

部分翻訳

European Union Risk Assessment Report

BENZENE

CAS No: 71-43-2

EINECS No: 200-753-7

RISK ASSESSMENT

欧州連合

リスク評価書（2008年最終承認版）

ベンゼン

RISK ASSESSMENT

Benzene

CAS-No.: 71-43-2

EINECS-No.: 200-753-7

Final version of 2008

FINAL APPROVED VERSION

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
2016年8月

本部分訳文書は、benzene (CAS No: 71-43-2)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/be2a96a7-40f6-40d7-81e5-b8c3f948efc2>

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

吸収

動物データ

ベンゼンは、動物に経口投与した場合、効率的に吸収されると考えられる。¹⁴C 標識ベンゼンをウサギに経口投与(340~500 mg/kg 体重)したところ、投与した放射能の約 80%が投与後 2~3 日以内に呼気、尿中に排泄されており、少なくともこの程度の吸収があることが示されている(Parke and Williams 1953)。これより後にラットやマウスを対象に行われた試験では、ベンゼンが 0.5~150 mg/kg 体重の用量で強制経口投与されたが、ベンゼンの消化管吸収は 97%を超えるという結果が得られている(Sabourin *et al.* 1987)。

げっ歯類を対象にした吸入試験では、ベンゼンの肺からの吸収率と吸入濃度との関係は、非直線的であることが示唆されている(Sabourin *et al.* 1987)。すなわち、¹⁴C ベンゼンへの 6 時間の吸入曝露において、曝露期間中に組織や血液に吸収・保持された ¹⁴C ベンゼンの割合の平均値は、曝露濃度が約 26 mg/m³ から 2600 mg/m³ (8 ppm から 812 ppm) に上昇するにつれ、ラットでは 33%から 15%に、マウスでは 50%から 10%に低下した。ベンゼンの濃度が低い側では、マウスの方がラットより高い吸収率を示しているが、これは、呼吸数および 1 回換気量に生理学的な相違があることからある程度説明がつく。同等の濃度の蒸気に曝露した場合、体重 1 kg あたりの吸収量は、マウスではラットの 1.5~2.0 倍になる。

ベンゼンは皮膚から吸収される。アカゲザル、ミニブタ、無毛マウスで実施した試験では、液体ベンゼンを直接単回適用した際の皮膚吸収は、1%未満であった(Franz 1984; Maibach and Anjo 1981; Susten *et al.* 1985)。吸収率の正確な測定はできなかったが、尿中 ¹⁴C 排泄は、曝露後最初の 8 時間が最も多いことが確認された(Franz 1984)。無傷の皮膚に反復適用した試験では、より多量の吸収が認められた(Maibach and Anjo 1981)。

ベンゼン蒸気を肺から吸入しないように、無毛マウスに人工呼吸器を装着して行われた試験では、空気中のベンゼンが皮膚から速やかに吸収された(Tsuruta 1989)。ベンゼン蒸気の経皮吸収率は、用量および曝露時間に依存して、直線的に上昇した。皮膚吸収速度は、640 mg/m³(200 ppm)において0.00032 mg/cm²/時(4.11 nmol/cm²/時)、3200 mg/m³(1000 ppm)において0.00189 mg/cm²/時(24.2 nmol/cm²/時)、9600 mg/m³(3000 ppm)において0.0059 mg/cm²/時(75.5 nmol/cm²/時)であった。皮膚吸収速度を曝露濃度で除して算出される皮膚吸収係数は、0.619 cm/時であった(Tsuruta 1989)。入念に除毛したラットをベンゼン蒸気に曝露した場合には、皮膚吸収係数は0.152 cm/時と算出されている(McDougal *et al.* 1990)。よって、ベンゼンの皮膚吸収係数には、種差があると思われる。

ヒトにおけるデータ

ヒトがベンゼンに曝露される場合、その主要経路は吸入であると考えられる。吸入されたベンゼンは、肺胞から拡散により吸収され(Nomiyama and Nomiyama 1974; Snyder *et al.* 1981b)、吸気からの吸収率は、吸入曝露開始時に最も高いが、肺胞濃度と血中濃度との差が減少していくことから、経時的に低下する。例えば、150~350 mg/m³(47~110 ppm)の濃度のベンゼンに被験者 23 名を 2~3 時間吸入曝露した試験では、曝露開始から最初の 5 分間では吸気から 78~80%が吸収されたが、1 時間後では吸収率が約 50%(範囲:20~60%)に低下することが示されている(Srbova *et al.* 1950)。166~198 mg/m³(52~62 ppm)の濃度のベンゼンに男性(n=4)および女性(n=2)を 4 時間吸入曝露した試験では、曝露から 2 時間後、吸収率が定常値(約 50%)に到達するのが観察されたが、性差は示されなかった(Nomiyama and Nomiyama 1974)。同様の手法により健常な非喫煙者 3 名を対象とした試験が行われており、ベンゼン濃度は 1.6 ppm または 9.4 ppm、曝露時間は 4 時間とされた(Pekari *et al.* 1992)。ベンゼンの吸収量は、吸気中濃度と呼気中濃度との差から推算した。吸収率は、高用量では 48%、低用量では 52%と推算され、Nomiyama and Nomiyama(1974)の結果を裏付けるものであった。吸入曝露によるベンゼンの吸収については、喫煙者におけるデータから、さらなる知見が得られている。ベンゼンの静脈血中濃度を測定したところ、喫煙者 14 名の方(濃度の中央値: 547 ng/L)が、非喫煙者 13 名の対照群(濃度の中央値: 190 ng/L)より有意に高かった(Hajimiragha *et al.* 1989)。タバコの煙は、ベンゼンを含有することが知られており(Brunnemann *et al.* 1989; Byrd *et al.* 1990)、またタバコ以外の既知のベンゼン曝露源は、それらの被験者には考えられなかった(Hajimiragha *et al.* 1989)。

経口摂取によるベンゼンの吸収率については、ヒトで実施した試験の情報が得られていない。しかし、偶発的にまたは故意に摂取した事例の情報に基づくと、ベンゼンは経口摂取後直ちに吸収されると思われる。

In vivo 試験の結果から、液体ベンゼンはヒトの皮膚から吸収されることが示されている。

それらのデータは、皮膚吸収が吸入曝露または経口曝露による吸収ほど多くはないことを示している。皮膚から血中への物質の移動は基本的に、フィックの法則として数学的に示される受動拡散により生じる。しかし、この説明は皮膚吸収過程を過度に単純化しており、皮膚を介するベンゼンの輸送には、実際にはさまざまな因子(例えばベンゼンと皮膚内分子の相互作用)が影響を及ぼす(Loden 1986)。

ヒトボランティア 4 名を対象に Franz(1984)が行った *in vivo* 試験では、¹⁴C ベンゼン 0.0026 mg/cm² が前腕の皮膚に適用され、ベンゼンが皮膚から吸収されることが立証されている。適用後最初の 8 時間で、総排泄量は 80%を超えた。吸収量の算出は尿中排泄データに基づいており、吸収が起こる前に適用部位から蒸発したベンゼンの量に関する補正は行われなかった。加えて、吸収されたベンゼンのうち尿中排泄される画分の割合として、アカゲザル由来のデータのみに基づいた推定値が用いられており、それを用いて算出された値は、ヒトの数値として正確でない可能性がある。したがって、適用用量の約 0.05%が吸収されたとしているが、この記載はある程度慎重に考慮しなければならない。

別の試験では、前腕の 35~43 cm² に液体ベンゼン約 0.06 g/cm² が適用され、1.25~2.0 時間の曝露が実施された(Hanke *et al.* 1961)。吸収量は、フェノールの尿中排泄量から推算した。皮膚による液体ベンゼンの吸収速度は、(完全飽和状態下で)約 0.4 mg/cm²/時と算出された。しかし、この吸収速度は、試験に方法論的な欠陥があることから、過大な数値である可能性がある(Maibach and Anjo 1981)。

ヒトの皮膚を用いた *in vitro* 試験も、ベンゼンが皮膚から吸収され得ることを裏付けている。ベンゼン(比放射能 99.8 mCi/mmol、ベンゼンの適用濃度の報告なし)を用いて、摘出したヒトの皮膚における透過性を検討した試験では、0.5 時間後には 0.17 mg/cm²、13.5 時間後には 1.92 mg/cm² 吸収したことが示された(Loden 1986)。ヒトの皮膚にベンゼンを 5、120、270、520 μL/cm²(4.4、106、237、457 mg/cm²)の用量で適用した場合、総吸収量は、それぞれ 0.01、0.24、0.56、0.9 μL/cm²(0.009、0.211、0.492、0.79 mg/cm²)であった。よって、総吸収量は、用量および曝露時間(すなわち完全に蒸発してしまうまでの時間)により直線的に増加すると思われる。各濃度において、適用量に対する吸収された量の割合は、約 0.2%で一定であった(Franz 1984)。

分布

動物データ

雄の F344 ラットをベンゼンに 1600 mg/m³(500 ppm)の濃度で吸入曝露した場合、血液では 4 時間以内に、脂肪では 6 時間以内に、また骨髄では 2 時間未満で定常状態(それぞれ 11.5

mg/mL、164.4 mg/g、37.0 mg/g)に達した(Rickert *et al.* 1979)。吸収されたベンゼンは、脂質に富む組織や血流が多い組織(すなわち腎臓、肺、肝臓、脳、脾臓)に分布することが判明した。単位重量当たりの組織における分布量は、組織の血流量に依存すると思われる。

吸入経路と同様に、経口投与によっても、ベンゼンは、様々な器官および組織に速やかに吸収され分布する。Sprague-Dawley ラットに、比較的低用量(^{14}C 標識ベンゼン 0.15 ないしは 1.5 mg/kg 体重)を投与したところ、投与から 1 時間後 の組織 1 kg 当たりの放射能は、肝臓および腎臓で高値(解析対象組織すべてで認められた総放射能のそれぞれ 27%および 34%)となり、血液では中等度(総放射能の 12%)、Zymbal 腺、鼻腔、乳腺では低値(いずれの組織も 6%未満)であった(Low *et al.* 1989)。これより高用量(15 mg/kg 体重)のベンゼンを投与した場合、乳腺(12%)、脂肪組織(放射能の割合の記述なし)、骨髄(18%)における分布濃度がそれ以外の組織より上昇したことから、血流量の多い組織から脂質含量の高い組織への分布のシフトが起こることが示された。

より水溶性の高いベンゼン代謝物の場合、その分布は親化合物とは異なる。ラットにベンゼン 15 mg/kg 体重を経口投与した場合、1 時間後の測定でヒドロキノンが高濃度で認められた組織は、肝臓、腎臓、血液であった(Low *et al.* 1989)。ベンゼンの水酸化代謝産物であるフェノールは、口腔、鼻腔、腎臓で高濃度に認められた。ベンゼンの抱合代謝物であるフェニル硫酸塩、ヒドロキノングルクロニド、*trans,trans*-ムコン酸については、主要な分布部位は、血液、骨髄、口腔、腎臓、肝臓であった。やはりベンゼンの抱合代謝物であるフェニルグルクロニドは、Zymbal 腺および鼻腔に蓄積した。

ベンゼン代謝物(フェノール、カテコール、ヒドロキノン)は、ベンゼンに 6 時間吸入曝露されたラットの血液や骨髄に検出されている(Rickert *et al.* 1979)。いずれの代謝物についても、骨髄中濃度は、血中濃度より高かった。曝露中止後、血中および骨髄中のフェノール濃度は、カテコールやヒドロキノンよりはるかに速やかに低下した。

ベンゼンは、胎盤を通過して発生中の仔動物に分布する可能性がある。Ghantous and Danielsson(1986)は、妊娠マウスをベンゼンに 6400 mg/m³(2000 ppm)の濃度で 10 分間曝露し、ベンゼンおよびその代謝物が脂質に富む組織(脳、脂肪など)、および血流量の多い組織(肝臓、腎臓など)に分布することを確認しているが、ベンゼンが、曝露後直ちに胎盤および胎仔にも認められたことも報告している。投与量のどのくらいが胎仔に到達したのかについては、推定に必要なデータが示されていない。

土壤に結合したベンゼンを皮膚適用した場合と純粋なベンゼンを皮膚適用した場合とでは、ベンゼンの生物学的利用能に差異が生じることから、土壤の種類は重要な因子である(Skowronski *et al.* 1988)。雄ラットに、純粋な ^{14}C ベンゼン、または粘土もしくは砂質土 1

g に吸収させた ^{14}C ベンゼンを、 0.004 mg/cm^2 の用量で皮膚適用した。血漿中の放射能濃度の最高値は、純粋なベンゼンで最も高く、僅差で砂質土に吸収されたベンゼンがそれに次ぎ、粘土に吸収されたベンゼンでは最も低かった。血漿からの放射能の消失半減期は、24.5 時間(砂質土)、23.0 時間(純粋なベンゼン)、19.4 時間(粘土)であった。適用部位におけるベンゼンの保持率は、土壌処理群の方が高かった。すなわち、適用部位の皮膚における 48 時間後の放射能の組織内濃度は、純粋なベンゼンで 0.011%、砂質土群で 0.059%、粘土群で 0.119%であった。土壌処理群では、適用部位の皮膚における放射能濃度が最も高く、それに次いで高かった組織は、腎臓および肝臓であった。純粋なベンゼン群では、組織内濃度が腎臓において最高となり、次いで肝臓、皮膚であった。これらのデータから、皮膚曝露後のベンゼンの生物学的利用能は、土壌の種類により影響を受け得ることが示唆されるが、詳細な定量データは示されていない。また、粘土の方が緊密にベンゼンと結合すると考えられ、粘土処理されたベンゼンは、砂質土処理されたベンゼンや純粋なベンゼンほど、接触により吸収され得ないことも示唆される。著者(Skowronski *et al.* 1988)は、分布の差異に関して結論を示しているが、試験においてベンゼンではなく ^{14}C 標識が測定されていることから、その結論は受け入れられない。

ヒトにおけるデータ

ヒトにおけるベンゼンの分布に関するデータは、主として、ベンゼンへの吸入曝露についての症例報告から得られている。全般的に、それらのデータは、ベンゼンが血中に吸収されて全身に分布することを示唆している。ベンゼンは脂溶性であり、脂質に富む組織に最も高濃度で分布することが認められている。試薬グレードのベンゼンを嗅いで死亡した 1 人の若年者の剖検例では、ベンゼンの濃度について、血液 2.0 mg%、脳 3.9 mg%、肝臓 1.6 mg%、腎臓 1.9 mg%、胃 1 mg%、胆汁 1.1 mg%、腹部脂肪 2.23 mg%、尿 0.06 mg%であったことが報告されている(Winek and Collom 1971)。ベンゼンはまた、ヒトの胎盤を通過することが示されており、臍帯血には母体血以上の量が認められている(Dowty *et al.* 1976)。

代謝

代謝経路

ベンゼンの代謝は、その毒性発現を左右する重要な決定因子である(Snyder and Kocsis 1975; Snyder *et al.* 1989; Irons and Moore 1980; Schlosser *et al.* 1995; Valentine *et al.* 1996)。ベンゼンの代謝は広く研究されており、動物とヒトの双方で類似の経路に従うと思われるが、顕著な動物種差が見られることが示されている。

肝臓が、ベンゼンの代謝の主要部位である。ベンゼンは、シトクロム P-450 依存性混合機

能オキシダーゼ系により、いくつかの代謝物に変換される。シトクロム P-450 の中で、酵素 CYP 2E1 が、ベンゼンに最も高い親和性を示すと思われる、ベンゼン代謝において最も高い活性を示す。CYP 2B1 もベンゼンをヒドロキシル化できるが、より高濃度においてのみ代謝に寄与する。トランスジェニック CYP 2E1 ノックアウトマウスを対象に、ベンゼンの *in vivo* 代謝を検討した試験で最近確認されたとおり、CYP 2E1 による酸化的代謝は、ベンゼンの血液毒性作用および遺伝毒性作用の発現に必須である (Valentine *et al.* 1996)。

さらに、CYP 2E1 によるベンゼンの代謝は骨髄でも認められており、フェノールおよびヒドロキノンを経約 7 : 1 の比で形成される (Schrier *et al.* 1989)。

エタノールは、CYP 2E1 誘導を通じてベンゼンの毒性を増強し、ベンゼンに起因する貧血、リンパ球減少、骨髄細胞充実度の減少といった影響の重症度を上昇させる (Baarson *et al.* 1982; Post and Snyder 1983 a, b)。それ以外の CYP 2E1 誘導因子であるイソニアジド、イソプロパノール、糖尿病、空腹などによっても、類似の増強がもたらされると考えられる。他方、CD-1 マウスに低濃度のベンゼンを反復経口投与 (50 mg/kg 体重/日未満を 3 週間) した場合には、CYP 2E1 の活性が 34% 低下した (Daiker *et al.* 1996)。

ベンゼンの生体内変換経路を Appendix A VI に示す。シトクロム P-450 酵素は、ベンゼン環への酸素原子 1 個の付加を触媒し、最初の段階としてモノエポキシド、すなわちベンゼンオキシドを形成すると考えられる (Jerina *et al.* 1968)。その後のベンゼンオキシドの代謝には、可能性として 4 つの経路が考えられる。1 つ目の経路は、グルタチオン抱合によりプレメルカプツール酸が産生され、それが腎臓でさらに代謝されて、無毒化された化合物であるフェニルメルカプツール酸を生じる、というものである。その後、フェニルメルカプツール酸は尿中に排泄される (Henderson *et al.* 1989; Sabourin *et al.* 1988)。2 つ目に考えられる経路は、ベンゼンオキシドの非酵素的転位によりフェノールが産生される、というものである。その後、フェノールがヒドロキシル化されて、ヒドロキノン、カテコール、または 1,2,4-トリヒドロキシベンゼン (ベンゼントリオール) が産生されると考えられる。3 つ目の経路は、ベンゼンオキシドへの加水反応により、ベンゼンジヒドロジオールが産生される、というものである。生じたベンゼンジヒドロジオールは、ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼにより酸化されカテコールになると考えられ、そのため、カテコールを形成する上述とは別の経路を提供することになる。最後に想定される経路は、ベンゼン環が開裂され、中間体であるムコンアルデヒドの形成を経て、尿中に排泄される代謝物であるムコン酸が産生される、というものである。

骨髄毒性を説明しようとする試みの中で、フェノール、カテコール、およびヒドロキノンが骨髄に輸送され、それらがペルオキシダーゼを介した反応により求電子化合物に変換されるという仮説が提示されている。例えば、フェノールは、骨髄中で骨髄ペルオキシダー

ぜにより速やかに酸化され、ビフェノールやビフェノキノンなど、タンパク質と結合する反応性化学種となることが示されている (Sawahata *et al.* 1985)。ヒドロキノンも、骨髄でペルオキシダーゼ触媒反応により酸化され、きわめて短寿命のセミキノラジカル中間体になる。これにより、ベンゼンに曝露された動物において、DNA 損傷および細胞毒性作用をもたらすことが知られている反応性代謝物である *p*-ベンゾキノンが形成される (Smith *et al.* 1989)。なお、*trans-trans*-ムコンアルデヒドも、代謝に関係している可能性がある (Snyder *et al.* 1989)。

ベンゼンの代謝における動物種差

ベンゼンの代謝は、ヒトおよび実験動物において定性的に類似していると思われるが、直接的な比較を行った試験の情報は得られていない (Sabourin *et al.* 1988; Henderson *et al.* 1989)。ベンゼンの有毒化(酸化)反応と解毒(抱合)反応には、見るからに動物種差が存在すると思われるが、*in vivo* においてそれらの反応経路がどのように相互に関連しているかは、未だ十分に明らかにされていない (Schlosser *et al.* 1995)。

げっ歯類では、ラットとマウスの中に、ベンゼンの代謝に関し、いくつかの顕著な定量的相違が認められる (Sabourin *et al.* 1988; Medinsky *et al.* 1989 a, b; Schlosser *et al.* 1995)。経口と吸入のいずれの投与経路によっても、マウスでは高用量において全体的な代謝が飽和に達したが、ラットでは飽和状態とならなかった。このことは、ベンゼンの代謝に定量的な種差があることを示している (Sabourin *et al.* 1987)。強制経口曝露の場合、50 mg/kg 体重までの用量では、単位体重あたりの総代謝物は、F344/N ラットと B6C3F1 マウスとで同等であった。しかし、それより高用量の場合、マウスでは総代謝物量が増加せず、すなわち飽和状態となったのに対し、ラットでは総代謝物量が引き続き増加した (Sabourin *et al.* 1987)。同様に、吸入曝露の場合、マウスのデータでは、高用量 (680 mg/m³ 超、260 ppm 超) で代謝物の生成が横ばいとなったことから、代謝の飽和が示されたのに対し、ラットでは、増加率は非直線的であったものの、代謝物の生成量が引き続き増加した (Sabourin *et al.* 1987)。

ただし、吸入曝露の場合、生成された代謝物の総量は、検討した全ての蒸気濃度 [26～2600 mg/m³ (8～812 ppm)] において、マウスの方がラットより多かった。これは、一部には、マウスの方が吸入量が多いことに起因する (Sabourin *et al.* 1987)。その後の試験で、160 mg/m³ (50 ppm) のベンゼンに 6 時間吸入曝露したラットとマウスとで代謝を比較したところ、マウスの総代謝物量がラットの 2 倍を超えることが確認された。これは、吸入されたベンゼンの量に差異があることに起因して生じ得る差よりも大きい (Sabourin *et al.* 1988)。

さらに、ベンゼンの代謝について、体重を基準(体重 1 kg あたりの代謝物のモル数)に表した場合、吸収したベンゼンを、推測される毒性代謝物であるヒドロキノン(HQ)、ベンゾキ

ノン(BQ)、ムコン酸(MU)に代謝した割合は、マウスの方がラットより高かった(Henderson *et al.* 1989; Medinsky *et al.* 1989; Sabourin *et al.* 1988, 1992)。また、フェニル硫酸塩、1種類の解毒代謝産物、1種類の非同定水溶性代謝産物が、ラットとマウスでほぼ等濃度存在していた。このことから、毒性を有する可能性のある代謝産物の生成に至る経路により代謝されるベンゼンの割合は、解毒経路とは対照的に、マウスの方がラットよりはるかに高かったことが示唆される(Sabourin *et al.* 1988)。

Henderson *et al.*(1989)は、ヒドロキノングルクロニドや *trans,trans*-ムコン酸も、ベンゼンに曝露されたマウスにおいて、ラットよりも高濃度に認められたことを報告している。肝代謝の差異が代謝物濃度の差異に結びついているのかを検討するため、Orzechowski *et al.* (1995)は、マウスとラット双方の分離した肝細胞から放出されるベンゼン代謝物のパターンを調べた。NMRI マウス由来の肝細胞には、Wistar ラット由来の肝細胞に比べ、ほぼ3倍のベンゼン代謝作用が認められた。ヒドロキノンの生成が多く、またトリヒドロキシベンゼン硫酸塩およびヒドロキノン硫酸塩を生成したことが、ベンゼンの代謝率が高くなった主因であった。大きな相違点として、ラット肝細胞では、マウス肝細胞に比べ、フェノール性代謝物の硫酸抱合体の生成がより多かったことが挙げられる。

In vitro データに基づく代謝経路および代謝動態の検討も、詳細に行われている(Schlosser *et al.* 1995)。マウス、ラット、ヒトの間には代謝に差異が存在するが、ヒト組織試料を用いて求められた速度の範囲は、マウスやラットで同様に求められた速度の範囲にまたがっている。例えば、フェニル硫酸塩の生成速度には、ヒトの試料の間に3倍のばらつきが認められた(範囲: 0.3~0.9 nmol/mg/分)が、実験動物の場合、フェノールの硫酸化は、ラットサイトゾル(1.2 nmol/mg/分)の方がマウスサイトゾル(0.5 nmol/mg/分)よりはるかに速かった。また、ヒドロキノンのグルクロン酸抱合は、ヒトの試料の間ではほぼ3倍のばらつきがみられ(範囲: 0.1~0.3 nmol/mg/分)、またマウス肝ミクロソーム(0.22 nmol/mg/分)の方が、ラット肝ミクロソーム(0.08 nmol/mg/分)での場合に比べ速かった。

ヒトにおけるCYP 2E1活性の個体間のばらつきは、肝ミクロソームにおけるp-ニトロフェノールのヒドロキシル化の測定でも認められ、その範囲は0.25~3.27 nmol/mg/分に及んでいる(Seaton *et al.* 1994)。マウスおよびラットにおいて測定された活性(それぞれ1.56 nmol/mg/分および0.63 nmol/mg/分)は、ヒトでの値の範囲内であった。

ただし、このデータは *in vitro* 試験に由来したものであり、その解釈は、*in vitro* 試験の限界を反映たものでなくてはならないことに留意すべきである。

ヒト以外の霊長類やげっ歯類において代謝試験が実施されており、そのデータから、*in vivo* で各動物種が示す挙動を比較することができる。マウスとラットでは強制経口投与が

行われたが、サルやチンパンジーでは別の経路(それぞれ腹腔内注射および静脈内注射)が用いられ、またサルでは曝露用量も異なっていた。経口経路と吸入経路を比較したこれまでの試験からは、代謝プロファイルが、ベンゼンへの曝露経路ではなく曝露率(曝露量)に依存して変化するとみられることが示唆されており(Sabourin *et al.* 1989)、このことから、サル、チンパンジー、ラットで認められた尿代謝プロファイルとマウスでの尿代謝プロファイルとの比較において認められた差異は、様々な代謝酵素がどのように代謝全体に関わっているかという点における動物種差に起因していると考えられる。尿代謝物に基づくと、吸収されたベンゼンをヒドロキノン抱合体およびムコン酸代謝物に至る経路により代謝する割合が最も高いのは、マウスであると思われる(Sabourin *et al.* 1992)。よって、マウスでは、サル、チンパンジー、またはラットにおけるよりも、多くのヒドロキノンおよびムコン酸が生成される。対照的に、非ヒト霊長類(およびラット)で認められた主要な代謝産物は、フェノール抱合体である。これらの試験では、投与経路や用量が一定ではなかったため、非ヒト霊長類(サル、チンパンジー)とラットの間では、代謝の差異に関して絶対的な順位付けを行うことは困難である。

骨髄代謝に種間差が認められている。Zhu *et al.*(1995)は、ラットにおける細胞グルタチオン含有量およびキノンレダクターゼ特異的活性が、それぞれマウスの2倍および28倍であったことを示している。動物においては、グルタチオンレダクターゼとキノンレダクターゼの双方とも、ヒドロキノンに起因する毒性の低減にきわめて重要な役割を果たすと考えられている。

ヒトでも職業曝露を受けた者において、尿中のベンゼン代謝物の測定が実施されている。しかし、ヒトと動物のデータを比較することは、試験デザインの面から、また、既知の代謝物全てを同時に測定した試験の情報が得られていないことから困難である。得られた試験の情報から、ベンゼンに曝露された場合の尿中フェノール量は、曝露濃度と相関している($r=0.881$)と結論付けられる(Inoue *et al.* 1986)。別の試験(Popp *et al.* 1994)では、尿中ムコン酸濃度がベンゼンへの職業曝露に伴い上昇することが示され、当該濃度は血中濃度および空気中のベンゼン濃度と相関していた。また、イタリアで条件を満たす参加者を対象に実施された別の試験(Lagorio *et al.* 1994)では、ベンゼンの血中濃度とベンゼンの尿中濃度との間に有意な相関が認められた。

排泄

ベンゼンに吸入曝露された際、ヒトおよび動物において未変化のベンゼンの主要排泄経路となるのは、呼気である。ベンゼンのほとんどは代謝され、代謝物は第II相抱合の後、主に尿中に排泄される(Appendix A VI)。フェノール性代謝物は、硫酸塩またはグルクロン

酸に抱合される(Henderson *et al.* 1989)。少量のグルクロニドが胆汁に入ることがあり、それらは糞便中に認められる。ヒト被験者1名を対象に、ベンゼン 20.5 mg/m³(6.4 ppm)に8時間、および 317 mg/m³(99 ppm)に1時間曝露した試験では、呼吸における排泄は、おそらく4相性であることが示唆された(Sherwood 1988)。初期相は急速で、その後の第2相または第3相は緩徐なものになる。この試験におけるフェノール抱合体の尿中排泄は、急速な排泄の初期相と、その後の緩徐な排泄相の2相性を示した。

代謝による排泄は、飽和し得ることが証明されている。低用量のベンゼン(15 mg/kg 体重未満)をラットやマウスに経口投与した場合には、投与された¹⁴Cの90%超がマウスとラット双方の尿に排泄され、用量と尿代謝物の排泄との間に直線的な関係が認められた(Sabourin *et al.* 1987)。高用量のベンゼン(マウス:50 mg/kg 体重超、ラット:150 mg/kg 体重超)を経口投与した場合には、投与されたベンゼンは、未変化のまま呼気中に存在する割合がより高くなったことから、代謝経路が飽和に至ったことが示唆された。

動態学および動力学的データのモデル化

様々なグループが、ベンゼンおよびその代謝物の吸収、代謝、排泄に関する各種データを活用して親化合物や有毒な可能性のある代謝産物の濃度を予測するモデルを開発し、用量-反応関係の理解、動物種間の比較およびリスクの総合評価に役立てる試みを行っている。コンパートメントに基づく動態モデル(Bailer and Hoel 1989; Beliles and Totman 1989)と生理学に基づく動態モデル(Medinsky *et al.* 1989; Paxman and Rappaport 1990; Travis *et al.* 1990; Bois *et al.* 1991)の双方が開発されている。例にもれずこれらのモデルは、一連の微分方程式および代数方程式から成っており、身体および組織のコンパートメント全体にわたる化学物質およびその重要な毒性代謝物の吸収、分布、代謝、排泄について記述している。こうした数学的モデルに組み込まれている要素としては、化学物質特異的な物理化学的パラメータ(血液-組織分配係数など)、ならびに生理機能および代謝における種差が挙げられる。こうしたモデルの開発は、ベンゼンおよび代謝物の体内量の予測、動物種差の比較、作用と最も優れた相関を示す投与方法の見極めを目的として行われてきている。これらのモデル間には、複雑さや妥当性(モデルの構築の基となった試験とは無関係の試験について、実測で得られた知見をどのくらい予測できているかで評価)にばらつきがみられる。モデルの妥当性を高めるには、より多くの試験データが必要となり、それに伴って複雑さが増大する。ただし、モデルに組み込まれたパラメータ値のほとんどは、同一の試験に由来するものではなく、また、ベンゼンやその代謝物の濃度測定の実験条件が同一のものから得られたのでもなく、教科書的記述から引用されている。他のモデル化手法の場合、複数のパラメータの予測値をわずかなデータから算出しており、かなり疑わしい値となっている。

Bailer and Hoel(1989)は、マウスからヒトまで投与量と体内量との関係を外挿する、初期のモデルの1つを提示している。本モデルでは、種間用量変換法(inter-species dose conversion approach)が用いられ、すなわち1日の体重1kgあたりの投与量(mg/kg 体重/日)が、動物種にまたがって等価の投与量単位になる様に設定された。マウスおよびラットの体内量は、ベンゼン代謝物の総量に基づいて求められた Sabourin *et al.*(1987)のデータから導出された。よって、体内量は投与量に対する代謝された量の割合として表され、この関係はヒトとマウスとで同一であるとみなされた(Bailer and Hoel 1989)。著者は、このモデルを Huff *et al.*(1989)により報告されたげっ歯類がん原性試験の結果に適用し、動物における用量と腫瘍発生との相関を検討して、ベンゼンに職業曝露されたヒトのがんリスクを予測した。腫瘍に関するげっ歯類試験データに照らし、本モデルによる体内量予測値を検証してみたところ、本方法による予測は、マウスについては妥当であった(Bailer and Hoel 1989)。本モデルによれば、ヒトに認められるがんの予測過剰発生率として、顕著に過大な値が導出される(Cox and Ricci 1992)。

最近の生理学的薬物動態(PBPK)モデルは、これまでのモデルよりコンパートメントおよび諸関係を多く含んできており、モデルのパラメータは、血流および特定の組織コンパートメントの代謝能を用いて導出されている(Medinsky *et al.* 1989; Spear *et al.* 1991)。Medinsky *et al.*(1989)は、Sabourin *et al.*(1987)の試験で得られたマウスおよびラットの動態学的データの平均値を使用し、一方 Spear *et al.*(1991)は、Rickert *et al.*(1979)および Sabourin *et al.*(1987, 1988)のラットのデータを使用している。

Travis *et al.*(1990)は、マウス、ラット、ヒトモデルを考案し、3種全てについて試験データ(Rickert *et al.* 1979; Sabourin *et al.* 1987; Sato *et al.* 1975; Sato and Nakajima 1979; Snyder *et al.* 1981)を使用した。本モデルによれば、ベンゼンを吸入、強制経口、または注射投与した場合の体内量に関するデータについて、ヒトと動物との間で良好な整合性が示される。Cox and Ricci(1992)は、所定の投与量のベンゼンから産生される代謝物をヒトについて Travis *et al.*(1990)のモデルを用いて算出した場合、Bailer and Hoel(1989)の種間用量変換法による予測よりも少なくなる可能性があることを示している。

Bois and Paxman(1992)は、Rickert *et al.*(1979)および Sabourin *et al.*(1987)が示したラットのデータを用いて、ベンゼンおよび生成される代謝物に関するモデルを構築した。本モデルには、ベンゼンの代謝部位として、肝臓と骨髄の両方が含まれている。本モデルにより、いくつかの重要なベンゼン代謝物の形成率に有意な影響を及ぼすのは、曝露率であるという結論が導かれている。著者は本モデルを用いて、ヒトの血中および骨髄における代謝物の産生のシミュレーションを、 3.2 mg/m^3 (1 ppm)での8時間吸入曝露および 102 mg/m^3 (32 ppm)での15分間吸入曝露の場合で行った。後者からは、実際に起こり得る曝露として、 16 mg/m^3 (5 ppm)の短期間曝露が考察された。これらのシミュレーションから、代謝物(ヒ

ドロキノン、カテコール、ムコンアルデヒド)の濃度は、高濃度[102 mg/m³(32 ppm)]での短時間曝露の場合の方が、低濃度[3.2 mg/m³(1 ppm)]での長時間曝露の場合より、20%高くなることが示された。著者は、濃度 16 mg/m³(5 ppm) (シミュレートした用量の 1/6)での短時間曝露には、安全性に適度な余裕があると結論付けている。本モデルには、データの集積に稚拙な面があり、モデル化手順における正確度が疑わしいなど多くの問題点があるため、導出されたパラメータについても、やはり科学的価値に疑いの余地がある。

Cox(1993)は、血中および骨髄におけるベンゼンの特定の毒性代謝物を対象に、さまざまな曝露シナリオにおいてどのような挙動を示すかを、より詳細に検討した。モデル化は、ベンゼンの濃度範囲を 9.6~154 mg/m³(3~48 ppm)、曝露時間を 360~22.5 分間として実施された。産生されたベンゼン代謝物の総量など、いくつかの体内量については、累積曝露(すなわち、曝露濃度と曝露期間の積)の結果が優れた予測根拠となり、代替値が導出された。しかしながら、著者は、このモデルにおいて、曝露期間が異なると、累積投与量が同一であっても、血中および骨髄における代謝物の最大濃度にきわめて大きな差異が生じることを予測している。著者は、自らのデータから、所定の累積曝露量に達した際の骨髄の最大代謝速度は、投与の時間的パターンの違いに応じて鋭敏に変化すると推測している。本モデルでは、曝露量については良く予測されているが、骨髄内の細胞増殖および細胞成熟に関する毒物動力学的情報の組み込みが不十分であった。

こうした制約を詳解しようとする試みの中で、Cox(1995)は、シクロホスファミド(既知の免疫抑制剤であり骨髄毒性剤でもある)について作製された生物学に基づくモデルの諸要素を用いて、生物学に基づくベンゼンでのモデルを開発した。この手法では、薬物動態学的要素および薬力学的プロセスを、血液毒性および遺伝毒性にきわめて重要であるとされているプロセスなどと共に組み込もうと試みられている。ベンゼンに関するこれ以前の解析では、累積曝露量は、ベンゼンによる血液毒性、白血病誘発、細胞遺伝学的影響を予測するための適切な指標に必ずしもならないことが示唆されているように思われる。今回の結果について、著者は、こうした以前の解析結果と整合し得るものと考えている。しかし、今回のモデルの妥当性を検討するデータが得られておらず、今回のモデルは純粋な理論上だけのものである。

ベンゼンに関する統合的な PKPD モデル構築の試みは、試験データが少ないため、これまでは失敗に終わっている。これまで用いられたモデルは、精度および妥当性が足りず、ここで想定する特定の状況を扱うには不適當である。原理的には母集団アプローチは適切な方法であると考えられ、また単一のモデルに様々な動物種のデータを組み入れられる様にする手段は得られているが、ベンゼンに関する PKPD では固有の問題が表出してくる。まず、男性におけるベンゼンの動態データが希薄である。また、得られているデータは、主に尿中のベンゼン抱合代謝物に関するデータであり、このことは、ベンゼンの動態パラメ

ータ算出に当たっては、そうした代謝物の形成に関して仮説を立てなければならないことを意味する。試験条件の制約から、ベンゼンの吸収量を正確に推算できないため、その分布量を推算することができない。よって、ベンゼンに関するヒトの動態データの導出は、主に動物におけるデータに基づかなければならず、このことは、これまでに検証がなされていはいくつかの仮説を立てなければならないことを意味する。

Bois and Paxman のモデル(Bois and Paxman 1992)では、肝臓、骨髄、低灌流組織、高灌流組織を含む 5 つのコンパートメントからなるモデルが使用された。本モデルでは、肝臓および骨髄での代謝物形成はミカエリスメンテン式に準じていると仮定し、骨髄はヒト白血病と関連するためモデルに組み入れられることとし、またベンゼンオキシドからフェノールへの変換は例外的に、本モデルでは自発的に起こり、一次反応速度式により説明されるものとした。本モデルを用いて、ラットを対象に、3 段階の異なる蒸気濃度で様々な曝露時間により鼻部だけの曝露を行った場合における、代謝物の形成についての予測が行われた。得られた予測データは、51 ppm(165.6 mg/m³)で 6 時間、153 ppm(496.8 mg/m³)で 2 時間、558 ppm(1811.8 mg/m³)で 0.5 時間の曝露が行われた Sabourin *et al.*(1989)の試験データとの比較に供された。この試験では、曝露濃度と投与時間の積は一定であった。モデルによる予測データと試験での測定データとの比較から、モデルでは尿中代謝物濃度が過大評価されたり過小評価されたりすることが示された。次のステップでは、本モデルを用いて、ヒトにおける代謝物形成の予測が、1 ppm(3.25 mg/m³)での 8 時間曝露、および 32 ppm(103.9 mg/m³)での 15 分間曝露の場合について行われた。本モデルの予測では、ベンゼン代謝物(ヒドロキノン、カテコール、ムコンアルデヒド)の曲線下面積は、32 ppm(103.9 mg/m³)で 15 分間曝露の場合の方が 1 ppm(3.25 mg/m³)で 8 時間曝露の場合よりも、20%大きいことが示された。

Medinski のモデル(Medinski *et al.* 1989 a, b, c)では、4 つのコンパートメント(肝臓、低灌流組織、高灌流組織、脂肪)が採用されている。本モデルでは、肝臓が代謝を生じる唯一の器官であると仮定されているが、このことは本モデルの明らかな欠点となっている。ヒトの Vmax 値(本モデルに組みこまれた各種代謝物について、5 つの異なる Vmax 値)を求めるに当たり、マウスのデータが基本入力データとして用いられ、シミュレーションデータが動物試験データと整合するまで、反復的な手法により調整が行われた。高用量から低用量の外挿については、特に検討は行われなかった。マウス、ラットおよびヒトにおいて Vmax 値および Km 値を比較すると、マウスとヒトの Km 値は同等である(これは本モデルの仮定にあたる)が、ラットの Km 値は、ほとんどの代謝段階でヒトと異なっていることが示された。マウスとラットの Vmax 値は、いずれもヒトより数倍高い。したがって、本モデルは、トキシコキネティクスの観点から最も適切な動物を決定することに関して、参考にならない。

どの代謝物が白血病誘発や血液毒性作用などの毒性作用と関連しているかについてはほとんど解明されていないことから、上述の PBPK モデルは、リスクの総合評価のための根拠とするには適しておらず、また、最も適した動物種を選択する際の参考とすることもできない。白血病のタイプはヒトと動物とでは異なっているため、この最も重要性が高い影響について、ベンゼンに関する動物およびヒトのデータを用いた統合的な PKPD 化による手法では、齟齬が生じてしまう。したがって、動物におけるデータを用いた PKPD モデル化で得られた結果および結論が、すべてヒトに当てはまるわけではない。

要約

ベンゼンのトキシコキネティクスは、動物とヒトの双方で検討されてきている。それらのデータは、国際化学物質安全性計画 (IPCS、1993)、米国有害物質・疾病登録局 (ATSDR、1993 および 1997) など、近年に行われた多くのレビューにおいて要約されている。主要な知見から、ベンゼンはあらゆる経路(吸入、経皮、経口)で吸収され、吸入が最も重要な曝露経路であることが示唆される。ベンゼンは速やかに分布し、血液に比べ脂肪および脂質に富む組織において高濃度となる。吸入経路、経皮経路、または経口経路による吸収後、ベンゼンのほとんどが代謝され、代謝物は第 II 相抱合の後、主に尿中に排泄される。ベンゼンの酸化的代謝は、動物で毒性が発揮されるための要件であり、ヒトと動物とで類似の経路に従っている。肝臓がベンゼンの代謝の主要部位であるが、ベンゼンの血液毒性作用および白血病誘発作用には、骨髄における代謝が関連している可能性がある。ベンゼンの代謝速度、ベンゼンに高レベルで曝露された場合における V_{max} 、毒性(酸化)誘発に向かう代謝経路対解毒(抱合)に向かう代謝経路の割合には、明らかに動物種差が存在する。しかし、血液毒性および白血病の発生に認められる動物種差を、代謝に動物種差があることで説明可能であるかは、目下のところ不明である。

4.1.2.2 急性毒性

動物データ：

経口：

ベンゼンの急性経口毒性は、既存データに一貫性がないことから導出が困難となっている。ある試験は、げっ歯類の成体に経口投与した場合の LD_{50} は、810 mg/kg 体重という低値を報告している。この試験では、1870 mg/kg 体重を経口投与した場合、被験動物は 20 分以内に死亡している (Cornish and Ryan 1963)。一方、Smyth *et al.* (1962) は、雄ラットの経口 LD_{50} 値が 10,016 mg/kg 体重もの高用量であったと報告している。

報告内容が不十分な別の試験では、その第 1 部において雄ラット 150 匹を用い、無希釈のベンゼン(純度に関するデータなし)を 2000、2990、4470、6690、10000 mg/kg の用量で各群 10 匹ずつとして強制経口投与したところ、動物の死亡率は 0/10、1/10、3/10、5/10、9/10 となった。試験の第 2 部では、3000、4250、6000、8460、11920 mg/kg の用量で各群 20 匹として投与したところ、ラットの死亡率は 0/20、5/20、12/20、17/20、17/20 となった。経口 LD₅₀ 値は、5960 mg/kg と算出された。臨床症状、死亡までの時間、剖検に関するデータは、いずれも示されていない(Withey and Hall 1975)。

Kimura *et al.*は、新生仔ラット(用量ごとに雄雌 6~12 匹)、14 日齢ラット(用量ごとに雄雌 6~12 匹)、若齢成熟ラット(用量ごとに雄 6 匹)、高齢ラット(用量ごとに雄 6 匹)を対象に、16 種類の溶媒の急性経口毒性を検討した。この試験では、観察期間は 1 週間とされ、最初に観察された毒性徴候について、それを引き起こしたおおよその用量が記録された。ベンゼン(分析グレード)の毒性は、14 日齢ラットに対しての方が若齢成熟ラットや高齢ラットに対してよりも、有意に高かった。経口 LD₅₀ 値の算出結果は、14 日齢ラットで 3400 mg/kg、若齢成熟ラットで 3800 mg/kg、高齢ラットで 5600 mg/kg であり、新生仔ラットは、ベンゼンに対する感受性がきわめて高かった。単回経口曝露の最大許容限度の算出結果は、若齢成熟ラットの場合 0.0002 mL/kg であり、この値は、臨床徴候(呼吸困難、運動失調、チアノーゼ、ないしは昏睡)が最初に出現した曝露量の 1/1000 を基準に算定された。剖検に関するデータは、報告されていない(Kimura *et al.* 1971)。

雄ラットで行われた別の試験では、ベンゼン(純度 99.98%)の経口 LD₅₀ 値を 5600 mg/kg と算定している。ベンゼンは、無希釈のままか、5~10%アカシア(アラビアゴム)水溶液で乳化したオリーブ油溶液またはコーン油溶液のいずれかとして、胃管により胃に送込まれた。総容量が 7 cc を決して上回らない様に投与が行われた。生残ラット全てについて、回復が確認されるまで(通常約 2 週間)観察が行われた。ラットを剖検したところ、肝臓のわずかな変化、また一部の例では、有意性に疑いの余地はあるが、腎臓に投与に関連した影響が多少認められた。用量または 1 用量あたりの動物数に関するデータ、臨床徴候に関するデータ、剖検に関するさらなるデータはいずれも記述されていない(Wolf *et al.* 1956)。

また別の試験が、1 用量(用量の記述なし)当たり雄ラット 5 匹(群の数は不明)を対象に行われており、経口 LD₅₀ 値は、11.4 mL/kg(約 10 g/kg)と求められている。他にデータは示されていない(Smyth *et al.*, 1962)。Cornish and Ryan は、1 用量当たり 10 匹のラットを用いた急性経口毒性試験について報告している。試薬グレードのベンゼンが高用量(1870 mg/kg)投与された群では、被験動物は振戦および強直間代痙攣を起こし、その多くが 20 分以内に死亡した。88 mg/kg を単回投与された群では、中枢神経系のわずかな抑制が引き起こされたが、死亡例はみられなかった。臨床症状や剖検に関して、さらなるデータは示されていない。ベンゼンの代謝的運命は、ベンゼン投与前の 24 時間絶食させたラットでは、顕著に

変化することが認められた。非絶食ラットの場合、主要な代謝物は、グルクロン酸以外の物質と抱合したフェノール類である。一方、絶食ラットの場合、主要な排泄経路は、グルクロン酸との抱合である (Cornish *et al.*, 1963)。

吸入：

ラットやマウスに対する急性吸入毒性は、4 時間の単回吸入曝露〔雌ラットの LC₅₀ : 13700 ppm (44500 mg/m³; Drew and Fouts 1974)〕、および 7 時間曝露〔マウスの LC₅₀ : 9980 ppm (31790 mg/m³; Svirbely *et al.* 1943)〕の結果から、おそらく低いと判断される。臨床症状は、不穏状態、振戦、筋肉攣縮、呼吸の変化、協調運動障害、および昏睡であった (Svirbely *et al.* 1943)。主な病理所見は、肺および肝臓のうっ血であった (Drew and Fouts 1974; Svirbely *et al.* 1943)。

雌ラットを用いた試験において、吸入 LC₅₀ 値が 13,700 ppm (約 44500 mg/m³)/4 時間であるという結果が得られている。ベンゼン蒸気は、直列に繋いだ 2 つのフリットガラスバブラーにそれぞれベンゼン (試薬グレード、チオフェン非含有) を入れ、順次通気させることにより生成された。1 つ目のバブラーはウォーターバスで約 35°C に維持され、これにより、2 つ目のバブラーから出ていく空気中に確実にベンゼンが飽和する状態を確保した。ベンゼンが飽和した空気は、フィルターを通した圧縮空気により、所定の濃度に希釈された。チャンバー内のベンゼンの濃度は、体積が明らかな空気に約 0.5 L/分の流量でメタノール中を通過させる手法により、30 分間隔で監視した。この流量におけるメタノールのベンゼン吸収効率は、95% を超えることが確認された。次いで、メタノールに吸収されたベンゼンの量が測定された。曝露時間 4 時間の吸入 LC₅₀ 値は、13700 ppm (約 44500 mg/m³) と算出された。何段階の用量が設けられたかについて、また 1 用量あたりの動物数や投与濃度については記述されていない。ベンゼンへの曝露のために死亡した例では、被験動物は通常、曝露中または曝露後最初の 24 時間に死亡している。死亡は、中枢神経系の抑制により引き起こされたと思われる。曝露中に瀕死状態となった動物全てについて、曝露後可能な限り早急に剖検を実施した。生残動物は 2 週間飼育後、屠殺して剖検した。これらの動物全てにおいて、肺と肝臓双方の重量増加が認められた。組織学的に認められた主要な所見は、赤血球の増加像から判断された肺および肝臓の鬱血であった。それ以外に組織学的に重要と思われた所見は、ベンゼンを吸入したことにより死亡した動物の肝臓における、空胞を有する肝細胞数の増加のみであった (Drew and Fouts 1974)。

ベンゼンの飽和蒸気を吸入しても耐容される最長時間を調べるため、雄または雌ラット 6 匹からなる 1 群を対象に、濃縮ベンゼン蒸気 (16000 ppm = 51800 mg/m³、純度に関するデータなし) を用いて試験が実施されている。ガス洗浄瓶に約 50 mL のベンゼンを入れ、その 1 インチ以上の深さの位置にフリットガラスディスク 1 枚を浸漬させ、本ディスクを介して

室温で乾燥空気を 2.5 L/分の流量で通気することにより、ベンゼン蒸気/空気の混合物を生成させた。濃縮蒸気を吸入しても死亡しない最長時間は、5 分間であったと報告されている。これ以上のデータは、記述されていない(Smyth *et al.* 1962)。

同じ試験の中で、LC₅₀ 値は 16000 ppm(51800 mg/m³)未満であることが示されている。雄または雌ラット 6 匹を、濃縮ベンゼン蒸気(16000 ppm = 51.8 mg/L、分析により検証されていない)に、4 時間吸入曝露して検討が行われた。ガス洗浄瓶に約 50 mL のベンゼンを入れ、その 1 インチ以上の深さの位置にフリットガラスディスク 1 枚を浸漬させ、本ディスクを介して室温で乾燥空気を 2.5 L/分の流量で通気することにより、ベンゼン蒸気/空気の混合物を生成させた。ラット 6 匹中 4 匹が、14 日以内に死亡した。これ以上のデータは、記述されていない(Smyth *et al.* 1962)。

マウス 182 匹を対象とした別の試験では、曝露時間 7 時間の吸入 LC₅₀ 値は、31800 mg/m³ (10400 ppm)と導出された。密閉フラスコにガーゼを入れて恒温槽中に置き、ベンゼン(純度 99.5%)を一定の割合でガーゼ上に滴下した。用いた空気は全て、流量計を介してフラスコに通気し、そしてベンゼン蒸気と空気の混合物を、混合管を介して曝露チャンバーに通気した。ベンゼン濃度は、曝露終了時まで蒸発したベンゼンの重量を、用いた空気の種類で除することにより、mg/L 単位で算出した。それらの算出値は、曝露チャンバーにおいて干渉計により測定された蒸気濃度とほぼ一致していた。15900 mg/m³(4980 ppm)を超える濃度では死亡例がみられ、通常、曝露開始から 8 時間以内に認められた。マウスの死亡率は、次のとおりであった。15900 mg/m³(4980 ppm)で 18 匹中の 0%、23900 mg/m³(7490 ppm)で 18 匹中の 11.1%、26600 mg/m³(8330 ppm)で 18 匹中の 16.7%、29600 mg/m³(9280 ppm)で 20 匹中の 35%、32200 mg/m³(10200 ppm)で 15 匹中の 75%、33300 mg/m³(10450 ppm)で 16 匹中の 50%、34900 mg/m³(10950 ppm)で 20 匹中の 45%、36800 mg/m³(11540 ppm)で 18 匹中の 89%、39600 mg/m³(12430 ppm)で 20 匹中の 75%、46500 mg/m³(14600 ppm)で 18 匹中の 100%。昏睡および呼吸困難が、毒性作用の一般的な徴候であった。呼吸不全によるとみられる即死が、ベンゼンへの曝露において特徴的であった。曝露中に瀕死状態となった動物の肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓からパラフィン切片が作製された。剖検では、肺、腎臓、脾臓において変化が認められた(Svirbely *et al.* 1943)。

皮膚：

ウサギおよびモルモットの皮膚 LD₅₀ 値は、8260 mg/kg 体重を超えると報告されている。臨床徴候および剖検所見に関するデータは、示されていない(Roudabush *et al.* 1965)。

ウサギ(雄 2 匹、雌 2 匹)の擦過処置を施した皮膚に、無希釈のベンゼン(試薬グレード)が、米国連邦規則集(CFR)のガイドラインに従って、閉塞条件下で適用された。得られた皮膚

LD₅₀ 値は、9.4 mL/kg (8260 mg/kg) を超えていた。これ以上のデータは、記述されていない。同じ方法により、CFR のガイドラインに従って、雄モルモット 4 匹の無傷の皮膚および擦過処置を施した皮膚に、閉塞条件下で無希釈のベンゼンが適用された。適用された皮膚の状態がいずれの場合でも、得られた皮膚 LD₅₀ 値は、やはり 9.4 mL/kg (8260 mg/kg) を超えていた。これ以上のデータは、記述されていない (Roudabush *et al.* 1965)。

ヒトにおけるデータ :

液体ベンゼンの摂取により、口、喉、食道、胃の粘膜が局所的に刺激を受ける。その後、摂取したベンゼンが血中に吸収されると、全身性の中毒の徴候および症状をもたらす。ベンゼン大さじ 1 杯 (約 15 mL、用量約 176 mg/kg 体重に相当) の摂取により、虚脱、気管支炎、肺炎が引き起こされることが知られている (Gerarde, 1960)。

ベンゼンは、肺を介して速やかに吸収される。液体ベンゼンを直接肺に吸引すると、肺組織との接触部位に、直ちに肺水腫および出血を生じる (Gerarde 1960)。

高濃度のベンゼン蒸気は、眼、鼻、気道の粘膜に刺激性を示す。高濃度のベンゼン蒸気の吸入により、速拍 (呼吸数の) が生じる可能性があり、これに続いて、嗜眠、疲労、眩暈、頭痛、悪心が引き起こされる。脈拍数の増加、息切れを伴う胸部圧迫感が生じ、最終的に意識を消失する場合がある。痙攣および振戦が頻発し、重度の曝露の場合には、数分間か数時間で死亡することがある。ベンゼンに急性曝露された場合の回復度は、曝露の程度により決まる。重度の曝露を受けた場合、息切れ、神経過敏、不安定歩行が 2~3 週間続くことがある。空気中のベンゼンの濃度と生理学的作用との関係については、次のように述べられている。65000~61000 mg/m³ (20020~18788 ppm) で 5~10 分間の曝露は、致死的である。25000 mg/m³ (7700 ppm) で 30 分間の曝露は、生命を脅かす。9600 mg/m³ (2957 ppm) で 30 分間の曝露は、耐容される。4800 mg/m³ (1478 ppm) で 60 分間の曝露は、重篤な症状を引き起こす。1600 mg/m³ (493 ppm) で 60 分間の曝露は、病的症状を引き起こす。480~160 mg/m³ (148~49 ppm) で 5 時間の曝露は、頭痛、倦怠感、疲労を生じる。80 mg/m³ (24.6 ppm) で 6 時間の曝露は、許容され得る最大濃度であると述べられている (Gerarde 1960)。

Avis and Hutton (1993) は、化学物質を積んだ貨物船上で生じた労災事故に起因する、3 名の急性ベンゼン中毒事例を報告している。被災して死亡した 3 名は、煙状のベンゼンに曝露された。その際のベンゼン濃度は不明であるが、曝露時間は数分程度であった。剖検では、顔、体幹および四肢の第 2 度化学熱傷、融合性の肺胞出血を伴う出血性無気肺、および肺水腫が認められた。脳は、肉眼的には正常と思われたが、顕微鏡検査では顕著な血管うっ血像が示された。犠牲者 3 名には、高濃度のベンゼンが血液 (30~120 mg/L)、体脂肪 (68~120 mg/kg 体重超)、脳 (58~63 mg/kg 体重) に、低濃度のベンゼンが肝臓 (15~38 mg/kg 体

重)に検出された。ベンゼンの急性中毒による死亡の機序は、中枢神経抑制性により呼吸停止および死亡に至るといったものか、心筋がアドレナリン感作を受け、致死的な不整脈が発生するようになるためなのかのいずれかと考えられる。いずれの機序も、この事故において機能したと考えられる。化学熱傷と死亡との関係については、言及されていない。

結論：

ヒトにおける事故に関する既存のデータから、ベンゼン 15 mL (176 mg/kg 体重) の摂取により虚脱、気管支炎、肺炎が見られた後死亡が引き起こされることが立証されており、そのため、「有害」物質への分類と、「R65: 飲み込むと肺損傷を引き起こすおそれがある」の表示が必要とされる。65000~61000 mg/m³ のベンゼン蒸気への 5~10 分間曝露は致死的であり、25000 mg/m³ での 30 分間曝露の場合には生命が脅かされるが、1600 mg/m³ での 1 時間曝露の場合には、いくつか病的症状が生じるに留まる (Gerarde 1960)。

ラットの場合、急性経口毒性が示される範囲は、810 mg/kg 体重 (Cornish and Ryan 1963) ~ 10,016 mg/kg 体重 (Smyth *et al.* 1962) である。しかし、多数のラットを用いた試験では、ラットの経口 LD₅₀ 値は 2000 mg/kg 体重を超えることが示唆されている (Whitney and Hall 1975; Kimura *et al.* 1971)。用量にもよるが、主要な臨床徴候は鎮静および昏睡である。病理所見としては、肺、副腎、脊椎の充血性および出血性変化が特に挙げられる。急性吸入毒性は低く、ラットの場合、4 時間曝露での LC₅₀ 値は 44500 mg/m³ (13700 ppm) である。中枢神経系の抑制が、死亡に関係していると思われた。主要な病理所見は、肺および肝臓のうっ血であった (Drew and Fouts 1974)。皮膚 LD₅₀ 値は、ウサギおよびモルモットの場合、8260 mg/kg 体重を超えると Roudabush *et al.* (1965) により報告されている。したがって、動物実験データからは、急性経口毒性、急性皮膚毒性、急性吸入毒性について表示することは支持されない。

4.1.2.3 刺激性 / 4.1.2.4 腐食性

動物データ：

ベンゼンは、ウサギに対し、軽度~中等度の皮膚刺激性を示し、表層壊死を生じさせる。

ベンゼンは、1981 年採択の OECD ガイドライン TG404 に準拠した Draize 試験により、皮膚刺激性物質かつ脱脂剤であることが証明されている。剪毛したウサギ 6 匹の皮膚に、6 cm² の曝露チャンバーを用いて、純粋な無希釈のベンゼンを 4 時間適用した。曝露後 1 時間の時点では、グレード 2 の浮腫およびグレード 1 の紅斑が認められた。曝露終了後 24、

48、72 時間の観察時には、浮腫は認められなかったが、スコア平均値がそれぞれ 2.0、2.2、2.4 の紅斑が認められている。紅斑は、すべての動物で 6 日以内にグレード 3 に増悪した (Jacobs 1991)。

無希釈のベンゼン(純度 99.98%)を 2~4 週間反復適用した試験では、パッチを充てられた皮膚に広範な表層壊死および剥脱が認められた。この試験では、無希釈のベンゼンを、2~4 週間にわたって、シロウサギの耳に定期的に 10~20 回滴下により適用し、また剪毛した腹部にも同程度の回数の適用を行った(包帯で被覆)。動物を 1 日 1 回観察し、週 1 回体重を測定した。容易に検出可能なレベルから判然と認められるレベルの紅斑、浮腫および表層壊死が生じたことが報告されている。これらの影響を受けて、パッチを充てられた皮膚に広範に、「ひび割れ」および剥脱が生じた。他にデータは、報告されていない (Wolf *et al.* 1956)。

アルビノウサギ 5 匹を用いた試験では、それぞれの毛刈りした皮膚に、無希釈のベンゼン 0.01 mL が被覆無しで適用されたが、24 時間以内に生じた最も重度の反応として、グレード 3(10 段階中)の一次皮膚刺激症状が認められたことが報告されている。他にデータは示されていない (Smyth *et al.* 1962)。

また、ウサギの右眼球に、無希釈のベンゼン(純度 99.98%)を 2 滴滴下した試験も実施されている。投与後 3 分、1 時間、1 日、2 日、7 日の時点で、被処置眼における刺激症状および角膜損傷(内側および外側)の程度を、目視により観察した。最初の 3 分より後のすべての観察時点において、蛍光色素である 5%フルオレセイン水溶液を用い、角膜外傷を可視化する染色を施した。眼瞼の炎症および軽度の腫脹が認められ、また、不明瞭なもしくはかろうじて検出可能な角膜の表層壊死が角膜面積の 50%未満に認められた。これ以上のデータは、記述されていない (Wolf *et al.* 1956)。

Carpenter and Smith により開発された方法 (Carpenter and Smyth, 1946) を用いた試験では、ベンゼンの角膜壊死性について、グレード 3(10 段階中)と報告されている。この試験法では、通常 5 匹のウサギを用い、眼瞼を開けさせている間に、無希釈の被験物質 0.005 mL を角膜の中央に適用する。約 1 分後、眼瞼が開いた状態を解除する。18~24 時間後、処置を受けた眼を検査し、角膜壊死専用のスコア化基準に従って損傷をスコア化した。被験物質を投与した各眼の個別のスコア値を合計し、それを眼の数で除すことにより、投与により生じた損傷のスコアが得られる。スコアが 5.0 に達した場合、重度の損傷と判定する。この数値は、染色した場合にのみ視認できる角膜表面の約 3/4 を覆う壊死、またはそれより狭い面積を覆うより重度の壊死に相当する。被験物質 0.005 mL 滴下で得られたスコアの結果および標準損傷グレードの表に基づき、角膜壊死と認識されるグレードの所見の 1 つについて、被験物質がそれを生じせしめるまで、さらに適用を(被験物質の容量を多くしたり、

被験物質の希釈を変えたりして)行う。広範な化学物質についての結果を示したリストにおいて、ベンゼン(純度に関するデータなし)は、この Carpenter and Smyth の方法に従った試験で、グレード 3 の角膜壊死性を有すると記述されている。角膜壊死性グレード 3 は、被験物質が無希釈の場合、0.1 mL により 5.0 ポイント以下の損傷をもたらすこと、または 0.5 mL により 5.0 ポイントを超える損傷をもたらすことと定義されている。治癒に要する時間に関するデータは、記述されていない(Smyth *et al.* 1962)。

ヒトにおけるデータ：

高濃度のベンゼン蒸気は、眼、鼻、気道の粘膜に刺激性を示す。液体ベンゼンを皮膚に直接接触させると、紅斑および水疱を生じる可能性がある。ベンゼンへの曝露が繰り返されたり長期化したりした場合には、皮膚とベンゼンとの接触により、その組織から脂肪が除去され、乾燥した鱗片状の皮膚炎を生じることがある(Gerarde 1960)。

急性皮膚曝露および急性吸入曝露による急性ベンゼン蒸気中毒で死亡した 3 名についての報告には、顔、体幹、四肢における第 2 度化学熱傷、肺出血および肺水腫が記載されている。しかし、犠牲者のこうした熱傷と死亡との関係については言及されていない(Avis and Hutton 1993)。

結論：

ヒトの場合、高濃度のベンゼン蒸気は、眼、鼻、気道の粘膜に刺激性を示す(Gerarde 1960)。急性ベンゼン蒸気中毒により、顔、体幹、四肢に、第 2 度化学熱傷が生じたことが報告されている(Avis and Hutton 1993)。

動物の場合、ベンゼンは皮膚刺激性を有し(Jacobs 1986)、眼に重篤な損傷をもたらすおそれがある(Smyth *et al.* 1962)。Wolf *et al.*(1966)の報告は、眼刺激性を評価した重要な試験であると考えられる。眼瞼の炎症および軽度の腫脹が認められ、また、不明瞭なもしくはかろうじて検出可能な角膜の表層壊死が角膜面積の 50%未満に認められ、それにより 3 未満の角膜混濁が生じたことが示唆された。炎症はスコア化できるほどではなく、浮腫は軽度である。この観察結果は、Smyth *et al.*(1962)により得られた結果(角膜の表層壊死性のグレードが 3/10)に照らして妥当なものと考えられる。

よって、「R36/38:眼や皮膚に刺激性がある」の基準を満たすものと考えられる。

4.1.2.5 感作性

動物データ：

動物試験のデータは、得られていない。

ヒトにおけるデータ：

ベンゼンにより生じる皮膚感作、吸入アレルギーに関しては、報告が得られていない。ヒトの場合、過去 100 年を超えて日常的に溶媒として用いてきたという経験を考慮すると、皮膚感作性や呼吸器アレルギーは、ベンゼンを取り扱うに当たって想定しなければならぬ有害性には該当しないと考えられる。

結論：

職場において、ベンゼンが引き起こした感作例の報告がないことから、皮膚や吸入による感作は想定されない。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1. 反復投与毒性/動物データ

4.1.2.6.1A. 造血への影響

動物を用いたベンゼンへの反復曝露試験の結果について、Summary Table 4.19 に要約した。文献は、適用経路(吸入曝露、経口投与、それ以外の経路)、動物種(マウス、ラット、それ以外の種)、曝露期間(短期、長期)の順に引用されている。

吸入試験については、全身曝露チャンバーを使用したものの情報のみが得られている。Ward *et al.*(1985)の試験のみが、指令 793/93/EEC に従った、亜急性毒性の基本設定レベルの最低要件を満たしている。この試験の手順は、血液学および臨床化学的検査、肉眼的および顕微鏡的な病理検査に関し、OECD ガイドライン 413/EU-method B.29 の手順に相当するものであった。ただし、反復投与毒性試験の標準デザインは、ベンゼンへの曝露に特有な影響を明らかにするには十分ではなかった。それ以外に引用された試験は、より特異的な試験パラメータを含めていることから、リスク評価を進めるのに適切であるとみなされた。

吸入曝露/マウス/短期試験(14日間以内)

各群5匹ずつの雄のDBA/2Jマウスを、0、10、30、または100 ppm(32、96、320 mg/m³)の濃度のベンゼンに、5日間(6時間/日)曝露した(Dempster and Snyder 1990)。ベンゼンへの曝露終了後1日および5日目の時点で、最も初期の2つの赤血球前駆細胞数[前期赤芽球系前駆細胞数(BFU-E)および後期赤芽球系前駆細胞数(CFU-E)]、および最も初期の顆粒球前駆細胞数[顆粒球系単球系前駆細胞数(GM-CFU)]を調べた。ベンゼンへの曝露終了後1日では、骨髄赤血球前駆細胞数は全ての用量群で減少していたが、骨髄顆粒球前駆細胞数は変化がないかまたは増加していた。ベンゼンへの曝露終了後5日では、減少していた骨髄赤血球前駆細胞数が回復していた。対照的に、顆粒球前駆細胞数は、曝露終了後5日の時点で、10 ppm群および100 ppm群において減少していた。顆粒球前駆細胞と赤血球前駆細胞の正常な比率は、骨髄では17:1、脾臓では0.03:1と報告されており、脾臓では赤血球造血が優位であることが示されている。曝露終了後1日目の時点では、脾臓の前駆細胞には、投与に関連する明確な影響はみられなかったが、回復期間の5日目には、脾臓のCFU-E数に用量依存性の増加が認められており、これはおそらく、ベンゼンへの曝露が終わった後、脾臓が赤血球系を再増殖させようとしているためと考えられた。

Rozen *et al.*(1984)の試験では、雄C57B1/6Jマウス(5~7匹/群)が、32、99.2、320ないしは960 mg/m³(10、31、100ないしは300 ppm)の濃度のベンゼン蒸気に6日間(6時間/日)吸入曝露され、全ての濃度でリンパ球数減少が、また320 mg/m³(100 ppm)以上において赤血球(RBC)数減少が認められた。また、320 mg/m³(100 ppm)以上の濃度群において、大腿骨骨髄のBリンパ球(sIgM⁺細胞)数減少、および脾臓のTリンパ球(Thyl.2⁺細胞)数減少が認められた。

雄BALB/cマウス(5~6匹/群)を対象に、50または200 ppm(約162または649 mg/m³)のベンゼン蒸気に、連続7日間または14日間(6時間/日)の曝露が行われている(Aoyama 1986)。死亡や体重抑制は認められなかった。脾臓の相対重量が、全群で減少した。また、胸腺の相対重量が、50 ppmで7日間曝露した群を除く全ての群で減少した。白血球(WBC)数は、200 ppm群ではいずれの曝露期間においても、50 ppm群では14日間曝露の場合に減少が認められた。RBC数は、投与に関連した影響を示さなかった。血中および脾臓のBリンパ球およびTリンパ球の絶対数は、7日間および14日間の曝露により、いずれの濃度群においても、用量依存的な減少を示した。脾臓および血中におけるBリンパ球の割合は、両濃度群とも低下し、その低下は用量依存的であった。Tリンパ球の割合は、7日間曝露では高濃度群において、14日間曝露では高低両方の濃度群において上昇した。液性免疫反応および細胞性免疫反応に関する影響は、セクション4.1.2.6.1 Bに報告した。

Toft *et al.*(1982)は、雄のNMRIマウスをベンゼン蒸気に連続曝露または間欠曝露した場合

の影響について報告している。1 群を 5 匹として、21 ppm(61 mg/m³)、50 ppm(約 162.4 mg/m³)ないしは 95 ppm(約 308.5 mg/m³)のベンゼンに、4~10 日間(24 時間/日)曝露した。その結果、骨髄の細胞充実性の低下、顆粒球・マクロファージ系幹細胞数(CFU-C)の減少、および小核を有する多染性赤血球(MN-PCE)の出現頻度増加が示された。1 および 10 ppm(約 3.247 および 32.47 mg/m³)の場合には、影響は認められていない。14 ppm(45 mg/m³)の濃度で 1~8 週間連続曝露されたマウスでは、MN-PCE 数の有意な増加が認められている。

マウスを 10、21、50、95、または 107 ppm(約 32.47、68.19、162.35、308.5、347.43 mg/m³)の濃度で 2 週間(8 時間/日、5 日/週)間欠曝露した試験では、21 ppm が、CFU-C 含量の抑制および MN-PCE の出現頻度増加をもたらす最小曝露濃度であることが判明した。50 ppm 以上の用量では、骨髄の細胞充実性が低下した。14 ppm での 8 週間までの曝露では、マウスにこうしたパラメータへの影響は認められなかった。著者は、顆粒球・マクロファージ系幹細胞の割合(CFU-C 含量)は、骨髄細胞の総数より感受性が高いと結論付けている。

追加試験において、95 および 201 ppm(約 308.5 および 652.6 mg/m³)での 2 週間(0~8 時間/日、5 日/週)曝露が実施されている。95 ppm の濃度では、6 時間/日の曝露の場合に、骨髄の細胞充実性の低下および CFU-C 含量の減少が影響として認められ、4 時間/日の曝露の場合には MN-PCE 数の増加が示された。201 ppm で 2 時間/日の場合には、骨髄の細胞充実性の抑制および MN-PCE 数の増加がみられたが、CFU-C 含量は有意に変化しなかった。このことから、高濃度短期間曝露においては、骨髄細胞数が最も感受性が高いパラメータであることが示された。4 時間/日の曝露では、201 ppm の濃度により、3 つのパラメータ全てにおいて変化が引き起こされた。

雌雄の C57B1/6 BNL マウス(5~10 匹/群)を被験動物として試験が行われており(Cronkite *et al.* 1985)、0、10、25、100、または 400 ppm(32、80、320、または 1280 mg/m³)の濃度のベンゼン蒸気への 2 週間曝露(6 時間/日、5 日/週)が実施された。100 ppm において、骨髄の細胞充実性の低下が認められた(より高用量についてはデータなし)。100 および 400 ppm において、骨髄多能性幹細胞数の減少と、DNA 合成期にある幹細胞の割合の増加が認められた。末梢血では、100 ppm 以上においてヘマトクリットが低下し、25 ppm 以上においてリンパ球数が減少した。いずれの用量群でも、顆粒球への影響はみられなかった。曝露を受けた動物の脾臓において、ヘモジデリン沈着が認められたと報告されているが、正確なデータは得られていない。

ベンゼンに対する反応には系統による差異が認められ、感受性は、Swiss Webster マウスの方が C57B1/6J マウスより高かった。双方の系統の雄マウスを対象に、300 ppm(960 mg/m³)の濃度で 2 週間(6 時間/日、4 日/週)、曝露が実施された。いずれの系統においても骨髄細胞数の減少や CFU-E(後期赤芽球系前駆細胞)の発生減少を認めたが、Swiss Webster マウス

の方が大幅な減少を示した (Neun *et al.* 1992)。

吸入曝露/マウス/亜慢性試験および慢性試験(15日間以上)

Gill *et al.*(1980)は、C57B1/6 マウスを対象に、ベンゼンへの間欠曝露または連続曝露により生じる影響について検討を行った。各群雄 6 匹ずつを最長 6 週間(6 時間/日、5 日/週)間欠曝露させたところ、曝露濃度 1000、2000、および 4000 ppm(3,247、6,494、および 12,988 mg/m³)において、濃度依存的な白血球減少が生じた。白血球数減少は曝露 3 日目に顕在化し、5 日目または 6 日目までに白血球数は最小となった。間欠曝露を最長で連続 6 週間行った場合でも、死亡例はごくわずかであった。4000 ppm 群のマウスは振戦を示し、曝露が行われている 6 時間の間はほぼ不動であったが、室内の空気に戻すと速やかに回復した。高濃度(4000 ppm)群について、曝露中に安定した状態において白血球百分率を計測したところ、リンパ球数および顆粒球数の減少(それぞれ、対照群が $5.94 \times 10^3/\text{cells}/\mu\text{L}$ であったのに対し $1.34 \times 10^3/\text{cells}/\mu\text{L}$ 、および対照群が $2.37 \times 10^3/\text{cells}/\mu\text{L}$ であったのに対し $0.5 \times 10^3/\text{cells}/\mu\text{L}$)が認められた。大腿骨骨髓の細胞充実性には、4000 ppm 群でも変化はみられなかった。しかし、骨髓の顆粒球前駆細胞を示す移植可能な脾臓細胞のコロニー数(CFU-S)は、1 週間および 4 週間曝露後では約 55%に、6 週間曝露後 30%に低下していた。[注：一般に、CFU-S は、骨髓球系細胞を始めとする不均質な前駆細胞群からなる。また、多分化能造血幹細胞としての位置付けもなされている](Green *et al.* 1981a,b)。

連続曝露の場合には、4000 ppm および 2000 ppm の濃度では、マウスが 24 時間以内に死亡した。死因は、造血系とは無関係であると報告されている(詳細なデータ無し)。1000 ないしは 500 ppm での連続曝露の場合には、曝露後 3 日目または 4 日目に死亡例が生じた。100 ppm での連続曝露の場合には、被験動物は 1 週間を過ぎても耐容した。100、500、および 1000 ppm(約 324.7、1623.5、および 3247 mg/m³)群では、白血球数減少が 24 時間後から既に起き始めていた。骨髓の細胞充実性は、500 および 1000 ppm の濃度でベンゼンに連続曝露した場合、最初の 24 時間には変化しなかったが、48 時間終了時点で対照値の約 30%になった。

Farris *et al.*(1997)が近年に行った試験では、雄 B6C3F1/CrlBR マウス(24 匹/群)を 0、1、5、10、100、ないしは 200 ppm(約 3.25、16.2、32.5、324.7、649.4 mg/m³)の濃度のベンゼンに 1、2、4、または 8 週間(6 時間/日、5 日/週)曝露し、影響の進展を曝露期間との関連の面から検討している。4 週間曝露群のマウスの一部には、4、11、18、ないしは 25 日間の回復期間が設けられた。10 ppm 以下の濃度では、造血パラメータに有意な影響は及ぼされなかった。100 または 200 ppm 群のマウスでは、いずれの時点でも総骨髓細胞数が減少していた。100 ppm 群では、この減少からの回復傾向が投与 4 週目には明確になったが、200 ppm 群では減少がさらに進行した。100 ないしは 200 ppm での 4 週間曝露を終えた後、4 日目に

は、骨髓有核細胞数が対照値の範囲内となった。全 3 系列の高増殖能未分化前駆細胞を表す CFU-HPP(他の試験の CFU-S に相当)は、200 ppm 群のすべての時点、および 100 ppm 群の 2、4、8 週間の時点で減少していた。この数値は、200 ppm 回復期間群では低値を維持したが、100 ppm 回復期間群では 11 日目までに対照値に戻った。未分化前駆細胞の複製率は、細胞周期の S 期にある細胞の割合として測定されるが、100 ないしは 200 ppm のベンゼンにより引き起こされる細胞毒性を代償する様に、曝露期間中増加を示した。200 ppm 群のマウスでは、S 期にある未分化前駆細胞の割合は、回復期間 25 日間を通じ、対照群に比べ高いままであった。100 ppm 回復期間群では、曝露終了後 11 日目まで S 期の細胞が高い割合を維持した。100 および 200 ppm 群で、曝露の 1 週間目には、後期赤芽球系前駆細胞(CFU-E)数の増加が認められたが、高濃度(200 ppm)群では、曝露の第 2 週目および 8 週目には、減少が認められた。免疫染色により前赤芽球、多染性正赤芽球および正染性赤芽球として特徴付けられる分化赤血球生成細胞は、絶対数は 100 および 200 ppm 群で減少したが、相対的な割合は、100 ppm 群では 4 週間、200 ppm 群では 8 週間の曝露で上昇した。100 および 200 ppm 群では、ベンゼンへの曝露の 5 日目に、血中 PCE の割合に大幅な低下が認められた。PCE の絶対数および割合は、高濃度(200 ppm)群では第 4 週、100 ppm 群では第 2 週の期間中、低減していた(第 1 週についてはデータ無し)。血中赤血球数は、100 ppm 群では第 2 週目以降、200 ppm 群ではすべての時点で減少していた。100 および 200 ppm 群では、曝露の第 8 週目に、平均赤血球容積の増加が示された。100 および 200 ppm のベンゼンに 2、4、または 8 週間曝露することにより、顆粒球/マクロファージ系前駆細胞(CFU-GM)数が減少した。免疫標識により識別され、形態学的には骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、桿状核球、分節核好中球に分類される骨髓顆粒球系細胞の絶対数は、100 ppm 群では第 4 週目、ベンゼン 200 ppm 群ではすべての時点で減少していたが、これらの細胞の相対的割合は、200 ppm 群では 2 週間の曝露、100 ppm 群では 2 週間および 8 週間の曝露を終えた時点で上昇していた。200 ppm でベンゼンに曝露された後、回復期間が設けられたマウスでは、顆粒球系細胞数が、曝露終了後 4 日の時点で対照群より高値を示し、その後対照値に戻った。100 および 200 ppm 群のマウスでは、血中白血球数が第 2 週目以降減少した(第 1 週目に関するデータ無し)。血小板数は、200 ppm 曝露マウスでは第 2~8 週目にかけて、100 ppm 曝露マウスでは第 2 週目に、低値を示した。

Green *et al.*(1981a,b)は、様々な曝露濃度および曝露期間により 3 件の試験を実施し、造血幹細胞(CFU-S:多分化能造血幹細胞、CFU-GM:顆粒球/マクロファージ系前駆細胞)、骨髓および脾細胞と吸入されたベンゼンとの相互作用について検討した。試験 1 では、雄 CD-1 マウス(11~19 匹/用量群)を、3.5、32、320、979、1930、4083、7731、または 15558 mg/m³(1.1、10、100、306、603、1276、2416、または 4862 ppm)の濃度で 5 日間(6 時間/日)曝露した。試験 2 は、32 mg/m³(10 ppm)での 50 日間(6 時間/日、5 日/週)曝露による影響と、320 mg/m³(100 ppm)での 5 日間曝露(試験 1)による影響とを比較するデザインとされた。試験

3 では、マウスを 966 mg/m^3 (302 ppm) のベンゼンに 26 週間 (6 時間/日、5 日/週) 曝露した。試験 2 および 3 については群当たりの動物数に関する正確なデータが示されていない。臓器の細胞充実性の検査および重量測定は、1 群当たり 12 匹の雄マウスについて実施された。

試験 1 の結果から、脾臓重量、大腿骨骨髄と脾臓の細胞充実性 (有核細胞、顆粒球、リンパ球および有核赤血球の総数)、大腿骨骨髄と脾臓における CFU-S 総数、ならびに脾臓における CFU-GM の数と割合は、 320 mg/m^3 (100 ppm) 以上の濃度において有意に低減することが示された。大腿骨骨髄では、CFU-GM の絶対数が、100 ppm においてわずかに減少し、それより高濃度では有意に減少したが、CFU-GM の相対的な割合は、100 ppm 以上のほとんどの濃度において、それぞれ様々な程度ではあったが増加を示した。306 ppm での曝露の場合、脾臓および骨髄における CFU-S の割合が低下した。末梢血中の WBC、好中球およびリンパ球の数は、 320 mg/m^3 (100 ppm) 以上の群で減少していた。末梢血中の RBC 数は、最高濃度側 2 群 (7731 および 15558 mg/m^3 群) においてのみ減少していた。

試験 2 からは、 32 mg/m^3 (10 ppm) での 50 日間曝露により、脾臓の重量と細胞充実性および脾臓における CFU-S の数と割合が増高されるが、骨髄の CFU-S 数や割合には変化を生じないことが示された。この試験では CFU-GM についての検討は行われていない。曝露に供されたマウスにおいて、末梢血、骨髄、体重には変化は認められなかった。

試験 3 では、脾臓重量の減少、骨髄および脾臓の細胞充実性の顕著な低下、骨髄および脾臓の CFU-S (総数および割合) の低減、骨髄の CFU-GM (総数および割合) の低減、脾臓の CFU-GM (総数) の減少という結果が示された。末梢血には、WBC 数、RBC 数、リンパ球の割合の低減といった顕著な変化が認められた。一方、好中球数については、増加影響が及ぼされると思われる、形態学的には、核濃縮および過分葉を示すといった異常が認められた。赤血球は、多染性、赤血球大小不同、変形赤血球、斑点、多数のハウエル・ジョリー小体を有するといった形態学的特徴を示した。骨髄像の検査では、顆粒球数、リンパ球数および有核赤血球数の減少が認められた。脾臓では、リンパ球数が顆粒球数より大幅な減少を示す一方、有核赤血球数は対照値と同等であった。有核骨髄細胞および有核脾臓細胞は、核および細胞質性の形態学的異常を示し、核や細胞質における小胞形成や空胞形成、および非定型的な有糸分裂像などが認められた。また、骨髄前駆細胞には、核/細胞質の非同期成熟が認められた。

ベンゼンの吸入がマウス多能性造血幹細胞に及ぼす影響については、Cronkite *et al.* (1982) の試験でも評価されている。雄の Hale Stoner BNL マウスを対象とし、400 ppm のベンゼンに最長 9.5 週間 (65 日間、6 時間/日、5 日/週) の曝露を行い、14 日間の回復期間を設けた。曝露期間中および曝露期間後のさまざまな時点でマウス 2~4 匹を屠殺し、WBC 数および RBC 数を測定し、大腿骨および脛骨を検査して骨髄全体の細胞充実性、幹細胞含有量、

DNA 合成期にある幹細胞の割合を調べた。ベンゼンへの曝露により RBC 数および WBC 数の減少が生じ、それらの減少は試験期間全体にわたって曝露後も少なくとも 14 日は続き、なかでも曝露 11 日目および 4 日目には有意差が認められた。曝露された動物の骨髄の細胞充実性も、曝露 5 日目以降試験期間全体を通じて低減していた。骨髄の細胞充実性は、最長 25 日目まで対照値の 33% に低減し、残りの曝露期間は 50 日目を除いて対照値の約 50% であった。ベンゼンへの曝露終了後、骨髄の細胞充実性は速やかに上昇し、最終曝露後 14 日間で対照値の 88% になった。脾臓多分化能造血幹細胞 (CFU-S) として測定される幹細胞の絶対数は、曝露 5 日目に対照値の 23% に低下し、曝露終了後 14 日目まで 13~43% のままであった。この影響は、赤血球系あるいは顆粒球系として判別される前駆細胞を増やす母細胞集団が大幅に減少したためと説明づけられている。活発に DNA を合成する CFU-S の割合は、曝露の最初の 3 日間で、まず 26~13% に低下することが示されている。その後、残りの曝露期間中には 26~66% の範囲まで上昇したが、最終曝露後には 7% に低下した。対照動物では CFU-S の 5~25% が、DNA 合成期にあった。曝露されたマウス由来の骨髄から得た脾臓細胞の組織学的分類では、未分化細胞は曝露 3 日目に消失し、その後、短期的なリバウンドがあった後、第 2 次の減少が認められた。赤血球系および顆粒球系の分化細胞の減少はより緩徐で、5 日目に最少となり、その後試験期間全体を通じ対照値より低値が維持された。

この試験に追加する形で、赤血球および顆粒球の初期前駆細胞の測定が実施されている (Cronkite *et al.* 1989)。骨髄細胞懸濁液から後期赤芽球系前駆細胞 (CFU-E) の 2 日間培養を試みたところ、1 回目および 4 回目の曝露後の試料では変化がみられなかったが、曝露の 29、48、および 65 日後の試料では、CFU-E 数の有意な減少が認められた。エリスロポエチンおよびポークウィードマイトジェン中で 8 日間培養された、骨髄由来の前期赤芽球系前駆細胞 (BFU-E-8) は、曝露 29 日目に顕著に減少 (対照値の 10% 未満) し、曝露終了後 12 日間でも回復は不十分であった。寒天培地中の顆粒球-マクロファージ凝集体は、対照に比べ減少した。減少は BFU-E-8 より小幅 (20% 未満) であり、曝露終了後 12 日間でほぼ対照値に回復した。

雄雌の C57B1/6 BNL マウスを、300 ppm (974.1 mg/m³) の濃度で、2、4、8、および 16 週間曝露した試験では、骨髄多能性幹細胞が低減したが、2 週間ないしは 4 週間ベンゼンに曝露した場合には 2 週間後、8 週間曝露した場合には 16 週間後に対照値に戻り、16 週間曝露した場合には 25 週間後に対照値の 92% に戻った (Cronkite *et al.* 1985)。血中リンパ球は、より速やかに対照値に戻った。300 ppm に 16 週間曝露されたマウスは、死に至るまでの期間が対照動物より短かった。

雌の BDF1 マウス (9 匹/群) を被験動物とした試験で、100、300、および 900 ppm (約 324.7、974.1、および 2922.3 mg/m³) の濃度で 16 週間 (6 時間/日、5 日/週) の曝露が行われ、骨髄造

血幹細胞群および末梢血細胞数の変化が検討されている(Seidel *et al.* 1989)。すべての幹細胞群において、用量依存的な抑制作用が認められた。後期赤芽球系前駆細胞(CFU-E)のみ、100 ppmでの曝露中に減少を示した。前期赤芽球系前駆細胞(BFU-E)、脾臓多分化能造血幹細胞(CFU-S)、および顆粒球・単球(マクロファージ)系前駆細胞(CFU-GM)は、300 ppmまたは900 ppmの曝露により減少を示しており、CFU-Eはこれらの細胞よりも感受性が高い。末梢血では、300 および 900 ppm でベンゼンに曝露されたマウスにおいて、リンパ球減少が生じている。これらの濃度群では、赤血球数が4週目に減少したが、その後さらに進行はせず、13週目および16週目に回復傾向が示された。ベンゼンへの曝露が停止されると、リンパ球数の再生および幹細胞数の緩徐な正常化が認められた。300 ppmでの16週間曝露の場合、完全回復には、73~185日間かかることが示された。

ベンゼンによる影響を高濃度短期曝露の場合と低濃度長期曝露の場合とで比較するため、Cronkite *et al.* (1989)は、雄雌のCBA/Ca BNLマウス(動物数/群に関するデータ無し)を対象に、ベンゼン蒸気への曝露試験を実施した。1群は、316 ppm(1011 mg/m³)で計19回(6時間/日、5日/週)曝露した。もう1群は、3000 ppm(9600 mg/m³)で連続2日間(6時間/日)曝露した。曝露終了後最長214日目まで、リンパ球数および好中球数は、いずれの曝露群でも減少した。しかし、長期曝露の方が、回復期間のほぼ全般にわたって、リンパ球減少および好中球減少が顕著であった。曝露後214日目の時点では、3000 ppm群の好中球数のみが回復していた。同様に、白血球百分率の計測では、大型の無染色性細胞を除く全ての種類の白血球が減少していることが示された。骨髄の細胞充実性は、両群とも曝露後1日目に低下しているのが確認され、32日目には回復しているのが確認された。骨髄における多分化能造血幹細胞(CFU-S)は、回復期間1日目の時点で両群ともに低減していた。このパラメータの値は、316 ppm群では最長214日目まで低値のままであったが、3000 ppm群では32日目に回復が確認された。

Baarson *et al.* (1984)の試験では、雄のC57B1/6Jマウスが、32 mg/m³(10 ppm)のベンゼンに、最長178日間(6時間/日、5日/週)曝露された(被験動物数の記述なし)。造血(特に赤血球生成)に関する*in vivo*および*in vitro*での評価を、曝露期間の32、66、および178日目に実施した。ベンゼンに曝露されたマウスには、循環血中のRBC数およびリンパ球数に、有意な減少が認められた。しかし、循環血中の好中球数は、曝露による影響を受けなかった(データは提示されていない)。178日目においては、ベンゼンに曝露されたマウスに、脾臓の有核細胞充実性の低下および脾臓の有核RBC数の減少が認められた。骨髄の細胞充実性および骨髄の有核RBC数は、曝露による影響を受けなかった(データは提示されていない)。*In vitro*での評価項目については、ベンゼンに曝露されたマウス由来の前駆細胞は、対照マウス由来の細胞に比べ、コロニー形成能が低いという結果が得られている。また、ベンゼンに曝露されたマウスでは、骨髄および脾臓の後期赤芽球系前駆細胞(CFU-E)のコ

ロニー形成が曝露期間中に徐々に低減し、178 日目ではそれぞれ対照値の 5%および 10%まで低下した。

CD-1 マウスをベンゼンに 2~13 週間曝露した試験では、960 mg/m³(300 ppm)の濃度において、WBC 数の減少が示された(Ward *et al.* 1985)。この試験では、マウス 150 匹を濃度が 3.2、32、96、または 960 mg/m³(1、10、30、または 300 ppm)のベンゼン蒸気に最長 13 週間(6 時間/日、5 日/週)曝露(全身)し、各群の雌雄 20 匹ずつを、投与の 7、14、28、56、および 91 日目に屠殺した(試験デザインは TG412 の要件に整合)。曝露に関連する死亡、平均体重への影響および臨床徴候は、いずれも認められなかった。960 mg/m³(300 ppm)群のマウスでは、曝露の 14 日目以降、ヘマトクリット、ヘモグロビン(Hb)、RBC 数、WBC 数、血小板数、ミエロイド-エリスロイド比(骨髓球系-赤芽球系比)、およびリンパ球の割合について、統計的に有意な低減が示された。また、平均赤血球容積(MCV)および平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)の上昇が見られ、形態学的変化を示す赤血球の割合が、その重症度とともに増大した。赤血球の形態学的変化は、赤血球大小不同、変形赤血球、有棘赤血球増加、血色素減少、有核赤血球、ハウエル・ジョリー小体形成、多染性、棘状赤血球増加、好塩基性斑点形成などであった。マウスの肉眼的な病理所見では、300 ppm 群において、胸腺および脾臓の萎縮の発生率に、わずかな上昇が認められた(前者は 56 日目および 91 日目、後者は 56 日目)。また、この群では、いくつかの屠殺時点において精巣重量の減少が認められ、雌マウスでは肝重量の増加が見られた。剖検した全てのマウスの中で、300 ppm 群においては、投与 7 日目に最初の組織病理学的変化がみられ、経時的に重症化していくのが認められた。これらのマウスには、大腿骨における骨髓形成不全、脾臓の動脈周囲リンパ鞘枯渇、腸間膜リンパ節のリンパ球枯渇、脾臓における髓外造血の増高が認められた。28 日目以降、一部のマウスの下顎リンパ節に形質細胞浸潤が生じていた。さらに、最後の時点で屠殺したマウスの剖検では、肝細胞の小葉中心性肥大が認められた(雄 3 匹)。300 ppm 群をはじめそれ以下の濃度群においても、マウスの精巣および卵巣に退行性病変が生じた。この試験では、末梢血循環に見られた血液学的影響に関する無毒性量(NOEL)は、96 mg/m³(30 ppm)であった。NOEL は、全ての有害作用に関して明確に求められたわけではない。10 および 30 ppm 群の動物の一部においても高濃度群(300 ppm)のマウスと類似の病変が認められており、それらは胸腺萎縮、髓外造血の増加、下顎リンパ節における形質細胞浸潤であった。

Luke *et al.* (1988a) は、ベンゼンがマウスの赤血球生成を害したり抑制したりする能力を評価するため、末梢血における多染性赤血球(PCE)の割合、小核を有する多染性赤血球(MN-PCE)および小核を有する正染性赤血球(MN-NCE)の出現頻度を測定した(それ以外の試験パラメータの記述無し)。各群雄雌 6 匹の DBA/2 マウスに対し、960 mg/m³(300 ppm)のベンゼンへの 13 週間(6 時間/日)曝露を行った。曝露は 2 種類のスケジュール、すなわ

ち、1週間当たり連続5日もしくは連続3日いずれかで行われた。MN-PCE(マウスにおけるPCEの存続時間は24時間である)の出現頻度は、曝露スケジュールや曝露期間とは関係なく増加した。MN-NCE(マウスにおける寿命は約30日である)については、ベンゼンへの曝露により、曝露期間依存性の増加が示された。この増加は、曝露スケジュールが連続3日間の場合の方が緩徐であった。これらの影響に対する感受性は、いずれについても雄の方が雌より高かった。PCEの割合(対照:3%)についてのデータを解析したところ、雌雄とも最初に赤血球生成の割合が大幅に低下(ほぼ0%)し、PCE産生の対照値までの回復については、性別と曝露スケジュールの双方に対する依存することが示された。すなわち、影響の持続性は、雄の方が高く、また、連続3日間の曝露の方が連続5日間の場合より低かった(雄の場合のみ)。ただし、曝露期間の後期の週になると、対照動物や曝露を受けた動物の中で出現頻度に大きな個体差がみられた。

Luke *et al.*(1988b)は、雄のDBA/2、B6C3F1、C57Bl/6マウス(6匹/群)を用いて、Luke *et al.*(1988a)の試験と同様の試験を実施した。MN-PCEの出現頻度は、すべての系統で増加した。出現頻度の程度は、系統特異的(DBA/2 > C57Bl/6 = B6C3F1)であり、曝露スケジュールとは無関係で、B6C3F1マウスを連続3日間のスケジュールで曝露させた場合を除き、曝露期間とも無関係であった。MN-NCEの出現頻度は、いずれの系統のマウスにおいても、曝露期間依存的に増加した(5日間曝露の方が3日間曝露より大)。MN-NCEの蓄積の程度は系統間で異なっていたが、その系統による異なり方は2つの曝露スケジュールにおいて不同であった(5日間連続曝露:C57Bl/6 = B6C3F1 > DBA/2、3日間連続曝露:C57Bl/6 > B6C3F1 = DBA/2)。末梢血中のPCE出現頻度は、すべてのマウス系統で顕著に低下した。その程度および持続期間は、系統(DBA/2マウスでより顕著)と曝露スケジュール(3日間連続曝露の方が5日間連続曝露より顕著)の双方に依存していた。各群におけるPCEの割合の平均値には、試験期間全体を通じばらつきがみられた。ばらつきは、個体差で見てもある週から別の週に進むに連れさらに大きくなっており、試験の最後の数週間に近づくと特に顕著になった。

別の吸入試験(Rozen and Snyder 1985)では、雄のC57Bl/6Jマウス各群10匹に対し、300 ppm(974.1 mg/m³)での吸入曝露を、連続6日間(6時間/日)で6回、または週5日(6時間/日)で30回ないしは115回行った。末梢血では、6、30、および115回曝露の後、総リンパ球数およびRBC数が減少していた。曝露期間が進むに連れ、平均リンパ球数およびRBC数の減少が増悪した。脾臓および胸腺の平均重量も、全てのベンゼン曝露群において、曝露期間終了後、空気に曝露した対照群と比べ、低値であった。その後、ベンゼン曝露群のマウスの脾臓および胸腺の重量は、経時的に増加した。全てのベンゼン曝露群において、脾臓、骨髄および胸腺の有核細胞は、曝露期間終了の時点で減少していた。しかし、ベンゼン曝露群のマウスにおいて、6回曝露と比べると、30回曝露の場合には、胸腺の細胞充

実性に 15 倍の上昇、骨髄の細胞充実性に 3 倍の上昇が認められた。骨髄および脾臓の B リンパ球の総数、胸腺および脾臓の T リンパ球数には、3 つの曝露期間のいずれにおいても、その終了後、顕著な減少が認められた。脾臓の B リンパ球数は、曝露期間中、対照値の 1%未満にまで連続的に減少し、骨髄の B リンパ球数は曝露期間中、空気に曝露したそれぞれの対照の 6%、11%、28%に減少した。同様に、脾臓の T リンパ球は漸減し、胸腺の T リンパ球数は、6 回曝露と比べると 30 回曝露では 15 倍に増加していた。

リンパ球数は、対照値に比べ減少はしたが、曝露期間が進むに連れ相対的な増加を示しており、この増加は、骨髄および胸腺に細胞を再充足させる動きを反映している可能性がある。脾臓では、これ程の増加は認められなかった。もっとも、骨髄および胸腺と異なり、脾臓は、B 細胞や T 細胞を回復させる能力を有していない。この試験の著者は、脾臓の重量増加の根底にある機序(例えば、髄外造血、組織球増殖、またはヘモジデリン沈着)について言及していない。組織病理学的な検討は、実施されなかった。

雄の AKR/J マウスおよび雄の C57Bl/6J マウスを対象に、100 ppm(320 mg/m³) (AKR/J マウス 50 匹)または 300 ppm(974.1 mg/m³) (C57Bl/6J マウス 40 匹)の濃度で 1 日 6 時間、週 5 日の生涯曝露を実施した試験では、曝露 1 週間後を起点に、慢性的なベンゼン曝露による持続的なリンパ球減少、および RBC 数減少が生じた(Snyder *et al.* 1980)。AKR/J マウスにおいては一過性の好中球増加傾向が示されたが、C57Bl/6J マウスにおける好中球増加は 17 週間後に明確となると、本試験終了まで持続した。赤血球大小不同および変形赤血球といった RBC の形態変化は C57Bl/6J マウスに認められ、それぞれ曝露開始の 4 週間後、15 週間後に始まった。過分葉成熟好中球が認められ、好中球左方移動が後骨髄球、骨髄球、前骨髄球、巨大血小板の出現率増加と共に明確になり、同時に好中球増加がみられた。曝露に供した AKR/J マウスでは、20%が骨髄形成不全を生じたが腫瘍の発生率上昇を示さなかった一方、C57Bl/6J マウスでは、33%が顆粒球形成成分に限定された骨髄過形成を生じ、造血器腫瘍の発生率上昇が示された。

Snyder *et al.*(1988)のもう 1 件の長期試験でも、血液毒性が検討されている。雄 C57Bl および CD-1 マウスを対象に、2 種類の曝露プロトコルによりベンゼン蒸気に曝露させた。一方のプロトコルでは、60 匹/系統のマウスが用いられ、300 ppm(974.1 mg/m³)のベンゼンに 1 週間(6 時間/日、5 日/週)曝露した後、非曝露期間 2 週間を設けることを、死亡するまで回復した。もう一方のプロトコルでは、80 匹/系統のマウスが用いられ、1200 ppm(3896.4 mg/m³)のベンゼンに 10 週間(6 時間/日、5 日/週)曝露され、曝露終了後、死亡するまでそのまま飼育された。このプロトコルでは、10 週間の曝露中、末梢血リンパ球減少および軽度の貧血が生じたが、曝露停止後、血球数はそれぞれ対照値まで回復した。300 ppm(974.1 mg/m³)のベンゼンへの曝露では、試験期間全体を通じ、リンパ球減少および貧血が生じた。(両プロトコルそれぞれの正確な腫瘍データについては、セクション 4.1.2.8 で言及する)。

10 週齢の雄の CBA/Ca マウスを用いて試験が行われており、300 ppm(974.1 mg/m³)のベンゼンへの 16 週間(6 時間/日、5 日/週)吸入曝露が実施され、被験動物は、最終曝露後 18 カ月間そのまま飼育された。試験が終了にさしかかった 20 カ月目の時点で、生残したベンゼン曝露マウス 24 匹および擬似曝露雄マウス 24 匹を安楽死させ、骨髄塗抹標本を検査したところ、ベンゼン曝露マウス 24 匹中 14 匹にごく軽微～顕著な顆粒球過形成(骨髄球-赤芽球比が最大で 16 : 1、平均で 3 : 1)、擬似曝露マウス 24 匹中 2 匹の骨髄にごく軽微な顆粒球過形成(骨髄球-赤芽球エリスロイド比が最大で 2.4 : 1、平均で 1 : 1)が認められた。これらの被験動物の血液塗抹標本の形態学的所見および細胞数の数値は、顆粒球過形成を示した動物において分葉核白血球数の増加が見られるなど、骨髄塗抹標本での所見を反映するものであった。ベンゼン曝露マウスにおける好中球の絶対数の平均値は、擬似曝露マウスの値の 2 倍であった。分葉核球 : リンパ球の平均比は、ベンゼン曝露マウスでは 58 : 29、擬似曝露マウスでは 48 : 39 であった。認められた腫瘍については、セクション 4.1.2.8 に記載した(Farris *et al.* 1993)。著者は、顆粒球に関連する反応について、表在性腫瘍の発生に伴って炎症や壊死が生じているのを認めたことから、直接的なベンゼンの影響ではないと結論付けている(したがって、この試験は Table 4.19 に収載していない)。しかし、生残した被験動物が腫瘍を有していたかどうかは明らかではない。このことに関する正確なデータは入手できていない。

吸入曝露/ラット/亜急性試験(14 日間未満)

白血球アルカリホスファターゼ(LAP)活性および白血球数に焦点を当てた短期試験が実施されており、雌の Wistar ラット(5~6 匹/群)が、20、50、100、および 300 ppm(約 64.94、162.4、324.7、974.1 mg/m³)の濃度で 7 日間(8 時間/日)曝露された(Li *et al.* 1986)。100 および 300 ppm の曝露により、LAP の用量依存的な増加がもたらされたが、白血球数および体重は減少した。より高濃度の 1000 ppm および 3000 ppm に 7 日間または 14 日間曝露しても、LAP のさらなる増加は生じなかった。別のラットの群を設けて 300 ppm のベンゼン蒸気に曝露したところ、やはり LAP の変化が確認され、血清アルカリホスファターゼの方は不変であることが確認された。

吸入曝露/ラット/亜慢性～慢性試験(15 日間以上)

Li *et al.*(1986)の知見は、雄雌のラット(6 匹/群、系統に関するデータなし)を、14.6 mg/L のベンゼンに曝露(4 時間/日、6 日/週)した 20 週間試験(Songnian *et al.* 1982)の結果と整合している。この試験でも白血球アルカリホスファターゼ活性が上昇し、WBC 数が減少した(WBC 数に関する正確なデータの報告なし)。

ベンゼン蒸気による影響を検討した近年の試験では、Sprague-Dawley ラットに対し、0、30、

200、または 400 ppm(0, 97, 649, 1299 mg/m³)のベンゼン蒸気への、2 週間(6 時間/日、5 日/週)(雄 8 匹/群)または 4 週間(雄 8 匹/群)の曝露が実施された(Robinson *et al.* 1997)。脾臓の B リンパ球数および脾臓の絶対重量は、400 ppm で 2 週間の曝露により有意に減少した。用量依存的だが有意ではない脾臓重量の減少が、2 週間曝露の低濃度群(30 ppm)および中濃度群(200 ppm)、4 週間曝露の低・中・高濃度の全群で認められた。脾臓の細胞充実性の低下が、曝露 4 週目に低・中・高濃度の全群で認められたが、有意な低下を示したのは高濃度群(400 ppm)のみであった。400 ppm での 4 週間曝露により、胸腺の絶対および相対重量、脾臓の B リンパ球および T リンパ球が有意に減少した。骨髄の細胞充実性には、いずれの時点でも、どの濃度群でも、影響はみられなかった。

Sprague-Dawley ラットをベンゼンに 1~13 週間曝露した試験では、960 mg/m³(300 ppm)の濃度において、WBC 数の減少が示された(Ward *et al.* 1985)。この試験では、各群雌雄 50 匹ずつを、濃度が 3.2、32、96、または 960 mg/m³(1、10、30、または 300 ppm)のベンゼン蒸気に最長 13 週間(6 時間/日、5 日/週)曝露(全身)し、各群の雌雄 10 匹ずつを、投与の 7、14、28、56、および 91 日目に屠殺した。曝露に関連する死亡、平均体重への影響および臨床徴候は、いずれも認められなかった。300 ppm 群の雌ラットでは、いくつかの屠殺時点において、甲状腺の臓器重量減少が示された。300 ppm 群のラットは、WBC 数の減少、リンパ球の割合の低下、および、7 日目のみではあったが、大腿骨骨髄の細胞充実性の低下を示した。この試験は、ラットに関する試験の中で最も信頼性が高かった。この試験は、EU-method B.29 の要件に従って実施されており、無毒性濃度(NOAEC)の導出に適用することができた。この試験では、末梢血循環に見られた血液学的影響に関する NOAEC は、96 mg/m³(30 ppm)であった。また、全ての有害影響に関して見た場合も、ラットにおける NOAEC は、やはり 30 ppm であった。

かなり以前に実施された Deichmann *et al.*(1963)の試験では、記載内容が乏しいが、各群 40 匹の Sprague-Dawley ラットが、6 週間から最大 31 週間、5 時間/日、4 日/週でベンゼン蒸気に曝露(全身曝露)されている。血液学的検査が、毎週もしくは 1 週間おきに、無作為に選択した雄 10 匹および雌 10 匹に対して実施された。46 日間の期間のうち、32 日間平均濃度 831 ppm(約 2698 mg/m³)に曝露されたラットは、曝露 1 週間目以降、雄雌とも WBC 数の減少を示した。別の曝露計画、すなわち総期間 39 日間のうち 26 日間平均 65 ppm(約 211 mg/m³)で曝露を行った場合には、雌では曝露の 2 週目、雄では 4 週目を皮切りに、WBC 数の減少が生じた。さらに、合計 245 日間のうち 180 日間、7 時間/日で 47 ppm(約 152 mg/m³)のベンゼンに曝露されたラットでは、白血球減少も明白になった。白血球減少は、平均濃度 44 ppm(約 143 mg/m³)のベンゼン蒸気への曝露の場合、雄では 7 週目、雌では 5 週目の時点で統計学的に有意であった。供試動物は、45~54 回の曝露期間を経て、8 週目に屠殺された。濃度 31 ppm(約 101 mg/m³)で 126 日間(7 時間/日、4 日/週)、29 ppm(約 94

mg/m³)で88日間(7時間/日、4日/週)、または15 ppm(約49 mg/m³)で154日間(5日/週)の場合には、WBC数の変化は誘発されなかった。15 ppm、31 ppm、47 ppm群のラットの脾臓を鏡検したところ、重症度の高いヘモジデリン沈着が高率で認められた(雌における方が雄より重症かつ高発生率)。著者は、白血球減少の程度は65 ppmに曝露されたラットと831 ppmに曝露されたラットとで同等であったが、高濃度曝露場合の方が、より早期に白血球減少の反応が引き起こされたと概説している。44または47 ppmで曝露されたラットでは、白血球減少の重症度が低めであった。雌ラットの方が、雄より白血球減少に対する感受性が高かった。末梢血に及ぼされる影響に関するNOAELは、31 ppmであった。しかし、すべての有害影響に関する明確なNOAELは、15 ppm(約249 mg/m³)以上の濃度において脾臓のヘモジデリン沈着の発生率/重症度が上昇したことから確立されなかった。

経口曝露/マウス/亜慢性および慢性試験(4週間以上)

成熟CD-1マウス(雄5匹/群)を供試動物として、ベンゼンを8、40、または180 mg/kg体重/日の用量で4週間飲水投与したところ、末梢RBC数、血中白血球数、血中リンパ球数が用量依存的に有意に減少したが、好中球や他の白血球の数は変化しなかった(Hsieh *et al.* 1988b)(免疫系への特別な影響については4.1.2.8.B参照[訳注:4.1.2.6.1.Bと思われる])。全ての用量群において、MCV値が用量依存的に上昇した。ベンゼンに起因して、全ての用量群において、用量依存的な脾臓重量の減少および腎臓重量の増加が生じ、180 mg/kg体重/日群ではそれらの変化は有意であった。胸腺重量は全ての用量群で減少したが、有意な変化ではなかった。回収された脾細胞の総数は、全ての用量群で減少しており、その程度は用量と関連していた。

米国国家毒性プログラム(NTP)において、17週間試験および2年間試験(NTP 1986; Huff *et al.* 1989)により、ベンゼンの蓄積毒性が、B6C3F1マウスを用いて調べられている。17週間試験では、各群雌雄10匹ずつのマウスに、コーン油に溶解したベンゼンが、0、25、50、100、または400 mg/kg体重の用量で強制経口投与された。また、各群15匹ずつのマウスに、0、200、または600 mg/kg体重/日を投与し、60日目に各群のそれぞれ5匹を屠殺した。100 mg/kg体重以上の用量で投与されたマウスでは、試験終了時体重の低下が認められた。400および600 mg/kg体重群では、振戦が間欠的に認められた。50 mg/kg体重以上を投与された雄マウスおよび400 mg/kg体重以上を投与された雌マウスでは、用量依存的な白血球減少およびリンパ球減少が認められた。

発がん性試験として行われた2年間試験では、雄雌のマウスに0、25、50、または100 mg/kg体重の用量で、ベンゼンが103週間(5日/週)強制経口投与された。12、15、18、21ヵ月の時点で各群雌雄10匹ずつから採血した。この他に、同じ動物種について雌雄10匹ずつの群を設け、同じ用量設定で51週間の投与を行い、0、3、6、9、12ヵ月の時点で採

血を実施した。100 mg/kg 体重群では、雌雄いずれのマウスにおいても体重増加の抑制が生じた。いずれの用量群においても、血液学的影響は、リンパ球減少および付随する白血球減少に限られていた(雄：3～18 ヶ月目にかけて、雌：12～18 ヶ月目にかけて)。ベンゼンの投与を受けた全ての群において、雌雄のどちらにも、小核を有する末梢血正染性赤血球の出現頻度増加が認められ、この影響への感受性は、雄の方が雌より高かった。

用量に関わらず、ベンゼンを投与された群のマウスには、骨髄の造血細胞過形成および脾臓造血が認められた。(腫瘍データおよび生存率については、セクション 4.1.2.8 で検討した。)

経口曝露/ラット/慢性試験(60 日間以上)

米国国家毒性プログラム(NTP)の 17 週間試験および 2 年間試験(NTP 1986; Huff et al. 1989)において、ベンゼンの蓄積毒性が、Fischer 344 ラットでも調べられている。17 週間試験では、各群 10 匹ずつに、コーン油に溶解したベンゼンが、0、25、50、100、または 400 mg/kg 体重の容量で強制経口投与された。また、15 匹ずつの群を設け、0、200、または 600 mg/kg 体重/日を投与し、60 日目に各群のそれぞれ 5 匹を屠殺した。200 mg/kg 体重以上で投与されたラットには、雌雄いずれにおいても試験終了時体重の低下が認められた。雄ラットでは 200 mg/kg 体重以上の群に、雌ラット 2 では 5 mg/kg 体重以上の群に、用量依存的な白血球減少およびリンパ球減少が認められた。脾臓については、200 mg/kg 体重以上の群で、雄雌いずれにおいてもリンパ球が存在する部位における B 細胞枯渇が顕在化し、600 mg/kg 体重/日群では、雄雌いずれにおいても髄外造血の増高がみられた。

発がん性試験として行われた 2 年間試験では、雄ラット 50 匹に 0、50、100、または 200 mg/kg 体重の用量で、雌ラット 50 匹に 0、25、50、または 100 mg/kg 体重の用量で、ベンゼンが 103 週間(5 日/週)強制経口投与された。12、15、18、21 ヶ月目の時点で、各群雌雄 10 匹ずつから採血した。この他に、同じ動物種について雌雄 10 匹ずつの群を設け、同じ用量設定で 51 週間の投与を行い、0、3、6、9、12 ヶ月の時点で採血を実施した。100 および 200 mg/kg 体重群の雄ラット、ならびに 100 mg/kg 体重群の雌ラットでは、体重増加の抑制が生じた。雄ラットで認められた血液学的影響は、いずれの用量群においても、3～18 ヶ月目にかけてのリンパ球減少および付随する白血球減少に限られていた。投与を受けた雌ラットでも、同じ期間中に、雄ほど顕著ではなかったものの、類似の影響が認められた。小核を有する末梢血正染性赤血球の出現頻度は、ラットでは検討されなかった。組織病理学的検査では、ベンゼンを投与された全ての群で、リンパ球枯渇の発生率上昇が、脾臓(雄ならびに雌ラット)および胸腺(雄ラット)で認められた。(腫瘍データおよび生存率については、セクション 4.1.2.8 で検討した。)

皮下投与/ウサギ/短期試験(14日間未満)

この試験では、ウサギ 9 匹(雌、体重 2~4 kg)に対し、0.5 mg/kg 体重/日の用量で、さらに別の 8 匹に対し、0.25 mg/kg 体重/日の用量で、連続 10 日間ベンゼンの皮下投与が行われた(Irons and Moore 1980)。前者の群の 4 匹および後者の群の 2 匹には、最長 30 日間の回復期間が設けられた。

投与により、循環血中リンパ球は急激に減少し、減少の割合は最高で 80%に達した。投与期間終了時、循環血中において、B リンパ球を表す免疫グロブリン陽性リンパ球は減少していた。これらの減少からの回復は、回復期間終了時でも不十分であった。高用量(0.5 mg/kg 体重/日)においては、免疫グロブリン陰性リンパ球の割合も、0 日目のベースライン値と比較すると低値となった。循環血中のリンパ球の減少は、B 細胞に対する選択的な毒性作用に起因すると同著者らは結論付けている。T リンパ球と考えられる免疫グロブリン陰性細胞が比較的影響を受けなかったのかどうかについては、未だ明確に結論付けられていない。

腹腔内投与/マウス/短期試験(14日間未満)

雄の C57B1/6J マウス 4 匹を対象に、ベンゼンを 600 mg/kg 体重の用量で 2 日間(1 日 2 回)腹腔内注射する短期投与試験が実施されている(Niculescu and Kalf 1995)。その結果、試験の 3 日目に、大腿骨ごとの有核骨髄細胞の総数が有意に減少しているのが確認された。また、有核赤血球の減少も 3 日目に確認され、モニタリング 7 日目まで一定レベルで推移した。さらに、リンパ球数減少が 3 日目に始まり、7 日目まで漸減していった。これらとは反対に、中等度ないしは最終的な段階まで分化した顆粒球数が、7 日間にわたり漸増した。

経皮曝露

経皮曝露でのベンゼンの血液毒性に関する情報は、得られていない。

4.1.2.6.1. B. 免疫系への影響

白血球産生に変化を及ぼすことによる免疫学的影響以外にも、ベンゼンおよびその代謝物が、免疫機能に影響を及ぼし得ることが実証されている(Table 4.22 参照)。

リンパ球亜集団に及ぼす影響

C57BL/6 マウスを用いた吸入試験(Rosenthal and Snyder 1987)において、100 ppm(325

mg/m³)のベンゼンに20回(6時間/日、5日/週)の曝露が実施されている。この試験のデータからは、脾臓白血球の相対的割合、脾臓 T 細胞サブセットの割合、脾臓ヘルパー/サプレッサー細胞の比は、影響を受けなかったことが示されている。

マイトジェン(分裂刺激剤)に対するリンパ球増殖反応

Rozen *et al.*(1984)は、雄 C57Bl/6J マウスを対象に、10、31、100、または 300 ppm のベンゼン蒸気による6日間(6時間/日)曝露試験を実施し、100 ppm(320 mg/m³)以上の濃度で、RBC数、Tリンパ球数、Bリンパ球数が減少することを示している(セクション4.1.2.6.1.A参照)。循環血中のリンパ球数、およびリポ多糖(LPS)誘発性の大腿骨Bリンパ球コロニー形成能は、すべての濃度群で低下した。31 ppm(99 mg/m³)では、脾臓におけるフィトヘマグルチニン(PHA)誘発性のTリンパ球幼若化反応も低減した。

雄 C57Bl/6J マウスを、300 ppm(960 mg/m³)の濃度のベンゼン蒸気に6、30、または115日間吸入曝露した試験では、Tリンパ球およびBリンパ球の数および増殖能が低減した(Rozen and Snyder 1985)。骨髄および脾臓のBリンパ球について、Bリンパ球コロニー形成測定法によりマイトジェン誘発性の増殖を調べたところ、曝露期間全体にわたり漸減していくのが確認され、115日間曝露の後では、マイトジェン誘発性の反応が認められないレベルにまで達した。PHA刺激指数測定法により脾臓T細胞のマイトジェン誘発性の増殖も調べられ、増殖反応は曝露期間全体を通じ顕著に抑制されたが、この反応が曝露期間中に徐々に低減することを示す証拠は得られなかった。

雄のCD-1マウスにベンゼンを4週間飲水投与した試験で、脾臓のリンパ球増殖反応が、マイトジェン刺激下あるいは非刺激下で検討された。その結果、8 mg/kg 体重の用量の場合は上昇し、40および180 mg/kg 体重/日の用量では低減した(Hsieh *et al.* 1988b)。Tリンパ球およびBリンパ球の増殖におけるこうした2相性の変化は、LPS、ポークウィードマイトジェン(PWM)、コンカナバリンA(ConA)、PHAを用いた場合に認められた。

In vitro 試験において、ConA刺激脾臓Tリンパ球培養液上清を試料として、マウスヘルパーT細胞株HT-2の増殖を亢進させる能力を調べることにより、インターロイキン2(IL-2)含量が測定されている。脾臓のIL-2産生は、40および180 mg/kg 体重の用量でベンゼンを投与された群において抑制された(Hsieh *et al.* 1991)。

細胞性免疫反応

同種異系細胞に対する混合リンパ球反応および細胞傷害性 T リンパ球反応

雄 C57Bl/6J マウスを対象とした試験で、100 ppm (320 mg/m³) のベンゼンへの連続 10 日間 (6 時間/日、5 日/週) 吸入曝露が実施され、その後腫瘍細胞の接種が開始された (Rosenthal and Snyder 1987)。脾臓の細胞傷害性 T リンパ球の腫瘍溶解能が低下することが示された。10 ppm (960 mg/m³) ないしは 100 ppm (約 325 mg/m³) で 20 日間曝露されたマウスから得た脾臓 T リンパ球では、同種抗原に対する混合リンパ球反応 (MLR) の遅延が示された。こうした MLR の遅延は、ベンゼン誘発性サプレッサー細胞の存在に起因するものではなかった。著者は、ベンゼンにより、同種異型細胞に反応すべき T 細胞の機能が障害される可能性を示唆している。

さらに別の試験では、4 週間経口曝露された雄 CD-1 マウスの脾臓リンパ球について、同種異系細胞に対するリンパ球培養物による混合リンパ球反応、および YAC-1 腫瘍細胞に対する細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 活性を調べることにより、細胞性免疫が測定された。両免疫反応とも、ベンゼンの用量が 40 または 180 mg/kg 体重/日の群では阻害されたが、用量が 8 mg/kg 体重/日の群では増高した (Hsieh *et al.* 1988b)。

サプレッサー細胞

雄の BALB/c マウスを対象とした試験において、50 または 200 ppm (約 162 または 649 mg/m³) のベンゼン蒸気に連続 14 日間 (6 時間/日) 曝露した後、細胞性免疫反応が、塩化ピクリル (PCI) に対する接触過敏性 (CS) を調べることにより測定された。マウスには、7 日目または 9 日目に PCI で免疫処置を施し、14 日目に PCI により惹起処置を行った (Aoyama 1986)。200 ppm 群では、6、24、48 時間後において耳の厚さの増加が充進したことから、CS 反応の発現が示された。CS の誘発および発現に関しては、これらの曝露濃度で T リンパ球の活性が低下することはないと結論付けられた。

サプレッサー細胞の活性は、脾臓において検討された。すなわち、CS に関する免疫が脾臓で受動伝達されるのを抑制する能力が調べられた。14 日間の曝露期間中に 7 日目に PCI により免疫処置され、14 日目に屠殺されたマウスから脾細胞を採取し、免疫処置した非曝露動物由来のエフェクター細胞を投与された放射線照射レシピエントマウスに注射した。反応は、レシピエントマウスに対する PCI による惹起処置後 24 時間での耳腫脹の増大として測定した。

耳の厚さは 200 ppm 群において陽性対照と同程度の割合で増加したことから、200 ppm で

曝露されたマウスのサプレッサー細胞活性は、有意に低いとみなされた。

液性免疫反応

抗体産生

ヒツジ赤血球 (SRBC) に対する液性免疫反応は、ベンゼンに吸入または経口曝露された動物で低下することが示されている。Aoyama (1986) の試験では、雄の BALB/c マウスを 50 または 200 ppm (約 162 または 649 mg/m³) のベンゼン蒸気に連続 14 日間曝露し、プラーク形成細胞測定法により脾臓ごとの IgG および IgM プラーク形成細胞 (PFC) 数を調べたところ、これらの数値が減少することが示された。

Hsieh *et al.* (1988b) は、ベンゼンに曝露した後の、SRBC に対する一次抗体反応を評価した。脾細胞 10⁶ 個あたりの PFC の比活性または脾臓全体を基準として示した場合、40 ないしは 180 mg/kg 体重/日の用量でベンゼンの投与を受けた雄の CD-1 マウスでは、PFC 数が減少した。ただし、低用量 (40 mg/kg 体重/日) の場合の方が、脾細胞 10⁶ 個あたりの PFC は多かった。SRBC 抗体の力価は、PFC 数と整合していた。

雄の Sprague-Dawley ラットを被験動物として、血清抗 SRBC IgM を用いた酵素結合免疫測定法 (ELISA) で測定を行った試験では、液性免疫反応への有意な影響は検出されなかった (Robinson *et al.* 1997)。この試験では、30、200、または 400 ppm のベンゼン蒸気で 2 週間または 4 週間 (6 時間/日、5 日/週) の曝露が行われ、曝露終了の 4 日前に SRBC が注射された。

宿主抵抗性モデルにおける免疫反応

C57BL/6 マウスを用いた試験では、わずか 30 ppm (96 mg/m³) の低濃度でも、ベンゼンへの連続曝露により、細菌感染させた際に起こる T 細胞およびマクロファージの免疫反応が遅延した (Rosenthal and Snyder 1985)。

この試験では、雄の C57BL/6J マウス (5~7 匹/群) を 10、30、100、または 300 ppm のベンゼンに 5 日間前曝露し、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) に感染させ、続けて 7 日間曝露させる群か、曝露を継続しない群に割り付けた。その結果、300 ppm で前曝露だけを施したマウス、ならびに 30、100、ないしは 300 ppm (約 97、325、974 mg/m³) で感染後も曝露が続けられたマウスでは、4 日目に細菌数の増加が示された。ただし 1 日目、7 日目には増加は認められなかった。脾臓当たりの有核細胞数、リンパ球数、T リンパ球数、B リンパ球数および単球系/マクロファージ系細胞数は、空気に曝露された対照群では、感染処置

後 1~7 日目には増加を示した。30 ppm 以上の濃度のベンゼンに曝露された群では、いずれの曝露スケジュールの場合でも、細菌感染後処置後 1~7 日目にかけて、単球系/マクロファージ系細胞を除く上記のそれぞれの種類の細胞において、有意な減少が認められた。

雄の C57Bl/6J マウスを 100 ppm(320 mg/m³)のベンゼンに計 100 日間(6 時間/日、5 日/週、20 週間)曝露し、マウス 1 匹当たり 10.00 個のポリオーマウイルス誘発性腫瘍細胞で惹起を行った試験では、T リンパ球を介した腫瘍抵抗性が、10 匹中 9 匹で低下した。これらのマウスには、致死的な腫瘍が発生した。致死的な腫瘍の発生率は、空気に曝露された対照群では、10 または 30 ppm の濃度のベンゼンに曝露された群における値の 3/10 以下であった (Rosenthal and Snyder 1987)。

毒素に対する免疫反応

雌 BNL マウス(15 匹/群)を対象に、200 ppm(649 mg/m³)の濃度で 10 回もしくは 20 回曝露(6 時間/日、5 日/週)、または 400 ppm(1299 mg/m³)の濃度で 5、12、もしくは 22 回曝露を行った試験では、破傷風毒素に対する T 細胞依存性一次抗体反応を調べたところ、免疫処置後 21 日目に抑制が確認された(Stoner *et al.* 1981)。50 ppm(160 mg/m³)に 5、10、または 20 回曝露した場合、および 200 ppm に 5 回曝露した場合には、影響は認められなかった。

非特異的な免疫反応

BALB/c マウス(被験動物数および性別に関するデータなし)に、ベンゼンを 800 mg/kg 体重/日の用量で、またはフェノールとヒドロキノンの混合物を 50 mg/kg 体重の用量で 3 日間皮下注射した試験では、骨髄由来マクロファージおよび顆粒球の活性化が、刺激後の過酸化水素の産生増加というかたちで認められた(Laskin *et al.* 1989)。大腿骨および脛骨の骨髄から回収される細胞の数は、ベンゼンが投与された各群においては、対照値の 30~40%にまで減少した。

ラットにおける免疫反応

Robinson *et al.*(1997)の吸入試験では、雄の Sprague-Dawley ラットが、0、30、200、または 400 ppm(約 97、649、1299 mg/m³)のベンゼンに 2 週間ないしは 4 週間(6 時間/日、5 日/週)曝露され、ベンゼンの免疫毒性について評価が行われた。2 週間試験では、脾臓の B リンパ球数減少が、最高濃度である 400 ppm 群において誘発された。一方、4 週間試験では、B リンパ球数および T リンパ球数が影響を受けた。抗原 SRBC を用いて測定した液性免疫反応は、30、200、ないしは 400 ppm のベンゼンを吸入させた場合には、影響を受けなかった。全体的には、これらのデータにより、200 ppm 以下の濃度でラットをベンゼンに曝露

しても、免疫機能は影響を受けないことが示唆される。

4.1.2.6.1 C その他の影響

ベンゼンは、神経を変調させる作用を有することも報告されている。

雄 CD-1 マウス(5 匹/群)に、ベンゼンを 8、40、または 180 mg/kg 体重/日の用量で 4 週間飲水投与したところ、視床下部-下垂体-副腎皮質系が顕著に刺激され、活性化された(Hsieh *et al.* 1991)。投与を受けた動物には、死亡も、毒性を意味する様な顕著な臨床症状も生じなかった。投与終了時、脳組織のホモジネートを調べると、視床下部のノルエピネフリンおよびその代謝物であるバニリルマンデル酸の濃度が上昇しており、同時に末梢血中への副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)/コルチコステロンの放出量が増加していた。投与期間の 2、7、14 日目および試験終了時に血液試料が採取されており、血清コルチコステロン濃度は、いずれの用量群においても 7 日目の試料で上昇が認められ、14 日目の試料では対照濃度に低下しているのが確認されたが、試験終了時の試料では高用量群(180 mg/kg 体重/日)にのみ再上昇が認められた。

これより前に行われた Hsieh *et al.* (1988a) の試験では、CD-1 マウス、ベンゼンを 31、166、および 790 mg/L の濃度で含有する飲料水を 4 週間連続的に与えたところ、視床下部、延髄、および小脳のノルエピネフリン(NE)濃度に上昇が認められた。また、視床下部および線条体のドパミン(DA)濃度にも、有意な上昇が認められた。いくつかのカテコールアミン代謝物、およびインドールアミンであるセロトニン(5-HT)の増加が、脳の様々な領域において認められた。著者は、ベンゼンが、神経伝達物質である NE、DA、5-HT の合成および異化の速度を上昇に導いたと結論付けている。免疫系への直接的な毒性作用に加え、脳カテコールアミンを増加させることにより、視床下部-下垂体-副腎系を介した免疫系に、間接的な作用を及ぼすことが考えられる。カテコールアミンの代謝上昇は、副腎皮質ステロイド濃度の上昇をもたらすと考えられる。

3 ヶ月齢の Sprague-Dawley ラットの雄 10 匹を用いた試験が実施されている。ベンゼン(純度 99%)が 0.5 mL/kg 体重/日の用量で、連続 3 日間腹腔内投与された(De Gandarias *et al.* 1992)。神経活性ペプチドのいくつかに対しそれらの活性を制御する働きを持つとされているアミノペプチダーゼの活性を、脳の様々な領域について、リジン-およびロイシン-2-ナフチルアミドの加水分解速度により測定した。ベンゼン投与により、どちらの酵素活性も視床、視床下部、海馬、扁桃体において低下したことから、中枢の神経ペプチド伝達が活性化される可能性が示された。

Li *et al.* (1992) は、低濃度のベンゼンに曝露された場合における、神経行動学的機能および

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性の変化について、検討を行っている。成熟 Kunming マウスの雄を、0、0.78、3.13、ないしは 12.52 ppm (約 0、2.5、10 ないしは 41 mg/m³) の濃度のベンゼンに、1 日 2 時間で 30 日間) 曝露した。神経行動学的機能は、握力、瞬時反応性(学習/記憶機能)、自発運動性を調べることにより測定した。神経行動学的機能は、高濃度群(12.52 ppm)において低下したが、中濃度群(3.13 ppm)では一貫した影響は示されず、低濃度群(0.78 ppm)では対照群に比べ活発化していた。血中および脳内の AChE 活性は、ベンゼン曝露用量の増加に伴って低下し、特に中濃度群および高濃度群で低下が顕著であった。AChE 活性値の変化は、高濃度群の脳内についてののみ、有意であった。

高濃度群では、体重、摂餌量、飲水量への影響は受けず、肝臓の相対重量が増加し、脾臓の相対重量は減少した。顕微鏡検査では、骨髄におけるほとんどの WBC 前駆細胞および RBC 前駆細胞の割合が、吸入したベンゼンの濃度の上昇に伴って低下したが、他の前駆細胞については、中濃度群および低濃度群において高値を示すものもあった。

Summary Table 4.19 Animal toxicity data after repeated exposure to benzene (Sections 4.1.2.6.1 A,B,C)

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
Inhalation	mouse/DBA/2J (males)	10, 30, 100 ppm 6 hr/d, 5 days	no	-	10 ppm	≥10 ppm: depression of marrow erythroid progenitor cells (BFU-E, CFU-E) on day 1 after exposure and recovery on day 5 after exposure, splenic erythroid progenitor cells (CFU-E) increased on day 5 of recovery	Dempster and Snyder, 1990
	mouse/C57B1/6J (males)	10, 31, 100, 300 ppm 6 hr/d, 6 d	no	-	10 ppm	≥10 ppm: depressed Ly counts, reduced mitogen response of femoral B-Ly to LPS ≥31 ppm: reduced mitogen response of splenic t-Ly to PHA ≥100 ppm: lower RBC counts, reduced numbers of B-Ly (femur) and T-Ly (spleen)	Rozen et al., 1984

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
	mouse/ BALB/c (males)	50, 200 ppm, 6 hr/d, 7 or 14 days	no	-	50 ppm	≥50 ppm: lower relative weights of spleen and thymus, reduced WBC, reduced No. of T- and B-Ly in blood and spleen, depressed antibody response in the Plaque-forming assay, reduced suppressor cell activity in a contact sensitivity test	Aoyama, 1986
Inhalation	mouse/ NMRI (males)	continuous: 24 hr/d: 1, 10, 21, 50, 95 ppm, 4-10 days 14 ppm, 1-8 weeks	no	10 ppm	21 ppm	≥21 ppm: depressed bone marrow cellularity and granulopoietic stem cells (CFU-C), increased MN-PCE	Toft et al., 1982
	mouse/ NMRI (males)	Intermittent: 8 hr/d: 1, 10.5, 21, 50, 95, 107 ppm, 5 d/w, 2 weeks 14 ppm, 1-8 weeks		-	14 ppm	14 ppm: increased marrow MN-PCE	
				10.5 ppm	21 ppm	≥21 ppm: depressed granulopoietic stem cells, increased marrow MN-PCE ≥50 ppm: depressed bone marrow cellularity	
				14 ppm	-	-	
						95 ppm/≥4 hr/d: increased MN-PCE	

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
Inhalation		0, 2, 4, 6, 8 hr/d: 95, 201 ppm, 5 d/w 2 weeks		-	95 ppm	95 ppm/≥6 hr/d: reduced bone marrow cellularity, granulopoietic stem cells (CFU-C) 201 ppm/≥2 hr/d: suppressed bone marrow cellularity, increased MN-PCE, 201 ppm/≥4 hr/d: reduced granulopoietic stem cells (CFU-C)	
	mouse/ B57B1/ 6 BNL	10, 25, 100, 400 ppm 6 hr/d, 5d/w 2 weeks	no	10 ppm	25 ppm	25 ppm: depressed Ly counts all groups ≥100 ppm: depressed Ly counts and hematocrit, bone marrow: lower No. of nucleated cells and stem cells and higher fraction of stem cells in DNA synthesis	Cronkite et al., 1985

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
	mouse/ Swiss Webster & C57B1/ 6J (males)	300 ppm, 6 hr/d, 4 d/week, 2 weeks	no	-	300 ppm	reduced bone marrow cellularity and development of CFU-E in both strains (Swiss>C57B1/6J)	Neun et al., 1992
Inhalation	mouse C57B1 /6 (males)	Intermittent: 1000, 2000, 4000 ppm, 6 hr/d, 5 d/w, up to 6 weeks continuous 24 h/d: 100, 500, 1000, 2000, 4000 ppm up to 8 days	no	-	100 ppm	≥2000 ppm: lower WBC counts from day 3 on 4000 ppm: tremor during exposure, reduced no. of Ly and PMN, reduced no. progenitor cells (CFU-S) in femur marrow ≥2000 ppm: death within 24 hr 500+1000 ppm: death within 3 or 4 d, lower WBC counts beginning after 24 hr 100 ppm: reduced WBC counts after 24 hr and thereafter, reduced bone marrow cellularity after 48 hr	Gill et al., 1980

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
Inhalation	mouse B6C3F1 /CrIBR (males) mouse B6C3F1 /CrIBR (males)	1, 10, 100, 200 ppm, 6 hr/d, 5 d/w, 1,2,4*,8 weeks, * with 4, 11, 18, or 25 days of recovery	no	10 ppm	100 ppm	≥100 ppm: bone marrow: reduced No. of bone marrow cells (reversible), decreased No. of stem cells (non-reversible at 200 ppm) increased No. of replicating stem cells in S-phase (non-reversible at 200 ppm), initially increased and thereafter decreased No. of erythrocytic progenitor cells (CFU-E), decreased No., but increased percentages of differentiating erythrocytic cells (rubriblasts-metarubricytes), reduced No. of granulocyte-macrophage colony-forming units (CFU-GM), reduced No. and increased percentages of differentiating granulocytic cells (myeloblasts-segmented neutrophils); blood: decreased No. and percentages of PCE and RBC, increased MCV, reduced WBC counts and platelets	Farris et al., 1997
	mouse CD-1 (males)	1.1, 10, 100, 306, 603, 1276, 2416, 4862 ppm 6 hr/d, 5 days	no	10 ppm	100 ppm	≥100 ppm: increased spleen weight, depressed WBC, Ly, PMN in peripheral blood, in spleen/femur bone marrow: reduction in cellularity (total cell number, Ly, PMN, nucleated red cells), No. of hematopoietic stem cells (CFU-S), No. of granulocytic/macrophage progenitor cells (CFU-GM)	Green et al., 1981a,b

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
Inhalation		9.6 ppm 6hr/d, 5 d/w, 50 days 302 ppm 6 hr/d, 5 d/w 26 weeks			9.6 ppm 302 ppm	increased fraction of CFU-GM in femur ≥306 ppm: in spleen & marrow: reduced concentration of CFU-S ≥2416 ppm: reduced RBC 9.6 ppm: increase of spleen weight, splenic cellularity, No. & concentration of CFU-S 302 ppm: lower spleen weight, depressed WBC, RBC, Ly %, increased PMN and altered red cell and PMN morphology in peripheral blood, depressed marrow and spleen cellularity with reduced Ly, PMN and (in femur only) nucleated red cells, lower No. & concentration of CFU-S in spleen/marrow and of CFU-GM in marrow, lower No. of spleen CFU-GM	
	mouse/ Hale Stoner BNL (males)	400 ppm 6 hr/d, 5 d/w up to 65 d & 14 d recovery	no	-	400 ppm	depressed peripheral RBC and WBC counts, cell No. and stem cell content (CFU-S) in bone marrow, initially decreased and thereafter increased percentage of marrow stem cells (CFU-S) with active DNA production	Cronkite et al., 1982

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
	mouse/ B57B1/ 6 BNL	300 ppm 6 hr/, 5 d/w 2,4,8,16 weeks	no	-	300 ppm	Reduced No. of pluripotent stem cells in bone marrow at all time periods, incomplete recovery of reduced stem cell No. after 16 weeks of exposure at week 25 of recovery	Cronkite et al., 1985
Inhalation	mouse BDF1 mice (female)	100, 300, 900 ppm, 6hr/d 5 d/w, up to 16 weeks	no	-	100 ppm	≥100 ppm: depressed colony-forming units (CFU-E) in bone marrow ≥300 ppm: depressed erythroid burst-forming cells (BFU-E), spleen CFU (CFU-S), or CFU-GM in marrow; blood: lymphocytopenia, anemia; recovery between 73 and 185 days	Seidel et al. al., 1989
	mouse CBA/Ca BNL	316 ppm 6 hr/d, 5d/w 19 days or 3000 ppm 6 hr/d, 2 days	no	-	316 ppm	both dose groups: nonreversible reduction of blood WBC, Ly, neutrophils up to 214 d after exposure (except neutrophils in 3000 ppm group), bone marrow cellularity (reversible at day 32 postexposure) and stem cell content (recovered at day 32 at 3000 ppm, no recovery in 316 ppm)	Cronkite et al., 1989

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
	mouse/ C57B1/ 6J (males)	10 ppm (32mg/m ³) 6hr/d, 5d/w up to 178 d	no	-	10 ppm	Depressed RBC, lymphocytes and splenic nucleated red cells, lowered splenic and marrow colony forming units-erythroid (CFU-E)	Baarson et al., 1984
Inhalation	mouse CD-1	1, 10, 30, 300 ppm 6hr/d, 5d/w up to 13 w	B.29	30 ppm for hematology	300 ppm for hematology	300 ppm: Blood: decreased RBC, WBC, Hb, Htk, Ly %, platelets, increased MCV, MCH, altered red cell morphology femoral myeloid hypoplasia, thymic atrophy, Ly depletion of splenic PALS and mes. lymph nodes, splenic extramedullary hematopoiesis 10/30 ppm: some animals with thymic atrophy and extramedullary hematopoiesis	Ward et al., 1985
	mouse/ DBA/2	300 ppm 6 hr/d, 13 w 3 d/w or 5 d/w	no	-	300 ppm	blood: increased frequency of MN-PCE and MN-NCE, initially depressed polychromatic erythrocytes (PCE)	Luke et al., 1988a

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
	mouse/ C57B1/ 6J (males)	300 ppm 6 hr/d, 5 d/w 6, 30, 115 d	no	-	300 ppm	all exposure periods: lower circulating Ly and RBC counts, decreased spleen and thymus weight, depressed nucleated cells in bone marrow, thymus, spleen, depressed thymus and spleen T-Ly, depressed spleen and marrow B-Ly; depressed mitogen-induced proliferation in B-Ly of spleen and bone marrow and in T-Ly in spleen	Rozen & Snyder 1985
Inhalation	mouse/ AKR/J (males) C57B1/ 6J (males)	100 ppm lifetime 300 ppm lifetime	no	-	100 ppm	AKR/J mouse/100 ppm: lymphopenia, lower RBC, tendency to neutrophilia. Bone marrow hypoplasia. C57B1/6J mouse/300 ppm: reduced weight gain, lymphopenia, lower RBC, neutrophilia/left shift, altered RBC morphology, myeloid hyperplasia. Granulopoietic or myeloid bone marrow hyperplasia, spleen hyperplasia due to extramedullary hematopoiesis	Snyder et al., 1980

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
	mouse/ C57Bl and CD-1 (males)	Intermittent: 300 ppm 6 hr/d, 5d/w, interrupted by 2 weeks unexposed, until death 1200 ppm 6 hr/d, 5 d/w 10 weeks, untreated until death	no	-	300 ppm	300 ppm/intermittent exposure: persistent lymphocytopenia, anemia 1200 ppm/continuously on 10 w: lymphocytopenia and anemia, reversible after exposure cessation	Snyder et al., 1988
Inhalation	C57Bl/ 6J mouse/ (males)	10, 30, 100,300 ppm, 6 hr/d, preexposure 5 days prior to infection, 10, 30, 100,300 ppm, 6 hr/d, 5 d prior and 7	no	10 ppm	30ppm	≥30 ppm: spleen: reduced increase of nucleated cells, lymphocytes, T-Ly, B-Ly on day 1 through day 7 postinfection 300 ppm: spleen: increased bacterial counts on day 4 postinfection ≥30 ppm: spleen; increased bacterial counts on day 4 postinfection, reduced increase of nucleated cells, lymphocytes, T-Ly, B-Ly on day 1 through day 7	Rosenthal and Snyder, 1985

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
		days during infection				postinfection	
	mouse/ BNL (female)	50, 200 ppm 6 hr/d, 5 d/w 5, 10, 20 exposures 400 ppm 6 hr/d, 5 d/w 5, 12, or 22 exposures	no	50 ppm	200 ppm	≥200 ppm: suppressed primary antibody response to tetanus toxin	Stoner et al., 1981
	mouse Kun- ming (males)	0.78, 3.13, 12.52 ppm 2hr/d, 30 d	no	3.13 ppm	12.52 ppm	12.52 ppm: significant depression of neurobehavioral functions in test on limb grip strength, rapid response, locomotor activity , relative weights of liver: increased, of spleen: decreased, AChE activity in blood (nonsig) and brain (sig) lowered, reduced No. of bone marrow precursor cells of all lineages 3.13 ppm: some minor nonsignificant effects on all test parameters	Li et al., 1992

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
Inhalation	rat/Wistar (female)	20, 50, 100 and 300 ppm 8hr/d, 7 d 1000 and 3000 ppm, 8 hr/d, 7 or 14 d	no	50 ppm	100ppm	≥100ppm: increased activity of leukocytic alkaline phosphatase, depressed WBC counts, lower body weight gain	Li et al., 1986
	rat	14.6 mg/l, 4 hr/d, 6 d/w, 20 weeks	no	-	14.6 mg/l	increased leukocyte alkaline activity, reduced WBC counts	Songnian et al., 1982
	rat/Sprague-Dawley (male)	30, 200, 400 ppm, 6 hr/d, 5 d/w, 2 or 4 weeks	no	200 ppm	400 ppm	400 ppm/2 weeks: reduction of abs. spleen weight and no. of splenic B-lymphocytes 400 ppm/4 weeks: reduction of spleen cellularity, of abs./re. thymus weight, and of spleen B- and T-lymphocytes	Robinson et al., 1997
	rat/Sprague-Dawley	1, 10, 30, 300 ppm 6hr/d, 5d/w up to 13 w	B.29	30 ppm	300 ppm	Decreased WBC and Ly %, decreased femoral cellularity	Ward et al., 1985

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
Inhalation	rat/ Sprague-Dawley	5 hr/d, 4 d/w: 46 d/831 ppm 39 d/65 ppm 154 d/15 ppm 7 hr/d, 4 d/w: 245 d/47 ppm 54 d/44 ppm 126 d/31 ppm 88 d/29 ppm	no	-	15 ppm	All treatment groups ≥ 44 ppm: decreased WBC counts Histopathology performed in rats from the 15, 31 and 47 ppm groups revealed increased incidence and severity of hemosiderosis of the spleen	Deichmann et al., 1963
oral oral drink-	mouse/ CD-1 (males)	8, 40, 180 mg/kg bw/d 4 weeks	no	-	8 mg/kg bw/d	≥ 8 mg/kg: reduced counts of RBC, leukocytes, lymphocytes, increased level of MCV lower weight of spleen and thymus, elevated kidney weight, reduced splenic cellularity elevated concentrations of hypothalamic norepinephrine and vanillylmadelic acid, increased levels of ACTH and corticosterone in the blood 8 mg/kg: spleen: elevated mitogen proliferation responses of T-Ly and B-Ly to LPS, PWM, ConA, PHA; increased mixed lymphocyte reaction and cytotoxic T-Ly reaction to allogenic cells; increased	Hsieh et al., 1988a, b, 1991

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
ing water						primary antibody response to SRBC ≥40 mg/kg: reduction of all immune responses cited above, depressed IL-2 production of stimulated T-Ly	
oral gavage	mouse/ B6C3F1	25, 50, 100, 200, 600 mg/kg bw/d 60 days or 17 weeks	no	25 mg/kg bw/d	50 mg/kg bw/d	≥50 mg/kg: leucopenia and lymphocytopenia in males ≥100 mg/kg: lower body weight gain, ≥400 mg/kg: intermittently tremor leucopenia and lymphocytopenia in females	NTP, 1986, Huff et al., 1989
	mouse/ B6C3F1	25, 50, 100 mg/kg bw/d, 51 and 103 weeks	453	-	25 mg/kg bw/d	≥25 mg/kg: lymphocytopenia, leucocytopenia, increased frequency of micronucleated normochromatic erythrocytes, hematopoietic hyperplasia in bone marrow, splenic hematopoiesis ≥100 mg/kg: reduced body weight gain	NTP, 1986, Huff et al., 1989

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
oral	rat/ Fischer-344	25, 50, 100, 200, 400, 600 mg/kg bw/d 60 days or 17 weeks	no	100 mg/kg in males, none in females	25 mg/kg in females 200 mg/kg in males	≥25 mg/kg: leucopenia and lymphocytopenia in females ≥200 mg/kg: reduced body weight gain in both sexes, leucopenia and lymphocytopenia in males, lymphoid depletion in the spleen, ≥600 mg/kg: extramedullary hematopoiesis	NTP, 1986, Huff et al., 1989
oral	rat/ Fischer-344	25, 50, 100 mg/kg bw/d in females, 50, 100, 200 in males, 51 and 103 weeks	453	-	25mg/kg bw/d in females 50mg/kg bw/d in males	≥25 mg/kg/females & ≥50 mg/kg:/males: leukocytopenia, lymphocytopenia lymphoid depletion in the spleen and the thymus (males only) ≥100 mg/kg/males & females: reduced body weight gain	NTP, 1986, Huff et al., 1989
subcutaneous inject.	mouse Balb/c (sex?)	800 mg/kg bw/d 3 d	no	-	800 mg/kg bw/d	decreased bone marrow cellularity, activated bone marrow derived macrophages and granulocytes showing increased production of hydrogen peroxide after stimulation	Laskin et al., 1989

Route	Species *	Study design	Study design acc. to B. 7, 8, 29, 32, 33,	NOAEL	LOAEL	Results	Reference
	rabbit (sex?)	0.25, 0.5 mg/kg bw/d, 10 d	no	-	0.5 mg/kg bw/d	≥0.25 mg/kg: lymphocytopenia	Irons and Moore, 1980
ip injection	mice C57B1/6J (males)	600 mg/kg bw/d, 2x/d, 2 d	no	-	600 mg/kg bw/d	monitoring on day 3 to day 7 of recovery: lowered bone marrow nucleated cells, depression of nucleated erythroid and lymphocyte marrow cells, stimulation of differentiation to intermediate and differentiated granulocytes	Niculescu and Kalf, 1995
ip injection	rat SD (males)	0.5 ml/kg bw/d	no	-	0.5 mg/kg bw/d	reduced enzyme activity of aminopeptidase involved in the regulation of neuroactive peptides, in several brain regions	Gandarias et al., 1992

略語：

* 雄または雌の一方を検討した場合には性別を記し、雄雌各性を検討した場合には性別を記していない。

AChE	アセチルコリンエステラーゼ
ACTH	副腎皮質刺激ホルモン
B-Ly	B リンパ球
ConA	コンカナバリン A
DNA	デオキシリボ核酸
IL-1	インターロイキン 2 [訳注:IL-2 と思われる]
LPS	リポ多糖
MCV	平均赤血球容積
MN-NCE	小核を有する正染性赤血球
MN-PCE	小核を有する多染性赤血球
PALS	細動脈周囲リンパ球鞘
PCE	多染性赤血球/網状赤血球
PHA	フィトヘマグルチニン
PMN	好中性顆粒球
PWM	ポークウィードマイトジェン
RBC	赤血球
T-Ly	T リンパ球
WBC	白血球

4.1.2.6.1 D まとめ

動物においては、ベンゼンへの反復曝露に関連して認められた最も重要な有害影響は、造血系への影響であった。こうした有害影響には、造血系の一次損傷に続発する免疫毒性が含まれる。それ以外の標的器官(腎臓や神経系など)に及ぼす影響は、毒性学的意義が低いものであったが、本報告では、データの完全性を期すために検討の対象に含めた。

致死性および臨床徴候

高用量のベンゼンへの反復曝露または長期曝露により、死亡または重篤な健康障害を生じるおそれがある。マウスの場合、2000 ppm(6400 mg/m³)以上の濃度のベンゼン蒸気を吸入させ続けると、24時間で死亡した。500 ppm(1600 mg/m³)の濃度のベンゼンに曝露し続けた場合(24時間/日)には、曝露4日目に死亡例が認められた(Gill *et al.* 1980)。

マウスを300 ppm(960 mg/m³)のベンゼン蒸気に生涯曝露した場合には、体重増加の抑制が認められた(Snyder *et al.* 1980)。また、亜慢性および慢性毒性試験において、マウスおよびラットを対象に、100 mg/kg 体重/日を経口投与した場合も、体重増加の抑制が示された(NTP 1986)。マウスに400 mg/kg 体重/日以上の高用量を強制経口投与すると、間欠的な振戦が顕著に現れた(NTP 1986)。曝露期間中の振戦は、4000 ppm(12800 mg/m³)といった高濃度のベンゼン蒸気への曝露(6時間/日、5日/週)においても認められた(Gill *et al.* 1980)。

造血への影響(4.1.2.6.1 A 参照)

マウス

曝露経路に関わりなく、ベンゼンが影響を及ぼす主要な標的器官は造血系である。反復吸入曝露では、10 ppm(約32 mg/m³)から影響が現れ、慢性経口投与試験での最小毒性量は、25 mg/kg 体重/日であった(Table 4.23 N(L)OAEL/C 参照)。

反復曝露試験では、ベンゼンにより、用量依存的なリンパ球減少、貧血、末梢血におけるあらゆる種類の細胞の減少を特徴とする汎血球減少、および骨髓前駆細胞の顕著な減少が生じた。骨髓では、細胞充実性の低下や増高が示されたが、各種細胞の正常数は導出されおらず、またそれらの細胞が正常に生成されているのかも提示できていない。前駆細胞の減少が細胞分化のさまざまな段階(多分化能造血幹細胞期、早期前駆細胞期、ある細胞期と次の細胞期の間段階)で生じていることが明確にされた。貧血は、最も広範なデータベースを有する種であるマウスの場合、形態学的には大球性かつ低色素性と分類される(Ward *et al.* 1985; Hsieh *et al.* 1988b)。

血小板減少は、Ward *et al.* (1985)によるマウスを用いた試験においてのみ報告されている。それ以外の試験では血小板に及ぼされる影響は報告されていないが、これは本パラメータを検討しなかったためであると考えられる。

様々な *in vivo* 試験において、ベンゼンへの長期曝露により、造血前駆細胞数を減少することが報告されている。これらの試験では、細胞数の定量は、細胞コロニーの形成を観察する、機能的手法を用いて行われた (Cronkite *et al.* 1982; Toft *et al.* 1982; Neun *et al.* 1992; Farris *et al.* 1997; Green *et al.* 1981a,b; Seidel *et al.* 1989; Baarson *et al.* 1984)。骨髓前駆細胞は、ベンゼンによる影響を見る上で、骨髓の細胞充実性より感受性の高いパラメータであると思われた。Toft *et al.* (1982) および Gill *et al.* (1980) の試験では、可移植性コロニー形成単位 (CFU) 数を調べることにより、ベンゼンに曝露された際の影響を早期に確認することができたが、骨髓の細胞充実性では、影響が認められなかったか、明確な影響は高濃度 [例えば、ベンゼン 200 ppm (約 649 mg/m³)] の場合にしか認められなかった。

多染性赤血球 (網状赤血球) は、一過性または持続性に減少したが、これに対し、未熟な段階の赤血球 (MN-PCE および MN-NCE) は増加しており、これは、ベンゼンが成熟途中の赤血球生成細胞に対して細胞毒性を示すことを反映しているものと考えられた。

髓外造血が増高したことから、赤血球の産生需要が高まることが確認された。変性した赤血球が捕捉されていることを示す形態学的所見、すなわち、脾臓その他の器官におけるヘモジデリン沈着や細胞内における易染色性の鉄沈着の増加などは、ベンゼンの影響を検討したほとんどの動物試験で、全く報告されていない。Cronkite *et al.* (1985) は、曝露された動物の脾臓にヘモジデリン沈着が見られたことを報告しているが、用量-反応に関して正確なデータを示していない。Deichman *et al.* (1963) の長期ラット試験では、脾臓への過度のヘモジデリン沈着が認められている。貧血は、主に成熟赤血球の末梢における喪失や破壊により生じるのではなく、骨髓での産生低下に起因している。

ベンゼンが造血系に及ぼす主要な毒性作用について、マウスでの反復曝露試験から得られた結果を、Summary Table 4.19 に要約した (マウスに及ぼす種々の影響の概略は Table 4.20 参照)。表に要約したパラメータの一部には、反対の反応が示されているようなものもあり、例えば、脾臓の重量および細胞充実性については、増大という結果と低減という結果が並立している。こうした多様性は、ベンゼンの細胞毒性が、同時に器官の反応を誘発するということにより説明できる。曝露期間中、幹細胞成分が示した反応も不均一であったが、これも全身的な反応により生じている可能性がある。ベンゼンへの曝露開始時または短期曝露時には、毒性作用が優位になっていると考えられるが、その後、同時に細胞は、損傷を受けた骨髓を再増殖させようとする方向性を強めた反応を示した。ベンゼンに曝露されている期間中の損傷の進行および回復は用量依存的であったが、それ以外の因子 (種、系

統)によって影響を受けていることも考えられ得る。

ラット

ラットに関する血液学的データは、ごくわずかしき得られていない(Summary Table 4.19 参照、また、ラットに及ぼす影響全般について別途書かれた概略に関しては Table 4.21 参照)。ベンゼンに曝露されたラットでも、白血球減少およびリンパ球減少が認められた。骨髄形成不全が生じたことも記録されている。しかし、ラットにおいては、影響を受けた細胞の系列は検討されていない(Ward *et al.* 1985)。Robinson *et al.*(1997)は、ベンゼンに曝露されたラットにおいて、骨髄の細胞充実性には変化を認めなかったが、脾臓重量および胸腺重量の減少、脾臓の細胞充実性の低下、T リンパ球数および B リンパ球数の減少が生じたことを示している。

ラットでは、吸入曝露や経口投与により、赤血球細胞系列に何らかの影響が及ぼされることが示された。WBC 数の減少も認められ、これは、白血球アルカリホスファターゼ活性(ラットおよびヒトの慢性ベンゼン中毒における有用な尺度に提唱されていた)の活性上昇と相関していた(Songnian *et al.* 1982)。

免疫系への影響(4.1.2.6.1 B 参照)

セクション 4.1.2.6.1 A に報告された白血球減少やリンパ球の細胞充実性に及ぼす他の影響(Summary Table 4.19)に加え、免疫反応を検討した複数の試験から、ベンゼンは、10 ppm(6 時間/日、6 日間)以上での吸入または 40 mg/kg 体重/日(4 週間)以上での経口投与により、マウスの細胞性免疫および体液性免疫を抑制することが明らかにされた(Rozen *et al.* 1984; Hsieh *et al.* 1988b)。Hsieh *et al.*(1988b)によるマウスを用いた試験では、8 mg/kg 体重/日を 4 週間投与という低用量でも、しばしば免疫刺激反応がみられた。高用量のベンゼンを短期間投与した場合(800 mg/kg 体重/日、3 日間)では、骨髄由来単球細胞の非特異的免疫反応が活性化された(Laskin *et al.* 1989)。免疫への影響については、*in vitro* での免疫応答を調べる宿主抵抗性試験で得られた結果に基づいて検証された。

現時点では、機能的免疫細胞のサブタイプのそれぞれに対する特異的な影響について、確固とした結論を導出するには、試験データが不足している。主要な影響については、Table 4.22 に要約した。

ラットを用いた試験のデータが乏しいため、ラットの体液性免疫反応に関して重要と思われる影響は明確にならなかった(Robinson *et al.* 1997)。

神経学的影響(4.1.2.6.1 C 参照)

マウスでは、8 mg/kg 体重/日(4 週間)以上での経口投与により、脳カテコールアミン濃度の上昇、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)およびコルチコステロンの血中への放出増高が誘発された(Hsieh *et al.* 1991)。免疫系に、視床下部-下垂体-副腎系を介し、間接的に作用するものと考えられた。経口投与試験の報告には、行動機能障害や形態異常に関するデータは含まれていない。したがって、これらのデータは、経口経路での NOAEL や LOAEL(最小毒性量)の導出根拠とはみなされない。マウスにベンゼン蒸気を 30 日間吸入させたところ、13 ppm(約 42 mg/m³)の濃度で神経行動学的機能の変化がもたらされ、またアセチルコリンエステラーゼ活性が低下した(Li *et al.* 1992)。

その他の影響(4.1.2.6.1 A, B 参照)

ベンゼンへの曝露により腎臓に影響が及ぶ可能性も排除できない。マウスを用いた 4 週間試験では、腎臓重量の変化を認めたが、それに呼応した形態学的変化や機能の変化は認められなかった(Hsieh *et al.* 1988b)。おそらくベンゼンへの曝露に起因ですると考えられる他の影響は、マウスにおいては、下顎リンパ節における形質細胞浸潤、肝臓の小葉中心性肥大および重量増加、精巣の重量減少および変性、卵巣での変性病変形成であった(Ward *et al.* 1985)。

Table 4.20 Benzene effects on hemopoiesis in mice:

Weight/morphology	Cellularity
<i>Bone marrow (BM)</i>	
myeloid hypoplasia, myeloid hyperplasia, granulopoietic/myeloid hyperplasia, hematopoietic hyperplasia, BM cells with nuclear/cytoplasmic dyscrasias	Cellularity/nucleated cells: No. ↓ stem cells: No. ↓ stem cells in S-phase: % ↑, or initially ↓ and thereafter ↑ hematopoietic stem cells (CFU-S, CFU-HPP): No./% ↓ hematopoietic stem cells (CFU-S) in S-phase: % ↑ granulopoietic stem cells (CFU-C): No. ↓ erythroid progenitor cells (BFU-E/CFU-E): No. ↓, or initially ↑ and thereafter ↓ granulocytic/macrophage progenitor cells (CFU-GM): No./% ↓ or % ↑ Micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE): No ↑ Nucleated red cells: No ↓ Differentiating erythrocytic cells: No. ↓, % ↑ Intermediate and differentiated granulocytes: No. ↑ or No. ↓ and % ↑ Lymphocytic cells ↓ B-lymphocytes ↓ PMN ↓

<i>Peripheral blood</i>	
altered PMN and RBC morphology	WBC: No. ↓ Lymphocytes: No./% ↓ T-lymphocytes: No. ↓ B-lymphocytes: No. ↓ Micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) ↑ Micronucleated normochromatic erythrocytes (MN-NCE) ↑ Polychromatic erythrocytes(PCE)/reticulocytes: No. ↓ initially or Persistent, % ↓ RBC: No. ↓ MCV: ↑, MCH: ↑: Hematokrit ↓, hemoglobin ↓ PMN: No. ↓ or No. ↑, % ↓ PMN: left shift Platelets: No. ↓
<i>Spleen</i>	
weight ↓ or ↑ lymphocytic depletion of the PALS region, extramedullary hemopoiesis ↑ cells with nuclear or cytoplasmic dyscrasis	Cellularity ↓ or ↑ Nucleated cells: No./% ↑ or No. ↓ Erythroid progenitor cells (CFU-E): No. ↓ or No. ↑ Hematopoietic stem cells (CFU-S): % ↓ or No./% ↑ Granulocytic/macrophage progenitor cells (GM-CFU-C): No./% ↓ Nucleated red cells: No. ↓ Lymphocytes: No. ↓ T-lymphocytes: No. ↓ B-lymphocytes, No. ↓ PMN: No. ↓
<i>Thymus</i>	
weight ↓, atrophy	Nucleated cells: No. ↓ T-lymphocytes: No. ↓
<i>Mesenteric lymph nodes</i>	
lymphocytic depletion	

(Details are given in Summary Table 4.19)

Table 4.21 Benzene effects on hemopoiesis in rats:

Weight/morphology	Cellularity	Subcellular effects
<i>Bone marrow</i>		
cellularity ↓		
<i>Peripheral blood</i>		
	WBC: no. ↓ Lymphocytes: no./% ↓	leukocytic alkaline phosphatase: activity ↑
<i>Spleen</i>		
weight ↓ extramedullary hemopoiesis ↑ hemosiderosis lymphoid depletion	Cellularity ↓ T- and B-lymphocytes ↓	
<i>Thymus</i>		
weight ↓ lymphoid depletion		

(Details are given in Summary Table 4.19)

Table 4.22 Immune response to benzene treatment in mice

Treatment schedule and effective doses	Target cell Compartment	Response	Reference
inhalation, ≥31 ppm, 6d, 6hr/d	T-lymphocyte	response to mitogens ↓	Rozen et al. 1984 Rozen&Snyder1985
oral, ≥40 mg/kg bw/d, 4 weeks	T-lymphocyte	response to mitogens ↓,	Hsieh et al. 1988b
oral, ≥40 mg/kg bw/d, 4 weeks	T-helper cell	IL-2 production ↓	Hsieh et al. 1988b
inhalation, 100 ppm 5 d/w, 6 hr/d, 10 d	cytotoxic T-cell	cytotoxic activity ↓	Rosenthal & Snyder 1987
oral, ≥40 mg/kg bw/d, 4 weeks	cytotoxic T-cell	cytotoxic activity ↓	Hsieh et al. 1988b
inhalation, 100 ppm 5	Alloreactive T-cell	mixed-lymphocyte	Rosenthal & Snyder

EURAR: BENZENE

d/w,6 hr/d, 10 d		response ↓	1987
inhalation, 200 ppm, 6 hr/d, 14 d	Suppressive T-cell	suppressive activity ↓	Aoyama 1986
inhalation, 100 ppm, 5 d/w,6 hr/d, 20 weeks	T-cells	tumor resistance ↓	Rosenthal & Snyder 1987
inhalation, 5d/w, 6hr/d, 200 ppm, ≥10d or 400 ppm, ≥5d	T-cell dependent B Cells	antibody production to tetanus toxin ↓	Stoner et al. 1981
inhalation, ≥30 ppm, 5 d preinfection and 7 d postinfection	T-cells and Macrophages	resistance to Listeria monocytogenes ↓	Rosenthal & Snyder 1987
inhalation, ≥10 ppm,6d,6hr/d	B-lymphocyte	response to mitogens ↓	Rozen et al. 1984 Rozen&Snyder1985
oral, ≥40 mg/kg bw/d, 4 weeks	B-lymphocyte	response to mitogens ↓	Hsieh et al. 1988b
inhalation, ≥50 ppm, 6 hr/d, 14 d	B-lymphocyte	antibody production ↓	Aoyama 1986
oral, ≥40 mg/kg bw/d, 4 weeks	B-lymphocyte	antibody production ↓	Hsieh et al. 1988b
sc. injection, 800 mg/kg bw/d, 3 d	Macrophages and Granulocytes	activation	Laskin et al. 1989

NOAEL (無毒性量), NOAEC (無毒性濃度)/LOAEL (最小毒性量), LOAEC (最小毒性濃度)

多数の動物試験から、ベンゼンが造血系に及ぼす主要な影響に関して、以下の Table 4.23 に示したとおり、NOAEL/C、または、NOAEL/C を確立できない場合は LOAEL/C が導出された。

Table 4.23 N(L)OAEL/C for the inhalation and oral routes

Exposure route	Exposure duration	Species	NOAEL/C	LOAEL/C	Reference
inhalation	6 to 178 days	mouse	-	10 ppm (32 mg/m ³)	Dempster and Snyder, 1990, Rozen et al. 1984, Baarson et al., 1984, Green et al., 1981a,b, and other studies (see Table 4.20)
inhalation	13 weeks	rats	30 ppm (97mg/m ³)	300 ppm (947 mg/m ³)	Ward et al., 1985
oral	103 weeks	mouse	-	25 mg/kg bw/d	NTP, 1986
oral	103 weeks	rat	-	25 mg/kg bw/d in females, 50 mg/kg bw/d in males	NTP, 1986

定量的にリスク評価を進めるに当たり、ベンゼンへの反復曝露により最も鋭敏な有害影響を示した動物種における最小の N(L)OAEL/C が推算された。その結果、亜慢性および慢性吸入曝露の LOAEC として 10 ppm が、慢性経口摂取の LOAEL として 25 mg/kg 体重/日が導出された。

4.1.2.6.2. 反復投与毒性/ヒトにおけるデータ**高用量ないしは中用量での曝露**

高濃度[通常、数ヵ月間～数年間の時間加重平均(TWA)として 320 mg/m³(100 ppm)超の場合をさす]のベンゼンによる影響としては、汎血球減少、再生不良性貧血など、重度の血液学的影響が、いくつかの報告に挙げられている (Aksoy *et al.* 1971, 1972; Paci *et al.* 1988;

Vigliani and Forni, 1976; Greenburg *et al.* 1939)。これらの報告は、横断調査や症例集積調査に基づいており、用量-反応に関する検討を伴っていない。また、報告のいくつかは、空気中のベンゼン測定用の信頼性が高い産業衛生ツールが利用できるようになる前に公表されたものである。よって、より重症型の骨髄抑制(すなわち汎血球減少、再生不良性貧血)の発症に結びつくベンゼンの正確な濃度については、不明確な部分がある。それでも、これらの報告について、以下に簡潔に検討を行った。これらから得られる情報は、どの血液学的パラメータがベンゼンの影響を受けるのかを示すのには有益であるが、LOAEL や NOAEL の判定には役立たないと考えられた。最終的に NOAEL は、造血系にそれほど重度の影響を認めなかった、比較的低用量の曝露についての調査から導出された。

Greenberg *et al.*(1939)は、RBC への影響が、WBC の減少より早期に、より重症度が低い例でも生じると思われたことから、ベンゼンの血液毒性については、RBC 数および平均赤血球容積(MCV)、より鋭敏な指標であると考えられるとしている。彼らの調査では、ベンゼンへの曝露が停止された後、1 年間以内にほとんどの血液学的異常が消失したことが示されている。この調査は、印刷工場 3 ヲ所(A、B、C)に勤務する作業員を対象に実施された。ベンゼン濃度の中央値は、工場 A で 585 mg/m³(183 ppm)、工場 B で 435 mg/m³(136 ppm)、工場 C で 205 mg/m³(64 ppm)であった。血液細胞(RBC、血小板、WBC)の減少、ヘモグロビン(Hb)濃度の低下、リンパ球数の低減、および MCV の増加などが認められた。ベンゼン中毒とみなされ、曝露濃度が 160~3,392 mg/m³(50~1,060 ppm)と記録されていた工場 A の従業員 35 名について、曝露中止後 8~10 週間に追跡調査が実施された。血液学的影響を検査したところ、従業員 13 名で消失、3 名で改善、15 名で変化無し、4 名で悪化という結果が得られた。工場 B では、77~2160 mg/m³(24~675 ppm)で曝露された作業員 47 名が調べられたが、46 名は曝露中止後 1 年間で改善したが、1 名はあまり状態の改善を示さなかった。

RBC の減少がベンゼンによる血液毒性の中で最も鋭敏な影響ではない可能性があることを示唆する報告もある(Aksoy *et al.* 1971; Savilhati 1956)。Aksoy *et al.*(1971)は、96~672 mg/m³(30~210 ppm)の濃度で最長 17 年間曝露されていたと報告されている、1 群の作業員 217 名を対象に調査を行った。血液学的異常は作業員 51 名(23.5%)に認められ、汎血球減少は 6 例で、再生不良性貧血の例はみられなかった。血液学的影響の程度は、曝露期間との相関を示さなかった。慢性ベンゼン中毒では、最も頻発する所見として血小板(数)減少が認められ、ベンゼンは、RBC より WBC に対して、より高頻度で影響を及ぼしていると思われた。Aksoy *et al.*(1971)は、この調査において、WBC 数、RBC 数、血小板数のどれも、ベンゼンへの曝露を示す最も鋭敏な指標であるかを判定できていない。

Aksoy *et al.*(1972)は、不特定の高濃度ベンゼンに 4 ヲ月間~15 年間曝露されていたトルコ人の靴職人でみられた再生不良性貧血 32 例について報告している。Jandl(1977)は、ベン

ゼン曝露の症例報告に係る過去の米国の文献をレビューし、血球減少または汎血球減少 880 例および再生不良性貧血 101 例を見出した。職場における曝露ガイドラインや曝露発生時に行われていた業務についての全体的な印象に基づくと、ほとんどの事例で、曝露濃度は 320 mg/m^3 (100 ppm) を超えていたと推察される。

他には、短期曝露と血液学的変化との関連に係る調査が行われているが、リスクの総合評価における意義が乏しいことから検討していない。Midzenski *et al.* (1992) は、ベンゼンに 5 日間～最長 3 週間曝露されることにより、WBC 減少や血液塗抹標本における大型顆粒リンパ球像所見などの血液学的変化がもたらされたことを示しているが、こうした変化は、曝露期間や曝露頻度のいずれとも相関していなかったと述べている。

Table 4.24

HUMAN DATA ON HAEMATOLOGIC EFFECTS FROM LOW EXPOSURES TO BENZENE

Author	Sample size	Exposure characteristics	Critical parameter(s)	Comments	LOAEC	NOAEC
Kipen et al., 1988 and 1989	264	35-137 ppm (mean=75 ppm); 15-20 ppm (1940-48)				
			WBC, RBC (Crump)	Statistically significant or near-significant correlations between exposure and blood parameters (annual means)	75 ppm (35-137 ppm)	15-20 ppm
			WBC, RBC (Rinsky)	-	-	6-19 ppm
Fishbeck et al., 1978	10	37-132 ppm TWA, then <25 ppm		Small sample, subjects served as own controls over time	-	
			RBC, Hb		35 ppm	<10 ppm
			WBC		-	35 ppm

Table 4.24 (contin.)

HUMAN DATA ON HAEMATOLOGIC EFFECTS FROM LOW EXPOSURES TO BENZENE

Author	Sample size	Exposure characteristics	Critical parameter(s)	Comments	LOAEC	NOAEC
Tsai et al., 1983	303	<5 ppm		96% of total samples were below 5 ppm		
			WBC, lymphocytes, RBC, platelets, Hb, Hct		-	<5 ppm
Hancock and Moffitt, 1984	70 exposed 21 controls	Average of 10.5 ppm		Controls matched for gender - averaging exposures may limit ability to detect transient effects of higher exposure		
			RBC, WBC, Hb		-	10 ppm
Yardley-Jones et al., 1988	66 exposed 33 controls	<1-10 ppm (TWA)		Controls matched for gender; occasional levels (duration not specified in report, but less than full shift) of 100 ppm		
			Hb			<1-10 ppm
Yardley-Jones et al., 1988			MCV	Statistically signif. results, but within clinical range	<1-10 ppm	

Author	Sample size	Exposure characteristics	Critical parameter(s)	Comments	LOAEC	NOAEC
Collins et al., 1991	200 exposed 268 controls	0.01-1.4 ppm		Well controlled multivariate analysis		
			RBC, WBC, Hb, platelets			0.01-1.4 ppm
			MCV	Statistically significant results judged by authors as clinically non-significant	0.01-1.4 ppm	
Chang, 1972	119	10-20 ppm		Studied unspecified industrial workers (Korea)		
			WBC, RBC		-	10-20 ppm
Doskin, 1971	365	10-40 ppm		Poor reporting of exposure data		
			Platelets	"Mild" cytopenia	10-40 ppm	-
Rothman et al., 1996a	44	1 - 328 ppm	WBC, lymphocytes, platelets MCV	Case control study, comparison of exposure > 31 vs < 31 ppm		1 ppm

Author	Sample size	Exposure characteristics	Critical parameter(s)	Comments	LOAEC	NOAEC
Rothman et al., 1996b	44	1 – 328 ppm	GPA Somatic cell mutation frequency	Case control study		1 ppm
Dosemeci et al., 1997	44	1 - >400 ppm	Relative risk (RR)	Increase of RR from 1 (exposure of <5 ppm) to 2.2 (exposure 5-19 ppm)		< 5 ppm
Dosemeci et al., 1997 Rotman et al., 1996a/b	22	Subcollectives < 30.6 ppm (median 13.6 ppm),	WBC, lymphocyte and platelet counts	Significant decrease		
	11	1.6 – 20 ppm, median 7.6 ppm.	Lymphocyte count	Significant decrease		1 ppm

低用量での曝露

Townsend *et al.* (1978) は、エチルセルロース製造作業員を対象として調査を行っているが、その中でより高度の曝露(曝露期間が約 1 年間以上)を受けたとされる作業員のうち 10 名についての調査が、Fishbeck *et al.* (1978) により別途検討されている。1963 年には、それらの従業員全てが、TWA 濃度 $118\sim 422\text{ mg/m}^3$ ($37\sim 132\text{ ppm}$) のベンゼンに曝露された。1963 年より前にも、一部の従業員は、TWA 濃度 112 mg/m^3 (35 ppm) での曝露を受けていた。1966 年までに、全ての従業員が、もはや曝露を受けないか、 80 mg/m^3 (25 ppm) 未満のより軽度の曝露を受けるかのいずれかとなった。全ての従業員に RBC の肥大(大赤血球症)、一過性の貧血が、また 90% に低 Hb 値が認められた。WBC や他の血液学的パラメータに関する影響は報告されていない。曝露濃度が 80 mg/m^3 (25 ppm) 未満に低下すると、影響を受けたパラメータ全てに回復傾向が認められた。業務に携わっていた期間の後半の数年間、ほとんどの場合、曝露の程度は TWA で $0\sim 32\text{ mg/m}^3$ ($0\sim 10\text{ ppm}$) であった。この調査では、 112 mg/m^3 (35 ppm) を超える曝露の場合、RBC および Hb に影響が及ぶことが示されたが、 32 mg/m^3 (10 ppm) 未満の曝露では、RBC に何らかの影響が生じたことを示す証拠は得られなかった。この調査では、WBC 数に影響が現れない最大曝露量は比較的高値であると論じているが、調査対照とした集団の規模が小さいため、この結論の妥当性は乏しい。

ベンゼン、トルエン、およびキシレンに 55~122 ヶ月間職業曝露された作業員 39 名を対象に、リンパ球関連の免疫についての調査が行われている。パラメータとして、総リンパ球数、T 細胞数、B 細胞数、リンパ球芽球化(幼若化)試験、ツベルクリン検査の成績、ストレプトキナーゼ皮膚検査の成績、血清 IgA、IgG、IgM 濃度、血清中抗ストレプトリジン O 価、直接および間接クームス試験の成績、血清中の抗核抗体量、および、血清中の B 型肝炎表面抗原(HBsAg)ならびに抗 HBs 抗体の有無が用いられた(Moszczynski and Lisiewicz, 1983)。曝露されていた作業員[ベンゼン濃度は 12 mg/m^3 (1978 年における曝露濃度の算術平均、範囲 $5\sim 17\text{ mg/m}^3$)]にみられた異常所見は、総リンパ球数と、 E_a および E_{18h} ロゼット形成細胞数(T 細胞数)が、対照群($n=38$)に比べ有意に減少したことのみであった。曝露されていた被験者の総リンパ球数は $2.208 (\pm 0.623) \times 10^9/L$ で、対照群の総リンパ球数 $2.694 (\pm 0.790) \times 10^9/L$ と比較した場合、有意に減少していた(平均 \pm 標準偏差、 $p = 0.01$)。しかし、曝露されていた被験者でも、PHA 刺激によるリンパ球芽球化反応や、ストレプトキナーゼおよびツベルクリンに対する細胞性免疫反応の成績が正常であった。すなわち、T 細胞の数が減少しても、T 細胞の機能の低下を伴ってはならず、このことは強調されるべきである。著者によれば、ベンゼンおよびその同族体に曝露されていた作業員における血中 T リンパ球数減少は、細胞性免疫反応に対する他の有害影響に先立って現れるため、それらの化合物による中毒の初期マーカーであるとみなせる可能性がある。

Hancock and Moffitt(1984)は、あるコークス炉副産物回収施設において、TWA で 33.6 mg/m³(10.5 ppm)のベンゼンに曝露されていた男性従業員 70 名と、同施設の非曝露男性 21 名を比較した調査について報告している。累積曝露指標を算出し、64 mg/m³・年(20 ppm・年)未満、64~640 mg/m³・年(20~200 ppm・年)、および 640 mg/m³・年(200 ppm・年)超に群分けした。曝露されていた作業員の WBC、RBC、Hb の値は、非曝露対照と同等であった。統計的に有意ではない、わずかな傾向として、低 Hb 値が検出された。著者は、約 32 mg/m³(10 ppm)では、検討対象の血液学的パラメータは影響を受けないと結論付けている。やはり留意すべきこととして、この調査では、血液細胞数を、曝露濃度に対して鋭敏に変化するものと曝露時間に対して鋭敏に変化するものとを区別せずに平準化して捉える手法をとっているため、高濃度曝露[平均 534 mg/m³(167 ppm)に達する]における一時的な影響を検出せずに見過ごした可能性がある。

Yardley-Jones *et al.*(1988)は、TWA 濃度 3 mg/m³(1 ppm)未満~32 mg/m³(10 ppm)のベンゼンに曝露された作業員 66 名について検査を実施している。ただし、対象者は、場合により 1 作業日中、最高 320 mg/m³(100 ppm)での曝露を受けていた(時間に関する具体的記述なし)。性別が整合するように選出した 33 名を対照とした。Hb および MCV について検討した。MCV は、曝露を受けていた作業員[93.1 フェムトリットル(fL)]で、対照(91.5 fL)に対し統計的に有意な高値を示したが、著者は、曝露された作業員の値の範囲(87~99 fL)の大部分が臨床的に正常範囲内(76~96 fL)であったと述べている。したがって、この影響は、NOAEL/LOAEL を確立するものとはみなされなかった。

Kipen *et al.*(1988, 1989)は、塩酸ゴムを扱う作業員 459 名の末梢血球数(RBC、WBC、Hb)について検討した。ここで対象とした集団は、Rinsky *et al.*(1987)により報告された調査対象の部分集合となっており、しばしば Pliofilm[®][訳注:塩酸ゴム製品の商標]コホートと称される。職務内容と従事期間を照らし合わせて 493 の類別項目に細分化された職務-曝露マトリックスが構築され、このうち 86(17%)の類別項目については、実測の曝露モニタリング情報が得られている。1947 年より前(1939 年以降)のすべての類別項目は、最新の測定結果を外挿することにより作成された。1989 年の報告においては、Kipen *et al.*は、曝露量を外挿で得る上で 2 つのスキーム(A および B)を用い、得られた曝露量それぞれに RBC、WBC、Hb などの血球・血液数値に関連付けた。各作業員について信頼性が高い傾向を得るため、著者は、5 回を超える血液検査を受けている作業員についての解析を行った(対象となった作業員 264 名、述べ検査回数 16841 回)。著者は、1940 年代に血球数が増加し、その後横ばいになったと報告している。Kipen *et al.*(1989)は、スキーム B を用いた外挿の場合に、112~438 mg/m³(35~137 ppm)[平均:240 mg/m³(75 ppm)]での曝露と、WBC 数減少との間に強い相関が示される(期間:1940~48 年)ことを認めている。RBC 数減少との強い相関も認められたが、Hb 値との相関はそれらより低かった。平均曝露濃度(長期間の平均濃度)が約

48~64 mg/m³(15~20 ppm)であった1949~75年には、こうした相関は、それら3つの血液学的測定項目のいずれにも認めることができなかった。スキーム A を用いた外挿では予測曝露量は低目となり、いずれの期間(特に1940~48年)においても、WBC、RBC、Hbの減少のいずれについても、相関は認められなかった。スキーム A による外挿では、1940~48年の曝露濃度は19.2~60.8 mg/m³(6~19 ppm)と予測された。いずれの外挿(スキーム A または B)でも、得られたデータから、64 mg/m³(20 ppm)以下の曝露では、WBC、RBC、Hbのいずれにも影響を及ぼさないことが示唆される。

Collins *et al.*(1991)も、濃度0.032~4.48 mg/m³(0.01~1.4 ppm)のベンゼンに曝露された、化学物質に関わる作業員200名および対照268名を対象とした調査について報告している。ベンゼンに連続的に一定用量で曝露されていた場合、RBC、WBC、Hb、血小板、MCVのいずれにも差異を認めなかった。「流動的」な曝露の場合、MCVにわずかな差異が認められた。いくつかの交絡因子を照らし合わせたところ、検討対象のほとんどのパラメータには、喫煙が有意な影響を及ぼすことが示された。著者は、MCVに及ぼされる影響が0.4%にすぎないことから、臨床的意義はないと判断している。

Marcus(1987)は、旧ソビエト連邦のDoskin(1971)および韓国のChang(1972)により実施された調査の要約を行っている。これらの調査では、様々な血液学的パラメータに関してNOAELの導出が試みられた。Doskin(1971)は、新設された工場でベンゼンに曝露されていた、化学物質に関わる作業員365名を検査した。32~128 mg/m³(10~40 ppm)のベンゼンに、1年目は作業時間の64%、2年目は作業時間の37%、3年目は作業時間の3%曝露されていた。残りの作業時間は、曝露濃度は32 mg/m³(10 ppm)であった。この調査では、1年目に作業員の40%が軽度の血球減少を示し、それらの中で最も多かったのは血小板減少であったことが報告されている。曝露量が低下した2年目以降は、影響は認められていない。Chang(1972)は、不特定の産業の従業員119名からなる集団を調査し、28名に白血球減少、貧血、またはその双方が認められたことを報告している。32~64 mg/m³(10~20 ppm)での曝露では、従業員に血液学的異常は認められなかった。著者は、血球減少の閾値を32 mg/m³(10 ppm)としている。報告されている曝露濃度の根拠に関しては、情報が乏しい。

Lange *et al.*(1973)は、[訳注:血清免疫グロブリンに関する]データを公表しているが、どの位の曝露量でどの影響が生じているのかを追跡するのが不可能であることから、NOAELやLOAELを判定するための要件を満たしていないと考えられる。さらにこの調査では、対象集団がベンゼン以外の物質への交絡曝露を受けている可能性があることから、やはりNOAELやLOAELの判定には不適切であると考えられた。

Yin *et al.*(1987)は、中国人作業員508818名中に生じた24例の再生不良性貧血について報告している。対象作業員のうち、26319名がベンゼン、502410名がベンゼン含有混合物に

曝露されており、曝露濃度は 1035 mg/m^3 (333 ppm) と推定された。白血球の減少にまで至ったベンゼン中毒についてみると、その罹患率は、全体で 0.5%、ベンゼンに曝露されていた作業員では 0.94%、ベンゼン含有混合物に曝露されていた作業員では 0.44% であった。罹患率が最も高かったのは靴製造業 (1.25%) で、ベンゼンの濃度範囲は $0.06 \sim 844 \text{ mg/m}^3$ ($0.02 \sim 264 \text{ ppm}$)、濃度の中央値は 40 mg/m^3 (12.5 ppm) であった。作業員の集団では、空気中のベンゼン濃度と、白血球減少症 (4000 cells/mm^3 未満) の有病率との間に有意な相関が認められた。白血球減少症の例は、ベンゼン濃度が 40 mg/m^3 (12.5 ppm) 未満の職場で認められたが、白血球減少症の罹患率が、こうした職場に対して予想された値よりも高かったかどうかは不明である。

Yin *et al.* (1987) の調査に修正を加え、規模を拡大して実施された調査において、様々な濃度 (曝露濃度の報告なし) のベンゼンに曝露されていた中国人作業員 74828 名と対照集団である作業員 35805 名とが、造血障害を指標に比較されている (Travis *et al.*, 1994)。特に興味深いことは、Travis *et al.* (1994) が、曝露されていた作業員においては再生不良性貧血 9 例と骨髄異形成症候群 (MDS) 7 例を報告しているのに対し、非曝露作業員にはそれらの発生例を認めていない点である。

Yin *et al.* (1996) は、ゴム産業、粘着テープ製造業、および塗料工場における調査について報告しており、そしてその亜集団を対象に、Rothman *et al.* (1996a, 1996b) および Dosemeci *et al.* (1997) により、さらなる症例対象調査が実施されている。これらの調査では、ベンゼンに曝露された作業員の群と、ベンゼンなどの骨髄毒性を示す化学物質や電離放射線への曝露歴がない非曝露コホート群との比較が行われた。非曝露群コホート群と曝露された被験者群とで、5 歳間隔で区切った年齢構成と性別とを整合させた。曝露濃度は $1 \sim 328 \text{ ppm}$ (Rothman *et al.*, 1996a)、曝露期間は少なくとも 6 ヶ月であった。症例 (曝露群) と対照 (非曝露コホート群) との間では、次の様にパラメータに有意差が認められた。WBC 数、リンパ球数、血小板数、RBC 数が、曝露群で有意に減少した。アルドステロン産生副腎皮質腺腫に関連する体細胞変異の頻度は、ベンゼン曝露群の方が非曝露対照群に比べ、約 2 倍高かった。これらの群を亜群に分け、さらなる検討が行われた。 31 ppm 未満 (範囲: $1.6 \sim 30.6 \text{ ppm}$ 、8 時間 TWA の中央値: 13.6 ppm) の濃度でベンゼンに曝露されていた被験者の亜群 ($n=22$) では、WBC 数、リンパ球数、血小板数の有意な減少が、親群で見られたのに続いて認められた。これらの作業員は、天然ゴムの可溶化および粘着テープの製造にベンゼンを使用する工場、ならびに木製玩具にニス塗や色塗りをするためにベンゼン基材を使用する工場の出身者であった。業界 [芳香族化合物生産者協会 (2006) COM063_hh_Ind15] の情報によれば、こうした作業は、これまできわめて高いベンゼン曝露を伴うものとされてきたが、調査で検討されておらず、ただ血液検査の結果に影響を及ぼすことは予測されていたと考えられる。さらに、 $1.6 \sim 20 \text{ ppm}$ (8 時間 TWA の中央値: 7.6 ppm) の濃度で曝露されて

いた被験者からなる亜群(n=11)では、リンパ球の絶対数 $[1.6 (\pm 0.4) \times 10^3/\mu\text{L}]$ が、対照群 $[1.9 (\pm 0.4) \times 10^3/\mu\text{L}]$ に比べ、有意に少ないことが示された(平均 \pm 標準偏差、 $p = 0.03$; Rothman *et al.*, 1996b)。ベンゼンにより健康障害が引き起こされるリスクは、5 ppm 未満で曝露されていた者と 5~19 ppm で曝露されていた者とで比較した場合、相対値で 1 に対し 2.2 となっていた(Dosemeci *et al.*, 1997)。

統計的に有意なリンパ球数減少の臨床的意義には、疑問の余地があると思われる。Moszczynski and Lisiewicz(1983)の調査結果によれば、ベンゼンに曝露された作業員の血中リンパ球数減少は、細胞性免疫反応に関連する他の障害が発現する前に現れる、中毒の初期指標であるとみなすことができる。Lee *et al.*(1996)の調査では、シンガポールのアジア人集団(80%が中国系)における、リンパ球亜群の基準値の範囲が確定されている。この調査の結果から、年齢および性別により、リンパ球亜群(構成)にばらつきがあることが確認されている。血中の絶対リンパ球数は、成人男性(n = 33)では $1.3(1.1\sim 1.5) \times 10^3/\mu\text{L}$ (中央値、括弧内は下四分位点~上四分位点)、成人女性(n = 38)では $1.5(1.2\sim 1.9) \times 10^3/\mu\text{L}$ であった。こうした調査から得られたリンパ球数の変化に関する全ての情報を考慮すると、ベンゼンによるリンパ球減少に関する NOAEC は、1 ppm だと推測される。

EC 委員会(CEC 1993)が未公表の調査(Van Damme *et al.* 1991)の予備的審査結果について報告したことも留意すべきである。その調査では、 $0.64\sim 1.92 \text{ mg}/\text{m}^3$ ($0.2\sim 0.6 \text{ ppm}$)への曝露により、白血球減少症(4000 cells/mL 未満と定義)の有病率が上昇していることが示されているが、これは、WBC への影響に関する NOAEL の予測値として他の報告者が示している $64 \text{ mg}/\text{m}^3$ (20 ppm)より大幅に低い。ただし、この調査は公表文献に掲載されていないことから、適切に評価できないと考えられる。この調査は、公表されている他の調査(Kipen *et al.* 1988; Fishbeck *et al.* 1978; Tsai *et al.* 1983; Collins *et al.* 1991)とも矛盾することから、LOAEC または NOAEC の定義には不適切であるとみなされた。

毎日 8 時間時間加重平均で 0.55 ppm のベンゼンに曝露されていた作業員 387 名と、非曝露作業員 553 名を対象にした反復横断調査(Collins *et al.*, 1997)では、このような低濃度のベンゼンに曝露された作業員において、リンパ球減少などの血液学的変化の発生リスクが高まることを示す徴候は、何も認められなかった。喫煙、年齢、および性別を考慮すると、ベンゼンに曝露された作業員において、リンパ球減少の有病率上昇はみられなかった(オッズ比 0.6、95%信頼区間:0.2~1.8)。ベンゼンに高用量で曝露されていた作業員では、リンパ球数減少が、Moszczynsky and Lisiewicz(1983)および Rothman *et al.*(1996b)によって報告されている。

「オーストラリアの石油産業におけるリンパ球造血系のがんとベンゼン曝露(Lymphohematopoietic cancer and exposure to benzene in the Australian Petroleum Industry)」〔米国石油協

会(API, 2001)では、極めて低用量の曝露(範囲:0.005~57.3 ppm-年、平均:4.9 ppm-年)でも一生涯その様な曝露を受けることは、急性骨髄性白血病(AML)や慢性リンパ性白血病(CLL)の発症と強く相関することが立証されている。したがって、造血系への影響に関する NOAEC は、以前の調査で導出された値より低いとみなされる。

結論

上述したデータから、慢性的なベンゼンへの曝露により、白血球および赤血球の減少に至ると言える。この影響は、低濃度[報告されている濃度範囲:32 mg/m³ 超~64 mg/m³ (10 ppm 超~20 ppm)]での長期間(数年間)曝露の場合、回復が可能である。192 mg/m³ (60 ppm)のベンゼンに約 1 週間曝露された場合、大型顆粒リンパ球の割合上昇が生じ得るが、骨髄への重度の影響やおよび特定の血球減少は、いずれも生じない。より高濃度のベンゼンでは、致死的な再生不良性貧血が引き起こされるおそれがある。Jandl (1977)のレビューでは、ベンゼンによる再生不良性貧血の症例の致死率が 13%であったことが示されている(特発性再生不良性貧血の 85%とは異なっている)。

白血球減少症の有病率は、Yin *et al.* (1987)および Kipen *et al.* (1988, 1989)のデータが示すとおり、ベンゼンの濃度と相関している。これらのデータから導出すると、白血球減少に関する LOAEC は、40 mg/m³ (12.5 ppm)~64 mg/m³ の範囲にある。濃度が 320 mg/m³ (100 ppm)を超えると、白血球減少症の有病率はより高くなる。

近年 Rothman *et al.* (1996a, 1996b)や Dosemeci *et al.* (1997)により報告された症例対照調査では、ヒトの慢性的なベンゼン曝露に対し最も鋭敏に現れる反応は、リンパ球減少であることが示されている。提示されたデータから、1.6~30.6 ppm の範囲の濃度でベンゼンに曝露された作業員集団のリンパ球数は、非曝露作業員コホートに比べ、有意に少なかったことが示されている。したがって、血球減少については、全体的にみて、LOAEC が 32 mg/m³ (10 ppm)であることが示唆される。ベンゼンへの曝露によるリンパ球数の変化について、上述の全ての調査の情報を考え合わせると、リンパ球減少に関する NOAEC として、3.2 mg/m³ (1 ppm)が導出される。

結論として、ベンゼンによる非腫瘍性の影響に関する NOAEC は、3.2 mg/m³ (1 ppm)であるとみなされる。

結論：分類および表示

ここに示す分類は、反復曝露による健康へのリスクを特徴付けるリスクフレーズの要件も含め、指令 67/548/EEC の付属書 I に基づいて承認されている。ベンゼンは、有毒物質に分

類され、T(有毒)、R 48/23/24/25 の表示に該当するものとされる。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro* データ

ベンゼンに関する遺伝毒性データについては、1990 年までのものが、EHC(環境保健クライテリア)の報告書 vol. 150(1993)に詳細に概説されている。この報告書によれば、ベンゼンは、ルーチ的な細菌を用いた遺伝子突然変異試験では陰性である。しかし、S9 mix 存在下で、曝露効果を高めるため細菌とベンゼンをデシケーターにおいてインキュベートした場合、弱陽性所見が得られている。哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験では、結果は様々であった。*In vitro* で染色体異常誘発性を示すという証拠も挙げられているが、試験ではやはり様々な結果が得られている。考察では、ベンゼンを活性化する酵素の活性が低下する様な試験系となった場合、その低下に起因して陰性所見が得られるのではないかと述べられている。

4.1.2.7.2 *In vivo* データ

ベンゼンの *in vivo* における変異原性についてのデータを、以下に要約する。

- A 経口投与での体細胞試験
- B 吸入投与での体細胞試験
- C 経胎盤性の突然変異誘発能
- D 哺乳類生殖細胞試験
- E ヒトにおけるデータ
- F 構造類似物質に関するデータ

最近公表されたデータ、および低用量のベンゼンで陽性となった試験を重要視した。

A 経口投与後の体細胞試験(Table 4.25 も参照)

染色体異常

Ciranni *et al.*(1991)は、ベンゼンがマウスの骨髄細胞に引き起こす染色体異常を、時間や用量との関係性の面から検討した。最初に、ベンゼン 1 mL/kg (880 mg/kg 体重)を単回経口投与し、所定の時間(6、12、18、24、30、36、42、48 時間)の経過後、骨髄細胞を採取し、解析を行った。この用量で、ベンゼンは、すべての採取時点で骨髄細胞に対し高い染色体異常誘発活性を示し、その活性は、24 時間後および 30 時間後にピークとなった〔異常細胞の出現頻度が対照で約 1%であったのに対し約 20%(ギャップを除く)〕。24 時間後/30 時間後の細胞 100 個あたりの異常数は、ギャップが 8.8/19.5(対照 2.4)個、切断が 33.3/39.5(対照 1.1)個、交換が 1.0/2.5(対照 0)個、高度の損傷を受けた細胞すなわち異常が 10 個を超える細胞が 2.2/2.2(対照 0)個であった。次に、ベンゼンを 0.1、0.5、または 1.0 mL/kg (88、440、および 880 mg/kg 体重に相当)を投与し、24 時間後の用量-反応関係を調べた。3 用量全てで明確な陽性が示され、また、用量依存性が立証された。

Fujie *et al.*(1992)は、ラットの骨髄細胞に対するベンゼンの染色体異常誘発作用について、*in vivo* 比較試験を実施した。著者は、用量-影響関係および時間-影響関係、性差、系統差について検討した。ベンゼンが経口投与された後、異常細胞の発生率は経時的に漸増し、投与後 12 時間で最大に達した。また、明確な用量-反応関係が認められた。雄ラットは雌より感受性が高く、Long-Evans ラットは Wistar ラット、Sprague-Dawley ラットより感受性が高かった。ベンゼン誘発性の染色体異常は、主にギャップおよび切断からなっていた。最も影響が強く現れたのは、雄 Long-Evans ラットにおいて、750 μ L/kg (660 mg/kg 体重)のベンゼンを経口投与して 12 時間後であった。陰性対照では異常細胞の割合は 1%であったが、この条件下では、ベンゼンにより 65%の細胞に異常が誘発された。経口投与での LOED(最小作用量)は、150 μ L/kg (132 mg/kg 体重)であった。

小核

Au *et al.*(1990)は、マウスの正染性赤血球における小核の誘発について検討している。2、8、または 14 日間の経口投与により、すべての用量(26.6~146.6 mg/kg 体重)において、用量および時間依存的に陽性所見が示された。投与が終了した後も調べてみると、小核の出現頻度はさらに上昇していた(影響が最も強く現れたのは、投与開始後 36 日)。

MacGregor *et al.*(1990)は、ベンゼンを長期経口投与した場合の小核誘発能について、マウス正染性赤血球を対象に検討した。投与期間が 4 ヶ月に達した以降、小核の出現頻度の用量依存的な増加が、25~600 mg/kg 体重の用量範囲で認められた。雄における影響は、雌

より顕著であった。25 mg/kg 体重の場合、雄では弱い影響が認められ、雌は当該用量において陰性であった(正確な出現頻度を当該公表文献の数値から得ることはできない)。50 mg/kg 体重の場合、雄では明確な影響が認められ(対照 0.13%に比し、約 0.40%)、雌ではわずかな増加が報告されている(対照 0.13%に比し、約 0.20%)。1年間および2年間という長期曝露期間については、雄のみで検討された。そうした長期曝露においては、小核の出現頻度は曝露期間が長くなるに連れて減少したが、生じた影響はなお明確に陽性であった。

Chen *et al.*(1994)は、マウスを対象に、2つの分子細胞遺伝学的方法[動原体 DNA プローブによる蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)および CREST 抗体による免疫蛍光染色(CREST)]を用いて、ベンゼンの投与を受けたマウスの骨髄赤血球および脾臓リンパ球に形成される、小核の起源を明らかにした。雄マウスにベンゼン(220 または 440 mg/kg 体重)を経口投与すると、骨髄中の小核を有する赤血球の割合は、220 mg/kg 体重では 1.8%、440 mg/kg 体重では 1.5%と、有意に増加した(陰性対照では 0.05%)。FISH 法および CREST 法では、骨髄赤血球中の小核が、染色体の損失および切断の双方により形成されることが示された。小核の大半は、染色体の切断に起因していた。小核を有する細胞の増加は、ベンゼンの投与を受けたマウスから樹立された脾細胞においても認められた(小核を有する細胞が 2~3 倍増加)。骨髄赤血球の結果とは対照的に、脾細胞では、ベンゼンにより誘発された小核の大半が CREST 抗体により標識され、これらの小核が染色体損失により生じたことが示された。

DNA 損傷

Tuo *et al.*(1996)は、マウスにおけるベンゼンの遺伝毒性および CYP2E1 タンパク質の役割について、アルカリコメットアッセイ(DNA の一本鎖および二本鎖切断やアルカリ不安定部位などの DNA 損傷検出法)により検討した。アルカリコメットアッセイでは、処置した細胞をゲル包埋し、細胞膜溶解後、電場にさらす。損傷レベルが高いほど DNA は電場により容易に移動できるようになり、DNA を蛍光染色するといわゆるコメットテールとして検出できる。

雄マウスにベンゼンを 40、200、または 450 mg/kg 体重の用量で単回経口投与したところ、投与後 6 時間の時点で採取された末梢リンパ球および骨髄細胞に、用量依存的な(コメットテール長の増加により示される)DNA 損傷が生じた。40 mg/kg 体重を投与した場合、骨髄細胞のテール長は、陰性対照に比べ 1.6 倍となった。同じ動物において、末梢血リンパ球には、DNA 損傷の有意な増加は認められなかった。200 mg/kg 体重では、テール長は、骨髄細胞および末梢血リンパ球で、それぞれ 4.8 倍、4.0 倍増加した。450 mg/kg 体重では、テール長はさらに増加し、それぞれ対照値の 5.4 倍、6.6 倍となった。

プロピレングリコール(CYP2E1 を阻害)による前処置を行うと、全ての用量において、いずれの型の細胞でも、テール長の増加が約 50%低下した。

B 吸入投与での体細胞試験(Table 4.25 も参照)

染色体異常

Fujie *et al.*(1992)は、ラットに2週間(2時間/日、5日/週)ベンゼンを吸入させ、骨髄細胞における染色体異常誘発作用について検討した。濃度範囲 10~60 ppm(32.5~196 mg/m³)において濃度依存的な影響が認められ、10 ppm(32.5 mg/m³)でも明確な陽性所見が認められた。雄雌間に反応の差異は認められなかった。

Styles *et al.*(1984)も、ラットを吸入曝露して、染色体異常試験を実施している。ベンゼンへの6時間の単回曝露が行われ、100または1000 ppm(325または3250 mg/m³)の濃度で、骨髄細胞において染色体異常出現頻度が増加した。1または10 ppm(3.25または32.5 mg/m³)での曝露では、陰性の結果となった。

極めて低用量のベンゼンによる遺伝的影響について、骨髄以外のマウス組織を対象にした検討が、Au *et al.*(1988、肺マクロファージ)および Au *et al.*(1991、脾臓リンパ球)により行われている。0.04 ppm(0.14 mg/m³、脾臓リンパ球のみ)、0.1 ppm または 1.0 ppm(0.325 mg/m³または 3.25 mg/m³)での7日/週曝露を6週間実施した。1日あたりの曝露時間は、1988年に公表された文献の試験では24時間、1991年に公表された文献の試験では22時間と記載されている。

マクロファージに及ぼす影響を検討するために、Au *et al.*(1988)は、新たな試験系を開発している。有糸分裂状態のマクロファージの蓄積を調べるために、細胞調製の4時間前に、紡錘体毒であるビンブラスチンが腹腔内投与された。この処置にも関わらず、中期で停止したマクロファージは比較的わずかにすぎず、1 ppm 群では24匹中15匹のみが解析可能であり、一部の動物については25個未満しか中期のマクロファージを解析できなかった。ビンブラスチンの用量は記述されていないが、きわめて高用量を用いたように思われる。ビンブラスチンの適切な用量を求めるための予備試験では、用量が0.14~87.5 mg/kg 体重の範囲の場合、マクロファージにおいて用量依存性は認められなかったが、骨髄においては最高用量(87.5 mg/kg 体重)で最大効果が得られた。(並行して行われた脾臓リンパ球に関する試験では、紡錘体毒であるコルヒチンが、マウス1匹あたり150 mg という極めて高用量で用いられている。) Au *et al.*(1988)は、0.1および1 ppmのベンゼンを吸入させた場合の異常出現頻度について、有意な用量依存的な増加が認められたと報告している[陰性対照:1.2±2.3%(標準偏差)、0.1 ppm:5.3±5.5%、1 ppm:6.5±5.9%]。この試験系には方法論的

な問題が伴われること、ビンブラスチンとの共曝露があること、および異常出現頻度の数値に極めて高い標準偏差が伴われることから、この試験の結果は、不明確であると評価される。

脾臓リンパ球についての試験(Au *et al.* 1991)は、2つの試験系で実施され、いずれの試験系においても雌雄各 6~12 匹が供試された。屠殺の 4 時間前、動物にコルヒチン(試験系 I)またはビンブラスチン(試験系 II)が投与された。コルヒチンは、高用量で染色体異常誘発性を示すが、マウス 1 匹あたり 150 mg という極めて高用量が投与された。試験系 II におけるビンブラスチンの用量は記述されていない。細胞 100 個あたりの染色分体切断数は、以下の表に示されている(この論文には、これ以外、他の種類の細胞における異常細胞の出現頻度などについて、記述されていない)。

chromatid breaks per 100 cells

sex	Expt.	neg.co.	0.04 ppm	0.10 ppm	1.00 ppm
male	I	2.0		6.4	9.0
	II	2.6	4.7	4.0	2.0
female	I	2.5		8.2	8.7
	II	0.4	1.7	2.7	1.4

こうした結果について、著者は陽性であると評価している。しかし、「影響」のばらつきが大きいこと、また、方法論的にいくつか不十分な点があることに基づくと、全体的な知見は不明確である(陽性対照がない、解析前の盲検化が行われていない、有糸分裂の解析がしばしば 100 個未満で行われている、コルヒチンまたはビンブラスチンとの共曝露がある)。

小核

Erexson *et al.*(1986)は、ラットおよびマウスを対象に、ベンゼンを 6 時間吸入させた際の影響について解析を行った。マウスでは、小核を有する骨髄細胞の明確かつ用量依存的な増加が、10~1000 ppm(32.5~3250 mg/m³)の範囲の全ての段階の用量で認められた。ラットにおける影響は、マウスにおけるほど強くはなかった。1~30 ppm(3.25~97 mg/m³)の範囲の用量では、多染性赤血球 1000 個あたりの小核の出現頻度が有意に増加した(小核を有する細胞の出現頻度は記述されていない)。

Farris *et al.*(1996)は、マウスを対象に、比較的低濃度で吸入させた場合のベンゼンの変異原性を検討した。雄マウスに 1.0~200 ppm(3.25~650 mg/m³)のベンゼンを 1、2、4、および 8 週間の曝露期間で吸入させた後骨髄および血中の小核を有する多染性赤血球、ならば

に血中の小核を有する正染性赤血球の出現頻度を測定した。ベンゼン濃度が 100 および 200 ppm(325 および 650 mg/m³)の場合にのみ、骨髓および血中において、小核を有する赤血球の出現頻度の増加が引き起こされた。骨髓中の小核を有する多染性赤血球の出現頻度は、対照では 1.0%であったのに対し、100 ppm および 200 ppm では、2 週目までにそれぞれ 4.2% および 8.6% に達して定常状態となった。また、小核を有する正染性赤血球の出現頻度(血中)は、対照では 0.18% であったのに対し、100 ppm および 200 ppm では、8 週目までにそれぞれ 1.34% および 3.25% へと漸増した。100 および 200 ppm(325 および 650 mg/m³)では、細胞毒性作用が認められた。

Valentine *et al.*(1996)は、CYP2E1 タンパク質の発現を欠損させたマウスを用いて、ベンゼンの毒性低下について検討を行った。トランスジェニックノックアウトマウス(*cyp2e1*^{-/-})、野生型マウス、および B6C3F1 マウスを、0 ppm(対照)および 200 ppm(650 mg/m³)のベンゼンに、5 日間(6 時間/日)全身吸入曝露した。ベンゼンへの曝露により、野生型および B6C3F1 の系統では、骨髓の細胞充実性が、空気曝露対照のそれぞれ 31%、50%に低下した。さらに、ベンゼンへの曝露により、これらの 2 系統では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度が増加した(それぞれ 5~4 倍)。対照的に、ベンゼンに曝露された *cyp2e1*^{-/-}マウスを空気に曝露された対照と比較しても、骨髓の細胞充実性および小核を有する多染性赤血球の出現頻度のいずれにも差を認めなかった。トランスジェニック CYP2E1 ノックアウトマウス(*cyp2e1*^{-/-})を用いて、野生型や B6C3F1 マウスと比較しながら、ベンゼンの *in vivo* 代謝およびベンゼンが誘発する毒性の発現への CYP2E1 の関わりについて、検討が行われた。この試験の結果は、マウスにおける *in vivo* ベンゼン代謝やベンゼン誘発性骨髓毒性と、CYP2E1 との因果関係を明らかにするものである。

遺伝子突然変異

Ward *et al.*(1992)は、マウスを吸入曝露して、脾臓リンパ球に対するベンゼンの遺伝子突然変異(*HPRT* 変異体)誘発能を検討した。0.04、0.10 ないしは 1 ppm(0.14、0.33 ないしは 3.25 mg/m³)の濃度で 6 週間(22 時間/日、7 日/週)曝露した。この試験はルーチンの試験ではなく、Au *et al.*(1991)が染色体異常の解析に用いたマウスで実施され、雌雄各 3 匹が解析に供された。屠殺の 4 時間前、被験動物に、700 mg/kg 体重という極めて高用量のビンブラスチンが投与された。続いて実施されるマイトジェン(コンカナバリン A)によるリンパ球刺激との干渉の可能性については、考慮されていない。

突然変異細胞の検出は、6-チオグアニン(6-TG)存在下でのトリチウム標識チミジン取り込み能を調べることにより行われた。突然変異頻度の定量化は、次の手順により行われた。6-TG 抜きで培養したものにおいて、標識細胞の割合を動物ごとに測定した(標識指数: LI)。6-TG 存在下で培養したもので計測した細胞(核)数を、同一動物の LI により補正し、「評価

に値する核」の数(N)とした。突然変異頻度(Vf)は、標識された核の数(M)を(N)で除したものと定義される。各群の Vf、M、LI の定量データを以下の表に示す。なお、Vf の値は 10^{-6} 倍で与えられる(各群の M および LI のデータは、著者の論文には収載されていない)。

	males			females		
	VF(1)	M	LI	VF(1)	M	LI
unexposed	15.3	10.7	0.071	13.2	14.3	0.081
air exposure	5.7	5.0	0.089	7.2	14.7	0.166
0.04 ppm	24.7	8.3	0.028	29.2	21.3	0.066
0.10ppm	40.2	12.0	0.031	62.5	25.7	0.052
1.00 ppm	17.0	12.6	0.064	25.0	14.0	0.057

著者によれば、0.04 および 0.10 ppm(0.14 および 0.33 mg/m³)では、雌雄双方に陽性の結果がもたらされた。しかし、標識細胞数(M の値)が明確に増加していても、それで現れるはずの「影響」が並行して現れていない。一方、標識指数(LI)には群の間で 6 倍のばらつきがあり、Vf 値の上昇は、このばらつきにより人為的に生じた可能性がある。さらに、ビンブラスチンへの共曝露があること、および陽性対照が設けられていないことを考慮すると、この試験の知見は、全体的に不明確さを伴うと言える。

Mullin *et al.*(1995)は、トランスジェニックマウスアッセイにより、ベンゼンの変異原性について検討した。このアッセイでは、バクテリオファージλの *lacI* を導入遺伝子として、(マウスを曝露した後)感染ファージの形でマウスゲノム DNA から回収し、表現型 LacI を有するファージを調べ、スコア付けが行われた。このアッセイでは、DNA 塩基置換および微小な挿入や欠失が検出可能である。マウス 8 匹を、濃度 300 ppm(974 mg/m³)のベンゼンに 12 週間(6 時間/日、5 日/週)吸入曝露した。突然変異頻度は、対象とした器官から回収した総ファージにおける表現型 LacI を有するファージの比として算出した。曝露されたマウスの肺組織において測定された突然変異頻度の平均値は、 10.6×10^{-5} であったが、この値は非曝露対照群より約 1.7 倍高かった(P > 0.05)。曝露マウス由来の脾臓組織では、突然変異頻度の平均値は 12.6×10^{-5} であったが、この値は対照群に比べ、約 1.5 倍高かった(P > 0.05)。しかしながら肝組織では、ベンゼンに曝露されたマウスと曝露されていないマウスとで、突然変異頻度の平均値に、有意差は認められていない。

姉妹染色分体交換(SCE)

Erexson *et al.*(1986)は、ラットおよびマウスの末梢リンパ球を対象に、ベンゼンの吸入曝露による姉妹染色分体交換(SCE)の誘発について検討した。並行して実施された骨髓細胞の小核の解析結果(上記参照)と比較すると、幾分弱い影響が認められた。マウスでは、最高用量だった 1000 ppm(3250 mg/m³)の場合にのみ、SCE 頻度が自発的に見られる値の 2 倍

に達した。ラットでは、最高用量の 30 ppm (97 mg/m³) において、わずかな増加を生じた (細胞分裂中期における SCE 頻度が陰性対照群で 8.6 あったのに対し 11.1)。

C 経胎盤性の突然変異誘発能

Harper *et al.* (1989)、Ning *et al.* (1991)、および Xing *et al.* (1992) は、ベンゼンが胎盤を介して作用し、突然変異を誘発するかどうかを検討した。マウス胎仔肝細胞において、小核を有する多染性赤血球の出現頻度の増加が、219～874 mg/kg 体重 (Ning *et al.* 1991)、または 878～1318 mg/kg 体重 (Xing *et al.* 1992) の範囲の用量を母体に腹腔内投与した場合に認められた。Harper *et al.* (1989) の試験では、880～1760 mg/kg 体重の用量で腹腔内投与あるいは経口投与が行われたが、いずれも明確な影響は認められていない。

これらの試験では、腹腔内投与という人為的な曝露経路が用いられているが、その結果から、ベンゼンが胎盤を介して突然変異を誘発する可能性がいくらか示されている。

D 哺乳類生殖細胞試験 (Table 4.26 も参照)

ベンゼンが生殖細胞で突然変異を誘発する可能性に関しては、いくつかのデータが得られているが、そのほとんどは信頼性が低い。

Ciranni *et al.* (1991) は、マウスにベンゼンを単回経口投与した場合の精原細胞での染色体異常誘発について、その時間依存性および用量依存性を検討した。1 mL/kg (880 mg/kg 体重) を投与した場合、最大の反応が投与後 24 時間で得られた (異常細胞の割合が陰性対照 1.2% であったのに対し 6.3%)。用量-反応の検討においては、0.25、0.5、および 1.0 mL/kg 体重 (220、440、および 880 mg/kg 体重に相当) の全用量にわたって、染色体異常の頻度が用量依存的な増加を示し、880 mg/kg ではやはり 6.3% の精原細胞に異常が認められた。骨髄の染色体異常誘発能が並行して検討されており (4.1.2.7.2 A 参照)、それらの結果から、骨髄細胞および精原細胞に対する染色体異常誘発能は、同じ用量範囲において発現していると言えるが、その影響の現れ方は、精原細胞では骨髄細胞におけるほど顕著でなかった。

Rithidech *et al.* (1987) は、詳細な情報を含まない抄録の中で、マウスに経口投与した場合の精原幹細胞における染色体異常誘発について報告している。

優性致死試験の再現性を多施設にわたって評価する試みの中で、マウスにベンゼンを経口投与 (1.0～4.0 mL/kg、最長 48 日) した場合の優性致死誘発能が検討されている (GSF Bericht, 1977; Ehling *et al.* 1978 も報告)。著者は、別々に実施された試験から全体に当てはまる明確な結論を引き出すのは不可能であったと結論付けている。

ラット優性致死試験でも、吸入曝露(1.0~300 ppm、3.25~975 mg/m³、10 週間)での結果は、曖昧なものであった(Biodynamics 社, 1981)。この試験では、10 週間の投与期間後、即座に 2 回の交配期間がそれぞれ 1 週間設けられた。しかし、その後の交配については検討されなかった。また、いずれの交配においても、高用量群(300 ppm、975 mg/m³)であっても、平均死亡着床数や突然変異誘発比の平均値に、わずかな増加しか引き起こされなかったことが報告されている。したがって、この優性致死試験の結果も、不明確であると評価されることになる。

別の優性致死試験が、マウス(経口投与:Feldt *et al.* 1985)およびラット(腹腔内投与:Lyon 1975, Dean *et al.* 1978 に引用されている)を対象に行われており、結果は陰性であると報告されている。しかし、これらの試験報告には、方法論および結果に関して十分な情報が記述されていない。したがって、意義のある結論は引き出せない。

Topham(1980)は、ベンゼンを投与されたマウスにおいて、精子の頭部異常が誘発されるという知見を得ているが、用いられた試験系は変異原性を特異的に検出するものではなかった。

E ヒトにおけるデータ

大体的場合、ヒトにおけるデータは、男性における遺伝毒性リスクを評価するものと深く関連している。しかし、男性の生殖細胞への変異原性に関しては、信頼性が高いデータがいずれの化合物についても得られておらず、一方、体細胞に関するデータには全般的に方法論上の問題があるため、その解釈は困難である(Ashby and Richardson 1985; Carrano and Natarajan 1988; Speit *et al.* 1994)。

ヒトにおけるベンゼンの遺伝毒性を検討した試験の概略を、Table 4.27 に示した。ほぼ全ての試験が、末梢リンパ球培養物を用いて実施されている。しかし、曝露量の情報が乏しく、試験法にも不備があることから、これらのデータからは、確定的な結論を導くことはできない。

ヒトにおけるベンゼンの遺伝毒性を検討した試験は、いずれも遡及的(後ろ向き)に実施され、曝露を受けていたヒトの群と曝露を受けていなかったヒトの群とを比較して、影響を調べている。このため、ベンゼンに曝露されていないこと以外のすべての状況が曝露群と整合するような、適切な陰性対照群を収集しなくてはならないという問題が生じる。曝露群および対照群は、年齢および性別に照らして整合が取れているだけでなく、喫煙歴、薬物療法、就労時および在宅時の物理化学的物質に対する曝露、栄養、個人および家族のがん発生率のような(過去および現在の)交絡因子に照らしても整合が取れていることが必要

とされる (Carrano and Natarajan 1988)。この項で検討されたベンゼンに関する試験のいずれも、こうした基準を厳密には満たしていない。さらに、いずれの試験も、陽性対照群が確立できていない。

また、ほとんどの試験報告で、ベンゼンの最高濃度を示していない、ベンゼン以外の化学物質に対する曝露が除外されていないなど、曝露についての記載が不十分である。

以下、Table 4.27 に記載した試験について、調べられた遺伝学的評価項目に従って、手短かに考察する。低レベルのベンゼン曝露に関する試験に重点を置いた。

染色体異常試験

染色体を解析した試験の大半において、各著者が、ベンゼンが陽性影響を生じたと判断できる所見が得られたと結論付けているが、陰性所見も報告されている (詳細は Table 4.27 参照)。しかし、方法論的に不備があることから、信頼性が十分に高い結論を導くことはできない。

平均で 10/20 ppm (32.5/65 mg/m³) までの低レベル曝露に関する試験は、特に重要である。このような用量範囲では、6 報の試験が陽性と判定し (Karacic *et al.* 1995; Major *et al.* 1994; Picciano 1979; Sarto *et al.* 1984; Sasiadek 1992; Tompa *et al.* 1994)、4 報の試験が陰性と判定している (Jablonicka *et al.* 1987; Jong *et al.* 1988; Tough *et al.* 1970; Watanabe *et al.* 1980)。

陽性という判断が出た試験でも、認められた影響は概して弱いものであった。Türkel and Egeli (1994) の試験でのみ、中程度の影響が認められた (異常細胞出現率が対照群の 0.8% に対し 7.1%)。しかし、この試験には、方法論的に大きな不備がある (曝露の定量化が為されていない、少なくとも他のベンゼン誘導体との共曝露がある、対照群が適切ではない)。

小核試験

小核の出現頻度を調べた 2 件の試験では、著者は、陽性の結果が得られたと結論付けている。Högstedt *et al.* (1991) の試験でも Liu *et al.* (1996) の試験でも、低濃度曝露群 (12 ppm 未満、39 mg/m³ 未満) において弱い影響が認められた。Liu *et al.* の試験では、より高濃度で曝露された 2 群 [12~60 ppm および 60 ppm 超 (39~195 mg/m³ および 195 mg/m³ 超)] において、小核の出現頻度は約 3 倍に増加した。両試験の信頼性は、方法論的な不備があるため、低いとされる (曝露データが乏しい、整合の取れた対照群の設定なし、Liu *et al.* の試験では小核の解析方法に関する記述がない)。

異数性試験

Ding *et al.* (1983) および Erdogan and Aksoy (1973) は、ベンゼン中毒による異数性誘発について報告している。しかし、この影響に関する定量データは示されていない。

グリコホリン A 遺伝子突然変異アッセイ

Rothman *et al.* (1995) は、高濃度のベンゼン(日常の平均濃度:72.2 ppm、235 mg/m³)に曝露されていた作業員の骨髄細胞を、グリコホリン A 突然変異アッセイを行って解析した。このアッセイで、広範な遺伝学的影響を検出できる(遺伝子突然変異、染色体突然変異、有糸分裂組換え)。整合のとれた陰性対照群と比較すると、作業員のグリコホリン A 遺伝子変異細胞の出現頻度は、2 倍であることが認められた。

SCE 試験

行われた SCE 試験のすべてが陰性、もしくは 1.1~1.3 倍の範囲で SCE 頻度が増加という結果であった。こうしたわずかな増加は、非特異的な細胞毒性(S 期の延長)に起因するものであり、DNA に対する直接的な影響によるものではないと考えられる。

SSB 試験(DNA 一本鎖切断)

Nilsson *et al.* (1996) および Popp *et al.* (1992) は、低濃度のベンゼンへの曝露による DNA 一本鎖切断(SSB)の誘発について報告している。両論文には、ベンゼンのピーク濃度が記述されておらず、共曝露(ベンゼン以外のガソリンの成分、トルエン)があったことが示唆されている。

Nilsson *et al.* の試験では、ベンゼンへの 8 時間曝露用量が、時間加重平均で 0.13 ppm〔範囲: 0.003~0.6 ppm、(0.42 mg/m³、範囲:0.01~1.95 mg/m³)〕であった。SSB はアルカリ溶出法により測定され、NAAC 値(溶出曲線より上の正規化された面積)を求めることにより定量化された。整合性を取った陰性対照群と比較すると、SSB 頻度は、曝露群において減少していた。しかし、交代制勤務の前と後の SSB 頻度を比較すると、1.25 倍の増加が認められた(ただし、この倍数は、交代制勤務前の対照群における値が、交代制勤務前の曝露群値と比べた時にどの位大きかったかを示す倍数と極めて類似している)。また、NAAC 値は、血液試料の貯蔵期間に強く依存して変化するが、この試験では、貯蔵期間が 0~59 日から 120~240 日までばらついており、この手法に固有の方法論的な問題が生じてしまっていた。交代制勤務の前後における変化は、方法論的に解決されていない制約の上に生じたもので、生物学的意義を持つものではないと推測される。

Popp *et al.* (1992) の試験では、ベンゼン曝露の平均値は 1.3 ppm (4.2 mg/m³) (範囲: 0.2~4.8 ppm) であった。SSB を間接的に定量するため、ポリカーボネートフィルターおよびポリビニリデンフィルターを用いて DNA 溶出速度を測定した。ポリカーボネートフィルターを用いた場合には、溶出速度は対照群に比べ統計的に有意な上昇を示したが、ポリビニリデンフィルターを用いた場合には、統計的有意差は認められなかった。

8-ヒドロキシ-デオキシグアニン試験

ベンゼンへの曝露が 8-ヒドロキシ-デオキシグアニン (8-OH-dG) 濃度に及ぼす影響について、Liu *et al.* (1996、リンパ球) および Nilsson *et al.* (1996、尿中濃度) が検討している。8-OH-dG は、酸化的 DNA 損傷の指標として用いられる。

Liu *et al.* の報告では、低濃度曝露群 [12 ppm (39 mg/m³) 未満] において酸化的 DNA 損傷の弱い増加 (1.3 倍増加)、高濃度曝露群 [12~60 および 60 ppm 超 (39~195 mg/m³ および 195 mg/m³ 超)] において明確な増加が認められた。こうした影響の生物学的意義については、現在も議論が続いている。曝露に関するデータが乏しく (ベンゼンのピーク濃度の記述なし、曝露期間の記述なし、少なくともトルエンおよびキシレンとの共曝露がある)、整合のとれた対照群が設けられていないことから、認められた影響をベンゼンへの曝露によるものと見なすことはできない。

Nilsson *et al.* (1996) の解析によると、曝露群の尿中 8-OH-dG 濃度 (μmol/mol クレアチニン) は、対照群に比べわずかに低下していた。さらに、8-OH-dG 濃度は交代制勤務の前後で差はなかったが、深夜および翌朝に 1.4 倍および 1.3 倍上昇することが認められた。尿の採取法については詳細に示されていない。著者による SSB の解析 (上記参照) と同様に、この場合も、認められた変化は、用いられた試験系で合理的に計測できる範囲を外れたところで捉えられている。

F 構造的に関連する物質/代謝物のデータ

フェノールは、*in vivo* でマウスの骨髄細胞に小核をわずかに誘発させる化合物である (Ciranni *et al.* 1988; McFee *et al.* 1991; Shelby *et al.* 1993)。しかし、そうした影響が現れるのは、一般毒性が示されるような高用量の場合に限られる。

ヒドロキノンは、*in vivo* で哺乳類に対し変異原性を示す。マウスに高用量を腹腔内投与すると、骨髄細胞に染色体異常や小核形成が誘発される (Xu and Adler 1990; Pacchierotti *et al.* 1991; Marrazzini *et al.* 1994)。さらに、染色体異常は、精原細胞および精母細胞においても誘発される (Ciranni and Adler 1991)。

カテコールおよび 1,4-ベンゾキノンは、マウスに腹腔内投与することにより骨髄細胞に小核形成を誘発するが、その作用は比較的弱い(Ciranni *et al.* 1988; Marrazzini *et al.* 1994)。

Witz *et al.*(1990)は、*trans,trans*-ムコンアルデヒドをマウスに1日に3回腹腔内投与し、当該化合物が *in vivo* で骨髄細胞に及ぼす影響を調べた。姉妹染色分体交換(SCE)が、3~6 mg/kg 体重の用量において誘発された。一方、小核を有する多染性赤血球(PCE)の出現頻度に影響はみられなかったが、用量3 mg/kg 体重以上では、PCEの割合が(正染性赤血球に比べ)低下した。

ベンゼン代謝物であるヒドロキノン、フェノールおよびカテコールの混合物の *in vivo* 変異原性を判定するため、Marrazzini *et al.*(1994)は、腹腔内投与によるマウス小核試験を実施している。2 つまたは 3 つの代謝物を各種濃度で混合するとさまざまな結果が生じ、小核(MN)誘発にも増高または低減が認められた。これら 3 種の代謝物を組み合わせた混合物では、遺伝毒性は、主にヒドロキノンおよびカテコールが担っていた。

4.1.2.7.3 結論

ベンゼンの変異原性については、広く検討されてきた。EHC report 150(1993)に記載されている *in vitro* データの概説には、細菌を用いた試験では主に陰性所見が、哺乳類細胞の培養試験では一様でない結果が得られたことが示されている。

ベンゼンは、哺乳類における *in vivo* 変異原であり、特に染色体異常および小核形成を誘発する。経口投与の場合、変異原性作用が認められる最低用量は、急性曝露および長期曝露とも約 25 mg/kg 体重であった(マウス小核試験)。吸入曝露により染色体に及ぼされる影響については、1件の報告では、低濃度 1 ppm(約 3.25 mg/m³)での単回曝露により、ラット骨髄細胞に小核形成が誘発されている。しかし、ラットで染色体異常を観察した複数の試験では、陽性所見は 100 ppm(約 325 mg/m³)以上の濃度(単回曝露)、または 10 ppm(32.5 mg/m³)以上の濃度(反復曝露)でのみ認められている。マウスについては、影響が認められる最低濃度として、10 ppm(約 32.5 mg/m³)が報告されている(単回曝露による小核形成)。

腹腔内投与試験の情報しか得られていないが、ベンゼンには、経胎盤性に遺伝学的影響を誘発する能力があるように思われる。

哺乳類の生殖細胞に対する変異原性に関しては、妥当なデータは、ごくわずかしき得られていない。マウスでは、精原細胞の染色体異常が、用量範囲 220~880 mg/kg 体重の経口投与により誘発される。マウスおよびラット優性致死試験からは、明確な結論は導き出せない。ヒトについては、*in vivo* におけるベンゼンへの曝露により、リンパ球に遺伝毒性影響

が誘発されることが、多くの公表文献で報告されている。しかし、曝露データが乏しく、方法論的に不備があることから、確定的な結論を導き出すことはできない。

全体的には、ベンゼンは、哺乳類およびヒトの体細胞に対し、*in vivo* で明らかに変異原として働く。生殖細胞に対する変異原性については、優性致死試験が行われているが、それからは明確な結論が得られなかった。精原細胞に対する染色体異常誘発能に関して陽性データが得られたこと、およびベンゼンの毒物動態学的特性に基づくと、ベンゼンは性腺に到達し、生殖細胞に突然変異を誘発する可能性がある結論付けられる。したがって、ベンゼンは、カテゴリー2の変異原物質に分類されるべきである。

Table 4.25 In vivo studies (somatic cells)

Test	Species (tissue)	Dose groups	Harvest time	Observations and remarks (include route of administration)
Oral administration				
Chromosomal aberration test	mouse (bone marrow)	88- 440 - 880 mg/kg	6 to 48 h	positive (Ciranni et al., 1991)
Chromosomal aberration test	rat (bone marrow)	up to 660 mg/kg	up to 24 h	positive (Fujie et al., 1992)
Micronucleus test	mouse (bone marrow)	26.6 to 146.6 mg/kg	2 - 8 - 14 days	positive (Au et al., 1990)
Micronucleus test	mouse (bone marrow)	25 to 600 mg/kg	4 to 24 months	positive (MacGregor et al., 1990)
Micronucleus test	mouse (bone marrow)	220 - 440 mg/kg	24 h	positive (Chen et al. 1994)
Comet assay	mouse (peripheral lymphocytes, bone marrow)	40 - 200 - 450 mg/kg	6 h	positive (Tuo et al., 1966)
Transplacental micronucleus test	mouse (fetal liver)	880 to 1760 mg/kg	24 h	positive (Harper et al., 1989)
Inhalation administration				
Chromosomal aberration test	rat (bone marrow)	10 to 60 ppm	2 weeks	positive (Fujie et al., 1992)
Chromosomal aberration test	rat (bone marrow)	1 to 1000 ppm		positive (Styles et al., 1984)
Chromosomal aberration test	mouse (lung macrophages)	0.1 - 1.0 ppm	6 weeks	inconclusive (Au et al., 1988)
Chromosomal aberration test	mouse (spleen lymphocytes)	0.04 - 1.0 ppm	6 weeks	inconclusive (Au et al., 1991)
Micronucleus test	rat & mouse (bone marrow)	rats, 0.1 to 30 ppm; mice, 10 to 1000 ppm		positive (Erexson et al., 1986)
Micronucleus test	mouse (bone marrow & blood)	1 to 200 ppm	1 to 8 weeks	positive (Farris et al, 1996)
Micronucleus test	mouse (bone marrow)	200 ppm	5 days	positive (no effect in cyp2e1 ^{-/-} mice; Valentine et al, 1996)
Gene mutation test	mouse (spleen lymphocytes)	0.04 to 1 ppm	6 weeks	equivocal (Ward et al., 1992)
Gene mutation test - transgenics	mouse (lung, spleen, liver)	300 ppm	12 weeks	positive (Mullin et al., 1995)
SCE test	rat & mouse (peripheral lymphocytes)	rats, 0.1 to 30 ppm; mouse, 10 to 1000 ppm		positive (Erexson et al., 1986)

Test	Species (tissue)	Dose groups	Harvest time	Observations and remarks (include route of administration)
<u>Intraperitoneal administration</u>				
Transplacental micronucleus test	mouse (fetal liver)	880 to 1760 mg/kg	24 h	inconclusive (Harper et al., 1989)
Transplacental micronucleus test	mouse (fetal liver)	109 to 874 mg/kg	21 h	positive (Ning et al., 1991)
Transplacental micronucleus test	mouse (fetal liver)	439 to 1318 mg/kg	40 h	positive (Xing et al., 1992)

Table 4.26 In vivo studies (germ cells)

Test	Species (tissue)	Dose groups	Harvest time	Observations and remarks (include route of administration)
<u>Oral administration</u>				
Germ cell chromosome aberration test	mouse (spermatogonia)	0.25 - 0.50 - 1.0 ml/kg (220 - 440 - 880 mg/kg)	up to 48 h	positive (Ciranni et al., 1991)
Germ cell chromosome aberration test	mouse (spermatocytes)	36.6 to 146.4 mg/kg	2 weeks	positive (Rithidech et al., 1987; abstract without detailed information)
Dominant lethal assay	mouse	1.0 - 4.0 ml/kg	up to 48 days	equivocal (GSF Bericht, 1977; also mentioned in Ehling et al., 1978)
Dominant lethal assay	mouse	Not given	5 weeks	negative (Feldt and Zhurkov, 1985; no detailed information on methodology and results)
<u>Intraperitoneal administration</u>				
Dominant lethal assay	rat	0.5 ml/kg	not given	negative (Lyon, 1975; cited in Dean, 1978; no detailed information on methodology and results))
Sperm abnormality test	mouse	0.4 to 1.0 ml/kg	5 days	positive (Topham, 1980)
<u>Inhalative administration</u>				
Dominant lethal assay	rat	1.0 - 300 ppm	10 weeks	equivocal (Biodynamics, 1981)

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
Clare 1984	N.I.	N.I.	N.I.	acute exp.	10	no	CAb SCE	neg neg	
Ding 1983	N.I. ^{*13}	N.I.	N.I.	6 (1-28)	21 ^{*17}	no	CAb Aneu	pos pos	N.I. N.I.
Erdogan 1973	N.I.(150-210) ^{*14}	N.I.	N.I.	long-term	13	no ^{*8}	CAb Aneu	pos pos	N.I. N.I.

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
Forni 1971a	N.I. ^{*13}	N.I.	N.I.	N.I.	25 ^{*18}	no ^{*15}	CAb	pos	1.89/1.22% (0.49/0.04) ^{*16}
Forni 1971b	N.I. (125-532)	N.I.	toluene	N.I. (<1-22)	10 ^{*17}	no ^{*15}	CAb	pos	1.66/0.62% (0.61/0.09) ^{*16}
Fredga 1979	0.08 (0.02-0.31)	N.I.	N.I.	N.I. (4-43)	9	no	CAb	inconcl	
	0.40 (0.01-4.13)	N.I.	N.I.	N.I. (4-25)	11	no	CAb	inconcl	
				N.I. (4-18)	12	no	CAb	inconcl	

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
Högstedt 1991	6.56 (0.33-22.80)	N.I.	N.I.	N.I. (0.1-12)	9	no	CAb	inconcl	0.53% (0.34)
	5.0-10.0	N.I.	N.I.	N.I. (2-14)	12	no	CAb	inconcl	
	0.31 (N.I.)	6.2	N.I.	N.I.	15	no	MN	pos ^{*3}	
Jablonicka 1987	N.I. (0.45-11.25)	N.I.	N.I.	N.I. (3-18)	66	no	CAb	neg	

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
Jong 1988	< 0.09 (<0.03-0.75)	N.I.	N.I.	N.I. (1-13)	32	no	CAb	neg	
Karacic 1995	8.0 (1.7-15.2)	N.I.	toluene	13.4 (2-31)	38	no no	CAb SCE	pos pos	0.55/0.16% (0.23/0.00) ^{*4} 7.2 (5.6)
	5.0 (1.9-12.8)	N.I.	toluene	17.7 (1-33)	45	no no	CAb SCE	pos neg	0.18 % (0.00) ^{*5}
Liu 1996	<12 (N.I.)	N.I.	toluene, xylene	N.I.	35	no	MN 8-OH-dG	pos pos	0.40% (0.26) 4.7 (3.7) ^{*10}
	N.I. (12-60)	N.I.	toluene, xylene	N.I.	24	no	MN 8-OH-dG	pos pos	0.80% (0.26) 26.1 (3.7) ^{*10}

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
	>60 (N.I.)	N.I.	toluene, xylene	N.I.	28	no	MN 8-OH-dG	pos pos	0.82% (0.26) 29.8 (3.7) ^{*10}
Major 1994	2.2 (0.3-14:7)	N.I.	N.I.	N.I.	42	yes yes	CAb SCE	pos pos	3.5% (1.6) 6.4 (5.6)
Nilsson 1996	0.13 (0.003-0.6)	N.I.	gasoline components	N.I.	33	yes yes	SSB 8-OH-	pos ^{*22} pos ^{*22}	

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
Picciano 1979	2.1 (N.I.)	N.I.	aromatic hydrocarb.	4.7 (0.1-26)	52	yes	CAb	pos	0.67/0.19% (0.35/0.06) ^{*7}
Popp 1992	1.3 (0.2-4.8)	N.I.	toluene	18 (3-N.I.)	20	yes	SSB SCE	pos pos	1.17/3.8 (0.95/3.4) ^{*2} 6.55 (6.05)
Sarto 1984	N.I. (0.2-12.4)	N.I.	N.I.	N.I. (3-35)	22	no	CAb SCE	pos neg	2.6% (1.9) ^{*11}

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
Rothmann 1995	72.2 (2.4-301.1)	N.I.	minimal	6.9 (0.7-16.5)	24	yes	gene- dupl ^{*9}	pos	13.9 (7.4) ^{*25}
Sasiadek 1989	<31 (N.I.)	N.I.	N.I.	N.I. (10-26)	33	no	CAb	pos	4.7% (1.7) ^{*12}
Sasiadek 1992	<10 (N.I.)	N.I.	organic solv.	N.I. (10-20)	56	yes	CAb	pos	2.7% (0.9) ^{*12}
Seiji 1990	50 (3-210)	N.I.	N.I.	5.5 (N.I.)	36	yes	SCE	neg	

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
Tompa 1994	N.I. (0.9-21.5)	N.I.	N.I.	N.I. (0-2)	10	yes	CAb	pos	2.5% (1.5)
							SCE	pos	6.6 (5.8)
				N.I. (2-10)	22	yes	CAb	pos	3.8% (1.5)
							SCE	pos	6.9 (5.8)
				>10 (N.I.)	17	yes	CAb	pos	3.0% (1.5)
							SCE	pos	6.4 (5.8)

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
Tough 1970	N.I. (25-150) N.I. (25-150) 12 (N.I.)	N.I. N.I. N.I.	N.I. N.I. N.I.	N.I. (2-16) N.I. (4-23) N.I. (2-26)	20*19 12*20 20	no no no	CAb CAb CAb	pos neg neg	1.5/1.0% (0.6/0.4) ^{*16}
Türkel 1994	N.I.	N.I.	b. derivatives	N.I. (5-50)	58	no	CAb	pos	7.1% (0.8)
Watanabe	N.I. (3-50)	177	N.I.	N.I. (2-12)	7 ^{*21}	no	CAb SCE	neg neg	

Table 4.27

BENZENE MUTAGENICITY: OVERVIEW ON HUMAN STUDIES WITH PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(N.I. = No information; pos = positive; neg = negative; inconcl = inconclusive)

Reference ^{*23}	Daily benzene concentration (ppm) mean (range)	Peak concentration	Co-exposure	Exposure period (years) mean (range)	No. of subjects	Matched negative control?	Genetic endpoint ^{*24}	Authors' conclusion	Quantitative effect (negative control)
	N.I. (0-9)	N.I.	N.I.	N.I. (1-20)	9 ^{*21}	no	CAb SCE	neg neg	
Yardley-J. 1988	N.I. (<1-10)	>100	N.I.	>5 (N.I.)	66	yes	SCE	neg	
Yardley-J.	N.I. (<1-10)	>100	N.I.	>5 (N.I.)	48	yes	CAb	inconcl ^{*6}	

Explanations

- *1 Urinary levels of DNA adduct 8-hydroxy-deoxyguanosine
- *2 Arbitrary units of DNA elution rate through polycarbonate/polyvinylidene fluoride filters
- *3 Positive in B-lymphocytes (stimulation with pokeweed mitogen) but negative in T-lymphocytes (phytohemagglutinin stimulation)
- *4 Acentric fragments/dicentrics, other types of aberration were negative
- *5 Dicentrics, other types of aberration were negative
- *6 1.6% in exposed group, 1.0% in controls; borderline using parametric statistical tests, significant with Fisher's exact test
- *7 Chromosome breaks/marker chromosomes, negative for chromatid breaks and abnormal cells

- *8 Number negative control group at all
- *9 Gene duplication
- *10 Number of 8-OH-dG per 105 dG
- *11 % aberrant metaphases incl. gaps (chromosome type aberrations excl. gaps: 1.1% (0.5))
- *12 Including gaps
- *13 Chronic benzene poisoning
- *14 10 out 13 subjects suffered from pancytopenia
- *15 Matched with respect to age and sex, smoking habit, however, not considered
- *16 Unstable/stable chromosomal aberrations
- *17 Analysis 10 or more years after exposure
- *18 Analysis 1 to 18 years after exposure
- *19 Analysis 2 to 3 years after exposure
- *20 Analysis 4 to 6 years after exposure
- *21 Analysis 0.5 years after exposure
- *22 Negative in comparing the exposed group with negative control group; however, positive in comparing exposed subjects before shift and after shift;
SSB (normalized area above the curve): 24.9 pre-shift, 31.3 post-shift; 8-OH-dG ($\mu\text{mol/mol creatinine}$): 0.72 pre-shift, 0.75 post-shift, 0.99 late evening, 0.90 next morning
- *23 For full citation see reference list
- *24 Aneu, aneuploidy; CAb, structural chromosomal aberrations; MN micronuclei; SCE, sister chromatid exchange;
SSB, DNA single strand breaks; 8-OH-dG 8-hydroxy-2-deoxyguanosine
- *25 Glycophorin A variant cell frequency $\times 10^{-6}$

4.1.2.8 発がん性

4.1.2.8.1. 発がん性/動物データ

化学物質の発がん性データに関する報告書より

ベンゼンのデータは、全てを Table 4.28 に要約した。

吸入曝露 - マウス

1980年、Snyder *et al.*は、C57Bl/6J マウスを 300 ppm (960 mg/m³) のベンゼンに約 70 週間吸入曝露したところ、悪性リンパ腫の発症が認められたことを報告している。AKR/J マウスを 100 ppm (約 325 mg/m³) のベンゼンに生涯曝露させた場合には、リンパ腫発生率の有意な上昇は誘発されず、悪性リンパ腫を認めたのは、対照群で 24/50 匹であったのに対し、投与群では 29/49 匹であった。いずれの系統のマウスでも、ベンゼン曝露により貧血およびリンパ球減少が生じたが、左方移動を伴う好中球増加、顆粒球性または骨髄球性の骨髄過形成、また、胸腺が関与するリンパ球性リンパ腫 6 例、形質細胞腫 1 例、および血球芽細胞による白血病 1 例は、C57Bl マウスの雄 40 匹の群においてのみ、報告されている。対照群の C57Bl マウス 40 匹では、2 匹のみが、胸腺が関与しないリンパ球性リンパ腫を発症している。

上記より後に行われた Snyder *et al.* (1988) の試験では、被験動物とした 2 系統のマウスにおいて、白血病/リンパ腫の発生率に、上昇は認められなかった。しかし、雄の CD-1 マウスおよび C57Bl/6J マウスを被験動物として、300 ppm (960 mg/m³) のベンゼンに 5 日間 (6 時間/日) 曝露して非曝露期間を 2 週間を設けるスケジュールで死亡するまで反復曝露させたところ、CD-1 マウスでは腫瘍 (総数)、悪性腫瘍および肺腫瘍の発生率が、また、C57Bl マウスでは Zymbal 腺腫瘍の発生率が上昇した。1200 ppm (3840 mg/m³) で 10 週間曝露後、死亡するまでを非曝露期間とした場合、腫瘍反応の生じ方は 2 系統で異なっていた。CD-1 マウスでは、腫瘍 (総数、悪性、良性)、肺腺腫および Zymbal 腺がんの有意な増加を示したが、C57Bl マウスでは、いずれのカテゴリーの腫瘍にも発生率上昇は見られなかった。

雌の C57Bl/6 BNL マウスを、300 ppm (960 mg/m³) で 16 週間 (6 時間/日、5 日/週) 曝露した場合には、累積死亡率の上昇が示された。対照群では 440 日齢から死亡し始めたのに対し、約 330 日齢で死亡が始まった。曝露群では、リンパ腫/白血病の発生率が上昇した。リンパ腫/白血病の総数は、対照群では 8/88 例 [胸腺新生物 (リンパ球性) 1 例、非胸腺新生物 (リンパ球性) 2 例、骨髄性白血病 3 例、白血病 (不特定:NOS) 2 例] であったのに対し、曝露群では 20/89 例 [胸腺新生物 (リンパ球性) 10 例、非胸腺新生物 (リンパ球性) 6 例、白血病 (NOS) 4 例] であった。Zymbal 腺および卵巣の腫瘍発生率が、対照群に比べ高いことも認められた。

(Cronkite *et al.* 1984, 1985)。

CBA/Ca BNL マウスを、100 ppm(約 325 mg/m³)または 300 ppm(約 974 mg/m³)のベンゼンに 16 週間(6 時間/日、5 日/週)曝露したところ、骨髄性新生物が、300 ppm(960 mg/m³)群の雄マウスの 19%、同群の雌マウスの 11%に生じた。対照群では雄 0%および雌 1.7%であった。対照群の雄では発生例が認められなかった骨髄性新生物は、100 ppm(320 mg/m³)群では雄の 2.4%に認められた(Cronkite *et al.* 1989)。

Goldstein *et al.*(1982)は、3 系統のマウス(AKR マウス 80 匹、C57Bl マウス 40 匹、CD-1 マウス 40 匹、性別および系統の詳細に関するデータなし)を、300 ppm(960 mg/m³)のベンゼンに、生涯曝露(6 時間/日、5 日/週)した。AKR マウス 50 匹からなる群をさらに 1 つ設け、100 ppm(320 mg/m³)で曝露した。曝露により、4 例に骨髄増殖性病変が生じた。300 ppm で曝露した CD-1 マウス 40 匹において、慢性骨髄性白血病 1 例、急性骨髄芽球性白血病 1 例、および顆粒球過形成 1 例が認められた。

Farris *et al.*(1993)の試験では、CBA/Ca 系統のマウスがベンゼンに曝露されたが、Cronkite *et al.*(1989)が報告している様な顆粒球性白血病の発生は確認できなかった。300 ppm(960 mg/m³)のベンゼンに曝露した CBA/Ca マウスの雄では、125 匹中 14 匹がリンパ腫(リンパ芽球性、リンパ球性、または混在)を発症した。このとき同等の条件で疑似的に(ベンゼンを使わず)曝露処置のみを施したマウス(シャム対照群)では、リンパ腫の発症は 125 匹中 2 匹のみであった。ベンゼンに曝露されたマウスでは、包皮腺扁平上皮がんのも発症も認められ(対照で 0%であったのに対し 60%)、肺腺腫の発生率も上昇した(対照で 14%であったのに対し 36%)。Zymbal 腺がんおよび前胃扁平上皮がんは、対照では 1 例および 0 例であったのに対し、ベンゼンに曝露されたマウスでは、14 例および 9 例が存在した(これらの器官の顕微鏡検査は、肉眼的病変が明確な場合のみ実施した)。ベンゼンへの曝露を受けたマウスでは、中等度～顕著な顆粒球過形成が見られ、その発生率は、シャム対照マウスでは骨髄 8%および脾臓 0%であったのに対し、それぞれ 36%および 6%であった。しかしこの知見は、包皮腺などで炎症が起きていたことを示す所見が認められていたことから、ベンゼンによる直接的な影響であるとは解釈されなかった。

吸入曝露 - ラット

上述の Goldstein *et al.*(1982)の試験では、Sprague-Dawley ラット(性別に関するデータなし)も被験動物とされ、100 ppm(320 mg/m³) (40 匹)ないしは 300 ppm(960 mg/m³) (80 匹)で、生涯曝露(6 時間/日、5 日/週)された。低用量群(100 ppm)で、慢性骨髄性白血病が 1 例認められた。

Maltoni (1982, 1983, 1985)が実施した一連の吸入試験では、妊娠 Sprague-Dawley ラット(13週齢成熟ラット)を対象に、妊娠 12 日目から 7 週間、200 ppm(約 649 mg/m³)で 1 日 4 時間、週 5 日の曝露、さらに 200 ppm で 12 週間、1 日 7 時間の曝露、続いて 300 ppm(約 974 mg/m³)で 85 週間、1 日 7 時間の曝露が行われた。出生仔に対し、12 日齢からその 15 週間後または 104 週間後まで、同様のスケジュールで曝露が行われた。全ての群について、150 週目まで観察が行われた。104 週間後の時点での死亡率は、胎仔期に曝露が開始され 104 週間続けられた動物において、より高値という結果が得られた。いずれの試験についても、統計データが報告されている。

104 週間までの長期曝露の場合、出生仔の雄の体重に軽微な影響が及んだことが様々な段階で確認された。主にリンパ球が減少したことによる白血球減少が、104 週間の曝露を受けた出生仔において、雌雄いずれにおいても顕著となった。試験開始後 150 週間の時点では、104 週間曝露群において、ベンゼンに起因する Zymbal 腺がん、口腔がん、鼻腔がん、皮膚がん、前胃がん、肝細胞がんの発生率上昇が認められた。

ベンゼン誘発性の Zymbal 腺がん、口腔がん、鼻腔がん、肝細胞がんの発生率上昇は、15 週間曝露され、その後 150 週間観察機関が設けられた出生仔においても、雌雄両方で認められた。

米国環境保護庁(EPA)遺伝毒性発がん性協議会(Nesnow *et al.* 1986)は、組織病理学的判定に用いられたスライドなど、これらの試験の生データについて再検討した。そして、この Maltoni の試験からは、結論は得られないと判定している(詳細な理由は述べられていない)。

試験デザイン、データの分析、および報告内容が、標準的な発がん性バイオアッセイ手法に沿ったものではないため、当該協議会が下した判定は、我々には妥当であると思われる。標的器官については他の試験と整合していることから、本リスク評価書の作成者は、Maltoni の試験データが、吸入経路でベンゼンが発がん性を示すことを裏付ける証拠を提示していると解釈している。

経口投与 - マウス

NTP の経口投与試験(NTP 1986; Huff *et al.* 1989)では、B6C3F1 マウスに、コーン油に溶解されたベンゼンが、25、50、または 100 mg/kg 体重/日の用量で 103 週間(5 日/週)経口投与されたが、やはり悪性リンパ腫の発生率上昇が報告されている。生存率は、用量依存的に低下した(雄:28/50、23/50、18/50、7/50、雌:30/50、26/50、24/50、18/50)。91 週目においては、マウスの生存率は全ての群で 60%を超えていたが、ベンゼンの投与を受け、103 週目より前に死亡したほとんどは、新生物を有していた。ベンゼンの投与を受けたマウスでは、雌

雄いずれにおいても、骨髄の造血細胞過形成が、発生率の上昇を伴って認められた。中用量群(50 mg/kg 体重/日)および高用量群(100 mg/kg 体重/日)の雄、ならびに高用量群の雌では、Zymbal 腺がんの発生率が溶媒対照群より高かった。これらの群では、Zymbal 腺における上皮過形成の発生率も上昇していた。ベンゼンを投与されたマウスの群の中には、雌雄いずれについても、前胃の扁平上皮乳頭腫や扁平上皮がん(合計)、過角化、および上皮過形成の発生率が一上昇していたものもあった。

ベンゼン投与に関係する影響は、肺、ハーダー腺、包皮腺、卵巣、乳腺、肝臓におけるものは、マウスでは認められたが、ラットでは認められなかった。マウスでは、中用量群および高用量群において、肺胞上皮過形成の発生率上昇が引き起こされた。高用量群の雄マウスでは、肺胞/細気管支がん、および、肺胞/細気管支腺腫や肺胞/細気管支がん(合計)の発生率上昇が認められた。高用量群の雌マウスでは、肺胞/細気管支腺腫の発生率上昇が認められ、中・高用量群の雌マウスでは、肺胞/細気管支がん、および、肺胞/細気管支腺腫や肺胞/細気管支がん(合計)の発生率上昇が認められた。ハーダー腺の限局性またはびまん性の過形成の発生率が、雄雌の各用量群において上昇した。雄マウスでは、いずれの用量の群においても、ハーダー腺腫の発生率が溶媒対照群より高かった。ハーダー腺腫やハーダー腺がん(合計)のわずかな発生率上昇が、高用量群の雌で認められた。雄マウスでは、ベンゼン投与により、包皮腺過形成および包皮腺扁平上皮がんの発生率上昇が引き起こされた。雌マウスでは、乳腺がんの発生率上昇が中用量群および高用量群に、また、乳腺がん肉腫の発生率上昇が高用量群に認められた。ベンゼンを投与された雌で、通常見られない様々な腫瘍性ないしは非腫瘍性の卵巣病変(乳頭状嚢胞腺腫、黄体腫、顆粒膜細胞腫、管状腺腫、良性混合腫瘍、上皮過形成、老年性萎縮)の発生率上昇がみられた。中用量群および高用量群の雌では、顆粒膜細胞腫および良性混合腫瘍の発生率が、溶媒対照群より高かった。肝細胞腺腫の発生率上昇が、低用量群の雌で、また、肝細胞腺腫や肝細胞がん(合計)の発生率上昇が、低用量群および中用量群の雌で認められた。著者は、NTP の定義に照らして、この 2 年間強制経口投与試験の条件下で、ベンゼンが雄雌の B6C3F1 マウスに発がん性を示することを支持する明確な証拠が提示されていると結論付けている。この試験で報告されている一般毒性作用については、4.1.2.6.1A において言及してある。

Maltoni は、Swiss 系統マウス(40 匹/性/群)および RF/J 系統マウス(雄 45 匹および雌 40 匹/群)を用いた試験で、0 ないしは 500 mg/kg 体重/日の用量で、それぞれ 78 週間および 52 週間の曝露を行った(Maltoni *et al.* 1989)。

Swiss マウスでは、ベンゼン投与により、悪性腫瘍の合計、乳腺がん、肺腫瘍、Zymbal 腺がんの増加が引き起こされた。乳がんの発生は、対照群の雌では 5%、対照群の雄では 2.5%であったのに対し、雌投与群では 47.5%で確認された。肺腫瘍は、対照群(雄 7.5%、雌 10%)に比べ、投与群の雄(42.5%)および雌(37.5%)では上昇していた。Zymbal 腺がんの

発生率は、雄 10%、雌 2.5%であり、対照群の発生例はなかった。

さらに、投与群の雄の 7.5%および投与群の雌の 10%が、Zymbal 腺の異形成病変を有していた。肝細胞がんが、投与群の雄でわずかに上昇していた(対照群の雄で 5%であったのに対し 7.5%)。肝血管肉腫は対照群での発生例は無かったが、投与群の雄では 2.5%に認められた。白血病の発症率については、Swiss 系統の場合、ベンゼン投与に起因する変化を認めなかった。

同様の条件下で RF/J マウスに 52 週間投与した場合、悪性腫瘍の合計発症率を始め、以下の腫瘍の発生率に上昇が認められた。乳がん(対照群の雌で 2.5%であったのに対し投与群の雌で 22.5%)、肺腫瘍(対照群の雄で 11.1%であったのに対し投与群の雄で 51.1%、対照群の雌で 7.5%であったのに対し投与群の雌で 45%)、白血病(NOS)(対照群の雄で 37.8%であったのに対し投与群の雄で 57.8%、対照群の雌で 35%であったのに対し投与群の雌で 60%)。

死亡率や上記以外の型の腫瘍の発生に関するデータは、報告されていない。結果は、腫瘍の発生率を要約した表にのみ提示されていた。

経口曝露 - ラット

ラットの 2 年間経口投与試験(NTP 1986; Huff et al. 1989)では、0、50、100、または 200 mg/kg 体重/日(雄)、および 0、25、50、または 100 mg/kg 体重/日(雌)の用量で投与が行われた。マウスと同様に、ベンゼンを投与された群では生存率の低下が認められた(雄:32/50、29/50、25/50、16/50 匹、雌:46/50、38/50、34/50、25/50 匹)が、60%の被験動物が、92 週目においてもなお生存していた。ベンゼンの投与を受けた群では、103 週目より前に死亡した被験動物のほとんどが、新生物を有していた。Zymbal 腺がんの発生率は、中および高用量群の雄、ならびに低、中および高用量群の雌では、溶媒対照群より高かった。ベンゼンは、ラットにおいて、皮膚新生物および口腔新生物の発生率上昇を引き起こした。高用量群の雄における、皮膚の扁平上皮乳頭腫および扁平上皮がんの発生率は、溶媒対照群より高かった。口腔の扁平上皮乳頭腫や扁平上皮がんは、あまり見られない型であるが、それら(合計)の発生率上昇が、低、中および高用量群の雌雄に認められた。過角化および表皮肥厚の発生率が、高用量群の雄において上昇していた。

Maltoni *et al.*(1989)も、Sprague-Dawley ラットおよび Wistar ラットにおいて、経口曝露によるベンゼンの影響を検討している。Sprague-Dawley ラットに、ベンゼンを 50 mg/kg 体重/日(雄 30 匹および雌 30 匹)、または 250 mg/kg 体重/日(雄 35 匹および雌 35 匹)の用量で、胃管により 52 週間(4~5 日/週)投与した。さらに、Sprague-Dawley および Wistar 系統ラットのそれぞれ雄 40 匹および雌 40 匹に、ベンゼンを 500 mg/kg 体重/日の用量で、104 週間

(4～5 日/週)投与した。104 週間試験の対照群は、Sprague-Dawley ラット雌雄 50 匹ずつ、および Wistar ラット雌雄 80 匹ずつとし、52 週間試験の対照群には、Sprague-Dawley ラット雄 30 匹および雌 30 匹を供した。

ベンゼンに 50 ないしは 250 mg/kg 体重/日の用量で 52 週間曝露された Sprague-Dawley ラットでは、それぞれ雌の 6.5%および 22.9%が Zymbal 腺がんを発症したが、対照群およびベンゼン投与群の雄における発症例は無かった。ベンゼンが 500 mg/kg 体重/日の用量で 104 週間投与された群では、Zymbal 腺がんが、Wistar ラットの 16%(雄 17.5%、雌 15%)、および Sprague-Dawley ラットの 42.5%(雄 45%、雌 40%)に認められた。

Sprague-Dawley ラットにおける白血病発生率は、52 週目の時点で、50 mg/kg 体重/日を投与されていた雌で 6.7%(雄 0%)であり、また、250 mg/kg 体重/日を投与されていた雄 11.4%、雌 2.9%が白血病を有していた。これらに対し、対照群での発生率は雌で 3.3%(雄で 0%)であった。500 mg/kg 体重/日で 104 週間の投与を受けていた場合の白血病発生率は、Sprague-Dawley ラットでは雄 2.5%、雌 7.5%(対照群:雄 6%、雌 2%)であり、Wistar 系統では雄 5%、雌 20%(対照群:雄 2.5%、雌 7.5%)であった。

Sprague-Dawley ラットでは、口腔がんが 250 mg/kg 体重/日投与群の雌の 5.7%に発生した(それ以外の用量の群および対照群では 0%)。Sprague-Dawley ラットにおける口腔がんの発生率は、500 mg/kg 体重/日投与群では、104 週目の時点で、雄では 52.5%、雌では 50%に上昇していた。これに比べ、Wistar ラットにおける口腔がん発生率は、雄で 5%、雌で 10%であった(対照群の雄で 2.5%)。

500 mg/kg 体重/日投与群の Sprague-Dawley ラットではまた、前胃上皮内がんの発生率が 15%であり、雄では浸潤がんの発生が 2.5%と報告されている(対照群 0%)。この群では、棘細胞腫および異形成の発生率が、雄で 25%、雌で 17.5%であった(対照群 0%)。Sprague-Dawley ラットの他の群、および Wistar ラットの群については、前胃新生物発生前病変および新生物病変に関するデータは報告されていない。

500 mg/kg 体重/日を投与されていた Sprague-Dawley ラットではまた、皮膚がんの発生率上昇(対照群で 0%であったのに対し 22.5%)、および肝腫瘍の発生率上昇が認められた。雄の 5%および雌の 7.5%が血管肉腫を有していたのに対し、対照群での発生例は無く、また、雄の 7.5%および雌の 2.5%が肝細胞がんを有していたのに対し、対照群では雄で 6%、雌で 0%であった。

鼻腔での腫瘍は、50 および 250 mg/kg 体重/日投与群には認められなかった。500 mg/kg 体重/日の用量でベンゼンを投与されていた Sprague-Dawley ラットでは、104 週目において、

EURAR: BENZENE

鼻腔がんが雄の 7.5%、雌の 2.5%に認められた(対照群 0%)。同じ用量を投与されていた Wistar ラットでは、鼻腔がんが雄の 5%および雌の 2.5%に認められた(対照群 0%)。

データは、要約の表にしか記載されておらず、また、生存率、ないしは腫瘍データの統計的有意性に関する情報は含まれていなかった。

Table 4.28 Data from carcinogenicity studies in experimental animals

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
Inhalation	mouse/C57Bl/6J (males) AKR/J (males)	300 ppm, 6hr/d,5d/w lifetime 100 ppm, 6hr/d,5d/w, lifetime	no	reduced median survival (41 vs 75 weeks in control) Ø	granulopoietic/myeloid bone marrow hyperplasia in C57Bl mice (13/32 animals without tumors)	8/40 animals with hematopoietic lymphoma (six lymphocytic lymphoma, one plasmocytoma, one hemocytoblastic leukemia) 2/40 control animals with lymphocytic lymphoma no increase of tumor rate of lymphomas (29/49 in treated animals, 24/50 in controls)	Snyder et al. 1980
	mouse/C57Bl/6J and CD-1 (males)	Intermitt.: 300 ppm, 6hr/d, 5d/w, 1 w interrupted by 2 weeks unexposed, until death	no	Ø	-	<u>C57Bl/intermittend</u> : tumor bearing animals (TBA): total TBA 25/54 vs 8/46 controls malignant TBA 24/54 vs 2/46 controls Zymbal gland carcinoma 19/54 vs 0/46 controls <u>CD-1/interrmittend</u> : total TBA 25/54 vs 4/46 controls malignant TBA 2/54 vs 1/46 controls lung adenoma 4/54 vs 3/46 controls <u>C57Bl/10 weeks</u> : no significant tumor response	Snyder et al. 1988

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
Inhalation		1200 ppm 6hr/d,5d/w, 10 weeks, untreated until death				<u>CD-1/10 weeks:</u> total TBA 45/71 vs 36/71 controls malignant TBA 24/71 vs 22/71 controls benign TBA.35/71 vs 21/71 controls lung adenoma 33/71 vs 17/71 controls Zymbal gland carcinoma 4/71 vs 0/71 controls	
Inhalation	mouse/ C57Bl/6 BNL (female)	300 ppm, 6hr/d,5d/w, 16 weeks, observation until death	no	increased	-	lymphomas/leukemia all types 20/89 vs 8/88 controls thymic lymphoma 10/89 vs 1/88 controls nonthymic lymphoma 6/89 vs 2/88 controls myelogenous leukemia 0/89 vs 3/88 controls leukemia NOS 4/89 vs 2/88 controls Zymbal tumors 16/89 vs 1/88 controls ovarian tumors 8/89 vs 0/88 controls	Cronkite et al. 1984, 1985
	mouse/C BA/Ca BNL	100, 300 ppm, 6hr/d,5d/w, 16 weeks, observation until death	no	increased at 100 and 300 ppm	-	<u>300 ppm: Myelogenous neoplasms</u> males: 19.3% vs 0% control females: 11% vs 1.7% control <u>100 ppm: Myelogenous neoplasms:</u> males: 2.4% vs 0% control	Cronkite et al. 1989

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
	mouse/ AKR, C57Bl, CD-1 (no data on sex)	6 hr/d, 5 d/w, lifetime AKR: 100 and 300 ppm, C57Bl and CD-1: 300 ppm	no	no data	CD-1 mice: granulocytic hyperplasia 1/40	<u>CD-1 mice:</u> chronic myelogenous leukemia 1/40, acute myeloblastic leukemia 1/40 vs none in control	Goldstein et al. 1982
	mouse CBA/Ca (males)	300 ppm, 6hr/d,5d/w, 16 weeks, observation until month 22 after start	no	increased	granulocytic hyperplasia in bone marrow (42/116 vs 9/117 controls) and in spleen (7/114 vs 0/116 controls)	malignant lymphoma 14/118 vs 2/119 controls lung adenoma 42/118 vs 17/119 controls preputial gland squamous cell carcinoma 71/118 vs 0/118 controls Zymbal gland carcinoma 14/125 vs 1/125 controls forestomach squamous cell carcinoma 9/125 vs 6/125 controls	Farris et al. 1993
inhalation	rat Sprague-Dawley (no data on sex)	100, 300 ppm 6 hr/d, 5 d/w, lifetime	no	no data	-	<u>100 ppm:</u> chronic myelogenous leukemia 1/40 vs none in control	Goldstein et al. 1982

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
Inhalation	rat/ Sprague-Dawley adult females and male and female 12-day embryos	pregnant females + male/ female offspring: 200 ppm, 4hr/d,5d/w, 7 week, then 200 ppm 7hr/d,5d/w, 12 week, then 300 ppm, 7hr/d,5d/w, 85 week	no	increased in offspring after 104 weeks of treatment	at week 118*: liver: nodular hyperplasias in 5/48 adult females (parent), 1/74 offspring male, 5/59 offspring females nodular dysplasia 2/59 offspring females versus none of each lesions was seen in controls	increase of tumor incidences at week 150**:. No. of animals with tumors were related to the No. of animals at study begin: Zymbal gland carcinoma: adult females (parent) 3/54 vs 1/60 controls offspring males 6/75 vs 2/158 controls offspring females 8/65 vs 0/149 controls oral cavity carcinomas: adult females (parent) 2/54 vs 0/60 controls offspring males 1/75 vs 0/158 controls offspring females 10/65 vs 0/149 controls nasal cavity carcinomas: adult females (parent) 1/54 vs 0/60 controls offspring males 1/75 vs 0/158 controls offspring females 2/65 vs 0/149 controls skin carcinomas: adult females (parent) 0/54 vs 0/60 controls offspring males 1/75 vs 0/158 controls offspring females 1/65 vs 0/149 controls forestomach carcinomas: adult females (parent) 0/65 vs 0/149 controls	Maltoni, 1982, 1983*, 1985**

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
Inhalation		male+female offspring: 200 ppm, 4hr/d,5d/w, 7week, then 200 ppm, 7hr/d,5h/d, 12 week, observation until death			at week 118*: liver: nodular hyperplasia 2/64 offspring males and 7/59 offspring females versus none in the controls	<p>offspring males 0/75 vs 0/158 controls offspring females 3/65 vs 1/149 controls</p> <p>hepatomas: adult females (parent) 1/54 vs 0/60 controls offspring males 2/75 vs 1/158 controls offspring females 7/65 vs 0/149 controls</p> <p>hemolymphoreticular neoplasia: adult females (parent): 0/54 vs 2/158 controls offspring males 6/75 vs 12/158 controls offspring females 0/65 vs 1/149 controls</p> <p>No. of animals with tumors were related to the No. of animals at study begin:</p> <p>Zymbal gland carcinoma: offspring males 4/70 vs 2/158 controls offspring females 1/59 vs 0/149 controls</p> <p>oral cavity carcinomas: offspring males 2/70 vs 0/158 controls offspring females 6/59 vs 0/149 controls</p> <p>nasal cavity carcinomas: offspring males 1/70 vs 0/158 controls</p>	

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
						offspring females 1/59 vs 0/149 controls hepatomas: offspring males 2/70 vs 1/158 controls offspring females 5/59 vs 0/149 controls	
oral (ga- vage) oral	mouse B6C3F1	0, 25, 50, 100 mg/kg bw/d	yes	decreased with increasing doses	hematopoietic marrow hyperplasia males: 11/48, 0/50, 25/49 vs 0/49 control females: 14/45, 8/ 50, 13/49 vs 3/49 control hyperplasia Zymbal gland males: 4/34, 12/40, 10/39 vs 0/42 control females: 1/32, 2/37, 6/31 vs 1/43 control	malignant lymphomas: males: 9/48, 9/50, 15/49 vs 4/49 controls females: 24/45, 24/50, 20/49 vs 15/49 controls Zymbal gland carcinomas: males: 1/34, 4/40, 21/39 vs 0/43 controls females: 0/32, 1/37, 3/31 vs 0/43 controls squamous cell papilloma or carcinoma (combined) of the forestomach: males: 2/42, 3/44, 5/38 vs 2/45 controls females: 3/40, 6/45, 5/42 vs 1/42 controls alveolar/bronchiolar carcinomas: males: 11/48, 12/50, 14/49 vs 5/49 controls females: 3/42, 6/50, 6/49 vs 0/49 controls alveolar/bronchiolar adenomas: females: 2/42, 5/50, 9/49 vs 4/49 controls alveolar/bronchiolar adenomas or carcinomas (combined):	NTP, 1986, Huff et al. 1989

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
oral					alveolar/bronch. hyperplasia: males: 3/48, 7/50, 10/49 vs 2/49 control females: 11/48, 12/50, 14/49 vs 1/49 control hyperplasia of preputial gland: males: 18/28, 9/29, 1/35 vs 1/21 control	males: 16/48, 19/50, 21/49 vs 10/49 controls females: 5/42, 10/50, 13/49 vs 4/49 controls Harderian gland adenomas: males: 9/46, 13/49, 11/48 vs 0/49 controls Harderian gland adenomas or carcinomas (combined): females: 6/44, 10/50, 10/47 vs 5/48 controls squamous cell carcinomas of preputial gland males: 3/28, 18/29, 28/35 vs 0/21 controls mammary gland carcinomas: females: 2/45, 5/50, 10/49 vs 0/49 controls mammary gland carcinosarcomas females: 0/45, 1/50, 4/49 vs 0/40 controls ovarian granulosa cell tumors females: 1/44, 6/49, 7/48 vs 1/47 controls overian benign mixed tumors females: 1/44, 12/49, 7/48 vs 0/47 controls hepatocellular adenomas: females: 8/44, 5/50, 4/49 vs 1/49 controls hepatocellular adenomas or carcinomas (combined) 12/44, 13/50, 7/49 vs 4/49 controls	

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
oral	rat/ F-344	males: 0,50,100, 200 mg/kg bw/d females 0,25, 50, 100 mg/kg bw/d	yes	increased with dose	-	Zymbal gland carcinomas: males: 6/46,10/42,17/42 vs 2/32 controls females: 5/40,5/44,14/46 vs 0/45 controls squamous cell papilloma of the skin: males: 2/50,1/50,5/50 vs 0/50 controls squamous cell carcinoma of the skin: males: 5/50,3/50,8/50 vs 0/50 controls squamous cell papilloma or carcinomas (combined) of the oral cavity: males: 9/50,16/50,19/50 vs 1/50 controls females: 5/50,12/50,9/50 vs 1/50 controls	NTP, 1986, Huff et al. 1989
oral	rat/Sprague-Dawley	50, 250 mg/kg bw/d, 4-5 d/w, 52 week 500 mg/kg bw/d, 4-5 d/w, 104 week	no	no data	SD: liver acanthomas and dysplasias: males: 25%, females: 17.5% control males and control females: 0%	<u>52 weeks:</u> Zymbal gland carcinomas: 50/males: 0% 50/females: 6.5% 250/males: 0% 250/females: 22.9% control/males: 0% control/females: 0% leukemia: 50/males: 0% 50/females 6.7% 250/males: 11.4% 250/females:2.9% control/males: 0% control/females 3.3% oral cavity carcinomas 250/males: 0% 250/females: 5.7%	Maltoni et al. 1989

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
oral		in Sprague-Dawley (SD) and Wistar (W) rats				<p>control/males: 0% control/females: 0%</p> <p><u>104 week: Zymbal gland carcinomas</u> SD-males: 45% SD-females 40% SD-control males: 2% SD-control females:0% W-males: 17.5% W-females: 15% W-control males:0% W-control females 0%</p> <p>leukemia: SD-males: 2.5% SD-females: 7.5% SD-control males: 6% SD-control females: 2% W-males: 5% W-females: 10% W-control males: 2.5% W-control females:7.5%</p> <p>oral cavity carcinomas: SD-males 52.55 SD-females: 50% SD-control males: 0% SD-control females:0% W-males: 5% W-females: 10% W-control males: 2.5% W-control females: 05</p> <p>forestomach carcinomas in situ: SD-males:0% SD-females: 15% SD control males: 0% SD-control females: 0%</p> <p>forestomach invasive carcinomas:</p>	

Route	Species	Study design	Study acc. to B.32 or B.33	Mortality rate	Hyperplasia related to tumor response	Tumor response	Reference
oral						SD-males:2.5% SD-females: 0% SD-control males: 0% SD-control females:0% skin carcinomas: SD-males: 22.5% SD-females:0% SD-control males:0% SD-control females 2% liver angiosarcomas: SD-males:5% SD-females 7.5% SD-control males: 0% SD-control females. 0% liver hepatomas: SD-males: 7.5% SD-females: 2.5% SD-control males: 6% SD-control females: 0% nasal cavity carcinomas: SD-males: 7.5% SD-females:2.5% SD-control males: 0% SD-control females:0% W-males: 5% W-females: 2.5% W-control males:0% W-control females:0%	

Ø no treatment-related effect NOS not other specified TBA tumor bearing animals

動物におけるベンゼンの発がん性のまとめ

幾つかの吸入曝露試験および経口曝露試験により、ベンゼンが動物において発がん性を示すという証拠が挙げられている。ベンゼンが誘発する発がん作用の標的器官は、動物においては造血系や上皮由来の様々な組織などであった。このことから、ベンゼンが動物に多種の腫瘍を誘発する能力を有する発がん物質であることが示唆される。標的器官は、適用経路に関わりなく、複数の試験わたり、同様であった。吸入試験では、造血系腫瘍が顕著に誘発され、特にリンパ腫が報告されてきている。マウスでは、発がん性の主要な標的細胞は、リンパ球であると思われる。リンパ腫は、マウスを用いた複数の試験において誘発されている (Snyder *et al.* 1980; Farris *et al.* 1993; NTP 1986; Cronkite *et al.* 1984, 1985) が、全ての試験でリンパ腫の発生率上昇が明確に示されたわけではない (Snyder *et al.* 1988)。さらに、腫瘍誘発反応は、マウスの様々な系統にわたって均一に示されたわけでもない (Maltoni *et al.* 1989)。

マウスでは、悪性リンパ腫の発生率上昇が認められたが、骨髄性白血病の誘発を報告したデータはほとんど存在しない。長期投与された RF/J マウスにおいて、白血病の発生率上昇が認められているが、主としてどのような細胞型のものであったかは明記されていない (Maltoni *et al.* 1989)。

マウスを用いた試験の中には、顆粒球系統の白血病誘発を示したものもある。しかし、骨髄性/顆粒球性白血病陽性を示したそれらの試験では、腫瘍誘発反応には有意差が無かったことが明らかにされている (Goldstein *et al.* 1982) か、陽性所見が再現できていない (Cronkite *et al.* 1989; Farris *et al.* 1993)。それどころか、ベンゼン投与後、骨髄性白血病の発生率低下が認められた試験もある (Cronkite *et al.* 1984, 1985)。

マウスでベンゼン誘発性のリンパ腫が認められたのとは対照的に、ラットの長期試験では、リンパ腫の発生率に及ぼす明確な影響は認められなかった。Fischer 344 ラットを用いた 2 年間経口投与試験では、リンパ系腫瘍の発生率上昇が誘発されず (NTP 1986)、また、Sprague-Dawley ラットおよび Wistar ラットを用いた Maltoni の試験では、報告内容に難があるものの、リンパ腫の発生率上昇は認められていない (Maltoni *et al.* 1989)。

ラットでは、Sprague-Dawley ラットや Wistar ラットをベンゼンに曝露した Maltoni の試験 (Maltoni *et al.* 1989) において、また、代謝物のヒドロキノンに関してラットで行われた試験 (Kari *et al.* 1992) において、白血病が対照群と比べて高頻度で認められた。さらに、Sprague-Dawley ラットをベンゼンに曝露した試験において、40 匹中 1 匹に慢性骨髄性白血病が認められたことが報告されている (Goldstein *et al.* 1982)。

経口投与による発がん性試験では、複数の器官において腫瘍の発生率上昇が示され、それらの一部は吸入試験で腫瘍が生じた部位と同じであった。造血系以外の部位でみられた腫瘍の種類は、多くが上皮由来型である。複数の系統のマウスにおいて、ベンゼンによる腫瘍の発生率上昇が認められた部位は、Zymbal 腺(Snyder *et al.* 1988; Cronkite *et al.* 1984; 1985; Farris *et al.* 1993; NTP 1986; Maltoni *et al.* 1989)、肺(Snyder *et al.* 1988; Farris *et al.* 1993; NTP 1986; Maltoni *et al.* 1989)、ハーダー腺(NTP 1986)、包皮腺(Farris *et al.* 1993; NTP 1986)、前胃(Farris *et al.* 1993; NTP 1996)、乳腺(NTP 1986; Maltoni *et al.* 1989)、および肝臓(Maltoni *et al.* 1989)であった。投与に関連した腫瘍の発生は、卵巣にも認められた(Cronkite *et al.* 1984, 1985; NTP 1986)。

マウスにおいてもラットにおいても陽性となった器官もあった。ラットでは、ベンゼン投与により腫瘍の発生率が上昇したのは、Zymbal 腺(NTP 1986; Maltoni *et al.* 1989)、口腔(NTP 1986; Maltoni *et al.* 1989)、前胃(Maltoni *et al.* 1989)、鼻腔(Maltoni *et al.* 1989)、および皮膚(NTP 1986; Maltoni *et al.* 1989)であった。

4.1.2.8.2. 発がん性/ヒトにおけるデータ

要約

高濃度のベンゼンに累積的に曝露されることと非リンパ性白血病発症との間に因果関係があるとみなすことについては、十分な科学的根拠がある。しかし、それを超えてベンゼンに曝露されると白血病のリスクが有意に増大するという閾値レベルの存在は、明確にされていない。

近年のデータ(Monash University, 2001)からは、急性骨髄性白血病および慢性リンパ性白血病(ただし、非ホジキンリンパ腫や多発性骨髄腫は除く)の発症リスクは、極めて低レベルのベンゼンへの曝露でも増大するという見解が裏付けられており、リスクに関する明確なカットオフ濃度は提示されていない。

それより前の調査[例えば Pliofilm[®] コホートから得られたデータを解析した Rinsky *et al.* (1981)の調査]では、白血病のリスクは、比較的低濃度のベンゼンへの曝露でも(いくつかの法的基準をごくわずかに超えただけでも)増大すると結論付けられている。Pliofilm[®] コホートを追跡調査し直し(1987 年まで)で、ベンゼンへの曝露状況の予測をやり直し、それに基づいたモデル化手法を用いて解析が行われた。そうして得られた近年の解析結果では、曝露の平均値が 40 年間にわたり 1 ppm 未満である場合、ベンゼンに起因する死亡率の上昇は、無視できるほどわずかであるとみなされた。これらの調査からは、閾値レベルの存在が示唆される。しかし、既存の疫学データでは、そうした曝露の閾値レベルを確立でき

ない。曝露量に関する上述の予測が承認された場合には、見直された(すなわちより高く見積もられた)曝露量の予測値を用いて、その Pliofilm[®] コホートの調査のデータを、上述の統計モデルにより、十分に説明できるようになる。ただし、そうして得られた結果は一般化に耐えるものではない。追加の大規模調査を行うことが、そうした結果や結論を補強するために必要である。ベンゼンへの曝露量を個々人について後ろ向きに予測する際、および交絡因子の可能性に関する情報を入手する際に、改良法があれば役立つであろう。最も古くに行われた調査における主要な欠点は、無差別的誤分類の問題を有していることである。こうした誤分類があると、曝露と疾患との間にどのような関係があっても減衰されてしまう。この様な誤分類が及ぼす影響については、その規模がどのくらいになるのかを予測したデータは、得られていない。

ヒトにおける疫学データ

Ott *et al.* (1978) は、594 名 (Dow Chemical 社 ミシガン地区) を対象に、後ろ向きコホート調査を実施した。対象者全体では、急性非リンパ性白血病 (ANLL) の症例数 ($n = 3$) が、予測値の 0.8 例に比べ、有意に多かったことが判明した ($p = 0.047$)。しかし、ベンゼン以外の化学物質 (例えばヒ素、アスベスト) に曝露された調査対象者が、標準化死亡比 (SMR) の算出から除外されていたかどうかは、不明確であるように思われる。また、総死亡率も疾患特異的死亡率も上昇していなかった。

一方、本研究は、対象者数が少ないことに難点がある。さらに、ベンゼンへの曝露量の予測値に関しては妥当性に議論の余地があり、曝露量の測定値のばらつきがきわめて大きい。平均曝露量は平均値を用いて予測され、より適切な曝露カテゴリーや中央値が用いられていない。交絡因子 (例えば喫煙、社会階級) の可能性は、検討されていない。

Rushton and Alderson (1981) は、34,708 名 (英国の石油精製所 8 ヶ所の従業員) を対象に、後ろ向きコホート調査を実施した。この調査では、白血病の SMR は有意に上昇しなかったが、悪性黒色腫、鼻腔および鼻洞の粘膜がんについては SMR が有意に上昇し、また、精製所の数カ所では腸がんの SMR の有意な上昇も認められた。社会経済的特性に関する調整を行うため、同年齢の一般集団における死亡率の地域差に照らして、SMR を調整した。

肺がんの SMR は有意に低かった。これは、調査対象集団における喫煙者の割合が、一般集団に比べ低かったことに起因していると考えられる。

しかし、この調査では、ベンゼンに限定された予測値は用いられていない。また、喫煙が負の交絡因子として影響を及ぼしていた可能性は排除できない。喫煙が白血病のリスクを増大させるとすれば、喫煙率が低かった調査対象集団における白血病の SMR は、過小評

価されていたということになる。(喫煙が白血病のリスクを増大させるという証拠は、いくつか得られている。ただし、この問題には、なお議論の余地がある。) この調査では、(地域ごとの死亡率を用いることにより)社会階級に関する調整を試みているが、この調整は不完全であった可能性がきわめて高い。SMR が上昇したいくつか種類のがんについては、その上昇が、社会階級に関するその他の交絡因子に起因している可能性がある。

Rinsky *et al.*(1981)は、748 名を対象に後ろ向きコホート調査を実施している。対象集団に組み入れる基準は、少なくとも 1 日、ベンゼンへの曝露歴があることとした。調査対象集団は、Pliofilm®コホート(オハイオ州のゴム工業の従業員からなる)であった。白血病による死亡は7名(全てANLL)で、SMRは560であった($p < 0.001$)。5年間以上曝露を受けていた者では、SMRは2,100であった。

1 日間よりはるかに長期間曝露されたと考えられる者のみを対象にした場合、ベンゼンに起因する白血病のリスクは、さらに高まる可能性がある。

この調査では、曝露量の予測方法が、極めて詳細に記述されている。著者は、結論として、ベンゼンには ANLL で見た場合発がん性があり、そのリスクは、「米国における現行の法的基準を大きく超えない範囲の曝露量」[当時の基準:8 時間時間加重平均(TWA)10 ppm]でも増大すると述べている。

曝露量の予測には、多大な努力がはらわれている。予測は、個別従業員ごとに作成された職務マトリックス、および各種職務に照らして区分した領域において繰り返し行われた測定(サーベイランス)に基づいている。しかし、ベンゼンの濃度は、体系的かつ定期的には測定されていない。著者は、慎重に曝露量の予測に取り組んでいるが、曝露の無差別的誤分類を回避できていない。作業領域によっては、曝露の平均値が、数年間で 1 度だけ行われた測定で得られたベンゼン濃度の値を外挿することにより予測されていることもあった。Pliofilm®コホートには、ベンゼン以外の化学物質への曝露(およびその結果生じる交絡作用の可能性)を無視できるという大きな利点がある。ただし、それ以外の喫煙や社会階級などの交絡因子の可能性については、そうした変数に関する情報が得られていなかったため、考慮することはできなかった。

これらのデータは、他の著者(Crump 1994, Paustenbach *et al.* 1992, Paxton *et al.* 1994a,b)により再度解析され、彼らは Rinsky *et al.*(1981)がベンゼンへの曝露による影響を実質的に過小評価していたと結論付けている。この結論に従うと、低濃度曝露での白血病のリスクが過大評価される可能性がある。Rinsky *et al.*(1981)は、彼らの新たな曝露量推定値を検討したが、自らの推定値を実質的に改訂することはしなかった。

この調査は、調査対象者数が比較的少ないことに難点があるが、長期間に及ぶ追跡調査が行われているという利点がある。

1987年、Rinsky *et al.* (1987)は、Pliofilm®コホート 1,165名を対象に、より長期に及ぶ追跡調査を行い、広範なデータを解析して公表している。この調査では、白血病(非リンパ性)によるとみなされた死亡数は9例で、SMRは337[95%信頼区間(CI):154~641]であった。また、多発性骨髄腫によるとみなされた死亡数は4例で、SMRは409(95% CI:110~1047)であった。

白血病のSMRは、ベンゼンへの(累積)曝露により有意に上昇する。この結果は、曝露量について異なった分類が行われた場合でも不変である。

このコホート内症例対照調査では、白血病1(死亡)症例あたり、年齢および雇用(曝露)開始が一致する対照10例が検討された。データは、条件付きロジスティック回帰法により解析された。最も整合性の良い(ベンゼンへの累積曝露量が曝露変数となり全体の曝露量を決める)モデルでは、白血病について、オッズ比 = $\exp(0.0126 \times \text{ppm} \cdot \text{年})$ の用量-効果(反応)関係が示されたが、曝露変数を二次項としたモデルでは、整合性が悪くなった。

採用したモデルが正しい関係を反映しているとする、白血病のリスクは、40年間にわたり平均10 ppmの曝露を受けていた場合には154倍、40年間にわたり平均1 ppmの曝露を受けていた場合には1.7倍増大すると考えられる。0.1 ppmの曝露では、白血病のリスク増大は生じないと考えられる。

しかし、このモデルでは、累積曝露を曝露期間と平均曝露濃度の積であると想定している。最も強力な発がん作用が示されるのは、短期間に極めて高度な曝露を受けた場合であり、累積曝露の場合ではないという想定については、可能性の考慮がなされていない。

著者は、曝露の評価は過大にではなく過小に行われたとみなしている。この想定は、妥当であるように思われる。なぜなら、ベンゼンの測定が主として、ベンゼンが高濃度であると推測される、“問題のある”領域で実施されたと考えられるためである。

この調査では、交絡因子の可能性は検討されなかった。

Paci *et al.* (1988)も、後ろ向きコホート研究(イタリアフィレンツェの靴職人、曝露期間:1953~1964年)を実施している。白血病(6例)全体のSMRは、400(95% CI:150~870)であった。SMRは曝露期間により上昇していない。ただし著者は、被験者数に関する情報を記述していない。さらに、曝露量の予測値の妥当性には疑いの余地がある(例えば、生産された靴の数、接着剤の量、空気循環の状況についての想定に関して)。

白血病の種類に関する情報は、記述されていない。交絡因子は検討されていない。

Yin *et al.*(1989)による後ろ向きコホート調査(中国における多施設共同調査)では、ベンゼンに曝露された調査対象者(28,460名)と非曝露対照者(28,257名)が最多となっている。白血病全体の SMR は 574(曝露コホートにおいて、白血病によるとされた死亡の 30 例中 23 例が ANLL 発症例)、肺がんの SMR は 231 であった。白血病の SMR は、曝露期間が 15 年になるまでは有意な上昇を示したが、それより長期間になると低下した。白血病による少数の死亡例が、比較的曝露の平均値が低い(6~10 ppm)、累積曝露が 50 ppm 以下の従業員にも認められた。曝露コホートでは、白血病の全症例に占める ANLL 発症例の割合が、一般集団の白血病症例に比べはるかに高かった。喫煙と白血病のリスクとの間には、関連が認められなかった。

残念ながら、曝露量を予測する方法に関する詳細な情報は記述されていない。白血病の症例と曝露を受けたその他の事例との間で、ベンゼンへの曝露量(平均および累積)に関する比較は行われていない。喫煙データは得られているが、その妥当性は明確でない。それ以外の交絡因子の可能性(例えば、ベンゼン以外の化学物質への曝露)は、検討されていない。

Hurley *et al.*(1991)は、英国のコークス工場またはコークス部門の作業員 6520 名を対象に、後ろ向きコホート調査を実施した。調査対象者の大半が低レベルの曝露しか受けていなかったため、SMR の上昇は認められなかった(白血病による死亡は 5 例認められた)。曝露量は、一部しか直接的な測定に基づいて求められておらず、曝露量の予測法には不明確さが残る。交絡因子は検討されなかった。

Cox and Ricci(1992)は、動物試験データに基づき、ベンゼンへの曝露と白血病との用量-効果関係を表すための数学的モデ化手法(最尤法)を公表した。低レベルの曝露では、非線形的な関係となることが示された。しかし、こうしたモデルを一般化してヒトにも適用できるのか否かについては、疑いの余地がある。

Rushton(1993)は、英国における複数の石油流通センターの従業員 23306 名を対象にした後ろ向きコホート調査について記述している。白血病の SMR は、ある 1 社の従業員の群および運転手の群で上昇していた。肺がんの SMR は低下していた。(このことは、コホートのメンバーが、一般集団よりも喫煙する傾向が低かったことを意味する。)

ただし、個人別の曝露量のデータは得られなかったか、或いは検討されなかった。こうした過去の調査の場合に見られる様に、ベンゼン以外の変数により交絡が生じ、影響が及んだ可能性は排除できない。運転手の群およびある 1 社の従業員の群で、なぜ白血病のリスクが増大したのかは不明確である。運転手の群で白血病の SMR が上昇したのは、彼らが

より高濃度のベンゼンに曝露されていたためかも知れない。ただし、別の原因(例えば、交絡)の可能性を排除することはできない。

Schnatter *et al.*(1993)は、カナダの石油流通販売業の従業員 6,672 名を対象に、後ろ向きコホート調査を実施した。ベンゼンへの曝露と白血病との有意な相関は、タンクローリー運転手の群(SMR 335、白血病による死亡 5 例)を除き、認められなかった。この結果は、Rushton(1993)の知見を裏付けるものとなっている。統計学的モデル化(Poisson 回帰)では、白血病と雇用期間との間に関連性は認められなかった。この解析においては、変数である社会経済的地位および雇用開始年は、交絡を生じる可能性のある因子として考慮されていた。しかし、この調査では、ベンゼンへの曝露量は正確には推定されていない。曝露状況は、3 つの(比較的大まかな)カテゴリー(曝露なし、毎日ではない曝露、毎日曝露)に基づいて、産業衛生士により分類された。全ての職務に関して完全なデータが得られたのは、従業員の約 50%に過ぎなかった。一部の従業員では、前職に関する情報を、総雇用期間に外挿しなければならなかった。このため、曝露の無差別的誤分類が問題になる可能性がある。その場合、曝露と疾患との真の関連が過小評価されると考えられる。残念ながら、運転手の群について、ベンゼンへの曝露に関する情報は示されていない。著者は、結論を導くことに慎重を期しており、この調査を、仮説を検証するためのものではなく、仮説を立案するためのものであるとみなしている。

Crump(1994)は、Pliofilm®コホートの追跡調査を 1987 年まで行い、そのデータを再度解析している。

この調査では、ベンゼンへの曝露と白血病との強い関連性、および明らかな用量-反応(作用)関係が確認されている。曝露量の推定値は Paustenbach *et al.*(1992)の論文に基づいており、それによる推定値は Rinsky *et al.*(1987)のものより大幅に高かった。用量-反応(作用)関係について、最尤法を適用してモデル化を行った。このモデルは、2 次の用量-反応関係を想定した場合に、最も整合性が良くなった。このモデルでは、曝露強度の方が曝露期間より重みを有していた。このモデルが実際の状況を反映しているとする、45 年間にわたり平均 1 ppm で曝露を受けた場合、ベンゼンに起因する白血病による死亡者は、曝露を受けた者 1000 名当たり 0.02~0.036 名増えることになると考えられる。上記で Rinsky *et al.*(1987)が用いた線形の用量-反応関係モデルでは、ベンゼンに起因する死亡は、曝露を受けた者 1000 名あたり 1.6~3.1 名増えると推定されている。

ただし、原則として、統計学的モデルの質は、使用されるデータの質に左右されるものである。ベンゼンへの曝露に関するデータは、推定値に基づいているが、それらは、もっと良い方法で再確認することができない過去の測定値に基づいていることから、妥当性が不明確である。Rinsky *et al.*(1987)による過去の推定値よりも、Pliofilm®コホートに関して導

出されたより新たな曝露量の推定値の方が妥当であるかどうか、なお疑いの余地がある。Crump(1994)が公表したモデルは、著者の分析データについて、最良の説明をしていると考えられる。しかし、このモデルは(様々な曝露推定値が存在する)単一コホートのものであり、他の調査対象集団で確認を取らない限り、一般化できない。こうした結果に基づくと、2 次の用量-反応関係が存在し、これまでの考えどおり、低濃度の方が曝露による白血病のリスクが低くなるという仮説が立てられる。この仮説は、生物学的にも妥当であると思われる。ただし、この結果は、やはり低レベルの曝露を受けていたコホートを対象とした他の試験により、確認されなければならない。現時点では、得られているデータからは、普遍的な結論を引き出すことはできない。

Paxton *et al.*(1994a)は、ベンゼンへの曝露を受けていた従業員 1,212 名からなり 1987 年までの追跡調査を受けていた Pliofilm® コホートについて、Rinsky、Crump/Allen、および Paustenbach が公表した 3 種類の曝露量推定値を取り上げている。The estimates of the latter t: Crump/Allen および Paustenbach による推定値は、Rinsky による推定値より大幅に高い(皮膚曝露を考慮に入れていること、1 週間当たりの就業時間の変動などに起因)。この 2 者の推定値は、白血病の患者(死亡例)において 3~5 倍高く、白血病でない従業員では 2~4 倍高い。3 種類いずれの推定においても、用量-反応曲線に有意な上昇が認められる。

曝露用量に応じて白血病で死亡する例数がどのように変化するかを調べた分布図によると、死亡例は累積曝露量が 1 ppm・年を超えると生じ始め(Rinsky の報告にある 2 例を除く)、大半の死亡例では累積曝露量が 10 ppm・年を超えている。

しかし、この様に新たに求められた曝露量推定値は、Utterback and Rinsky(1995)から反論され(例えば皮膚曝露の過大評価)、当初の推定値はほとんど修正されることがなかった。Paxton *et al.*の結論では、50 ppm・年という曝露量の閾値が存在するとされている。こうした想定について、データからは十分な証拠が示されていない。データからは、50 ppm・年を超える曝露により、白血病のリスクが有意に増大するという仮説は支持される。しかし、この知見から、50 ppm・年未満の曝露では、全くリスクが増大しないと結論付けることはできない。さらなる試験や調査により検討を行うことが必要となる仮説しか立てられない。Crump(1994)や Paustenbach *et al.*(1992)の曝露量推定値を用いた場合、曝露量が 5 ppm・年より多く 50 ppm・年以下の範囲では、SMR は 330(Crump)ないしは 180(Paustenbach)となり、対象者の数が大きい集団でみれば統計的に有意となる。

著者は、この調査が、このように曝露と影響との関連性を検出する力が不足している可能性について認識している。

また、Paxton *et al.*(1994b)は、比例ハザードモデルを用いて、対象者を多くして検討した

Pliofilm®コホート(1987年までの追跡調査)のデータについて、統計学的モデル化を実施した[Rinsky *et al.*(1987)によるコホート内症例対照調査と同じマッチング基準を適用]。

この論文では、適切な統計学的手法が用いられているように思われる。しかし、この場合も、統計学的解析の質は、得られているデータの質に大きく左右される。

したがって、最も適切に推定された用量-反応関係に基づいて白血病での死亡数がベンゼンによりどの位増えるかを算出すると、ベンゼンへの累積曝露が 45 ppm・年の場合、1000 名当たり、0.3~0.5 名となる。

1995 年、Wong and Rabe は、石油産業労働者(ベンゼンへの曝露量の平均値は低いとされる)の 19 ヶ所のコホートについてメタ分析を実施し、白血病のリスクを算出した。このメタ分析では、観察的調査に付き物の問題が全て内包されている。分析の対象となる労働者の選定基準は事前に定義されておらず、そのため、様々な調査の質に関する情報は示されていない。特に、それぞれの試験について曝露量を推定するために用いられた方法が適切であったかどうかを判断するのに役立つ情報が与えられておらず、すなわち、曝露量の平均値を算出するための基準が提示されていない。一部の調査では、曝露を受けた者と曝露を受けていない者が(曝露を受けたとして)足し合わされていたため、ベンゼンが影響を及ぼす能力が低く見積もられていた。ANLL についての SMR は、対照の SMR の 0.96 倍であった。この対照が適切であるかどうかは不明確である。残念ながら、この点は、考察に取り上げられておらず、明確にされなかった。この値の 95%信頼区間は、検討した調査に同等性があると想定して算出されているが、実際はその同等性はかなり疑わしい。問題はベンゼンが影響を示すことを証明するのではなく、影響を示さないことを証明することにあることから、99%信頼区間の方が適切であると考えられるが、その適否については検討されていない。こうした欠点があるため、このメタ分析の結果は、慎重に解釈されなければならない。データの非同等性が考慮され、95%信頼区間ではなく 99%信頼区間が算出されていた場合、症例数に関する信頼限界は、Wong and Rabe(1995)の論文に示されたものより、はるかに広がっていたものと考えられる。

Ireland *et al.*(1995)は、4,091 名(低曝露~中曝露の大規模化学工場、米国イリノイ州)を対象に、後ろ向きコホート調査を実施した。ベンゼンへの曝露を受けていた従業員の SMR は、白血病全てでは 230(95% CI:70~940)、ANLL のみでは 270(95%CI:30~1000)であった。対象者の中で曝露を受けていたのが 666 名と、集団の規模が小さく、また曝露量の推定値にはやはり疑念がある(詳細な曝露データが提示されていない)。さらに、交絡因子の可能性も検討されていない。

Rushton and Romaniuk(1995) は、英国の石油流通販売業の労働者(ほとんどが低濃度曝露)

を対象に、コホート内症例対照調査を実施した。白血病 91 例 (ANLL 32 例) が報告され、条件が整合する対照はそれらの各症例につき 4 例であった。オッズ比 (ANLL) は、4.5~45 ppm・年累積曝露群と 4.5 ppm・年未満累積曝露群との比較では、2.8 (95% CI: 0.8~9.4) であった。この結果は、統計的に有意ではない。ただし、高濃度のベンゼンに短期間で曝露を受けた者では、有意性が認められた。白血病の SMR は、運転に携わっていた労働者群では上昇していた (全ての白血病: 125、ANLL: 155) が、有意ではなかった。

また、曝露を受けていたとされる群の一部では、白血病の症例が少なかった。そのため、信頼区間が広くなり、回帰モデルへの適合性が悪くなる。ベンゼン曝露をカテゴリー変数または定量的変数として用いても、一貫性のある結果は得られない。

この調査では、交絡因子の可能性のある喫煙についてのデータが収集されている。しかし、データは、明らかに不完全であるか、詳細が不十分である。ベンゼンへの曝露と白血病との関連性は、曝露量について無差別的誤分類が為されているため、過小評価されていた可能性がある。

Schnatter *et al.* (1996) による、カナダの石油流通業の労働者を対象にしたコホート内症例対照調査では、白血病による死亡は 14 例で、各症例につき、整合する対照は 4 例であった。ベンゼンへの累積曝露と白血病、非ホジキンリンパ腫、または多発性骨髄腫との間には、有意な関連は認められなかった。曝露濃度は、企業内の記録などから産業衛生士により推算された。しかし、曝露量および交絡因子の可能性のある喫煙歴について、無差別的誤分類が為された可能性が高い。喫煙データは、労働者が勤務していた企業内の医療記録のみから得られている。

この調査は、対象者数が比較的少ないことから、曝露と影響の関連性を検出する力に限界がある。

Hayes *et al.* (1997) は、最近終了した疫学調査の中で、ベンゼンへの曝露の程度とリスクのレベルとの関係について検討している。

1972~1987 年に中国 12 都市の工場 632 ヶ所で雇用された作業員からなる、ベンゼンへの曝露を受けていた者 74,828 名、受けていない者 35,805 名のコホートを認定し、追跡調査を行って、血液腫瘍および関連疾患の発生率を測定した。ベンゼンへの曝露量の推定値は、作業歴および入手可能な過去のベンゼン濃度測定結果から導出した。作業員の数、工場の数、および調べた都市の数が多いことから、きわめて多様な環境条件が提示される。過去に 10 ppm 未満の平均濃度でベンゼンに曝露されていた作業員の場合、血液腫瘍すべてを併せた相対リスク (RR) は 2.2 [95% 信頼区間 (CI) : 1.1~4.2]、また、急性非リンパ性白血病

(ANLL)と関連する骨髄異形成症候群(MDS)とを併せた RR は、3.2(95% CI:1.0~10.1)であった。25 ppm 以上の一定レベルでベンゼンに職業曝露されていた作業員では、急性非リンパ性白血病と関連する骨髄異形成症候群とを併せた RR は、7.1(95% CI:2.1~23.7)であった。ベンゼンへの曝露期間が 10 年以上の作業員は、非ホジキンリンパ腫発症の RR が 4.2(95% CI:1.1~15.9)であり、非ホジキンリンパ腫の発症は、診断までに 10 年間以上曝露されていたことと非常に強く結びついていた。これらの知見から、近年に受けたベンゼンへの曝露の量は、その後に ANLL/MDS を発症するリスクの予測因子となることが示唆される。対照的に、非ホジキンリンパ腫とは、近年に受けた曝露の量は、弱い結びつきを示すに留まった。

オーストラリアでは、大規模な前向きコホート調査により、石油産業労働者の健康について評価が実施されている(Health Watch, 2000)。この調査は、石油産業に 5 年間以上従事していた 17,525 名を対象としている。この調査では、白血病すべてを併せた発生率について、統計的に有意な上昇が認められた。そのリスクは、炭化水素全般を合わせた曝露量と相関している。リンパ球造血系のがんとベンゼンへの曝露との関係は、その後に行われたコホート内症例対照調査で検討された(Monash University, 2001)。この症例対照調査では、リンパ球造血系のがん 79 例(白血病 33 例、非ホジキンリンパ腫 31 例、多発性骨髄腫 15 例)が対象となった。白血病は AML 9 例、慢性骨髄性白血病(CML)6 例、急性リンパ性白血病(ALL)2 例、CLL 11 例、およびそれ以外の種類 5 例であった。個々人の曝露推定値は、18 種類の職務グループ別に求められた。この調査における曝露量推定値は、ベンゼンの白血病誘発作用に関して実施された過去の職業曝露調査よりも多くの実測値に基づいていることから、信頼性が高いと考えられる。がんと曝露に関する様々な測定項目(累積曝露、曝露期間、曝露強度、曝露開始日、曝露に「ピーク」状態があった場合の影響)との間の関係が明確化された。生涯累積曝露量は、大半の労働者では少なかった(0.005~57.3 ppm・年、平均:4.9 ppm・年)。85%近くの労働者で曝露量が 10 ppm・年未満であったのに対し、40 ppm・年を超える曝露を受けていた労働者は 3.6%に過ぎなかった。曝露強度の平均値は、98%の労働者で 1 ppm 未満であった(範囲:0.001~2.07 ppm)。リンパ球造血系のがんの総発生率には、ベンゼンへの曝露の合計量と強い関連が認められた。8 ppm・年以上の曝露を受けていた群では、平均オッズ比(OR)が 3.32 であった。診断されるまでに 5~15 年間曝露されていた群には、影響との最も強い関連性が認められた。曝露を受けたのが最近の 5 年間以内の群では、曝露による影響はごくわずかに留まった。雇用期間や雇用開始日とは無関係であった。16 ppm・年以上の曝露の場合、白血病とだけ極めて強い関連が認められ、OR は約 35 であった。雇用期間や雇用開始時期とは無関係であった。白血病のサブタイプである AML(すなわち ANLL)および CLL は、曝露に強く関連した増加が認められた。慢性骨髄性白血病およびそれ以外の種類の白血病[非ホジキンリンパ腫(NHL)や多発性骨髄腫]には、曝露に関連した増加は認められなかった(Monash University, 2001)。

結論:分類および表示

疫学調査においてがん原性の証拠が示され、かつ実験動物試験で裏付けデータが得られており、それらの十分な重み付けに基づくと、ベンゼンはヒトに対し発がん性があるとみなされる。

危険物質の分類および表示に関する EEC 基準により、ベンゼンは既に「カテゴリー1 の発がん物質」に分類され、「T, R45:がんを引き起こすおそれがある」の表示に相当するとされている。この分類および表示は確定済みである。

4.1.2.9 生殖毒性

生殖能力の障害

動物データ:

雌ラットを対象にした、吸入による受胎能試験 1 報が入手可能である。この試験は、米国石油協会および米国化学製造業者協会の名で Bio/dynamics 社が実施し、そのデータは Kuna *et al.* (1992) が公表している。この試験では、雌の Sprague-Dawley ラットが、1、10、30、ないしは 300 ppm (約 3.3、32.5、97、ないしは 974 mg/m³) の濃度のベンゼンに、交配前と交配期を合わせた期間 (10 週間)、妊娠期間中、および出産後 21 日目までの授乳期間中曝露 (6 時間/日、5 日/週) した。5 群が設けられ、各群は、雌 26 匹および生殖可能であることが証明されている雄 13 匹で構成された。被験動物は、最初の 1 週間は 1 ケージ当たり 2 匹で飼育され、2 週間目は個別に飼育された。交配前期間には、曝露期間中および非曝露期間中ともラットは個別にケージに入れられた。交配に当たっては、1 ケージあたり雄 1 匹および雌 2 匹を収容した。雌は、妊娠期間中や分娩時は個別に、授乳期間中は同腹仔と一緒に飼育された。全ての群の雌に対して、チャンバー内における曝露を、交配前期間と交配期を合わせた期間の 10 週間 (6 時間/日、5 日/週)、ならびに妊娠期間の 0~20 日目および授乳期間の 5~20 日目 (1 日 1 回) に実施した。投与が発情に影響を及ぼすかどうかを判断するため、各雌について、交配開始 2 週間前から、1 日 1 回膣スミアを作製して検査した。死亡の有無や肉眼的な臨床徴候を調べるため、雌の観察を 1 日 2 回実施した。この試験全体を通じ、週 1 回詳細な身体検査を実施した。交配期間終了まで、週 1 回体重を記録した。交配期間後は、雌の体重を、妊娠期間 0、7、14、および 21 日目、ならびに授乳期間 0、4、14、および 21 日目に測定した。仔動物について、計数、体重の測定および性別の判定を、授乳期間 0、4、14、および 21 日目に行った。同腹仔の観察を 1 日 2 回実施した。授乳期間 4 日目に、11 匹以上の同腹仔から無作為に選別し、可能な限り雌雄同数として、10 匹に

間引いた。死亡した仔動物については解剖を行い、体重の測定および性別の判定を実施した。雌親全てについて、肉眼的剖検を行った。子宮に着床部位が存在することを確認し、また着床数を調べ、卵巣と共に 10%中性緩衝ホルマリンで固定して保存した。授乳期間中に死亡が認められた仔動物および授乳期間 21 日目に達して屠殺に供された仔動物全てについて、肉眼剖検を行い、体の内部の検査による性別の判定などを実施した。授乳期間中に死亡した仔動物については、胃における母乳の有無についても確認した。肝臓、腎臓、雄の精巣の重量を、仔動物ごとに記録した。各腹仔の雌雄 2 匹ずつから 33 の器官や組織および全ての異常病変を採取し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、後の組織病理学的検査用に保存した。授乳期間 4 日目より前に死亡が認められた仔動物は、70%エタノールに保存した。

最高濃度の 300 ppm の場合を含め、母動物の体重および体重増加には影響がなく、また、妊娠した動物の割合、平均妊娠期間、同腹仔数、同腹仔の大きさ、仔および離乳仔の生存能の測定結果から、受胎能にも有害影響が及ばなかったことが確認された。30 および 300 ppm の場合には、授乳期間中における仔動物の平均体重が低い傾向が認められ、また、出生後 21 日目における臓器重量(精巣、肝臓、腎臓)の平均値も少ない傾向が認められた。しかし、これらの低減は、1 項目(300 ppm における雌の仔動物の肝臓重量低減)を除き、対応する対照値との統計的有意差を示さなかった。投与に関連する影響は、授乳期間中の仔動物の生存データにおいても、出生後 21 日目におけるこれらの仔動物の肉眼的剖検においても認められなかった。

Gofmekler(1968)の試験では、雌ラットを対象に、約 $1\sim 670\text{ mg/m}^3$ (0.3~210 ppm)の範囲の 6 段階の濃度設定で、ベンゼンへの曝露が実施された。曝露は、雄と同居前の 10~15 日間、および同居後 3 週間(妊娠期間)に連続で行われた。新生仔が全く得られないという現象が、210 ppm で曝露された雌ラットで認められたが、これより低い 3~20 ppm の曝露濃度では認められなかった。雌親の臓器重量には、すべての曝露濃度でばらつきが認められたが、新生仔の体重への有害影響や奇形の誘発は報告されていない。濃度 210 ppm で認められた観察結果が、交配の失敗、不妊、受精卵の初期着床前死亡のいずれに起因したかは不明である。こうした評価不能な点があり、また記述内容が極めて乏しいことから、この試験は有害性を評価する目的に妥当であるとはみなされない。

生殖器に毒性が示される可能性に関しては、亜慢性吸入試験から情報を入手することができる(4.1.2.6 参照)。Ward *et al.* (1985)の試験では、各群雌雄 150 匹ずつの CD-1 マウスおよび各群雌雄 50 匹ずつの Sprague-Dawley ラットが、1、10、30、ないしは 300 ppm(約 3.3、32.5、97、ないしは 974 mg/m^3)のベンゼン(純度 99.9%超)蒸気に、13 週間曝露された(チャンバー内における全身曝露、6 時間/日、5 日/週)。同数のマウスおよびラットで追加の群が設けられ、対照群として、同様の条件下で濾過した空気に曝露された。試験全体を通じ、

被験動物が死亡したり瀕死状態に陥ったりしていないかを、各曝露の前後の1日2回、また非曝露日にも1日2回観察した。週1回の間隔で、被験動物における毒性の徴候を観察し、体重を測定し、また個体別の体重を記録した。試験7、14、28、56、および91日目には、ラットでは各群雌雄10匹ずつマウスでは各群雌雄20匹ずつを無作為に選択し、血液試料を採取して、全项目的に血液学的検査および臨床生化学的検査を実施した。別に用意したラット10匹およびマウス30匹から、試験開始1日前に臨床病理解析用に血液を採取した。7、14、28、56日目に中間屠殺、および91日目に最終屠殺を行い、その際、ラットは各群雌雄10匹ずつ、マウスは各群雌雄20匹ずつが無作為に選択された。これらの動物すべて、および試験中に死亡が認められた動物または瀕死状態で屠殺された動物を対象に、詳細な剖検が実施された。生殖器に関しては、各時点で剖検された動物それぞれについて、精巣の絶対重量および精巣/最終体重比が測定された。加えて、各屠殺時点で剖検された動物それぞれから、精巣または卵巣、前立腺または子宮、および乳腺が採取され、組織固定に供された。マウスとラットの両動物種とも、対照群および高濃度(300 ppm)群から各屠殺時点で得られた切片は、組織病理学的検査に供された。マウスでは、91日目の最終屠殺時に屠殺した全ての濃度群の全ての被験動物について、精巣および卵巣の顕微鏡検査を行った。マウスおよびラットいずれの動物種においても、臨床観察所見および平均体重データに、曝露に関連した一貫性のある明確な傾向は、認められなかったと報告されている(データの提示無し)。マウスの300 ppm群では、赤血球数、白血球数、血小板数、ヘモグロビン、骨髓球系/赤芽球系比、およびヘマトクリットの低減といった、血液学的変化が生じた。また、大腿骨骨髓形成不全、脾臓における髓外造血、胸腺萎縮が認められたことが報告されている。生殖器に関しては、300 ppm群で、28、56、および91日目に屠殺された被験動物における精巣の平均絶対重量の減少、および59、91日目に屠殺された被験動物における精巣の平均相対重量の減少が、統計的に有意にかつ曝露時間依存的に認められた(データの提示なし)。同じ濃度群で、生殖器の組織形態的变化が、91日目に屠殺された雄マウスにおいて報告されている(軽度~中等重度の両側性の萎縮/変性:7匹、中等度~中等重度の精子減少:6匹、軽度~中等度の精子形成異常の増加:9匹)が、それより前の時点で屠殺されたマウスでは報告されていない。濃度300 ppm群の雌では、両側性の卵巣嚢胞を4匹に検出したと報告されている。類似の病変が、これより低い濃度群の雌雄双方に認められたことも報告されている(データの提示なし)が、著者は、その生物学的意義について、自ら疑いの余地があるとみなしている。著者がこのように推測しているため、この低濃度側の群で得られた知見は、対照から見て有意な変化を示すものではなかったとみなされる。しかし、マウスでベンゼン濃度が300 ppmの群において報告されている知見を解釈するのは困難である。その理由は、精巣の重量データと組織形態的变化の発生率の数値が、この試験報告では提示されていないからである。また、この試験が行われている間の対照動物の成績に関するデータも記述されていない。ラットでは、この試験において、そうした精巣および卵巣の変化は報告されていない。

Wolf *et al.*(1956)がより詳しい試験を実施しているが、報告内容は不十分である。この試験では、各種実験動物に対し、ベンゼンの間欠吸入曝露が実施された(チャンバー内における全身曝露、7~8時間/日、5日/週)。雄ラット 10~25 匹(おそらく Wistar ラット)からなる群が 6600 ppm で 93 日間、雄モルモット 5~10 匹(系統の明記なし)からなる群が 88 ppm で 269 日間、雄ウサギ 1~2 匹(系統の明記なし)からなる群が 80 ppm で 243 日間曝露させたと報告されている。こうした曝露条件により、軽度~中等度の障害が生じたことが、ラットおよびモルモット精巣重量に関して(時期の提示無し)、およびウサギの精巣の組織病理学的検査結果(詳細な記載無し)に関して報告されている。付随して、白血球減少、脾臓の平均重量の増加、骨髄の組織病理学的変化(詳細な記載無し)により特徴付けられる、全身的な毒性影響が生じた。対照動物の成績に関する数値データや情報は、この試験報告には提示されていない。こうした評価不能な点があり、また記述内容が極めて乏しいことから、この試験は有害性を評価する目的に妥当であるとはみなされない。

雄 SHR マウスを対象にした強制経口投与試験(Feldt *et al.* 1985、抄録)では、記述内容は乏しいが、ベンゼンを 0.001~0.2 LD₅₀の用量範囲で 5 週間投与しても、優性致死変異を誘発しなかったことが報告されている。

ヒトにおけるデータ:

ベンゼンへの職業曝露が生殖能力に及ぼす影響を調べたデータから、ベンゼンが女性の受胎能を障害する可能性が示されていると思われる(Mukhametova and Vozovaya 1972; Vara and Kinnunen 1946; Michon 1965)。しかし、データの元になっている調査には難点があるため、この知見から結論は導かれない。

これらの内の一つの調査では、ベンゼンの毒性症状を有する女性 30 名が検査された(Vara and Kinnunen 1946)。これらの女性はベンゼンを含有する環境で就業していたが、空気中のベンゼン濃度は特定されておらず、1 ppm よりはるかに高かったと推定されている。これらの女性のうち 12 名が月経障害(出血量過多または過少、および月経困難)を有していた。白血球減少が 4 名で報告され、彼女たちの大半は好中球および血小板も減少していた。前述の 12 名中 10 名が既婚者であった。この 10 名中 2 名には自然流産歴があり、また、避妊処置を取らなかったにも関わらず、雇用中に出産例は生じていない。このことから、著者は、高濃度ベンゼンに曝露された場合、受胎能に有害作用が及ぶことを示唆するに至った。しかし、この調査では、出産例が無いことが不妊に起因していることを立証できていない。婦人科検査により、これらの患者のうち 5 名の月経過少は、卵巣萎縮に起因することが判明している。この調査には、適切な比較集団が確立されていないという難点がある。さらに、対象女性 30 名について、継続的な職歴やベンゼンで生じうる毒性症状に関する追

跡はほとんど実施されていない。

別の調査(Michon 1965)では、芳香族炭化水素(ベンゼン、トルエン、キシレン)に曝露された女性作業員において、月経周期障害が認められている。ベンゼンおよびトルエンの曝露濃度は、0.25 ppm 未満であった。観察の対象とした群は、20~40歳の女性500名であった。この調査では100名の対照者が設けられた。その結果、月経が不規則であったのは、対照群で12%であったのに対し、座ったり立ったりする作業に従事し、曝露を受けていた女性では21%であることが示された。月経周期が短期(2日以内)もしくは長期(6~9日)であったり、さらに長かったり(10日以上)する例は、対照群では13%で認められたのに対し、作業中に物の持ち上げを行う女性では26%に認められた。月経出血量や疼痛の度合いが正常から外れる例も、芳香族炭化水素に曝露された女性作業員に認められた。この調査における主要な難点は、化学物質の混合物により曝露が生じていること、曝露濃度が十分に確定されていないこと、曝露期間についての言及が無いこと、対照群の人の活動状況について明らかにされていないことである。

さらに別の調査では、接着剤を扱う業務に携わり、石油(ベンゼンの主要供給源)および塩素化炭化水素に経皮および吸入の両方で曝露されていた、女性従業員360名を対象に、生殖機能の検査および婦人科学的影響の発生率の検討が行われた(Muhametova and Vozovaya 1972)。ただし、経皮曝露は、ごくわずかであるとみなされている。空気中のベンゼン濃度については、十分な記述は無い。化学物質に曝露されていない女性従業員と比較したところ、受胎能に有意差は認められなかった。しかし、接着剤を扱っていた女性従業員には、月経周期の機能的障害が発生した。さらに、化学物質への曝露期間が増長するにつれ、早期妊娠中絶数の増加、遅滞破水率の上昇、および胎児の子宮内仮死率の上昇が認められた。この調査には、不備な点(曝露歴の欠如、ベンゼン以外の物質との同時曝露の存在、追跡調査の欠如など)があることから、ベンゼンが生殖能力に及ぼす影響について評価するのは困難である。

ベンゼンが男性の生殖能力に及ぼす影響については、ヒトにおけるデータが得られていない。

生殖能力の障害のまとめ

ベンゼンが男性の生殖能力に及ぼす影響については、ヒトにおけるデータが得られていない。ベンゼンへの曝露が女性の生殖能力に及ぼす影響については、調査のデザインが不十分であり、労働環境におけるベンゼンや他の化学物質への曝露が適切に定量されていないことから、因果関係を立証するには証拠が不十分である。したがって、生殖能力に関する有害性の評価は、動物試験から得られたデータに基づくことになる。雄雌の生殖能力に関

わる項目については、実験動物を対象に、曝露経路は吸入のみであるが、質および妥当性がさまざまな試験において検討されてきている。ガイドラインに合致する亜慢性毒性試験から得られたデータから、マウスはラットより、ベンゼン曝露に対する感受性が高いことが示されている。生殖器官に影響を及ぼす可能性については、ラットを用いた試験では、ベンゼン濃度 300 ppm (960 mg/m³) まで、雌雄いずれにも影響が認められていない。また、雌の生殖能力や生殖性についても、ラットでは、ベンゼン濃度 300 ppm (960 mg/m³) まで影響は認められなかった。一方、マウスでは、亜慢性毒性試験において 300 ppm (960 mg/m³) の高濃度のベンゼンで曝露した場合、雌雄双方において、明確な血液毒性(貧血、白血球減少、血小板減少)が引き起こされた。生殖器にもいくつかの変化が示され、それらは、雄(精巣重量および組織病理学的[訳注:組織形態学的と思われる]検査における影響)においての方が雌(頻度の低い卵巣嚢胞)におけるよりも顕著であると思われた。

入手された反復吸入曝露試験の中からは、NOAEC を導出するために Ward *et al.* (1985) の試験データを用いるべきであり、それにより定量的なリスク評価が行えると考えられる。その理由は、この試験では、生殖に関して意義のある時期に、雌雄双方において、臓器重量の測定および組織病理学的評価が行われているからである。300 ppm (960 mg/m³) という高濃度のベンゼンに曝露されたマウスで認められた影響に基づくと、ベンゼンの生殖器毒性に関する NOAEC として 30 ppm (96 mg/m³) という数値が導出される。定量的リスク評価では、この値を考慮すべきである。

Kuna *et al.* (1992) の試験から得られる情報は、ベンゼンが雌雄の生殖能力に障害を及ぼす可能性全般を推定するには、不適であると考えられる。雌ラットの受胎能試験では、高濃度(全身毒性を検討した濃度を含む)での検討が行われていないことに加え、雄の生殖成績を得るための機能試験のデータは、これまでマウスでもラットでももたらされていない。したがって、生殖能力に関する分類および表示は、現在のところ提唱されない。

発生・発達毒性

動物データ:

妊娠中に動物をベンゼンに吸入曝露した試験の情報は、多数得られている。これらの試験のいずれにおいても、ベンゼンに特異的な胎仔毒性および催奇形性の証拠は、母体毒性の徴候を誘発した濃度であっても示されなかった。しかし、出生仔の体重減少という形で胎仔に発達障害が起きていた例が示され、また骨格変形の増加や骨化遅延も認められており、それらの事例は母体毒性が見られた濃度でよく認められている。

動物における連続吸入曝露試験

Tatrai *et al.* (1980)は、CFY ラットを、妊娠期間 7~14 日目にかけて、空气中濃度が 150、450、1500、または 3000 mg/m³ (約 50、150、500、または 1000 ppm に相当)のベンゼンに連続曝露(24 時間/日)したが、仔動物に有意な骨格奇形は認められなかった。胎仔の平均体重減少、骨格形成の遅延(すなわち骨化遅延)の徴候、および母体毒性の症状(体重増加の抑制、平均胎盤重量の減少)が、全ての曝露濃度で認められた。高濃度側の3段階では、着床後の有意な胎仔消失、および骨格変形発生率の上昇傾向が認められた。

別の連続吸入曝露試験では、CFLP マウスが、妊娠期間 6~15 日目にかけて、500 または 1000 mg/m³ (約 155 および 310 ppm に相当)のベンゼンに曝露(24 時間/日)されたが、両濃度において、体重増加の遅延および骨格形成の遅延を示す胎仔の割合の上昇、ならびに吸収胎仔または死亡胎仔の割合の上昇がもたらされた(Ungvary and Tatrai 1985)。雌親に対する有害作用は示されなかった。同じ濃度で NZ ウサギを妊娠期間 7~20 日目にかけて曝露したところ、低濃度(500 mg/m³)では、発生・発達毒性の事例は生じなかった。1000 mg/m³では、母体の体重増加の抑制、胎仔の平均体重、流産数の増加、死亡胎仔または吸収胎仔の割合の上昇、および小規模な異常の割合の上昇について、統計的有意差が認められた。

動物における間欠吸入曝露試験

Green *et al.* (1978)の試験では、妊娠 Sprague-Dawley ラット(1 群あたりの数の明記なし、15~18 妊娠例を評価)を、100、300、ないしは 2200 ppm (約 325、974、ないしは 7143 mg/m³)のベンゼンに、妊娠期間 6~15 日目にかけて(6 時間/日)曝露した。対照群 3 群(1 群あたりの数の明記なし、14~16 妊娠例を評価)は、同一条件下のチャンバーにおいて、濾過した空気に曝露した。雌親の体重を 1 日 1 回記録した。妊娠期間 21 日目の屠殺時、胎仔について、視認可能な外表異常の検査、性別の判定、体重の測定、頭臀長の測定を行い、さらに内臓異常や骨格異常の検査のための措置を施した。雌親の体重増加は、対照群と 100 ppm や 300 ppm 曝露群との間では同等であった。2200 ppm 曝露群では、雌親の体重増加の平均値に有意な抑制が認められ、この抑制はわずか 2 回の曝露の後に顕在化し、試験期間終了まで継続した。2200 ppm 曝露群の雌親は、チャンバー内における曝露の間、嗜眠状態になったが麻酔がかかった状態にはならなかった。一方、100 ppm および 300 ppm 曝露群の雌親は、そうした影響を示さなかった。一腹当たりの着床部位数および生存胎仔数、着床部位数に占める吸収胎仔数の割合、吸収胎仔が見られた妊娠例の割合、および全胎仔の吸収が見られた妊娠例数は、高濃度(2200 ppm)群を含め、対照群と曝露群とで同程度であった。胎仔の平均体重は、濃度 100 および 300 ppm では対照群と同等であったが、最高濃度(2200 ppm)では、対照群(5.0 ± 0.1 g)に比べ、統計学的に有意に減少していた(4.5 ± 0.3 g)。胎仔の頭臀長の平均値は、濃度 100 および 300 ppm では対照群と同等であったが、最高濃

度では対照群(4.0 ± 0.1 cm)に比べ、統計学的に有意に短縮していた(3.8 ± 0.2 cm)。一方、骨格の検査では、胸骨分節の骨化遅延の一腹における発生率を調べたところ、曝露群とそれぞれに対応する対照群との間で、同等であることが判明した。いわゆる胸骨分節欠損(殆どが第 5 胸骨分節に関連するもので、第 5 胸骨分節が最後に骨化するため視認できない)の一腹における発生率は、100 および 2200 ppm 曝露群ではそれぞれの対照群との比較で統計学的に有意な上昇が認められたが、中濃度群(300 ppm)では有意な変化は認められなかった。この試験からは、雌親の体重増加の抑制が 8 日目から試験期間終了まで認められたことに基づき、母体毒性に関し、LOAEC として 2200 ppm、NOAEC として 300 ppm という値が得られる。さらにこの試験からは、胎仔の発育遅延(胎仔の体重減少、胎仔の頭臀長短縮、および骨化遅延により示されている)の知見に基づき、発生・発達毒性に関し、LOAEC として 2200 ppm、NOAEC として 300 ppm という値が得られる。

Kuna and Kapp(1981)により実施された試験では、授精させた雌 Sprague-Dawley ラット 18、20、および 19 匹からなる群を、設定濃度 10、50、および 500 ppm(約 32.5、162、および 1624 mg/m³)のベンゼンに、連続 10 日間(妊娠期間 6~15 日目)曝露した(チャンバー内における全身曝露、7 時間/日)。対照群の動物(n = 17)は、濾過した室内気に同様に曝露した。妊娠期間 5 日目および屠殺直前に、静脈血試料を各雌から採取し、赤血球数、総白血球数、白血球百分率数を測定した。妊娠期間 20 日目に屠殺し、卵巣の黄体数、胚吸収部位数、生存胎仔数および死亡胎仔数を観察し、各腹ごとに記録した。胎仔について、外表異常の検査、性別の判定、体重の測定、頭臀長の測定、さらに内臓および骨格の異常の検査を行った。

死亡、観察でわかる様な疾患、ベンゼン誘発性の毒性の徴候は、いずれの投与群の雌にも認められなかった。剖検では、ベンゼン曝露に起因すると考えられる異常は認められなかった。血液学的パラメータのいずれにも投与に関連する変化は認められず、対照群および投与群で全ての値が正常範囲内に収まっていた。妊娠率は 0、10、50、500 ppm 群で 64.7、83.3、75.0、73.7%に達し、試験が行われた施設における既存累積対照値の範囲内であったと報告されている。0~5 日目(曝露前期間)の間、雌親の体重増加の平均値は、どの群でも同等であった。15 日目の雌親の平均体重は、50 ppm 群(290 ± 25 g)および 500 ppm 群(278 ± 19 g)において、対照群(298 ± 23 g)よりも統計学的に有意に低く、さらに 5~15 日目(曝露期間)にかけての雌親の体重増加は、50 ppm 群(39 ± 13 g)および 500 ppm 群(37 ± 21 g)において、対照群(59 ± 17 g)に比べ、約 30%抑制されたことが明らかとなった。着床効率(着床部位数/卵巣の黄体数)は、曝露群と対照群との間で同程度であった。吸収の発生率および胎仔の生存率は、全ての曝露群で対照群と同程度であった。胎仔の雄/雌比は全ての群で正常範囲内であった。曝露濃度 500 ppm では、胎仔の頭臀長の平均値(3.8 ± 0.4 cm)が、対照群(4.1 ± 0.2 cm)より統計学的に有意に短かった。生存胎仔の平均体重は、濃度 50 ppm

群(3.8 ± 0.7 g)および濃度 500 ppm 群(3.6 ± 0.8 g)では、対照群(4.4 ± 0.6 g)より統計学的に有意に少なかった。濃度 10 ppm 群と対照群との比較では、胎仔の体重や頭臀長は同程度であった。変異胎仔(殆どが骨化遅延)の発生率は、濃度 50 ppm 群(125 匹中 23 匹)および濃度 500 ppm 群(142 匹中 30 匹)において、対照群の発生率(110 匹中 3 匹)に比べ、統計学的に有意な上昇が認められた。この試験からは、5~15 日目にかけて雌親の体重増加に抑制が認められたことに基づき、母体毒性に関し、LOAEC として 50 ppm、NOAEC として 10 ppm という値が導出される。さらにこの試験からは、胎仔の発育遅延(胎仔の体重減少、胎仔の頭臀長短縮、および骨化遅延により示されている)の知見に基づき、発生・発達毒性に関し、LOAEC として 50 ppm、NOAEC として 10 ppm という値が導出される。

さらに、吸入曝露による催奇形性試験が、米国石油協会の名で Hazelton Laboratories 社により実施されており、そのデータが Coate *et al.*(1984)により公表されている。この試験では、授精させた雌の Sprague-Dawley ラット 40 匹ずつからなる群を、1、10、40、および 100 ppm(約 3.25、32.5、130、および 325 mg/m³)のベンゼンに、妊娠期間 6~15 日目にかけて、チャンバー内で全身曝露した。この試験では、濾過した室内気を用いてベンゼン(工業用)の蒸気を生成し、試験の期間中、動物を 1 日中チャンバー内に入れたままで 1 日 6 時間の曝露を行った。それぞれ 40 匹からなる対照群 2 群を設け、上述と同様に処置し、濾過した空気だけでの曝露を行った。0~5 日目および 16~20 日目には、被験動物を 1 日 1 回観察した。曝露期間 6~15 日目の間は、その日の曝露前、曝露中 1 回、および曝露後に動物を観察した。0、5、8、10、16、20 日目に、被験動物ごとに体重の測定および観察を行った。20 日目に屠殺し、卵巣ごとの黄体数、子宮における着床数と着床位置、吸収胚数、生存胎仔数および死亡胎仔数について検査し、雌親ごとに記録した。胎仔については、体重の測定、体長の測定、外表の肉眼的な異常の検査、内臓および骨格の異常の検査を行った。

雌親において、死亡、曝露に関連する臨床徴候、肉眼的な病理学的異常は認められなかった。また、雌親の体重増加にも、有意な変化は認められなかった。妊娠率は、対照群 2 群では 80.0 および 85.0%、また、1、10、40、100 ppm 曝露群では 92.5、95.0、92.5、87.5%にのぼった。いずれの群でも母体毒性は認められなかった。着床数、再吸収数、および胚吸収発生率の平均値、ならびに生存胎仔数は、すべての群で同等であった。同様に、着床したが吸収された胚が 1 個以上であった雌親の割合は、すべての群で同程度であった。胎仔の平均体重は、100 ppm 群の腹仔では、対照群と比較すると、雌雄いずれにおいてもわずかに統計的に有意な減少が認められた。また、胎仔の体長の平均値も、100 ppm 群の方が対照群よりわずかに短かったが、統計学的に有意な差ではなかった。外表、内臓および骨格の検査では、曝露に関連する奇形は認められなかった。軟部組織の検査では、軟部組織に 1 つ以上の異常を有する胎仔の数を一腹当たりの平均値で見た場合、対照群とベンゼン曝露群との間に有意差を認めなかった。骨格の検査では、100 ppm 群の胎仔の胸骨分節お

よび尾椎に、有意差のないわずかな骨化遅延を認めたが、40 ppm 群の胎仔ではその様な変化を認めなかった。胎仔で統計学的に有意に約 6%の平均体重の減少が認められたこと、そしてこれが統計学的に有意でない胎仔の平均体長の短縮および統計的に有意でない胎仔の骨化遅延と相関を示すということに基づき、発生・発達毒性に関し、LOAEC として 100 ppm(320 mg/m³)、NOAEC として 40 ppm(128 mg/m³)という数値が導出される。また、この試験では、母体毒性に関する NOAEL として、100 ppm(320 mg/m³)という値が得られる。

もう 1 件の試験(Murray *et al.* 1979)では、CF-1 マウス 35 匹および 37 匹からなる群を、濃度 500 ppm(約 1624 mg/m³)のベンゼン(工業用)か濾過した室内空気のいずれかに単回曝露(チャンバー内における全身曝露、7 時間/日、妊娠期間 6~15 日目)し、また、ニュージーランド白色ウサギ 20 匹ずつからなる群を、濾過した室内空気か濃度 500 ppm のベンゼンのいずれかに、妊娠期間 6~18 日目に同様に単回曝露した。被験動物について、妊娠期間 6 日目から毎日観察を行い、試験期間中は適当な間隔で体重を測定した。摂餌量および飲水量は、試験期間中、マウスについては 3 日おきに、ウサギについては毎日記録した。マウスおよびウサギは、それぞれ妊娠 18 日目および 29 日目に屠殺した。屠殺の際には、血液学的測定(ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、白血球数)用に、対照群およびベンゼン曝露群のウサギの胎仔、および追加的に飼育されていたマウスとウサギの数匹から、血液試料を採取した。血液学的検査は、マウスの胎仔には実施しなかった。さらに、生存胎仔数、死亡胎仔数、吸収胚数およびそれらの胎仔・胚の胎位を記録した。胎仔全てについて、体重の測定、体長(頭臀長の)測定、性別の判定、外表異常および口蓋裂の検査を行った。それから、胎仔の内臓および骨格の異常について検査した。

500 ppm のベンゼンへの曝露では、雌親の外表、体重、体重増加のいずれにも、有意な影響を与えないことが報告されている(データの提示無し)。摂餌量および飲水量(データの提示なし)は、ベンゼンに曝露されたウサギでは増加したが、マウスでは影響が及ぼされなかった。ベンゼンへの曝露が妊娠率に有意に影響を及ぼすという証拠は、マウスでもウサギでも認められなかった。一腹当たりの生存胎仔数および吸収胚数の平均値には、いずれの種においても有意な影響は認められなかった。胎仔の平均体重は、ベンゼンに曝露されたマウスの胎仔(0.95 ± 0.10 g)では、対照群の胎仔(1.01 ± 0.09 g)と比べると有意に低かったが、頭臀長についてはそうした差は認められなかった。ウサギでは、胎仔の身体の測定値に、ベンゼン曝露による有意な変化は示されなかった。マウスおよびウサギの胎仔に奇形は認められなかったが、胸骨分節や頭蓋骨および癒合していない後頭骨の骨化遅延などのいくつかの小規模な骨格変形については、ベンゼンに曝露されたマウスの胎仔で発生率が増加したと報告されている(データの提示無し)。

Table 4.29 Overview on studies with prenatal exposure to benzene by intermittent inhalation and indications for fetal growth retardation

species	benzene (ppm)	maternal ↓ body weight	fetal growth retardation			Ref.
			↓ body weight	↓ body length	↓ ossification	
CF-1 mouse	500	-	+	-	+	Murray et al., 1979
N. Z. rabbit	500	-	-	-	-	Murray et al., 1979
SD rat	100 300 2200	- - +	- - +	- - +	+ - +	Green et al.; 1978
SD rat	10 50 500	- + +	- + +	- - +	- + +	Kuna and Kapp, 1981
SD rat	1 10 40 100	- - - -	- - - +	- - - (+)	- - - (+)	Coate et al., 1986

D-1 マウスを被験動物として、強制経口投与試験が実施されている (Nawrot and Staples, 1979、抄録)。この試験は報告内容が不十分であるが、0.3、0.5 ないしは 1.0 mL/kg 体重の用量で、妊娠期間 6～15 日目にベンゼンが経口投与された。その結果、雌親の死亡や胎仔の吸収の有意な増加が引き起こされ、また、胎仔の体重は、全ての用量レベル(0.3、0.5、および 1.0 mL/kg)で有意に減少した。同じ様な所見が、1.0 mL/kg の用量でベンゼンをより短期間(妊娠期間 12～15 日目)投与した場合にも認められているが、吸収は妊娠期間の後期に生じている。奇形の発生率には、いずれの用量においても、ベンゼンに関連するとされる様な統計的に有意な変化は認められなかった。

他の情報

動物試験の情報は、受胎能や発生・発達を標的とするベンゼンの毒性の検討に関連するものに加え、造血系を標的とするベンゼンの臓器毒性についてのものも得られている。それらの試験では、従来から行われてきた成熟動物を対象にした検討に加え、発生・発達中の動物におけるベンゼンに特異的な毒性の現れ方まで広範に検討範囲とされている。ベンゼンが造血系に及ぼす毒性については、得られたデータの大半を 4.1.2.6(反復投与毒性)に詳述している。そのためこのセクションでは、ベンゼンの血液毒性についてさまざまな段階の発生・発達中の動物において検討した試験から得られたデータのみを報告する。

Swiss-Webster マウスを用い、3 件の独立した試験からなる検討が行われている (Keller and Snyder, 1988 and 1986)。胎仔(妊娠期間 16 日目)、新生仔(2 日齢)、ないしは若齢仔(6 週齢)を対象とした。末梢血または種々の造血器の造血前駆細胞に対するベンゼンの血液毒性作用が検討された。後者については、細胞構成の計測もしくはコロニー形成能試験の結果から定量化を行った。妊娠雌を 5、10、または 20 ppm(約 16、32.5、または 65 mg/m³)の濃度のベンゼンに連続 10 日間(妊娠期間 6~15 日目)吸入曝露(チャンバー内における全身曝露、6 時間/日)して仔動物を妊娠・産出させ、3 つの試験それぞれでは、各仔動物に対し基本的なプロトコルで曝露が行われた。年齢が一致する対照仔動物を、濾過した空気への擬似曝露処置を受けた妊娠雌から作製した。各曝露濃度群の妊娠例数(仔動物を得た雌親数)は、仔動物のそれぞれ年齢群につき、5 例未満であったと報告されている。1 件目および 2 件目の試験(それぞれ胎仔、新生仔が対象)では、各同腹仔から無作為に雄 2 匹および雌 2 匹を選択し、断頭後体幹血を採取し、赤血球数、白血球数、末梢血細胞分画測定用およびヘモグロビン解析用の末梢血試料とした。これらの仔から肝臓も採取して処理を施し、細胞構成の計測、ならびに赤血球前駆細胞(BFU-E および CFU-E)の計測および顆粒球前駆細胞(GM-CFU-C)の計測に供した。3 件目の試験(6 週齢仔)では、雄 1 匹および雌 1 匹を各同腹仔から無作為に選択し、尾静脈、脾臓、大腿骨骨髓から得られた末梢血試料をやはり処理して、細胞構成の計測、赤芽球系前駆細胞の計測、および顆粒球前駆細胞の計測に供した。

ただし、雌親の血液学的検討は実施されていない。また、3 件の試験では、妊娠パラメータに関するデータも、ベンゼンの胚毒性/胎仔毒性や催奇形性の検討がこれらの試験の焦点ではなかったことから、提示されていない。しかし、曝露で用いられた全てのベンゼン濃度において、雌親には、曝露期間中、病的状態に陥ったり、死亡したり、体重が減少したりすることにより示される毒性の証拠を認めなかったことが報告されている(データの提示なし)。さらに、胎仔および新生仔の試験では、一腹仔当たりの子孫の数、性比、体重、および、死亡、胚吸収、奇形を呈した胎仔数が、すべて対照範囲内であったことが報告されている(データの提示なし)。

末梢血細胞に関する指標(赤血球数、平均赤血球ヘモグロビン量、1 mm³ 当たりの有核細胞数、major HbA と minor HbA との比)を調べた結果、様々な発生・発達期段階にわたり、ベンゼン曝露群と空気曝露群の子孫の間に有意差は認められなかった。

末梢血細胞構成の計測(細胞計 100 個を調べた内の芽球数、分化/未分化顆粒球数、初期/後期および原始有核赤血球数、およびリンパ球数)の結果では、発生・発達の初期(妊娠 16 日目の胎仔)および後期(6 週齢仔)において、ベンゼン曝露群と空気曝露群との間に有意差を認めなかった。新生仔期を対象とした試験からは、ベンゼン曝露群は、赤芽球系前駆細胞(初期有核細胞)数が有意な減少を示し、濃度 20 ppm のベンゼンで子宮内曝露された新生

仔は、後期有核赤血球数の減少および顆粒球前駆細胞(未分化顆粒球)数の増加も示した。

同様の所見が、造血器の細胞構成を計測した結果(胎仔および新生仔では肝臓、6週齢仔では大腿骨髄および脾臓において細胞計500個を調べた内の芽球数、分化/未分化顆粒球数、初期/後期および原始有核赤血球数、およびリンパ球数)から得られている。すなわち、発生・発達の初期(妊娠16日目の胎仔)においては、ベンゼン曝露群と空気曝露群との間に有意差を認めなかった。一方、新生仔期を対象とした試験からは、ベンゼン20ppm子宮内曝露群では、やはり後期有核赤血球数の有意な減少および初期有核赤血球数の減少が示され、反対に芽球数、分化/未分化顆粒球数、リンパ球数は増加した。6週齢仔を対象とした試験でも、20ppm子宮内曝露群では、芽球数、分化/未分化顆粒球数、およびリンパ球数が、週齢を一致させた対照群に比べ、わずかに増加した。

子宮内でベンゼンに曝露された新生仔では、赤芽球系前駆細胞(初期有核細胞)数に減少が認められたが、この減少は、末梢血の細胞数が正常であったことからわかる様に、これらの動物の循環赤血球数に、全く負の影響を及ぼしていない。また、赤芽球系前駆細胞の正常な成熟が妨げられていることを示す、major HbA/minor HbA比の変化も、それらの新生仔において認められていない。

保存した種々の前駆細胞分画で実施された機能試験では、主として、より成熟した赤血球コロニー形成細胞において変化が認められた。CFU-Eの増加が、5および10ppmでベンゼンに子宮内曝露された16日齢胎仔の肝臓由来細胞に認められたが、20ppmでベンゼンに子宮内曝露された胎仔では減少が認められた。認められた変化は持続せず(5ppmでベンゼンに子宮内曝露されていた子孫では、2日齢の新生仔になるとCFU-E数は対照値に戻っていた)、子宮内曝露を受けたていた子孫は6週齢に到達した時点では、保存されていた3つの前駆細胞分画全てが正常な範囲の増殖を示した。

3件目の試験については、10ppm子宮内曝露群の出生仔の一部が継続飼育されたと記述されている。このうち雄5匹および雌5匹を、10週齢の時点から10ppmのベンゼンに2週間直接曝露し、雄3匹および雌5匹を、濾過した空気に同様に曝露した。これらの動物の骨髄および脾臓の造血前駆細胞で、細胞数、CFU-E数およびGM-CFU-C数が計測されたが、一貫したパターンは示されなかった。雌の骨髄のCFU-E数が、空気曝露群とベンゼン曝露群との間で同等であったのに対し、雄における数は、曝露群の方が対照群に比べて少なかった。一方、脾臓のCFU-E数については、雄雌いずれの場合も、どのベンゼン曝露群と空気投与群との間にも、変化を認めなかった。

別の試験(Corti and Snyder, 1996)では、同じ試験グループにより、Swiss Websterマウスの成熟雄、未交配雌、ないしは妊娠雌を対象に、同等のプロトコル[10ppm(約32.5mg/m³)のベ

ンゼンに連続 10 日間(6 時間/日)吸入]で曝露を行い、ベンゼン誘発性の血液毒性影響を評価する試験手順を適用し、ベンゼン曝露とエタノール曝露の相互作用の検討が試みられた。妊娠期間 5~16 日目の間に連続 10 日間曝露された妊娠雌の検討に加え、妊娠期間 16 日目以降の胎仔についても検討した。その結果、(10 ppm のベンゼンで子宮内曝露された)雄胎仔の肝臓において、CFU-E 数の有意な減少が認められたが、雌胎仔では、変化は全く認められなかった。この胎仔に関する知見は、同等の曝露プロトコルにより胎仔の肝臓において CFU-E 数の増加が認められた Keller and Snyder(1988)の試験の知見とは対照的である。

全体的に、発生・発達中の動物におけるベンゼンの血液毒性を検討した試験では、20 ppm までの濃度でベンゼンに間接(子宮内)曝露しても、血液毒性の臨床徴候は認められなかった。造血前駆細胞に関して行われたこれらの試験で変化が認められているため、ある程度生物学的な影響をもたらすという証拠がある、ということになるとも考えられるが、こうした試験における CFU の計測結果には大きなばらつきがあり、そうしたばらつきは、一回一回の計測を比較した場合において見られるだけでなく、種々の前駆細胞(CFU-E、BFU-E、CFU-GM)での影響、種々の発生・発達年齢での影響、および同一プロトコルを採用した独立した試験で見られた影響を比較する場合においても認められる。また、報告されている群間差の統計学的有意性にも疑いの余地がある。というのは、1986 年という過去の試験に採用された統計手法は、適切であるとはみなされず、妥当性を付与されていないからである。これらの試験の結果を全体的にみると、発生・発達中の動物が、成熟した動物に比べ、ベンゼンによる血液毒性に高い感受性を示すとはみなされない。

ヒトにおけるデータ:

ベンゼンがヒトの発生・発達に及ぼす影響については、得られているデータが限られており、結論は導かれていない。データが得られた数少ない既存の調査においては、評価項目に關して対照発生率データを欠いている、曝露集団を認定する際に問題がある、曝露濃度データが欠如している、複数の物質に対する同時曝露が存在する、などの難点がある(Budnick *et al.* 1984; Goldman *et al.* 1985; Heath 1983; Olsen 1983)。

Heath (1983)がラブ・キャナル地区(米国ニューヨーク州:地区内に、ベンゼンも含め、計 248 種類以上の化学物質が同定された廃棄物処分地域)において実施した調査では、近隣の居住者集団を対象に、妊娠の成績が評価された。自然流産、先天異常、低出生体重の発生率の明確な増加は、同地区近隣の居住女性には認められなかった。この調査の欠点は、被験者数が不十分でありかつ曝露歴が欠如していることであり、そのため得られた知見の意義を評価することができなくなっている。

ラブ・キャナル地区に関しては Goldman *et al.*(1985)により別の調査が行われており、妊娠

期間中に曝露された乳児 239 名を対象に、出生時体重が評価された。低出生体重(2500 g 未満)と有害廃棄物への曝露との関連が認められた。しかし、この調査のデザインおよび方法論には、固有の問題が存在した。この調査で設けられたの 1 つは、低所得の賃借人および主に黒人からなっていた。また、この調査で取られた方法では、ラブ・キャナル地区から立ち退いた 235 世帯が対象にされていなかった。

さらに、Chen *et al.*(2000)の調査では、各種の溶媒(ベンゼン、トルエン、スチロール、キシレンなど)に曝露されてきた中国の石油化学工場作業員のコホートを対象に、出生体重が検討された。コホートの構成は、ベンゼン曝露者 354 名、非曝露者 438 名であった。この工場での交代制勤務におけるベンゼンへの曝露量は、時間加重平均(TWA)で 0.017 ppm(ゴム製造施設)~0.191 ppm(化学工業施設 No. 1)であったと推定された。この調査では、4 種類の化学物質(ベンゼン、トルエン、スチロール、キシレン)の濃度が、個人別に就業環境の空気を採取して測定されるか、あるいは役職ごとまたは就業場所ごとに測定された。そして曝露群においては、ベンゼンへの曝露量は、いかなる場合もそれらの測定のいずれかに基づいて算出された。なお、就業環境の空気が採取されたのは、132 名の作業員についてのみであった。この様に曝露量を確定することにより、低出生体重は、ベンゼンへの曝露、および作業によるものであることが認定されているストレスと関連があるとみなされた。補正を加えた平均出生体重は、ベンゼン曝露も作業ストレスもない場合 3445 g(95% CI: 3402~3489)、ベンゼン曝露のみの場合 3430 g(95% CI:3382~3477)、作業ストレスのみの場合 3426 g(95% CI: 3340~3513)、ベンゼン曝露と作業ストレス双方がある場合 3262 g(95% CI:3156~3369)であった。この調査では、ベンゼン曝露と、作業によると認定されたストレスとの間に相互作用が認められた。

ベンゼンへの曝露が月経障害を引き起こす可能性について、探索的後ろ向き横断調査(Thurston *et al.*, 2000)において検討されている。中国の石油化学会社作業員約 3 000 名を対象に実施された調査に基づくと、女性 333 名に月経周期異常(AMCL)(36 日以上または 21 日未満)が確認された。調査対象者の化学物質曝露について、質問票を用いて評価し、特定の化学物質への曝露が報告されていた職務に照らして従事年数ごとにコード化した。この調査で探索された様々な変数の内、ベンゼンへの長期曝露(数年間)は、AMCL を生じる可能性があるかと推測された。AMCL の調整後オッズ比は、ベンゼンに曝露され始めた最初の 7 年間には有意な変化を示さなかったが、ベンゼンへの曝露期間がさらに 5 年増すと、同オッズ比は、1.71(95% CI:1.27~2.31)となった。作業にストレスを感じることも、AMCL を予測する重要な因子であった。

最後に、ドレーク・スーパーファンド地区(米国ペンシルベニア州:ベンゼンおよびそれ以外の発がん物質による汚染地域)周辺に住む人の集団を対象とした調査に触れる。この調査では、先天異常に関して、統計的に有意に影響を受けていたことを示す群は認められなかつ

た(Budnick *et al.* 1984)。しかし、被験者数が不十分であることおよび曝露濃度が定量化されていないことなど、試験のデザインおよび方法論が不適切であることから、この知見の意義は判定できない。

ある毒物動態学的試験では、ベンゼンがヒト胎盤を通過し、臍帯血には母体血以上の量が存在することが示されている(Dowty *et al.* 1976)。

Forni *et al.*(1971)は、ベンゼンに曝露されたことが判っている人を対象とした調査を行い、妊娠期間全体を通じ空気中のベンゼンに曝露されていた、妊娠中の作業員の1例について報告している。この女性には、重度の汎血球減少および染色体異常の発生率増加が認められたが、健康な男児を分娩し、発生・発達への影響があったとする証拠も染色体に変化が生じたとする証拠も認められなかった。翌年には健康な女児を分娩した。別の調査では、妊娠中、ベンゼンおよびそれ以外の有機溶媒(明記されていない)に吸入曝露された女性作業員の子14名において、リンパ球の染色体切断および姉妹染色分体交換の発生率増加が認められた(Funes-Cravioto *et al.* 1977)。この調査が行われた理由、母親が毒性徴候を示したかどうか、出生児において身体的異常が生じたかどうかについては言及されていない。

発生・発達毒性のまとめ

ベンゼンが発生・発達毒性を有する物質であることを示唆している疫学調査には、多くの難点があり、そのため、ベンゼンがヒトの胎児に及ぼす影響を評価するには、データが不十分である。発生・発達への影響を検討する目的でデザインされた試験に難点があるとされる主な理由は、ベンゼン以外の化学物質に対する同時曝露があること、被験者数が少ないこと、ならびに曝露濃度の立証および被験者ごとの定量化ができていないことにある。したがって、発生・発達毒性に関する有害性の評価は、動物試験で得られたデータに基づいて行われることになる。

動物データのほとんどが、主に懸念される経路である吸入曝露による試験から得られている。吸入曝露の結果は、動物種によらずほぼ一貫している。ベンゼンが明確に胚毒性および催奇形性を有していることは証明されなかったが、胎仔の体重減少、胎仔の体長短縮、骨化遅延などの骨格の変化が示されたことから判る様に、ベンゼンが胎仔の発育遅延を引き起こし得ることは明白である。様々な試験において、雌親の体重増加抑制などと良く関連して胎仔の体重減少および骨格変形の増加が生じていたことから、ベンゼンの胎仔毒性は、母体毒性に相関するものであることが示唆されている。しかし、この毒性の機序については、十分に解明されていない。ベンゼン曝露については、雌親の摂餌量に及ぼす影響、さらには雌親に生じるとされる血液学的影響についてのデータがそれぞれ得られておらず、雌親およびその胎仔におけるベンゼンおよびその代謝物の血中濃度は、こうした

試験のいずれにおいても調べられていない。胎仔の発育遅延および母体毒性の用量依存性に関しては、いずれも検討結果はラットを用いた試験からしか得られていない。妊娠期間中連続 10 日間ベンゼンへの曝露が行われた試験では、曝露濃度が 50 ppm 以上で母体毒性を生じた。曝露濃度が 40 ppm 以下の場合には、胎仔の発育遅延に関する臨床所見は認められなかった。入手されたラット試験のデータから、発生・発達毒性の最小 NOAEC は、Kuna and Kapp(1981)の試験に基づいて 10 ppm(32 mg/m³)と導出され、この値を以後のリスクの総合評価および定量的なリスク評価において考慮すべきである。

ヒトや動物がベンゼンに経皮曝露された際に発生・発達へ及ぼされる影響については、データが得られていない。経口投与データは 1 件の動物試験からしか得られていないが、ベンゼンが、重度の母体毒性の徴候を引き起こし、それに関連して胚毒性および胎仔毒性の影響を生ずることが示されている。

ベンゼンの血液毒性に関しては、様々な発生・発達段階の胎仔・仔動物を間接的にベンゼンに曝露した試験が行われているが、発生・発達中の動物と成熟した動物との比較において、ベンゼンの血液毒性に対する感受性の相違は、全般的に認められていない。造血前駆細胞にいくつかの変化が認められているが、こうした所見の生物学的意義は未だ明確にされていない。

結論:

ベンゼンへの曝露が女性の生殖能力に及ぼす影響については、ヒトにおけるデータでは、調査のデザインが不十分であること、ならびにベンゼンおよびそれ以外の化学物質の曝露の定量化が不適切であることから、因果関係を立証するには十分でない。男性における生殖能力への影響に関する疫学調査の情報は入手できていない。同様に、ベンゼンが発生・発達毒性物質であると示唆している疫学調査には、多くの難点があり、そのため、ヒト胎児に及ぼす影響を評価するのに十分な情報は示されていない。したがって、有害性の特定および評価は、主に動物試験データに基づいて行われる。明確な胚毒性および催奇形性を有している可能性は、催奇形性試験および発生・発達毒性試験においては示されなかったが、母体毒性と良く相関して胎仔の発育遅延が認められた。発生・発達毒性に関する定量的リスク評価には、NOAEC として 10 ppm(32 mg/m³)を用いることが提唱される。反復投与毒性試験データでは、ベンゼン曝露により、ラットでは認められなかったが、マウスでは雄雌双方において生殖関連器官にいくつかの影響が及ぼされることが認められ、これにより生殖器官への毒性に関する NOAEC として 30 ppm(96 mg/m³)が示唆される。ラットを用いた生殖能力試験が 1 件見つかっており、情報を得ることができるが、この試験は、雄および雌における生殖能力障害の全体的な評価に、十分かつ適切であるとはみなされなかった。

Appendix A VI
of the Risk Assessment Report
Benzene CAS-No.: 71-43-2

Benzene metabolic pathways (Concawe 1996)

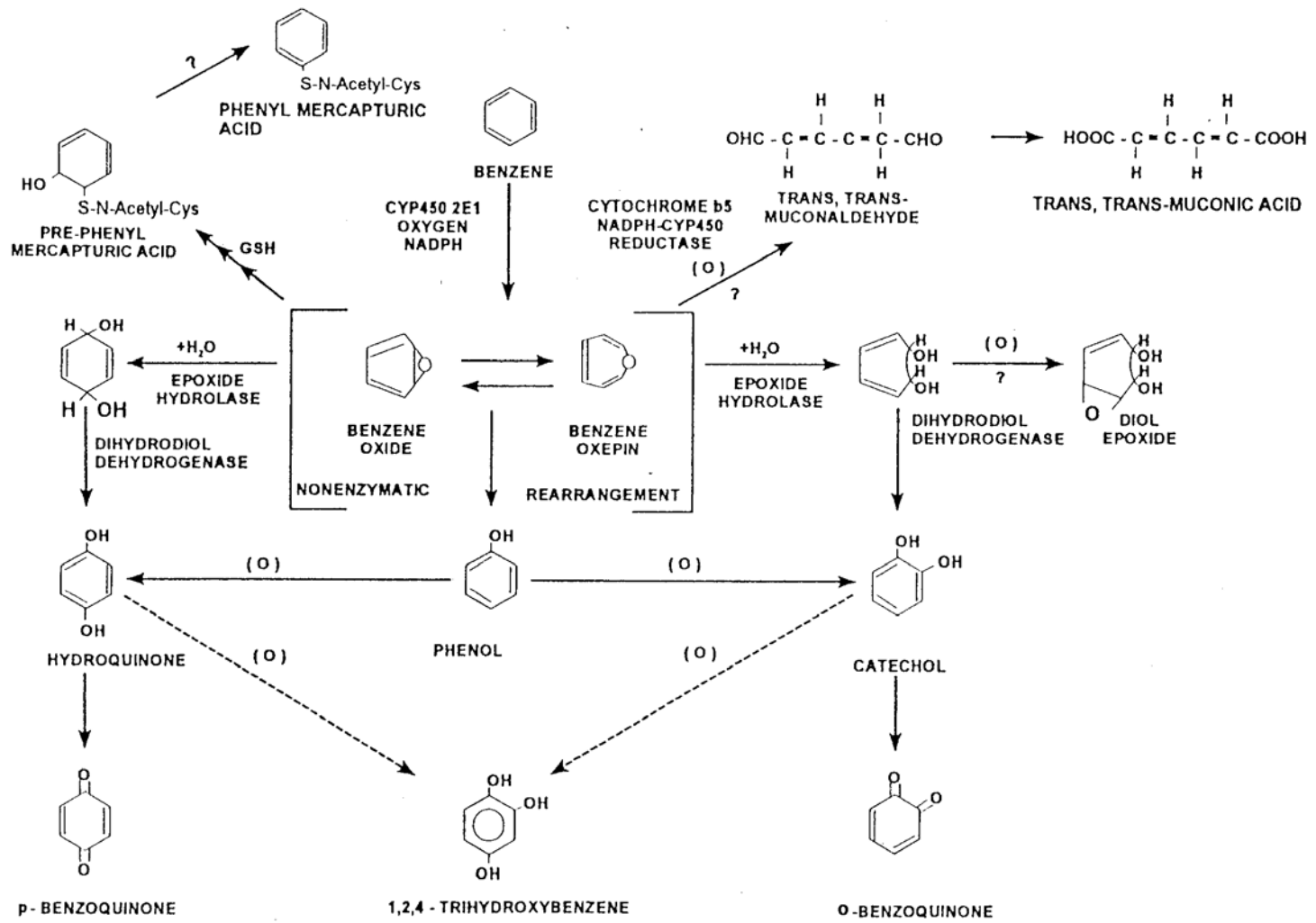


Figure 4.1.2.1: Benzene metabolic pathways (Concawe 1996)