

部分翻訳

**European Union  
Risk Assessment Report  
2-NITROTOLUENE**

**CAS No: 88-72-2**

*2008*

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

**2-NITROTOLUENE**

CAS No: 88-72-2

EINECS No: 201-853-3

**RISK ASSESSMENT**

*Final report, 2008*

SPAIN

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2016年1月

本部分翻訳文書は、2-nitrotoluene (CAS No: 88-72-2)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://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk\\_assessment/REPORT/2nitrotoluenereport403.pdf](http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk_assessment/REPORT/2nitrotoluenereport403.pdf)

を参照のこと。

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

##### 4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

###### 4.1.2.1.1 動物試験

###### In vivo 試験

###### 吸入

データは得られていない。

###### 経皮

データは得られていない。

###### 経口

2-ニトロトルエンを経口投与した場合のトキシコキネティクスについては、実験動物、特にラットを用いて実施された数々の試験により検討されている。それらの試験の多くは、研究目的で実施されたものであり、論文中に公表されたものである。したがって、それらの試験手法は必ずしも OECD ガイドライン 417 に特に準拠したものではなく、その要項に記載されたパラメータの一部しか検討していないものもある。

###### ラット

Maitrya and Vyas (1970) の試験では、アルビノラット(各群 6 匹ずつ、体重約 150 g)に、2-ニトロトルエン(純度の提示無し)が、0 ないしは 48 mg/kg 体重の用量で、7 日間毎日投与された。試験第 1 日から 24 時間毎に尿試料が毎日採取され、その中への馬尿酸排泄量を推算することにより、2-ニトロトルエンの代謝が調べられた。中等度量の馬尿酸が、尿中に

排泄された(独立して6回試行され、その平均値  $\pm$ SE は  $8.64 \pm 0.06$  mg/kg 体重であった)。抱合化は、主としてグリシンとの間で生じるが、グルクロン酸の様な他の化合物との抱合も起こり得る。したがって、尿中に排泄される最終産物は、グリシンと抱合化した場合は馬尿酸であり、グルクロン酸と抱合化した場合はグルクロニド抱合体であると考えられる。この試験では馬尿酸の排泄だけが対象とされていることを考慮すると、2-ニトロトルエンの実際の抱合機序をこの試験だけで想定するのは早計であると考えられる。また、この試験の報告は、馬尿酸の測定法(Quik's 法と記載)に関する詳細な記載が無い短報で行われており、馬尿酸はトキシコキネティクスを検討した他の試験では検出されていないことから、この試験の妥当性には疑義がある。

Chism, Turner and Rickert(1984)の試験では、雄の Fischer-344 を用いて、2-ニトロトルエンの代謝と排泄が調べられた。コーン油に懸濁された[芳香環- $U-^{14}C$ ]2-ニトロトルエン(純度99%超)が、200 mg/kg 体重の用量で、ラット(各群3匹ずつ、80~90日齢)に強制経口投与された。この用量は、投与を受けたラットの肝細胞で不定期 DNA 合成を誘発することに基づいて選択された。投与後2、4、8、12、24、36、48、60 および 72 時間までの尿と、投与後12、24、36、48、60 および 72 時間までの糞便が採取された。2-ニトロトルエンの排泄は、そのほとんどが最初の24時間になされた(投与用量の86%)。投与後72時間までに、投与用量の91%が尿中(86%)、糞便中(5%)および呼気(0.1%)に排泄された。尿中代謝産物は、2-ニトロ安息香酸(29%)、未同定化合物 1(16%)、2-ニトロベンジルグルクロニド(14%)、S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステイン(12%)、未同定化合物 2(6%)、S-(2-ニトロベンジル)-グルタチオン(4%)、2-アミノ安息香酸(2%)、硫酸 2-ニトロベンジル(0.5%)および 2-ニトロベンジルアルコール(0.4%)であった。ニトロ基が還元されていない代謝産物の排泄率が最高となったのは、投与後の最初の4時間以内であった。2-アミノ安息香酸とピーク2および3の未同定化合物については、それらの排泄率が最高となったのは、投与後4~12時間の間であった。検出された代謝産物の性質に基づき、また、deBethizy and Rickert(1984)から得られた *in vitro* データを考慮すると、2-ニトロトルエンの代謝は、ニトロベンジルアルコールがさらに生体内変化を受ける経緯をとるものと思われる。*In vivo* では2-ニトロベンジルアルコールの代謝に3つの経路があると考えられる。すなわち、1) 2-ニトロ安息香酸への酸化、2) グルクロン酸抱合、および 3) グルタチオン抱合である。

Chism and Rickert(1985)は、雌雄の Fischer-344 ラットを用いて、2-ニトロトルエンの体内活性化における腸管循環の役割を調べている。ラット(雌雄3匹ずつ、80~90日齢)にメトキシフルランで麻酔を施し、総胆管にカニューレを装着した。カニューレは、側枝を備えたガラス製の容器に接続された。ガラス製の容器は腹部に埋め込まれ、側枝は胆汁を定期的に採取できるように体外に露出された。別のラット(雌雄3匹ずつ)を用意して、同様の

外科的処置とガラス製の容器を埋め込みを施したが、総胆管へのカニューレの装着は行わず、外科的処置を模した群とした。対照群として別のラット(雌雄 3 匹ずつ)を配し、これらには麻酔も外科的処置も施さなかった。ラットには、立ち直り反射が復活してから 1 時間後に、コーン油を媒体として、200 mg/kg 体重の[芳香環- $^{14}\text{C}$ ]2-ニトロトルエン(純度 99%超)が経口投与された。投与後 1、2、3、4、6、9 および 12 時間までの胆汁と、投与後 6 および 12 時間までの尿と、投与後 12 時間までの糞便が採取された。ラットは投与の 12 時間後に屠殺し、肝臓を取り出して、総  $^{14}\text{C}$  量および共有結合した  $^{14}\text{C}$  量の分析を行った。カニューレを装着したラットにおける胆汁への排泄量は、雄で投与用量の 29%、雌で投与用量の 10%であった。外科的処置の有無に関係なく、雄においても雌においても、主要な排泄経路は尿中であった。雄における尿中排泄量は、投与用量の 75%(対照群)、52%(外科的処置を模した群)、または 36%(胆管カニューレを装着した群)であった。雌における尿中排泄量は、投与用量の 80%(対照群)、63%(外科的処置を模した群)、または 33%(胆管カニューレを装着した群)であった。糞便への排泄は、2%未満であった。胆汁中の代謝産物は以下の通りであった(投与用量に対する百分率で表示)。2-ニトロベンジルグルクロニド(♂で 22%、♀で 8%)、S-(2-ニトロベンジル)-グルタチオン(♂で 5%、♀で 0.4%)、S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステイン(♂で 1%、♀で 0.4%)、および硫酸 2-ニトロベンジル(♂で 1%、♀で 0.1%)。対照群における尿中の代謝産物は以下の通りであった(投与用量に対する百分率で表示)。2-ニトロ安息香酸(♂で 25%、♀で 31%)、未同定代謝産物 1(♂で 14%、♀で 6%)、2-ニトロベンジルグルクロニド(♂で 13%、♀で 25%)、S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステイン(♂で 11%、♀で 7%)、未同定代謝産物 2(♂で 5%、♀で 4%)、S-(2-ニトロベンジル)-グルタチオン(♂♀とも 3%)、2-アミノ安息香酸(♂で 2%)、硫酸 2-ニトロベンジル(♂で 0.5%、♀で 1%)、および 2-ニトロベンジルアルコール(♂♀とも 0.5%未満)。雌雄両方においてもっとも多く尿中に排泄される代謝産物は 2-ニトロ安息香酸であったが、この排泄量は、胆管カニューレを装着した群の雌雄では 60%以上低下し、外科的処置を模した群の雄では 42%減少し、同雌では 12%減少した。2-ニトロベンジルグルクロニドの尿中排泄は、胆管カニューレを装着した場合でも外科的処置を模した場合でも、大きな影響を受けることはなかった。S-(2-ニトロベンジル)-グルタチオンおよび S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステインの尿中排泄は、胆管カニューレを装着した群では低減したが、外科的処置を模した群では影響は認められなかった。未同定の代謝産物 1 および 2 の尿中への排泄は、胆管カニューレ装着による影響を最も強く受け、特に雄では 81%(代謝産物 1)および 95%(代謝産物 2)の減少が認められた。外科的処置を模した場合も、未同定の代謝産物の尿中排泄は減少し、特に雄では 60%(代謝産物 1)および 84%(代謝産物 2)の減少が認められた。肝臓における総放射活性濃度は、雄の方が雌よりも高かった。肝臓における放射活性濃度は、雄では胆管カニューレ装着により減少したが、胆管カニューレを装着した雌や外科的処置を模した場合には、その様な影響は認められなかった。雌雄両方において、肝臓の高分子物質への共有結合が認められた(雄では雌の 3 倍)。外科的処置

を模した場合や胆管カニューレを装着した場合には、雌雄両方において共有結合が低減した。共有結合は、胆管カニューレを装着した雄の場合、対照群と比べて 98%、外科的処置を模した群と比べて 93%減少した。外科的処置を模した場合に共有結合が減少したのは、一次的にウリジン二リン酸グルクロン酸の肝臓中濃度を減少させる麻酔剤(メトキシフルラン)により、2-ニトロベンジルグルクロニドの胆汁への排泄が減少したことを反映していると思われる。要約すると、この試験の結果から、ラットにおける腸管循環には 2-ニトロトルエンと肝臓の高分子物質との共有結合が必須であることが示され、また、2-ニトロベンジルグルクロニドが活性代謝産物の前駆体となっていることが示唆される。2-ニトロトルエンの生体内活性化について、次の様な経路が提唱される。2-ニトロベンジルグルクロニドが胆汁を介して小腸に排泄され、腸内細菌叢がグルクロン酸を加水分解し、またニトロ基を還元して 2-アミノベンジルアルコールが生成される。次に、2-アミノベンジルアルコールは再吸収されて肝臓の酵素によりさらに代謝され、肝臓の DNA と共有結合可能な化学種となる。肝臓の高分子物質との共有結合や遺伝毒性および発がん性についてみられた性差は、胆汁への排泄が雌よりも雄の方が多いことにより説明づけられる。

NTP(2002)は、F344/N ラットを用い、GLP に準拠した高品質の試験を複数行っている。約 9~14 週齢の雄または 9~12 週齢の雌に対し被験物質が投与され、以下の項目が検討された。すなわち、a) 2-ニトロトルエンを単回もしくは反復強制経口投与した場合の代謝と排泄；b) 単回投与した場合における、ブチオニンスルホキシミンやペンタクロロフェノールの、2-ニトロトルエン代謝に対する影響；単回投与した場合における 2-ニトロトルエンの血漿中濃度；および、d) 単回投与した場合における 2-ニトロトルエン等価物のヘモグロビンへの結合；であった。

a) 最初の試験においては、雄 4 匹の群および雌 4 匹の群に、Emulphor®を媒体として、 $[^{14}\text{C}]$ -2-ニトロトルエン(純度 98%以上)が、200 mg/kg 体重の用量で強制経口投与された。投与後 4、8、24、48 および 72 時間までに採取された尿および糞便中の放射活性が測定された。2-ニトロトルエン代謝物は主として尿中に排泄され、投与後 24 時間までに投与用量の 86% (雄)および 92% (雌)が、投与後 48 時間までに投与用量の 99% (雄)および 101% (雌)が回収された。雌雄の被験動物における放射活性の総回収量は、約 106% (尿中に 103%および糞便中に 3%)であった。尿中代謝産物のプロファイルが、HPLC により分析された。その結果、ラットの尿中には、以下に示す、少なくとも 8 種類の代謝産物が存在していることが明らかとなった(雄において投与後 0~48 時間の尿中に回収された量を、投与用量に対する割合(%)で示した)。それらは、2-ニトロ安息香酸(A, 21%)、2-ニトロベンジルグルクロニド(B, 17%)、未同定代謝産物(C, 0.2%)、2-アミノベンジルアルコール(D, 18%)、未同定代謝産物(E, 4%)、S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステイン(F, 10%)、2-ニトロベンジルアルコール(G, 2%)、および o-トルイジン(H, 1%) であ

った。雌においても同様の主要代謝産物が検出されたが、2-アミノベンジルアルコールと S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステインの生成量は雄よりもかなり少なかった。尿をグルクロニダーゼ/スルファターゼとインキュベートしたところ、代謝産物のプロファイルが変化した。最も顕著であったのは、ピーク G の増高をもたらすピーク B の消失であった。また、精製スルファターゼとインキュベートした場合には、ピーク B が維持されたことから、ピーク B は硫酸抱合体ではなく、グルクロニドであることが確認された。ピーク G を 2-ニトロベンジルアルコールとした同定結果については、真正標準品との共溶出により確認がなされた。単離された代謝産物 E を熱噴射質量スペクトル解析したところ、その保持時間は S-(2-ニトロベンジル)グルタチオンの合成標準品と同等であったが、質量スペクトルは当該合成標準品と一致していなかった。

2 件目の試験では、雄 3 匹の群および雌 3 匹の群に、Emulphor®:エタノール:水(1:1:8)を媒体として、 $[^{14}\text{C}]$ -2-ニトロトルエン(純度 98%以上)が、2 mg/kg 体重の用量で強制経口投与された。投与後 24、48 および 72 時間までの尿および糞便が回収され、放射活性が測定された。放射活性の排泄は、用量 200 mg/kg 体重の場合と同様であった。2-ニトロトルエン代謝物は主として尿中に排泄され、投与後 24 時間までに投与用量の 98%(雄)および 97%(雌)が、投与後 48 時間までに投与用量の 104%(雄および雌)が回収された。放射活性の総回収量は、雄では 112%(尿中に 106%および糞便中に 5%)、雌では 113%(尿中に 108%および糞便中に 4%)であった。代謝産物のプロファイルは 200 mg/kg 体重の場合と同様であったが、最も顕著な違いとして、2 mg/kg 体重の場合、2-ニトロ安息香酸および 2-ニトロベンジルグルクロニドとして排泄される割合が高かったことが報告されている。投与用量が 2 mg/kg 体重の場合にも代謝産物プロファイルに性差が認められ、雌においては雄におけるよりも、2-アミノベンジルアルコールおよび S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステインの排泄量がかなり少なく、2-ニトロ安息香酸の排泄量が多かった。

3 件目の試験では、雄 3 匹の群に、Emulphor®:エタノール:水(1:1:8)を媒体として、 $[^{14}\text{C}]$ -2-ニトロトルエン(純度 98%以上)が、200 mg/kg 体重の用量で、14 日間毎日強制経口投与された。投与は、最初の 11 日間は非放射標識被験物質で、12 日目は放射標識被験物質で、13 および 14 日目は非放射標識被験物質で行われた。放射標識被験物質の投与後 24、48 および 72 時間までの尿および糞便が採取され、放射活性が測定された。放射活性の排泄は、単回投与の場合と同様であった。2-ニトロトルエン代謝物は主として尿中に排泄され、投与後 24 時間までに投与用量の 78%が、投与後 48 時間までに投与用量の 85%が回収された。放射活性の総回収量は、98%(尿中に 87%および糞便中に 11%)であった。

b)2-ニトロトルエン代謝に対するブチオニンスルホキシミンやペンタクロロフェノールの

影響が、雄を用いた別々の複数の試験で検討されている。Emulphor®:エタノール:水(1:1:8)を媒体として、 $[^{14}\text{C}]$ -2-ニトロトルエン(200 mg/kg 体重)が、単回強制経口投与された。3匹のラットには、ブチオニンスルホキシミン(グルタチオン合成阻害剤)が、2-ニトロトルエン投与の6日前から投与後72時間まで、飲水投与された。別の3匹のラットには、ペンタクロロフェノール(O-硫酸化阻害剤)が、2-ニトロトルエン投与の前に腹腔内投与された。2-ニトロトルエンの投与後、24、48 および 72 時間まで(ブチオニンスルホキシミン投与群)もしくは4、8 および 24 時間まで(ペンタクロロフェノール投与群)の尿が採取され、放射活性が測定された。ブチオニンスルホキシミンの前処理を受けていたラットでは、前処理を受けてないラットと比べ、尿中に排泄された放射活性量が顕著に低減しており(24時間尿で57%)、また、S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステインの排泄量は約半分となり、2-ニトロベンジルアルコールの排泄量は、約3倍となった。ペンタクロロフェノールの前処理を受けていたラットでも、前処理を受けていないラットと比べ、尿中に排泄された放射活性量が顕著に低減しており(24時間尿で52%)、S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステインの排泄量は投与用量の10%から1.5%まで低減していた。これらのデータから、2-ニトロベンジルアルコールが、O-硫酸化によりアルキル化合物に転換されることが示唆され、またグルタチオンは、反応性の中間体である2-ニトロベンジルアルコールと抱合体を形成することで、保護的な役割を果たしている可能性があることが示された。また、ペンタクロロフェノールによる前処理により、2-ニトロベンジルグルクロニドおよび2-アミノベンジルアルコールの尿中排泄量も、それぞれ15%から8%までおよび17%から4%まで低減した。尿中に排泄される2-ニトロベンジルグルクロニドが減少したのは、おそらくグルクロニド化がペンタクロロフェノールと競合したためと考えられる。その結果、胆汁に排泄される2-ニトロベンジルグルクロニドの減少やニトロ基の還元および腸内細菌叢による脱抱合化の低減が生じ、それが尿中に排泄される2-アミノベンジルアルコールの減少につながった可能性がある。

- c) 最初の試験で用いた雄4匹を用いて、2-ニトロトルエンの血漿中濃度が測定された。被験動物を、ケタミン:キシラジン(7:1)の腹腔内注射により麻酔し、頸部カニューレを留置して連続的に血液使用を採取できるようにし、24時間代謝ケージに入れて回復させた。その後、Emulphor®を媒体として、200 mg/kg 体重の $[^{14}\text{C}]$ -2-ニトロトルエン(純度98%以上)を強制経口投与した。血液試料は、投与の15および30分後、ならびに1、2、4、8 および 24 時間後に採取した。2-ニトロトルエンの血漿中濃度は、投与の15~60分後に最大となり、血漿1g中約10,000 ngに達し、投与後24時間までに急速に減少し、投与後24時間の時点では検出限界未満となった。2-ニトロトルエンの血漿中半減期は、約1.5時間であった。
- d) 2-ニトロトルエン等価物のヘモグロビンへの結合に関する検討が、別の試験で実施され

た。雌雄 4 匹ずつのラットに、Emulphor®を媒体として、200 mg/kg 体重の $^{14}\text{C}$ -2-ニトロトルエン(純度 98%以上)を単回強制経口投与し、ケタミン:キシラジンを腹腔内投与して麻酔を施し、心臓穿刺により血液試料の採取を行った。血漿中、赤血球中および分離したタンパク質中の放射活性が測定された。投与後 72 時間で血中に検出された総放射活性のうち、89%は赤血球に関連するものであった。赤血球中の放射活性のうち、約 40%は、分離・洗浄されたタンパク質集塊に関連するものであった。このタンパク質集塊を、共有結合した 2-ニトロトルエン等価物だけが残る様に、連続抽出(ソックスレー抽出)により処理した。1 mg のグロブリン当たり、雄では 26 pmol の、雌では 29.9 pmol の等価物が存在していた。これらのデータからは、2-ニトロトルエン等価物のグロブリンへの結合については、顕著な性差は示されなかった。また、代謝産物プロファイルのデータとは相反して、アルキル化物質の生成に関しても、ラットの雄と雌とで、相違は示されなかった。

Chism, Turner and Rickert(1984)の代謝試験の結果に基づき、3 種類の尿中代謝産物(2-ニトロ安息香酸、2-ニトロベンジルメルカプツール酸、および 2-アミノ安息香酸)が曝露のバイオマーカーとして選択され、それらの指標を用いて、曝露濃度と内部用量との間の相関性が検討され、また、2-ニトロトルエンの代謝が曝露の長期化や加齢によりどのように変化するかが検討されている。NTP(2002)が実施した発がん性試験では、F344/N ラット(6~7 週齢)に、0、625、1250 ないしは 2000 ppm の濃度で、2-ニトロトルエン(純度 99%超)が、105 週間混餌投与された。それぞれの群において、2 週目および 3、12 ならびに 18 ヶ月の時点で雌雄 5 匹ずつを無作為に選択し、尿中代謝物の分析に供した。代謝産物:クレアチニン比を用いて、代謝産物データの間での比較が行われた。クレアチニンに対する 2-アミノ安息香酸の比は、対照群および被験物質投与群の雌雄において、ほぼ同様であった。クレアチニンに対する 2-ニトロ安息香酸の比は、投与濃度と線形的な相関を示し、全体として、被験物質投与群の雌は、被験物質投与群の雄よりも高い値を示した。クレアチニンに対する 2-ニトロベンジルメルカプツール酸の比も、投与濃度と線形的な相関を示し、被験物質投与群の雌は、被験物質投与群の雄よりも顕著に低い値を示した。雄ラットでは 2-ニトロベンジルメルカプツール酸が多く排泄され、一方雌では 2-ニトロ安息香酸が多く排泄されており、代謝には性差が存在するように思われた。2-ニトロ安息香酸でも 2-ニトロベンジルメルカプツール酸でも、生成の第 1 段階は、メチル基の酸化によりベンジルアルコールが生じることであり、代謝の性差は、カルボン酸へのさらなる酸化の過程、もしくはアルコールの抱合体の形成およびその抱合体と還元グルタチオンとのさらなる反応の過程のいずれかにおいて生じていると考えて間違いない。



## マウス

品質の高い、GLP に準拠した複数の試験が、NTP(2002)により実施されている。これらの試験では、9～11 週齢(被験物質投与時)の B6C3F1 マウスが用いられ、2-ニトロトルエンの単回投与後の代謝および排泄が検討された。

最初の試験では、4 匹の雄の群に、Emulphor®を媒体として、 $[^{14}\text{C}]$ -2-ニトロトルエン(純度 98%以上)が、200 mg/kg 体重の用量で強制経口投与された。投与後 4、8、24、48 および 72 時間までの尿および糞便が回収され、放射活性が測定された。2-ニトロトルエン代謝物は主として尿中に排泄され、投与後 24 時間までに投与用量の 66%が、投与後 48 時間までに投与用量の 74%が回収された。放射活性の総回収量は、87% (尿中に 78%および糞便中に 9%)であった。尿中代謝産物のプロファイルが、HPLC により分析された。主要な尿中代謝産物は 2 種類だけで、2-ニトロ安息香酸(A, 38%)および 2-ニトロベンジルグルクロニド(B, 24%)であった。尿をグルクロニダーゼ/スルファターゼとインキュベートしたところ、代謝産物のプロファイルが変化した。最も顕著であったのは、ピーク G の増高をもたらすピーク B の消失であった。精製スルファターゼとインキュベートした場合には、ピーク B が維持されたことから、ピーク B は硫酸抱合体ではなく、グルクロニドであることが確認された。ピーク G の正体は 2-ニトロベンジルアルコールであることが、当該化合物の真正標準品と共溶出されたことから確認された。

2 件目の試験では、雄 3 匹の群に、Emulphor®:エタノール:水(1:1:8)を媒体として、 $[^{14}\text{C}]$ -2-ニトロトルエン(純度 98%以上)が、2 mg/kg 体重の用量で強制経口投与された。投与後 24、48 および 72 時間までの尿および糞便が回収され、放射活性が測定された。放射活性の排泄は、用量 200 mg/kg 体重の場合と同様で、投与用量の約 60%が投与後 24 時間までに、69%が投与後 48 時間までに尿中に排泄された。放射活性の総回収量は、108% (尿中に 85%および糞便中に 23%)であった。マウスにおいても、主要な尿中排泄物は、2-ニトロ安息香酸と 2-ニトロベンジルグルクロニドであったが、2-アミノベンジルアルコールも少量(4%)ながら検出された。

3 種類の尿中代謝産物(2-ニトロ安息香酸、2-ニトロベンジルメルカプツール酸、および 2-アミノ安息香酸)が曝露のバイオマーカーとして選択され、それらの指標を用いて、曝露濃度と内部用量との間の相関性が検討され、また、2-ニトロトルエンの代謝が曝露の長期化や加齢によりどのように変化するかが検討されている。NTP(2002)が実施した発がん性試験では、B6C3F1 マウス(6 週齢)に、0、1250、2500 ないしは 5000 ppm の濃度で、2-ニトロトルエン(純度 99%超)が、105 週間混餌投与された。それぞれの群において、2 週目および 3、12 ならびに 18 ヶ月の時点で雌雄 5 匹ずつを無作為に選択し、尿中代謝物の分析に供した。代謝産物:クレアチニン比を用いて、代謝産物データの間での比較が行われた。

定量するのに十分なデータが得られた時点においては、尿中に排泄されたクレアチニンに対する 2-ニトロ安息香酸の比は、雌雄両方において、投与濃度と線形的な相関を示しているように思われた。2-ニトロベンジルメルカプツール酸および 2-アミノ安息香酸の濃度は、全般的に定量限界未満であった。性差は認められなかった。

### *In vitro* 試験

雄の Fischer 344 ラットから分離した肝細胞および肝ミクロソームを用い、それらによる 2-ニトロトルエンの代謝についての検討が行われている (deBethizy and Rickert, 1984)。肝細胞を、10~1000  $\mu\text{M}$  の濃度の [芳香環- $^{14}\text{C}$ ]2-ニトロトルエン (純度 99% 超) と、様々な時間設定でインキュベートした。インキュベートの際加えられた総放射活性の回収率は、90% を上回っていた。細胞の生存性は、インキュベーション時間が 90 分に至るまでは、影響を受けなかった。45 分間のインキュベートにより、2-ニトロトルエン (200  $\mu\text{M}$ ) は、2-ニトロベンジルアルコール (52%)、2-ニトロベンジルアルコールグルクロニド (28%)、未同定代謝産物 (20%) および ニトロ安息香酸 (3%) に転換された。肝細胞とのインキュベートの場合、2-ニトロトルエンの濃度が変化しても、いずれの代謝産物についても、総代謝産物に占める割合が大きく変化することはなかった。インキュベートされた混合物中からの 2-ニトロトルエンの消失に関する半減期は、約 27 分であった。2-ニトロベンジルアルコールは、最初の 20 分にかけては、時間と共に直線的に増加した。未同定代謝産物と 2-ニトロベンジルアルコールグルクロニドは、45 分のインキュベート時間において、最初の 10 分間は増加を示さなかったが、その後は直線的に増加した。肝ミクロソームを最長 90 分間 [芳香環- $^{14}\text{C}$ ]2-ニトロトルエンとインキュベートした場合には、生成した代謝産物はニトロベンジルアルコールのみであり、その生成は、最初の 20 分間は直線的であるように思われた。要約すると、肝ミクロソームを用いた場合では、2-ニトロトルエンは、最初にチトクロム P-450 依存性の反応によりメチル基の酸化を受けることが示され、一方、ラット肝細胞を用いた場合では、グルクロン酸との抱合により 2-ニトロベンジルアルコールを生じる (主要経路) か、酸化により 2-ニトロ安息香酸を生じる (非主要経路) ことが示された。

2-アミノベンジルアルコールが N-水酸化の基質であるという観点から、2-ニトロトルエンの代謝における 2-アミノベンジルアルコールの役割を検討した試験が行われている (Rickert, Chism and Kedderis, 1986)。この試験では、2-アミノベンジルアルコール (最終濃度 0.5 mM) を、NADPH の存在下で、ラット肝ミクロソームと 30 分間インキュベートした。2-アミノベンジルアルコールから、 $\text{Fe}^{3+}$  を還元する能力を有する代謝産物が生成した。代謝産物の生成速度は、ミクロソームタンパク 1 mg 当たりの還元当量で示すと、 $0.29 \pm 0.01$  nmol/min であった。反応混合物を酢酸エチルで抽出して HPLC で分析したところ、三価鉄イオンを還元する能力のある 2 種類の代謝産物が生成していることが明らかとなった。ミ

クロソームにより生成した代謝産物と合成 2-ヒドロキシルアミノベンジルアルコール標準品について、保持時間に関して比較を行ったところ、代謝産物の 1 つが 2-ヒドロキシルアミノベンジルアルコールであることが示された。もう一方の代謝産物は同定されていないが、水酸基を有するアミノベンジルアルコールであることが示唆されている。これらのデータは、提言されている活性化機序と整合する。すなわち、2-ニトロトルエンは、胆汁中に排泄される 2-ニトロベンジルグルクロニドへと転換されるという機序である。腸内細菌叢の働きにより、このグルクロニドは、肝チトクロム P-450 依存性の N-水酸化の基質である、2-アミノベンジルアルコールへと転換され得る。硫酸転移酵素阻害剤の *in vivo* 投与により肝 DNA への共有結合が 96% を超える割合で減少する (Rickert *et al.*, 1984 を参照) ことから、2-ニトロトルエンは代謝されて[訳注:2-アミノベンジルアルコールを経て]非常に活性の強い不安定な N,O-硫酸化物を生じ、これが分解することで求電子性のニトレニウムイオン[訳注:肝 DNA との共有結合にあずかる]を生じると考えられる。

2-アミノベンジルアルコールの活性化に関連する代謝経路を明らかにするために、[芳香環-U-<sup>14</sup>C]2-アミノベンジルアルコールを、仔ウシ胸腺 DNA の存在下で、様々な混合物系でインキュベートした。すなわち、Fischer-344 ラットもしくはアカゲザルの肝サイトゾルと 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸 (PAPS [訳注:硫酸転移酵素による反応における補酵素]) の系、Fischer-344 ラットもしくはアカゲザルの肝ミクロソームおよび NADPH の系、Fischer-344 ラットもしくはアカゲザルの肝ミクロソームとサイトゾルに PAPS と NADPH を加えた系である。インキュベートした系のいくつかには、2,6-ジクロロ-4-ニトロフェノール (DCNP) も加えられた。DNA を分離し、共有結合した <sup>14</sup>C を測定した。いずれの動物種についても、2-アミノベンジルアルコールは、PAPS とサイトゾルが存在した場合にのみ、DNA に共有結合し得る代謝物へと活性化された。PAPS 依存性の結合 (ラットのサイトゾルではサルサイトゾルでの 5 倍) は、DCNP により阻害された。インキュベート後の混合物の HPLC 分析により、主要な代謝産物として、PAPS 依存性の酸に不安定な 1 種類の化合物の存在が明らかとなった (ラットでは加えた基質の 11%、サルでは加えた基質の 5% がこの化合物へと転換された)。この化合物は、DCNP を加えた場合は低減した (加えた基質の 2%)。試験の結果 (要約のかたちで報告されている) から、DNA との共有結合に与る 2-ニトロトルエン代謝産物の前駆体は、2-アミノベンジルアルコールの硫酸抱合体であり、おそらくは硫酸 2-アミノベンジルであることが示唆された (Chism and Rickert, 1987)。

2-アミノベンジルアルコールの活性化に係る代謝経路の検討が、適切な組み合わせの様々な酵素源および補因子を用いて、*in vitro* で行われている (Chism and Rickert, 1989)。仔ウシ胸腺 DNA と [芳香環-U-<sup>14</sup>C]2-アミノベンジルアルコール (純度 98%) が、雄の Fischer-344 ラットの肝サイトゾルおよび PAPS と、ミクロソームおよび NADPH と、もしくは、ミクロソームおよびサイトゾルに PAPS、NADPH およびアセチル補酵素 A を加えたものとイ

ンキュベートされた。また、DCNP もしくは NADP が、PAPS は存在するがまだ基質を加えていないサイトゾルのインキュベート系に添加された。このほかに、 $[^{14}\text{C}]$  2-アミノベンジルアルコールを、PAPS、雄の Fischer-344 ラットのサイトゾルおよび肝細胞核とインキュベートし、DNA やタンパク質と結合した放射活性を測定した。試料の pH を塩酸で 3 に調整し、また、試料をスルファターゼとインキュベートすることで、酸加水分解および酵素的加水分解をそれぞれ実行した。インキュベートしたサイトゾル混合物の分析により、放射活性化合物が DNA に共有結合したことが判明し、この代謝産物については、暫定的に硫酸 2-アミノベンジルと同定された(M1)。この代謝産物の生成は、PAPS の存在を必要とし、DCNP により阻害された。NADP は、代謝産物 M1 の生成に影響を及ぼさなかったが、DNA に結合する放射活性を減少させた。ミクロソームとのインキュベートの場合は、NADPH が存在するか否かには関係なく、DNA に結合した放射活性はほとんど認められなかった。しかし、ミクロソームタンパク質に結合した放射活性は、NADPH 存在下では増加し、サイトゾルタンパク質に結合した放射活性の約 2 倍であった。HPLC 分析により、NADPH 依存性に生成する 1 つの代謝産物の存在が判明し、この代謝産物については、暫定的に 2-(N-ヒドロキシアミノ)ベンジルアルコールと同定された(M2)。ミクロソームとサイトゾルの両方の存在下では、DNA に結合する放射活性物質の生成や代謝産物 M1 の出現は、インキュベート系に PAPS が加えられていた場合にのみ認められた。NADPH が加えられていた場合には、代謝産物 M2 の生成が認められた。アセチル補酵素 A を加えることにより、1 つの代謝産物が生成され、この代謝産物は、暫定的に 2-(N-アセチルシアミノ)-ベンジルアルコールと同定された(M3)。PAPS が無い場合には、NADPH とアセチル補酵素 A が加えられていても、DNA に結合した放射活性は認められなかった。サイトゾルとミクロソームを含むが補因子を含まない系でインキュベートした場合と比較すると、タンパク質に結合した放射活性は、NADP を含む系では増加し、アセチル補酵素 A を含む系では低減し、PAPS を含む系では同程度であったかわずかに増加した。胸腺 DNA の代わりに肝細胞核を用い、サイトゾル、PAPS および[芳香環- $^{14}\text{C}$ ]2-アミノベンジルアルコールとインキュベートした場合には、DNA やタンパク質に結合した放射活性が認められた。サイトゾルと PAPS が無い場合には、DNA に結合した放射活性が 70%減少し、タンパク質に結合した放射活性が増加した。これらのデータから、2-アミノベンジルアルコールの代謝には、細胞の高分子物質との結合を生じさせるものとして、酵素介在性の 2 つの経路が存在することが示唆される。一方は、PAPS と肝サイトゾル酵素を必要とし、DNA と共有結合する化合物を生成する経路である。この場合、硫酸転移酵素阻害剤である DCNP により、DNA への共有結合は減少し、スルファターゼ易分解性の代謝産物が PAPS 依存性に生成するのが抑制された。したがって、この場合に生成される活性代謝産物は、硫酸 2-アミノベンジルと考えられる。もう一方は、肝ミクロソーム酵素と NADPH を必要とし、タンパク質と共有結合する中間体を生成する経路である。この場合、PAPS は、タンパク質と

結合する化合物の生成に対して何ら影響を及ぼさない様であり、アセチル補酵素 A は、タンパク質への共有結合を低減させた。これらのデータから、2-(N-ヒドロキシアミノ)ベンジルアルコールもしくは 2-アミノベンジルアルコールのフェノール性代謝産物が、タンパク質に共有結合する反応性化合物の前駆体となっていることが示唆される。また、アセチル補酵素 A 介在性の 2-(N-アセチルアミノ)ベンジルアルコールの生成が、解毒経路の 1 つとなっている可能性が示唆される。

2-ニトロベンジルアルコールのグルタチオン抱合における硫酸化の役割を解明するため、2-ニトロベンジルアルコールをラット肝サイトゾルとインキュベートした試験が、PAPS 生成系の存在下もしくは非存在下で行われている。インキュベート後の混合物の HPLC 分析では、2-ニトロベンジルアルコールのグルタチオン抱合体の生成は認められなかった(NTP, 2002)。

#### 4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

##### In vivo 試験

##### 吸入

データは、得られていない。

##### 経皮

データは、得られていない。

##### 経口

データは、得られていない。

##### In vitro 試験

データは、得られていない。

#### 4.1.2.1.3 他の情報

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

F-344 ラットを用い、経口投与(200 mg/kg 体重)により、 $^{14}\text{C}$ -2-ニトロトルエンの生体内分布および肝臓の高分子物質との共有結合に関する検討が行われている(Long and Rickert, 1983)。肝臓、小腸、盲腸内容物および門脈血の試料が、3、6、12、24、48 および 96 時間の時点で採取された。組織のホモジネートおよび血液試料は、放射活性の測定に供され、また、個々の代謝物を得るために HPLC 分析された。また、それらの試料の TCA 沈殿物を総量分析に供し、肝臓の高分子物質に共有結合した量を推定した。 $^{14}\text{C}$ -2-ニトロトルエンの肝臓の高分子物質への共有結合は、12 時間の時点で最高となり、その後ゆっくりと減少した。2-ニトロトルエン投与後 96 時間の時点でもなお、共有結合量は、初回の測定時(3 時間の時点)よりも上回っていた。腸管や門脈血への 2-ニトロトルエン代謝産物の出現は、共有結合した  $^{14}\text{C}$  が最大濃度となる(12 時間の時点)のより前であり、このことから、反応性代謝産物の生成には腸肝循環が関与していることが示唆された。腸管では、2-ニトロトルエン投与の後、ニトロベンジルアルコールグルクロニド(NBA1cG)が大量に検出された。その他に、未同定の 2 種類の代謝産物、アセトアミド安息香酸およびニトロ安息香酸も検出された。これらのデータから、2-ニトロトルエンはおそらく NBA1cG への代謝を受けて活性化されることが示唆された。

Rickert *et al.*(1984)は、Fischer-344 ラットを用い、DNA などの肝臓の高分子物質と 2-ニトロトルエンの共有結合に対し、硫酸転移酵素阻害剤が及ぼす影響を検討した。この試験では、ラット(18 匹、70~80 日齢)に、コーン油を媒体として、[芳香環- $^{14}\text{C}$ ]2-ニトロトルエン(純度 99%超)が、200 mg/kg 体重の用量で強制経口投与された。投与後 3、6、12、24、48 および 96 時間の時点でラットを 3 匹ずつ選択し、メトキシフルランで麻酔し、肝臓を摘出して総放射活性量および共有結合した放射活性量を測定した。その結果、総放射活性濃度は投与後 6~12 時間の時点で最大となり、続く 12~24 時間の時点にかけて急速に減少した。一方、共有結合した物質の放射活性濃度は投与後 12 時間の時点で最大となり、その後ゆっくりと減少した。DNA をラットの肝臓から分離したところ、用いた分析法の検出限界を上回る共有結合が認められた。硫酸転移酵素阻害剤である PCP や DCNP による影響は、27 匹のラットを用いて調べられた。そのうちの 9 匹には、DCNP を腹腔内投与(プロパン-1,2-ジオールを媒体として 40  $\mu\text{mol/kg}$  体重)し、別の 9 匹には PCP を腹腔内投与(プロパン-1,2-ジオールを媒体として 40  $\mu\text{mol/kg}$  体重)し、残りの 9 匹にはプロパン-1,2-ジオールのみを投与した。この前処置の 45 分後、各群から 3 匹を選択し、コーン油を媒体として、[芳香環- $^{14}\text{C}$ ]2-ニトロトルエン(純度 99%超)を、150 mg/kg 体重の用量で経口投与した。12 時間後、被験動物を頸椎脱臼法により屠殺した。肝臓を取り出し、共有結合にあず

かる放射活性を測定した。DCNP や PCP の前投与により、肝臓の高分子物質との共有結合がそれぞれ 63%および 57%減少し、DNA との共有結合は 96%を超える割合で減少した。これらの結果から、2-ニトロトルエンが肝臓の DNA と共有結合可能な化合物へと転換されるためには、硫酸転移酵素の作用が必要であることが示唆される。

Marques *et al.* (1997) は、芳香族アミンの窒素原子における反応に着目した試験を行っている (NTP, 2002 の中で引用)。その結果、生成する DNA 付加体の構造が、芳香族アミンのオルト、メタおよびパラ置換体により引き起こされる遺伝毒性反応において、決定的な因子となっていることが示された。オルト置換体の付加体は、シン構造をとる傾向が認められ、一方、メタおよびパラ置換体では、アンチ構造をとる傾向が認められた。この事象は、*o*-ニトロトルエン代謝産物のベンジル位の炭素で生じる反応にも当てはまる様である。なぜならば、*o*-ニトロトルエンは雄ラットを用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成試験で DNA 修復を誘発するのに対して、*m*-および *p*-ニトロトルエンではそのような誘発が認められなかったからである。

#### 4.1.2.1.4 トキシコキネティクス、代謝、および分布の要約

2-ニトロトルエンのトキシコキネティクスのデータは、ヒトに関しては得られていない。しかし、実験動物、特にラットを用いて実施された経口投与試験のデータが、いくつか得られている。*In vitro* 試験からも、代謝に関する付加的な情報が得られている。

#### 吸収

2-ニトロトルエンは、ラットやマウスにおいて、速やかに吸収され、よく代謝され、そして急速に排泄される。

雄ラットに 200 mg/kg 体重の 2-ニトロトルエンを投与した試験では、2-ニトロトルエンの血漿中濃度は、投与の 15~60 分後に最大となり、その後速やかに減少し、投与の 24 時間後には検出限界未満となった。2-ニトロトルエンの血漿中半減期は、約 1.5 時間であった (NTP, 2002)。

カニューレを装着したラットに、放射性標識した 2-ニトロトルエンが 200 mg/kg 体重の用量で投与され、12 時間後までの放射活性の排泄が測定された。胆汁に排泄された放射活性は、雄で投与用量の 29%、雌で投与用量の 10%であった。尿中に排泄された放射活性は、雄で投与用量の 36%、雌で投与用量の 33%であった。糞中排泄は、投与用量の 2%未満であった。糞便への排泄が 2%未満であったことから、標識化合物が消化管から再吸収され

ていると考えられる。

ラットにおける経口での吸収率は、2 mg/kg 体重を単回経口投与した場合の放射活性の排泄結果(雌雄とも 95%を超える量が尿中に排泄)に基づき、24 時間以内に 100%であると判断された。性差は認められなかった。また、ラットに 200 mg/kg 体重の用量で単回あるいは反復投与した場合でも、同様の結果が得られている。

雄マウスにおける経口での吸収率は、2 mg/kg 体重を単回経口投与した場合の放射活性の排泄結果(尿中に 85%)に基づき、72 時間以内に 100%であると判断された。マウスに 200 mg/kg 体重を単回投与した場合でも、同様の結果が得られている。

吸入経路での曝露に関するデータは、得られていない。したがって、吸入では最悪の吸収(すなわち 100%)が生じるとみなすべきである。

経皮経路での曝露に関するデータは、得られていない。したがって、経皮吸収については、2-ニトロトルエンの物理化学的性質(分子量 137.14, log P<sub>ow</sub> 値 2.3)および経口曝露のデータに基づき、デフォルト値の 100%が適用されるべきである。

## 分布

適切なデータは、得られていない。しかし、2-ニトロトルエンの経口投与を受けたラットやマウスでは、様々な器官で毒性が示された(反復毒性試験の項を参照)ことから、体内に広範に分布するものと思われる。ラットでは、主として肝臓、腎臓、脾臓、精巣および造血系で毒性が認められている。また、排泄データ(ラットやマウスで投与の 24 または 72 時間後に測定された、尿および糞便中への放射活性の総回収量)に基づく、「体内に蓄積する証拠」は示されていないと言える。

## 代謝

げっ歯類を用いた試験では、尿試料中には親化合物は検出されなかった。ラットやマウスで同定された尿中代謝産物を、Figure 1 に示す。

ラットでは、少なくとも 9 種類の尿中代謝産物が同定されている。すなわち、2-ニトロ安息香酸、2-ニトロベンジルグルクロニド、S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステイン、S-(2-ニトロベンジル)グルタチオン、硫酸 2-ニトロベンジル、2-ニトロベンジルアルコール、2-アミノ安息香酸、2-アミノベンジルアルコール、および *o*-トルイジンである(Chism, Turner and Rickert, 1984; NTP, 2002)。代謝産物のプロファイルは、2 mg/kg 体重を投与した



場合と 200 mg/kg 体重を投与した場合とで同様であった。ただし、最も顕著な相違として、2 mg/kg 体重の場合の方が、2-ニトロ安息香酸や 2-ニトロベンジルグルクロニドとして排出される割合がより大きいという知見が得られている。反復投与した場合でも、S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステインの低減が認められた他は、尿中代謝産物のプロファイルにおける明らかな相違は認められなかった。性別による相違が認められ、雌では雄よりも、2-アミノベンジルアルコールや S-(2-ニトロベンジル)-N-アセチルシステインの排泄が少なく、2-ニトロ安息香酸の排泄が多かった(NTP, 2002)。

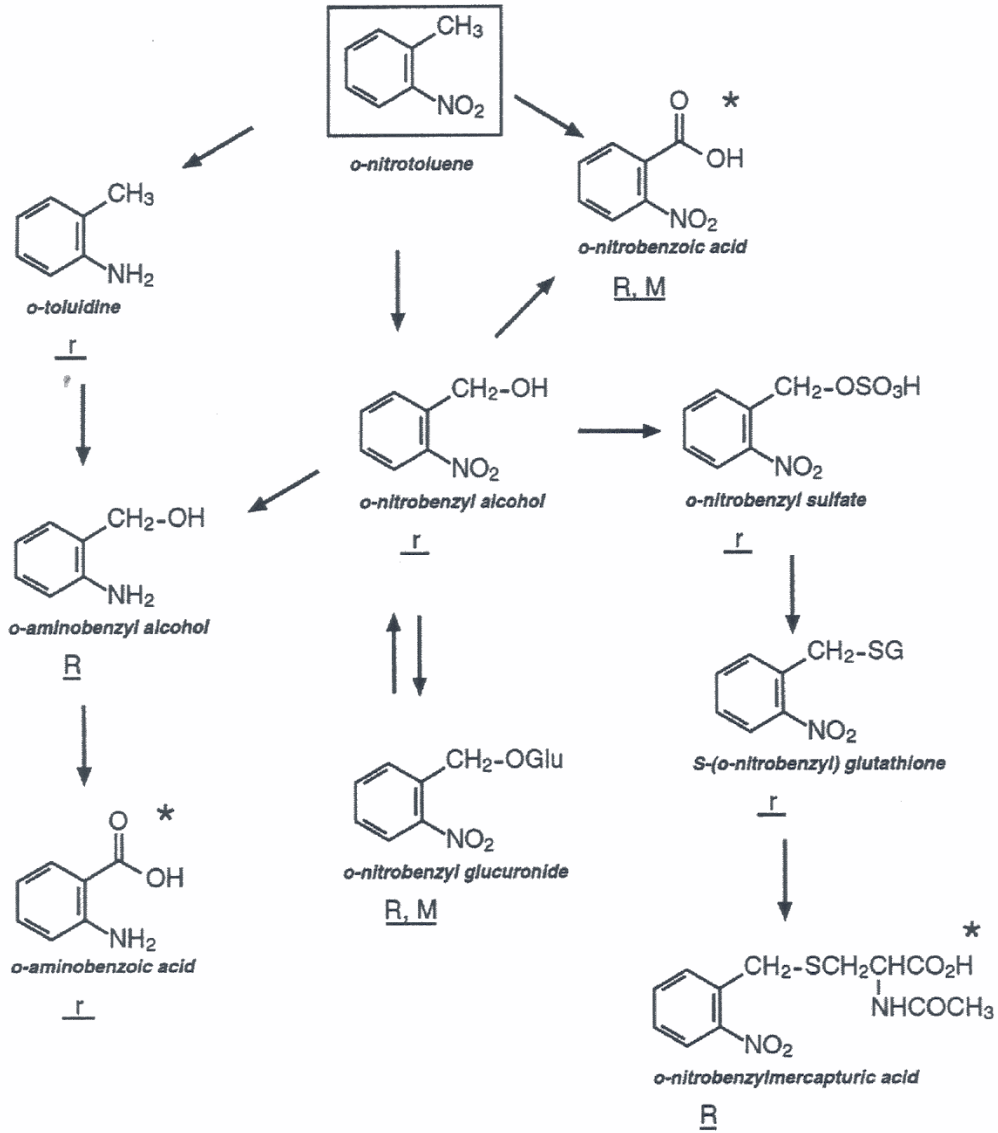
雄マウスでは、200 mg/kg 体重を投与した場合の主要な尿中代謝産物は、2-ニトロ安息香酸および 2-ニトロベンジルグルクロニドであったが、2 mg/kg 体重を投与した場合は、さらに少量の 2-アミノ安息香酸も検出された(NTP, 2002)。

2-ニトロトルエンをラットに投与した場合、胆汁に排泄される主要な代謝産物は、2-ニトロベンジルグルクロニドであった。この代謝産物は、雄では雌の約 3 倍排泄された。次に胆汁への排泄が多かった代謝産物は、S-(2-ニトロベンジル)グルタチオンであり、雄では雌の約 10 倍排泄された(Chism and Rickert, 1985)。DNA との共有結合や遺伝毒性については性差が認められているが、これらは、代謝産物の胆汁排泄が雄において雌よりも多いことから説明付けられる。

*In vivo* および *in vitro* 試験で得られた全てのデータに基づくと、2-ニトロトルエンの代謝は、チトクロム P450 が介在するニトロベンジルアルコールへの酸化を端緒とし、以下の 4 つの代謝経路へとつながっているものと言える。すなわち、a) 2-ニトロ安息香酸への酸化; b) 2-ニトロメルカプツール酸生成へとつながるグルタチオン抱合; c) 2-アミノ安息香酸の生成につながるニトロ基の還元; および d) 2-ニトロベンジルグルクロニドの生成につながるグルクロン酸抱合である(Figure 1)。この最後の経路が、2-ニトロトルエンの生体内活性化において重要であると思われる(Figure 2)。胆汁中に排泄された 2-ニトロベンジルグルクロニドは、腸内細菌叢の加水分解作用および還元作用により 2-アミノベンジルアルコールへと転換され、その後全身性に再吸収されると考えられている。2-アミノベンジルアルコールの硫酸化が高分子化合物との共有結合につながっていることから、最後の活性化段階は、硫酸転移酵素に依存するものである。酵素を介する 2 つの経路が関与している。一方は、*in vitro* では PAPS とサイトゾル酵素を用いた系で示された経路で、DNA に共有結合する化合物(おそらく硫酸 2-アミノベンジル)を生成する。硫酸 2-アミノベンジルの DNA との反応性は、アミノ基が電子供与性を有することに起因して反応性のベンジル陽イオンが容易に生成されることと関係付けられる。もう一方は、*in vitro* では肝ミクロソーム酵素と NADPH を用いた系で示された経路で、タンパク質に共中間体を生成する。2-アミノベンジルアルコールが 2-(N-ヒドロキシアミノ)ベンジルアルコールへと酸化された後、硫酸化を経て不安定な N-硫酸化合物となる。この N-硫酸化合物は、求電子性のニトロニウムイ

EURAR 2-NITROTOLUENE

オンやカルボニウムイオンへと分解する。*o*-ニトロトルエンは *in vivo* 不定期 DNA 合成試験で DNA 修復を引き起こし、一方 *m*-もしくは *p*-ニトロトルエンは DNA 修復を引き起こさないことから、以前に *o*-芳香族アミンで(ニトロ基で生じる反応に着目して)示されている様に、DNA 付加体のシン構造(*o*-ニトロトルエン代謝産物ではベンジル位の炭素で生じる反応に着目)が、遺伝毒性に関する決定的な因子であると思われる。



\* Measured in urine (NTP, 2002)

Figure 1: Composite metabolic scheme for *o*-nitrotoluene in rats and mice (Chism, Turner and Rickert, 1984; NTP, 2002). Abbreviations: Major (R) or minor (r) urinary metabolite in rats; (M) metabolite in mice

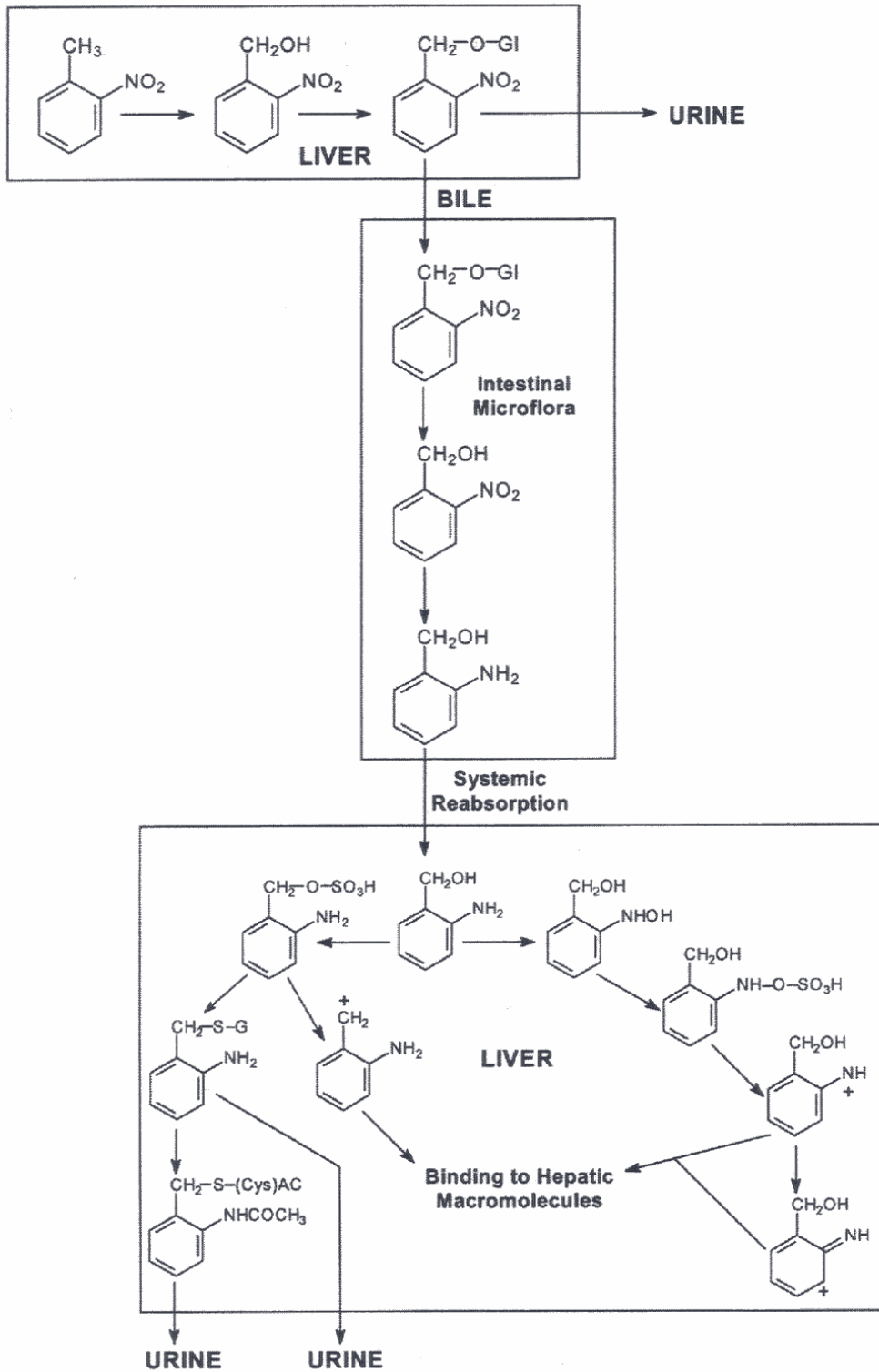


Figure 2: Proposed pathway for bioactivation of *o*-nitrotoluene (Chism and Rickert, 1985)

## 排泄

2-ニトロトルエンを経口投与した場合、親化合物と代謝産物が、尿中、糞便中および呼気中へ、多量に速やかに排泄された。臓器や組織に蓄積するという証拠は、示されていない。

排泄経路は、ラットとマウスで同様で、主として尿中であった。放射標識被験物質を 2 mg/kg 体重の用量で単回投与した場合、72 時間までに回収された放射活性は、尿中に 100% (ラット) および 85% (マウス)、糞便中に 4~5% (ラット) および 23% (雄マウス) であった。マウスではラットより多量の放射活性が糞便中に回収されているが、これは糞便が尿により汚染されていたことによると考えられる (NTP, 2002)。呼気中には、極めて微量の放射活性 (0.1%) が検出された (Chism, Turner and Rickert, 1984)。

排泄速度はマウスよりもラットの方が速く、ラットでは投与後 24 時間までにほぼ 100% の放射活性が尿中に排泄された。マウスでは、同じ期間に尿中に排泄された放射活性は、投与量の 70% 未満であった。

雌雄のラットを同様に処置した場合、12 時間後に測定した胆汁中への排泄量は、雌 (10%) よりも雄 (29%) の方が多かった。糞便中への排泄が胆汁中への排泄に反比例して低値を示したことから、放射性標識物質が腸管から再吸収されると推定される。また、胆管カニューレの装着により肝臓での共有結合が阻害される。このことから、排泄には腸肝循環が関与していることが示唆される (Chism and Rickert, 1985)。

### 4.1.2.2 急性毒性

#### 4.1.2.2.1 動物試験

##### In vivo 試験

いくつかの試験が、異なる動物種を用いて、様々な投与経路により実施されている。それらを Table 4.1.2.2.1 にまとめて示した。

## 吸入

2-ニトロトルエンの急性吸入毒性データが、ラットを用いた 3 件の試験およびマウスを用いた 1 件の試験から得られている。これらの試験は、1972~77 年にかけて報告されたもので、ガイドライン策定以前に実施されており、GLP に準拠していない。これらの試験のい

ずれも、現行のガイドラインに沿って実施されたものではない。また、被験物質の純度についての報告もなされていない。

## ラット

Brown & Reinhardt (1972) の試験では、平均濃度 209 ppm (実測・分析値、1.17 mg/L) の 2-ニトロトルエン蒸気に、雄の ChR-CD ラットが 1 時間曝露された。2-ニトロトルエンは、シリンジ駆動装置により、加熱されたステンレス製の管に、所定量導入された。生じた蒸気は、室内空気を媒体として、10 匹の被験動物を入れた 20 L の容器に運び入れられた。被験動物のいずれに対しても、肉眼剖検や組織病理学的検査は実施されなかった。曝露期間中に被験動物にみられた臨床徴候は、軽微なものだけであった (頻繁な洗顔動作、頻繁な毛づくろい動作、努力性呼吸、眼からの赤みを帯びた物質の分泌)。また、曝露後の体重増加率は正常であった。

Hollander and Weigand (1975a) の試験では、190.8 ppm (1.086 mg/L) の 2-ニトロトルエン飽和蒸気に、雄の SPF Wistar ラット (6 匹) が 8 時間曝露された。14 日間の観察期間中、死亡例、毒性徴候および肉眼病変は認められなかった。

Kinkead *et al.* (1977) の試験では、320 ppm (1.795 mg/L) の 2-ニトロトルエン飽和蒸気に、雄の Sprague-Dawley CFE ラットが 4 時間曝露された。この濃度での飽和度は、77% と算出された。飽和蒸気は、フリットディスクを供試物質に浸し、それを介して爆気を行うことにより生成させた。その後、得られた蒸気を、10 匹の被験動物を収容した 9 L のガラスチャンバーへ送り、通過させた。14 日間の観察期間中、死亡例、毒性徴候および肉眼病変は認められなかった。被験動物は、14 日間の観察期間中、正常な体重増加を示した。

## マウス

Kinkead *et al.* (1977) の試験では、354 ppm (1.986 mg/L) の 2-ニトロトルエン飽和蒸気に、雄の Sprague-Dawley CF-1 マウスが 4 時間曝露された。この濃度での飽和度は、85% と算出された。飽和蒸気は、フリットディスクを供試物質に浸し、それを介して爆気を行うことにより生成させた。その後、得られた蒸気を、10 匹の被験動物を収容した 9 L のガラスチャンバーへ送り、通過させた。14 日間の観察期間中、死亡例、毒性徴候および肉眼病変は認められなかった。被験動物は、14 日間の観察期間中、正常な体重増加を示した。

## 経皮

2-ニトロトルエンの急性経皮毒性データが、ウサギを用いた 2 件の試験およびラットを用

いた 1 件の試験から得られている。これらの試験は、1972～77 年にかけて報告されたもので、ガイドライン策定以前に実施されており、GLP に準拠していない。ただし、これらの試験は、被験物質の純度を示していないものの、大まかには現行の試験ガイドラインに沿っていると思われる。

### ラット

雌の SPF Wistar ラット 6 匹を用い、5000 mg/kg 体重の単用量で、限度試験が実施されている。被験物質は、無希釈で毛刈りした背部に適用され、絆創膏により被覆された状態で 24 時間保持され、その後洗浄された。14 日間の観察期間中、死亡例や毒性徴候は、いずれも認められなかった (Hollander and Weigand, 1975b)。

### ウサギ

雌の New Zealand アルビノウサギ 3 羽を用い、20000 mg/kg 体重の単用量で、限度試験が実施されている。被験物質は、無希釈で毛刈りした背部に適用され、ガーゼパッチ、ラテックスゴム、歯科用ゴムシートおよび伸縮性の接着テープにより被覆された状態で 24 時間保持され、その後除去された。その後の 14 日間の観察期間中、全てのウサギで臨床徴候は認められず、正常な体重増加が示された。

6 羽の雄のアルビノウサギを用いた試験では、2-ニトロトルエンが、200 mg/kg 体重の用量で、背部の毛刈りした無傷の皮膚に適用された。被験物質の塗布後、ウサギの胴体を、Saran®ラップ、伸縮性のガーゼ包帯および伸縮性の接着テープで被覆した。24 時間後、被覆物を取り除き、皮膚を洗浄し、乾燥させた。被験動物にプラスチック製の首輪を装着し、残留物を全く摂取できない様にした。それから 48 時間、観察を行った。死亡例や臨床徴候は認められなかった (McDonnell and Reinhardt, 1972)。

### 経口

2-ニトロトルエンの急性経口毒性は、ラット、マウスおよびウサギで検討されている。データが得られた試験は、1972～85 年にかけて報告されたものであり、ガイドライン策定前に実施されており、GLP に準拠していない。これらの試験の多くは、被験物質の起源や試験方法の記載が十分でないなど、品質に難がある。

最も品質の高い試験は、Ciss がラットを用いて行ったものである (Ciss, 1978; Ciss *et al.*, 1980a)。2-ニトロトルエン(純度 99%超)が、中性化したオリーブ油を媒体として、Wistar ラットに強制経口投与された。まず、雄 3 匹ずつの 4 群に、1700、2900、5800 ないしは

11600 mg/kg 体重の用量で投与された。いずれの被験物質投与群においても死亡例が認められた。具体的には、1700 mg/kg 体重群で 1/3 匹(投与の 24 時間後)、2900 mg/kg 体重群で 2/3 匹(投与の 24 ないしは 48 時間後)、5800 mg/kg 体重群で 3/3 匹(投与の 24 時間後)、および 11600 mg/kg 体重群で 3/3 匹(投与の 24 時間後)が死亡した。この結果を受けて、雌雄 10 匹ずつの 6 群に対して、1000、1500、2000、2500、3000 ないしは 4000 mg/kg 体重の用量で投与が行われた。1500 mg/kg 体重以上の群では、以下の様に死亡例が認められた。1500 mg/kg 体重群では、3/20 匹が死亡した(投与後 18~24 時間に♂1/10 匹、♀2/10 匹)。2000 mg/kg 体重群では、9/20 匹が死亡した(投与後 18~24 時間に♂2/10 匹、♀4/10 匹、および投与後 48 時間に♂3/10 匹)。2500 mg/kg 体重群では、15/20 匹が死亡した(投与後 18~24 時間に♂5/10 匹、♀6/10 匹、および投与後 48 時間に♂2/10 匹、♀2/10 匹)。3000 mg/kg 体重群では、16/20 匹が死亡した(投与後 18~24 時間に♂6/10 匹、♀8/10 匹、および投与後 48 時間に♂2/10 匹)。4000 mg/kg 体重群では、20 匹全て(♂10 匹、♀10 匹)が、投与後 18~24 時間に死亡した。Barlett(1937)の指針[訳注: Bartlett 検定と思われる]に基づき、Miller & Tainer 法を用いた算出を行うことにより、LD<sub>50</sub>は、雌雄両方において 2100 ± 145 mg/kg 体重と判定された。肉眼病理所見についての記載はなされていない。特徴的な毒性徴候は、投与開始後 5 分ないしは 10 分で生じる興奮であった。呼吸促迫および痙攣が認められた。それに続いて活動低下期が認められ、それは 24 時間持続することもあった。死亡例は投与後 2 日目までに生じ、生残した動物は徐々に回復し、1 週目の終わりには完全に回復した。さらに、Wistar ラット(10 匹)に、2-ニトロトルエンを 3000 mg/kg 体重の単用量で経口投与し、眼底から採取した血液を用い、SH 基やメトヘモグロビン含量など、生化学的パラメータに関する測定を行った(Ciss, 1978)。8/10 匹が死亡した。3/10 匹は投与後 24 時間に、4/10 匹は投与後 48 時間に、そして 1/10 匹は投与後 1 週間に死亡が確認された。SH 基の含量は、投与前が 10.76 ± 0.11 mmol/L であったのに対し、投与後 4 時間では 10.76 ± 0.10 mmol/L、投与後 24 時間では 10.5 ± 0.10 mmol/L、投与後 48 時間では 10.3 ± 0.14 mmol/L、投与後 1 週間では 10.1 ± 0.18 mmol/L、そして投与後 2 週間では 10.1 ± 0.19 mmol/L であった。メトヘモグロビン含量(総ヘモグロビンに対する割合で表示)は、投与前が 0.73% であったのに対し、投与後 48 時間では 1.07% であった。死亡例の多くは、やはり投与後 2 日目までの期間に生じた。SH 基の含量の軽度な減少は、非直接的な機序による毒性影響を引き起こし、システインなどの生育に必須なアミノ酸の不動化や除去といった結果をもたらすと考えられる。

EURAR 2-NITROTOLUENE

Table 4.1.2.2.1: Summary of acute toxicity of 2-nitrotoluene in experimental animals

Route	Species	Dosage	LC50 (mg/L) or LD50 (mg/kg b.w.)	Comments	References
<b>Inhalatory</b>	Rat, ChR-CD (♂) 10 rats/group	209 ppm = 1.17 mg/L (1 h)	>1.17 mg/L	Purity not given	Brown and Reinhardt (1972)
	Rat, SPF Wistar (♂) 6 rats/group	190.8 ppm = 1.086 mg/L (8 h)	>1.086 mg/L	Purity not given	Hollander and Weigand (1975a)
	Rat, Sprague-Dawley CFE (♂) 10 rats/group	320 ppm = 1.795 mg/L (4 h)	>1.795 mg/L	Purity not given	Kinkead <i>et al.</i> (1977)
	Mouse, Sprague-Dawley CF-1 (♂) 10 mice/group	354 ppm = 1.986 mg/L (4 h)	>1.986 mg/L	Purity not given	Kinkead <i>et al.</i> (1977)
<b>Dermal</b>	Rat, SPF Wistar (♀) 6 rats/group	5000 mg/kg b.w. (24 h)	>5000 mg/kg b.w.	Purity not given Limit test	Hollander and Weigand (1975b)
	Rabbit, albino (♂) 6 rabbits/group	200 mg/kg b.w. (24 h)	>200 mg/kg b.w.	Purity not given	McDonnell and Reinhardt (1972)
	Rabbit, albino New Zealand (♀) 3 rabbits/group	20000 mg/kg b.w. (24 h)	>20000 mg/kg b.w.	Purity not given Limit test	Kinkead <i>et al.</i> (1977)
<b>Oral</b>	Rat		891 (530-1584) mg/kg b.w.	Purity not given. Method not reported.	Back, Thomas and MacEwen (1972)
	Rat, SPF Wistar (♀) 10 rats/group	1600, 2000, 2500, 3200, 4000 mg/kg b.w. (by gavage in sesame oil).	2546 (2343-2766) mg/kg b.w.	Purity not given.	Hollander and Weigand (1975c)
	Rat		1610 mg/kg b.w.	Purity not given.	Vasilenko and Kovalenko (1976)
	Rat, Sprague-Dawley (♂)		890 (500-1580) mg/kg b.w.	Purity not given. Experimental details not documented	Vernot <i>et al.</i> (1977)
	Rat, Wistar (♂,♀) 10 rats/sex/group	1000, 1500, 2000 2500, 3000, 4000 mg/kg bw. (by gavage in olive oil).	2100 ± 145 mg/kg b.w.	>99% purity. ↓-SH group and ↑methaemoglobin (3000 mg/kg bw). Clinical signs related with the formation of methaemoglobin.	Ciss (1978)* Ciss <i>et al.</i> (1980a)*
	Rat		891 mg/kg b.w.	Purity not given. Method not reported.	NIOSH (1985)
	Mouse		2462 (1789-3390) mg/kg b.w.	Purity not given. Method not reported.	Back, Thomas and MacEwen (1972)
	Mouse		970 mg/kg b.w.	Purity not given. Method not reported.	Vasilenko and Kovalenko. (1976)
	Mouse, CF-1 (♂)		2460 (1790-3390) mg/kg b.w.	Purity not given. Experimental details not documented.	Vernot <i>et al.</i> (1977)
	Mouse		970 mg/kg b.w.	Purity not given. Method not reported.	NIOSH (1985)
	Rabbit		1750 mg/kg b.w.	Purity not given. Method not reported	Vasilenko and Kovalenko. (1976)

\*) Studies of good quality for risk assessment



一方、ネコを用いて、単回投与による造血系への影響が調べられている (Hollander and Weigand, 1975d)。2匹のネコに、ゴマ油に溶解した2-ニトロトルエン(純度は示されていない)が、100 mg/kg 体重の用量(LD<sub>50</sub>未満)で、強制経口投与された。3時間後、被験動物全体でみると、白血球数の増加が認められ、白血球数百分率を測定した結果、好中性顆粒球の増加とリンパ球の減少が認められた。これらの変化はおおむね 24 時間以内に回復した。ハイツ小体の増加も観察された(一方のネコでは 11.5%、もう一方のネコでは 15%)。1～48 時間後の期間には、メトヘモグロビンの生成は検出されなかった。設定した測定時点(1、3、7、24 および 48 時間後)では、特に 1 時間後に既にハイツ小体数が増加していた事実と照らすと、メトヘモグロビンの生成は検出できなくなっていたのではないかと考えられる。被験動物の外観や行動には、変化は認められなかった。

#### In vitro 試験

データは、得られていない。

#### 4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

##### In vivo 試験

急性毒性に特化した試験のデータは、吸入曝露のものに限られている。

ただし、Hazardous Substances Data Base(有害物質データベース: HSDB, 2004)の中で引用されている別の参考文献から、以下の様な情報が得られている。a) 2-ニトロトルエンは、どの経路(吸入、摂取、経皮吸収)によっても毒性を示す。b) 2-ニトロトルエンは、低酸素症を引き起こすメトヘモグロビンを生成させるが、その能力は低い。c) 標的器官は、血液、中枢神経系、消化管、心血管系および皮膚である。臨床徴候および症状は、頭痛、顔面紅潮、浮動性めまい、呼吸困難、チアノーゼ、悪心、嘔吐、筋力低下、脈拍や呼吸数の増加、神経過敏および痙攣である。しかし、元のデータが得られないため、曝露-反応関係を判断することができない。

##### 吸入

ヒト(男性および女性)が有害影響を被ることなく化学産業の職場で働けるようにするために、空気中の様々な気体、粉塵、煙および金属の有害濃度が、それを超えると満足な状態が得られなくなる上限の値として確立されている (Goldblatt, 1955)。2-ニトロトルエン蒸気については、情報は表に示された濃度に限られる。その表によれば、200 ppm(1140 mg/m<sup>3</sup>)

の濃度で 60 分間の曝露により、ヒトに重大な毒性影響が及ぼされると考えられる。また、40 ppm (228 mg/m<sup>3</sup>) は、その濃度での曝露が短時間では済まなかった場合に疾患の徴候が導かれることから、不耐容濃度であると考えられる。さらに、1 ppm (5.7 mg/m<sup>3</sup>) は、正常状態の上限濃度であると考えられる。その濃度表には、臨床記録や試験記録の綿密な検討により得られたヒトへの影響に関するデータを考慮して、詳細な記載がなされている。

また、200 ppm は、生命や健康へ直ちに危険が及ぶ (Immediately Dangerous to Life or Health: IDLH) 濃度であると、米国労働安全衛生研究所 (NIOSH) により確定されている [米国技術情報局 (NTIS) 公表文献 n° PB-94-195047, May 1994]。

### 経皮

データは、得られていない。

### 経口

データは、得られていない。

### In vitro 試験

データは、得られていない。

#### **4.1.2.2.3 急性毒性の要約**

2-ニトロトルエンの急性毒性は、ラットやマウスを用いた試験(吸入)、ラットやウサギを用いた試験(経皮)、およびラットやマウスないしはウサギを用いた試験(経口)において検討されている。

データが得られた吸入毒性試験は、特に被験物質の特定(純度が報告されていない)の観点から、品質に難がある。しかし、結果に一貫性があるため、それらの試験は、リスク評価に有用であると考えられる。飽和蒸気での曝露では、ラットを 190.8 ppm (1.086 mg/L) の濃度で 8 時間曝露した場合でも、ラットを 320 ppm (1.795 mg/L) の濃度で 4 時間曝露した場合でも、マウスを 354 ppm (1.986 mg/L) の濃度で 4 時間曝露した場合でも、14 日間の観察期間中、2-ニトロトルエンにより致死性や毒性が示されることはなく、肉眼病変が発生することもなかった。したがって、EU の基準に照らして、分類の必要性は無い。

データが得られた経皮毒性試験は、特に被験物質の起源(純度が報告されていない)の観点から、品質に難がある。しかし、結果に一貫性があるため、それらの試験は、リスク評価に有用であると考えられる。限度試験において、2-ニトロトルエン(ラットの試験においては 5000 mg/kg 体重、ウサギの試験においては 20000 mg/kg 体重)は、14 日の観察期間中、致死性も毒性も示さなかった。したがって、EU の基準に照らして、分類の必要性は無い。

急性経口毒性に関するデータは得られているが、それらの試験は品質に難がある(被験物質の純度についての報告がなされているのは 1 件のみ)。しかし、それらの試験の結果には一貫性があり、リスク評価に有用であると考えられる。それらの結果によると、経口 LD<sub>50</sub> は、ラットにおいて 890~2546 mg/kg 体重の範囲、マウスにおいて 970~2462 mg/kg 体重の範囲であり、ウサギにおいては 1750 mg/kg 体重と判定された。毒性の臨床徴候は、メトヘモグロビン形成に関連したものであった。低い方の LD<sub>50</sub> 値(ラットにおける 890 mg/kg 体重)に基づくと、2-ニトロトルエンは、EU の基準に照らして Xn R22 に分類される。これらの試験から得られる数値の中で、リスクの総合評価の目的にみあう信頼性を有するものは、この LD<sub>50</sub> 値だけである。

様々な経路について、ヒトが曝露された場合の影響が報告されているが、それらのほとんどはメトヘモグロビン形成によるものと考えられる。ただし、急性毒性に関するデータは、吸入曝露の場合のものに限られている(Goldblatt, 1955)。また、これらのデータには曝露期間についての報告が付随しておらず、急性毒性のリスク評価の出発点とされる NOAEC や LOAEC を決定することができない。そのため、それらのデータは、考慮から除外されている。

したがって、急性毒性のリスク評価は、動物試験のデータに基づいて行われている。

#### 4.1.2.3 刺激性

急性皮膚刺激性試験および急性眼刺激性試験について、得られたデータを Table 4.1.2.3 にまとめて示した。

Table 4.1.2.3: Summary of acute toxicity (irritation) of 2-nitrotoluene in experimental animals

Exposure	Species	Protocol	Effect	References
Dermal	Rabbit, albino 6 rabbits	The test substance (99.2% purity) is applied undiluted (0.5 ml/rabbit) to intact areas of skin. 4 h exposure, observations at 24 and 48 h.	Not irritating	Edwards and Reinhardt (1973)*
	Rabbit, SPF albino Himalayan 6 rabbits	The test substance (purity not given) is applied undiluted (0.5 ml/rabbit) and diluted in sesame oil (0.5 ml 10% dilution/ rabbit) to clipped intact and scarified areas of skin. 24 h exposure, observations at 24, 48 and 72 h.	Not irritating	Hollander and Weigand (1975e)
	Rabbit, albino New Zealand (♀) 6 rabbits	The test substance (purity not given) is applied undiluted (0.5 ml/rabbit) to intact and abraded areas of skin. 24 h exposure, observations at 24 and 72 h.	Not irritating	Kinkead <i>et al.</i> (1977)
	Rabbit, albino (♂) 6 rabbits	The test substance (>99% purity) is applied undiluted (0.5 ml/rabbit) to intact and abraded areas of skin. 24 h exposure, observations at 24 and 72 h.	Not irritating	Ciss (1978)* Ciss <i>et al.</i> (1981)*
Ocular	Rabbit, SPF albino Himalayan 6 rabbits	The test substance (purity not given) is applied undiluted (0.1 ml/rabbit). 24 h exposure, observations at 1, 7, 24, 48 and 72 h.	Not irritating	Hollander and Weigand (1975e)
	Rabbit, albino (♂) 6 rabbits	The test substance (>99% purity) is applied undiluted (0.1 ml/rabbit). ≥ 24 h exposure, observations at 24, 48 and 72 h.	Not irritating	Ciss (1978)* Ciss <i>et al.</i> (1981)*

\*) Studies considered of good quality for risk assessment

#### 4.1.2.3.1 皮膚

##### 動物試験

ウサギを用いて 2-ニトロトルエンの皮膚刺激性が調べられている。1973～81 年にかけて実施された 4 件の試験の情報が得られているが、これらの試験はガイドライン策定以前に実施されたものであり、GLP に準拠していない。これらのうち 2 件(Edwards and Reinhardt, 1973; Ciss, 1978 and Ciss *et al.*, 1981)だけが、リスクの総合評価の目的にかなうものとみなされた。残りの試験は、特に被験物質の特定に関して曖昧な点があるなど、品質に難があ

EURAR 2-NITROTOLUENE

るものと考えられたためである。Edwards and Reinhardt(1973)の試験、Ciss(1978)およびCiss *et al.*(1981)の試験のいずれも、6羽のウサギを用いて行われた。

Edwards and Reinhardt(1973)の試験では、無希釈の2-ニトロトルエン(1羽当たり 0.5 mL)が、無傷の皮膚領域に塗布された。塗布部位は、ガーゼパッチで被覆され、さらにゴム製シートで緩く覆われた。4 時間後、ゴム製シートとガーゼパッチを取り除き、皮膚に何らかの反応が現れていないかを観察した。その後、塗布部位を洗浄した。塗布の 24 および 48 時間後にも、皮膚反応の観察を行った。刺激性の評価方法やスコアについての報告は、なされていない。

Ciss(1978)および Ciss *et al.*(1981)の試験でも、無希釈の2-ニトロトルエン(1羽当たり 0.5 mL)が適用された。被験物質はガーゼパッチに塗布され、それが無傷の皮膚領域および擦過処置を施した皮膚領域にあてがわれた。このガーゼパッチを、ゴム製シートで緩く覆った。24 時間後、ゴム製シートとガーゼパッチを取り除き、皮膚反応を評価した。その後、塗布部位を洗浄した。適用の 24 および 72 時間後に皮膚反応の評価を行い、被験動物の観察は、適用から 1 週間続けられた。刺激性の評価は、Draize *et al.*(1944)が記載した方法に従って行われた。以下に結果を示す。

Erythema and eschar formation	Reading times	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3	Rabbit 4	Rabbit 5	Rabbit 6	Mean value
Intact skin	24 h	0	0	0	0	0	0	0
Intact skin	72 h	0	0	0	0	0	0	0
Abraded skin	24 h	2	1	2	2	1	1	1.5
Abraded skin	72 h	0	0	0	0	0	0	0

Oedema formation	Reading times	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3	Rabbit 4	Rabbit 5	Rabbit 6	Mean value
Intact skin	24 h	0	0	0	0	0	0	0
Intact skin	72 h	0	0	0	0	0	0	0
Abraded skin	24 h	2	1	0	1	0	0	0.66
Abraded skin	72 h	0	0	0	0	0	0	0

これらの結果に基づき、2-ニトロトルエンは、無傷の皮膚に対し、刺激性を示さないと判断された。擦過処置が施された皮膚に関しては、紅斑や痂皮形成が、24 時間後の時点で被験動物の 3 匹に認められたが、それらは持続的ではなく、最後の観察時点、すなわち 72 時間後には認められなくなっていた。

### ヒトにおける試験

データは得られていない。しかし、HSDB (2004)において、2-ニトロトルエンは皮膚刺激性を示すと述べられている。

#### 4.1.2.3.2 眼

##### 動物試験

ウサギを用いた試験により、2-ニトロトルエンの眼刺激性が調べられている。2件の試験の報告が得られているが、これらはガイドライン策定前の1975～81年にかけて実施されたもので、GLPに準拠していない。そのうちの1件では、被験物質の純度に関する報告がなされておらず、そのため、Cissによって実施された試験(Ciss, 1978; Ciss *et al.*, 1981)だけが、リスクの総合評価にみあうものと考えられた。Cissの試験では、6羽の雄のアルビノウサギが用いられ、無希釈の2-ニトロトルエンが適用された(1羽当たり0.1 mL)。曝露期間は24時間以上とし、24、48および72時間の時点で、各被験動物の眼を検査した。刺激性の評価は、Draize *et al.* (1944)が記載した方法に従って行われた。反応の観察が行われたどの時点においても、いずれの被験動物でも、角膜混濁、虹彩病変、結膜発赤および結膜浮腫に関するスコアは0であった。したがって、2-ニトロトルエンは眼に対して刺激性を示さないと判断された。

### ヒトにおける試験

データは得られていない。しかし、HSDB (2004)において、2-ニトロトルエンは眼刺激性を示すと述べられている。International Programme on Chemical Safety(国際化学物質安全性計画)の化学物質安全情報データベース(IPCS INCHEM, 2000)にも、2-ニトロトルエンが、眼に発赤や疼痛を引き起こすと述べられている。

#### 4.1.2.3.3 気道

##### 動物試験

げっ歯類を用いた急性吸入毒性試験では、気道に対する刺激の徴候は何も認められなかった。しかし、マウスへの混餌投与が行われた亜慢性試験(NTP, 1992)および発がん性試験(NTP, 2002)では、雌雄両方において1250 ppm以上の濃度の場合に、嗅上皮変性が認めら

れている。この嗅上皮変性は、2-ニトロトルエンの吸入に関連した刺激作用を反映したものである可能性がある。しかし、この影響は、同様の揮発性を有する他の異性体(*m*-および *p*-ニトロトルエン)では認められておらず、また、ラットにおいては生じていない。ただし、この病変の重症度は、曝露濃度が上昇するにしたがって増悪している。嗅上皮変性は、壊死、萎縮、再生、過形成、肥大および化生からなる複合病変であった。もっとも顕著に表れた変化は、嗅上皮、ボーマン腺および嗅神経束の萎縮であり、この変化には、線毛円柱細胞からなる呼吸様上皮への嗅上皮の置換が伴われており、それらの細胞は背側鼻道表面を覆い、粘膜に入り込んで拡張した偽腺を形成していた。これらの試験で認められたこの様な嗅上皮変性や化生の発生機序は、明らかにされていない。

### ヒトにおける試験

データは得られていない。しかし、HSDB(2004)において、2-ニトロトルエンは、気道に対して刺激性を示すと述べられている。

#### **4.1.2.3.4 刺激性の要約**

HSDB(2004)において、2-ニトロトルエンは、皮膚、眼および気道に対して刺激性を示すと述べられている。しかし、詳細な情報が無く、他にヒトにおけるデータが得られていないことを考慮すると、刺激性についての検討は、動物試験のデータに基づくことになる。

急性曝露の場合の 2-ニトロトルエンの刺激性(皮膚および眼に対して)は、ウサギを用いて検討されている。それらの結果に基づき、EU の基準に照らすと、分類は必要とされない。

急性吸入試験においては、呼吸器の刺激症状は何も認められていない。マウスへの混餌投与が行われた亜慢性毒性試験および発がん性試験の両方で、嗅上皮変性が認められているが、この様な影響はラットでは生じなかった。また、この影響は、同様の揮発性を有する他の異性体では認められなかった。したがって、この嗅上皮変性は、マウスだけに認められる全身性の影響であり、2-ニトロトルエンを呼吸器刺激性に関して分類するのは適切ではないと考えられる。

結論として、2-ニトロトルエンは、皮膚、眼および気道に対して刺激性を示さないとと言える。

#### 4.1.2.4 腐食性

動物試験(4.1.2.3 項参照)では、2-ニトロトルエンは皮膚、眼および気道に刺激症状を引き起こさないことが示されている。

#### 4.1.2.5 感作性

皮膚感作性および呼吸器感作性に関するデータは、得られていない。しかし、ヒトにおいて皮膚感作性や呼吸器感作性を支持する報告が得られていないことは、意味があることと考えられる。

#### 4.1.2.6 反復投与毒性

##### 4.1.2.6.1 動物試験

###### In vivo 試験

###### 亜急性毒性試験

###### 吸入

データは、得られていない。

###### 経皮

データは、得られていない。

###### 経口

ラットやマウスを用いて、2-ニトロトルエンの亜急性経口毒性が調べられている。これらの試験は、1973～1993 にかけて報告されたものであり、Table 4.1.2.6.1-1 にそれらをまとめて示した。



## ラット

NTP(1992)の試験では、F344/N ラット(各群雌雄 5 匹ずつ、42 日齢)に、2-ニトロトルエン(純度 96%超)が、0、625、1250、2500、5000 ないしは 10000 ppm の濃度で、14 日間混餌投与された(雄における用量は 0、56、98、178、383 および 696 mg/kg 体重、雌における用量は 0、55、102、190、382 および 779 mg/kg 体重)。被験物質の投与に先立って、13~15 日の馴化期間が設けられた。この試験は、13 週間毒性試験においてどのくらいの用量を高用量とすべきかを判断するために行われた。最高用量群の雄およびその次の高用量群の雄において、平均体重増加量の減少および飼料消費量の減少が認められたが、それ以外には臨床徴候は認められず、死亡例も生じなかった。臨床生化学的検査や血液学的検査のデータは、示されていない。顕微鏡による組織検査が行われたのは、肝臓だけであった。最高用量群の雄で、卵形細胞の過形成がわずかに認められた。雌の肝臓には、病変は認められなかった。この試験は、OECD ガイドライン 407 に則ったものではなかったが、GLP に準拠したものであり、13 週間毒性試験における最高濃度(10000 ppm)を選択するのに有用であった。

Ciss の試験では、Wistar ラット(各群雌雄 10 匹ずつ、体重約 200 g)に、オリーブ油を媒体として、2-ニトロトルエン(純度 99%)が、0、500 ないしは 1000 mg/kg 体重の用量で、28 日間週 5 日で強制経口投与された(Ciss, 1978; Ciss *et al.* 1980a)。1000 mg/kg 体重群では、1 週間以内に死亡例が生じた。500 mg/kg 体重群では、被験物質投与の 3 または 4 日目までの間に、軽度の疲労が認められた。臨床生化学的検査、血液学的検査および組織病理学的検査のデータは、いずれも示されていない。この試験は OECD ガイドライン 407 や GLP に準拠しておらず、NOAEL を決定するためには不適切であると考えられた。

Kaneko *et al.*(1993)の試験では、Wistar ラット(各群雌雄 6 匹ずつ)に、コーン油を媒体として、2-ニトロトルエン(純度は示されていない)が、0、3、6、18、90 ないしは 450 mg/kg 体重の用量で、28 日間胃内投与された。さらに 2 群を設け、0 ないしは 450 mg/kg 体重で投与を行い、投与期間に続けて 2 週間飼育し、回復期間の検討を行った。血液学的検査および生化学的検査が行われており、その結果、90 および 450 mg/kg 体重群において、赤血球数、ヘモグロビン含量、ヘマトクリット値および血清総タンパク質量の減少が認められた。組織病理学的検査も実施されており、90 および 450 mg/kg 体重群で、脾臓におけるヘモジデリン沈着、鬱血および髄外造血が認められ、また 450 mg/kg 体重では、肝臓における細胞の膨張と胆管拡張も観察された。回復期間の後には、これらの症状は減弱または消失しており、全ての影響が可逆的なものであることが示唆された。この試験のデータは、要約文の中で公表されたものであり、リスクの総合評価に利用することはできない。

Kovalenko(1973)の試験では、322 mg/kg 体重の 2-ニトロトルエン(純度は示されていない)が、30 日間ラットに強制経口投与され、造血系への影響が調べられた。血液学的パラメー

タへの影響に関するデータから、貧血が生じることが示唆された。軽度なスルフヘモグロビン血症と、血液凝固時間の延長が認められた。この試験は OECD ガイドライン 407 や GLP に準拠しておらず、NOAEL を決定するためには不適切であると考えられた。

## マウス

Lysy *et al.* (1988) の試験では、雌の B6C3F<sub>1</sub> マウスに、600 mg/kg 体重の 2-ニトロトルエン（純度は示されていない）が、14 日間強制経口投与され、IgM 抗体形成細胞のヒツジ赤血球への反応性を調べることにより、液性免疫への影響が検討された。2-ニトロトルエンは、IgM の反応性に影響を及ぼさなかった。

NTP (1992) の試験では、B6C3F<sub>1</sub> マウス（各群雌雄 5 匹ずつ、42~49 日齢）に、2-ニトロトルエン（純度 96%超）が、0、388、675、1250、2500 ないしは 5000 ppm の濃度で 14 日間混餌投与された（雄における用量は 0、63、106、204、405 ないしは 854 mg/kg 体重、雌における用量は 0、134、217、397、631 ないしは 1224 mg/kg 体重）。この試験は、13 週間毒性試験においてどの位の用量を高用量とすべきかを判断するために実施され、被験物質の投与に先立って、13~14 日の馴化期間が設けられた。死亡例は認められなかった。体重はばらついてしたが、最高濃度群のマウスでは、対照群よりも低値の傾向が認められた。体重への影響以外には、被験物質投与に明らかに関連していると思われる毒性の臨床徴候はとくに認められなかった。臨床生化学的検査データや血液学的数値の測定データは示されていない。剖検では、最高用量側 3 群の雄において、肝臓重量に多少の増加が認められた。顕微鏡学的検査が行われたのは、肝臓のみであった。雌雄どちらにおいても、肝臓に病変は認められなかった。この試験は、OECD ガイドライン 407 に則ったものではなかったが、GLP に準拠したものであり、13 週間毒性試験における最高濃度 (10000 ppm) を選択するのに有用であった。

## EURAR 2-NITROTOLUENE

Table 4.1.2.6.1-1: Summary of oral sub-acute toxicity studies in experimental animals administered 2-nitrotoluene

Species, sex and number	Protocol	Results and Comments	References
Rat, F344/N (♂, ♀) 5/sex/group	14 days, daily, diet 0, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 ppm (0, 56, 98, 178, 383, 696 mg/kg b.w. in males; 0, 55, 102, 190, 382, 779 mg/kg b.w. in females). >96% purity. GLP	↓ b.w. gain and ↓ feed consumption from 5000 ppm and minimal oval cell hyperplasia in liver at 10000 ppm (♂). Therefore, a high dose of 10000 ppm was selected for the 13-week toxicity study. No determinations on clinical biochemistry and haematology.	NTP (1992)*
Rat, Wistar (♂, ♀) 10/sex/group	28 days (5 days/week), gavage, olive oil 0, 500, 1000 mg/kg b.w. 99% purity.	Mortality within 1 week at 1000 mg/kg b.w. A slight fatigue during the 3 <sup>rd</sup> or 4 <sup>th</sup> intoxication day at 500 mg/kg b.w. Not information on clinical biochemistry, haematology or histopathology	Ciss (1978) Ciss <i>et al.</i> (1980a)
Rat, Wistar (♂, ♀) 6/sex/group	28 days, daily, intragastic, corn oil 0, 3.6, 18, 90, 450 mg/kg Purity not given An additional group of rats exposed to 450 mg/kg was used for investigate subsequent recovery for 2 weeks	<u>Haematopoietic system</u> : ↓erythrocytes, ↓volume of haemoglobin, ↓ hematocrit and ↓ concentration of total serum protein from 90 mg/kg. <u>Spleen</u> : hemosiderin deposition, congestion and extramedullary haematopoiesis from 90 mg/kg. <u>Liver</u> : hepatocytes swelling and bile duct proliferation at 450 mg/kg group. After the recovery period, these symptoms were diminished or weaker, suggesting that all the effects were reversible.	(Kaneko <i>et al.</i> , 1993).
Rat	30 days, daily, gavage 322 mg/kg b.w Purity not given.	Sulphahaemoglobinemia and prolonged blood clotting time. Study designed to observe effects on haematopoietic system	Kovalenko (1973)
Mouse B6C3F1 (♀)	14 days, gavage 600 mg/kg Purity not given.	Not altered IgM response. Study designed to determine effects on humoral immunity by estimating the IgM antibody forming cell response to sheep erythrocytes	Lysy <i>et al</i> (1988)
Mouse, B6C3F1 (♂, ♀) 5/sex/group	14 days, daily, diet 0, 388, 675, 1250, 2500, 5000 ppm (0, 63, 106, 204, 405, 854 mg/kg b.w. in males; 0, 134, 217, 397, 631, 1224 mg/kg b.w. in females) >96% purity. GLP.	↓ b.w. gain at 5000 ppm. Therefore, a high dose of 10000 ppm was selected for the 13-week toxicity study. No determinations on clinical biochemistry and haematology	NTP (1992) *

\*) Studies considered of good quality for risk assessment.

## 亜慢性毒性試験

### 吸入

データは、得られていない。

経皮

データは、得られていない。

経口

2-ニトロトルエンの亜慢性経口毒性が、ラットおよびマウスで調べられている。1973～1996年にかけて報告された試験から、データが得られている。

ラット

Kovalenko(1973)の試験では、ラットに 322 mg/kg 体重の 2-ニトロトルエン(純度は示されていない)が 3 ヶ月間(週 3 日)強制経口投与され、造血系への影響が検討された。血液学的パラメータへの影響に関するデータから、貧血が生じることが示唆された。軽度なスルフヘモグロビン血症と、血液凝固時間の延長が認められた。この試験は OECD ガイドライン 407 や GLP に準拠しておらず、NOAEL を決定するためには不適切であると考えられた。

実質的に OECD ガイドライン 408 および GLP に準拠して、F344/N ラットを用いた試験が実施されている(NTP, 1992; Dunnick, Elwell and Bucher, 1994)。10～15 日間の馴化期間の後に、各群雌雄 10 匹ずつ(6 週齢)に対し、2-ニトロトルエン(純度 96%超)が、0、625、1250、2500、5000 ないしは 10000 ppm の濃度で 13 週間混餌投与された(雄における用量は 0、45、89、179、353 ないしは 694 mg/kg 体重、雌における用量は 0、44、87、178、340 ないしは 675 mg/kg 体重)。生残率への影響は認められず、毒性の臨床徴候は、最高用量側 3 群における平均体重増加量と飼料消費量減少に限られており、それらは特に雄で顕著であった。血液学的検査、臨床生化学的検査、剖検および組織病理学的検査の結果に基づくと、被験物質投与に関連した影響として、Table 4.1.2.6.1-2.1 に定性的にまとめて示したものが挙げられる。病変の発生率や重症度については、Table 4.1.2.6.1-2.2 にまとめて示した。

**肝臓：**剖検では、10000 ppm 投与群の雄全例で、肉眼病変が認められた。肝臓は、対照群と比べて肥大化した外観を示しており、また褪色化し、散在性の病巣を有していた。肝臓の相対重量は、625 ppm 以上の群の雌雄両方において、濃度依存的な増加を示した。13 週目の終わりには、雄および雌の血清に生化学的影響が見られ、顕著であったのは、最高用量側の 2 群の雌雄両方における、軽度から中等度の胆汁酸濃度の上昇であった。これらの変化は、雄に限って、ALT および SDH の活性の軽微な上昇を伴っていたが、この知見は、胆汁鬱滞や肝細胞機能低下が見られたことと整合している。2500 ppm 以上の群の雄に限って、顕微鏡学的非腫瘍性病変が認められ、それらの病変は、細胞質空胞変性、卵形細胞の過形成および炎症からなるものであった。被験物質投与との関係は、炎症については、他

の肝病変と比べて不明確であった。炎症の発生率は、高濃度群でわずかに上昇していたが、重症度は、被験物質投与群全群および対照群にわたり同等であった。

**腎臓：**腎臓の相対重量は、雌では 1250 ppm 以上の群、雄では 2500 ppm 以上の群において状増加していた。雄においても雌においても、被験物質投与に関連した病変が認められた。雌では 2500 ppm 以上の群で、また、雄では 5000 ppm 以上の群で、腎皮質の尿細管上皮の細胞質に、褐色の色素小球の蓄積が観察された。この色素の出現に加え、1250 ppm 以上の群の雄では、硝子滴腎症が確認され、これは  $\alpha$ -2 $\mu$  グロブリン濃度の上昇に起因するものと考えられた。

**造血系/脾臓：**剖検では、10000 ppm 群の雄 5 匹の脾臓に、対照群におけるよりも色が濃い病変やわずかに肥厚した病変が、肉眼的に認められた。血液の生化学的変化が、軽度の再生成貧血と整合して認められた。貧血の機序には、ハインツ小体の形成や赤血球寿命の短縮へとつながる、ヘモグロビンの酸化的損傷が関与していると考えられる。顕微鏡学的病変は、造血像の増加(2500 ppm 以上の群の雄および 5000 ppm 以上の群の雌)、およびヘモジデリン沈着(2500 ppm 以上の群の雌雄)を特徴としていた。造血像やヘモジデリン沈着の発生率や重症度は、用量の増加とともに増高した。さらに、脾膜の線維化が、1250 ppm 以上の群の雄および 5000 ppm 以上の群の雌で観察され、10000 ppm 群におけるその発生率は、雄で 9/10 匹、雌で 2/10 匹であった。

**生殖器系：**雌において被験物質投与に関連するものとして認められた影響は、10000 ppm 群における発情周期の延長だけであった。雄の剖検では、最高濃度群の精巣は、対照群よりも縮小化した外観を示しており、また褪色化し、散在性の病巣を有していた。10000 ppm 群では、精巣の相対重量が減少しており、2500、5000 および 10000 ppm 群では、精巣上体の絶対重量が、対照群よりも明らかに減少していた。5000 および 10000 ppm 群では、顕微鏡学的所見(精細管の変性)および精液の観察結果(精子の数、密度および運動性の低下)から、精巣の機能障害が生じていたことが示された。さらに、10000 ppm 群の雄 2 匹は、精巣上体表面の精巣鞘膜に中皮細胞の過形成を有しており、5000 ppm 群の雄 3 匹には、これと同じ解剖学的領域に中皮腫が生じていた。

Table 4.1.2.6.1-2.1: Summary of main treatment-related effects observed in the rat NTP (1992) study

<b>RATS</b>	Male	Female
Final Body Weight (90% or less than control)	↓(3) <sup>a</sup>	↓(3)
<b>Liver</b>		
Relative weight	↑(1)	↑(1)
ALT	↑(4)	-
SDH	↑(3)	-
Bile Acids	↑(4)	↑(5)
Nonneoplastic lesions	+(3)	-
<b>Kidney</b>		
Relative weight	↑(3)	↑(2)
Nonneoplastic lesions	+(2)	+(3)
<b>Spleen</b>		
Hematology	(3)	(3)
Nonneoplastic lesions	+(2)	+(3)
<b>Testis</b>		
Sperm count	↓(4)	
Nonneoplastic lesions	+(4)	
<b>Epididymis</b>		
Neoplastic and preneoplastic lesions	+(4)	
<b>Estrous cycle length</b>		
		↑(5)

<sup>a</sup> Lowest dose group in which an effect was seen, 1 = 625 ppm (45 mg/kg b.w in ♂, 44 mg/kg b.w in ♀); 2 = 1250 ppm (89 mg/kg b.w in ♂, 87 mg/kg b.w in ♀); 3 = 2500 ppm (179 mg/kg b.w in ♂, 178 mg/kg b.w in ♀); 4 = 5000 ppm (353 mg/kg b.w in ♂, 340 mg/kg b.w in ♀); 5 = 10000 ppm (694 mg/kg b.w in ♂, 675 mg/kg b.w in ♀).

<sup>+</sup> Presence of treatment-related histopathology.

Table 4.1.2.6.1-2.2: Incidence and severity of the lesions observed in the rat NTP (1992) study<sup>a</sup>

Dose (ppm)	0	625	1250	2500	5000	10000
<b>MALE</b>						
<i>Liver</i>						
oval cell hyperplasia	0	0	0	2 (1.0)	10 (1.2)	10 (2.2)
vacuolization	0	0	0	6 (1.3)	9 (1.8)	10 (3.0)
inflammation	5 (1.8)	5 (1.0)	5 (1.6)	10 (1.5)	10 (1.8)	8 (1.8)
<i>Kidney</i>						
nephropathy, hyaline droplet	0	0	6 (1.0)	10 (1.6)	10 (2.8)	9 (2.6)
regeneration	2 (1.0)	6 (1.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	5 (1.0)	6 (1.1)
pigment	0	0	0	0	1 (1.0)	10 (1.0)
<i>Spleen</i>						
hematopoiesis	0	0	0	6 (1.3)	10 (2.0)	10 (2.0)
hemosiderin pigment	0	0	0	7 (1.3)	10 (2.0)	10 (2.0)
capsular fibrosis	0	0	1 (1.0)	1 (2.0)	1 (1.0)	9 (1.9)
<i>Testis</i>						
degeneration	0	0	0	0	10 (2.3)	10 (4.0)
<i>Epididymis</i>						
mesothelial hyperplasia	0	0	0	0	0	2
mesothelioma	0	0	0	0	3	0
<b>FEMALE</b>						
<i>Kidney</i>						
pigment	0	0	0	3 (1.0)	10 (1.1)	10 (1.8)
<i>Spleen</i>						
hematopoiesis	0	0	0	0	1 (1.0)	10 (1.0)
hemosiderin pigment	0	0	0	5 (1.0)	9 (2.0)	10 (2.0)
capsular fibrosis	0	0	0	0	1 (1.0)	2 (1.0)

<sup>a</sup> Incidence and severity score ( ) based on a scale of 1 to 4; 1 = minimal, 2 = mild; 3 = moderate; 4 = marked. Severity scores are averages based on the number of animals with lesions from groups of 10

Ciss の試験では、Wistar ラット(各群雌雄 10 匹ずつ、体重約 200 g)に、1 週間の馴化期間の後、オリーブ油を媒体として、2-ニトロトルエン(純度 99%)が、0 ないしは 200 mg/kg 体重の用量で、6 ヶ月間週 5 日で強制経口投与された(Ciss, 1978; Ciss *et al.* 1980a)。その結果、生残率への影響や毒性の臨床徴候は、認められなかった。血液学のおよび臨床生化学的検査、剖検、ならびに組織病理学的検査により、被験物質投与に関連した主要な影響として、以下の所見(臓器や系ごと)が示された。**造血系**：雌雄の両方で、ヘモグロビン含量が 10% 減少した。**腎臓**：雌の 7/9 匹、雄の 3/8 匹において、尿細管に硝子滴の蓄積が認められた。**脾臓**：雄において軽微な変化が認められた。

Ton *et al.*(1995)の試験では、雄の F344 ラット(各群 10 匹ずつ、6~7 週齢)に、2-ニトロトルエン(純度 99 ± 1%)が、0 もしくは 5000 ppm の濃度(375 mg/kg 体重)で、13 週間もしくは 26 週間混餌投与された。また、13 週間の混餌投与を受け、その後試験 26 週目の剖検に至るまで対照飼料で飼育される群も設けられた。肝臓については、重量測定および肉眼な

らびに組織病理学的検査が実施された。また、肝臓には、肝臓の前がん状態の指標である胎盤性グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(PGST)に対する免疫組織化学的染色が施され、コンピュータによる画像解析を用いて、立体解析学的に定量が行われた。全ての被験物質投与群において、対応する対照群と比べ、最終平均体重、1日当たりの平均飼料消費量ならびに平均体重増加量が減少し、肝臓の絶対および相対重量が増加した。細胞質空胞変性および卵形細胞過形成が、13週間の投与後、被験物質投与群の全てのラットの肝臓において観察された。この細胞質空胞変性の重症度は、13週間の投与後では軽微もしくは軽度であったが、それ以降も投与が続けられた群でもそれ以降投与が中止された群でも、26週間の時点では中等度となっていた。卵形細胞過形成の重症度については、被験物質投与群のいずれにおいても同様であった。被験物質が投与された全ての群において、PGST陽性(PGST+)の肝病巣が観察された。26週間連続して被験物質の投与を受けた群では、13週間の群よりも、PGST+の肝病巣がより多く生じており、また病巣の体積もより大きかった。さらに、13週間で被験物質の投与が中止され26週目の時点で測定が行われた群では、PGST+肝病巣の数が、13週間の連続投与後ないしは26週間の連続投与後の数と比べ、少なかった。ただし、病巣の平均体積は、13週間で被験物質の投与が中止され26週目の時点で測定が行われた群の方が、13週間連続投与後に測定が行われた群および26週間連続投与後に測定が行われた群よりも、大きかった。要約すると、これらの病巣は、2-ニトロトルエンの投与が終わっても維持されて体積が大きくなることが示され、このことから、長期試験においては2-ニトロトルエンが肝臓がんを誘発する可能性が示唆される。

NTP(1996)の試験では、2-ニトロトルエン(純度 $99.8 \pm 0.3\%$ )が、0ないしは5000 ppmの濃度(0ないしは292~296 mg/kg 体重)で、前もって9日間馴化飼育を受けた雄のF344ラット(対照群10匹および被験物質投与群20匹、45日齢)に、13もしくは26週間混餌投与された。また、13週間の混餌投与を受け、その後試験26週目の剖検に至るまで対照飼料で飼育される群も設けられた。2-ニトロトルエンの濃度は、前述の先行して行われた13週間試験、すなわち5000 ppmの混餌投与で精巣上部に中皮腫が認められた試験に基づいて選択された。さらに別群が設けられ、それらの群で、腸内細菌叢を変化させた場合に2-ニトロトルエンの毒性や発がん性にどのような影響が及ぶかが検討された。腸内細菌叢を変化させる群のラットには、2-ニトロトルエンの投与開始前の6日間と投与開始後の13週間、脱イオン水を媒体とした抗生物質混合物が、毎日単回強制経口投与された(予備試験では、この処置により、対照群と比べ、腸内細菌叢が97%以上減少した)。13週間の混餌投与が行われた時点で、各対照群(通常のものおよび腸内細菌叢を変化させたもの)の10匹、および被験物質が投与された各群(通常のものおよび腸内細菌叢を変化させたもの)の20匹を屠殺し、中間評価に供した。13週間の被験物質の混餌投与が行われ、それに続いて13週間の対照飼料での維持飼育が行われた群については、その時点で各群(通常のものおよび腸内細菌叢を変化させたもの)の20匹を屠殺し、投与を中止された(中途停止)群として



の評価に供した。26 週間被験物質の混餌投与を受け、腸内細菌叢は通常のままとされた群については、その時点で各群の 20 匹を屠殺し、26 週間被験物質投与を受けた(連続投与)群としての評価に供した。また、各対照群(通常のものおよび腸内細菌叢を変化させたもの)の 10 匹を、26 週間の時点で屠殺し、中途停止群ないしは連続投与群に対応する群としての評価に供した。その結果、生残率への影響は認められず、毒性の臨床徴候は、被験物質が投与された全ての群における、平均体重増加量および飼料消費量の減少に限られていた。剖検および組織病理学的検査の結果(通常 of 腸内細菌叢とした群に関しては Table 4.1.2.6.1-3 にまとめて示した)ならびに盲腸試料の微生物コロニー数や肝臓の胎盤性グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(PGST)活性の測定結果を考慮すると、被験物質投与に関連した影響として、以下のものが挙げられる。

**肝臓：**重量が進行性かつ不可逆的に増加し、および細胞質空胞変性ならびに卵形細胞過形成の発生率が不可逆的に増加した。13 週間の被験物質投与により PGST 陽性の肝病巣が生じ、26 週間の連続投与により PGST 陽性肝病巣の数および大きさが増高した。回復期間の間に PGST 陽性肝病巣の数はわずかに減少したが、病巣は増大し続けた。26 週間後の時点での評価では、通常 of 腸内細菌叢の群において、胆管がんが認められた。その内訳は、中途停止群で 2 匹、連続投与群で 1 匹であった。

**腎臓：**相対重量がわずかに増加した。13 週間の被験物質投与により、腎尿細管上皮における硝子滴の蓄積が生じた。この蓄積は、26 週間の連続投与で重症化することはなく、回復期間の間に消退した。主として腎症(再生およびタンパク質円柱)による、他の病巣も認められた。その発生率および重症度は、対照群と比べると増高していたが、連続投与群と中途停止群とで同等であった。

**脾臓：**相対重量がわずかに増加した。顕微鏡学的病変が認められ、それらは、造血像の発生率増加、ヘモジデリン沈着および脾膜線維化を特徴としており、26 週間連続投与群において、他群との差はわずかだが、最も高い重症度で観察された。回復期間の間に、造血像の発生率およびヘモジデリン沈着は低減したが、脾膜の線維化は消退しなかった。

**精巣および精巣上体：**被験物質が投与された全てのラットにおいて、対照群と比べ、精巣および精巣上体の重量が有意に減少し、精細管における変性の発生率が有意に上昇した。これらの影響については、連続投与群で重症化しており、中途停止群でも回復は示されなかった。中途停止群と連続投与群の両方において、精巣や精巣上体の鞘膜の中皮表面に、中皮細胞過形成や中皮腫の発生が認められた。

Table 4.1.2.6.1-3: Summary of main treatment-related lesions in the rat NTP (1996) study

	Control (0 ppm)	o-Nitrotoluene (5,000 ppm)
Body weight		Less than controls at all time points
Lesions		
13 weeks	<u>Kidney</u> : regeneration (3/10)	<u>Kidney</u> : hyaline droplet accumulation (20/20); regeneration(16/20) <u>Liver</u> : cytoplasmic vacuolization (20/20); oval cell hyperplasia (20/20) <u>Spleen</u> : hematopoietic cell proliferation (20/20); hemosiderin pigmentation (20/20); capsule, fibrosis (1/20) <u>Testis/epididymis</u> : degeneration (20/20)
Stop-exposure	<u>Kidney</u> : protein casts (3/10); regeneration (7/10)  <u>Spleen</u> : hematopoietic cell proliferation (3/10); hemosiderin pigmentation (3/10)	<u>Kidney</u> : protein casts (20/20); regeneration (19/20) <u>Liver</u> : cytoplasmic vacuolization (20/20); oval cell hyperplasia (20/20); cholangiocarcinoma (2/20) <u>Spleen</u> : hematopoietic cell proliferation (18/20); hemosiderin pigmentation (17/20); capsule, fibrosis (7/20) <u>Testis/epididymis</u> : degeneration (20/20); mesothelial hyperplasia (2/20); mesothelioma (5/20)
26 weeks	<u>Kidney</u> : protein casts (3/10); regeneration (7/10)  <u>Spleen</u> : hematopoietic cell proliferation (3/10); hemodiderin pigmentation (3/10)	<u>Kidney</u> : hyaline droplet accumulation (20/20); protein casts (20/20) regeneration(19/20) <u>Liver</u> : cytoplasmic vacuolization (20/20); oval cell hyperplasia (20/20); cholangiocarcinoma (1/20) <u>Spleen</u> : hematopoietic cell proliferation (20/20); hemosiderin pigmentation (20/20); capsule, fibrosis (3/20) <u>Testis/epididymis</u> : degeneration (20/20); mesothelial hyperplasia (2/20); mesothelioma (7/20)

腸内細菌叢を変化させる処置に関連すると考えられる影響は、当該処置無しで 2-ニトロトルエンの投与を受けたラットで見られた胆管がんが認められなかったという事だけであった。腸内細菌叢を変化させても、肝臓重量の増加や他の肝毒性(細胞質空胞変性、PGST 陽性病巣および卵形細胞過形成)を防ぐことはできなかった。卵形細胞過形成は、胆管腫瘍の発生に関連しており、その発生に先行して現れる形態学的変化であると考えられた。これらの知見、試験期間(被験物質投与期間)が短い(それでも肝腫瘍が発生した)こと、および通常腸内細菌叢の群においてもそれらの肝腫瘍発生数が少ない(3/40 匹)であることに基くと、腸内細菌叢を変化させることが胆管がんの発生を阻止するとは考えにくい。また、適用された抗生物質の処方では、腸内細菌群の好気性微生物を減少させる効果しか得られず、ニトロ基の還元に必要な役割を果たすと考えられる偏性嫌気性微生物にはほとんど影響を示さないことが判明している。要約すると、この試験の結果から、2-ニトロトルエンの発がん性(高い発生率の中皮腫および少数例の胆管がん)が、雄のラットにおいて、13 ないしは 26 週間という短い期間の投与で確認された。しかし、発がんにおける腸内細菌叢の役割については、結論を導くことはできなかった。

## マウス

GLP に準拠して、B6C3F<sub>1</sub> マウス(各群雌雄 5 匹ずつ、6 週齢)を用いた試験が実施されている。マウスを 12~14 日間馴化飼育した後、2-ニトロトルエン(純度 96%超)が、625、1250、2500、5000 ないしは 10000 ppm の濃度で、13 週間混餌投与された(雄では 104、223、415、773 ないしは 1536 mg/kg 体重、雌では 132、268、542、1007 ないしは 1712 mg/kg 体重に相当)(NTP, 1992; Dunnick, Elwell and Bucher, 1994)。剖検および組織病理学的検査の結果に基づくと、被験物質投与に関連した主要な影響として、以下のものが挙げられる。また、それらの定性的な要約を Table 4.1.2.6.1-4.1 に示した。病変の発生率および重症度については、Table 4.1.2.6.1-4.2 にまとめて示した。

生残率への影響は認められず、毒性の臨床徴候は、最高用量側 2 群の雄と雌両方における、平均体重増加量および飼料消費量の減少に限られていた。剖検では、投与に関連した肉眼病変は認められなかった。臓器重量に関しては、雄では、最高用量側 2 群もしくは 3 群において、肝臓と精巣では増加が、腎臓では減少が認められた。雌では、1250 ppm 以上の群において肝臓および腎臓重量の増加が、5000 ppm 以上の群において心臓および肺の重量の増加が認められた。唯一認められた組織病理学的病変は、1250 ppm 以上で投与を受けた雌雄両方における、嗅上皮の変性および化生であった。また、10000 ppm の投与を受けた雄では、対照群と比べて、精子の運動性が有意に低減していた。

Table 4.1.2.6.1-4.1: Summary of main treatment-related effects observed in the mouse NTP (1992) study<sup>a</sup>

MICE	Male	Female
Final Body Weight (90% or less than control)	↓(3)	↓(3)
Nose		
Nonneoplastic lesions	+(2)	+(2)
Liver		
Relative weight	↑(3)	↑(3)

<sup>a</sup> Lowest dose group in which an effect was seen; 1 = 625 ppm (104 mg/kg b.w in ♂, 132 mg/kg b.w in ♀); 2 = 1250 ppm (223 mg/kg b.w in ♂, 268 mg/kg b.w in ♀); 3 = 2500 ppm (415 mg/kg b.w in ♂, 542 mg/kg b.w in ♀); 4 = 5000 ppm (773 mg/kg b.w in ♂, 1007 mg/kg b.w in ♀); 5 = 10000 ppm (1536 mg/kg b.w in ♂, 1712 mg/kg b.w in ♀).

+ Presence of treatment-related histopathology.

Table 4.1.2.6.1-4.2: Incidence and severity of the lesions observed in the mouse NTP (1992) study<sup>a</sup>

Dose (ppm)	0	625	1250	2500	5000	10000
MALE						
Nose						
olfactory epithelium, degeneration/metaplasia	0	0	1(1.0)	2(1.0)	10(2.0)	10(3.0)
FEMALE						
Nose						
olfactory epithelium, degeneration/metaplasia	0	0	2(1.5)	9(1.0)	10(1.9)	10(2.9)

<sup>a</sup> Incidence and severity score ( ) based on a scale of 1 to 4; 1= minimal, 2= mild; 3= moderate; 4= marked. Severity scores are averages based on the number of animals with lesions from groups of 10

## 慢性毒性試験

### 吸入

データは、得られていない。

### 経皮

データは、得られていない。

### 経口

慢性毒性を検討する目的に特化した試験のデータは得られていないが、ラットやマウスを用いた 2 年間発がん性試験の中で、多くの非腫瘍性病変についての報告がなされている (NTP, 2002)。この試験は、4.1.2.8 項に詳述されている。ここでは、方法論的な記述と主要な非腫瘍性病変の概要について触れ、慢性毒性に関する NOAEL/LOAEL を導出するにあた

り、この試験がどのような意義を有するかを検討した。

## ラット

ラットを用いた試験のうち核となる主試験は、OECD ガイドライン 451 および GLP に実質的に準拠して実施された。その試験では、12～14 日間の馴化飼育を受けた F344/N ラット（各群雌雄 60 匹ずつ、6～7 週齢）に、0（雌のみ）、625、1250 ないしは 2000 ppm の濃度で、2-ニトロトルエン（純度 99%超）が、105 週間混餌投与された（雄では 25、50 ないしは 90 mg/kg 体重、雌では 0、30、60 ないしは 100 mg/kg 体重に相当）。また、3 ヶ月間で投与を中止する試験も行われ、そこでは各群雄 60 匹が、0、2000 ないしは 5000 ppm（0、125 ないしは 315 mg/kg 体重に相当）の濃度で 13 週間混餌投与を受け、その後、試験の残りの期間は被験物質無しで飼育された（NTP, 2002）。625 ppm 以上の群で、雄ならびに雌の肝臓、骨髄、脾臓および肺において、また雌の乳腺および下顎リンパ節において、非腫瘍性病変の発生率が増加した（Table 4.1.2.6.1-5）。

EURAR 2-NITROTOLUENE

Table 4.1.2.6.1-5: Summary of the main non-neoplastic lesions in the rat carcinogenicity study (2-year evaluation)<sup>a</sup>

	2-nitrotoluene	0 ppm	625 ppm	1,250 ppm	2,000 ppm	2,000 ppm (Stop-exposure)	5,000 ppm (Stop-exposure)
<b>Male Rats</b>							
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>	0	25	50	90	125	315	
<i>Body weights</i>				Less than controls	Less than controls	Less than controls	Less than controls
<i>Survival</i>	39/60	18/60	3/60	0/60	11/60	0/60	
<i>Liver</i>							
Eosinophilic focus	7/60	18/60	29/60	24/60	15/60	13/60	
Mixed cell focus	5/60	7/60	12/60	6/60	12/60	8/60	
Clear cell focus	29/60	29/60	34/60	31/60	30/60	34/60	
Mixed cell cellular infiltration	1/60	5/60	11/60	20/60	15/60	33/60	
<i>Bone marrow</i>							
Hyperplasia	2/60	25/60	43/60	45/60	37/60	33/60	
<i>Spleen</i>							
Hematopoietic cell proliferation	7/60	33/60	38/60	47/60	36/60	35/60	
<i>Lung</i>							
Alveolar epithelial hyperplasia	2/60	8/60	3/60	7/60	15/60	29/60	
	2-nitrotoluene	0 ppm	625 ppm	1,250 ppm	2,000 ppm		
<b>Female Rats</b>							
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>	0	30	60	100			
<i>Body weights</i>					Less than controls		
<i>Survival</i>	47/60	47/60	39/60	33/60			
<i>Mammary gland</i>							
Hyperplasia	14/60	36/60	30/60	19/60			
<i>Liver</i>							
Eosinophilic focus	5/60	12/59	25/60	32/60			
Mixed cell focus	6/60	9/59	11/60	28/60			
Clear cell focus	16/60	30/59	28/60	33/60			
Basophilic focus	51/60	56/59	60/60	54/60			
<i>Bone marrow</i>							
Hyperplasia	2/60	7/60	15/60	24/60			
<i>Spleen</i>							
Hematopoietic cell proliferation	22/60	38/59	48/60	48/59			
<i>Lung</i>							
Alveolar epithelial hyperplasia	6/60	14/60	16/60	9/60			
<i>Lymph node (mandibular)</i>							
Lymphoid hyperplasia	3/60	5/60	6/59	15/59			

<sup>a</sup> NTP, 2002

<sup>b</sup> Number of neoplasm-bearing animals/number of animals examined. Denominator is number of animals examined microscopically for liver and lung; for other tissues, denominator is number of animals necropsied.

## マウス

マウスを用いた試験は、OECD ガイドライン 451 および GLP に実質的に準拠して実施された。この試験では、12 日間の馴化飼育を受けた B6C3F<sub>1</sub> マウス(各群雌雄 60 匹ずつ、6 週齢)に、0、1250、2500 ないしは 5000 ppm の濃度で、2-ニトロトルエン(純度 99%超)が、105 週間混餌投与された(雄では 0、165、360 ないしは 700 mg/kg 体重、雌では 0、150、320 ないしは 710 mg/kg 体重に相当)(NTP, 2002)。その結果、雌雄両方において、1250 ppm 以上の濃度で、肝臓、腎臓および鼻における非腫瘍性病変の発生率が上昇した(Table 4.1.2.6.1-6)。

Table 4.1.2.6.1-6: Summary of the main non-neoplastic lesions in the mouse carcinogenicity study (2-year evaluation)<sup>a</sup>

	2-nitrotoluene 0 ppm	1,250 ppm	2,500 ppm	5,000 ppm
<b>Male Mice</b>				
Average Daily Dose (mg/kg)	0	165	360	700
Body weights		Less than controls	Less than controls	Less than controls
Survival	52/60	34/60	0/60	0/60
<i>Liver</i>				
Eosinophilic focus	3/60	14/59	1/57	1/60
Basophilic focus	0/60	6/59	4/57	0/60
Necrosis	1/60	15/59	27/57	30/60
Focal hepatocyte syncytial alteration	16/60	26/59	43/57	39/60
<i>Kidney</i>				
Renal tubule pigmentation	1/58	6/59	32/58	35/60
<i>Nose</i>				
Olfactory epithelial degeneration	0/60	36/60	60/60	60/60
<b>Female Mice</b>				
Average Daily Dose (mg/kg)	0	150	320	710
Body weights			Less than controls	Less than controls
Survival	52/60	46/60	47/60	5/60
<i>Liver</i>				
Eosinophilic focus	2/60	3/59	6/59	28/60
Basophilic focus	1/60	6/59	2/59	6/60
Necrosis	3/60	0/59	2/59	13/60
Focal hepatocyte necrosis	0/60	0/59	0/59	6/60
Focal hepatocyte cytoplasmic vacuolization	1/60	2/59	2/59	9/60
<i>Kidney</i>				
Renal tubule pigmentation	0/59	1/56	3/58	35/59
<i>Nose</i>				
Olfactory epithelial degeneration	0/60	28/60	59/59	57/57

<sup>a</sup> NTP, 2002<sup>b</sup> Number of neoplasm-bearing animals/number of animals examined. Denominator is number of animals examined microscopically for liver and lung; for other tissues, denominator is number of animals necropsied.

#### 4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

##### In vivo 試験

ペンシルベニア健康技術研究所(Pennsylvania Institute of Health and Technology, PIHT)によれば、2-ニトロトルエンは、慢性曝露の場合、貧血を引き起こす疑いがある(HSDB, 2004 の中で引用)。しかし、元データが入手できないため、また、曝露経路についての報告がないため、曝露-反応関係を明確にすることができない。

##### 吸入

データは得られていない。

##### 経皮

データは得られていない。

##### 経口

データは得られていない。

#### 4.1.2.6.3 反復投与毒性の要約

実験動物における 2-ニトロトルエンの反復吸入曝露試験や反復経皮投与試験のデータは得られていないが、反復経口投与毒性については、ラットやマウスを用いたいくつかの試験のデータが得られている。混餌投与試験の多くは、実質的に OECD ガイドラインおよび GLP に準拠して実施されており、したがって、それらはリスク評価の目的に見合うものとして考慮に入れられた。

ラットは、2-ニトロトルエンの反復投与毒性に供試された動物種の中で、もっとも感受性が高かった。

14 日間試験(NTP, 1992)では、2-ニトロトルエンは最高 5000 ppm(マウス)もしくは 10000 ppm(ラット)の濃度で投与された場合でも、生残率への影響や臨床徴候を引き起こすことはなかったが、5000 ppm で投与を受けた被験動物では、対照群と比べ、体重増加量が減少した。また、肝臓における卵形細胞の軽微な過形成が、10000 ppm の濃度で投与を受けた雄でのみ観察された。この結果から、その後の 13 週間試験の最高濃度として、10000 ppm



が採用された。

13 週間毒性試験では、雌雄のラットにおいて、625 ppm 以上で、肝臓の相対重量が増加した。ただし、625 ppm では、被験物質投与に関連した組織病理学的所見は認められなかった。非腫瘍性病変は、1250 ppm 以上で観察された。したがって、亜慢性毒性に関する NOAEL は、1250 ppm (89 mg/kg 体重) の投与を受けた雄ラットの脾臓で観察された脾膜の線維化に基づいて、625 ppm (45 mg/kg 体重) と判断された。マウスでは、唯一観察された組織病理学的病変は、雌雄両方における嗅上皮の変性および化生で、これは 1250 ppm (雄で 223 mg/kg 体重、雌で 268 mg/kg 体重に相当) 以上の群で観察された。

2 年間試験では、非腫瘍性病変が、試験における最低濃度、すなわち、ラットでは 625 ppm、マウスでは 1250 ppm から認められた。したがって、慢性毒性の LOAEL は、ラットにおいて、雌雄両方で肝臓、骨髄、脾臓および肺に病変が認められたこと、また雌だけで乳腺および下顎リンパ節に病変が認められたことに基づき、625 ppm (雄ラットで 25 mg/kg 体重、雌ラットで 30 mg/kg 体重) と判断された。

#### 4.1.2.7 変異原性

2-ニトロトルエンの変異原性や遺伝毒性を調べるに当たっては、様々な *in vitro* や *in vivo* の手法が利用できる。

##### 4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

###### 細菌を用いた試験

2-ニトロトルエンの遺伝毒性が、細菌を用いたいくつかの試験において検討されている。それらを Table 4.1.2.1.1-1 に一覧にして示した。

Chiu *et al.* (1978) は、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の TA98 および TA100 株を用いて、代謝活性系の非存在下で、2-ニトロトルエンの変異原性について、10、1 および 0.1  $\mu\text{mol/plate}$  の濃度で試験した。結果は陰性であった。

Tokiwa *et al.* (1981) は、代謝活性系の存在下および非存在下で、ネズミチフス菌の TA98 および TA100 株を用い、2-ニトロトルエンの変異原性を検討した。代謝活性系には、アロクロール 1254 で処置したラットから調製した肝 S9 画分を用いた。この S9 画分のタンパク質濃度は、39 mg/mL であった。S9 画分は、プレートあたり 0.15 mL 添加された。2-ニトロ

トルエンの濃度は、1000 ないしは 100  $\mu\text{g}/\text{plate}$  であった。結果は陰性であった。

Miyata *et al.* (1981) は、代謝活性系の存在下および非存在下で、ネズミチフス菌の TA92、TA94、TA98、TA100、TA1535 および TA1537 株を用いた試験を実施した。代謝活性系には、NADPH 生成系を含む肝 9000 $\times$ g 上清(S9)を用いた。2-ニトロトルエンの濃度は、30、100、300、1000 ないしは 3000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  であった。結果は陰性であった。また、S9 mix の存在下では 1000 および 3000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の濃度で、S9 mix の非存在下では 3000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の濃度で、細胞毒性が認められた。

Spangord *et al.* (1982) は、ネズミチフス菌の TA98、TA100、TA1535、TA1537 および TA1538 株を用い、2-ニトロトルエンの変異原性を調べた。結果は、代謝活性系の存在下でも非存在下でも、陰性であった。被験物質濃度は、10~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  であった。

Haworth *et al.* (1983) は、ネズミチフス菌の TA98、TA100、TA1535 および TA1537 株を用い、プレインキュベーション法により、2-ニトロトルエンの Ames テストを実施した。肝 S9 画分は、アロクロール 1254 を腹腔内投与された雄の Sprague-Dawley ラットおよび雄の Syrian ハムスターから調製した。2-ニトロトルエンの濃度は、3.3、10.0、33.0、100.0 および 333.0  $\mu\text{g}/\text{plate}$  であった。結果は陰性で、TA98、TA100 および TA1537 株においては、333.0  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の濃度により、S9 mix 非存在下で細胞毒性が示された。

Sundvall *et al.* (1984) は、主としてニトロ安息香酸およびニトロトルエンを製造する化学処理工場から出る廃液を調査した。ネズミチフス菌の TA1535、TA1538、TA98 および TA100 株を用い、代謝活性系の存在下および非存在下で試験を行った。2-ニトロトルエンは、代謝活性系の非存在下で TA100 株だけで検討され、廃液 1 mL 中 13  $\mu\text{g}$  の濃度では、変異原性反応は陰性であった。

Suzuki *et al.* (1983) は、タバコのタール中に見られる化学物質であるノルハルマンの作用を評価するために、2-ニトロトルエンを含むモノニトロベンゼン誘導体の変異原性を調べた。ネズミチフス菌の TA98 および TA100 株を用いて、変異原性試験を行った。試験は、被験物質濃度を 100、200 ないしは 300  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とし、S9 mix の存在下あるいは非存在下で、ノルハルマンの添加量を 1 プレートあたり 200  $\mu\text{g}$  として実施された。2-ニトロトルエンを含むニトロ化合物のオルト異性体はいずれも、ネズミチフス菌の TA98 に対し、ノルハルマンおよび S9 mix の存在下で陽性を示した。ノルハルマンはタバコのタール中に検出され、また、ニトロ芳香族化合物は空中粒子中やディーゼルエンジンの排ガス中に検出されることから、この試験は、環境発がんという視点から重要であると考えられる。

Nohmi *et al.* (1984) は、Ames 法に準拠して、プレインキュベーション法により、ネズミチフ

ス菌/マイクロソームテストを実施し、2-ニトロトルエンの変異原性を検討した。プレインキュベーションは 37°C で 20 分間行われ、ネズミチフス菌の TA98 および TA100 株が用いられ、また、2-ニトロトルエンの濃度は 10 mM であった。結果は、代謝活性系の有無にかかわらず陰性であった。

Shimizu and Yano(1986)は、ネズミチフス菌の TA98、TA100、TA1535、TA1537 および TA1538 株を用いて、2-ニトロトルエンの Ames テストを実施した。被験物質濃度は、S9 存在下および非存在下とも、0.01、0.05、0.1、0.5、1 ないしは 5  $\mu$ L であった。結果は陰性であった。

Kawai *et al.*(1987)は、ネズミチフス菌の TA98 および TA100 株を用いて、S9 mix の存在下および非存在下で、プレインキュベーション法により、2-ニトロトルエンの変異原性を調べた。結果は陰性であった。

Gupta *et al.*(1987)は、ネズミチフス菌の TA98 および TA100 株を用いて、S9 mix の存在下および非存在下で、0.5~5.0  $\mu$ M/plate における 2-ニトロトルエンの変異原性を調べ、陰性の結果を得ている。

日本化学物質安全・情報センター(JETOC, 1996)は、日本の労働省のガイドラインに準拠して、2-ニトロトルエンを用いた変異原性試験を実施した。Dr. Ames から得たネズミチフス菌の TA98、TA100、TA102、TA104、TA1535、TA1537 および TA1538 株と、Dr. Ishizawa から得た大腸菌(*Escherichia coli*)の WP2uvrA および WP2uvrA/pKM101 株が用いられた。被験物質の最終濃度が 2.8% (v/v)となる様に、DMSO が加えられた。代謝活性系(S9 mix)は、フェノバルビタールナトリウムおよび 5,6-ベンゾフラボンで誘導したラットから得た。プレインキュベーション法が採用された。設定濃度は、0.0763、0.305、1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250 および 5000  $\mu$ g/plate であった。2-ニトロトルエンは、ネズミチフス菌および大腸菌の両方において、変異原性陰性であった。

Shimizu and Yano(1986)は、枯草菌(*Bacillus subtilis*)の H17 および M45 株を用いて、遺伝子組換え試験[訳注:DNA 損傷試験である]を実施した。2-ニトロトルエンは、S9 mix 非存在下で、5  $\mu$ L/plate の濃度で弱い陽性を示した。

Nohmi *et al.*(1984)は、枯草菌を用いて、2-ニトロトルエンが形質転換 DNA を不活性化する能力を有するかどうかを調べた。DMSO に溶解した 5 ないしは 10 mM の 2-ニトロトルエンと 37°C で 60 分間インキュベートしたが、形質転換 DNA は不活化されなかった。

## EURAR 2-NITROTOLUENE

Table 4.1.2.7.1-1: Genotoxicity tests in bacteria by 2-nitrotoluene

TEST SYSTEM	SOURCE AND PURITY OF CHEMICAL	RESULT <sup>a)</sup>		DOSE <sup>b)</sup> (LED/HID)	REFERENCE
		Without exogenous metabolic system	With exogenous metabolic system		
Salmonella typhimurium: TA98, TA100	Eastman Organic chemicals, Rochester NY. Purity not given	-	NT	10 µmol/plate	Chiu <i>et al.</i> (1978)
Salmonella typhimurium: TA98, TA100	Aldrich chemical Co. Purity not given	-	-	1000 µg/plate	Tokiwa <i>et al.</i> (1981)
Salmonella typhimurium: TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535, TA1537	Not given	-	-	1000 µg/plate	Miyata <i>et al.</i> (1981)
Salmonella typhimurium: TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA 1538	Not given	-	-	5000 µg/plate	Spanggard <i>et al.</i> (1982)
Salmonella typhimurium: TA98, TA100, TA1535, TA1537(with preincubation)	Eastman. Purity > 99%	-	-	333 µg/plate	Haworth <i>et al.</i> (1983)
Salmonella typhimurium: TA100	2NT extracted from wastewater	-	NT	13 µg/ml wastewater	Sundvall <i>et al.</i> (1984)
Salmonella typhimurium: TA98, TA100	Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. Purity not given	-	+ (TA98) with Norharman (200µg/plate)	300 µg/plate	Suzuki <i>et al.</i> (1983)
Salmonella typhimurium: TA98, TA100 (with preincubation 20 min. at 37 °C)	Not given	-	-	10 mM	Nohmi <i>et al.</i> (1984)
Salmonella typhimurium: TA98, TA 100, TA1535, TA1537, TA 1538	Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. Purity 99% min	-	-	5 µl/plate	Shimizu and Yano (1986)
Salmonella typhimurium: TA98, TA 100	Merck Schuhardt Purity not given	-	-	5 µM/plate	Gupta <i>et al.</i> (1987)
Salmonella typhimurium: TA98, TA 100	Wako Purity not given	-	-	Not given	Kawai <i>et al.</i> (1987)
Salmonella typhimurium: TA98, TA100, TA 102, TA104, TA1535, TA 1537, TA 1538 (with preincubation) E. coli WP2uvra and WP2uvra/PKM101 (with preincubation)	Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. Purity 99% min	-	-	5000 µg/plate	JETOC (1996)
Bacillus subtilis recombination assay, H17 and M45	Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. Purity 99%	(+)	NT	5 µl/plate	Shimizu and Yano (1986)
Bacillus subtilis assay for loss of transforming DNA activity	Not given	-	NT	10 mM	Nohmi <i>et al.</i> (1984)

Notes:

a) +, positive; (+) weak positive; ?, inconclusive; -, negative; NT, not tested

b) LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose

哺乳類の細胞を用いた試験

Table 4.1.2.7.1-2 に、哺乳類の培養細胞における 2-ニトロトルエンの遺伝的影響ならびに関連する影響を調べた *in vitro* 試験を列挙した。

肺組織繊維芽細胞のサブクローン株である、チャイニーズハムスター肺細胞(CHL 細胞)を用いて、細胞遺伝学的試験により、2-ニトロトルエンの変異原性が評価された。試験は、250 µg/mL までの濃度で、代謝活性系の非存在下で実施された。曝露期間は 48 時間で、回復期間は設けられなかった。倍数体の割合が有意に増加したが、構造的な異常は認められなかった (Ishidate, Harnois and Sofuni, 1988)。

Galloway *et al.* (1987) は、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO 細胞)を用いて細胞遺伝学的試験を実施し、染色体異常誘発性を評価した。試験は、425 µg/mL までの濃度で、S9 mix の非存在下ならびに存在下で実施された。染色体異常の出現頻度は、被験物質曝露群と対照群とで同等であった。CHO 細胞における姉妹染色分体交換の評価も行われており、2-ニトロトルエンの濃度が 177~218 µg/mL の範囲で S9 mix の添加をしなかった場合では、姉妹染色分体交換頻度に非常にわずかな増加が認められ、一方、355~423 µg/mL の濃度で S9 mix 有りの場合には、姉妹染色分体交換頻度が顕著に増加した (Galloway *et al.*, 1987)。

Huang, Wang and Han. (1995) は、ヒト末梢血リンパ球培養系を用いて染色体異常試験を行い、2-ニトロトルエンの遺伝毒性を評価した。リンパ球は、健常な男性から提供された。2-ニトロトルエンは、0.005、0.050、0.40 ないしは 1.00 mmol/L の濃度で、リンパ球の培養開始から 48 時間後に、DMSO を媒体として、培養系に添加された。各濃度につき、5 つの培養系(5 系列)を作製した。培養系は、その後さらに 24 時間の培養に供され、その終了の 2 時間前に 5 µg/mL のコルヒチンが添加された。染色体標本が作製され、ギムザ染色が施された。各培養系につき 100 個の良く広がった分裂中期細胞を調べ、染色体異常を有する細胞の数を記録した(ギャップは異常とはみなさなかった)。2-ニトロトルエンは、遺伝毒性を示した。染色体異常を示した細胞の割合[PAC(percentage of aberrant cells) ± S.E.]は、 $7.6 \pm 1.1$ 、 $14.8 \pm 1.0$ 、 $29.8 \pm 1.4$  および  $46.2 \pm 2.2$  であった。 $-\text{LogEC}_{50}$  は、-0.60 であった。対照物質(10 µL DMSO)では、PAC は  $1.8 \pm 0.3$  であった。

Working and Butterworth(1984) は、ラットの精母細胞および精子細胞を用いて *in vitro* DNA 修復試験を行い、不定期 DNA 合成(UDS)を指標として、2-ニトロトルエンの遺伝毒性を評価した。新たに分離した細胞を、10 µCi/mL の <sup>3</sup>H-チミジンと 10、100 ないしは 1000 µM (1.37~137 µg/mL) の 2-ニトロトルエン(媒体: DMSO)を含むウイリアムズ E 培地に添加した。この細胞培養系を、代謝活性化の非存在下で、18 時間培養した。各濃度につき、少なくとも 5 つの培養系を作製し、それらについて粒子数を計測した(1 培養系当たり 50 細胞

で計測)。その結果、2-ニトロトルエンは、ラットの精母細胞においても精子細胞においても、DNA 修復合成(UDS)を引き起こさず、1000  $\mu\text{M}$  の濃度では細胞毒性を示した。

Doolittle, Sherrill and Butterworth(1983)は、*in vitro* UDS 試験を行い、2-ニトロトルエンの遺伝毒性を評価した。グリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)-コラゲナーゼ灌流法により、何も処置を施されていない雄の F344 ラットから肝細胞を分離した。得られた肝細胞を、0、100 ないしは 1000  $\mu\text{M}$  の 2-ニトロトルエンおよび  $^3\text{H}$ -チミジンと共に培養した。2-ニトロトルエンは、F344 ラットの肝細胞において DNA 修復を誘発せず、1000  $\mu\text{M}$  の濃度では細胞毒性を示した。陽性対照物質のアセチルアミノフルオレンは、10  $\mu\text{M}$  の濃度で、正味核内粒子数と 5 個以上の正味核内粒子を有する肝細胞の割合の両方を顕著に増加させており、用いられた肝細胞は、十分な代謝能と DNA 修復能を有していたことが示されている。

Furihata and Matsushima(1987)は、ラットの肝細胞を用い、DMSO を媒体として最高 1 mM の 2-ニトロトルエン濃度で UDS 試験を実施し、陰性の結果を得ている。

Brambilla and Martelli(1990)は、2-ニトロトルエンが UDS を誘発する能力を、ヒトの肝細胞とラットの肝細胞とで比較した。試験した濃度範囲は、0.01~1 mM であった。2-ニトロトルエンは、どちらの動物種においても DNA の修復合成を誘発しなかった。

Butterworth *et al.*(1989)は、ヒトの肝細胞を用いて UDS 試験を行い、2-ニトロトルエンの遺伝毒性を検討した。比較のため、2-ニトロトルエンの遺伝毒性を、ラットの肝細胞を用いた *in vitro* DNA 修復試験でも検討した。媒体として DMSO を用い、2-ニトロトルエンの濃度は 0.01、0.1 ないしは 1 mM とした。試験の手順には、外科廃棄物からヒトの初代培養肝細胞を調製するのに最適な修正が加えられた。肝細胞肉腫の摘出術を受けた 6 歳の女児から得た細胞の生存度は、86%であった。転移がんを除去するため、左葉の摘出術を受けた 73 歳の男性から得た細胞の生存度は、82%であった。大腸がんから転移したがん病巣の摘出術を受けた 25 歳の女性から得た細胞の生存度は、84%であった。自殺した 16 歳の女性から得た細胞の生存度は、75%であった。肝臓の転移がんの摘出術を受けた 56 歳の男性から得た細胞の生存度は、87%であった。最後の例は、肝臓切除術で得たものであり、肝臓組織から調製した初代培養肝細胞の生存度は、89%であった。得られた細胞は、 $^3\text{H}$ -チミジンおよび被験物質と一緒に、18~24 時間培養された。ヒトの 6 例全ておよび肝細胞を用いた試験のいずれにおいても、DNA 修復反応は、定性的に陰性であった。

Parton, Yount and Garriot(1995)は、無血清法による *in vitro* UDS 試験を行い、2-ニトロトルエンの評価を行った。コラゲナーゼ法によりラットの初代培養肝細胞を調製し、0.1、0.5、1、5、10、50、ないしは 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度の 2-ニトロトルエンを 2 mL 加えてインキュベ

EURAR 2-NITROTOLUENE

ートした。各濃度につき、2つの培養系を作製した。10  $\mu\text{Ci/mL}$  の  $^3\text{H}$ -チミジンを含む無血清ウイリアムズ E 培地 (WEM) を用い、それぞれ適切な濃度に調整した。1% DMSO 液を、対照物質として用いた。その結果、50 および 100  $\mu\text{g/mL}$  では細胞毒性が示され、10  $\mu\text{g/mL}$  では、正味核内粒子数が媒体対照よりも有意に ( $p \leq 0.01$ ) 増加した。

Table 4.1.2.7.1-2: In vitro test for genetic and related effect in cultured mammalian cells by 2-nitrotoluene

TEST SYSTEM	SOURCE AND PURITY OF CHEMICAL	RESULT <sup>a)</sup>		DOSE <sup>b)</sup> (LED/HID)	REFERENCE
		Without exogenous metabolic system	With exogenous metabolic system		
Cytogenetic assay, Chinese hamster lung (CHL) (structural aberration)	Not given	- P	NT	250 $\mu\text{g/ml}$	Ishidate <i>et al.</i> (1988)
Chromosomal aberrations, Chinese hamster ovary CHO cells in vitro	Radian Corp. Austin, TX Purity not given	-	NT	425 $\mu\text{g/ml}$	Galloway <i>et al.</i> (1987)
Sister chromatid exchange assay, Chinese hamster ovary CHO cells in vitro	Radian Corp. Austin, TX Purity not given	(+)	-	177-218 $\mu\text{g/ml}$	Galloway <i>et al.</i> (1987)
			+	355-423 $\mu\text{g/ml}$	
Chromosome aberrations test in cultured human peripheral lymphocytes	Not given	+	NT	0.005 mmol/L	Huang, Wang and Han. (1995)
Unscheduled DNA synthesis (UDS), rat spermatocytes and spermatides	Aldrich Chemical Co. Purity 99%	-	NT	100 $\mu\text{M}$	Working and Butterworth (1984)
UDS assay rat hepatocytes	Aldrich Chemical Co. Purity 99%	-	NT	100 $\mu\text{M}$	Doolittle <i>et al.</i> (1983)
UDS assay rat hepatocytes	Not given	-	NT	up 1mM	Furihata and Matsushima (1987)
UDS assay human and rat hepatocytes	Not given	-	NT	1 mM	Brambilla and Martelli (1990)
UDS assay human hepatocytes	Aldrich Chemical Co. Purity 99%	-	NT	1 mM	Butterworth <i>et al.</i> (1989)
UDS assay (serum-free) rat hepatocytes	Aldrich Chemical Co. Purity > 98%	+	NT	10 $\mu\text{g/ml}$	Parton <i>et al.</i> (1995)

Notes:

- a) +, positive; (+) weak positive; ?, inconclusive; -, negative; NT, not tested
- b) LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose
- P Polyploid cells increased significantly

4.1.2.7.2 In vivo 試験

Table 4.1.2.7.2-1 に、2-ニトロトルエンの遺伝毒性を調べた in vivo 試験を列挙した。

### 昆虫を用いた試験

2-ニトロトルエンの遺伝毒性を調べるため、ネッタイエカ (*Culex fatigans*) を用いた細胞遺伝学的試験が行われている (Sharma, Chaudhry and Ahluwalia, 1989)。ネッタイエカの幼虫を、DMSO に溶解した 0.01  $\mu\text{g/mL}$  の 2-ニトロトルエンに 24 時間曝露した。染色体標本を、12~15 時間齢の雌の成体の卵巣から作成した。様々な染色体異常の発生頻度に関し、対応する対照群との有意差が認められ、2-ニトロトルエンが染色体異常誘発性を有することが示された。検出された染色体異常は、切断、転座、断片化および異数体の出現であった。ただし、倍数体細胞は認められなかった。

ネッタイエカにおける 2-ニトロトルエンの遺伝毒性を調べるため、優性致死試験が実施されている (Sharma, Chaudhry and Ahluwalia, 1989)。曝露処置された雄を、無処置の正常な雌と交配させた。産み落とされた卵塊を検査し、孵化した卵と孵化しない卵を計数した。優性致死を、孵化しない卵の出現頻度を指標として評価した。その結果、2-ニトロトルエンは優性致死を引き起こさないことが示された。

### DNA 付加体

以下に 2 件の試験の情報を示したが、いずれも要約から得られたものであり、試験の全てが記載された文献から得られたものではないため、内容は定性的なものに限られる。

ヘモグロビンと DNA の付加体の生成を検討するため、雄の WELS-Fohm ラットを、2-ニトロトルエンに、週 5 日で 12 週間、慢性曝露した (Jones *et al.*, 2003)。薄い塩基でヘモグロビンを処理し、2-メチルアニリン (2MA) を放出させて、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) により、定量を行った。2MA の 2'-デオキシグアノシン (dG) および 2'-デオキシアデノシン (dA) 付加体が、電気スプレー質量分析により、肝細胞 DNA 中に検出された。In vivo で検出された dG 付加体は、芳香族アミンの付加体として予測される、N-(2'-デオキシグアノシン-8-イル)-2MA とは共溶出してこなかった。また、曝露されたラットから検出された dG 付加体は、in vitro で N-アセトキシ-2-メチルアニリンの修飾を受けた仔ウシ胸腺 DNA (ct-DNA) 中には存在しなかった。ラットで検出された dA 付加体は、in vitro で修飾を受けた ct-DNA 中にはわずかにしか存在しなかった。2-ニトロトルエンに曝露されたラットで検出された dG 付加体および dA 付加体は、用量依存性に増加し、同じ被験動物で測定したヘモグロビン付加体についても、同様の増加が認められた。DNA 付加体およびヘモグロビン付加体の量は、用量に対して超線形的に増加した。試験した全ての用量範囲にわたり、2-ニトロトルエンの投与を受けたラットの肝細胞 DNA における dG-2MA 量と dA-2MA 量との間には、非常に強い直線相関が認められた。強い直線相関は、肝細胞 DNA 中



の dG-2MA 量または dA-2MA 量とヘモグロビン付加体中の dG-2MA 量または dA-2MA 量との間にも認められた。これらの結果から、ヘモグロビン付加体が、2-ニトロトルエンを慢性的に投与されたラットにおける、肝細胞 DNA の損傷を示す有効な代替的指標となり得るとする説を支持する、強い証拠が示された。

芳香族アミンやニトロアレンによる DNA 付加体形成について、*in vitro* および *in vivo* で検討が行われている (Jones and Sabbioni, 2003)。仔ウシ胸腺 DNA を、*in vitro* で活性 N-ヒドロキシルアールアミン(2-メチルアニリン)と反応させて修飾した。また、雌の Wistar ラットに 2-メチルアニリンやそのニトロ誘導体(2-ニトロトルエン)を単回強制経口投与し、24 時間後に屠殺して分析した。肝細胞 DNA および *in vitro* で修飾した DNA を酵素的に加水分解し、2'-デオキシリボヌクレオシドの状態とした。付加体は、HPLC/MS/MS を行って、合成標準物質と対比することにより同定・定量した。加水分解の効率、UV 検出器を備えた HPLC により測定した。2-メチルアニリンは、*in vitro* で DNA と反応させた場合、2'-dG および 2'-dA に結合して付加体を形成した。2-メチルアニリンもしくは 2-ニトロトルエンを投与されたラットでは、DNA 付加体は検出されなかった。ただし、両化合物とも、加水分解性のヘモグロビン付加体を形成した。すなわち、生物学的に利用可能な N-ヒドロキシルアールアミンは、ヘモグロビン付加体を生じるが、肝細胞 DNA との付加体は形成しないことが示された。

#### 哺乳類を用いた試験

雄の F344/N ラットを用いて、2 つの急性処置スケジュールにより、小核試験が実施されている。一方の処置スケジュールでは、2-ニトロトルエンが、コーン油を媒体として、625、1250 ないしは 2500 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与され、24 時間後に骨髄の分析が行われた。もう一方の処置スケジュールでは、2-ニトロトルエンが 625 ないしは 2500 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与され、その 48 時間後に骨髄が回収され、分析が行われた。陽性対照群の動物には、シクロホスファミドが投与された。各用量群につき最大 5 匹を選択し、2000 個の多染性赤血球(PCE)を検査した。小核を有する PCE の出現頻度を統計ソフトにより分析し、コ克蘭-アーミテージの片側傾向テストにより、用量群にわたっての増加傾向に関する評価を行い、さらに、各被験物質投与群および対照群との間の対比較を実施した。どちらの処置スケジュールでも、陽性反応は認められなかった。24 時間後標本の場合には、多染性赤血球 1000 個当たりの小核を有する細胞の数(MN-PCEs/1000 PCEs)は、用量 625、1250 および 2500 mg/kg 体重のそれぞれで、 $1.50 \pm 0.70$ 、 $0.33 \pm 0.33$  および  $0.80 \pm 0.25$  であった。同じ 24 時間後標本の場合、陽性対照のシクロホスファミドでは MN-PCEs/1000 PCEs は  $9.80 \pm 2.18$ 、媒体対照のコーン油では、MN-PCEs/1000 PCEs は  $0.60 \pm 0.19$  であった。48 時間後標本の場合には、MN-PCEs/1000 PCEs は、用量 625 および 2500

mg/kg 体重のそれぞれで、 $1.30 \pm 0.41$  および  $0.75 \pm 0.25$ 、陽性対照のシクロホスファミドでは  $13.40 \pm 1.76$ 、媒体対照のコーン油では  $1.10 \pm 0.19$  であった。なお、この試験で用いられる被験物質質量を選択するために、予備用量設定試験が実施されている。用量の選択に影響した要因は、化学的溶解性、および、2-ニトロトルエン曝露により誘発される毒性ならびに細胞周期の遅延の程度などであった。ただし、この予備用量設定試験の結果については報告がなされていない。また、多染性赤血球/正染性赤血球比(PCE/NCE)の情報も示されていない(NTP, 2002)。

マウスでも小核試験が実施されている。この試験では、雄の B6C3F<sub>1</sub> マウスに、コーン油を媒体として、2-ニトロトルエンが 100、200、300 ないしは 400 mg/kg 体重の用量で(24 時間置きに 3 回)、腹腔内投与された。マウスは、3 回目の投与の 24 時間後に屠殺された。各用量群につき最大で 5 匹を選択し、大腿骨から得た骨髓細胞で塗抹標本を作製し、2000 個の PCE を検査した。被験物質投与群ではいずれも小核を有する多染性赤血球の数がわずかに増加していたが、結果としては陰性であった(NTP, 2002)。MN-PCEs/1000 PCEs は、100、200、300 および 400 mg/kg 体重のそれぞれで、 $1.50 \pm 0.16$ 、 $1.30 \pm 0.60$ 、 $1.60 \pm 0.37$  および  $1.80 \pm 0.30$  であった。陽性対照のシクロホスファミドでは、 $6.20 \pm 1.15$ 、媒体対照のコーン油では、 $0.90 \pm 0.10$  であった。なお、この試験で用いられる被験物質質量を選択するために、予備用量設定試験が実施されている。用量の選択に影響した要因は、化学的溶解性、および、2-ニトロトルエン曝露により誘発される毒性ならびに細胞周期の遅延の程度などであった。ただし、この予備用量設定試験の結果については報告がなされていない。また、PCE/NCE 比の情報も示されていない(NTP, 2002)。

末梢血での小核試験もマウスで実施されている。この毒性試験では 625、1250、2500、5000 ないしは 10000 ppm の濃度で、2-ニトロトルエンが 13 週間混餌投与された。試験終了時に、雄および雌のマウスから末梢血試料が採取された。各用量群につき 10 匹ずつについて、作製した血液塗抹標本を検査し、2000 個の正染性(成熟)赤血球(NCE)における小核を有する細胞の出現頻度を測定した。雌マウスの末梢血では、小核を有する正染性赤血球(MN-NCE)の増加は認められなかった。一方、雄マウスでは、最高用量の 1000 ppm で、MN-NCE の出現頻度のわずかな増加が認められた。雄マウスでみられた増加は、傾向テストでは十分に有意性(P = 0.003)を示していた。しかし、いずれの被験物質投与群においても、MN-NCE の出現頻度は、対応する対照群と比べて有意に増加しておらず、10000 ppm でみられた MN-NCE の出現頻度の増加はわずかなものであった。このため、雄マウスにおける結果は、曖昧なものであると判定された。各群とも、末梢血中の総赤血球に対する PCE の割合が、毒性の指標として調べられている。無処置対照群の場合、PCE の割合は、雄で 1.6%、雌で 1.5%であった。最高用量群では、PCE の割合が無処置対照群と比べて少なく、雄で 1.1%、雌で 1%であったが、このような減少が認められたのは、最高用量群の

みであった(NTP, 2002)。

2-ニトロトルエンの UDS 試験が、Mirsalis *et al.*の方法に準拠して、F344/N ラットと B6C3F1 マウスを用いて実施されている(NTP, 1992)。被験動物は、11~12 週齢であった。雄ラットには、0、100、200 ないしは 500 mg/kg 体重の用量で、雌ラットおよび雌雄のマウスには、0、200、500 ないしは 750 mg/kg 体重の用量で、単回強制経口投与が行われた。陽性対照として、2,6-ジニトロトルエンが用いられた。被験物質や陽性対照物質の投与には、媒体としてコーン油が用いられた。所定の時点で、各群からそれぞれ 3 匹のラットもしくは 6 匹のマウスを選択し、UDS 計測のために肝細胞を採取した。各用量に付き、3 匹の被験動物のそれぞれから 3 枚の標本作製した(合計 6000 個の細胞を検査)。ラットでは、200 および 500 mg/kg 体重群の雄、および 750 mg/kg 体重群の雌で、UDS 陽性反応が認められた。マウスでは、UDS 反応は陰性であった。2-ニトロトルエンは、ラットでは雌雄両方において、S 期(DNA 合成期)にある肝細胞の数を増加させたが、マウスにおいては増加させなかった。

*In vivo-in vitro* 肝細胞 DNA 修復試験により、2-ニトロトルエンの遺伝毒性が評価されている(Butterworth *et al.*, 1982, Doolittle, Sherrill and Butterworth, 1983)。雄の F344 ラットに、コーン油を媒体として、200 ないしは 500 mg/kg 体重の用量で、強制経口投与が行われた。投与から 12 時間後に被験動物を屠殺し、肝細胞を分離して <sup>3</sup>H-チミジンとインキュベートし、定量的オートラジオグラフィにより UDS を測定した。2-ニトロトルエンは、いずれの用量群においても、顕著な DNA 修復を誘発した。2-ニトロトルエンの投与から 24 時間後には、S 期にある肝細胞の数が 50 倍となっており、2-ニトロトルエンが DNA 修復に加えて細胞分裂も誘発することが示された。Butterworth *et al.*(1982)の結果においては、200 および 500 mg/kg 体重の両方で、正味粒子数が 20 個を超えていた。陽性対照の N-ニトロソジメチルアミン(NDMA)でも、正味粒子数が 20 個を超えていた。Doolittle *et al.*(1983)の結果においては、200 mg/kg 体重での正味核内粒子数は  $15.4 \pm 4.6$  個であり、500 mg/kg 体重での正味核内粒子数は  $38.5 \pm 1.0$  個であった。陽性対照の NDMA では、 $34.9 \pm 7.6$  個であった。

Butterworth *et al.*(1982)は、予備的試験を行い、2-ニトロトルエンの代謝活性化における腸内細菌叢の役割を検討した。Charles River Laboratories から得た無菌の Fisher-344 ラットの雄を、被験動物として用いた。搬入の 2 週間前に、1 群を隔離し、通常細菌叢と同等の細菌混合物である、Charles River 社仕様の細菌叢(Charles River Associated Flora, CRAF)を移植した。通常飼育の動物と同じように、CRAF を移植された動物においては、2-ニトロトルエンは肝細胞の陽性反応を誘発した(核 1 個当たりの粒子数は 5 個を超えていた)。一方、無菌動物では、2-ニトロトルエン投与による、肝細胞における DNA 修復の誘発は認められなかった。陽性対照には、NDMA が 2 mL/kg 体重の用量で用いられた。肝臓の灌流の際

に、盲腸内容物を採集し、定量的な細菌学的検査を行って、細菌叢の状態を確認した。これらのデータから、2-ニトロトルエンは、投与を受けた動物の肝細胞において DNA 修復を引き起こすが、この作用の活性化には、腸内細菌叢による代謝が必須であることが示された。

Doolittle, Sherrill and Butterworth(1983)は、2-ニトロトルエンの代謝活性化における腸内細菌叢の役割を検討するため、雄の F344 ラット(無菌状態および Charles River Altered Schaedler 細菌叢の移植を受けた状態)に、2-ニトロトルエンを強制経口投与した。剖検時に、盲腸内の細菌の状態が確認された。2-ニトロトルエンは、無菌動物において、DNA 修復を引き起こさなかった(200 mg/kg 体重群での正味粒子数は-3.8 個)。一方、Charles River Altered Schaedler 細菌叢の移植を受けた動物では、DNA 修復が誘発された(200 mg/kg 体重群での正味粒子数は 5.4 個)。通常腸内細菌叢とした雌の F344 ラットに 2-ニトロトルエンを強制経口投与し、初代培養肝細胞を得て観察したが、不定期 DNA 合成は認められなかった(200 mg/kg 体重群での正味粒子数は-2.6 個)。F344 ラットの雄と雌で、同様の腸内細菌叢を持つようにして試験を行ったが、試験した用量では、雌は、2-ニトロトルエンの遺伝毒性作用に対して抵抗性を示した。これらの結果から、2-ニトロトルエンの代謝活性化には腸内細菌叢の働きが必須であり、2-ニトロトルエンの遺伝毒性作用には、試験に用いられた動物においては、性差があることが示された。

### 分子レベルの試験

ヒトのがん発症において重要と思われるがん遺伝子の変異の観点から、自然発生血管肉腫と 2-ニトロトルエン誘発性血管肉腫に焦点を当てた試験が行われている(NTP, 2002)。発がん性試験において 1250、2500 ないしは 5000 ppm の 2-ニトロトルエンを混餌投与されていたマウス由来の皮下、腸間膜および骨格筋血管肉腫の 15 例、ならびに以前の NTP の試験における対照群の動物由来の皮下血管肉腫 13 例を、アビジン-ビオチン検出系を用いた免疫組織化学的分析にかけ、*p53* タンパク質および  $\beta$ -カテニンタンパク質の発現についてのスクリーニングを行った。野生型の *p53* タンパク質は半減期が短い、変異型になると腫瘍性細胞の核内で検出されるようになる。野生型の  $\beta$ -カテニンタンパク質発現は、正常の細胞では速やかに低減するが、 $\beta$ -カテニン遺伝子に変化が生じると、腫瘍性細胞の細胞膜、細胞質ないしは核において発現の増加が認められるようになる。陽性対照として、*p53* 遺伝子導入マウス(*p53* の 135 番目のコドンが変異)から得た組織標本、および  $\beta$ -カテニン遺伝子に点変異を有することが直接配列決定法により確認された、マウスの肝芽腫から得られた組織標本を用いた。

対照群由来の血管肉腫では、*p53* タンパク質や  $\beta$ -カテニンの蓄積を示唆する所見は認めら

れなかったため、これらの血管肉腫由来の DNA についてはさらなる分析は行われなかった。一方、2-ニトロトルエンの投与を受けていたマウス由来の血管肉腫では、15 例全てにおいて、*p53* タンパク質の蓄積が認められた。 $\beta$ -カテニンは、2-ニトロトルエンにより誘発された血管肉腫のうち 7 例で蓄積が確認された。これを受けて、2-ニトロトルエンに誘発されたこれらの血管肉腫については、*K-ras*、*H-ras*、*p53* および  $\beta$ -カテニン遺伝子における変異も調べられた。

2-ニトロトルエンにより誘発された血管肉腫 15 例のうち 13 例(87%)で、これらの遺伝子のうち少なくとも 1 つに変異があることが確認され、同 15 例のうち 11 例(73%)で、*p53* のエクソンの 5~8 番目におけるミスセンス変異が検出された。

*p53* の変異は、190、195、200、205、210、220、235、241、243、250、263 および 264 番目のコドンで確認された。*p53* の変異が確認された 15 例のうち、6 例ではグアニンからアデニンへの変異、3 例ではアデニンからグアニンへの変異、3 例ではシトシンからチミンへの変異、その他の 3 例では様々な塩基対変異が認められた。5000 ppm 群由来の血管肉腫 4 例では、*p53* 遺伝子の二重変異が認められ、それらのうちの 1 例では  $\beta$ -カテニン遺伝子の変異も確認され、もう 1 例では *K-ras* 遺伝子の 61 番目のコドンに CTA 変異が認められた。血管肉腫のいくつかの例では、*p53* タンパク質が免疫組織化学的検査により陽性であったにも関わらず、*p53* 遺伝子に変異が認められなかったが、これは、5~8 番目のエクソン以外で変異が生じたことによるものか、あるいは、*p53* 遺伝子の発現に影響する他の遺伝子の発現において変化が生じたことによるものと考えられた。

2-ニトロトルエンに誘発され、*p53* 遺伝子に変異が認められた血管肉腫のうち 5 例では、*ras* 遺伝子や  $\beta$ -カテニン遺伝子における変異は検出されなかった。2-ニトロトルエンを投与されたマウス由来の血管肉腫 15 例のうち 7 例(47%)では、 $\beta$ -カテニン遺伝子中に、欠落もしくは 2 番目のエクソンの開始部分におけるスプライス部位変異が生じていた。2-ニトロトルエンに誘発された血管肉腫の 2 例では、 $\beta$ -カテニン遺伝子の変異が認められたが、*p53* 遺伝子や *ras* 遺伝子の変異は示されなかった。 $\beta$ -カテニンタンパク質が細胞膜に染色される血管肉腫の例と  $\beta$ -カテニン遺伝子変異を示す血管肉腫の例との間には、全体的に良い相関が認められた(7 例中 6 例; 86%)。

2-ニトロトルエンに誘発されて生じた血管肉腫では *p53* 遺伝子や  $\beta$ -カテニン遺伝子に変異が生じていたが、一方で、自然発生した血管肉腫ではその様な変異が認められなかった。このことから、2-ニトロトルエンにより誘発されてがんが生じる経路は、自然発生的に血管肉腫が生じる経路とは異なることが示唆される。

一方、マウスの血管肉腫において認められた *ras* 遺伝子、*p53* 遺伝子および  $\beta$ -カテニン遺

伝子の変異は、ヒトにおけるさまざまな腫瘍でも認められている (Marion, Froment and Trepo, 1991; Hollstein *et al.*, 1994; Gamallo *et al.*, 1999)。

化学物質に関連した血管肉腫がマウスにおいて *p53* 遺伝子や  $\beta$ -カテニン遺伝子の変異を伴って認められたことは、そうした腫瘍が、ヒトにおける同様の腫瘍の良いモデルになることを示唆している。さらに、そうした腫瘍は、ヒトとマウスで同様の発がん経路により生じると考えられ、ヒトが 2-ニトロトルエンに曝露された場合のリスク評価に関連性を有すると考えられる。

Table 4.1.2.7.2-1: In vivo test for the genotoxicity of 2-nitrotoluene

TEST SYSTEM	SOURCE AND PURITY OF CHEMICAL	RESULT <sup>a)</sup>	DOSE <sup>b)</sup> (LED/HID)	REFERENCE
Chromosomal aberrations (ovaries) Culex Faligans	Department of Pharmacy Panjab University Chandigarh	+	0,01 µg/ml	Sharma, Chaudhaj and Ahluwalya (1989)
Dominant letal Culex Fatigans	Department of Pharmacy Panjab University Chandigarh	-	0,01 µg/ml	Sharma, Chaudhaj and Ahluwalya (1989)
DNA adducts and hemoglobin adducts male Wels –Fohm rats	Not given	+	5 days /wk 12 wks	Jones <i>et al.</i> (2003)
DNA adducts and hemoglobin adducts	Not given	- (DNA) + (haemoglobin)	1, p.o.	Jones and Sabbioni (2003)
Micronucleus test male F344/N rats bone-marrow cells	Not given	- (24 hr) - (48 hr)	2500 mg/kg 1,i.p.	NTP (2002)
Micronucleus test male B6C3F1 mice bone-marrow cells	Not given	-	400 mg/kg 3,i.p.	NTP (2002)
Micronucleus test male and female B6C3F1 mice peripheral blood cells	Not given	? (male) - (female)	10000 ppm 13 weeks, feed	NTP (2002)
UDS Assay male and female F344/N rats hepatocytes	Aldrich Chemical Co. Purity > 96%	+ (male) + (female)	200 mg/kg 1,p.o. 750 mg/kg 1,p.o.	NTP (1992)
UDS Assay, male and female F6C3F1 mice hepatocytes	Aldrich Chemical Co. Purity > 96%	-	750 mg/kg 1,p.o.	NTP (1992)
UDS Assay, male F344 rats hepatocytes	Aldrich Chemical Co. Purity > 99%	+	200 mg/kg, 1,p.o.	Doolittle <i>et al.</i> (1983)
UDS Assay, male F344 rats hepatocytes	Not given	+	200 mg/kg 1,p.o.	Butterworth <i>et al.</i> (1982)
UDS male F344 rats (germ free and CRAF )	Not given	- (germ free) + (CRAF)	200 mg/kg 1,p.o.	Butterworth <i>et al.</i> (1982)
UDS male F344 rats (germ free and CRAF), female F344 rats (conventional intestinal flora)	Aldrich Chemical Co. Purity > 99%	- (male germ free) + (male CRAF) - (female conventional intestinal flora)	500 mg/kg 1,p.o. 200 mg/kg 1,p.o. 200 mg/kg 1,p.o.	Doolittle <i>et al.</i> (1983)

Notes:

c) +, positive; (+) weak positive; ?, inconclusive; -, negative; NT, not tested

d) LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose

CRAF: Charles River Altered Schaedler Flora (mixture of 8 bacteria, 2 Lactobacillus sp., bacteroides distasonis, 4 fusiform-shaped bacteria and spirochete) intended to stimulate the autochthonous gastrointestinal flora

#### 4.1.2.7.3 変異原性の要約

2-ニトロトルエンの遺伝毒性に関して、さまざまな *in vitro* 試験および *in vivo* 試験のデータが得られている。

細菌を用いた試験では、2-ニトロトルエンは、ネズミチフス菌のどの菌株に対しても、代謝活性化酵素(S9)の存在下および非存在下で、変異原性を示さないかった。ただし、ノルハルマンを添加した場合は、S9 mix の存在下で、陽性結果が得られている。枯草菌に対しては、2-ニトロトルエンは遺伝毒性作用を示した。

チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた細胞遺伝学的試験では、2-ニトロトルエンは、姉妹染色分体交換の頻度を増加させた。この影響は、S9 mix の存在下ではより顕著であった。染色体異常試験では、S9 mix の存在下でも非存在下でも、陰性結果が得られた。チャイニーズハムスター肺細胞(CHL 細胞)の培養物に、S9 mix の非存在下で2-ニトロトルエンを作用させた場合には、倍数性細胞の増加が認められた。また、2-ニトロトルエンは、ヒトのリンパ球において、染色体異常を誘発した。

ラットから分離した精子細胞、精母細胞および肝細胞では、不定期 DNA 合成の誘発は認められなかった。

ネッタイエカの幼虫を用いた *in vivo* 試験において、2-ニトロトルエンは染色体異常誘発能を示した。しかし、ネッタイエカを用いた優性致死試験では、結果は陰性であった。

2-ニトロトルエンは、雄の Wels-Fohm ラットへ週 5 日で 12 週間投与した慢性投与試験において、ヘモグロビンや肝細胞 DNA との付加体を形成した。Wistar ラットに 2-ニトロトルエンを単用量で強制経口投与した試験では、ヘモグロビン付加体の形成は認められたが、DNA 付加体の形成は認められなかった。

2-ニトロトルエンを雄ラットないしは雄マウスに腹腔内投与し、骨髄の多染性赤血球における小核形成を観察した試験では、小核の出現頻度に有意な増加は認められなかった。2-ニトロトルエンをマウスに 13 週間混餌投与し、末梢血での小核形成を観察した試験では、雄では曖昧な結果が、雌では陰性結果が得られている。

ラットにおける 2-ニトロトルエンの UDS 試験では、雄と雌の両方で陽性結果が得られている。2-ニトロトルエンの遺伝毒性に対する感受性は、雄の方が高かった。2-ニトロトルエンの遺伝毒性における性差は、胆汁排泄に性差があることが原因ではないかと考えられた。また、2-ニトロトルエンは、Charles River Altered Schaedler 細菌叢を移植された動物においては DNA 修復を誘発したが、無菌動物では DNA 修復を誘発しなかった。この試験で



は、用いられた F344 ラットは、雄も雌も同じ様な腸内細菌叢を有していることが示されたが、試験した用量では、雌の方が、2-ニトロトルエンの遺伝毒性作用に対して抵抗性を示した。これらの結果から、2-ニトロトルエンの代謝活性化には腸内細菌叢の働きが必須であり、2-ニトロトルエンの遺伝毒性作用には、試験に用いられた動物においては、性差があることが示された。

2-ニトロトルエンを2年間混餌投与された B6C3F<sub>1</sub> マウスに生じた血管肉腫では、*ras* 遺伝子、*p53* 遺伝子および  $\beta$ -カテニン遺伝子の変異が認められた。これらの *in vivo* 試験のデータは、2-ニトロトルエンが変異原性を有する中間体に代謝されることを示唆しており、これにより *in vitro* 試験では多くの場合陰性結果が得られていることを説明づけられる。2-ニトロトルエンは、提唱される生体内活性化経路の記載(4.1.2.1.4 項参照)に示される様に、活性を有する様々な代謝産物へと代謝され、それらが上述の腫瘍における遺伝子変異に関与していると考えられる。

結論としては、2-ニトロトルエンは、体細胞において変異原性を示す。また、2-ニトロトルエンは、精巣や精巣上体においても毒性が示されていることから、生殖細胞に到達すると考えられる(4.1.2.6 項参照)。技術指針書(TGD, 2005)には、以下の様な記載がある。体細胞に対して変異原性を示す物質は、胚細胞においても変異を誘発する能力を有すると考えるのが妥当である。胚細胞において *in vivo* で変異原性を示す可能性については、当該化学物質のトキシコキネティクスと、影響を発揮し得る量で当該化学物質が標的組織に到達するかどうかに基づいて判断される。したがって、この観点から、生殖細胞における変異原性に関しては直接的な証拠は得られていないが、2-ニトロトルエンをカテゴリ-2(T, R46)の変異原性物質とする、現行(29<sup>th</sup> ATP)の分類が支持される

#### 4.1.2.8 発がん性

##### 4.1.2.8.1 動物試験

###### *In vivo* 試験

###### 吸入

データは、得られていない。

## 経皮

データは、得られていない。

## 経口

### ラット

ラットを用いた試験の核となる主試験は、OECD ガイドライン 451 および GLP に準拠して実施されており、12～14 日間馴化飼育された各群雌雄 60 匹ずつの 6～7 週齢の F344/N ラットに、2-ニトロトルエン(純度 99%超)が、0(雌のみ)、625、1250、ないしは 2000 ppm の濃度で、105 週間混餌投与された(雄における用量は 25、50 ないしは 90 mg/kg 体重、雌における用量は 0、30、60 ないしは 100 mg/kg 体重)。3 ヶ月で投与が中止される試験(中途停止試験)も行われ、雄 70 匹ずつの群に、0、2000 ないしは 5000 ppm (0、125 ないしは 315 mg/kg 体重) が 13 週間混餌投与され、その後は被験物質を含まない餌で試験終了まで飼育された。ただし、中途停止試験の被験物質投与群および対照群の雄 10 匹ずつは、3 ヶ月の時点で中間屠殺した(NTP, 2002)。主試験の 2000 ppm 群と中途停止試験の 5000 ppm 群の雄全てと、主試験の 1250 ppm 群の雄 3 匹が、試験終了を待たずに死亡した。主試験の 625 ppm 群、中途停止試験の 2000 ppm 群の雄および主試験の 2000 ppm 群の雌における生残率は、対照群よりも有意に低かった。主試験の 625 ppm 群を除くと、被験物質投与群の全てにおいて、試験期間を通して全般的に、平均体重が対照群よりも低かった。2000 ppm 群の雌の平均体重は、試験の 2 年目の間中、対照群よりも低かった。被験物質投与群における飼料消費量は、試験期間を通じて、対照群と同等であった。臨床症状の 1 つとして、被験物質投与群の雌雄において、胴体、頭部および四肢に、大きな皮下腫瘍が認められ、その数は投与期間の経過とともに増加した。また、主試験および中途停止試験の 2000 ppm 群の雄、および中途停止試験の 5000 ppm 群の雄で、耳の矮小化と尾の削瘦が認められた。主要な毒性学的所見を、以下に記載するとともに Table 4.1.2.8.1-1 および Table 4.1.2.8.1-2 にまとめた。

**中皮：**3 ヶ月目の中間屠殺の時点では、被験物質を投与された雄において、中皮腫や中皮の過形成は、認められなかった。しかし、時間が経過すると、中途停止試験の動物も含め、被験物質の投与を受けた雄の全ての群において、被験物質誘発性の中皮腫が発生した。被験物質投与群における悪性中皮腫の発生率は、対照群におけるよりも高く、また 2 年間背景対照範囲を上回っていた。中皮腫は、主として精巣や精巣上体の鞘膜に生じていた。

**皮膚：**被験物質を投与を受けた全ての群の雄において、皮下の線維腫、線維肉腫、線維腫や線維肉腫(合計)および脂肪腫の、有意な発生率増加が認められた。また、1250 および

2000 ppm 群の雌において、皮下の線維腫および線維腫や線維肉腫(合計)の、有意な発生率増加が認められた。これらの増加は、[訳注:投与用量と]正の相関傾向を示し、また、2年間背景対照範囲を上回っていた。

**乳腺：**主試験の 2000 ppm 群の雄を除き、被験物質の投与を受けた全ての群の雌雄において、線維腺腫の発生率が、対照群における発生率よりも高く、2年間背景対照範囲を上回っていた。線維腺腫の前駆病変である過形成の発生率が、625 および 1250 ppm 群の雌において、有意に増加していた。

**肝臓：**中途停止試験の 5000 ppm 群の雄における肝臓重量は、3ヵ月の時点で、対照群の値よりも有意に増加していた。主試験の 2000 ppm 群の雌雄における肝細胞腺腫の発生率、および主試験の 2000 ppm 群の雄ならびに中途停止試験の 5000 ppm 群の雄における肝細胞腺腫ないしは肝細胞肉腫(合計)の発生率は、対照群の値よりも有意に高く、全般的に 2年間背景対照範囲を上回っていた。中途停止試験の 5000 ppm 群の雄 3 匹で、胆管がんが認められ、また、主試験の 625 および 2000 ppm 群の雄 1 匹ずつに、肝胆管細胞がんが認められた。被験物質投与群では、雌雄両方において、好酸性病巣、混合型細胞巣および明細胞巣などの様々な非腫瘍性病変の増加が認められ、雄では混合型細胞浸潤、雌では好塩基性病巣の増加も見られた。

**肺：**肺胞/細気管支腺腫および肺胞/細気管支腺腫ないしは肉腫(合計)の発生率が、中途停止試験の 5000 ppm 群の雄において統計学的に有意に増加し、2年間背景対照範囲を上回っていた。また、被験物質投与が投与されたほとんどの群では、雌雄両方において、肺胞上皮の過形成が認められた。

**造血系：**骨髄における過形成(被験物質を投与された全ての群の雄および 1250 ないしは 2000 ppm 群の雌)、脾臓における造血細胞の増殖(被験物質を投与された全群)、および下顎リンパ節の過形成(2000 ppm 群の雌)の発生率が、有意に増加した。

**血液：**1250 ppm 以上の群の雄および全ての被験物質群の雌において、単核球細胞白血病の発生率が、有意に低下しており、2年間背景対照範囲を下回っていた。白血病の発生率低下は、脾臓への毒性と関連している可能性が最も高いと考えられた。

**精巣：**精巣の間質性細胞腺腫の発生率が、中途停止試験の 5000 ppm 群の雄で有意に低下していたが、これは精巣への毒性と関連しているものと考えられた。

EURAR 2-NITROTOLUENE

Table 4.1.2.8.1-1: Summary of the main neoplastic lesions in the rat carcinogenicity study (2-year evaluation)<sup>a,b,c</sup>

	2-nitrotoluene	0 ppm	625 ppm	1,250 ppm	2,000 ppm	2,000 ppm (Stop-exposure)	5,000 ppm (Stop-exposure)
<b>Male Rats</b>							
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>		0	25	50	90	125	315
<i>Body weights</i>				Less than controls	Less than controls	Less than controls	Less than controls
<i>Survival</i>		39/60	18/60	3/60	0/60	11/60	0/60
<i>Mesothelium Malignant Mesothelioma</i>		2/60	20/60	29/60	44/60	44/60	54/60
<i>Skin (Subcutaneous)</i>							
Lipoma		0/60	4/60	13/60	13/60	10/60	12/60
Fibroma		5/60	46/60	52/60	59/60	45/60	52/60
Fibrosarcoma		0/60	7/60	17/60	20/60	8/60	12/60
Fibroma or Fibrosarcoma		5/60	47/60	55/60	59/60	47/60	53/60
<i>Mammary Gland</i>							
Fibroadenoma		0/60	7/60	10/60	2/60	13/60	20/60
<i>Liver</i>							
Hepatocellular Adenoma		2/60	3/60	3/60	7/60	3/60	4/60
Hepatocellular Adenoma or Carcinoma		3/60	3/60	3/60	8/60	3/60	6/60
Cholangiocarcinoma		0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	3/60
Hepatocholangiocarcinoma		0/60	1/60	0/60	1/60	0/60	0/60
<i>Lung</i>							
Alveolar/bronchiolar Adenoma		1/60	5/60	1/60	2/60	3/60	8/60
Alveolar/bronchiolar adenoma or Carcinoma		2/60	5/60	1/60	2/60	3/60	11/60
	2-nitrotoluene	0 ppm	625 ppm	1,250 ppm	2,000 ppm		
<b>Female Rats</b>							
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>		0	30	60	100		
<i>Body weights</i>					Less than controls		
<i>Survival</i>		47/60	47/60	39/60	33/60		
<i>Skin (Subcutaneous)<sup>c</sup></i>							
Fibroma		3/59	3/60	18/60	19/60		
Fibroma or Fibrosarcoma		3/60	3/60	21/60	22/60		
<i>Mammary Gland</i>							
Fibroadenoma		23/60	47/60	52/60	56/60		
<i>Liver</i>							
Hepatocellular Adenoma		1/60	0/59	1/60	6/60		

<sup>a</sup> NTP, 2002

<sup>b</sup> Most treated animals (all exposed groups of males and the high exposure group of females) died before getting 2 years old (in contrast to the controls). Thus, the necropsy results for the treated animals refer to the time-points when they actually died. Early deaths among treated animals were due to the development of neoplasms. For males, malignant mesotheliomas were the reason for early deaths.

<sup>c</sup> Incidences of neoplasms are given as number of neoplasm-bearing animals/number of animals examined. Denominator is number of animals examined microscopically for liver and lung; for other tissues, denominator is number of animals necropsied.

EURAR 2-NITROTOLUENE

Table 4.1.2.8.1-2: Summary of the main non-neoplastic lesions in the rat carcinogenicity study (2-year evaluation)<sup>a,b,c</sup>

2-nitrotoluene	0 ppm	625 ppm	1,250 ppm	2,000 ppm	2,000 ppm (Stop-exposure)	5,000 ppm (Stop-exposure)
<b>Male Rats</b>						
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>	0	25	50	90	125	315
<i>Body weights</i>			Less than controls	Less than controls	Less than controls	Less than controls
<i>Survival</i>	39/60	18/60	3/60	0/60	11/60	0/60
<i>Liver</i>						
Eosinophilic focus	7/60	18/60	29/60	24/60	15/60	13/60
Mixed cell focus	5/60	7/60	12/60	6/60	12/60	8/60
Clear cell focus	29/60	29/60	34/60	31/60	30/60	34/60
Mixed cell cellular infiltration	1/60	5/60	11/60	20/60	15/60	33/60
<i>Bone marrow</i>						
Hyperplasia	2/60	25/60	43/60	45/60	37/60	33/60
<i>Spleen</i>						
Hematopoietic cell proliferation	7/60	33/60	38/60	47/60	36/60	35/60
<i>Lung</i>						
Alveolar epithelial hyperplasia	2/60	8/60	3/60	7/60	15/60	29/60
2-nitrotoluene	0 ppm	625 ppm	1,250 ppm	2,000 ppm		
<b>Female Rats</b>						
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>	0	30	60	100		
<i>Body weights</i>				Less than controls		
<i>Survival</i>	47/60	47/60	39/60	33/60		
<i>Mammary Gland</i>						
Hyperplasia	14/60	36/60	30/60	19/60		
<i>Liver</i>						
Eosinophilic focus	5/60	12/59	25/60	32/60		
Mixed cell focus	6/60	9/59	11/60	28/60		
Clear cell focus	16/60	30/59	28/60	33/60		
Basophilic focus	51/60	56/59	60/60	54/60		
<i>Bone marrow</i>						
Hyperplasia	2/60	7/60	15/60	24/60		
<i>Spleen</i>						
Hematopoietic cell proliferation	22/60	38/60	48/60	48/59		
<i>Lung</i>						
Alveolar epithelial hyperplasia	6/60	14/60	16/60	9/60		
<i>Lymph node (mandibular)</i>						
Lymphoid hyperplasia	3/60	5/59	6/59	15/59		

<sup>a</sup> NTP, 2002

<sup>b</sup> Most treated animals died before getting 2 years old (in contrast to the controls). Thus, the necropsy results for the treated animals refer to the time-points when they actually died.

<sup>c</sup> Incidences of non-neoplastic lesions are given as number of non-neoplastic lesions-bearing animals/number of animals examined. Denominator is number of animals examined microscopically for liver and lung; for other tissues, denominator is number of animals necropsied.

## マウス

OECD ガイドライン 451 および GLP に実質的に準拠した試験が実施されている。この試験では、12 日間馴化飼育された B6C3F<sub>1</sub> マウス(各群雌雄 60 匹ずつ、6 週齢)に、2-ニトロトルエン(純度 99%超)が、0、1250、2500 ないしは 5000 ppm の濃度で、105 週間混餌投与された(雄では 0、165、360 ないしは 700 mg/kg 体重、雌では 0、150、320 ないしは 710 mg/kg 体重)(NTP, 2002)。2500 および 5000 ppm 群の雄は、試験終了前に、全てが死亡した。1250 ppm 群の雄および 5000 ppm 群の雌の生残率は、対照群の生残率よりも有意に低かった。被験物質投与群の雄および 5000 ppm 群の雌の平均体重は、試験期間を通じて全般的に、対照群の値よりも低かった。また、2500 ppm 群の雌の平均体重は、試験の 2 年目の間中、対照群よりも低かった。5000 ppm 群の雄における飼料消費量は、対照群における値よりも少なかった。臨床症状の 1 つとして、被験物質投与群の雌雄において、胴体、頭部および四肢に、大きな皮下腫瘍が認められた。主要な毒性学的所見を、以下に記載するとともに Table 4.1.2.8.2-1 および Table 4.1.2.8.2-2 にまとめた。

**循環器系：**全ての被験物質投与群の雄および 5000 ppm 群の雌における血管肉腫の発生率が、対照群における発症率よりも高く、また 2 年間試験の背景対照範囲を上回っていた。血管肉腫は、主として、腸間膜、骨格筋および皮下に発生していた。

**大腸：**1250 および 2500 ppm 群の雄における盲腸のがんの発生率が、有意な増加を示しており、また 2 年間背景対照範囲を上回っていた。被験物質投与群の雌における盲腸のがんの発生率増加は有意なものではなかったが、この種のがんは非常に稀であり、背景対照の雌ではまったく認められていないことから、やはり被験物質投与に関連したものとみなされた。

**肝臓：**2500 ならびに 5000 ppm 群の雌における腺腫の発生率、5000 ppm 群の雌におけるがんの発生率、および 2500 ならびに 5000 ppm 群の雌における腺腫ないしはがん(合計)の発生率が、有意に対照群における値よりも高く、また、2 年間背景対照範囲を上回っていた。被験物質投与群の雄では、血管肉腫を発症して早期に死亡する例がみられており、このことは、雄においてそれよりも後に発生する肝細胞腫瘍が認められなかったことを、説明付けていると思われる。非腫瘍性病変については、1250 ppm 群の雄および 5000 ppm 群の雌における好酸性病巣の発生率、1250 ならびに 2500 ppm 群の雄および 1250 ならびに 5000 ppm 群の雌における好塩基性病巣の発生率、および、全ての被験物質投与群の雄および 5000 ppm 群の雌における壊死の発生率に、有意な増加が認められた。さらに、被験物質投与群の雄では肝細胞の合胞体変性が、5000 ppm 群の雌では肝細胞の細胞質空胞変性が、それぞれ認められている。

## EURAR 2-NITROTOLUENE

**腎臓：**被験物質投与群の雄および 5000 ppm 群の雌において、腎尿細管の色素沈着の発生率が、対照群における値よりも有意に高かった。

**鼻：**1250 ppm 以上の群の雌雄で、嗅上皮の変性が生じており、この病変の重症度は、被験物質濃度が上昇するとともに増高していた。

Table 4.1.2.8.2-1: Summary of the main neoplastic lesions in the mouse carcinogenicity study (2-year evaluation)<sup>a,b,c</sup>

	2-nitrotoluene 0 ppm	1250 ppm	2500 ppm	5,000 ppm
<b>Male Mice</b>				
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>	0	165	360	700
<i>Body weights</i>		Less than controls	Less than controls	Less than control s
<i>Survival</i>	52/60	34/60	0/60	0/60
<i>Circulatory System</i>				
Hemangiosarcoma a	4/60	17/60	55/60	60/60
<i>Large Intestine (Cecum)</i>				
Carcinoma	0/56	12/49	9/36	0/44
<i>Lung</i>				
Alveolar/bronchiolar adenoma or Carcinoma	14/60	7/60	6/60	0/60
	2-nitrotoluene 0 ppm	625 ppm	1,250 ppm	2,000 ppm
<b>Female Rats</b>				
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>	0	150	320	710
<i>Body weights</i>			Less than controls	Less than controls
<i>Survival</i>	52/60	46/60	47/60	5/60
<i>Circulatory System</i>				
Hemangiosarcoma a	0/60	2/60	3/60	50/60
<i>Large Intestine (Cecum)</i>				
Carcinoma	0/60	1/60	4/60	3/60
<i>Liver</i>				
Hepatocellular Adenoma	7/60	5/59	19/59	29/60
Hepatocellular Carcinoma	2/60	4/59	6/59	16/60
Hepatocellular Adenoma or Carcinoma	9/60	9/59	24/59	39/60

<sup>a</sup> NTP, 2002

<sup>b</sup> Most treated animals (all exposed groups of males and the high exposure group of females) died before getting 2 years old (in contrast to the controls). Thus, the necropsy results for the treated animals refer to the time-points when they actually died. Early deaths among treated animals were due to the development of neoplasms. Hemangiosarcomas were the reason for early deaths in both males and females.

<sup>c</sup> Incidences of neoplasms are given as number of neoplasm-bearing animals/number of animals examined. Denominator is number of animals examined microscopically for liver and lung; for other tissues, denominator is number of animals necropsied.

## EURAR 2-NITROTOLUENE

Table 4.1.2.8.2-2: Summary of the main non-neoplastic lesions in the mouse carcinogenicity study (2-year evaluation)<sup>a,b,c</sup>

	2-nitrotoluene 0 ppm	1250 ppm	2500 ppm	5,000 ppm
<b>Male Mice</b>				
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>	0	165	360	700
<i>Body weights</i>		Less than controls	Less than controls	Less than control s
<i>Survival</i>	52/60	34/60	0/60	0/60
<i>Liver</i>				
Eosinophilic focus	3/60	14/59	1/57	1/60
Basophilic focus	0/60	6/59	4/57	0/60
Necrosis	1/60	15/59	27/57	30/60
Focal hepatocyte syncytial alteration	16/60	26/59	43/57	39/60
<i>Kidney</i>				
Renal tubule pigmentation	1/58	6/59	32/58	35/60
<i>Nose</i>				
Olfactory epithelial degeneration	0/60	36/60	60/60	60/60
	2-nitrotoluene 0 ppm	625 ppm	1,250 ppm	2,000 ppm
<b>Female Rats</b>				
<i>Average Daily Dose (mg/kg)</i>	0	150	320	710
<i>Body weights</i>			Less than controls	Less than controls
<i>Survival</i>	52/60	46/60	47/60	5/60
<i>Liver</i>				
Eosinophilic focus	2/60	3/59	6/59	28/60
Basophilic focus	1/60	6/59	2/59	6/60
Necrosis	3/60	0/59	2/59	13/60
Focal hepatocyte necrosis	0/60	0/59	0/59	6/60
Focal hepatocyte cytoplasmic vacuolization	1/60	2/59	2/59	9/60
<i>Kidney</i>				
Renal tubule pigmentation	0/59	1/56	3/58	35/59
<i>Nose</i>				
Olfactory epithelial degeneration	0/60	28/60	59/59	57/57

<sup>a</sup> NTP, 2002

<sup>b</sup> Most treated animals died before getting 2 years old (in contrast to the controls). Thus, the necropsy results for the treated animals refer to the time-points when they actually died.

<sup>c</sup> Incidences of non-neoplastic lesions are given as number of non-neoplastic lesions-bearing animals/number of animals examined. Denominator is number of animals examined microscopically for liver and lung; for other tissues, denominator is number of animals necropsied.

### 他の投与経路

#### マウス

若齢の A/Jax マウスの雄(各群 30 匹ずつ)を用いて、肺腫瘍誘発試験が実施されている。この試験では、2-ニトロトルエン(純度 98%)が、コーン油を媒体として、1200、3000 ないし



は 6000 mg/kg 体重の用量で、連続 8 週にわたり週 3 回、腹腔内投与された。マウスは最後の投与から 16 週間後に屠殺され、肺腫瘍の数が測定された (Slaga *et al.*, 1985)。体重には、投与に関連した影響は認められなかった。肺腫瘍の発生率は、明らかに用量依存性に増加したが、それらの増加は統計学的に有意ではなかった。この試験は OECD ガイドライン (451 または 453) や GLP に準拠したものではなく、リスク評価に適切なものではないとみなされた。

#### In vitro 試験

データは、得られていない。

#### 4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

データは、得られていない。

#### 4.1.2.8.3 他の情報

12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセテート (TPA) をプロモータとして用い、腫瘍イニシエート-プロモート試験が実施されている。2-ニトロトルエン (純度 98%) が、アセトン媒体として、24、120 ないしは 240 mg の用量で、SENCAR マウスの皮膚の表面に適用された。その後の 30 週間、1 週間に 1 度の頻度で、4 µg の TPA によるプロモートが行われた (Slaga *et al.*, 1985)。マウスの生残率は、90% 以上であった。体重には、投与に関連した影響は認められなかった。240 mg 群では、TPA のみの処置を受けたマウスの群と比較して、統計学的に有意ではなかったが、乳頭腫やがん腫の発生率が増加していた。2-ニトロトルエンは、皮膚腫瘍をイニシエートする弱い活性を有している可能性があるとして結論付けられた。

#### 4.1.2.8.3 発がん性の要約

げっ歯類を用いた長期混餌投与による発がん性試験の情報だけが得られている (NTP, 2002)。それらの試験は OECD ガイドライン 451 および GLP に準拠して行われており、したがって、リスク評価の目的に適したものであるとみなされた。

2-ニトロトルエンがラットに対し発がん活性を有することを示す明確な証拠が存在してお

り、雄では、悪性中皮腫、皮下腫瘍、乳腺線維腺腫および肝臓の腫瘍の発生率増加が認められ、雌では皮下腫瘍および乳腺線維腺腫の発生率増加が認められた。雄では肺腫瘍の発生率が、雌では肝細胞腺腫の発生率が増加していたが、これらも被験物質投与に関連したものとみなされた。投与を試験終了まで続けた主試験では、雄ラットにおける悪性中皮腫の発生率は、625 ppm 群で 33%、1250 ppm 群で 48%、2000 ppm 群で 73%であった。途中で投与を停止した試験では、雄ラットにおける悪性中皮腫の発生率は、2000 ppm 群で 73%、5000 ppm 群で 90%であった。中途停止試験の 2000 ppm 群と主試験の 625 ppm 群とを比べると、後者の方が 2-ニトロトルエンの総投与量は約 50%多かったにもかかわらず、中皮腫の発生頻度は、前者の方が高かった。同じ 2000 ppm 群で比べると、主試験と中途停止試験とで、雄ラットにおける中皮腫の発生頻度は同等であった。これらのことから、中皮腫につながる重大な事象は試験期間の早期に起こると考えられ、また、それによる損傷は、非可逆的であると考えられる。中皮腫の分子病理学的発症機序は、良くわかっていない。被験物質投与群では、単核球細胞白血病や精巣の間質性細胞腺腫の発生率が減少していたが、それらはそれぞれ脾臓への毒性ないしは精巣への毒性に関連したものであると考えられた。

2-ニトロトルエンが雌雄のマウスに対しても発がん性を有することを示す明確な証拠が存在しており、血管肉腫、大腸(盲腸)のがんおよび肝細胞腫瘍の発生率増加が認められている(肝細胞腫瘍については雌のみ。雄は血管肉腫の発生により、肝細胞腫瘍が現れる以前に死亡)。自然発生する血管肉腫では、*p53* 遺伝子や  $\beta$ -カテニン遺伝子の突然変異は認められないのに対し、2-ニトロトルエンに誘発された血管肉腫では、それらの突然変異が認められた。このことから、2-ニトロトルエンが誘発するがんの発生経路は、血管肉腫が自然発生する経路とは異なることが示唆される。

文献では、2-ニトロトルエンの発がん性に関する疫学試験の報告は、得られていない。しかし、Ward *et al.* (NTP, 2002 の中で引用)によれば、関連化学物質である *o*-トルイジンに曝露された労働者の群において、過剰発がんが認められている。

要約すると、ラットとマウスの両方において、複数の部位で、腫瘍発生率が増加することを示す十分な証拠が得られている。また発生時期が非常に速いことを示す証拠も存在する。これらの所見は、遺伝毒性試験で得られた知見に基づく遺伝毒性原因論と整合するものである。

これらのことから、EU の基準に基づくと、2-ニトロトルエンは、カテゴリー2 の発がん性物質とみなされ、したがって、TR45 を付与すべき化学物質に分類される。

#### 4.1.2.9 生殖毒性

##### 4.1.2.9.1 生殖能力への影響

#### 動物試験

#### 経口

#### ラット

亜慢性毒性および生殖毒性を検討した試験において、1 週間の馴化飼育を終えた Wistar ラット(各群雌雄 10 匹ずつ、体重約 200 g)に、2-ニトロトルエン(純度 99%)が、オリーブ油を媒体として、0 ないしは 200 mg/kg 体重の用量で、週 5 日で 3 ヶ月間強制経口投与された。その後、被験物質投与群の雄 5 匹ずつを、非投与群の雌 5 匹または投与群の雌 5 匹と交配させ、また、非投与群の雄 5 匹ずつを、非投与群の雌 5 匹または投与群の雌 5 匹と交配させた。被験物質投与群の雌には、妊娠期間を通じて投与が続けられたが、仔動物への授乳期間中は、投与は行われなかった。さらに、非投与群の雄と交配された非投与群の雌 2 匹に対して、仔動物への授乳期間中に被験物質投与が行われた。仔動物は、被験物質の投与は受けず、分娩 3 か月後に屠殺された(Ciss, 1978; Ciss *et al.* 1980b)。親動物の精巣や卵巣には、被験物質投与に関連した組織病理学的変化は認められなかった。また、仔動物の数は、被験物質投与群でも非投与群でも同様であった。したがって、この試験における用量では、2-ニトロトルエンは生殖能力に何ら影響を及ぼさなかったと言える(より詳細には、4.1.2.6.1 の亜慢性毒性の項を参照)。

Huntingdon(1994、KemI 1994 の中で引用)は、生殖毒性/発生毒性スクリーニング試験を行い、その中で、雌雄の CD ラットに、2-ニトロトルエンを、コーン油を媒体として、0、50、150 ないしは 450 mg/kg 体重/日の用量で、合計で約 10 週間(交配前の 2 週間、交配期間の 2 週間、妊娠期間の 20 日間および分娩後の 21 日間)強制経口投与した。仔動物は、分娩後 21 日の時点で屠殺された。450 mg/kg 体重/日群においては、雌雄両方で被毛が濡れたようになる症状が全体的に認められ、また、雄では全例で被毛が褐色に汚れる症状も観察され、これはその後雌でもほとんどの例で認められるようになった。150 mg/kg 体重/日以上群の雄では、体重増加量や飼料消費量の低下が認められた。450 mg/kg 体重/日群の雌では、妊娠期間中体重増加量の低下が生じたが、分娩 21 日後の時点では回復していた。雌の飼料消費量は、150 mg/kg 体重/日以上群で、分娩 1~13 日において、低値であった。親動物では、50 mg/kg 体重/日以上群の雌および 150 mg/kg 体重/日以上群の雄で肝臓重量の増加が、150 mg/kg 体重/日以上群の雌雄で腎臓および脾臓重量の増加が認められた。生殖系に関しては、150 mg/kg 体重/日以上群で、精巣上体、精嚢および前立腺重量の低下

が用量依存的に認められ、また 450 mg/kg 体重/日群で、精巣重量の低下が認められた。これ以上詳細な報告は無いため、これらの影響は、生殖能力の損傷を十分に示す証拠とはみなされなかった。

OECD ガイドライン 408 および GLP に準拠して実施された亜慢性試験の中で、10～15 日間の馴化飼育を終えた F344/N ラット(各群雌雄 10 匹ずつ、6 週齢)に、2-ニトロトルエン(純度 96%超)が、0、625、1250、2500、5000 ないしは 10000 ppm の濃度で、13 週間混餌投与された(雄における用量は 0、45、89、179、353 ないしは 694 mg/kg 体重、雌における用量は 0、44、87、178、340 ないしは 675 mg/kg 体重)(NTP, 1992; Dunnick, Elwell and Bucher, 1994)。5000 ppm 以上の濃度で、雄においては、精子数の減少と精子の運動性の低下を伴う精巣の変性が、雌においては、発情周期の延長が認められた。なお、これらの濃度は、全身毒性が認められる範囲に入っていた(より詳細には 4.1.2.6.1 項参照)。

亜慢性毒性を検討した試験の中で、9 日間の馴化飼育を終えた F344 ラットの雄に、2-ニトロトルエン(純度 99.8 ± 0.3%) が、0 ないしは 5000 ppm の濃度(0 ないしは 292～296 mg/kg 体重)で、13 週間もしくは 26 週間混餌投与された。また、13 週間の混餌投与を受け、その後試験 26 週目の剖検に至るまで対照飼料で飼育される群も設けられた(NTP, 1996)。精細管の変性が認められ、投与が続けられるとともに重症度が增高し、試験途中で投与が停止された群でも、その影響の回復は認められなかった。なお、この濃度は、全身毒性が認められる範囲に入っていた(より詳細には 4.1.2.6.1 項参照)。

## マウス

GLP に準拠して実施された亜慢性試験の中で、12～14 日間の馴化飼育を終えた B6C3F<sub>1</sub> マウス(各群雌雄 5 匹ずつ、6 週齢)に、2-ニトロトルエン(純度 96%超)が、625、1250、2500、5000 ないしは 10000 ppm の濃度で、13 週間混餌投与された(雄における用量は 104、223、415、773 ないしは 1536 mg/kg 体重、雌における用量は 132、268、542、1007 ないしは 1712 mg/kg 体重)(NTP, 1992; Dunnick, Elwell and Bucher, 1994)。10000 ppm 群の雄の中に、精子運動性の低下を示す例が認められた(より詳細には 4.1.2.6.1 項参照)。

## ヒトにおける試験

データは、得られていない。

#### 4.1.2.9.2 発生・発達毒性

##### 動物試験

##### 経口

##### ラット

亜慢性毒性および生殖毒性を検討した試験において、1 週間の馴化飼育を終えた Wistar ラット(各群雌雄 10 匹ずつ、体重約 200 g)に、2-ニトロトルエン(純度 99%)が、オリーブ油を媒体として、0 ないしは 200 mg/kg 体重の用量で、週 5 日で 3 ヶ月間強制経口投与された。その後、被験物質投与群の雄 5 匹ずつを、非投与群の雌 5 匹または投与群の雌 5 匹と交配させ、また、非投与群の雄 5 匹ずつを、非投与群の雌 5 匹または投与群の雌 5 匹と交配させた。被験物質投与群の雌には、妊娠期間を通じて投与が続けられたが、仔動物への授乳期間中は、投与は行われなかった。さらに、非投与群の雄と交配された非投与群の雌 2 匹に対して、仔動物への授乳期間中に被験物質投与が行われた。仔動物は、被験物質の投与は受けず、分娩 3 か月後に屠殺された(Ciss, 1978; Ciss *et al.* 1980b)。仔動物の死亡率、活動性および行動は、被験物質投与群と非投与群とで同等であった。また、被験物質投与の有無にかかわらず、仔動物の臓器には、組織病理学的変化は認められなかった。したがって、この試験における用量では、2-ニトロトルエンは発生毒性を示さなかったと言える。さらに、母乳を介した被験物質の移行によって毒性が生じることもなかった(より詳細には、4.1.2.6.1 の亜慢性毒性の項を参照)。

Huntingdon(1994、KemI 1994 の中で引用)は、生殖毒性/発生毒性スクリーニング試験を行い、その中で、雌雄の CD ラットに、2-ニトロトルエンを、コーン油を媒体として、0、50、150 ないしは 450 mg/kg 体重/日の用量で、合計で約 10 週間(交配前の 2 週間、交配期間の 2 週間、妊娠期間の 20 日間および分娩後の 21 日間)強制経口投与した。仔動物は、分娩後 21 日の時点で屠殺された。450 mg/kg 体重/日群においては、雌雄両方で被毛が濡れたようになる症状が全体的に認められ、また、雄では全例で被毛が褐色に汚れる症状も観察され、これはその後雌でもほとんどの例で認められるようになった。150 mg/kg 体重/日以上群の雄では、体重増加量や飼料消費量の低下が認められた。450 mg/kg 体重/日群の雌では、妊娠期間中体重増加量の低下が生じたが、分娩 21 日後の時点では回復していた。雌の飼料消費量は、150 mg/kg 体重/日以上群で、分娩 1~13 日において、低値であった。親動物では、50 mg/kg 体重/日以上群の雌および 150 mg/kg 体重/日以上群の雄で肝臓重量の増加が、150 mg/kg 体重/日以上群の雌雄で腎臓および脾臓重量の増加が認められた。生殖系に関しては、150 mg/kg 体重/日以上群で、精巣上体、精囊および前立腺重量の低下が用量依存的に認められ、また 450 mg/kg 体重/日群で、精巣重量の低下が認められた。

450 mg/kg 体重群では、12 匹の雌のうち 3 匹が、分娩後、試験期間の途中で(分娩後 1 または 2 日目に)死亡し、それらの子宮には、着床後死亡胚が認められた。分娩後 4 または 8 日目以降、全ての被験物質投与群において、仔動物の顕著な生育遅延が、用量依存的に認められた。450 mg/kg 体重群の 12 匹の雌親のうち 3 匹が死亡したのは、2-ニトロトルエンの全身毒性によるものであり、したがって、胎仔の死亡は、母体毒性により二次的に現れた影響である。仔動物の生育遅延は発生・発達毒性を示唆するものと捉えることもできるが、その重症度について詳細な記述が無いため、この影響を発生・発達毒性に関する分類に用いることができるのか、または、この影響を発生・発達上の微細な変化と考えるべきなのか、確信が得られていない。さらに、もし仔動物の発育遅延を毒性影響とみなすならば、母乳を介した被験物質の移行により何らかの毒性が生じることを除外視することはできなくなる。

### ヒトにおける試験

データは、得られていない。

#### **4.1.2.9.3 生殖毒性の要約**

生殖能力に関する情報は、実験動物を用いた非標準的な試験から得られたものだけである。5000 ppm の濃度で 13 週間 2-ニトロトルエンを混餌投与された雄ラットでは、精子数の減少および精子の活動性低下を伴う精巣および精巣上体の損傷が引き起こされた。同様の被験物質投与を受けた雌においては、発情周期の延長を示す例が認められた。10000 ppm(試験した最高濃度)で混餌投与を受けたマウスでも、精子の活動性低下が認められた。精巣におけるこれらの影響に基づけば、生殖能力に関して何らかの分類が必要となることが示唆される。しかし、これらの影響が全身毒性が現れる用量で生じており、生殖能力に関する明確な影響ではないと思われるため、現実的には、EU の基準に沿って、カテゴリ-3 の生殖毒性(Xn, R 62)だけの適用が妥当であると考えられる。その場合、生殖毒性に関する NOAEL は、2500 ppm(179 mg/kg 体重)とみなされる。

発生・発達毒性に関する情報は、実験動物を用いた 2 件の非標準的な試験から得られたものだけである。それらのうちの一方は、CD ラットを用いたもので、発生・発達毒性を示唆する影響は、仔動物の発育遅延だけであった。ただし、その重症度について詳細な記述が無いため、この影響を発生・発達毒性に関する分類に用いることができるという確信は得られていない。また、もしこの影響を毒性影響とみなすならば、母乳を介した被験物質の移行により何らかの毒性が生じることを除外視することはできなくなる。もう一方は、

## EURAR 2-NITROTOLUENE

Wistar ラットを用いたもので、被験物質投与群由来の仔動物と非投与群由来の仔動物とで、死亡率、活動性および行動に差は認められず、また、被験物質投与の有無にかかわらず、仔動物の臓器に組織病理学的変化は認められなかった。したがって、2-ニトロトルエンは、発生・発達毒性を示していない。また、母乳を介した被験物質の移行によって毒性が生じることもなかった。ここに述べた試験の間に結果の相違が認められたのは、ラットの系統間の感受性の違いによると考えることができる。得られたデータに基づくと、EU の基準に沿って発生・発達毒性に関する分類を行うことは妥当ではない。しかし、最悪の場合を想定してリスクの総合評価を行う際には、発生・発達毒性に関する LOAEL として、50 mg/kg 体重が用いられる。