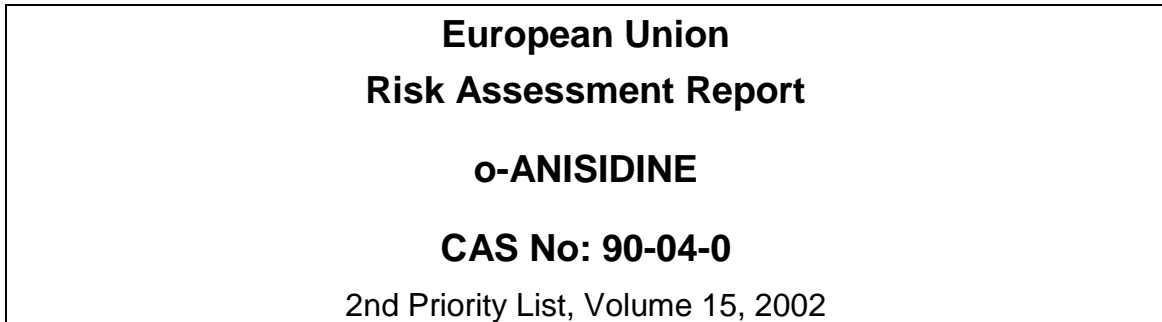


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 15, 2002)
o-アニシジン

European Chemicals Bureau
Institute for Health and Consumer Protection
European Chemicals Bureau
Existing Substances
European Union
Risk Assessment Report
CAS No: 90-04-0
EINECS No: 201-963-1
o-anisidine
Nc1ccc(OC)cc1
EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
EUR 19834 EN
CAS: 90-04-0
EC: 201-963-1
2nd Priority List
Volume: 15
PL 15

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
2016年8月

本部分訳文書は、o-anisidine (CAS No: 90-04-0)に関するEU Risk Assessment Report, (Vol. 15, 2002)の第4章「ヒト健康」のうち、第4.1.2項「影響評価：有害性の特定および用量-反応関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、
<http://echa.europa.eu/documents/10162/c556ccd6-05be-41ab-a896-058ca6b8fae3>
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)評価

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

検索により得られた文献中には、o-アニシジンの代謝を調べることを主目的とした *in vivo* 試験の情報は認められなかった。毒性学的試験において見られた影響に基づくと、o-アニシジンは、経口、経皮および吸入曝露により体内に吸収されることが想定される。

o-アニシジンの代謝や作用機序は、まだ完全には解明されていない。ただし、他の芳香族アミンと同様に、o-アニシジンも N-ヒドロキシ誘導体に酸化されると思われ、そうした誘導体は、ヘモグロビン中のヘム基と反応して、メトヘモグロビンを生じると考えられる (McLean *et al.*, 1969; Ashby *et al.*, 1991; 4.1.2.2 章を参照)。

他の芳香族アミンの場合と同様に、o-アニシジンの代謝活性化には、N,O-アセチル化が関与している可能性がある。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の N-または O-アセチルトランスフェラーゼ活性を増強させた菌株を用いた遺伝子突然変異試験では、o-アニシジンの変異原活性が検出されている (Thompson *et al.*, 1992; Oda *et al.*, 1995; 4.1.2.7 章を参照)。

In vitro 試験では、o-アニシジンの代謝活性化に、プロスタグランジン H シンターゼなどの過酸化酵素が関与している可能性が示唆されている。プロスタグランジン H シンターゼは、膀胱など、哺乳類の組織に広範に分布している (Thompson *et al.*, 1992)。Thompson *et al.* (1991) は、セイヨウワサビのペルオキシダーゼをモデル酵素として用いた試験で、o-アニシジンから反応性の中間体が生じること、そしてそれら中間体が核酸やタンパク質に共有結合することを報告している。生成する反応性の中間体としては、求電子性のジイミンやキノニン代謝産物が挙げられる。こうした代謝産物は、プロスタグランジン H シンターゼを用いた場合にも生成する (Thompson *et al.*, 1992)。

o-アニシジンの代謝においてはさらに、O-脱メチル化が生じている可能性がある。ラットの肝臓から得たミクロソームを用いた *in vitro* 試験では、N,N-ジメチルアニリンからホルムア

ルデヒドが生成する反応に対する o-アニシジンが O-脱メチル化される反応の相対比率は 13%であった (Schmidt *et al.*, 1973)。

o-アニシジンを、甲状腺ペルオキシダーゼ、過酸化水素、ならびに甲状腺ペルオキシダーゼの基質であるグアヤコールおよびヨウ化物とインキュベートしたところ、グアヤコールやヨウ化物の酸化が効果的に阻害された (IC₅₀: 1.9 μM)。雄の F344 ラットに 2 年間混餌投与した試験では、濾胞細胞腫瘍の発生率増加が認められている。甲状腺ペルオキシダーゼが持続的に阻害され、それに伴って甲状腺ホルモンの生成が低減すると、甲状腺腫瘍を引き起こすことが知られているが、この機序は、前述の腫瘍発生率増加の一因となり得る。

色素 ¹⁴C-FAT 92367/A を被験物質として、OECD のガイドライン 417 に準拠したトキシコキネティクス試験が実施されている。Wistar ラットに被験物質が経口投与された (目標用量を 7.4 mg/kg 体重とした単回経口投与)。この被験物質が胃腸管において細菌による分解を受けたことにより生じたと思われる o-アニシジンが、雄ラットの血漿中 [投与された ¹⁴C 放射活性の 1.5% (0.017 μg/g) が o-アニシジンとみなされた]、雄ラットの尿中 (投与された ¹⁴C 放射活性の 0.14%)、および雌雄のラットの糞便中 (投与された ¹⁴C 放射活性の 1.1% および 0.9%) に検出された。投与量の 93% を超える ¹⁴C 放射活性が、96 時間以内に主として尿を介して排泄され、その大部分は、最初の 24 時間以内に排泄された (Ciba-Geigy AG, 1995)。被験物質の色素 (クロムを原料とする) は、工業的に最も重要なアゾ色素やナフトール色素に類しておらず (第 2 章も参照)、そのため、代謝試験のデータも得られていない。

結論

生物における o-アニシジンの吸収、分布、または代謝を検討するために行われた試験のデータは、得られていない。ただし、他の毒性試験の結果から、o-アニシジンが、経口、吸入および経皮吸収されることが想定される。作用機序に関しては、ほんのわずかな情報しか得られていない。色素を被験物質としたトキシコキネティクス試験では、o-アニシジンの生成が認められ、これはおそらく、消化された色素が胃腸管で細菌による分解を受けたことによると思われた。被験物質の色素の排泄が急速であり、また log K_{ow} が 1.18 である (第 1.3 章参照) ことから、o-アニシジンは生体内蓄積することはないと思われる。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物試験

OECD のガイドライン 401 に準拠した経口投与試験が実施されており (1,250、1,600、1,800、2,000、2,500、3,150 ないしは 4,000 mg/kg 体重を強制経口投与)、Wistar ラットの LD₅₀ は 1,890 mg/kg 体重であった。しゃがみ姿勢、よろめき歩行、自発運動の減少、めまいおよび呼吸抑制が、低用量側の群で認められた。高用量側の群ではさらに、腹臥位、正向反射消失、橙色尿、皮膚の褪色化が認められ、2,500 mg/kg 体重を超える用量群では、何例かで呼吸雑音も報告されている。肉眼剖検では、胃腸管および肺における血管の鬱血、小腸における黄赤色の泡立った液体の貯留、および胃、小腸ならびに膀胱における出血が認められた。1,800 mg/kg 体重群の 1 匹を除いて、生残したラットには、投与の 4 日後の時点で毒性の徴候は認められなくなっていた (例外の 1 匹も 11 日以内には回復した) (Hoechst AG, 1984a)。

報告内容が不十分であるため確証が取れない試験の報告も、何件か得られている。それらによると、LD₅₀ 値は、ラットで 2,020 mg/kg 体重およびマウスで 1,410 mg/kg 体重 (Vasilenko & Zvezdaj, 1981)、またウサギで 870 mg/kg 体重 (Prosolenko, 1975) であった。ある程度の血液学的変化が見られたことや、貧血および腎毒性が生じたことが記載されている。

他の芳香族アミンと同様に、o-アニシジンも、メトヘモグロビン生成を引き起こす。雄の CBA マウスに 690 mg/kg 体重を、雄の Alpk:APfSD ラットに 690 ないしは 1,380 mg/kg 体重を単回強制経口投与し、3~48 時間の間に試料採取を行った試験では、メトヘモグロビンの有意な上昇が認められた (マウス:対照で 0.66%であったのに対し最高 4.8%、ラット:対照で 1.1%であったのに対し最高 15.4%) (Ashby *et al.*, 1991)。ネコに 7.7 mg/kg 体重の用量で単回静脈内投与し、1~5 時間の間に試料採取を行った試験でも、メトヘモグロビンの有意な上昇が認められた (対照で 1.1%であったのに対し最高 11.5%) (McLean *et al.*, 1969)。この様なメトヘモグロビンの上昇は、ネコがヒトと同程度のメトヘモグロビン生成能を有することから、ヒトの健康にとっても重要な事象である。

OECD のガイドライン 403 に準拠した急性吸入試験 (o-アニシジンのエアロゾルを吸入) が実施されており、Wistar ラットの 4 時間 LC₅₀ は、技術的に到達可能な曝露濃度である 3.87 mg/L を超えると判断された。死亡例は生じなかった。非特異的な影響以外では、運動障害、呼吸障害および反射障害が、血性鼻漏およびチアノーゼと共に認められた。曝露から 8 日目以降、毒性の徴候は認められなくなった。体重への影響は、雌の 10 匹中 2 匹だけにおいて、わずかに認められた。肉眼剖検では、毒性影響は検出されなかった (Hoechst AG, 1989b)。

OECD のガイドライン 402 に準拠した経皮適用試験が実施されており、Wistar ラットの LD₅₀

は、試験で設定された唯一の用量である 2,000 mg/kg 体重を超えると判断された。死亡例は生じなかった。非特異的な影響以外では、運動失調、流涙、眼瞼狭窄、橙色尿が報告されている。適用の 2 日後には毒性の徴候は認められなくなり、また肉眼剖検でも、影響を示す病理所見は検出されなかった。

4.1.2.2.2 ヒトのデータ

ヒトにおける急性毒性データは、得られていない。現在までのところ、o-アニシジンによる職業性メトヘモグロビン血症は、報告されていない(Hoechst AG, 1996f)。

4.1.2.2.3 急性毒性の要約

げっ歯類を用い、適切に報告がなされている試験に基づくと、o-アニシジンは、経口投与の場合、有害性を示す(LD₅₀は 1,890 mg/kg 体重)。o-アニシジンは、到達可能な曝露濃度で吸入させた場合(エアロゾルとして 3.87 mg/L)でも、限度試験で 2,000 mg/kg 体重を経皮適用した場合でも、死亡例を生じさせることはなかった。経口投与、吸入曝露または経皮適用後に急性毒性徴候が見られたことから、o-アニシジンはいずれの生理学的経路によっても吸収されることが証明された。げっ歯類に経口投与した場合やネコに静脈内投与した場合には、メトヘモグロビンの形成が認められた。ネコの試験で認められたメトヘモグロビン血症の重症度は、ヒトで引き起こされるメトヘモグロビン血症の重症度に関連していると考えられることから、o-アニシジンは、T; R23/24/25 の「毒性」物質に分類される。指令 67/548/EC の付属書 I に基づく分類については、第 1 章を参照のこと。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物のデータ

OECD のガイドライン 404 に準拠して、ウサギを用いた急性皮膚刺激性/腐食性試験が実施されている(被験物質の純度 99%)。生じた毒性の徴候(紅斑および軽度の水腫形成)は全て、適用パッチを除去してから 72 時間以内に消失した。ガイドライン 83/467/EEC の分類基準によれば、o-アニシジンは皮膚刺激性物質には分類されない(Hoechst AG, 1984b)。

同様に、OECD のガイドライン 405 に準拠して、ウサギを用いた急性眼刺激性/腐食性試験が実施されており(被験物質の純度 99%)、ほんのわずかだが、o-アニシジンが刺激性を有す

ることが示された。生じた毒性の徴候(結膜浮腫、結膜発赤、虹彩炎および角膜炎)は全て、適用後7日以内に消失した。ガイドライン 83/467/EEC の分類基準によれば、o-アニシジンは眼刺激性物質には分類されない(Hoechst AG, 1984b)。

4.1.2.3.2 ヒトのデータ

ヒトの皮膚や眼に対する局所的な刺激性影響に関するデータは、得られていない。

4.1.2.3.3 刺激性の要約

ウサギを用いて信頼性のある皮膚刺激性試験および眼刺激性試験が行われており、これらの両方の結果に基づくと、o-アニシジンは弱い刺激性を示したものの、その程度は、皮膚または眼刺激性物質としての分類の基準を満たしているとは言えない。

4.1.2.4 腐食性

動物のデータ

o-アニシジンは、ウサギの皮膚や眼に対して腐食性影響を示さないことが明らかとされている(4.1.2.3.1 項参照)。

ヒトのデータ

ヒトの皮膚や眼に対する腐食性影響に関しては、データが得られていない。

腐食性の要約

ウサギを用いて信頼性のある皮膚刺激性/腐食性試験が行われており、その結果に基づくと、o-アニシジンは、皮膚腐食性を示さない。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物のデータ

モルモットに、0.5 mg/kg 体重を皮内適用もしくは 2.5 mg/kg 体重を皮膚適用した試験では、o-アニシジンは、弱い感作性を示した(これ以上の情報は得られていない) (Ilichkina, 1985)。この試験の報告内容は不十分であり、試験結果の妥当性を判断することができない。

マウス局所リンパ節試験が行われている (Ashby *et al.*, 1995)。この試験は、いくつかの芳香族アミンを被験物質として用い、標準的な試験手順を採用して実施され、皮膚感作性に関する求電子理論に基づいて構造-活性相関(SAR)が検討された。o-、m-、および p-アミノフェノール化合物は、用量依存性にどちらとも言えない陽性反応を示した化合物群に含まれていた。o-アミノフェノールは、o-アニシジンが o-脱メチル化によって代謝される際に生成する可能性がある (Schmidt *et al.*, 1973 などの *in vitro* 試験で示されている; 4.1.2.1 項参照) が、改良単回投与アジュバント試験 (Basketter & Goodwin, 1988) において、やはり陽性を示した。

また、o-アミノフェノール p-トルイジンおよびアニリンの皮膚感作性が、皮膚試験プロトコルを用いて調べられており、国際統一化学物質情報データベースのそれぞれのデータシートに報告されている。そこでは陽性という結果が示されているが、これとは反対に、構造類縁体である o-フェネチジン(1-アミノ-2-エトキシベンゼン)を被験物質として用いて行われた、信頼性が高く適切に報告がなされている Magnusson and Kligman モルモットマキシミゼーション試験では、陰性という結果が示されている (Bayer AG, 1991)。

4.1.2.5.2 ヒトのデータ

ヒトにおける感作性影響に関するデータは、得られていない。化学物質の混合物(o-アニシジンを 0.7%含む)が放出された、ドイツで起きた化学事故では、曝露を受けた子供たちにおいて、アトピー性皮膚炎の発生率が上昇した (Traupe *et al.*, 1997)。ただし、その混合物には 20 を超える化学物質が存在していたため、皮膚炎の誘発に o-アニシジンがどのような役割を果たしたかを検討することはできない。

4.1.2.5.3 感作性の要約

動物に対する o-アニシジンの皮膚感作性に関する情報は限られている。モルモットの皮内

ないしは表皮に適用を行った試験では、弱い陽性という結果が得られているが、報告内容が十分ではないため、その妥当性については、不確実性が残る。代謝産物の o-アミノフェノールを含め、構造的に関連性のある多くの物質も、他の試験で陽性を示している。しかし、構造類縁体である o-フェニチジンは、適切に実施され、十分な報告がなされているマキシミゼーション試験において、陰性を示した。結論としては、o-アニシジンが皮膚感作性を有するか否かに関しては不確実性が残っており、この問題を解決するにはさらなる情報が必要とされる。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物データ

雌雄の Wistar ラットを用い、OECD のガイドライン 407 に準拠して 28 日試験が実施されている(o-アニシジンを 0、16、80 ないしは 400 mg/kg/日体重の用量で強制経口投与)が、16 mg/kg 体重/日群においては、被験物質に関連した(すなわち非特異的でない)影響は何も認められなかった。80 mg/kg 体重/日以上群では、黄色尿および軽度の溶血性貧血が報告されており、これらの影響は 400 mg/kg 体重/日群においてより顕著に認められた。雌では、血中ビリルビン濃度および肝臓の相対重量が増加した。雌雄両方において、組織病理学的検査により脾臓の形態学的変化(ヘモジデリン沈着、充血、および造血像)が認められた。400 mg/kg 体重/日群では、15 日目に、流涎、しゃがみ姿勢および腹部膨満が認められた。雄においては、体重減少および肝臓ならびに腎臓の相対重量の増加が示され、一方、雌においては、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)の上昇が示された。雌雄いずれにおいても飲水量が増加し、血液中のビリルビン濃度および尿素窒素濃度が上昇し、脾臓の相対重量が増加した。この試験からは、NO(A)EL として 16 mg/kg 体重/日という値が、LOAEL として 80 mg/kg 体重/日という値が導出された。

F344 ラットや B₆C₃F₁ マウスを用いて行われた、用量設定試験[o-アニシジン塩酸塩(CAS no. 134-29-2)を 0、1,000、3,000、10,000 ないしは 30,000 ppm の用量で 7 週間混餌投与(ラットでは約 75、225、750 ないしは 2,250 mg/kg 体重/日に相当; マウスでは約 150、450、1,500 ないしは 4,500 mg/kg 体重/日に相当); 各群雌雄 5 匹ずつ]の情報が得られている。ラットでは、10,000 ppm 以上において、用量依存的に 10%を超える体重低下と中等度の脾臓肥大が認められ、それらの脾臓は黒色化および粒状化を呈していた。また、1,000 ないしは 3,000 ppm で投与を受けていた雄ラットの脾臓も、粒状化していた。3,000 ppm で投与を受けていたマウスでは、用量依存的に 10%を超える体重低下が示され、10,000 ppm 以上で投与を受けていたマウスでは、やはり脾臓が黒色化し、肥大していた(NCI, 1978)。

2年間試験(NCI, 1978)において、F344 ラットに o-アニジジン塩酸塩が 0、5,000 ないしは 10,000 ppm の濃度で混餌投与された。また、B₆C₃F₁ マウスに o-アニジジン塩酸塩が 0、2,500 ないしは 5,000 ppm の濃度で混餌投与された。生残ラットは、103～107 週目に全て屠殺され、生残マウスは、104 または 105 週目に全て屠殺された。試験期間の途中で死亡した全ての被験動物、および試験期間の終了時に屠殺した全ての被験動物について、通常の組織病理学的検査が実施されたが、血液学的ないしは生化学的検査は実施されなかった。発がん性影響については、4.1.2.8.1 項に記載している。いずれの動物種についても、用量依存的な体重減少が報告されている。いずれの動物種においても、組織病理学的検査で認められた非腫瘍性病変は、どれも被験物質に関連したものではないと考えられた。

反復吸入試験もしくは反復経皮投与試験の情報は、o-アニジジンについては得られていない。

4.1.2.6.2 ヒトのデータ

ヒトが反復曝露された場合にみられる影響に関するデータは、得られていない。

4.1.2.6.3 反復投与試験の要約

OECD のガイドライン 407 に準拠して行われたラットの 28 日間経口投与試験からは、NO(A)EL として 16 mg/kg 体重/日という値が、LOAEL として 80 mg/kg 体重/日という値が導出された。80 mg/kg 体重/日で認められた影響は、急激なメトヘモグロビン形成の結果生じたものと考えられ、メトヘモグロビン形成に関しては、毒性有りに分類することが織り込み済みであると言える。これに基づき、本リスク評価書作成者は、全身性影響に関しては、Xn; R 48/22「有害性有り」への分類を提案しない。実験動物を用いた反復吸入試験もしくは反復経皮投与試験の情報は、得られていない。

4.1.2.7 変異原性

In vitro および *in vivo* での変異原性試験の結果は、以下の **Table 4.5** および **4.6** に詳述されている。

細菌系および酵母系

原核生物を用いた通常の *in vitro* 系により行われた試験〔ネズミチフス菌 (*Salmonella*

typhimurium)を用いた Ames 試験または umu 試験、大腸菌 (*Escherichia coli*)を用いた復帰突然変異試験]のデータがいくつか得られているが、o-アニシジンは、代謝活性系の存在下でも非存在下でも、陰性という結果を示している。

しかし、ネズミチフス菌の TA 98、TA 100、TA 1537 および TA 1538 を用いた試験では、被験物質濃度が低くても、また、N-アセチルトランスフェラーゼ活性が高められたネズミチフス菌を用いた試験では、1 菌株において、代謝活性系の存在下で陽性という結果が示された例が見受けられた(4.1.2.1 章も参照)。複数の研究施設にまたがって実施されたある試験では、反応にかなりの相違が認められた。ノルハルマンを添加した場合、ネズミチフス菌 TA 98 において、S9 mix の存在下で非常に強い遺伝毒性反応が示されている。

さらに、o-アニシジンは、出芽酵母において、染色体内の組換えにより遺伝子欠失を引き起こし得ることが示されている。

哺乳類細胞を用いた *in vitro* 系

CHO 細胞を用いた染色体異常試験および姉妹染色分体交換試験、ならびにマウスリンフォーマ試験において、代謝活性系の存在下および非存在下で陽性という結果が得られている。マウスリンフォーマ細胞を用いたアルカリ溶出試験では、代謝活性系の存在下でのみ陽性という結果が得られている。これに対し、ラットの肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験では、陰性という結果が得られている。

哺乳類細胞を用いた *in vivo* 系

哺乳類の細胞を用いた *in vivo* 試験系のほとんどで、陰性という結果が得られている [¹⁴C 標識物質もしくは ³²P ポストラベル法を用いて o-アニシジンの DNA への共有結合性を検討した試験(膀胱、肝臓)、DNA 一本鎖切断試験(肝臓、腎臓、脾臓、膀胱、胸腺、精巣)、宿主経由試験(経口投与)、経口ないしは腹腔内投与による小核試験(骨髄または肝臓)、UDS 試験(腎臓、肝臓)]。また、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)を用いた伴性劣性致死試験でも、o-アニシジンは、陰性という結果を示している。

宿主経由試験(腹腔内投与)、Friedman-Staub 試験(精巣の DNA 合成阻害を検討)、およびキイロショウジョウバエを用いた体細胞突然変異試験ならびに組換え試験では、陽性という結果が得られている。Friedman-Staub 試験は、危険物質の分類、包装および表示に関連する法律、規制および管理規定のすり合わせについての第 28 次評議会指令 67/548/EEC に沿った技術的進歩に値するものとみなされ(OJ L 225, 21.8.2001, p.1)、そうした技術的進歩に関する 2001 年 8 月 6 日付けの委員会指令 2001/59/EC に基づき、当該試験の結果から、o-アニシジ

ンの分類登録は、「カテゴリー3の変異原性物質, R40」から、「カテゴリー3の変異原性物質, R68」へと置換えられ、修正される。

最近確立された Big Blue™ トランスジェニックマウス突然変異試験は、方法として標準化されているが、まだ正式に承認されてはいない。o-アニシジン¹は、この試験において、マウスやラットでの発がんの主要な標的組織である膀胱において、弱いながら lac I⁺突然変異を誘発した。肝臓ではこのような誘発は認められなかった。

目下のところ、遺伝毒性関係の試験からは、o-アニシジンの作用機序は明らかとされていない。過酸化酵素やN-アセチルトランスフェラーゼの関連が示唆されている(4.1.2.1章参照)。このことは、膀胱において、ラジカル化学種が o-アニシジンやその代謝産物から生成する可能性を提示するものであり、この考えは、o-アニシジンの付加体が認められないのに突然変異が認められることと整合している。

Table 4.5 Mutagenicity of o-anisidine *in vitro*

Assay	Strain / Type	Metabolic activation	Concentration range	Results	Comments	Reference
Prokaryotes						
<i>Escherichia coli</i>	WP2uvrA	+ / -	0.3 – 10,000 µg/plate	ambiguous with S9 mix from mouse and hamster; considerable differences in results	four-laboratory study; o-Anisidine HCl was tested; study well documented and described in sufficient detail	Dunkel et al. (1985)
<i>Escherichia coli</i>	WP2, WP2uvrA	+ / -	up to 1,000 µg/ml (only highest tested concentration given)	negative	study well documented and described in sufficient detail	Thompson et al. (1983)
<i>Escherichia coli</i>	WP2/pKM101, WP2uvrA/pKM 101	-	313 – 5,000 µg/plate	negative	two-laboratory study; study well documented and described in sufficient detail	Watanabe et al. (1996)
<i>Escherichia coli</i>	WP2uvrA	+ / -	0.004 - 10 µl/plate	negative	study well documented and described in sufficient detail	Hoechst AG (1984)
<i>Escherichia coli</i>	I. K12/343/636 II. K12/343/591	+ / -	up to 117 mg/ml (only highest tested concentration given)	both strains negative with S9 mix; positive in K12/343/591 without S9 mix	study well documented and described in sufficient detail	Hellmér & Bolcsfoldi (1992a)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	+ / -	0.004 - 10 µl/plate	negative	study well documented and described in sufficient detail	Hoechst AG (1984)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538, G46, C 3076, D 3052	+ / -	up to 1,000 µg/ml (only highest tested concentration given)	negative	study well documented and described in sufficient detail	Thompson et al. (1983)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98, TA 100, TA 102	+ / -	100 µg/plate	negative	in Italian (brief English summary)	Vito et al. (1985)

Table 4.5 continued overleaf

Table 4.5 Mutagenicity of o-anisidine in vitro continued

Assay	Strain / Type	Metabolic activation	Concentration range	Results	Comments	Reference
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98, TA 100	+ / -	1 – 5,000 µg/plate	TA 98: dose-dependent increase from about 1-3,000 µg with S9 mix (also positive when tested with S9 mix and norharman); TA 100: dose-dependent increase from about 1-100 µg with S9 mix	study well documented and described in sufficient detail	Shimizu & Takemura (1983)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537	+ / -	10 – 10,810 µg/plate	ambiguous in TA 100 without S9 mix at about ≥ 1,000 µg	study well documented and described in sufficient detail	Haworth et al. (1983)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537	+ / -	100 – 5,000 µg/plate	TA 98: positive with S9 mix and norharman	study well documented and described in sufficient detail	Wagner & Pugh (1995)
<i>Salmonella typhimurium</i>	YG 1012, YG 1029	+ / -	1 – 1,230 µg/plate	positive in YG 1029 with S9 mix at about ≥ 12 µg	hamster S9 fraction; the strain YG 1029 has an elevated N-acetyltransferase level; study well documented and described in sufficient detail	Thompson et al. (1992)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	+ / -	0.3 – 10,000 µg/plate	TA 98, TA 100, TA 1537, and TA 1538 with S9 mix: judged as positive, although there were considerable differences in results	four-laboratory study; o-Anisidine HCl was tested; study well documented and described in sufficient detail	Dunkel et al. (1985)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 1538	+ / -	50 or 100 µg/plate	negative	study well documented and described in sufficient detail	Garner & Nutman (1977)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98, TA 100	+ / -	3 – 10,000 µg/plate	TA 98: positive with S9 mix at about ≥ 100 µg; TA 100: positive with S9 mix at about ≥ 33 µg	study well documented and described in sufficient detail	Zeiger et al. (1992)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 1538	+ / -	100 µg/plate	negative	study well documented and described in sufficient detail	Ferretti et al. (1977)

Table 4.5 continued overleaf

Table 4.5 Mutagenicity of o-anisidine *in vitro* continued

Assay	Strain / Type	Metabolic activation	Concentration range	Results	Comments	Reference
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 102, TA 2638	-	313 – 5,000 µg/plate	negative	two-laboratory study; study well documented and described in sufficient detail	Watanabe et al. (1996)
<i>umu-test Salmonella typhimurium</i>	TA 1535, NM 2009, NM 2000	+	125 – 1,000 µg/ml	weak increase for umuC gene expression in NM 2009 at ≤ 500 µg	the strain NM 2009 has an elevated O-acetyltransferase level; study well documented and described in sufficient detail	Oda et al. (1995)
Yeast						
DEL assay <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RS112	-	5 – 7.5 mg/ml	positive significant increases in recombination at 5 mg/ml and a 7-fold increase at 7.5 mg/ml recombination was reduced by co-incubation with antioxidant N-acetyl-cysteine	study well documented and described in sufficient detail	Brennan & Schiestl (1999)
Mammalian cell mutation						
Alkaline elution assay	Mouse lymphoma L5178Y/TK ^{+/+} cells	+ / -	without S9 mix: 0.12 - 1.85 mg/ml; with S9 mix: 0.1 - 0.5 mg/ml	negative without S9 mix; positive with S9 mix at about ≥ 0.17 mg	study well documented and described in sufficient detail	Garberg et al. (1988)
Chromosome aberration assay	CHO cells	+ / -	without S9 mix: 1200-1400 µg/ml; with S9 mix: 2,400-2,800 µg/ml	without S9 mix: positive at 1,200-1,300 µg; with S9 mix: positive at ≥ 2,400-2,800 µg	precipitation of the substance at ≥ 1,200 µg; study well documented and described in sufficient detail	Galloway et al. (1987)

Table 4.5 continued overleaf

Table 4.5 Mutagenicity of o-anisidine *in vitro* continued

Assay	Strain / Type	Metabolic activation	Concentration range	Results	Comments	Reference
Chromosome aberration assay	human lymphocytes	+ / -	0.1 or 25 mg/m ³	positive	no further information available (English translation from Russian); documentation insufficient for assessment	Ilichkina (1985)
Mouse lymphoma assay	L5178Y TK ⁺ /- cells	+ / -	without S9 mix: 246 - 1230 µg/ml; with S9 mix: 123 - 370 µg/ml	without S9 mix: positive at ≥ 246 µg; with S9 mix: positive at ≥ 23µg	study well documented and described in sufficient detail	Wangenheim & Bolcsfoldi (1988)
Sister chromatid exchange assay	CHO cells	+ / -	without S9 mix: 38-377 µg/ml; with S9 mix: 2500-3000 µg/ml	without S9 mix: positive at ≥ 38 µg; with S9 mix: positive at ≥ 2,500 µg; positive mainly at doses that induced marked cell cycle delay	precipitation of the substance at ≥ 2,500 µg/ml; study well documented and described in sufficient detail	Galloway et al. (1987)
Unscheduled DNA synthesis assay	rat hepatocytes	-	0.04 – 1 mg/ml	negative	study well documented and described in sufficient detail	San & Sly (1995)
Unscheduled DNA synthesis assay	rat hepatocytes	-	0.06 - 123 ng/ml	negative	study well documented and described in sufficient detail	Thompson et al. (1983)
Unscheduled DNA synthesis assay	rat hepatocytes	-	0.123 - 123 mg/ml	negative	study well documented and described in sufficient detail	Yoshimi et al. (1988)

Table 4.6 Mutagenicity of o-anisidine *in vivo*

Assay	Sex / Strain / Animal	Route of administration	Exposure concentration and duration	Results	Comments	Reference
DNA adduct assay (³² P-post-labelling) (bladder, liver)	female B ₆ C ₃ F ₁ mice or female transgenic B ₆ C ₃ F ₁ (Big Blue™) mice	single oral application via gavage	750 mg o-anisidine HCl/kg	negative	sampling time: 24 h	Ashby et al. (1994)
DNA adduct assay (¹⁴ C-labelling) (bladder, liver)	female B ₆ C ₃ F ₁ mice	single oral application via gavage	750 mg ¹⁴ C-o-anisidine HCl/kg	negative	sampling time: 6, 12 or 24 h	Ashby et al. (1994)
Big Blue™ transgenic mouse mutation assay (bladder, liver)	female transgenic B ₆ C ₃ F ₁ (Big Blue™) mice	1, 3 or 10 applications via gavage	750 mg o-anisidine HCl/kg	small increase in mutation frequency in the bladder (increased mutation frequencies were observed following 1, 3, or 10 daily doses with sampling times 1 or 2 weeks after the final dose); statistical significance was only reached 2 weeks after either 3 or 10 daily administrations		Glickman et al. (1993); Ashby et al. (1994); Morrison & Ashby (1994)
DNA single strand break assay (liver, kidney, spleen, bladder)	male Wistar rats	I. single oral application via gavage; II. single i.p. application	I. 500 mg/kg; II. 500 or 750 mg/kg	negative	sampling time: I. 4 h; II. 500 mg/kg: 1 or 4 h, 750 mg/kg: 4 h	Ashby et al. (1991)
DNA single strand break assay (liver, kidney, spleen, bladder)	male Wistar rats	6 i.p. applications (no further data)	200 mg/kg	negative		Ashby et al. (1991)
DNA single strand break assay (liver, kidney, spleen, bladder)	male Wistar rats	single i.p. application 5 days after tissue enzyme induction with Aroclor 1254	200 mg/kg	negative	sampling time: 4 h	Ashby et al. (1991)
DNA single strand break assay (liver, thymus, testes)	male Sprague-Dawley rats	single oral application via gavage	700 mg/kg	negative	hepatocytes were isolated at 3 or 16 h; cells from thymus and testes were isolated at 16 h	Ashby et al. (1991)

Table 4.6 continued overleaf

Table 4.6 Mutagenicity of o-anisidine *in vivo*

Assay	Sex / Strain / Animal	Route of administration	Exposure concentration and duration	Results	Comments	Reference
Host-mediated assay	male NMRI mice	oral unspecified	430 or 1,300 mg/kg	negative	test with <i>E. coli</i> K12; bacterial samples were collected after a 2-h exposure from blood, liver, lung, kidney and testes	Hellmér & Bolcsfoldi (1992b)
Host-mediated assay	male NMRI mice	i.p.	310 or 920 mg/kg	positive in blood, liver and kidney	test with <i>E. coli</i> K12; bacterial samples were collected after a 2-h exposure from blood, liver, lung, kidney and testes	Hellmér & Bolcsfoldi (1992b)
Inhibition of testicular DNA synthesis	male mice	oral unspecified	200 mg/kg	positive	"Friedman-Staub assay" (test system not sensitive enough for this investigated parameter)	Seiler (1977)
Micronucleus assay (bone marrow)	male CBA mice	3 oral applications via gavage (no further data)	345 or 690 mg/kg	negative	sampling time: 48 h	Ashby et al. (1991)
Micronucleus assay (bone marrow)	male B ₆ C ₃ F ₁ mice	3 i.p. applications (no further data)	125, 250 or 500 mg/kg	negative	sampling time: 24 h	Ashby et al. (1991)
Micronucleus assay (bone marrow)	male Alpk:APfSD rats	single oral application via gavage	690 or 1380 mg/kg	negative	sampling time: 24 h	Ashby et al. (1991)
Micronucleus assay (bone marrow)	male & female NMRI mice	single oral application via gavage	1000 mg/kg	negative	sampling time: 24 - 72 h; the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes was statistically different from control values	Hoechst AG (1989)

Table 4.6 continued overleaf

Table 4.6 Mutagenicity of o-anisidine *in vivo*

Assay	Sex / Strain / Animal	Route of administration	Exposure concentration and duration	Results	Comments	Reference
Micronucleus assay (bone marrow)	male & female ICR mice	single oral application via gavage	225, 450 or 900 mg/kg (m); 275, 550 or 1100 mg/kg (f)	negative	sampling time:24 or 48 h	Putman et al. (1998)
Micronucleus assay (bone marrow)	male CBA mice	single oral application via gavage	690 mg/kg	negative	sampling time:24 or 48 h	Ashby et al. (1991)
Micronucleus assay (liver)	male Alpk:APfSD rats	single oral application via gavage	690 or 1104 mg/kg	negative	hepatocytes were isolated on day 5	Ashby et al. (1991)
Micronucleus assay (liver)	male F344 rats	single oral application via gavage	150, 350 or 690 mg/kg	negative	hepatocytes were isolated on day 5	Ashby et al. (1991)
UDS assay (kidney)	male F344 rats	i.p.	200 or 500 mg/kg	negative	sampling time: 12 h	Tyson & Mirsalis (1985)
UDS assay (liver)	male Alpk:APfSD rats	single oral application via gavage	I. 100, 200, 400, 690 or 1104 mg/kg II. 50, 100, 200 or 400, 690 or 1104 mg/kg	negative	sampling time: I. 2 h; II. 12 h	Ashby et al. (1991)
Sex-linked recessive lethal assay	<i>Drosophila melanogaster</i>	I. via diet II. injection	I. 500 ppm II. 2000 ppm	negative		Yoon et al. (1985)
w/w+ somatic assay (somatic mutation and recombination test)	<i>Drosophila melanogaster</i>	chronic exposure	62 - 616 mg	positive	flies were permitted to lay eggs for 3 days on standard medium prepared with the test substance	Rodriguez-Arnaiz & Aranda (1994)

変異原性の要約

信頼性のある短期試験からは、o-アニシジンが *in vitro* で遺伝毒性を示すという十分な証拠が得られているが、*in vivo* 試験では相反する結果が示されている。陽性という結果が示された *in vivo* 試験は、変異原性に関する EU の分類の根拠とすることを明確に認められてはいないが、本報告書作成者は、トランスジェニックマウス突然変異試験の結果およびその裏付けとなる *in vitro* や *in vivo* での証拠ならびに構造-活性相関の知見を十分信頼できるものとみなし、o-アニシジンをカテゴリー3、R68 の変異原性物質に分類するという提案を妥当なものであると考える。指令 67/548/EC の付属書 I に基づく分類については、第 1 章を参照のこと。

4.1.2.8 発がん性

4.1.2.8.1 動物データ

2 年間試験が実施されており (NCI, 1978)、F344 ラットに対し、o-アニシジン塩酸塩が、0、5,000 ないしは 10,000 ppm の濃度で混餌投与された (雄では約 333 または 666 mg/kg 体重/日、雌では約 500 または 1,000 mg/kg 体重/日の用量となり、これらは遊離塩基としては 256 または 512 mg/kg 体重/日、および 385 または 770 mg/kg 体重/日に相当する)。また、B₆C₃F₁ マウスに対し、0、2,500 ないしは 5,000 ppm の濃度での混餌投与が行われた (雄では約 214 または 428 mg/kg 体重/日、雌では約 250 または 500 mg/kg 体重/日の用量となり、これらは遊離塩基としては 164 または 328 mg/kg 体重/日、および 192 または 384 mg/kg 体重/日に相当する)⁷。生残ラットは、103~107 週目に全て屠殺され、生残マウスは、104 または 105 週目に全て屠殺された。試験期間の途中で死亡した全ての被験動物、および試験期間の終了時に屠殺した全ての被験動物について、通常の組織病理学的検査が実施されたが、血液学的ないしは生化学的検査は実施されなかった。

o-アニシジンは、両方の動物種に対し、発がん性を示した。

ラットの雌雄いずれにおいても、膀胱の移行上皮がんまたは乳頭腫が認められ、雄ラットでは、腎盂の移行上皮がんおよび甲状腺の濾胞細胞腫瘍も認められた (Table 4.7 参照)。高用量群では、膀胱に、ラットで認められることはほとんど無い平滑筋肉腫も生じていた (Jonkinen, 1990)。高用量群では、全てのラットが 83~88 週以内にがんで死亡した。低用量群でも、生残率は有意に低かった。

⁷ ラットの平均体重: 雄 300 g, 雌 200 g; 1 日当たりの飼料消費量: 20 g
マウスの平均体重: 雄 35 g, 雌 30 g; 1 日当たりの飼料消費量: 3 g

甲状腺腫瘍は、甲状腺-下垂体バランスの乱れによって生じた可能性がある。甲状腺-下垂体のバランスが乱れると、十分なホルモンを産生しようとして、甲状腺の特定の細胞が大きくなり、またその増殖が盛んになる (Thomas & Williams, 1991; Andrae & Greim, 1992)

マウスは感受性が低かった。生残率は対照群と同等であった。高用量群においてのみ、膀胱の移行上皮がんや乳頭腫の発生率が、有意に上昇していた。この他には腫瘍は認められなかった (Table 4.8 参照)。

Table 4.7 Results of the carcinogenicity study with rats (NCI, 1978)

	Dose (ppm)		
	0	5,000	10,000
Survival (at week 52)	m: 55/55 f: 55/55	m: 55/55 f: 55/55	m: 49/55 f: 44/55
<i>Kidney or kidney-pelvis</i>			
Transitional-cell carcinoma	m: 0/53 f: 0/52	m: 3/55 f: 0/52	m: 7/53* f: 1/54
<i>Urinary bladder</i>			
Transitional-cell carcinoma or papilloma	m: 0/51 f: 0/49	m: 52/54* f: 46/49*	m: 52/52* f: 50/51*
only papilloma	m: 0/51 f: 0/49	m: 1/54 f: 5/49	m: 2/52 f: 0/51
<i>Thyroid</i>			
C-cell carcinoma	m: 0/53 f: 3/49	m: 2/40 f: 1/45	m: 0/40 f: 0/46
C-cell adenoma or carcinoma	m: 3/53 f: 4/49	m: 3/40 f: 1/45	m: 0/40 f: 0/46
Follicular-cell carcinoma	m: 0/53 f: 0/49	m: 2/40 f: 3/45	m: 2/40 f: 0/46
All follicular-cell tumors**	m: 0/53 f: 1/49	m: 7/40* f: 4/45	m: 6/40* f: 3/46

* Statistically significant increase

** Carcinomas, cystadenocarcinomas, adenomas, cystadenomas and papillary cystadenomas

Table 4.8 Results of the carcinogenicity study with mice (NCI, 1978)

	Dose (ppm)		
	0	2,500	5,000
Survival (at week 103)	m: 44/55 f: 44/55	m: 43/55 f: 38/55	m: 43/55 f: 42/55
<i>Urinary bladder</i>			
Transitional-cell carcinoma or papilloma	m: 0/48 f: 0/50	m: 2/55 f: 1/51	m: 22/53* f: 22/50*
Hyperplasia	m: 1/48 f: 0/50	m: 2/55 f: 1/51	m: 21/53 f: 12/50

* Statistically significant increase

o-アニシジンの腫瘍プロモータ能を検討する試験が実施されている。まず、13 または 16 匹で構成されたラット (F344) の 2 群に、N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN) が、イニシエータとして、最初の 4 週間飲水投与された (0.05%)。10 匹の雄ラットで構成される 3 番目の群には、同じ期間、無処置の水が与えられた。BBN を前投与された群の一方および無処置の水が与えられた群に対し、o-アニシジンが、次の 2 週間は 1,700 ppm の濃度で混餌投与 (約 85 mg/kg 体重) され、その後の 30 週間は 425 ppm の濃度で混餌投与された (約 21.3mg/kg 体重)。これらの全てのラットは、36 週間後に屠殺された。BBN と o-アニシジンの両方を投与されたラットでは、最終平均体重が有意に低く、また膀胱の組織学的検査では、乳頭状および結節上過形成の発生率が有意に上昇しているのが示され、また BBN だけを投与された群に比べ、膀胱の乳頭腫およびがんが増加しているのが示された。これに対し、o-アニシジンだけを投与された群では、これらの所見は陰性であった (Table 4.9 参照) (Ono *et al.*, 1992)。

Table 4.9 Result of the tumor-promoting potential of o-anisidine (Ono *et al.*, 1992)

	Hyperplasia n (%)	Papilloma n (%)	Carcinoma n (%)
o-anisidine only (10 rats)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
BBN only (13 rats)	2 (15)	0 (0)	0 (0)
BBN and o-anisidine (16 rats)	13 (81)	3 (19)	2 (13)

発がん性に関しては、非直接的な、非遺伝毒性的な作用機序が考察されている (Ashby *et al.*, 1991)。一方、膀胱における発がんに関しては、高侵襲性であり (潜伏期間が短く、発生率が高い)、またいくつかの遺伝毒性試験で陽性という結果が得られており、非遺伝毒性的な作用機序を当てはめることは合理的ではない。

4.1.2.8.2 ヒトのデータ

ヒトにおける発がん性影響に関するデータは、得られていない。

4.1.2.8.3 発がん性の要約

o-アニシジンには、ラットおよびマウスに対し、発がん性を示した。いずれの動物種においても、主要な標的器官は膀胱であったが、雄ラットではさらに、甲状腺腫瘍の発生率増加も認められた。o-アニシジン塩酸塩を経口投与した場合の発がん性影響は、o-アニシジン自身により引き起こされると考えられる。信頼性のある短期間試験からは、o-アニシジンが *in vitro* で変異原性を示すという十分な証拠が得られているが、*in vivo* 試験では相反する結果が示されている。遺伝子突然変異を測定する試験系では、陽性という結果が得られている。これに基づくと、o-アニシジンは、遺伝毒性を有する発がん物質とみなされるべきである。しかし、肝臓でも膀胱でも、DNA 付加体の形成を示す証拠は認められていないのにもかかわらず、トランスジェニックマウスを用いた試験では、膀胱における突然変異発生頻度の上昇が認められた。これらのことから、o-アニシジンが非直接的な機序によって影響を及ぼしている可能性を、完全に除外することはできない。

欧州委員会(指令 67/548/EEC の付属書 I)、国際がん研究機関(IARC, 1999)、ドイツ作業環境最大許容濃度(MAK)委員会(DFG, 1996)は、o-アニシジンを発がん性物質とみなしている。現在妥当とされている指令 67/548/EEC に基づく分類に則り、o-アニシジンは、カテゴリ2で R45 の表記を要する(がんを引き起こすおそれ有り)の発がん物質であることが確認されている。指令 67/548/EC の付属書 I に基づく分類については、第 1 章を参照のこと。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物データ

生殖障害性や発生・発達毒性ならびに催奇形性に関するデータは、得られていない。

ラットやマウスを用いた 2 年間発がん性試験(NCI, 1978)では、雄において精囊、前立腺および精巣の組織病理学的試験が、雌において卵巣および子宮の組織病理学的試験が実施されているが、o-アニシジン塩酸塩が雄や雌の生殖器官に有害な影響を及ぼしたことを示唆する所見は認められなかった。また、ラットを用いた亜急性試験でも、精巣への影響は何も認められなかった(雌の生殖器官は調べられていない; Hoechst AG, 1990c)。

o-アニシジンとは対照的に、構造類縁化合物については、国際統一化学物質情報データベースから、発生・発達毒性および催奇形性に関する情報を得ることができる。データは不十分だが、o-アミノフェノールをシリアンハムスターに腹腔内投与した試験では、100 mg/kg 体重の用量で、母体毒性は生じなかったが、胚毒性および催奇形性が認められている。この情報は、o-アミノフェノールが o-アニシジンの o-脱メチル化によって代謝産物として生じる可能性がある (*in vitro* 試験で示されている。Schmidt *et al.*, 1973; 4.1.2.1 章参照) ため、考慮する必要があるが、被験物質が生理学的な経路で投与されておらず、その重要性には疑問が残る。p-アミノフェノールは、構造の類縁性は劣るが、情報が豊富に得られている。それによると、ラットに経口投与したいくつかの試験およびハムスターに静脈投与した試験で、催奇形性および発生・発達毒性が明確に示されている (投与用量で母体毒性が生じたかどうかは報告されていない)。また、ハムスターを用いた試験では、母体毒性が認められていない用量で、催奇形性および発生・発達毒性が明確に示されている。アニリンについても、発生・発達毒性および催奇形性が示されている。o-アニシジンに関しては、このような芳香族アミンを急性投与した際に共通して認められる初期反応として、メトヘモグロビン血症の誘発が認められている。この影響は、発生中の器官に対し、母体に対する以上に有害であることが推測される。発生の初期段階での有害影響は、遺伝毒性によっても引き起こされ得る (アミノフェノールは o-体も p-体もカテゴリ 3 の変異原性物質) が、*in vivo* 遺伝毒性試験の結果からすると、o-アニシジンについても同様の推測をすることは、十分な説得力を伴わない。

4.1.2.9.2 ヒトのデータ

ヒトにおける生殖毒性影響に関するデータは、得られていない。

4.1.2.9.3 生殖毒性の要約

2 年間発がん性試験において生殖器官に顕微鏡学的影響が認められなかったことから、o-アニシジンは生殖能力を障害しないことが示唆される。

発生・発達毒性および催奇形性については、o-アニシジンのデータが得られていないため、目下のところ、結論を導くことはできない。類縁化合物で陽性という所見が得られていることから、o-アニシジンは、催奇形性を有する可能性が疑われる。