

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report
DIPHENYLAMINE**

CAS No: 122-39-4

29.05.2008

欧州連合
リスク評価書(2008年5月29日最終承認版)
ジフェニルアミン

**European Union Risk Assessment Report
DIPHENYLAMINE**

CAS No: 122-39-4

EINECS No: 204-539-4

RISK ASSESSMENT

Final version of 29.05.2008

FINAL APPROVED VERSION

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2014年2月

本部分訳文書は、Diphenylamine (CAS No: 122-39-4)に関する EU Risk Assessment Report 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反応関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、

http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk_assessment/REPORT/diphenylaminereport306.pdf

を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量反応関係

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

吸収

経口投与されたジフェニルアミンは、ヒト、ウサギ、ラット (Alexander et al. 1965)でも、イヌ (DeEds 1963)でも、また、ウシでも (Gutenmann & Lisk 1975)、速やかに吸収される。哺乳類では、経口投与されたジフェニルアミンの少なくとも 68～89%が吸収される [FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JMPR), 1998]。経皮吸収に関するデータは得られていないが、皮膚浸透値を(物理的性質に基づいて)算出したところ、ジフェニルアミンが経皮毒性を有する可能性が示唆された (Fiserova-Bergerova et al, 1990)。その可能性については、ウサギを用いた経皮試験により明示されており、その試験では、ジフェニルアミンが閉塞経皮適用により経皮的に吸収されたことを示す所見が観察された。すなわち、蒸留水を媒体としたジフェニルアミンを用い、0、100、500、1000 mg/kg bw/日の用量で週6日経皮曝露を行って剖検したところ、中用量および高用量群のウサギの胃に暗赤色の病巣が観察された [Siglin の試験 (1992)、米国環境保護庁 (EPA) の報告書で引用されているが、原報告書は入手不可能であった]。肺からの吸収に関するデータは得られていない。

分布

分布に関するデータは得られていない。しかし、急性、短期、および長期毒性試験により標的組織が明らかとなっており、それからすると、体内で広範囲に分布するものと考えられる。経口曝露では、様々な動物種において、腎臓、肝臓、脾臓および造血系が、ジフェニルアミンの毒性影響の標的組織であることが判明している (DeEds, 1963 など)。

代謝と排泄

動物におけるデータ

ラットにおける代謝

雄の白色ラットに、5 mg のジフェニルアミン(プロピレングリコールに溶解)を単回腹腔内注射した。24 時間尿を集め、ジフェニルアミン、2-ヒドロキシジフェニルアミン、4-ヒドロキシジフェニルアミンおよび 4,4'-ジヒドロジフェニルアミンについて、薄層クロマトグラフィーにより検査を行った。4-ヒドロキシジフェニルアミンおよび 4,4'-ジヒドロジフェニルアミンが検出された。同じ代謝物が、白色ラットに 2 mg のジフェニルアミン(50%エタノール水溶液に溶解)を静脈注射した後、胆汁で検出された。なお、胆汁は 6 時間収集された (Alexander et al., 1965)。

^{14}C で均一に環標識したジフェニルアミンを、コーン油を媒体として、各群雌雄 5 匹ずつの Sprague-Dawley ラットに、5 mg/kg bw の用量で単回、または 14 日間非放射線標識ジフェニルアミンを 5 mg/kg bw/日の用量で投与したのに続いて 5 mg/kg bw の用量で単回、もしくは 750 mg/kg bw の用量で単回、経口投与した。排泄物を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー、もしくは質量スペクトル法により分析した。すべての用量群で、以下の 12 種類の代謝物が検出された。

- 4,4'-ジヒドロジフェニルアミン(非抱合型および O-硫酸抱合物もしくは O,O-二硫酸抱合物として)
- 4-ヒドロキシ-ジフェニルアミン(非抱合型および O-グルクロン酸抱合物、N-グルクロン酸抱合物、O-硫酸抱合物もしくは O,N-ジグルクロン酸抱合物として)
- インドフェノール(非抱合型および O-硫酸抱合物として)
- 3-ヒドロキシジフェニルアミン
- 2-ヒドロキシジフェニルアミン

これらの代謝産物と親化合物が、投与量の 82~92%の割合で排泄物中に、主として硫酸抱合物もしくはグルクロン酸抱合物の形で検出された。尿中代謝産物と糞便中代謝産物との間の差異については提示されていない[Wu の試験 (1993)、JMPR の報告書で引用されているが、原報告書は入手不可能であった]。ラットにおけるジフェニルアミンの代謝経路として、Figure 4.1 に示すものが提唱されている。

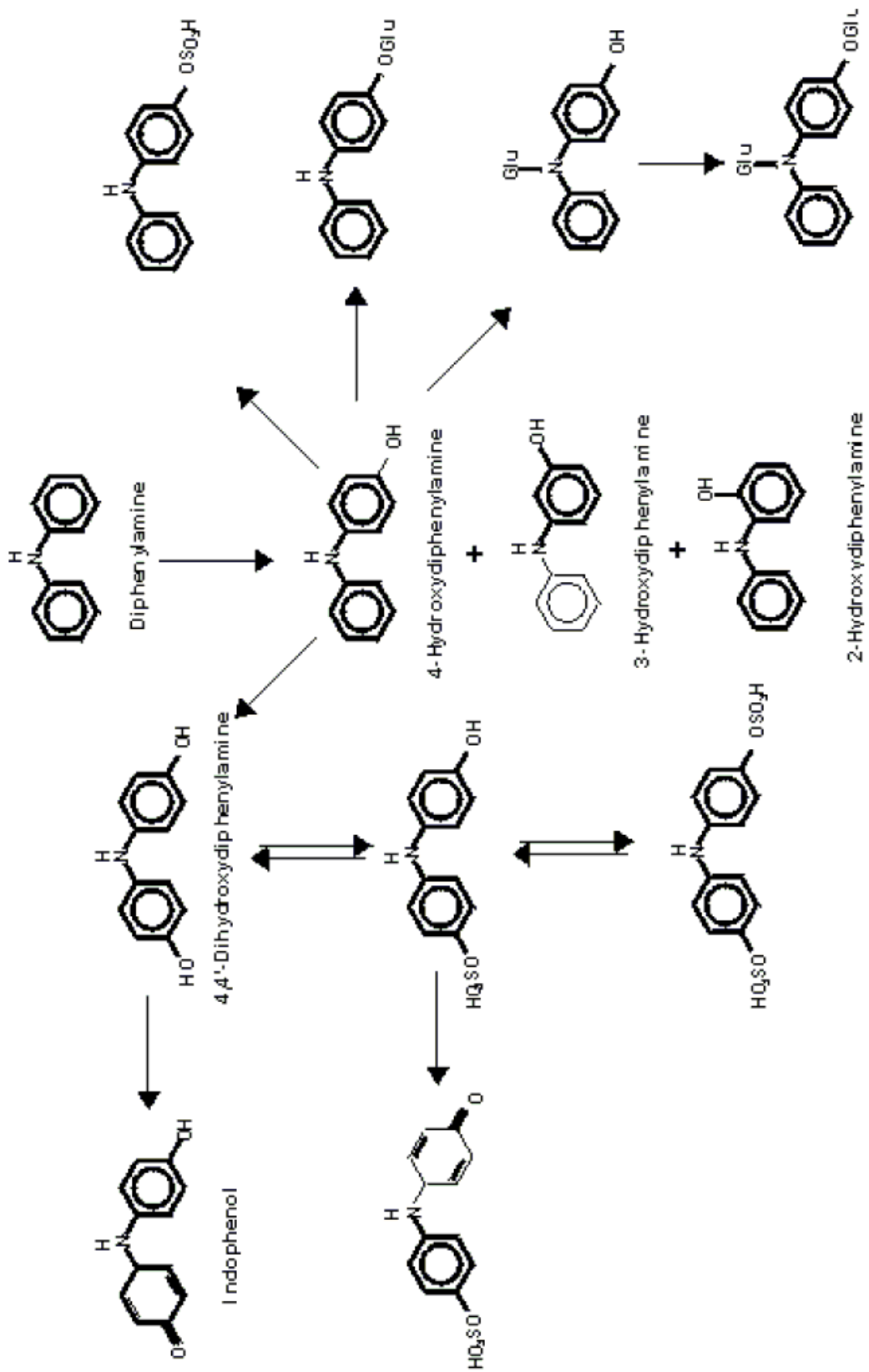


Figure 4.1: Metabolic scheme of diphenylamine in rats

ジフェニルアミンのニトロソ化

ジフェニルアミンを 0.01%、硝酸ナトリウムを 0.15% 含む標準飼料を、24 匹のラットに給餌した。動物を 6 匹ずつに分けて、30、60、120 および 180 分後に屠殺した。そして、胃の幽門部内容物中のジフェニルニトロソアミンの濃度を測定した。ジフェニルニトロソアミンの量は 120 分後が最大で、胃内容 1 g 当たり 37 μg であった (Sander et al. 1968)。

雌の Wistar ラットに、850 mg/kg bw のジフェニルアミンもしくは 1000 mg/kg bw の N-ニトロソジフェニルアミンを、コーン油を媒体として単回強制経口投与した。36 時間、尿を収集し、分析した。ジフェニルアミンについては、4-ヒドロキシジフェニルアミンが主要な代謝産物の 1 つであった。ジフェニルアミンの量は、比較的少なかった (0.02~0.05 μmol /ラット/36 h)。N-ニトロソジフェニルアミンを投与したラットでは、亜硝酸化合物 (約 15 μmol /ラット) や硝酸化合物 (約 150~250 μmol /ラット) も検出された (Appel et al. 1984a)。

ジフェニルアミンで処置した後の、肝臓における 2-デオキシグアノシンに対する 8-OH-2-デオキシグアノシンの量が、肝臓 DNA の HPLC 分析より検討されている (Lodovici et al. 1997)。ラットにジフェニルアミンを連続 10 日間、0.9~1.4 mg/kg bw/日の用量で経口投与した。対照群に比べ、全ての投与群で、8-OH-2-デオキシグアノシンの量が、用量依存的に増加した。著者は、この結果を受けて、ジフェニルアミンから、細胞遺伝学的損傷を惹起し得る活性酸素種が生成されると結論付けている。

ラットにおける排泄

雄の白色ラットに、 ^{14}C -ジフェニルアミンを 5 mg/kg bw の用量で腹腔内注射し、24 時間単位で尿を収集した。尿中の ^{14}C をシンチレーション計測によって分析した。代謝産物の同定は行われなかった。投与量の 75% が 48 時間以内に尿中排泄された。雄の白色ラットに、 ^{14}C -ジフェニルアミン (50% エタノール水溶液に溶解) を 5 mg/kg bw の用量で静脈内注射した場合には、6 時間後までに、放射活性の 25% が胆汁中に排泄された。胆汁中の ^{14}C は、シンチレーション計測によって分析された。代謝産物の同定は行われなかった (Alexander et al., 1965)。

^{14}C で均一に環標識したジフェニルアミンを、コーン油を媒体として、各群雌雄 5 匹ずつの Sprague-Dawley ラットに、5 mg/kg bw の用量で単回、または 14 日間非放射線標識ジフェニルアミンを 5 mg/kg bw/日の用量で投与したのに続いて 5 mg/kg bw の用量で単回、もしくは、750 mg/kg bw の用量で単回、経口投与した。尿、糞便およびケージ洗浄汚水を、投与の 4、8、12 および 24 時間後、以降は、24 時間単位で 168 時間後まで収集した。168 時間後までに尿中に回収された放射活性は、投与量の 68~89% であり、168 時間後までに回収された総

放射活性は、投与量の94～105%であった。それぞれの投与計画において回収された放射活性を、尿、糞便、ケージ洗浄汚水ごとに Table 4.1 に示した。体部や組織に残った放射活性の、投与量に対する割合の平均は、750 mg/kg bw 単回投与の場合は、雄で0.41%、雌で0.28%であり、他の投与計画においては0.14～0.28%であった〔Wu の試験(1993)、JMPR の報告書で引用されているが、原報告書は入手不可能であった〕。

Table 4.1: Recovery of radioactivity after oral administration of uniformly ¹⁴C-ringlabelled diphenylamine to Sprague-Dawley rats.

Dosing regime	Radioactivity in urine [% of the dose]	Radioactivity in feces [% of the dose]	Radioactivity in cage washes [% of the dose]
5 mg/kg bw	male: 81 female: 72	male: 9.1 female: 16	male: 9.2 female: 11
5 mg/kg bw preceded by 5 mg/kg bw nonradioactive diphenylamine for 14 days	male: 89 female: 68	male: 7.6 female: 21	male: 7.7 female: 12
750 mg/kg bw	male: 75 female: 73	male: 15 female: 8.8	male: 4 female: 11

ウサギにおける代謝

雄のウサギに、1 g のジフェニルアミン(水に懸濁)を、9 日間にわたり 5 回投与した。次に挙げる化合物が尿中に検出された。少量のジフェニルアミン、2-ヒドロキシジフェニルアミン、4,4'-ジヒドロキシジフェニルアミン、および 4-ヒドロキシジフェニルアミンの O-硫酸抱合物および O-グルクロン酸抱合物(トリ-O-アセチルメチルエステルとして) (Alexander et al. 1965)。

イヌにおける代謝

ビーグル犬(各群雌雄 2 匹ずつ)に、ジフェニルアミンを、0、0.01、0.1、もしくは 1.0%の用量で 2 年間混餌投与した。次に挙げる化合物が尿や糞便中に検出された。4-ヒドロキシジフェニルアミン、4-ジフェニルアミンの硫酸抱合物およびグルクロン酸抱合物、および 4,4'-ジヒドロキシジフェニルアミン。糞便中と尿中との間における代謝産物の差異や、投与量

との関連性についての情報は示されていない。胆汁中には、加水分解産物である 4-ヒドロキシジフェニルアミンが検出された (DeEds 1963)。

ウシにおける排泄

ホルスタイン種の乳牛に、4 日間、5 ppm の用量でジフェニルアミンを混餌投与する試験が行われている。10 日間、朝と夕に牛乳試料を採取し、1 日分を合わせて分析した。尿や糞便も、毎日収集・分析した。牛乳や尿では、痕跡量のジフェニルアミンも検出されなかった。最大で、総投与量(0.45 g)の 1.4%が糞便中に排泄された。ガスクロマトグラフィーによる手法では、ジフェニルアミンの水酸化物誘導体を検出することはできないと考えられた (Gutenmann & Lisk 1975)。

ヒトにおけるデータ

100 mg のジフェニルアミンを 2 人に単回経口投与したところ、尿中(投与後 24 時間まで収集)に未変化のジフェニルアミンと 2 種類の代謝産物が検出された。それら代謝産物は、4-ヒドロキシジフェニルアミンおよび 4,4'-ジヒドロキシジフェニルアミンであった。2-ヒドロキシジフェニルアミンや N-ヒドロキシジフェニルアミンは検出されなかった(検出法は薄層クロマトグラフィーであったが検出限界は示されていない) (Alexander et al. 1965)。

亜硝酸化合物を含む溶液を媒体として極少量のジフェニルアミンを投与された患者では、胃において N-ニトロソジフェニルアミンが生成された (Sander & Schweinsberg 1972)。ただし、ラットを用いた *in vivo* 試験やラットの肝細胞を用いた *in vitro* 試験で得られた知見 (Appel et al., 1984a; 1987) に基づくと、N-ニトロソジフェニルアミンは次に脱ニトロソ化されるものと結論付けられる。

In vitro 試験

In vitro でウシ肝臓由来の S9 分画と 5 ppm のジフェニルアミンをインキュベートしたところ、その約 50%が 30 分以内に転換された (Gutenmann & Lisk 1975)。ガスクロマトグラフィーによる手法が適用されており、ジフェニルアミンの水酸化代謝産物を検出できていないと考えられる。したがって、ジフェニルアミンから生成された代謝産物についての結論を、この試験結果から導き出すことはできない。

N-ニトロソジフェニルアミンを、再構成モノオキシゲナーゼ系(フェノバルビタールを投与されたブタのミクロソームから分離したシトクロム P-450 および NADPH P-450 還元酵素)

と共にインキュベートしたところ、1 nmol の P-450 あたり、0.18 nmol/分で亜硝酸化合物が生成された (Appel et al. 1984b)。

N-ニトロジフェニルアミンの代謝について、フェノバルビタール誘導マウス肝ミクロソームを用いて調べられている。代謝産物の 1 つはジフェニルアミンと同定され、他の代謝産物については、4-ヒドロキシジフェニルアミンやそれに対応したキノンイミン化合物であると判断された (Appel et al. 1987)。

ジフェニルアミンを NADPH と酸素分子の存在下でブタ肝ミクロソームで *in vitro* 酸化して、窒素酸化物のフリーラジカルを生成させる試験が行われている。その結果、0.22 mM のジフェニルアミンは、反応開始の 30 分以内にその 75% が転換されることが示された。酸化活性を有する産物の生成は、生合成されたジフェニルニトロキシドと化学合成されたジフェニルニトロキシドを、HPLC と電子スピン共鳴で比較することによって検出した。

結論：

経口投与されたジフェニルアミンは、ヒトや、ラット、ウサギ、イヌおよびウシなどのいくつかの動物種において、消化管からよく吸収される。親化合物の形で投与量の最大 3%、12 種類の代謝産物の形で投与量の約 80~90 が排泄される。代謝産物は、4-ヒドロキシジフェニルアミン、4,4'-ジヒドロキシジフェニルアミン、およびこれら水酸化代謝産物の硫酸もしくはグルクロン酸抱合物である。さらに、インドフェノールも代謝産物として検出されている。N-水酸化代謝産物は、芳香族アミンの性質からメトヘモグロビン血症の原因となるが、そのような代謝産物は検出されなかった。これらの結果から、ジフェニルアミンは速やかに代謝され、排出されると考えられ、また、体内蓄積は生じないと思われる。経皮投与や吸入曝露のデータは得られていない。リスクの総合判定においては、経口投与による吸収を 100% とすることが推奨され、経皮および吸入による吸収も、100% (デフォルト値) と仮定することになる。経皮吸収を 100% と仮定することは、ジフェニルアミンの物理化学的性質 (分子量: 169 g/mol、log Pow: 3.4、水溶性: 40 mg/L) によって支持される。潜在的に吸収性であることと、試験データが得られていないことから、吸入による取り込み量もデフォルトの 100% と仮定される。

4.1.2.2 急性毒性

動物におけるデータ

経口

雄の Syrian ハムスター、ラットおよびスナネズミで、経口 LD₅₀ 値が調べられている (Lenz and Carlton 1990)。それぞれ 40 匹の雄の Syrian ハムスター、ラットおよびスナネズミを、3 つの投与群と 1 つの対照群に、10 匹ずつ振り分けた。投与群の個体には、ジフェニルアミン (媒体は落花生油) が、400 mg/kg bw/日、600 mg/kg bw/日もしくは 800 mg/kg bw/日の用量で、1 日 1 回、連続 3 日間、強制経口投与された。対照群の動物には、落花生油のみの投与が行われた。試験期間中に瀕死状態になった動物は、3 回目の投与後 24 時間で安楽死させ、ただちに剖検した。600 mg/kg bw/日群の 10 匹中 6 匹、および 800 mg/kg bw/日群の 10 匹中 5 匹が、初回投与の 20 時間以内に活動性低下を示し、瀕死状態に陥った。600 mg/kg bw/日群の残りの 4 匹、および 800 mg/kg bw/日群の 2 匹が、2 回目の投与後 12 時間以内に死亡した。400 mg/kg bw/日群では、死亡例は無かった。この結果から、ハムスターにおけるジフェニルアミンの経口 LD₅₀ は、約 600 mg/kg bw/日であると結論付けられる。腎臓の肉眼病変が、600 mg/kg bw/日群および 800 mg/kg bw/日群で観察された。腎臓は腫脹し、艶の無い褐色部が拡散していた。その変色部は、被膜表面から見ることができ、皮質から髄質外層にかけて広がっていた。両群において、黄褐色化が、腎乳頭の肉眼病変においてのみ観察された。他の肉眼病変は、胃や脾臓に局限していた (胃潰瘍、脾腫)。雄ラットやスナネズミでは、死亡例は無かった。したがって、これらの動物種に関しては、経口 LD₅₀ は 800 mg/kg bw/日をこえるものと考えられた。剖検時、800 mg/kg bw/日群のラット 1 匹で、腎乳頭部に病変が認められたが、スナネズミに関しては、何ら所見は報告されなかった。

EU や OECD の現行のガイドラインに沿った試験が、ラットで実施されており、経口 LD₅₀ は 5000 mg/kg bw を超えると報告されている。10 匹ずつからなる 2 群に対して、3100 mg/kg bw もしくは 5000 mg/kg bw の用量で、ルトロールを媒体として強制経口投与された。14 日間の観察期間終了まで、3100 mg/kg bw 群では、臨床徴候や死亡例は全く観察されなかった。一方、5000 mg/kg bw 群では、3 日目から 4 日目にかけて 2 匹のラットが死亡し、また全ラットが、立毛や一般状態の悪化を示した (Bayer AG 1977)。

JMPR で示されたデータや提言の中で、純度 99.9% のジフェニルアミンの LD₅₀ 値が、ラットの雄 (2960 mg/kg bw/日) やラットの雌 (2480 mg/kg bw/日) について、言及されている。この報告書では、使用された方法や観察された臨床徴候に関する情報は提示されていない (Spanjers & Til 1982, FAO/WHO 1984 で引用された)。

嚢胞性の腎病変に焦点を当てた混餌投与試験が実施されている (Philbert et al. 1978, 4.1.2.9 項参照)。妊娠 2~3 日目の Wistar ラットと Hartley モルモットを 20 匹ずつ用い、それぞれの動物種で各用量群 2 匹に振り分け、2 ないしは 4% の工業用等級のジフェニルアミンを含む餌を与えた。平均投与用量は、ラットについては 1800 mg/kg bw ないしは 3600 mg/kg bw に、モルモットについては 2200 mg/kg bw ないしは 4400 mg/kg bw に相当した。投与開始後 1 か月以内に、2% 混餌投与群で 10% の動物が死亡し、4% 混餌投与群で 60% の動物が死亡した。臨床的に認められた中毒症状は、著しい体重減少、脱毛、被毛の淡色化の増加、および活力低下であった。最長 6 ヶ月の投与で生残した動物について、病理学的所見が報告されており、投与開始後 1 週間内での全妊娠動物における流産、肝壊死、および腎臓の近位尿管上皮細胞の壊死や皮質の嚢胞が認められた。

吸入

急性吸入毒性に関して、動物におけるデータは得られていない。

経皮

ウサギを用いた試験で、純度 99.9% のジフェニルアミンの経皮 LD₅₀ は、2000 mg/kg bw/日を超えると報告されている。この情報は、JMPR で示されたデータや提言の中から得られたものである (van Beek & Bruijntjes 1982, FAO/WHO 1984 で引用された)。

雌雄の New Zealand 白色ウサギを用いた試験では、ジフェニルアミン (純度 99.9~100.1%) に 24 時間経皮曝露させた場合の急性 LD₅₀ は、2000 mg/kg bw を超えていた。臨床徴候は指摘されていない。ラット (雌雄の情報無し) では、24 時間での経皮 LD₅₀ は 5000 mg/kg bw を超えていたと報告されている (Majnarich, 1991; 未公表試験; JMPR report, 1998 で引用された)。

ヒトにおけるデータ

ジフェニルアミンの急性毒性に関して、ヒトにおけるデータは得られていない。

結論：

ヒトにおいては、ジフェニルアミンの急性毒性に関するデータは得られていない。雄の

Syrian ハムスターについては、約 600 mg/kg bw/日という経口 LD₅₀ 値が報告されている。ラットや雄のスナネズミについては、経口 LD₅₀ 値は 800 mg/kg bw/日を超えると報告されている。経皮 LD₅₀ 値に関しては、ウサギで 2000 mg/kg bw/日超、ラットで 5000 mg/kg bw/日超と報告されている。ジフェニルアミンの急性吸入毒性に関するデータは得られていない。これらの情報から、ジフェニルアミンは、有害性有りと分類され、R22 警告文「飲み込むと有害」の表示を要するとされる。急性経皮毒性については表記を要しないとされる。急性吸入毒性を評価するには、EU や OECD の現行ガイドラインに則った動物試験が不足している。

4.1.2.3 刺激性

ウサギを用いた試験では、ジフェニルアミンは、全く皮膚刺激性を示さないか、示したとしても非常に軽微なものであった。2 匹の Albino ウサギを用いて、耳の内側表面におけるジフェニルアミン(純度不詳)の皮膚刺激性が調べられており、ジフェニルアミンが 24 時間閉塞適用された(媒体が用いられたか否かの情報は提示されていない)。7 日間の観察期間中、刺激症状は認められなかった(Bayer AG, 1977)。無希釈のジフェニルアミン 0.5 g を、ウサギの無傷の皮膚ならびに擦過処置した皮膚に適用した試験について、JMPR の報告書で引用されており、非常に軽微な一次刺激症状が生じた。この試験について、さらに詳しい情報は提示されていない(van Beek 1982, FAO/WHO 1984 で引用された)。より最近の試験について、JMPR の報告書(1998)で引用されており、ウサギに対してジフェニルアミン(純度 99.9 ~100.1%)が皮膚刺激性を示さなかったことを明らかにしている(Kreuzmann, 1991; 未公表試験; JMPR report, 1998 で引用された)。

Albino ウサギを用いて、精製ジフェニルアミンの皮膚一次刺激性試験が、EPA のガイドラインに則って実施されている(Elf Atochem North America Inc. 1994a, 試験は 1982 年実施)。0.5 g のジフェニルアミンを、6 匹のウサギのそれぞれ無傷皮膚 2 箇所および擦過処置皮膚 2 箇所に塗布された。24 時間閉塞状態にして曝露させた結果、軽微な影響が観察された。72 時間後の最後の観察では、24 の塗布箇所のうち 6 箇所で、非常に軽微な浮腫(グレード 1)が見られた。

ジフェニルアミンの眼刺激性についてのデータは、矛盾したものがあり、また、十分に報告されていない。2 匹のウサギの眼に 50 mg のジフェニルアミンを滴下して行ったドライズ眼刺激性試験では、中等度の結膜刺激症状が認められた。その動物のうち 1 匹が、7 日間の観察期間中に、軽微から中等度の結膜刺激症状(発赤および浮腫)を示した。これらの影響が可逆的であったか非可逆的であったかについては、情報が示されていない(Bayer AG 1977)。

別のドレイズ眼刺激性試験が、3匹のウサギを被験動物とし、0.1 g の試薬等級のジフェニルアミンを用い、EU および OECD の現行ガイドラインに準拠して行われている。ドレイズ評点法に則って、角膜混濁、発赤、結膜浮腫、分泌物および虹彩炎に関して評価を行った。EU の分類法と同様に、角膜や結膜の損傷が回復するまでに 21 日より長くかかる場合は、その化学物質を強い刺激性物質として分類するものとした。この試験の結果では、ジフェニルアミンは、「角膜を含め、刺激症状や眼の損傷が、投与後 21 日より長く持続」したことから、眼に対して「腐食性」を示す物質であると分類された(Sugai et al. 1990)。ただし、ドレイズ評点の数値も、どのような影響を及ぼしたかについても、提示されていない。さらに 1 件、6 匹のウサギを被験動物とし、0.1 g の精製ジフェニルアミンを用いて、眼刺激性試験が行われている(Elf Atochem North America Inc. 1994b, 試験は 1982 年実施)。試験は EPA のガイドラインに準拠して行われ、軽度から中等度の影響が認められた。投与 24 時間後に、軽度の虹彩炎(1 匹のみで、評点は 1)や、軽度から中等度の結膜炎を発症した。平均のドレイズ評点は、24、48、72 時間後および 4、7 日後で、結膜の発赤についてはそれぞれ 1.2、1.2、1、0.4、0.2、結膜浮腫についてはそれぞれ 1、1、0.5、0.5、0.2 であった。観察期間が進むにつれて、これらの影響は徐々に消失していった。10 日後には、処置を受けた眼はすべて正常状態に回復した。JMPR の報告書(1998)では、Kreuzmann による未公表試験(1991)について触れられており、0.1 g のジフェニルアミン(純度 99.9~100.1%)を 1 匹のウサギに 7 日間、眼の洗浄を行わずに適用した後に、腐食性が示され角膜混濁が生じたとの報告がなされたとしている。

ヒトにおけるデータ

データは得られていない。

結論：

ジフェニルアミンの局所刺激性や腐食性に関して、ヒトにおけるデータは得られていない。ジフェニルアミンは、ウサギを用いた試験において、皮膚刺激症状を引き起こさないか、極軽微な皮膚刺激症状を引き起こすだけにとどまった。

ジフェニルアミンの眼刺激性についてのデータは、相反したものがあり、また、十分な報告がなされていないが、眼に対して重篤な損傷をもたらす可能性に関し、リスクがあるのではないと思われる。2 件の試験において、ともにジフェニルアミンにより重度の眼刺激症状が報告されている(1 件はガイドラインに適合していることを記載している)。これらの試験のうち 1 件においては、影響が 21 日間では不可逆であったことが述べられている。し

たがって、R41 警告文「眼の重篤な損傷のリスク有り」と適切に表記することが提言される。

4.1.2.4 腐食性

皮膚への影響を調べた試験の全てにおいて、弱い皮膚刺激性しか示されていない(4.1.2.3 項)。したがって、ジフェニルアミンは、腐食性物質ではない。

4.1.2.5 感作性

動物におけるデータ

ジフェニルアミン(純度 99.9%)は、モルモットで皮膚感作を引き起こさなかった〔Kiplinger, 1995, JMPR の報告書(1998)で引用された〕。

皮膚感作性に関して、動物におけるデータは、他に得られていない。

ヒトにおけるデータ

電気回路ブレーカ工場に勤務し、金属、プラスチックおよび潤滑剤を取り扱っていた 44 歳の女性が、手の甲に、滲出物を伴う小胞性皮膚炎を発症した。パッチテスト(被験物質濃度 1%、媒体については言及されていない)の結果、ジフェニルアミンに対して陽性であったが、p-フェニレンジアミンに対しては陰性であった(Bazin et al. 1986)。9つの市で、合計 1012名の湿疹患者について、パッチテストが実施された(被験物質濃度: 1%、媒体: ワセリン)。その中の1つの市では、3名の陽性患者がいた。これらの患者は全て、p-フェニレンジアミンに対して陽性であったことが知られており、今回の陽性反応は、交差感受性によるものと考えられた。ジフェニルアミンが 0.1%の濃度で含まれている香水原料の使用により、曝露が起こった可能性がある」と述べられている(Calnan 1978)。生成化学薬品の品質管理や分析に携わっていた 16名の集団で、皮膚炎の流行が起こった。それら従業員のうち 11名に対し、メタノールを媒体とした 1%の濃度のジフェニルアミンを用いて、パッチテストが実施された(残りの従業員のうち 4名は別の化学物質を用いたテストを受けた)。従業員の誰にも、陽性反応は見られなかった(Slovak 1980)。30名のボランティアを対象に、マキシミゼーションテストが実施されたが、誰にも感作反応は引き起こされなかった(ワセリンを媒体とし、1%の濃度で実施; Epstein 1976)。

呼吸器感作

気道でのジフェニルアミンの感作性についての情報は得られていない。しかし、ジフェニルアミンは、使用し始められてから今日まで、具体的な症例報告が発信されていないことから、ヒトに対して強力な気道感作性を示さないと考えられる。

結論：

ジフェニルアミン(純度 99.9%)は、モルモットで皮膚感作を引き起こさなかった[Kiplinger, 1995, JMPR の報告書(1998)で引用された]。接触アレルギーの様相を示した女性の症例が、1例存在する。11名あるいは1012名の患者を対象とした調査では、ジフェニルアミンが原因であるような皮膚感作例は認められなかった。ジフェニルアミンに陽性反応を示した前述の女性の例では、p-フェニレンジアミンへの交差感作性は認められなかったが、陽性であった3名の患者では、交差感作性が疑われた。30名のボランティアを対象に実施されたマキシミゼーションテストでは、感作反応は全く引き起こされなかった。これらのデータは、ジフェニルアミンがヒトに対して弱い感作性を有するか、あるいはまったく感作性を持たないことを示している。p-フェニレンジアミンとの交差感作性が生じるのは稀ではあるが、可能性を除外するべきではない。しかしながら、消費者として、あるいは従業員として曝露されたヒトにおいて、全般的に陰性データが得られていることから、警句 43「皮膚接触により感作を生じる可能性有り」を適用することは妥当ではない。さらに、ヒトのボランティアにおいて、ジフェニルアミンは、接触アレルギーを引き起こすことは全くなかった。

4.1.2.6 反復投与毒性

動物における試験

経口

強制経口投与試験

Sprague Dawley から派生した系統のラットの雄6匹に、338 mg/kg bw/日の用量で、ジフェニルアミンが21日間強制経口投与された(対照群は5匹)。投与群の動物は、腎乳頭の20%の壊死、腎重量増加および尿濃縮能の低下を示した(Hardy 1974)。

雌雄のFischerラットを用いて、ガイドラインに準拠した28日間経口投与試験が行われている。111、333ないしは1000 mg/kg bw/日の用量で、ジフェニルアミンが強制経口投与され

た。36 匹を、同匹数の 6 群に分け、4 群には通常投与を行い、残りの群で回復の検討を行った。高用量群の雌雄両方において、体重増加抑制、肝臓、脾臓および腎臓重量の増加、ならびに貧血が観察された。同群で、組織病理学的検査により、全胃部の粘膜過形成、腎臓の皮髄境界部における尿細管の拡張、変性もしくは壊死、骨髄の過形成が認められた。333 mg/kg bw/日群の数匹において、肝臓、脾臓および腎臓重量の軽微な増加や、腎尿細管の軽微な変性が認められた。14 日が経過すると、組織病理学的病変の修復が見られたが、貧血が生じた。低用量群では毒性影響がまったく認められなかったことから、この試験条件下で、111 mg/kg bw/日という NOAEL を導くことができた(Yoshida et al. 1989)。

混餌投与試験

ラット

雄ラットに、ジフェニルアミンが、飼料中濃度 2.5% で 19 週間にわたり混餌投与された(1250 mg/kg bw/日に相当)。最初に検出された微細形態学的な腎病変は、近位尿細管の上皮細胞における、電子密度の高い物質の出現である。これらの細胞は、変性を起こした。同様の事象が、ネフロンの遠位部においても認められ、細胞の密集化、細胞内ミトコンドリアの膨張および細胞剥離を伴っていた。その結果、尿細管で閉塞が起こり、尿細管拡張、嚢胞形成、および隣接する実質に対する圧迫が引き起こされた(Woodhouse et al. 1965)。

各群 40 匹の Albino ラット(雌雄 20 匹ずつ)を用いて、2 年間にわたる、ジフェニルアミンの混餌投与試験が行われている。飼料中濃度は、0.001% (0.5 mg/kg bw/日に相当)、0.01% (5 mg/kg bw/日に相当)、0.1% (50 mg/kg bw/日に相当)、0.5% (250 mg/kg bw/日に相当)、ないしは 1.0% (500 mg/kg bw/日に相当)であった。混餌投与中、初めの 240 日目までは、0.1% (50 mg/kg bw/日)までの群では、動物の生育や体重に影響は現れなかった。高濃度群では、生育遅延が有意に認められた。1.0% (500 mg/kg bw/日)群では、摂餌量が、対照群に比べて 10%低下した。血液学的検査(126 日目と 463 日目に実施)では、ヘモグロビン値低下、赤血球減少および正赤芽球の増加が認められ、軽微な貧血が明らかとなった。死亡率が増加することはなく、対照群との差異は認められなかった。0.1%群と 0.5%群の動物では、尿細管拡張の徴候とともに、慢性間質性腎炎が明らかとなった(DeEds, 1963 要約版)。

雌の Albino ラット(各群 6 匹)を用いて、226 日間の、ジフェニルアミンの混餌投与試験が行われている。飼料中濃度は、0%、0.25% (125 mg/kg bw/日に相当)、0.1% (50 mg/kg bw/日に相当)、0.5% (250 mg/kg bw/日に相当)、1.0% (500 mg/kg bw/日に相当)、ないしは 1.5% (750 mg/kg bw/日に相当)であった。飼料中濃度 0.5%以上の群でみられた主要な毒性影響は、生育遅延、尿細管の巣状拡張、および遠位尿細管や集合尿細管における嚢胞形成であった

(Thomas et al. 1957)。

雄の Sprague Dawley ラットに、ジフェニルアミンを、1.0%の飼料中濃度(500 mg/kg bw/日に相当)で、最長 76 週間混餌投与した試験が行われている。2 から 6 週間経過すると、多尿症や尿の希薄化が生じた。5 週間後には最初の病理組織学的変化が現れ、それは遠位尿細管細胞および集合尿細管細胞の巣状増殖であったと記載されている。髄質尿細管の病巣部では、いくつかの細胞同士が重なり合い、肥厚が見られた。10 週までには、集合管は巣状壊死を伴って嚢胞状に拡張し、尿細管腔には円柱様物質が増加していた。この試験は毒性学上の目的で企図されたものではないため、NOAEL は導出されなかった(Evan et al. 1978)。

さらに、各群 40 匹の Albino ラットを用いて、2 年間の、ジフェニルアミンの混餌投与試験が行われている。飼料中濃度は、0.001% (0.5 mg/kg bw/日に相当)、0.01% (5 mg/kg bw/日に相当)、0.1% (50 mg/kg bw/日に相当)、0.5% (250 mg/kg bw/日に相当)、ないしは 1.0% (500 mg/kg bw/日に相当)であった。0.5%群および 1.0%群の雌雄で、中等度の発育遅延が認められた。これは餌に対する嗜好性が悪く、摂餌量が少なかったためと考えられた。0.1%群では、遠位尿細管および集合管の嚢胞状拡張、それに伴って間質に炎症が生じた。間質の炎症は 0.5%群でも見受けられた。近位尿細管の変化は非常に稀であり、糸球体には変化は全く生じなかった。0.01% (5 mg/kg bw/日、NOAEL 値)以下では、何ら投与に関連した変化は引き起こされなかった(Thomas et al. 1967a)。

雌の Sprague Dawley ラットに、飼料中濃度 2.5%でジフェニルアミンを混餌投与した試験では、3~6 週間経過後、検査に供された腎臓の約 10%に、肉眼で確認できる嚢胞が生じていた。しかし、全ての腎臓が形態学的な変化を示しており、集合管の拡張が最も一貫して認められた組織学的所見であった。さらに、腎臓の尿濃縮能が 2 週間以内に低下した(Eknoyan et al. 1976)。

雄の Sprague Dawley ラットに、ジフェニルアミンを、1.0%の飼料中濃度(500 mg/kg bw/日に相当)で、5~12 か月間混餌投与した試験が行われている。検査に供された全ての腎臓で、尿細管の拡張や嚢胞の形成が認められた。尿細管や集合管の管腔は、所々に細胞残屑が溜まっており、一部は腔内を閉塞していた。影響を受けた尿細管では、腔内静水圧が上昇していた。組織学的検査により、拡張した尿細管と形成された嚢胞が結合して、閉塞や隣接する組織構造の圧迫を引き起こしていることが明らかとなった。この所見は、腎臓での機能障害の存在を示す、形態学的な根拠であると解釈された。血液学的パラメータについては検討されていない(Gardner et al. 1976)。

各群雌雄 10 匹ずつの Sprague Dawley に、一般化学試験等級のジフェニルアミンを、90 日間混餌投与した試験が行われている。飼料中濃度は、0、150、1500、7500 ないしは 15000 ppm

で、これらは雄においてはそれぞれ 0、9.6、96、550 ないしは 1200 mg/kg bw/日に相当し、雌ではそれぞれ 0、12、110、650 ないしは 13000 mg/kg bw/日に相当した。尿の暗色化が、1500 ppm 群で 1 匹の雌で認められたのを皮切りに、15000 ppm 群では 100%の動物に認められ、用量依存的にその頻度が上昇した。血液学的な測定では、赤血球数やヘモグロビン値の減少が示され、試験終了時では、7500 および 15000 ppm 群において、対照群との比較で統計学的有意差が認められた。ヘマトクリット値は、高用量側の 3 群の雌で、対照群に比べて統計学的に有意に減少していた。7500 および 15000 ppm 群では、雄においてはアルカリホスファターゼ活性、アルブミン含量およびアルブミン:グロブリン比に、雌においては血糖値、アルブミン含量およびアルブミン:グロブリン比に、有意な軽度の上昇が見られた。コレステロール濃度は、雌において用量依存的に上昇し、高用量側の 3 群では、対照群との比較で統計学的に有意差が認められた。また、雄においては、肝臓や脾臓の絶対および相対重量が用量依存的に増加し、7500 および 15000 ppm 群では統計学的に有意であった。腎臓や生殖腺の相対重量も用量依存的に増加し、高用量側の 2 群ではやはり統計学的に有意であった。雌においては、肝臓の絶対および相対重量が用量依存的に増加し、相対重量の変化は、1500 ppm を超える群で統計学的に有意であった。腎臓は、7500 および 15000 ppm 群で、雌雄いずれにおいても暗色化しており、肝臓については、最高用量群の雌の 60%で、暗色化や肥大が認められた。脾臓は、高用量側の 2 群の雌雄両方で鬱血していた。組織病理学的検査により、7500 および 15000 ppm 群の雌雄の両方で、肝臓における造血亢進や色素沈着、脾臓における造血亢進やヘモジデリン沈着および鬱血像、および腎臓における色素沈着について、発生率の増加が明らかとなった。1500 ppm 群のすべての雌において、脾臓は、極軽微から軽微な造血亢進およびヘモジデリン沈着を示していた。毒性に関わる臨床症状、臨床化学的变化、臓器重量の変化、および肉眼的・組織病理学的所見に基づくと、NOAEL は、150 ppm であり、これは 12 mg/kg bw/日に相当する (Krohmer, 1992a)。

ラット(各群雌雄 10 匹ずつ)を用いて、90 日間混餌投与試験が行われている。ジフェニルアミンの飼料中濃度は、0.01、0.03、0.1、0.3 ないしは 1%であり、これらはそれぞれ 5、15、50、150 および 500 mg/kg bw/日の投与用量に整合するように設定された。使用したラットの系統も明示されておらず、要約だけが入手された試験報告である(詳細な報告は入手不能であった)。結果に関しても、生育についてのデータ、雌における血液学的項目の平均値および剖検時に測定した臓器重量の平均値が示されているだけである。0.01 および 0.03%群の雄では、外表、行動、生育、摂餌量、死亡率、試験終了時における体重や臓器重量に関しても、また、肺、心臓、肝臓、脾臓および精巢の肉眼的および顕微鏡学的検査においても、有害影響の所見は認められなかった。雌では、全ての群において肝臓重量が統計学的に有意な増加を示し、飼料中濃度 0.03%以上の群において脾臓重量が増加した。雄ラットの肝臓重量は、飼料中濃度 0.01%以上の群で増加した。飼料中濃度 0.3%群では、肝臓、腎臓および脾臓の色が褐変し、鬱血が見られ、また、脾臓重量の増加が認められた。50 日後には、

飼料中濃度 1.0%群の雌雄両方で、深刻な影響(衰弱、生育遅延、肝臓および脾臓の重量増加、肝臓における小葉中心性壊死、腎炎の増加、脾臓鬱血)が確認された。さらに、飼料中濃度 1.0%群の雄では、上気道感染症により死亡率が上昇し、雌では、血液学的検査の平均数値が対照群と比べて悪化していた。この試験からは、雌における肝臓重量に対する影響に基づき、0.01% (5 mg/kg bw/日) という LOAEL が得られた。雌におけるその重量変化は小幅なものであり、機能に対する悪影響を伴うものではなかったため、この LOAEL は、ジフェニルアミンのリスク総合判定においては考慮に入れられないと思われる (Dow Chem, 1958)。

イヌ

各群 4 匹(雌雄 2 匹ずつ)のビーグル犬に、飼料中濃度 0.01% (8 mg/kg bw/日に相当)、0.1% (77 mg/kg bw/日に相当)ないしは 1.0% (769 mg/kg bw/日に相当)のジフェニルアミンを、2 年間にわたり混餌投与した。投与用量は、改訂版 TGD (訳注:EU 技術指針書)の Annex VI に示されている、摂餌量に関する動物種別の方程式に基づいて、報告者によって算出された。400 日目までは、低い側の 2 つの用量群において、生育(体重)に対する影響はみられなかった。高用量群では、体重増加量が明らかに抑制された。したがって、77 mg/kg bw/日という用量が、NOAEL であると考えられた。飼料中濃度 1.0%群では、ヘモグロビンと赤血球の減少がみられ、スルホプロモフタレイン(訳注:肝臓の異物排泄能を知るために使用される指標物質)の滞留の徴候が認められた。同群では、脾臓、腎臓および肝臓の重量が増加した。組織病理学的検査により、肝細胞でのビリルビン蓄積の徴候や、脾臓、腎臓、肝臓および骨髄での軽微なヘモジデリン沈着があることが明らかとなった (DeEds, short version 1963)。

雌雄共に含む各群 4 匹の純血ビーグル犬に、ゼラチンカプセルに入れられた一般化学試験等級のジフェニルアミン(純度 99%超)が、0、10、25 ないしは 50 mg/kg bw/日の用量で、90 日間投与された。死亡、臨床症状、体重、摂餌量、眼科的パラメータ、血液学的パラメータ、臨床化学的パラメータ、尿パラメータ、臓器重量、および肉眼的・組織病理学的所見について、観察が行われた。死亡例は無く、上述のどの項目に関しても投与に関連した変化は認められなかった。ただし、高用量において、アルブミン含量、雄におけるアルブミン:グロブリン比、雌におけるビリルビン含量などの、いくつかの臨床化学的パラメータで、統計学的に有意な上昇が認められた。これらの影響は、偶発的なものであると思われた。したがって、最も高い設定用量の 50 mg/kg bw/日が NOAEL とされた (Krohmer, 1992b)。

各群 4 匹(雌雄 2 匹ずつ)のビーグル犬に、飼料中濃度 0.01% (2.5 mg/kg bw/日に相当)、0.1% (25 mg/kg bw/日に相当)ないしは 1.0% (250 mg/kg bw/日に相当)のジフェニルアミンを、2 年間混餌投与した。中用量群および高用量群では、1 年後の時点で、顕著な生育遅延が認められた。同群で、用量依存性の貧血がみられ、高用量群では著しく、中用量群では中等度であった。2 年後では、飼料中濃度 1.0%群において、赤血球の低浸透圧に対する抵抗性が、

中等度の低下を示した。618 から 627 日目にかけて行われたスルホプロモフタレイン試験による肝機能検査の結果から、飼料中濃度 1.0%群における、中等度の肝障害が示された。したがって、本試験における NOAEL は、25 mg/kg bw/日の用量で認められたヘモグロビン含量や赤血球数の軽微な減少に基づき、2.5 mg/kg bw/日となる。動物には、肝小葉周辺帯脂肪変性と脂肪含量の増加を伴った肝臓重量の増加、脾臓や腎臓および骨髄における軽度のヘモジデリン沈着、および腎臓重量の軽微な増加も認められた(Thomas et al. 1967b)。

マウス

合計 1200 匹の Charles River CD-1 マウス(両性を含む)に、飼料中濃度 0 ppm、50 ppm(7.5 mg/kg bw/日)、100 ppm(15 mg/kg bw/日)ないしは 250 ppm(37.5 mg/kg bw/日)のジフェニルアミンが、最長 92 日間混餌投与された。ジフェニルアミンへの曝露は、生育、一般状態、生存率、自然疾患の発生、主要な血液学的数値(メトヘモグロビン含量など)、そして関連組織のいかなる組織病理学的検査結果に関しても、影響を及ぼすことはなかった。唯一の明白な影響は、飼料中濃度 250 ppm(0.025%)群における、赤血球中のハインツ小体の出現であった。回復期間を 5 週間与えても、ハインツ小体の量は、代表的な対照値の範囲を逸脱していた。同系統のマウスに、飼料中濃度 0 ppm、5 ppm(0.75 mg/kg bw/日)、10 ppm(1.5 mg/kg bw/日)、50 ppm(7.5 mg/kg bw/日)、100 ppm(15 mg/kg bw/日)、250 ppm(37.5 mg/kg bw/日)ないしは 1000 ppm(150 mg/kg bw/日)のジフェニルアミンが、12 週間混餌投与された。飼料中濃度 50 ppm 以上の群で、ハインツ小体が確認された。ハインツ小体は、1~2 週間以内に出現した。飼料中濃度 1000 ppm(0.1%)群のマウスの赤血球において、グルコース-6-リン酸脱水素酵素および 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素の一時的な減少が観察された(Ford et al. 1972)。この試験は、要約しか得られていないが、1.5 mg/kg bw/日という NOAEL を導出することができた。

各群雌雄 15 匹ずつの Swiss-derived CD-1 マウスに、一般化学試験等級のジフェニルアミンが、飼料中濃度 0、10、52、260 ないしは 520 ppm(雄で 1.7、94、440 および 920 mg/kg bw/日、雌で 2.1、110、560 および 1100 mg/kg bw/日の用量に相当)で、90 日間混餌投与された。血液学的検査では、高用量側の 2 群の動物において、赤血球数やヘマトクリット値に、用量依存的な減少が認められ、それらの値は対照群の値との統計学的有意差が認められた。平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球容積、および平均赤血球ヘモグロビン濃度の値が用量依存的に増加し、高用量側の 2 群については、対照群との統計学的有意差が確認された。平均赤血球ヘモグロビン濃度は、飼料中濃度 52 ppm 群の雄でも、統計学的に有意に増加した。網状赤血球数は用量依存的に増加し、最高用量群では、対照群に対して有意差が認められた。雄では、肝臓や脾臓の絶対および相対重量が用量依存的に増加し、高用量側の 2 群では対照群との統計学的な有意差が確認され、腎臓や心臓の相対重量は、最高用量

群で、対照群との統計学的有意差が認められた。雌では、脾臓の絶対および相対重量が用量依存的に増加し、高用量側の 2 群では対照群との統計学的な有意差が確認され、肝臓の絶対および相対重量ならびに腎臓の相対重量は、最高用量群で、対照群との統計学的有意差が認められた。雌の剖検では、高用量側の 3 群で脾臓の暗色化や肥大が、高用量側の 2 群で肝臓の暗色化が、最高用量群で腎臓の暗色化が観察された。雄の剖検では、高用量側の 2 群で、脾臓や肝臓の暗色化や肥大が観察された。肝臓の組織病理学的検査により、高用量側の 2 群で、雌雄どちらにおいても、色素沈着や軽微な造血亢進が明らかとなった。脾臓は、高用量側の 3 群で、ヘモジデリン沈着や鬱血が認められ、高用量側の 2 群ではそれらの発生率は 14/15 以上であった。脾臓における造血亢進の程度も、高用量側の 3 群で上昇していた。腎臓は、高用量側の 2 群で、色素沈着が明らかとなった。膀胱炎も観察され、発症率は、最高用量群の雄で 9/15、飼料中濃度 260 ppm 群の雌で 2/15、飼料中濃度 520 ppm 群の雌で 8/14 であった。骨髄の細胞充実度は、高用量側の 2 群で上昇した。血液学的パラメータの変化と剖検での所見に基づき、NOAEL は 10 ppm (1.7 mg/kg bw/日に相当) とされた (Botta, 1992)。

吸入(ラット/マウス/イヌ/その他)

データは得られていない。

経皮

ウサギ

各群雌雄 5 匹ずつの New Zealand 白色ウサギに、蒸留水に溶解した一般試験用等級のジフェニルアミンを、100、500 ないしは 1000 mg/kg bw/日の用量で反復適用した。被験物質は、体表の約 10% に相当する毛刈りした皮膚の 1 箇所を毎日塗布され、6 時間閉塞状態に置かれた。これを連続 21 日繰り返し、22 日目に屠殺した。さらに雌雄 5 匹ずつの 2 群を対照として設けた。死亡例は無く、臨床症状、体重、摂餌量および血液学的項目にも、投与に関連した影響はみられなかった。臨床化学的項目に関して、唯一投与に関連したと考えられる影響が、ナトリウムやカリウム濃度の変化として認められた。すなわち、対照群と比べ、投与を受けた全 3 群の雌ではナトリウムの値が減少し、中用量および高用量群の雌ならびに高用量群の雄ではカリウムの値が減少していた。剖検では、中用量と高用量の雌雄で、胃に暗赤色の病巣の存在が明らかとなった。その病巣の出現頻度は用量依存的に上昇し、中用量の雄における出現頻度は 1/5 匹、高用量の雄では 4/5 匹、中用量の雌では 1/5 匹、そして高用量の雌では 2/5 匹であった。対照群や低用量群では、胃にそのような暗赤色の病変

は観察されなかった。雌雄の胃における暗赤色病巣の出現に基づき、全身毒性に関する NOAWL は 100 mg/kg bw/日となる (Siglin, 1992)。

Sprague Dawley ラットを用いて 90 日間経皮投与試験が行われており、2 群に対して、それぞれ 500 もしくは 1000 mg/kg bw/日の用量で、週に 5 日間投与が行われた (Mobil Oil Corp., 1994)。対照群にはジフェニルアミン無しで、同等の処置が施された。ラットは単一のケージで飼育され、被験化合物が経口摂取されるのを防ぐために、カラーを装着された。この試験では、被験物質投与群が 2 つしか設けられていないため、OECD の試験要項に完全に準拠するものではない。全身毒性の徴候は無く、体重増加量にも投与による影響はみられなかった。被験物質投与群では、血清生化学および血液学的パラメータに変化が見受けられた。これらのような所見は対照群の動物でもある程度観察されており、背景対照の範囲を逸脱するものではなかった。ジフェニルアミンを 90 日間にわたり経皮適用した場合の全身毒性に関する NOAEL は、高用量群の雄で認められた腎臓の相対重量の増加に基づき、500 mg/kg bw/日となる。被験物質投与群の動物全てで、投与部位に皮膚の過形成が生じた。したがって、局所的影響に関する NOAEL は得られなかった。90 日間投与による皮膚での局所的影響に関する LOAEL は 500 mg/kg bw/日である。

その他の情報

雄の Syrian ハムスター、雄の SD ラットおよび雄のスナネズミに、それぞれ 400、600 ないしは 800 mg/kg bw/日の用量で、ジフェニルアミンが連続 3 日間、強制経口投与もしくは腹腔内注射された。最後の投与から 24 時間後に動物を屠殺し、腎臓をヘマトキシリン・エオジン染色により組織学的に検査した。Syrian ハムスターでは、600 mg/kg bw/日群の 10 匹のうち 6 匹、および 800 mg/kg bw/日群の 10 匹中 5 匹が、最初の経口投与後に瀕死状態となったため、試験終了の日よりも前に剖検した。腎乳頭全体にわたる壊死が、400、600 ないしは 800 mg/kg bw/日の用量で経口投与を受けた雄の Syrian ハムスターにおいて、それぞれ 10 匹中 4 匹、10 匹中 7 匹および 10 匹中 6 匹で観察された。腎乳頭全体にわたる壊死は、600 ないしは 800 mg/kg bw/日の用量で腹腔内投与を受けた雄の Syrian ハムスターにおいても、それぞれ 10 匹中 4 匹および 10 匹中 3 匹で観察された。800 mg/kg bw/日の用量で経口投与を受けた雄の SD ラットでは、その 2 匹に、腎髄質ピラミッド頂部や直細動脈に局限した間質細胞の壊死、および腎間質マトリクスの変性が生じた。スナネズミでは、肉眼病変もしくは顕微鏡学的病変を生じた例はみられなかった。これらの結果から、Syrian ハムスターは、SD ラットおよびスナネズミよりも、ジフェニルアミンによる腎乳頭への毒性に対して、感受性が高いと結論付けられた (Lenz and Carlton 1990)。

ジフェニルアミンについて、多嚢胞腎疾患を引き起こす化合物として検討した試験が、様々

な動物種を用いて多数行われている (Alvarez et al. 1987; Darmady et al. 1965; Darmady and Offer 1970; Thomas et al. 1957; Safouh et al. 1970; Evan and Gardner 1976; Evan et al. 1979; Philbert et al. 1978; Powell et al. 1987; Rohrbach et al. 1993; Kronevi and Holmberg 1979; Kronevi and Holmberg 1980)。

これらの試験は、比較的高用量の設定で実施されており、また、現行の毒性学的試験のガイドラインに沿っていないため、リスク評価における重要な影響の選択に際して、有用な情報を与えるものではない。

動物における反復投与毒性データの要約

ジフェニルアミンの反復吸入による影響に関するデータは得られていない。

動物におけるジフェニルアミンの混餌投与試験の結果から、最も感度の良い毒性の指標は、軽微な貧血やハインツ小体形成などの、血液学的影響であると思われた (Ford et al. 1972)。

ハインツ小体は、メトヘモグロビン形成の指標となると考えられている。

高用量のジフェニルアミンは、様々な動物種において、一般的に多嚢胞腎疾患と記される変化を腎臓に引き起こし、それに付随して、様々な段階の腎乳頭壊死や腎炎を生じる。ガイドラインに準拠した 28 日間強制経口投与試験が唯一行われており (Yoshida et al. 1989)、いくつかの動物種において、腎尿管細胞の軽微な退行性変化と共に、肝臓、脾臓および腎臓の微細な変化が散見されたことが報告されている。この試験条件下での、ラットにおける全身性の影響に関する NOAEL は、111 mg/kg bw/日と明示された。

ジフェニルアミンに関する 1998 年の JMPR の報告書の中に、ガイドラインに準拠してマウスやラットを用いてより最近に行われた反復投与毒性試験 (Botta, 1992; Krohmer, 1992a) のことが記載されている。それらの試験の全てにおいて、血液毒性が、ジフェニルアミンによる主要な毒性影響として明示されている。残念ながら、これらの試験については原資料が入手不能である。ジフェニルアミンへの短期ないしは長期混餌投与曝露における主要な標的器官は、血液系、腎臓、脾臓および肝臓である。

Table 4.1.2.6 に、ラット、マウスおよびイヌに対してジフェニルアミンを反復経口投与した様々な試験について要約した (4.1.2.8 項 発がん性も参照)。その中には、JMPR の報告書 (JMPR, 1998) から抜き出した結果も収載した。様々な試験で得られた LOAEL 値を比較すると、ラットやイヌにおける有害影響は、約 25 mg/kg bw/日という同用量で生じていることが

明らかとなる。マウスは、より新しい短期および長期試験(Botta,1992, 1994a)で得られた結果によると、感受性は低めであると思われる。

Table 4.1.2.6 Summary table: NOAEL and LOAEL values for diphenylamine derived from repeated dose oral toxicity studies in experimental animals

Species	Exposure route; exposure duration	NOAEL [mg/kg bw/d]	LOAEL [mg/kg bw/d]	Reference
Rat, albino	diet, 2 years	50	250	DeEds, 1963
Rat, albino	diet 2 years	50	250	Thomas, 1967a
Rat, F344	gavage, 28 days	111	1000	Yoshida, 1989
Rat, SD	diet, 90 days	12	110 (f)	Krohmer, 1992a
Rat, SD	diet, 2 years	7.5	25 (f)	Botta, 1994b
Mouse, CD-1	diet, 92 weeks	15	37.5	Ford et al., 1972
Mouse, CD-1	diet, 12 weeks	1.5	7.5	Ford et al., 1972
Mouse, CD-1	diet, 90 days	1.7	94	Botta, 1992
Mouse, CD-1	diet, 78 weeks	73	370 (f)	Botta, 1994a
Dog, Beagle	diet, 2 years	77	769	DeEds, 1963
Dog, Beagle	diet, 2 years	2.5	25	Thomas, 1967b
Dog, Beagle	gavage, 90 days	50	-	Krohmer, 1992b
Dog, Beagle	gavage, 1 year	10	25	Botta, 1994c

詳細ではないが、マウスで行われた12週間混餌投与試験の情報が得られている(Ford et al. 1972, 要約のみ)。他の試験からは関連するデータが得られていないが、この試験では、赤血球中でのハイツ小体形成が、7.5 mg/kg bw/日以上用量で認められたと記載されており、

1.5 mg/kg bw/日の用量では、ジフェニルアミン投与に関連した影響は報告されていない。したがって、この用量が、反復投与毒性の NOAEL であるとすることもできる。しかしながら、この NOAEL は、同じ著者によって実施された、1200 匹の Charles river CD-1 マウスに 7.5、15 ないしは 37.5 mg/kg bw/日の用量を混餌投与した 92 週間試験の結果と相反している。この試験では、ジフェニルアミンによる影響は、生育、一般状態、自然発症パターン、主要な血液学的項目(メトヘモグロビンを含む)および関連組織におけるどの組織病理学的項目に関しても、認められていない。この長期試験で明示された唯一の影響は、37.5 mg/kg bw/日投与群におけるハインツ小体形成であるが、7.5 および 15 mg/kg bw/日投与群では、どの影響も認められていない。このことから、Ford et al.による古い 12 週間試験で得られた 1.5 mg/kg bw/日という低い値は、反復投与毒性の NOAEL としては、却下してよいと思われる。

反復経口投与の動物試験データをすべて考え合わせると、ラットにおける 2 年間の発がん性試験(Botta, 1994b)から得られた 7.5 mg/kg bw/日が、慢性曝露による有害影響に関する NOAEL として提案される。この NOAEL は、25 mg/kg bw/日 (LOAEL)以上の用量で混餌投与した場合に、雌ラットにおいて、血液学的ならびに組織学的影響が認められたことに基づくものである。この試験は、JMPR(1998)が、1 日摂取許容量(ADI)を 0~0.08 mg/kg bw と実際に定めた際にも、その根拠とされている。

ジフェニルアミンに関する JMPR の報告書(1988)において、ウサギを用いた 21 日間経皮投与試験(Siglin, 1992)のことが記載されている。原資料は入手できないが、この試験からは、100 mg/kg bw/日という NOAEL を得ることができる。ラットに 90 日間にわたってジフェニルアミンを皮膚適用した試験では、高めの用量を適用された雄で腎臓の相対重量が増加したことに基づいて、全身毒性に関する NOAEL は 500 mg/kg bw/日であるとされている。この試験では、投与を受けた動物すべてにおいて、投与部位の皮膚に過形成が生じた。このことから、90 日間投与での皮膚における局所的影響に関する LOAEL は 500 mg/kg bw/日とされるが、NOAEL を得ることはできなかった。

経皮曝露に関するリスク総合評価(全身毒性)については、ラットにおける上記の 90 日間試験から得られた 500 mg/kg bw/日という NOAEL に基づくべきであると考えられる。ウサギを用いた 21 日間試験では、500 mg/kg bw/日群の 2 匹に暗赤色の病巣が認められたが、ラットにおける上記の 90 日間試験では、同用量でもその様な病巣は観察されなかった。

分類に関する結論:

他の試験で得られたデータと相関していないが、マウスでは、7.5 mg/kg bw/日の用量で 12 週間混餌投与した際に、ハインツ小体の形成が認められている。通常であれば、この知見

だけで、R48 表示を要すると十分に判定できる。しかし、マウスなどの動物種を用いた他の長期(亜慢性、慢性)試験では、貧血性の影響は、R48 表示が求められるような用量域では認められておらず、この警句の表示の必要性は退けることができる。

Thomas et al.のイヌを用いた試験(1967b)では、25 mg/kg bw/日の用量で、ヘモグロビン含量や赤血球数の軽微な減少が観察されたが、この結果は溶血性貧血に関して R48 表示を要すると類別するには不十分であると考えられる。Muller et al.の論文"Hazard assessment of chemicals inducing haemolytic anemia: An EU Regulatory perspective"(「溶血性貧血を引き起こす化学物質の有害性評価：EU による規制の展望」)によれば、ヘモグロビン濃度の 10%未満の減少は、一般的には無症候性である。ラットを用いた 2 年間試験(Botta, 1994b)で認められた赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少は、高用量側(140 および 290 mg/kg bw/日)でのみ統計学的に有意であった。ジフェニルアミンは、どの哺乳類の組織においてもそれほど蓄積しないため、R33 の表示も妥当ではない。毒性動態学的試験において、ジフェニルアミンは速やかかつほぼ完全に排出されたと記載されている(4.1.2.1 項参照)。

4.1.2.7 変異原性

In vitro 試験

細菌を用いた遺伝毒性試験

ジフェニルアミンは、*Salmonella typhimurium*(ネズミチフス菌)の試験菌株 TA97、TA98、TA100 および TA1535 を用いた遺伝子突然変異試験において、ヒトもしくはラットの肝臓から得た S-9 調製物の非存在下で、陰性であった(Zeiger et al, 1988)。試験は、OECD ガイドライン 471 に沿って行われた。設定用量は、最高 333 µg/plate であった。菌株によっては、33 µg/plate 以上の用量で、細胞毒性が認められた。哺乳類由来マイクロソーム存在下でネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA1538、TA98 および TA100 株を用いて行われた突然変異試験の結果について、EPA(1988)は陰性であったと報告している[原資料(Lawlor 1992)は入手不能であった]。ジフェニルアミンの用量は、代謝活性系の非存在下では 6.67、10.0、33.3、66.7 および 100 mg/plate、代謝活性系の存在下では 10.0、33.3、66.7、100 および 333 µg/plate であった。EPA によれば、ジフェニルアミンは、最高用量では細胞毒性を示したということである。

他にも、現行のガイドラインに沿った行われたものではなかったが、遺伝子突然変異試験が行われており、陰性の結果が報告されている(Litton Bionetics, 1977)。この試験は、供試菌株として TA1535、TA1537、TA1538、TA98 および TA100 を用い、ジフェニルアミンの用

量は、0.1、1、10、100 および 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、アロクロールで誘導したラット肝 S-9 調製物の存在下および非存在下で実施された。最高用量では、全ての菌株において、細胞毒性が認められた。ネズミチフス菌の 1 菌株(TA1535)のみを用い、哺乳類由来ミクロソームとのプレインキュベーション法により、スクリーニング試験が行われている。代謝活性系の非存在下で、最高用量 75 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で実施されたが、ジフェニルアミンは、陰性を示した (Mobil Oil Corp., 1985)。

さらに、ネズミチフス菌の様々な試験菌株を用いた試験結果について、他の著者により陰性と報告されている。しかし、データの表記が不十分で、結果を適切に解釈することができない (Epler et al., 1978; Probst et al., 1981; Sugimura et al., 1982)。Ferretti et al. (1977) や Florin et al. (1980) によっても、結論に達しない知見が得られている。

手法や結果について詳しく書かれていないが、細菌を用いた DNA の SOS 修復誘導試験でも、陰性が示されている (Hude et al, 1988)。

哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験

ジフェニルアミンは、S-9 調製物存在下で行われたマウスリンフォーマ試験において、陰性を示した (Amacher et al., 1980)。この試験では、設定最高用量が 0.2849 mmol/L で、これは 48.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当する量であったが、この用量で、明らかな細胞毒性影響 (相対細胞生存率が 22%) が認められた。この試験では、小コロニーと大コロニーの区別は行われなかった。また、この試験は、S-9 調製物非存在下では実施されなかったが、OECD のガイドライン 476 に準拠して行われた。

EPA (1998) と JMPR (1998) によって、L5178Y TK⁺/-マウスリンフォーマ突然変異試験における、弱い陽性結果が報告されている [原資料 (Cifone 1992) は入手不能であった]。ジフェニルアミンの用量は 5~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、ラット肝 S-9 調製物の存在下および非存在下で行われた。EPA (1998) によれば、大コロニーと小コロニーの割合はほぼ同等であったということである。

哺乳類細胞を用いた遺伝子修復試験

ラット肝細胞の一次培養における DNA 修復 (不定期 DNA 合成, UDS) の誘発に関するスクリーニング試験では、100 nmoles/mL (16.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当) の用量で、陰性であった (Probst et al., 1981)。

姉妹染色分体交換誘発試験 (SCE)

ジフェニルアミンがヒトの培養リンパ球において SCE を誘発するかどうかを、OECD のガイドライン 479 に準拠して、最高 3.5×10^{-5} mol/L (60 µg/mL) の用量で検討した (Ardito et al., 1996)。4 時間という短時間の曝露では、S-9 調製物の存在下および非存在下で陰性を示した。S-9 調製物非存在下で連続的に処理した場合には、最高用量で、SCE 頻度が 1.2 倍増加した。Ardito et al. (1996) によれば、この増加は統計学的に有意であるということだが、このようなわずかな増加は、遺伝毒性機序よりも、非特異的機序によって誘導された可能性が高い。

In vivo 試験

細胞遺伝学的試験

染色体異常試験が、*in vivo* で行われている。ラットを、0.05、0.5 ないしは 5.0 mg/kg bw/日の用量のジフェニルアミンで経口曝露したが、曝露様式および曝露期間については明示されていない (Korolev et al., 1976)。陰性結果が得られているが、試験内容や結果の記述が乏しく、手法も不適當である (陽性対照が無いなど) ため、この知見の信頼性は低い。

マウスにおける SCE 誘発スクリーニング試験は、陰性であった (Gorecka-Turska et al., 1983)。この試験では、ジフェニルアミンが 1~100 mg/kg bw/日の用量で腹腔内投与され、骨髓細胞が検査された。

EPA (1998) と JMPR (1998) によって、マウスを用いた小核試験について報告されており、強制経口投与で致死量に至るまでの用量で実施されたが、結果は陰性であった [原資料 (Murli 1992) は入手不能である]。この試験では、ICR マウスに対し、雄では 250、500 ないしは 1000 mg/kg bw の、雌では 375、750 ないしは 1500 mg/kg bw のジフェニルアミン (純度 99.9%) が単回投与され、骨髓細胞中での小核を有する多染性赤血球の出現頻度が、投与の 24、48 および 72 時間後に調べられた。雌雄各 5 匹の Sprague Dawley ラットに、ジフェニルアミンを 500 ないしは 2000 mg/kg bw/日の用量で経皮適用し、複数の評価項目について調べた 90 間試験が行われている (Mobil Oil Corp., 1987)。無処置の対照群と比べて、骨髓中での小核を有する赤血球の増加は認められなかった (詳細については 4.1.2.6 項に記載している)。多染性赤血球と正染性赤血球の比率に変化は無かった。手法に不備があり (陽性対照が無い)、また被験化合物が骨髓細胞に到達したことを示す情報が得られておらず、この知見は信頼性が低い。

宿主経路試験

宿主としてマウスを用い、指標細菌としてネズミチフス菌 TA1950 株(宿主の腹膜で培養)を用いて、宿主経路試験が行われている。指標菌を腹腔内に接種し、ジフェニルアミンを 1.45~2.90 $\mu\text{moles/kg}$ (0.245~0.490 mg/kg bw/日に相当)の範囲で経口投与したところ、陰性という知見が得られた。等モル濃度の亜硝酸ナトリウムとともに投与した場合でも、指標菌において突然変異は観察されなかった。結果に関して、定量的データは示されていない (Braun et al., 1977)。

結論

ジフェニルアミンは、ネズミチフス菌を用いた遺伝子突然変異試験 2 件において、陰性であった。また、哺乳類細胞を用いた他の *in vitro* 試験でも、ジフェニルアミンは遺伝毒性を示さないか、ほんのわずかな遺伝毒性を示しただけであった。

In vivo での小核試験からも陰性結果が得られ、*in vivo* で変異原性作用を現さないことが示されている。結論として、全データが、ジフェニルアミンは、ヒトに対して変異原性を示さないことを示唆している。

4.1.2.8 発がん性

動物における試験

経口

強制経口投与

ラット

1 群 20 匹のラット (Sprague Dawley 系) に、ジフェニルアミンを 300 mg/kg bw/日の用量で単回投与した。30 日後ないしは 6 ヶ月後に動物を屠殺し、剖検した。主要器官 (乳腺組織、腸管、下垂体) において腫瘍形成の影響は認められず、試験終了前の死亡例は、各群で 2/20 匹であった (Griswold et al. 1966)。

マウス

8 週齢の NMRI 非近交系 Albino マウスに、ジフェニルアミンを、大豆油を媒体として 300 mg/kg bw/日の用量で、1 週間に 1 度、18 ヶ月間(78 回)強制経口投与した。陽性対照として、ジメチルニトロソアミン(DMNA)投与群(用量 15 mg/kg bw/日)を置き、同様に観察した。ジメチルアミン投与群は 125 匹のマウスからなり、陽性対照群は 30 匹のマウスで構成された。25 週目と 52 週目に中間屠殺を行った。合計の観察期間は 126 週に及んだ。媒体のみ投与した対照群とくらべても、腫瘍の発生頻度に差はみられなかった。ジフェニルアミン投与群では、22.9%の動物に腫瘍の発生がみられた。最もよく見受けられた腫瘍の種類は、リンパ腫(8.3%)および肺胞腺腫(16.5%)であった。媒体対照群における腫瘍発生率は、22.2%で、リンパ腫が 11.1%、肺胞腺腫が 11.1%であった。非腫瘍性変化として、ジフェニルアミン投与群において、リンパ組織球性腎炎が認められた。腫瘍の形態や発生率に関する結果からは、媒体対照群と比べて、ジフェニルアミンに関連した変化は認められなかった(Holmberg 1983)。

イヌ

雌雄のビーグル犬 4 匹に、ゼラチンカプセルに入れたジフェニルアミン(純度 99%超)を、0、10、25 もしくは 100 mg/kg bw/日の用量で、52 週間投与した。臨床症状、体重、摂餌量や、眼科的、血液学および臨床生化学的評価項目、尿の検査項目、臓器重量、そして、肉眼的および組織病理学的変化に関して、観察を行った。試験終了時、投与に関連した臨床症状は認められなかった。中用量群の 1 匹および高用量群の 2 匹で被毛の緑色化が認められた。死亡例は無く、体重、摂餌量および眼科的パラメータにも、投与に関連した影響は認められなかった。血液学的検査では、高用量群の雄において、平均赤血球数の減少(対照群と比較して 11%減)、ヘモグロビン量の減少(同 9.3%減)およびヘマトクリット値の減少(同 8.7%減)が明らかとなった。雌ではこれらのパラメータにおける減少は、小幅であった。雄では、血小板数が、13、26、39 および 52 週目に行われた評価時において、用量依存的に増加しており、この増加は、中用量および高用量群では統計学的に有意であった。平均総ビリルビン濃度の増加が濃度依存的に認められ、中用量および高用量群の雌雄では試験期間を通じて統計学的に有意であった。この増加は、26 週目の評価時においては雌雄で、39 週目の評価時でも雌のみで認められた。平均コレステロール濃度も、全ての評価時で用量依存的な増加の様相を示したが、統計学的に有意な増加を示したのは、13 週目の評価時における高用量群の雄(68%増)および 39 週目の評価時における高用量群の雌(37%増)だけであった。血中尿素窒素濃度は、52 週目の評価時において、中用量および高用量群の雌で減少していた(それぞれ 16%および 20%減)。肝臓および甲状腺の平均絶対重量および平均相対重量は、雄において用量依存的な増加の様相を示していたが、統計学的に有意な増加が認

められたのは、高用量群の雄における肝臓の平均絶対重量だけであった。甲状腺の平均絶対重量および平均相対重量は、雌においても用量依存的に増加したが、どの用量群でも、統計学的に有意な増加には達していなかった。肉眼的および組織病理学的所見に関しては、投与に関連した変化は認められなかった。軽微な臨床生化学的変化に基づき、毒性に関する NOAEL は 10 mg/kg bw/日とされた (Botta, 1994c)。

混餌投与

ラット

各群雌雄 20 匹ずつの Albino ラットに、0.5 ないしは 1.0% の用量でジフェニルアミンを 2 年間混餌投与した試験では、投与に関連した腫瘍性変化は引き起こされなかった。著者らは、剖検時に発症が観察された腫瘍(詳細な記載は無い)は、ラットの老衰によるものであり、投与とは無関係であると結論付けている (Thomas et al. 1967a)。

各群雌雄 60 匹ずつの Sprague-Dawley ラットを用いて最長 2 年間の混餌投与試験が行われている。ジフェニルアミン(一般化学試験用等級、純度 99% 超)の飼料中濃度は、雄では 0、200、750、3750 ないしは 7500 ppm であり、雌では 0、150、500、2500 ないしは 5000 ppm であった。これらの濃度は、雄では 0、8.1、29、150 および 300 mg/kg bw/日、雌では 0、7.5、25、140 および 290 mg/kg bw/日の用量に相当する。各群の雌雄 10 匹ずつを、1 年目で中間屠殺した。死亡率に関しては、投与に関連した影響はみられなかった。しかし、対照群と低用量群のラットの死亡率が増加したため、試験は 102 週間で終了となった。この時の雄の生残率は、無投与群および 200 ppm 投与群で 22%、7500 ppm 投与群で 55% であった。このように生残率が用量依存的に増加したように思われ、そのデータから、雌雄のラットにおいて、死亡率が用量増加と共に減少する傾向が、統計学的に有意に示された。高用量側 2 群の死亡率は、対照群の死亡率よりも、統計学的に有意に低かった。試験期間のほぼ全体にわたり、体重と体重増加量が用量依存的に減少し、高用量側 2 群では、統計学的に有意な減少を示していた。体重増加量は、高用量側 2 群の雄で、78 週の時点で対照群の 95% および 87% にそれぞれ抑制され、102 週間の時点では、対照群と同等であった。雌では、高用量側 2 群で、78 週の時点で 78% および 56% にそれぞれ抑制され、102 週の時点では 80% および 61% に抑制されていた。最初の 1 週を除き、摂餌量に減少はみられなかった。他の時点では、摂餌量は増加を示したと思われたが、おそらく飼料廃棄によるものと考えられた。眼科的パラメータに関しては、投与に関連した影響はみられなかった。

血液検査からは、高用量側 2 群の動物において、投与期間を通しての、用量に関連した、赤血球数、ヘモグロビン含量およびヘマトクリット値の減少が明らかとなった。赤血球数

およびヘモグロビン含量の減少は、3750 および 7500 ppm 投与群の雄で、26 週の時点および試験終了時には、統計学的に有意な減少に達していた。雌では、赤血球数、ヘモグロビン含量およびヘマトクリット値の減少が、2500 および 5000 ppm 投与群において、投与期間のほぼ全体を通じて、また試験終了時点で統計学的に有意な水準に達していた。赤血球数、ヘモグロビン含量およびヘマトクリット値の減少は、750 ppm 投与群の雄および 500 ppm 投与群の雌でも認められたが、これらの減少は、投与期間中、不連続的に統計学的に有意な水準に達していた。平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン含量については、高用量側 3 群の雄および高用量側 2 群の雌において、対照群の値との統計学的有意差が認められた。

高用量側 2 群の中間屠殺した雌や試験終了時に剖検した雌において、脾臓の絶対および相対重量が、用量に関連して統計学的に有意な増加を示した。雄でも脾臓に対する影響が同様に観察されたが、3750 ppm 群では、その変化は統計学的に有意ではなかった。肝臓の相対重量は、試験終了時の 5000 ppm 群の雌や中間屠殺した 3750 および 5000 ppm 群の雌で、統計学的に有意に増加していたが、雄では肝臓重量の増加は認められなかった。脾臓や肝臓重量の増加は、ジフェニルアミンによる血液学的影響と整合するものであった。剖検所見として、750 ppm 投与群より高用量の群の雄や 500 ppm 投与群の雌において、脾臓の暗色化や肥大が認められたが、これらはおそらく血液学的影響に関連しているものと思われる。顕微鏡検査からは、投与に関連した影響が、腎臓、肝臓、脾臓および骨髄で明らかとなった。腎臓での色素沈着発生率が用量依存的に増加し、死亡のために剖検された、瀕死状態に至ったために屠殺・剖検された、および試験終了時に屠殺・剖検された高用量群の動物において、雄で 44/50 匹、雌で 44/52 匹に達していた。肝臓での造血や色素沈着の発生率も用量依存的に増加し、死亡のために剖検された、瀕死状態に至ったために屠殺・剖検された、および試験終了時に屠殺・剖検された高用量群の動物において、雄でそれぞれ 21/50 および 27/50 匹、雌でそれぞれ 41/52 および 45/52 匹に達していた。対照群や低用量群では認められなかった赤血球過形成が、高用量群側で観察された。脾臓における鬱血の発生率が用量依存的に増加し、死亡や瀕死状態が確認されたかもしくは試験終了時に屠殺された高用量群の動物において、雄で 50/50 匹、雌で 47/52 匹に達していた。これらの所見は、すべて血液学的項目で観察された影響と関連していた。投与に関連した腫瘍発生率の増加は認められなかった。毒性に関する NOAEL は、血液学的パラメータや脾臓、腎臓および肝臓での組織病理学的所見における変化に基づき、飼料中濃度 150~200 ppm、用量 7.5 mg/kg bw/日とされた (Botta, 1994b)。

マウス

各群雌雄 60 匹ずつの CD-1 マウスを用いて、最長 78 週間の混餌投与試験が行われている。

ジフェニルアミン(一般化学試験用等級、純度 99%超)の飼料中濃度は、0、520、2600 ないしは 5200 ppm であった。これらの濃度は、雄では 0、73、370 および 760 mg/kg bw/日、雌では 0、90、460 および 940 mg/kg bw/日の用量に相当する。各用量群で、雌雄 10 匹ずつを 52 週の時点で屠殺した。陰茎突出の発生率が用量とともに増加し、78 週の時点で、2625 ppm 投与群で 7 匹の雄が、5250 ppm 投与群で 17 匹の雄が発症していた。粗剛な外観を示す例も用量とともに増加し、雄において高率に認められた。死亡率も用量とともに増加し、52 週の時点で、2625 および 5250 ppm 投与群の雄において、対照群との統計学的有意差が認められた。死亡の主因は、雄では膀胱炎、雌ではアミロイド蓄積症であった。13、52 および 78 週の時点における平均体重増加量は、5250 ppm 投与群で、対照群の値と比べて、雄でそれぞれ 87、86 および 91%、雌でそれぞれ 104、93 および 93%であった。体重増加量は、5250 ppm 投与群の雄において、また散発的に 2625 ppm 群の動物において、試験期間を通じて(主として 58 週間を通じて)統計学的に有意な減少がみられた。雌における体重増加量は、5250 ppm 投与群で、最初の 3 週間有意な減少を示し、残りの試験期間は散発的に有意な減少を示した。平均摂餌量は、投与開始後最初の 1 週間は高用量群の雄で統計学的に有意に減少したが、その後は高用量側 2 群の雄で投与期間を通じて増加した状態が維持され、散発的に対照群に対し統計学的有意差が生じていた。

投与期間中に行われた 52 週の時点での血液学的検査において、雄ではヘマトクリット値および赤血球数の用量依存的な減少が示され、2625 および 5250 ppm 投与群では統計学的に有意な減少を示していた。また、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン濃度および平均赤血球ヘモグロビン含量は用量とともに増加し、これらの用量群の雄で統計学的に有意な増加を示していた。雌では、ヘマトクリット値について、用量に関連した減少がみられ、525 ppm を超える投与群で統計学的に有意な減少であった。雌の赤血球数は、用量依存的に減少し、2625 および 5250 ppm 投与群では統計学的に有意な減少を示した。平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン濃度および平均赤血球ヘモグロビン含量は用量とともに増加し、後者 2 項目については 2625 および 5250 ppm 投与群で統計学的に有意な増加に達しており、また平均赤血球容積については 5250 ppm 投与群で統計学的に有意な増加に達していた。78 週目の試験終了時、雄も雌もヘマトクリット値や赤血球数が用量に関連した減少を示しており、2625 および 5250 ppm 投与群では統計学的に有意な減少に達していた。網状赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン濃度および平均赤血球ヘモグロビン含量は、用量とともに増加し、それらの用量群の雄では、統計学的に有意に増加していた。

中間屠殺した動物の剖検では、2625 および 5250 ppm 投与群において、脾臓の暗色化が観察された。肝臓の暗色化や腎臓の褪色が、5250 ppm 投与群において観察された。試験終了時の剖検では、脾臓の暗色化や肥大や肝臓の暗色化が、2625 および 5250 ppm 投与群において観察された。脾臓、肝臓および心臓の絶対および相対重量の用量に関連した増加が、中間

屠殺時および最終屠殺時に、雄雌いずれにおいても認められた。中間屠殺時には、2625 および 5250 ppm 投与群の雄で、脾臓および肝臓の絶対重量について、対照群の数値と統計学的に有意な差が認められたが、肝臓の相対重量については、最高用量群においてのみ、統計学的に有意な差に達していた。雌では、脾臓の絶対および相対重量が、最高用量群においてのみ、統計学的に有意に増加していた。心臓の絶対および相対重量が、5250 ppm 投与群の雌において統計学的に有意に増加していたが、雄では対照群と比べて統計学的に有意な差は生じていなかった。最終屠殺時には、脾臓や肝臓の絶対および相対重量が、2625 および 5250 ppm 投与群の雄で、統計学的に有意に増加していた。雌では、脾臓の絶対および相対重量が、5250 ppm 投与群においてのみ有意に増加していた。肝臓の相対重量は、2625 および 5250 ppm 投与群において統計学的に有意に増加していた。心臓の絶対および相対重量は、5250 ppm 投与群の雄雌いずれにおいても、統計学的に有意に増加していた。

組織病理学的検査からは、腎臓、肝臓、脾臓、骨髄、膀胱および陰茎において、投与に関連した影響が明らかとなった。肝臓における造血ならびに色素沈着の発生率は、中用量および高用量群で増加していた。死亡や瀕死状態が確認されたかもしくは試験終了時に屠殺された 2625 ppm 投与群のマウスにおいて、19/51 匹の雄および 24/51 匹の雌で肝臓内造血が認められ、15/51 匹の雄および 37/51 匹の雌で肝臓の色素沈着が認められた。これらの影響は、高用量群でより高率に認められた。脾臓の鬱血やヘモジデリン沈着の発生率が、被投与群全てで増加していた。死亡や瀕死状態が確認されたかもしくは試験終了時に屠殺された低用量群のマウスにおいて、11/50 匹の雄および 8/50 匹の雌で脾臓の鬱血が認められ、8/50 匹の雄および 35/50 匹の雌で脾臓へのヘモジデリン沈着が認められた。これらの影響は、高用量側の群でより高率に認められた。色素沈着の発生頻度は、高用量群の雄ならびに中用量および高用量の雌で増加していた。死亡や瀕死状態が確認されたかもしくは試験終了時に屠殺された雌のうち、中用量群の 5/51 匹および高用量群の 7/51 匹で色素沈着が認められた。死亡や瀕死状態が確認されたかもしくは試験終了時に屠殺された雄のうち、中用量群の 5/51 匹および高用量群の 7/51 匹で色素沈着が認められ、さらに 5/54 匹が腎盂腎炎に罹患していた。脾臓内造血は用量依存性には増加していなかったが、その重症度スコアは、対照群では極く軽微または軽微であったものが、高用量群では中等度ないしは重度などのスコアが入り混じっていた。脾臓内造血の重症度は、対照群ではおおかた極く軽微な水準であったのに対し、525 ppm 投与群では極軽微から軽微であった。さらに、骨髄の細胞充実度は、対照群では主に中等度であったものが、高用量群では過度になっていた。

膀胱炎および膀胱拡張症の発生率は、用量と共に増加し、中用量および高用量群では統計学的に有意な増加を示した。死亡や瀕死状態が確認されたかもしくは試験終了時に屠殺された中用量群マウスのうち、雄の 24/51 匹および雌の 13/48 匹が膀胱炎に罹患しており、雄の 18/51 匹および雌の 13/48 匹が膀胱拡張症を有していた。その割合は、高用量群ではより

高値であった。亀頭包皮炎の発生率も用量とともに増加した様であるが、統計学的分析結果は得られていない。5250 ppm 投与群の雌で、甲状腺、副腎、腎臓、胃、小腸、卵巣および子宮におけるアミロイド蓄積症の発生率が増加した。腫瘍発生率は、被投与群と対照群とで同等であった。毒性に関する NOAEL は、体重増加量の減少、生残率の減少、有意な血液学的変化、ならびに肉眼的および顕微鏡的に観察された有意な病理学的変化に基づき、飼料中濃度で 525 ppm であり、用量 73 mg/kg bw/日に相当するものとされた (Botta, 1994a)。

雌雄の Charles River CD-1 Albino マウス (各群 150 匹) を用いた試験で、ジフェニルアミンが、0、0.005、0.01 ないしは 0.025% の飼料中濃度で、92 週間にわたって混餌投与された。組織病理学的変化の様子や発生率、特に腫瘍の出現時期や発症率に関して、ジフェニルアミンによる影響は全く認められなかった (Ford et al. 1972, 要約書)。

イヌ

各群雌雄 2 匹ずつのビーグル犬を用いた混餌投与試験が行われている。ジフェニルアミンを 0.01、0.1 ないしは 1% 含む飼料が、24 ヶ月にわたって給与された。どの用量群でも腫瘍性変化は何も観察されず、全ての動物が試験終了時まで生残した (DeEds 1963; Thomas 1967b)。

短期 *in vivo* および *in vitro* 試験

雄の Wistar ラットにジフェニルアミンを 400 mg/kg bw の用量で単回胃内 (強制経口) 投与した試験では、36 時間後に副腎皮質細胞の有糸分裂活性を測定したが、亢進はみられなかった。したがって、アフラトキシンの様な発がん性物質との比較から、この迅速スクリーニング試験においては陰性であると判断された (Danz and Urban 1979)。

同じ著者が、Sprague Dawley ラットを用いた同様の試験について報告している。ジフェニルアミンが 500 mg/kg bw の用量で単回 (強制経口) 投与されたが、36 時間後において、副腎皮質細胞の有糸分裂指数に関して変化はみられなかった (Danz and Urban 1980)。

化学物質の発がん性に関して、*in vivo-in vitro* 宿主経路試験が、次の様に実施されている。妊娠 10 日から 11 日目の Syrian ゴールデンハムスターに、体重 100 g 当たり 0.5~2.0 mg のジフェニルアミンが腹腔内注射された。妊娠 13 日目、すなわち母親への注射後 48~72 時間後に、胎仔を摘出した。胎仔の細胞を分取し、形質転換や細胞遺伝学的変化の有無を調べ、所定量の細胞を適合宿主 (放射線を照射した同系統のハムスター) に注入し、腫瘍の増殖に関して評価を行った。ジフェニルアミンの投与は、このような試験条件において、陽性結果をもたらさなかった。実際、引用元である論文に書かれた試験設定においては、ジ

フェニルアミンは陰性対照物質として使用されていた (DiPaolo et al. 1973)。

形質転換試験が *in vitro* で実施されており、ラットの正常な腎臓の細胞を、代謝活性化処置を施した後、あるいは代謝活性化処置無しで、種々の希釈濃度のジフェニルアミン(媒体 1 mL 当たり 2.5~20.0 µg)に曝露した。24 時間後、その試験系をマウス肉腫ウイルス (MS; オンコルナウイルス由来)に感染させた。形質転換の頻度の上昇度を、ウイルス感染処置だけを施した対照培養物と比較して測定した。代謝活性化処置無しの場合には、ジフェニルアミンはウイルス性の形質転換の頻度を中程度に抑制した。具体的には、2.5 µg/mL における対照の 0.8 倍から、20.0 µg/mL における対照の 0.4 倍の範囲であった。ラット肝 S9 分画により曝露前に代謝活性化処置を施した場合には、ウイルス性の形質転換の頻度が、2.5 倍というわずかな上昇を示した (Wilson and Khoobyarian 1982)。

化学物質による細胞形質転換に関するレビューにおいて、ジフェニルアミンを用いた以下の試験が報告されている。Syrian ハムスター胚細胞の一次培養物を、ジフェニルアミン希釈液(濃度範囲 6~100 µg/mL)で 2 時間~18 時間処置した。その後、細胞にサルアデノウイルス SA7 株を摂取し、37°C で 3 時間インキュベートした。Syrian ハムスター胚細胞の細胞 DNA における SA7 ウイルス株による形質転換の誘発率は、25 µg/mL 以上の濃度のジフェニルアミンへのウイルス接種前曝露により、上昇を示した [Casto 1983, Heidelberger et al. (1983) の中で引用]。

ヒトにおけるデータ

得られていない。

結論

ジフェニルアミンの発がん活性に関して、ガイドラインに沿った長期生物試験のデータはほとんど全く得られていない。しかし、いくつかの系統のラットやマウス、そしてイヌまでも用いて行われた古い試験が数多くあり、それらはジフェニルアミンが関連する腫瘍性変化を全く報告していない。生残率や毒性の情報も、腫瘍発生に関する評価項目についての解釈に差し障りをもたらすものではない。これらの試験においては、どのような腫瘍性毒性影響も、ジフェニルアミン投与に関連するものとしては明確に検出されていない。発がん性を有していれば、腫瘍性の細胞増殖活性の徴候は、これらの試験条件下でも出現し得るものであったと考えられる。さらに、*in vivo* や *in vitro* での短期試験のほとんどが同様に、ジフェニルアミンの形質転換活性について、陽性とする証拠を示していない。唯一の

例外は、Costa et al.(1983)によるレビューの中で、SA7 ウイルスに感染させたハムスター胚細胞の形質転換率が、25 µg/mL の濃度で上昇したことが触れられていることだけである。しかし、別の形質転換試験では、ジフェニルアミンは同様の影響を示さず、実際、いくつかの試験では、ジフェニルアミン処理した細胞で形質転換の抑制が生じた。そして、ジフェニルアミンが遺伝毒性活性に関して陰性である点から見て、全体的な結果としても、発がん性は証明されない。JMPR の 1998 年の文献には、マウスやラットにおいて現行のガイドラインに沿って行われたジフェニルアミンに関する長期試験(Botta et al. 1994a, 1994b)の全容が含まれているが、腫瘍発生率が上昇したという証拠は見当たらない。同じ著者により、ビーグル犬で行われた 1 年間の強制経口投与試験(Botta 1994c)でも同様に、腫瘍性変化は全く認められていない。

4.1.2.9 生殖発生毒性

ヒトにおけるデータ:

データは得られていない。

動物におけるデータ:

受胎能の障害

目下のところ、ガイドラインに準拠した世代生殖試験のデータは得られていない。

Rodwell(1993)により、未公表の 2 世代生殖毒性試験が行われている。Sprague-Dawley ラット(各群雌雄 28 匹ずつ)に、ジフェニルアミン(純度 99.8%)が、0、500、1500、ないしは 5000 ppm の飼料中濃度(F0 の雄で 0、40、115 および 399 mg/kg bw/日、F0 の雌で 0、46、131 および 448 mg/kg bw/日に相当)で、交配前の期間に混餌投与された。全ての用量、両世代、両性において、ジフェニルアミン投与に関連した全身毒性が、用量依存的に観察された。一般的に、雌は雄よりも、F1 世代は F0 世代よりも大きな影響を受けた。5000 ppm 群では、臨床徴候が顕著に認められた(雌雄における青味がかかったケージ内の漏液や被毛の汚れ、および主として雌における乳腺の腫脹や外側腹側に触診できる腫瘤)。1500 および 5000 ppm 群では、体重減少が認められた。5000 ppm 群では、体重が対照群と比較して、F0 の雄で 6~9%、F0 の雌で 5~8%、F1 の雄で 22~28%、F1 の雌で 11~23%減少した。1500 ppm 群では、体重が対照群よりも、F0 の雌で 5~8%、F1 の雄で 7~9%、F1 の雌で 5%減少した。摂餌量(1 匹当たり g/日)も、1500 および 5000 ppm 群で減少した。腎臓、脾臓および肝臓は、

5000 ppm 群の雄や 1500 および 5000 ppm 群の雌で対照群との重量差が生じていたこと、また、全投与群の雌雄における肉眼的および顕微鏡学的所見から、標的臓器であると考えられた。肉眼所見は、脾臓の肥大や黒紫色化などであった。顕微鏡学的所見としては、腎臓の近位曲尿細管での褐色色素沈着、肝細胞肥大、肝臓のクッパー細胞での褐色色素沈着、脾臓の鬱血およびヘモジデリン沈着などが挙げられる。全身毒性に関する NOAEL は、500 ppm (雄で 40 mg/kg bw/日、雌で 46 mg/kg bw/日)未満であった。LOAEL は、脾臓における肉眼的病理所見 (肥大、変色)、および腎臓 (近位曲尿細管での褐色色素)、肝臓 (肥大およびクッパー細胞中の褐色色素) および脾臓 (鬱血およびヘモジデリン沈着) における顕微鏡学的所見に基づき、500 ppm 以下とされた。

発生・発達毒性は、1500 および 5000 ppm 群で有意な低体重として観察され、5000 ppm 群の F1 仔動物では授乳期間を通して(対照群より 11~25%低い値)、5000 ppm 群の F2 仔動物では授乳 4~12 日にかけてないしは 21 日において(対照群より 10~29%低い値)、1500 ppm 群の F2 仔動物では授乳 14 日目 (10%) および 21 日目 (12%) に認められた。授乳後期における F2 仔動物の低体重に基づき、発生・発達毒性に関する NOAEL は 500 ppm (母動物で 46 mg/kg bw/日)、LOAEL は 1500 ppm (母動物で 131 mg/kg bw/日)とされた。繁殖毒性については、5000 ppm 群の両世代における出生時一腹仔数の減少(F2 の出産において有意)が認められている。両世代における一腹仔数の減少に基づき、生殖毒性に関する NOAEL は 1500 ppm (母動物で 131 mg/kg bw/日)、LOAEL は 5000 ppm (母動物で 448 mg/kg bw/日)とされた[EPA 再登録適格決定(RED)報告書(1998)および JMPR の 1998 年報告書から引用; 原資料は入手不能であった]。

Albino ラット (Slonaker-Addis 系)を用いて、混餌投与による 2 年間の慢性毒性試験(4.1.2.6 項参照)が行われており、その中で、追加で設けられた群において、ジフェニルアミンの生殖成績への影響が調べられている (Thomas et al. 1967a; DeEds et al. 1963)。雌 12 匹および雄 3 匹からなるそれぞれの群に対し、ジフェニルアミン(凝固点降下法によって測定した最低純度 99.9%)を含む市販の実験動物用固形飼料を給与した。飼料中濃度は、0.0、0.1、0.25 ないしは 0.50%であった(摂取量は約 50、125 および 250 mg/kg bw/日に相当)。動物は、5 週齢時にこれらの飼料中濃度群に群分けされ、100 日齢から 3 週間の交配期間を設けた(雌 4 匹に対して雄 1 匹)。最初に交配させて生まれた仔動物が全て離乳し終えたら、再びラットを交配させた。さらに最初の交配による仔動物を、2 世代目の仔を得るために 1 度交配させた。これらの処置の間、臨床症状や、体重増加量ないしは摂餌量などの、親動物ないしは母動物の状態に関するデータは収集されなかった。僅かなパラメータについてのみ、評価が行われ、その結果が報告されている(出生時一腹仔数、平均一腹仔数、離乳時一腹仔数、離乳時平均一腹仔数、生後 21 日目の離乳時における仔動物の平均体重)。これらのデータからは、F0 世代(1 回目および 2 回目の交配)および F1 世代において、それぞれの同時対照群と

比較して、どの投与群でも、出生時一腹仔数や仔動物の出生後死亡率に関して、何ら影響は認められなかった。全体的に最も一貫して認められた所見は、対照群と比べて投与群の動物の子孫で一腹仔数が減少した〔F0 の 1 回目の交配では、一腹仔数が対照群で 8.3 匹であったのに対して 6.3 匹 ($p<0.05$ で有意)、F0 の 2 回目の交配では、一腹仔数が対照群で 9.6 匹であったのに対して 6.6 匹 ($p<0.01$ で有意)、F1 では、一腹仔数が対照群で 8.6 匹であったのに対して 7.0 匹〕ことと、ジフェニルアミンの飼料中濃度が 0.5% であった群の仔動物において、授乳期間中の体重増加量が減少したことである。1 回目の交配で生まれた仔動物の離乳時平均体重は、高用量群において、対照群におけるよりも低値であった(雌で-2 g、雄で-2.5 g)。2 回目の交配で生まれた高用量群の仔動物の離乳時平均体重は、対照群と比較してそれほど低値ではなかったが、低用量群よりも低値であった(雌で-8 g、雄で-9 g)。F2 仔動物の平均体重は、0.5%群で統計学的に有意に ($p<0.01$) 低下していた。主試験から、仔動物で観察された体重への影響は、その母動物が妊娠中や授乳中に適切に摂餌していなかったことに関連している可能性が示唆されている。すなわち、摂餌量が減って体重増加量が低下したことが、主試験において、飼料中濃度 0.5 ないしは 1.0% でジフェニルアミンを給与された非妊娠雌に関して報告されている (4.1.2.6 項参照)。この試験は、限られた情報しかもたらさず、また標準的な 2 世代試験の要件を満たしていないが、リスクの総合評価の面では、0.25% (約 125 mg/kg bw/日の摂取量に相当) という NOAEL が導出されるものと考えられる。これは、最高飼料中濃度群で観察された、一腹仔数の低下と出生後生育の抑制といった所見に基づくものである。

F344 ラットを用いてガイドラインに沿って行われた 28 日試験 (Yoshida et al., 1989, 4.1.2.6 項参照) の中で、生殖器官の重量測定が行われ、また、生殖腺に加えて前立腺、子宮および膣の切片が作成され、組織病理学的評価が行われた。最高設定用量の 1000 mg/kg bw/日の群では、貧血や体重増加抑制が雌雄の動物で観察されていたが、左右の精巣の絶対重量についても、対照群と比較して軽微だが統計学的に有意な (右: $p<0.05$; 左: $p<0.01$) 減少が認められた。左の精巣の相対重量は、対照群と比べて有意に ($p<0.01$) 増加していたが、右の精巣にはそうした増加はなかった。333 および 111 mg/kg bw/日の用量群では、精巣の絶対もしくは相対重量に影響は認められなかった。雌の生殖腺については報告されていない。組織病理学的評価からは、投与に関連した影響を示す所見は何も得られなかった。

発生・発達毒性

ガイドラインに準拠した発生・発達毒性試験のデータは得られていない。

Rodwell (1992) により、妊娠雌 Sprague-Dawley ラット (各群 25 匹) を用いて、未公表の催奇形性試験が行われている。コーン油を媒体として、ジフェニルアミン (純度 99.9%) が、0、

10、50 ないしは 100 mg/kg bw/日の用量で、妊娠 6 日目から 15 日まで、それらの日を含めて強制経口投与された。母獣は妊娠 20 日目に屠殺した。試験期間中に死亡したラットはいなかった。母体毒性が、100 mg/kg bw/日投与群の母獣において、脾臓重量の増加、脾臓の肥大および脾臓の黒紫色化として現れた。母体毒性に関して、NOAEL は、50 mg/kg bw/日、LOAEL は 100 mg/kg bw/日とされた。どの用量においても、発生・発達毒性は認められなかった。発生・発達毒性に関する NOAEL は、試験での最高設定濃度であった 100 mg/kg bw/日以上とされた[EPA RED 報告書(1998)および JMPR の 1998 年報告書から引用；原資料は入手不能であった]。

Rodwell(1993)により、Sprague-Dawley ラットを用いた未公表の 2 世代生殖毒性試験が、1500 および 5000 ppm の用量で行われている。有意な低体重が、5000 ppm 群の F1 仔動物において授乳期間中に(対照群より 11~25%少ない)、5000 ppm 群の F2 仔動物において授乳 4~12 日にかけてないしは授乳 21 日目に(対照群より 10~29%少ない)、1500 ppm 群の F2 仔動物において授乳 14 日目(10%低下)と授乳 21 日目(12%低下)に認められた。試験の詳細については、受胎能の障害の項で述べてある。F2 仔動物の授乳後期にみられた低体重に基づき、発生・発達毒性に関する NOAEL は 500 ppm(母獣への用量 46 mg/kg bw/日に相当)、LOWAL は 1500 ppm(母獣への用量 131 mg/kg bw/日に相当)とされた[EPA RED 報告書(1998)および JMPR の 1998 年報告書から引用；原資料は入手不能であった]。

ウサギにおける催奇形性試験が報告されている(Edwards et al. 1983; FAO 1984)。妊娠した New Zealand ウサギ(各群 16~18 匹の交配済みの雌)に、精製したジフェニルアミン(純度 99.9%)の懸濁液が、0、33、100 ないしは 300 mg/kg bw/日の用量で、妊娠 7~19 日まで、これらの日を含めて、胃挿管により投与された。用量は、予備試験によって決められたもので、そこでは 200 および 400 mg/kg bw/日の用量でまず体重低下がみられ、600 mg/kg bw/日では低下がさらに大きくなった。媒体対照群には 1%メチルセルロースが投与された。臨床症状や死亡の有無について、毎日観察が行われた。体重と摂餌量の測定を、妊娠 1、7、9、11、15、20、24 および 29 日目に行った。妊娠 29 日目に動物を屠殺し、肉眼による組織学的変化についての検査を実施した。まず卵巣と子宮を検査し、黄体数、生存胎仔の数と分布、胚死亡例および胎児死亡例の数と分布、個々の胎仔の重量、および肉眼的な胎仔の異常について調べた。胎仔の内臓や骨格の以上も調べられた。尿の緑色化が全ての用量群で認められ、特に 100 および 300 mg/kg bw/日投与群で顕著であった。300 mg/kg bw/日投与群では、平均摂餌量が減少し、投与開始からすぐに平均体重の軽微な低下を示した。その後、平均体重増加量は、対照群の値よりも低いまま推移した。このような影響は 33 および 100 mg/kg bw/日投与群ではみられなかった。その他には、投与に関連したと考えられる様な毒性徴候や死亡例は生じなかった。妊娠率は、投与による影響を受けなかった。試験終了時の剖検では、目立った肉眼所見は無かった。一腹仔数、一腹重量、着床前や着床後の胚損

失、および平均胎仔重量も、ジフェニルアミンによる影響を受けなかった。投与に関連したと考えられる奇形や異常は観察されなかった。内臓や骨格の異常発生率は、最高 300 mg/kg bw/日の用量のジフェニルアミン投与でも影響を受けなかった。この試験では、最高用量で摂餌量の減少と体重増加量の減少がみられたことに基づき、母体毒性に関する NOAEL は 100 mg/kg bw/日と判断され、発生への影響がみられなかったことから、発生毒性の NOAEL は 300 mg/kg bw/日以上であると判断された。

Chernoff-Kavlock 法をラット用に改良した発生毒性スクリーニングテストの妥当性を調べる試験の中に、ジフェニルアミンについての検討も組み入れられている (Wickramaratne 1987) が、わずかなデータしか示されていない。ジフェニルアミンが、12 匹の妊娠ラット (Wista 由来の Alpk:Ak 系) の群に、妊娠 7~17 日目にかけて、1000 mg/kg bw/日という 1 日当たりの最高用量 (用量限界試験, OECD) で経口投与された。親についての観察は、妊娠 1、7~17 および 22 日目の体重測定に限られていた。仔動物についての観察は、分娩 1 および 5 日後の一腹当たりの生存仔体重と、それらの日の時点での生存仔数および死亡仔数に限られていた。奇形については、特別な検査は実施されなかった。ジフェニルアミン投与を受けた母親の母体重増加量は、生理食塩の投与を受けた対照群と比較して、投与期間中も妊娠期間中全体にわたっても、低下していた。一方、一腹仔数や仔動物の出生後生残率に関する影響は報告されなかった。著者は、出生後 1~5 日の間の一腹仔の平均体重増加量 (%) の低下により、体重増加量の低下がみられたとし、それが胎仔毒性の徴候であると評価した。しかし、仔動物の出生 1~5 日の平均体重については、生理食塩水の投与を受けた対照群と差がみられなかったことから、この「結果」には疑義が残る。

さらに、ジフェニルアミンの腎毒性に焦点を当てた試験が行われており、子宮内曝露による腎臓の嚢胞性尿細管病変の誘発について調べられている (Crocker et al. 1972, Crocker et al. 1970)。妊娠 Sprague-Dawley ラットに、妊娠後期 (妊娠 14 日から出産まで) の期間、ジフェニルアミンを、混餌投与もしくは強制経口投与した。投与には、様々なジフェニルアミン (市販の古いジフェニルアミンやクロマトグラフィーで精製したジフェニルアミン) の調製物が用いられ、また、棚保管されていた市販のジフェニルアミンから分離された 3 種類の不純物も使用された。混餌投与の場合は、市販のジフェニルアミンをラット用固形飼料に混ぜ (飼料中濃度は、1.5 もしくは 2.5%)、強制経口投与の場合は、70% アルコール中に溶解した (1 日用量は、市販のジフェニルアミンや精製ジフェニルアミンで 20 mg、分離した 3 種類の不純物については 50 µg)。母獣についての観察は、腎臓の組織学的評価に限られていたが、混餌投与群でも強制経口投与群でも影響は認められなかった。両投与群で、一腹当たりの仔動物の数は、3~17 匹と多様で、母獣による新生仔の食殺が、いくつかの腹仔について高率に認められた。クロマトグラフィーで精製したジフェニルアミン投与を受けた群の仔動物では腎臓の病変は誘発されなかったが、市販のジフェニルアミン投与を受けた群の

仔動物では尿細管に嚢胞性病変が認められた。この病変は、3つの不純物のうち1つ(後にN,N,N'-トリフェニル-p-フェニレンジアミンと同定された)についても確認され、市販の古いジフェニルアミン中に腎毒性活性物質が生成されることが示された。

腎臓の嚢胞性病変に焦点を当てた試験が、さらに別個に行われている(Philbert et al. 1978)。20匹のWistarラットと20匹のHartleyモルモット(1用量群につき妊娠2~3日の各種の動物が2匹ずつ)に、一般化学試験用等級のジフェニルアミンを2ないしは4%含む餌が給与された。その結果、妊娠動物は、投与の最初の1週間間に、100%が流産した。この試験の条件下では、ジフェニルアミン投与群の全ての動物のうち、50%を超える例が混餌投与の最初の1週間で死亡しており、ジフェニルアミンが急性毒性を示したことが明らかとなったことから、この試験の結果を発生毒性の評価に用いることは適切ではないと考えられる。

要約と結論:

ジフェニルアミンの生殖毒性に関するヒトにおけるデータは得られていない。実験動物を用いた試験のデータは、経口投与試験のものに限られている。ラットを用いた試験から得られたデータによると、ジフェニルアミンを親動物の摂餌量や体重増加に支障が出ない用量で投与した場合には、生殖機能や能力の障害は生じないものと思われる。2種類の動物(ラットおよびウサギ)で行われた2件の発生・発達毒性試験で得られた結果では、母体毒性を生じる用量であっても、胚毒性や胎仔毒性ないしは催奇形性は、なんら具体的に示されなかった。EPA(1998)によって引用された2世代試験においては、母獣へ最高448 mg/kg bw/日の投与した場合でも、何ら催奇形性影響は観察されなかった。授乳後期に131ないしは448 mg/kg bw/日の投与を受けた群のF2世代で発育遅延がみられたことに基づき、発生・発達毒性に関するNOAELは46 mg/kg bw/日と推定された。これらの用量では、低体重、摂餌量低下、および脾臓、腎臓、肝臓での病理学的変化といった母体毒性が観察された。ジフェニルアミンによる何らかの腎毒性に関しては、ラットを用いて行われた発生・発達毒性試験で、仔動物の腎臓への病変の誘発は認められなかった。これら動物試験で得られたデータから、受胎能に関するNOAELとしては131 mg/kg bw/日、発生・発達毒性に関するNOAELとしては46 mg/kg bw/日、発生・発達毒性に関するLOAELとしては131 mg/kg bw/日が、リスクの総合評価を行う際に使用される値として提言される。