

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report
4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE
(TOLUENE-2,4-DIAMINE)**

CAS No: 95-80-7

28.05.2008

欧州連合

リスク評価書 (2008年5月28日最終承認版)

4-メチル-m-フェニレンジアミン

(トルエン-2,4-ジアミン)

European Union Risk Assessment Report

4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE

(TOLUENE-2,4-DIAMINE)

RISK ASSESSMENT

CAS-No.: 95-80-7

EINECS-No.: 202-453-1

28.05.2008

FINAL APPROVED VERSION

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2015年10月

本部分訳文書は、4-methyl-m-phenylenediamine (toluene-2,4-diamine) (CAS No: 95-80-7)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/24tdareport064.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

動物データ：

吸収

動物試験における、尿や糞便を介しての排泄量の観察結果に基づくと、4-メチル-m-フェニレンジアミン(トルエン-2,4-ジアミン: 2,4-TDA)の消化管からの吸収は、良好であると考えられる(排泄の項も参照)。雄の Fischer F344 ラットに、2,4-¹⁴C-TDA を、60 ないしは 3 mg/kg bw (bw = body weight; 体重)の用量で強制経口投与したところ、48 時間後までに、65 および 64%の放射活性が尿中に排泄され、少なくともこの量の吸収があったことが示された(Sauerhoff et al. 1977; Timchalk et al. 1994)。

2,4-TDA は、皮膚を透過可能である。サルにおける透過率は 54%で、ヒトにおける 24%よりも高かった(被験動物:アカゲザル; 被験者:ヒトボランティア; ¹⁴C 環標識 TDA の二塩酸塩をアセトン媒体として 4 μg/cm² 適用; サルでは腹部皮膚に非被覆で適用; ヒトでは前腕背側部の皮膚に非被覆で適用; 適用面積:3~15 cm²; 曝露期間:24 時間; 尿を 5 日間にわたり採取し放射活性を分析) (Marzulli et al. 1981)。

組織分布

ラットに、¹⁴C 環標識 2,4-TDA を、経口 (DuPont 1974) もしくは腹腔内経路 (Grantham et al. 1979) でそれぞれ 300 mg/kg bw および 77 mg/kg bw したところ、4~24 時間後、最も高い放射活性濃度が、肝臓および腎臓で示された[腹腔内投与の場合、7~12 μg/g(湿重量)]。心臓、肺、脾臓および精巣における放射活性濃度は、かなり低かった[2~6 μg/g(湿重量)]。ラットへの腹腔内投与の場合、血中濃度は、投与後 1~8 時間で最大となった。血中残留濃度

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

は6～24時間以内に、低い値まで減少した(Grantham et al. 1979)。経口投与の場合は、血中濃度は、2時間以内に最大に達した(DuPont 1974)。マウスとラットでは、組織分布に種差は認められなかった(Unger et al. 1980; Unger et al.1978; Grantham et al. 1979)。マウスやラットでは、組織からの排出は二相性であることが確認された(Sauerhoff et al. 1977; Unger et al. 1980; Unger et al.1978)。

生体内変化

ラット、ウサギおよびモルモットに 2,4-TDA を経口投与したところ(50 ないしは 60 mg/kg bw)、12 時間および 24 時間までの尿中に未変化のまま排泄されたのは、投与量のわずか 0.1～3%に過ぎなかった(Timchalk et al.1994; Waring and Pheasant 1976)。これらの結果は GC-MS や TLC-MS を用いた分析から得られており、ほぼ完全な生体内変化が生じることを示唆している。未変化の親化合物が排泄されるのに加えて、多くの代謝物や抱合体が尿中に排泄・同定され、それらにはラットとマウスで種差が認められた。ラットにおける主要な尿中代謝物は、4-アセチルアミノ-2-アミノトルエン、2,4-ジアセチルアミノトルエン、および 4-アセチルアミノ-2-アミノ安息香酸であった。マウスにおいては、4-アセチルアミノ-2-アミノ安息香酸、および 2,4-ジアセチルアミノ安息香酸であった。他の代謝産物として、 α -ヒドロキシ-2,4-ジアセチルアミノトルエンや α -ヒドロキシ-2,4-ジアミノトルエンが同定されている。尿中への排泄は、マウスにおける方が早く、また、グルクロン酸抱合体として排泄される代謝物の量は、マウスではラットの約 2 倍であった。

哺乳類においては、2,4-TDA は、かなりの程度まで代謝される。ベンゼン環やベンゼン環に結合しているメチル基が酸化され、フェノール系や安息香酸系の代謝産物が生成されることが分かっている(Figure 4.1.2.1 参照)。2,4-TDA やその代謝産物は、酸に不安定な抱合体としても排泄される。ラット、ウサギおよびモルモットは、主経路により、2,4-TDA をアミノフェノール類に代謝する(経口用量の約 40%) (Waring & Pheasant 1976)。Grantham et al.(1979)は、HPLC-MS を用いた分析により、ラットやマウスにおける代謝産物として、トルエンジアミンやジアミノ安息香酸のアセチル誘導体を同定している(Figure 4.1.2.1 参照)。このアセチル化経路は、腹腔内投与の場合、15%を占めている。2,4-TDA のモノもしくはジアセチル誘導体は、動物により様々な量で尿中に認められており、ラットで投与量の 15%、ウサギで 8%、モルモットで 8%で、他にイヌでも結果が得られている(2 匹のイヌに 1 匹当たり 100 mg の 2,4-TDA を 8 日間毎日経口投与して 24 時間尿を HPLC で分析したところ、モノアセチル誘導体は約 1%未満であった。これ以上の詳細情報は示されていない。)(Waring & Pheasant 1976; Burroughs 1975)。Grantham et al.(1979)は、ラットやマウスの 24 時間尿において、アセチル誘導体に加えて、硫酸抱合体として投与量の 10%が排泄されること、また、グルクロン酸抱合体としての排泄がラットよりマウスで高水準に認められ

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

る(ラットで投与用量の 7.5%であるのに対しマウスでは 17.4%)ことを明らかにしている。この試験では、他に未同定の水溶性代謝物が、投与量の 30~35%存在することが示されている。

様々な動物の様々な器官由来のサイトゾル存在下で行われた *in vitro* 試験からは、肝臓では主に N-アセチル化が起こり、4-モノアセチル誘導体や 2,4-ジアセチル誘導体が生じることが示されている。種差や性差があることも判明している (Glinsukon et al. 1975; Glinsukon 1976)。動物種の比較では、N-アセチル化は、ハムスターにおいて最も強勢で、それにモルモット、ウサギ、マウス、およびラットが続く。ヒトの肝臓のサイトゾルを用いた試験では、N-アセチル誘導体は痕跡量しか検出されず、イヌの場合は全く検出されなかった。雌マウスや雌ラットの肝臓のサイトゾルを用いた場合、アセチル化の程度は、どちらの場合も、雄よりも高かった (Glinsukon et al. 1975)。ヒトやイヌでアセチル化の程度が低かったことから、げっ歯類とは異なる代謝経路が存在することが想定される。

雄ラットの肝臓サイトゾル分画と、4-アセチルアミノ-2-アミノトルエンや 2,4-ジアセチルアミノトルエンをインキュベートし、その間に生じる生成物を検出することにより、N-脱アセチル化の様子を観察した。そのサイトゾルは、脱アセチル化を触媒し、2,4-TDA および 2-アセチルアミノ-4-アミノトルエンが産生された (Sayama et al. 2002)。

アロクロールで前処置したラットから得た肝 S9-Mix と 2,4-TDA をインキュベートした場合には、主要代謝物として、ジメチル-ジアミノ-ジヒドロ-ヒドロキシフェナジンが検出された(試験濃度に関するデータ無し) (Cunningham et al. 1988)。

高分子体への結合

ラットに、0.25 mmol/kg (30.5 mg/kg bw) の用量での単回経口投与、または 19 日かけて 0.1 mmol/kg の 10 回投与 (12 mg/kg bw) を行ったところ、ヘモグロビン付加体は検出されなかった。一方、2,6-TDA の場合は、投与 1 回当たり 0.2 mmole/mole Hb (単回経口投与) および投与 1 回当たり 0.4 mmole/mole Hb (複数回経口投与) という、ヘモグロビン結合指数が得られた (Neumann et al. 1993)。

2,4-TDA および 2,6-TDA に関しては、0.5~250 mg/kg bw の用量で、用量依存的にヘモグロビン付加体が形成されることが報告されている (Wilson et al., 1996)。Fischer F344 ラットに 250 mg/kg bw を腹腔内投与した場合、2,4-体についても 2,6-体についても、ヘモグロビン付加体量の最高値は、0.36 nmol/g Hb に上った。

排泄

ラットやマウスでは、2,4-TDA 代謝物の排泄は、主として尿を介して行われる (Grantham et al. 1979; Timchalk et al. 1994; Sauerhoff et al. 1977)。腹腔内投与後の腎臓からの排泄は、ラットよりマウスにおいてより急速かつより徹底して起こり、両動物種において、排泄は 48 時間後までに実質的に完了する。ラットでは、48 時間以内に、尿を介して最大 74% の放射活性が排泄されたのに対し、マウスでは、48 時間後までに、投与用量の 92% が排泄された。ラットに単回経口投与 (^{14}C -TDA を 0.5、50 または 60 mg/kg bw) した場合には、投与量の 60 ~ 65% が、48 時間以内に、尿中に排泄された (Sauerhoff et al. 1977; Timchalk et al. 1994)。ラットに静脈内投与もしくは腹腔内投与した場合の、放射活性の糞便への排泄は、2~5 日後までの期間で 20~30% であった。これらの試験では、両投与経路で糞便への排泄速度が非常に近似していたことから、ラットに 2,4-TDA を経口投与した場合の吸収は、ほぼ完全であり、経口投与された 2,4-TDA の糞便への排泄は、胆汁を介して行われるものと考えられる。マウスでは、腹腔内投与した場合、2 日以内に糞便中に排泄された放射活性は、全体のわずか 3% であった (Grantham et al. 1979)。

ラットに 3 mg/kg bw を経口投与もしくは静脈内投与した試験では、尿中排泄半減期は、4.6 時間であった。60 mg/kg bw を経口投与した場合には、排泄半減期は長くなり、8 時間であった (Timchalk et al., 1994)。

マウスを 2,4-TDA で亜慢性的に前処置した場合、尿中排泄量は、6 時間以内に増加して、投与用量の 45% から 54% となり、それとともに糞便中への排泄は減少した (Unger et al. 1979)。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

ヒトにおけるデータ

2,4-TDA は、皮膚を透過することができる。成人男性を 24 時間にわたって曝露 (TDA の二塩酸塩を、アセトンを媒体として 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の用量で適用。接触適用した皮膚面積は 3~15 cm^2) したところ、24%の透過が示された (Marzulli et al. 1981)。

ヒトの肝臓を用いた *in vitro* 試験では、N-アセチル化された 2,4-TDA は痕跡量しか検出されず、ハムスターの肝臓サイトゾルを用いた場合の 1%未満であった (Glinsukon et al. 1975)。

要約

2,4-TDA は、動物において、消化管からほぼ完全に吸収され、皮膚からも良く吸収される (ヒト男性において 24 時間の曝露で 24%)。吸入に関するデータは、得られていない。したがって、リスク評価に際しては、全身アベイラビリティとして 100%を採用 (最悪のケースを想定) することになる。

ラットにおいては、経口投与や腹腔内投与の場合、組織濃度が最大となったのは、肝臓と腎臓であった。心臓、肺、脾臓、および精巣では、濃度はかなり低かった。ラットに腹腔内投与した場合、血中濃度は 1~8 時間後に最大となった。マウスとラットでは、組織分布において、種差は認められなかった。

ラット、ウサギ、およびモルモットでは、2,4-TDA の未変化体の尿中排泄は、0.1~3%であった。2,4-TDA は、主経路では、環部分が水酸化を受けてアミノフェノール類が生成し、また、N-アセチル化も起こる。モノアセチル誘導体やジアセチル誘導体が尿中に観察されるが、その量は、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、およびイヌでばらつきがある。イヌでは、検出されたモノアセチル誘導体は、非常に少量であった。ラットやマウスでは、24 時間尿中に、硫酸抱合体の排泄が観察されたが、グルクロン酸抱合体は、概してラットよりマウスにおいて、高レベルで検出された。

ラットやマウスでは、2,4-TDA 代謝物は、主として尿を介して排泄される。ラットに 3 mg/kg bw を経口投与もしくは静脈内投与した試験では、尿中排泄半減期は、4.6 時間であった。60 mg/kg bw を経口投与した場合には、それより排泄半減期は長くなり、8 時間であった。

4.1.2.2 急性毒性

2,4-TDA

動物データ

経口

ラットやマウスを用いた試験では、純 2,4-TDA は毒性を示し、LD₅₀ 値が 73~350 mg/kg bw であることが判明している。

EU や OECD の現行のガイドラインと同等に実施された試験では、雌ラットの LD₅₀ が 73 mg/kg bw、雄ラットでは 136 mg/kg bw と判定されている。まず、各群 10 匹ずつの雄ラットが試験に供され、2,4-TDA が、ルトロールを媒体として、200、180、150、100 ないしは 50 mg/kg bw の用量で経口投与された。50 mg/kg bw の用量では、死亡例や臨床症状は認められなかった。100 mg/kg bw の用量では、雄ラットの 2/10 匹が、5 日以内に死亡した。150 mg/kg bw の用量では、5/10 匹が 4 日以内に死亡した。180 mg/kg bw では 8/10 匹が、200 mg/kg bw では 10/10 匹が死亡した。次に、各群 10 匹ずつの雌ラットが試験に供され、同じ被験物質が、500、100、70、50 ないしは 10 mg/kg bw の用量で経口投与された。10 mg/kg bw の用量では、死亡例や臨床症状は認められなかった。50 mg/kg bw の用量では、雌ラットの 1/10 匹が、3 日目に死亡した。70 mg/kg bw の用量では、5/10 匹が、4 日以内に死亡した。100 mg/kg bw では 8/10 匹が、500 mg/kg bw では 10/10 匹が死亡した。臨床症状は、雄では 50 mg/kg bw を超える用量で、雌では 10 mg/kg bw を超える用量で認められ、それらは、一般状態の悪化、尿量増加、鎮静、下痢および体重低下などであった。剖検では、肉眼的な変化は認められなかった (Bayer 1981, 未公表報告)。

「標準化された方法」(さらなる詳細情報無し)を用いて、各用量に 10 匹ずつのラットを供して試験が行われ、270 mg/kg bw という経口 LD₅₀ 値が得られている。臨床症状として無気力が認められ、数日以内に死亡も発生した(死亡した日については述べられていない)。剖検では、肺の軽度の充血、肺や肝臓の褪色化、および消化管の炎症が認められた。LD₅₀ の用量では、投与後 48 時間の時点で、メトヘモグロビンの軽度の上昇が認められた(腹腔内投与だけの場合でも、メトヘモグロビンが 8%に上昇しているのが観察されている)。メトヘモグロビンの最高値は、経口投与の 48 時間後に検出され、300 ないしは 350 mg/kg bw の用量を投与されたマウスで、それぞれ 2.08 および 2.97%であった。ラットでは、240~540 mg/kg bw の用量で投与した後、2.06~3.18%の値で検出された。ハイツ小体は、検出されなかった (Weisbrod and Stephan 1983)。この「標準化された方法」(さらなる詳細情報無し)を用いて、各用量に 10 匹ずつのマウスを供して同様の試験が行われ、350 mg/kg bw と

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

いう経口 LD₅₀ 値が得られている。ラットを用いた試験と同様に、臨床症状として無気力が認められ、数日以内に死亡も発生した(死亡した日については述べられていない)。剖検では、肺の軽度の充血、肺や肝臓の褪色化、および消化管の炎症が認められた。LD₅₀ の用量では、投与後 48 時間の時点で、メトヘモグロビンの軽度の上昇が認められたが、ハインツ小体は検出されなかった(Weisbrod and Stephan 1983)。

吸入

純 2,4-TDA の急性吸入毒性に関するデータは得られていない。しかし、2,4-TDA80%と 2,6-TDA20%の混合物が、純 2,4-TDA と同様の毒性プロファイルを有することを考慮すると、80/20 混合物を用いた試験の結果から、純 2,4-TDA の急性吸入毒性を十分に評価できると考えられる。

論拠:

ラットへの経口投与の場合、純 2,4-TDA の LD₅₀ は、73~350 mg/kg bw の範囲であった。一方、2,4/2,6 TDA の 80/20%異性体混合物の LD₅₀ は、150~179 mg/kg bw の範囲で観察されている。ラットでの経皮曝露の場合、LD₅₀ は、純 2,4-TDA で 1200 mg/kg bw、2,4/2,6 TDA の 0/20%異性体混合物で 463 mg/kg bw であった。異性体混合物は、経口では同等の毒性、経皮ではより強い毒性を示したことになる。したがって、純 2,4-TDA に関する吸入試験のデータが得られていない現状で、異性体混合物を用いた吸入試験を参照することは、適切であるとみなされる。

2,4/2,6-TDA の 80/20 混合物の吸入毒性は、ラット、マウスおよびウサギを用いた試験に基づいて判定すると、懸念の対照となるようなものではないと思われる。これらの試験は、現行の試験ガイドラインに沿ったものではないが、リスク評価に取り上げるに値する。

経皮

「標準化された方法」により、各用量群に 10 匹ずつのラットを用いた試験(水を媒体として 24 時間適用。それ以上の情報無し)において、経皮 LD₅₀ 値は、1200 mg/kg bw と計測されている。この試験で認められた臨床症状は、無気力などで、死亡例も数日以内に生じている(死亡日の記載は無い)。剖検では、肺の軽度の充血、肺や肝臓の褪色化、および消化管の炎症が判明した。メトヘモグロビンの軽度の上昇が、LD₅₀ の用量を適用した 6 時間後に認められた。ラットに 900 ないしは 1200 mg/kg bw を適用した場合、6 時間後にメトヘモグロビンの最大値が、1.22~3.39%の範囲で記録された。ハインツ小体は検出できなかった(Weisbrod and Stephan 1983)。

ヒトにおけるデータ

データは、得られていない。

2,4/2,6-TDA の異性体混合物 (80/20)

動物データ

経口

2,4/2,6-TDA の 80/20 混合物は、ラット、マウス、ウサギおよびネコを用いた試験で毒性ないしは有害性を示し、経口 LD₅₀ は、50～500mg/kg bw の範囲であった。いずれの試験も、現行の試験ガイドラインに沿って実施されたものではなかった。

雌ラットを用いた 2 件の試験では、1 件目ではルトロールが媒体として用いられ、2 件目ではピーナッツ油が用いられたが、2,4/2,6 TDA の 80/20 混合物の LD₅₀ を計測することができ、それぞれ 150 mg/kg bw および 164 mg/kg bw であった。これらの試験では、80～220 mg/kg bw にわたる、5 段階もしくは 6 段階の用量が設定された。最高用量の 200 や 220 mg/kg bw では、ラットの 9/10 匹もしくは 10/10 匹が死亡した。死亡は、1～9 日以内に発生した。臨床症状は、鎮静化や一般状態の悪化などであった (Bayer 1974, 未公表報告)。

各用量群 15 匹ずつの雄ラットを用いた試験では、ジメチルスルホキシドを媒体として TDA が経口投与され、遅延型の死亡が生じることを示すため、投与 2 日後の LD₅₀ と 14 日後の LD₅₀ が算出された。それぞれの LD₅₀ は、927 + 138 mg/kg bw および 502 + 205 mg/kg bw であった。この観察は、早期死亡が中枢神経系の抑制により生じ、遅延型の死亡は内臓への毒性により生じているという違いを示そうとするものであった。死亡は、1～4 日以内に生じた。主要な臨床症状は、中枢神経系の抑制であり、自発運動の減少となって現れた。振戦や単発性痙攣が起こり、それに続いて運動失調や正向反射の消失が観察された。剖検では、肝臓に明褐色の斑点や暗色領域が認められた (Zalchari, 1978)。

25～500 mg/kg bw の範囲で 8 段階の用量を設定し、各用量につき 15 匹ずつの雄ラットを用いた試験では、経口 LD₅₀ 値が、179 mg/kg bw と算出された。死亡は 6 日以内に発生した。臨床症状を伴わない用量は 25 mg/kg bw であった。臨床症状は報告されていない (Bayer 1971, 未公表報告)。

50～1000 mg/kg bw の範囲で 7 段階の用量を設定し、各用量につき 15 匹ずつの雄マウスを用いた試験では、経口 LD₅₀ 値が、380 mg/kg bw と算出された。死亡は 4 日以内に発生した。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

臨床症状を伴わない用量は 50 mg/kg bw であった。臨床症状は報告されていない(Bayer 1971, 未公表報告)。

50、250 および 500 mg/kg bw の用量を設定し、各用量につき 3 匹ずつの雄ウサギを用いた試験では、LD₅₀ 値が、約 500 mg/kg bw と算出された。50 や 250 mg/kg bw の用量では、死亡は生じず、臨床症状も認められなかった。500 mg/kg bw の経口投与では、2/3 匹が 2 日以内に死亡し、3/3 匹が、一般状態の悪化、努力性呼吸およびチアノーゼなどの臨床症状を示した(Bayer 1971, 未公表報告)。

単回経口投与によるメトヘモグロビン形成を調べた試験では、1/2 匹の雌ネコが、50 mg/kg bw の経口投与を受けた後、48 時間以内に死亡した。この試験では、各用量群にネコが 2 匹ずつ割り当てられ、0.5 もしくは 2.5 mg/kg bw(雄)、または 10 もしくは 50 mg/kg bw(雌)の用量で経口投与が行われた。全ての用量群でメトヘモグロビン形成が認められ、増加の範囲は、50 mg/kg bw での 70%から、0.5 mg/kg bw での 5.4%であった。0.5 および 2.5 mg/kg bw 群では、投与後に一般状態の変化は認められなかった。10 や 50 mg/kg bw の高用量群では、健康状態の悪化が観察された(Bayer 1971, 未公表報告)。

吸入

2,4,2,6-TDA の 80/20 混合物の吸入毒性は、ラット、マウスおよびウサギを用いた試験に基づく、低いと判断される。これらの試験は、現行の試験ガイドラインに沿ったものではないが、リスク評価に取り上げるに値する。

ラットとマウスを用いた試験では、4 時間 LC₅₀ 値が、5.57 mg/L と算出されている。この試験では、大量の粒子を含む蒸気-粉塵混合物について、計算上の濃度を用いており、化合物の沈積が起るため、実効濃度はおそらくそれより低いと考えられる。10 匹のラットと 20 匹のマウスが、約 5.57 mg/L の濃度(80°C に熱して生じた被験物質の煙をプロペラを用いて分散させて調製)に 4 時間曝露(全身曝露、動物の性別は報告無し)された。14 日の観察期間中に死亡は認められなかったが、全ての被験動物が、一般状態の悪化と努力性呼吸を示した。ラットやマウスでの同様の試験が、約 1.835 mg/L の濃度(被験物質を 100°C に加熱して発生)を用いて行われているが、死亡例や臨床症状は認められなかった(Bayer 1971, 未公表報告)。

ウサギを用いた試験では、2 匹が、約 17.16 mg/L の濃度(140°C に熱して生じた被験物質の煙をプロペラを用いて分散させて調製)に、4 時間曝露(全身曝露、動物の性別は報告無し)された。14 日の観察期間中、1 匹が死亡した。臨床症状は、一般状態の悪化と努力性呼吸などが見られた。鼻の刺激症状は認められなかった。2 匹のウサギを用いた同様の試験が、

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

約 9.487 mg/L の濃度(被験物質を 100°C に加熱して発生)を用いて行われており、死亡例は認められなかったが、先行試験におけるものと同様の臨床症状が認められた(Bayer 1971, 未公表報告)。

経皮

OECD の現行の試験ガイドラインと同等の試験が実施されており、雌ラットに関して、経皮 LD₅₀として 463(326~658) mg/kg bw という値が得られている。2,4/2,6-TDA の 80/20 混合物が、50~1000 mg/kg bw の範囲の 6 段階の用量で、各用量群 5 または 10 匹ずつの動物に、経皮適用された(24 時間閉塞適用、媒体はピーナツ油)。臨床症状として、一般状態の悪化、呼吸困難、痙攣が認められ、これらは適用の約 1 時間後から始まり、7 日目の試験終了時まで持続した。高用量群では、後肢の麻痺とチアノーゼが認められた。50 mg/kg bw の用量で適用を受けた動物では、剖検において、肉眼的な変化は何も示されなかった。しかし、それより高用量では、剖検において、皮膚や皮下の暗青色化、胃の漿膜下出血および点状出血、消化管潰瘍、腎臓の褪色化、肝臓における変性、および副腎の肥大が認められた(Bayer 1974, 未公表報告)。

ヒトにおけるデータ

データは、得られていない。

結論:

ヒトにおける 2,4-TDA の急性毒性に関するデータは得られていない。動物試験においては、2,4-TDA は、経口投与で毒性(LD₅₀ 値は 73~350 mg/kg bw の範囲)を示し、経皮適用で有害性(LD₅₀ 値は 1200 mg/kg bw)を示した。これらの試験結果に基づき、2,4-TDA は、「有毒」に分類され、R21(皮膚に接触すると有害)および R25(飲み込むと有毒)の表記を要する。メトヘモグロビン形成は、TDA 異性体類による、動物への特徴的な影響である。この影響に関しては、ネコは非常に感受性が高く(Bayer 1971, 未公表報告)、一方、ヒトは感受性が低いと思われる(Blom, 2001 参照)。

純 2,4-TDA の急性吸入毒性に関するデータは、ヒトについても動物についても得られていない。しかし、2,4-TDA80%と 2,6-TDA20%の混合物が、純 2,4-TDA と同等の急性毒性プロファイルを有することから、80/20 混合物を用いて行われた試験の結果により、純 2,4-TDA の急性吸入毒性を十分に評価できるものと考えられる。ただし、この混合物の急性吸入毒

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

性の評価は、実際に吸入された濃度を確実に計測できていない試験の結果に基づいている。約 5.57 mg/L の濃度で 4 時間吸入した場合には、死亡は起こらなかったが、全ての被験動物で、健康状態の悪化が示された。1.8 mg/L では影響は何も認められておらず、したがって、この濃度を、リスクの総合評価における NOAEC として用いることになる。

4.1.2.3 刺激性

2.4-TDA

動物データ

OECD のガイドライン 404 に沿って 3 匹のウサギを用いて行われた Draize 試験では、皮膚への刺激性は認められなかった。この試験では、500 mg の被験物質(水で湿潤化)を、4 時間、皮膚に閉塞適用した。どのウサギも、刺激症状を示さなかった (Bayer 1982, 未公表報告)。

3 匹のウサギを用いて実施された Draize 眼刺激性試験では、軽度の結膜発赤が認められた。この試験では、各被験動物の片方の眼に、100 mg の被験物質が滴下された。1/3 匹の動物に、72 時間にわたって、軽度な結膜発赤(グレード 1)だけが認められた(1、24、48、72 時間における、結膜発赤に関する Draize スコアは、処置を施した眼/未処置の眼について、0/0、1/0、1/0、0/0 であった)。角膜や虹彩に、病変は認められなかった。7 日目の観察時には、影響は何も残っていなかった (Bayer 1982, 未公表報告)。

呼吸器刺激性に関する動物データは、急性吸入試験から得ることはできなかった。

ヒトにおけるデータ:

データは、得られていない。

2.4/2.6-TDA の異性体混合物(80/20)

動物データ

ウサギを用いた Draize 皮膚試験において、「中等度の皮膚刺激症状」が、24 時間の曝露期間の後に観察された。曝露(用いられた方法のデータ無し)後 24 時間の時点で、3 匹のウサギ

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

に、浮腫は認められなかったが、グレード 1 の紅斑が認められた。紅斑は 3 日間進行し、72 時間目の観察時点では、3 匹全てでグレード 2 の紅斑が認められた。これらの進行性の皮膚刺激症状の可逆性は、検討されていない(Dunn 1978a)。この試験は、リスク評価の目的にはそぐわないと考えられた。

ウサギ 6 匹を用いた Draize 眼刺激性試験では、被験物質を点眼した後、重度の腐食性が示された。角膜混濁(グレード 4)、重度の虹彩炎(グレード 2)、重度の充血(グレード 4)、結膜壊死、顕著な結膜浮腫、および流涙が、3 日間の観察期間中に認められた(Dunn 1978b)。これらの重度の眼病変が見られたことから、EU の分類基準に従うと、本来、「刺激性物質」への分類と、R41(眼に重篤な損傷を及ぼす可能性有り)の表記が求められることになる。しかし、この試験で用いられた被験物質については、黒褐色の結晶性の固体と記載されているが、その純度は示されていない。純 TDA は無色の固体であることから、その被験物質は、異なった毒性を示す酸化生成物によって、おそらく重度に汚染されていたものと考えられる。したがって、この試験は、不相当とみなすべきである。それより以前に行われた試験では、50 mg の 2,4-/2,6-TDA(80/20)がウサギに適用され、顕著な紅斑と結膜浮腫が認められており、それらは 4 日以内に回復した(Bayer 1971, 未公表報告、詳細な報告を欠く)。この試験の結果を考慮すると、現行の分類と R36 の表記が正当であるという結論が導かれる。もう 1 件の Draize 試験では、2,4-/2,6-TDA(80/20)の 5%溶液を 0.1 mL 用いて行われたが、何も影響は認められなかった(Blades, 1976)。

呼吸器刺激性に関する動物データは、急性吸入試験から得ることはできなかった。

ヒトにおけるデータ:

データは、得られていない。

結論:

2,4-TDA による局所刺激性/腐食性に関するデータは、ヒトにおいては得られていない。ウサギを用いた Draize 試験では、2,4-TDA は皮膚刺激症状を引き起こすことはなく、点眼後に軽度の結膜発赤を示しただけであった。したがって、EU の現行の規制によって、純 2,4-TDA を R36(眼に刺激性)の表記を要すると定めるのは適切ではない。2,4-/2,6-TDA(80/20)の眼刺激性試験の結果からは、異性体混合物に対する現行の分類と R36 表記が正当であるという結論が導かれる。2,4-/2,6-TDA(80/20)の皮膚刺激性に関しては、信頼性のある試験が実施されていない。呼吸器刺激性に関するデータを、急性吸入試験から得ることはでき

なかった。

4.1.2.4 腐食性

4.1.2.3 項で記載した Draize 試験の結果は、2,4-TDA が腐食性物質ではないことを明確に示している。

4.1.2.5 感作性

2,4-TDA

動物データ

Magnusson Kligman 試験が 1 件行われている。25%の被験物質溶液で 1 回目の感作惹起を行った後に、10/10 匹のモルモットで、陽性反応が示された。5%の被験物質溶液で 2 回目の感作惹起を行った後には、5/10 匹のモルモットで、陽性反応が示された(皮内投与濃度 0.5%、局所感作誘導濃度 50%、Kynoch and Elliot 1977)。修正 Draize 試験では、DMSO を媒体とした 0.1%溶液で処置したが、モルモット 7 匹中、陽性反応を示したものはいなかった(Allied Chemical Corporation 1978c)。前者の試験は、OECD の試験ガイドライン 406 に準拠して実施されたが、後者の試験は準拠していない。

呼吸器感作性に関する動物データは、得られていない。

ヒトにおけるデータ:

様々な皮膚炎や湿疹の患者 40 名を対象に、パッチテストが実施されている。全ての患者が、p-フェニレンジアミンに対して過敏症を示した。m-トルエンジアミンとの交差感受性が、67.5%の患者で認められた。試験濃度は 2%で、媒体は黄色パラフィンであった(Kleniewska 1975)。これらのデータは、交差感作率が非常に高いことを示している。

ヒトにおける呼吸器感作性に関するデータは、得られていない。

結論：

Magnusson Kligman 試験において、感作率が 100%に及んだことに基づくと、2,4-TDA は、R43(皮膚との接触により感作される可能性有り)の表記が求められる。さらに、ヒトにおいては、p-フェニレンジアミンとの交差感受性が認められている。呼吸器感作に関する動物やヒトのデータは、得られていない。

4.1.2.6 反復投与毒性

2,4-TDA

動物データ

経口(混餌および強制)投与により 2,4-TDA への曝露を行った、信頼性の最も高い試験の結果から、主要な標的臓器が肝臓であることが判明し、また、2,4-TDA が雄の生殖器系に毒性影響を及ぼすことが示されている。一連の試験において、2,4-TDA の生殖への、特に雄の受胎能への影響について、検討が行われている。この影響に関する詳細な情報は、4.1.2.9 項に記載されている。ただし、これらの試験は、反復投与毒性試験に関する現行のプロトコルに準拠していない(雄の成体ラットしか検討されていない)。これらの試験の殆どで、対象としたパラメータが特定のものに限られている。

いくつかの試験・検討は、発がん性を調べるためにデザインされた長期試験である。実験動物における 2,4-TDA の非腫瘍性影響についての情報は、4.1.2.8 項に詳述したこれらの試験からも得ることができる。そのため、長期試験に関しては、4.1.2.8 項も参照されたい。

経口

- 強制経口投与試験

8 日間試験(マウス)

マウスを 8 日間にわたり 2,4-TDA に反復経口曝露した際の影響について、その後の生殖毒性試験における適切な曝露量を得るために、検討が行われた。この試験では、各群 10 匹ずつの雌の CD-1 マウスに、2,4-TDA(業務用純度)が、0、150、175、200、225 ないしは 250 mg/kg bw/日の用量で、コーン油を媒体として、最長 8 日間強制経口投与され、8 日間

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

の投与後期間が設けられた。血液学的パラメータや生化学的パラメータの情報、および組織病理学的所見の情報は得られなかった。175 mg/kg bw/日群では、体重増加量の減少(10%)、および5回目の投与日以降、投与後期間の5日目にかけて死亡例が認められた。曝露期間中は、被験動物に、被毛粗剛や円背姿勢が認められた。最大耐量(MTD)は、150 mg/kg bw/日であった(Smith 1983)。

14日間試験(マウス)

この試験は、2,4-TDAの毒性および免疫毒性を検討するために実施された。雌のB6C3F1マウス(群規模のデータ無し、合計864匹を供試)に、媒体(蒸留水)もしくは2,4-TDA(業務用純度)が、25、50ないしは100 mg/kg bw/日の用量で、14日間連続で強制経口投与された。最後の曝露から1日経った試験15日目に、被験動物の免疫学的パラメータの評価を行った。2,4-TDAに100 mg/kg bw/日の用量で曝露されたマウスでは、最初の1週間において、体重増加量の軽度の減少(有意ではない)が認められた。曝露2週間時では、体重増加量は、対照群と同等になっていた。全てのマウスにおいて、赤血球数、ヘモグロビン値およびヘマトクリット値など、赤血球パラメータについて、変化は認められなかった。25 mg/kg bw/日以上以上の投与群では、白血球数が、対照群の数値と比べ、最大60%まで、用量依存的に増加していた。さらに、血液中のリンパ球の割合が増加しているのが確認された。50 mg/kg bw/日以上以上の群では、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)活性が上昇し、尿素窒素濃度が低下していた。剖検では、投与を受けた全ての動物において、投与に関連した肉眼病変は、何も認められなかった。100 mg/kg bw/日群では、肝臓の絶対および相対重量の増加(42%)が確認され、また、脾臓重量の低下が認められた。50および100 mg/kg bw/日群では、肝臓において、軽度～中等度の小葉中心性壊死が観察された。他の臓器(肺、胸腺、脾臓、腎臓および腸間膜リンパ節)の鏡検では、影響は認められなかった。25 mg/kg bw/日以上以上の投与群で、以下の免疫学的パラメータの低下が認められている。脾臓マクロファージの貪食能(45%)、ヒツジ赤血球に対するIgMおよびIgGの反応(それぞれ46%および56%)、血清中の補体C3産生、細菌感染に対する宿主抵抗性、およびNK細胞活性(39%)。免疫学的パラメータの数値が上昇したものは、血中白血球数、血中におけるリンパ球の割合、脾臓におけるTおよびBリンパ球の割合、遅延型過敏症反応(123%)および肝臓の細網内皮活性などであった。2種類の発がんモデルに対する宿主抵抗性は、いずれも、2,4-TDAにより悪化することはなかった。

この試験で得られたデータから、肝臓が、2,4-TDAの重要な標的臓器であることが示された。肝臓への影響を示す所見としては、50 mg/kg bw/日以上以上の用量群における、肝臓重量の増加、ALATの上昇および尿素窒素の低下が挙げられる。軽度～中等度の肝臓の小葉中心性壊死も、50 mg/kg bw/日群で認められている。いくつかの免疫学的パラメータの変化

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

も、25 mg/kg bw/日以上での投与群について記載されている。全体として NOAEL は示されていない(White et al. 1989; Burns et al. 1994)。

● 混餌投与試験

3～10 週間試験 (ラット)

2,4-TDA の精子形成組織に対する影響を検討した試験において、雄の Sprague-Dawley ラットの群に、0、0.03 ないしは 0.06% (約 0、15 および 30 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA (純度 98%) を含む飼料が、最長 10 週間投与された。アンドロゲン結合蛋白(rABP)産生、精細管の超微形態的变化、および精巣ならびに精巣上体重量への影響が検討され、また、精子形成および精巣の形態に対する 2,4-TDA 投与による早期影響が調べられた。精巣および精巣上体の検査が実施された。血清中の rABP やテストステロン濃度を測定するために、血液試料が採取された。他の組織や臓器は検査されなかった。詳細な情報は、4.1.2.9 項に記載されている。

第 1 回目の試行では、各群 9 匹ずつのラットに、0 ないしは 0.03% (0 および約 15 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA を含む飼料が、10 週間投与された。被験物質を投与されたラットでは、血清 rABP 含量および精巣のサイトゾル濃度が、それぞれ 3.8 倍および 8.9 倍に増加していた。精細管を培養した培地には、対照群と比べ、7 倍もの濃度の rABP が含まれていたが、一方、精巣上体の rABP 濃度は、67%減少していた。電子顕微鏡で精巣組織を検査したところ、セルトリ細胞における様々な退行性変化が認められた。それらの変化は、様々な程度の細胞質膨張、細胞膜の破壊、および空胞変性などであった。これらの所見は、散在性に認められた。精母細胞や精子細胞には、超微形態学的異常は認められなかった。

2 回目の試行では、各群 5 匹ずつに、0 ないしは 0.03% (0 および約 15 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA を含む飼料が投与された。4、6、8 および 10 週後に、投与群の動物と対照群の動物を 1 匹ずつ屠殺し、精巣と精巣上体を検査した。2,4-TDA を 4、6 または 8 週間摂取したことにより、対照群と比べ、体重増加量が減少 ($p < 0.01$) し、体重に対する精巣重量の割合が倍化 (6 週間では $p < 0.05$ で有意、8 週間では $p < 0.01$ で有意) し、この倍化は、精細管中の体液容量が 2.5～2.9 倍増加したと高い相関性を示していた。2,4-TDA の 0.03% の混餌投与を 10 週間受けた後では、精巣重量は対照群と同等であったが、精細管中の体液容量は、依然として上昇していた。精巣上体重量は、2,4-TDA の混餌投与の 4 週間後では有意に ($p < 0.02$) 増加していたが、10 週間後では有意に ($p < 0.05$) 減少していた。2,4-TDA の 4 週間摂取では、精巣上体の精子数への影響は認められなかった。その後、2,4-TDA の混餌投与が 6、8、10 週間続けられる中で、精巣上体の精子数は、対照群のラットの 37～57% に減少した。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

3 回目の試行では、各群 9 匹ずつのラットに、0 ないしは 0.06% (0 および約 30 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA を含む飼料が、1 または 3 週間投与された。2,4-TDA を 1 週間 0.06% の濃度で混餌投与されたラットでは、体重増加量の減少、精巣上体精子数の減少 (25%) および精巣上体重量の減少が有意に認められたが、精巣への肉眼的影響を伴うものではなかった。細胞質中に数個の小空胞を有するセルトリ細胞が散見されたが、投与群の動物における変化は限定的で、ほとんどのセルトリ細胞は、正常な超微細形態を有していた。3 週間 2,4-TDA を 0.06% 含む餌を投与されたラットでは、体重増加量が対照群と比べて有意に少なく (対照群では+20.8% であったのに対し 0.06% 投与群では+4.4%)、また、精子数はかなり減少しており (40%)、これは精巣重量の劇的な増加 (2 倍以上) を伴っていた。剖検では、精細管の色や緊密度は、正常な様相を示していた。電子顕微鏡による精巣組織の検査では、尿細管周囲組織の肥厚および尿細管基底膜の組織分布不整が認められた。血清テストステロン濃度には、2,4-TDA を 1 週間混餌投与されたラットでも 3 週間混餌投与されたラットでも、有意な変化は見られなかった。この 3 試行目の結果から、2,4-TDA の混餌投与が 3 週間以内でも、精巣の精子形成への毒性が示され、この精子形成に対する早期の抑制は、セルトリ細胞の損傷を介して生じることが示唆された。

総括すると、まず、ラットに 2,4-TDA を 0.03% の濃度 (約 15 mg/kg bw/日) で 10 週間混餌投与することにより、組織の rABP 量の変化、およびセルトリ細胞の細胞構造に変化が生じることが示された。2,4-TDA を 0.03% の濃度 (約 15 mg/kg bw/日) で 4、6 ないしは 8 週間混餌投与することにより、体重増加量の減少と精巣重量の増加 (体重に対する精巣重量の比率がほぼ倍化) が引き起こされた。2,4-TDA を 0.06% の濃度 (約 30 mg/kg bw/日) で 1 週間混餌投与した場合でも、有意に生育が抑制され、精巣上体の縮小、精巣上体精子数の減少が引き起こされたが、精巣への肉眼的影響やセルトリ細胞の顕著な変化を伴うものではなかった。2,4-TDA を 0.06% の濃度 (約 30 mg/kg bw/日) で 3 週間混餌投与した場合には、ラットに、精巣上体精子蓄積量の減少、およびセルトリ細胞の超微細構造の変化の増悪が認められた。これらのデータから、2,4-TDA は、0.06% の濃度 (約 30 mg/kg bw/日) で混餌投与した場合に、1 週間以内に毒性影響を引き起こすことが示された。精子数への影響や超微細構造の変化については、2,4-TDA の混餌投与を 3 週間行った場合と 10 週間行った場合とでは、それらの重症度のみで差異が認められた。この試験では、雄の生殖器系への影響に関する NOAEL を導出することはできなかった (Varma et al. 1988)。

7 週間試験 (ラットおよびマウス)

後に行う発がん性試験での適切な曝露量を得ることを目的として、ラットやマウスを 7 週間にわたり 2,4-TDA に反復経口曝露し、その影響が検討された。その様な目的であるため、生化学的および血液学的パラメータについては、測定は行われていない。各群雌雄 5

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

匹ずつの F344 ラットおよび B6C3F1 に、いくつかの設定の内のいずれかの用量で、2,4-TDA が 7 週間混餌投与され、その後観察期間が 1 週間設けられた。ラットにおける 2,4-TDA (純度 99.9%) の用量は、0、250、500、1000、2000 ないしは 3000 ppm (0、約 18、36、72、144 ないしは 216 mg/kg bw/日) であった。マウスにおける用量は、0、100、200、300、500、700 ないしは 1000 ppm (0、約 15、30、45、75、105、150 mg/kg bw/日) であった。

ラットにおける死亡例は、2000 ppm (144 mg/kg bw/日) より高い用量で認められた。500 ppm (36 mg/kg bw/日) を超える用量では、用量依存性の体重増加量減少が引き起こされた。

Dose [ppm]	mean weight at week 7 as % of control: male/female:
250	96/91
500	82/93
1000	59/80

1000 ppm (約 72 mg/kg bw/日) の投与を受けていたラットでは、肝臓内造血の軽度の上昇および肝細胞の細胞質の空胞化が、雌雄両方で認められた。また、軽度の胆管の過形成が、雄において生じていた。250 ppm (約 18 mg/kg bw/日) では、ラットに有害な影響は、何も見られなかった。

マウスでは、1000 ppm (約 150 mg/kg bw/日) 群で、死亡例が認められた。700 ppm (約 105 mg/kg bw/日) の雄マウスや 1000 ppm (約 150 mg/kg bw/日) の雌マウスでは、臨床症状や組織病理学的所見は、何も報告されていない。200 ppm (約 30 mg/kg bw/日) の雌マウスでは、10% の体重増加量減少が見られ、これは 1000 ppm では 25% であった。

総括すると、ラットの NOAEL は、250 ppm (約 18 mg/kg bw/日)、マウスの NOAEL は、100 ppm (約 15 mg/kg bw/日) であった (NCI 1979)。

10 週間試験(ラット)

混餌投与試験がさらに 1 件行われており、雄の生殖器系に対する 2,4-TDA の影響が調べられている。各群 8~10 匹の成体 Sprague-Dawley ラットの雄に、0、0.01 ないしは 0.03% (0、約 5 ないしは 15 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA (純度 98%) を含む基礎飼料が 10 週間投与され、投与終了 4 週後に屠殺を行った。光学顕微鏡により、精巣および精巣上体の検査が実施された。詳細な情報は、4.1.2.9 項に記載してある。

0.01% (約 5 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA を 10 週間混餌投与された群では、死亡例は無く、体

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

重増加量への影響も見られなかった。0.03% (約 15 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA を与えられた群では、投与開始 4 週間で体重増加量の低下が認められ、体重増加量の合計は、対照群と比べ、27%減少していた。精巣の光学顕微鏡検査では、精細管中の精子数の減少が認められた。精母細胞低形成が、限局的(低頻度)もしくは瀰漫性に認められた(半分以上の精細管で影響が見られた)。間質性細胞の変性所見は認められなかった。影響を受けた精巣の精細管では、細胞の管腔への剥離を特徴とするものも認められた。さらに、精巣上体尾部における精子数の減少も認められた。影響がみられた精巣や精巣上体の精細管の多くでは、精子が欠落していた。影響がみられた精細管では、概して精原細胞が存在していなかった。このような毒性徴候は、0.01% (約 5 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA を 10 週間混餌投与された群では、特に認められなかった。この試験の結果から、2,4-TDA が、ラットの精子形成に対して、抑制的もしくは毒性学的影響を及ぼす可能性があることが示された (Thysen et al. 1985a)。

試験では、さらに詳細な試行が実施され、ラットにおいて、2,4-TDA による内分泌学的影響および精子形成への影響が検討された。成体ラットの雄に、0、0.01 ないしは 0.03% (0、約 5 ないしは 15 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA (純度 98%) が 10 週間混餌投与され、その後通常飼料で 11 週間飼育した。10 週目の最後および 2,4-TDA 投与後 11 週目に被験動物を屠殺し、精巣上体尾部精子数および生殖器(精巣、精巣上体、精囊、腹側前立腺)の重量を測定した。血液試料を採取し、テストステロンおよび性腺刺激ホルモンを分析した。0.03% (約 15 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA を 10 週間混餌投与された群では、被験動物の体重増加量は、対照群の動物より 36%低下していた。さらに、平均重量の有意な低下が、精囊 ($p < 0.05$) および精巣上体 ($p < 0.05$) で認められた。2,4-TDA の投与を受けたラットにおける、平均精巣重量および平均前立腺重量は、対照群における値と同等であった。しかし、0.01% (約 5 mg/kg bw/日) 群の動物では、精子の貯蔵量の低下が認められた。0.03% (約 15 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA 投与を受けた雄ラットでは、精子数が有意に ($p < 0.05$) 減少した。これらの雄では、血清テストステロン濃度が、有意に ($p < 0.05$) 低下していた。これに伴って、黄体形成ホルモンの上昇が認められた。卵胞刺激ホルモンの分析からは、投与に関連した有意な影響は認められなかった。

投与無しの 11 週間の期間後でも、0.03% (約 15 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA 投与を受けていた被験動物において、精子数の有意な ($p < 0.001$) 減少が続いていた。精子濃度は、精巣および精巣上体重量と、強い相関を示していた。これらの雄ラットでは、平均精巣重量の有意な ($p < 0.001$) 低下と、平均精巣上体重量の有意な ($p < 0.001$) 低下が認められた。精囊や腹側前立腺の平均重量については、対照群と比べ、有意な変化は認められなかった。血清におけるテストステロン濃度は低下し、黄体形成ホルモン濃度は上昇していたが、いずれも有意ではなかった。一方、卵胞刺激ホルモン濃度には、投与による有意な変化は認められ

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

なかった。

総括すると、これらの結果から、2,4-TDA は、セルトリ細胞に有害影響を及ぼし、それにより精子形成に関して、用量依存性の毒性影響を發揮することが示された。雄ラットの性腺損傷の第一の徴候は、精子の検討により把握された。2,4-TDA が 0.01% (約 5 mg/kg bw/日) の用量であっても、精子貯蔵量の低下が認められた(詳細は 4.1.2.9 項を参照)。したがって、雄の生殖系への得強に関する NOAEL を確立することはできなかった(Thysen et al. 1985b)。

36 週間試験(ラット)

雄の Wistar ラット 12 匹ずつからなる 2 群が設けられ、2,4-TDA(業務用等級の純度)を 600 ないしは 1000 ppm(約 45 ないしは 75 mg/kg bw/日)含む飼料が、30~36 週間投与された。第 3 群(雄ラット 6 匹)を設け、基礎飼料で飼育する対照群とした。試験手順および結果の報告内容は、規制に係る現行の試験プロトコルに準じて行われた試験のものと同等であった。しかし、この試験の信頼性は限定的である。この試験は、焦点を当てたパラメータが少なく、また GLP に準じて実施されていない。それでも、十分な記載がなされており、科学的に受容され得るものである。詳細は、4.1.2.8 項も参照されたい。

600 ppm(約 45 mg/kg bw/日)群では、11 匹が 35 週間生残し、1000 ppm(約 75 mg/kg bw/日)群では、9 匹が 35 週間生残した。投与期間が 4~8 週に達すると、被験動物の体重増加量が低下し、体重も減少した(平均で、低用量群での体重増加量は対照の 0.1%で体重は対照の 51%減少、高用量群での体重増加量は対照の 0.06%で体重は対照の 57%減少)。相対肝重量は、対照群の 300%以上であった。600 ppm(約 45 mg/kg bw/日)以上の用量群の雄 Wistar ラットでは、浸潤性の肝がんが認められ、転移も見られた。肝臓のがんに侵されていない部位では、卵形細胞の広範な増殖が見られ、それらは胆管上皮への分化を伴っていた。結節性の過形成が、肝臓に広範に認められた。さらに、脂肪変性、胆管線維症および硬変を生じている部位が存在していた。全体として NOAEL は導出されなかった(Ito 1969 et al.)。

15 カ月試験(ラット)

この試験は、クロロトルエンジアミン混合物による長期毒性を検討することを企図したもので、2,4-TDA は陽性対照物質として使用されている。ChP-CD ラットの雌雄 36 匹ずつに、1000 ppm(約 75 mg/kg bw/日)の 2,4-TDA(業務用等級の純度)を含む飼料が 2 週間、500 ppm(約 38 mg/kg bw/日)の飼料が 5.5 カ月間、そして 250 ppm(約 19 mg/kg bw/日)の飼料が 9 カ月間投与された。投与日数でならした平均濃度は 367 ppm で、1 日当たりの平均摂取量は約 28 mg/kg bw/日と算出された。対照群は、非投与の雄 12 匹と雌 10 匹で構成されていた。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

2,4-TDA が投与された群では、雌雄とも死亡率が上昇しており、体重増加量が顕著に減少（平均で対照群の 33%）し、軽度の貧血および白血球增多症が生じていた。鏡検では、様々な組織に、対照群よりも多量のヘモジデリンが認められた。2,4-TDA の投与を受けた動物では、対照群と比べ、血清中の ALP、GPT およびビリルビン濃度が上昇していた。これらの所見は、肝臓の組織病理学的所見、すなわち、肝細胞の巣状壊死、嚢胞性胆管、胆管炎、胆管線維症、造血像およびヘモジデリン沈着と整合していた。雌雄両方において、脾臓の重度の萎縮が認められた。雄では、試験開始後 9 ヶ月の時点で、タンパク尿や糖尿が観察された。腎臓の鏡検では、投与群の雄で、腎盂の炎症が、対照群より高頻度で認められた。肉芽腫形成を伴う重度の精巣萎縮が、2,4-TDA の投与を受けた全ての雄で、一貫して認められた。飼料に 2,4-TDA が添加されることにより、雌雄両方において、肝腫瘍ならびに乳腺腫瘍の発生率が有意に増加し、雄では肺腫瘍(主として腺腫)も有意に増加した。全体として NOAEL は導出されなかった (Stula and Aftosmis 1976)。

長期試験(ラットおよびマウス)

2,4-TDA の発がん性に関する生物試験が実施されており、F344 ラットおよび B6C3F1 マウスに混餌投与が行われた。

ラット

F344 ラット(各群雌雄 50 匹ずつ)に、2,4-TDA(純度 99.9%)が、まず 40 週間、125 もしくは 250 ppm(約 9 もしくは 18 mg/kg bw/日)のいずれかの濃度で投与された。低用量群でも高用量群でも平均体重増加量が過度に低下したため、その後用量は、50 および 100 ppm(約 3.7 および 7.4 mg/kg bw/日)に減じられた。このため、平均摂取量は、5.9 および 13 mg/kg bw/日と算出された。同時対照群は、雌雄 20 匹ずつの、投与を受けていないラットで構成されていた。

雌雄のラットとも生残率は低下していった。78 週間の投与を終えた時点でなお生残していたラットの数は、下表の通りであった。

Number of rats which were still alive at week 78 on study

Dose	Males	Females
Low dose	42/50 (84%)	46/50 (92%)
High dose	32/50 (64%)	46/50 (92%)
Control	18/20 (90%)	20/20 (100%)

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

死亡率は、雌雄のラットとも、用量依存性を示しており、生残数は減少した。250/100 ppm の 2,4-TDA を投与された雄は、79 週までにすべてが死亡した。高用量群の雌は、84 週までに死亡したか、切迫屠殺された。投与を受けた雌雄のラットでは、平均体重が対応する対照群よりも低く、その低下は用量依存性であった(平均体重は、125/50 ppm 群の雄では対照群の 79%、250/100 ppm 群の雄では 58%、125/50 ppm 群の雌では対照群の 93%、250/100 ppm 群の雌では 66%)。F344 ラットを用いたこの発がん性試験における非腫瘍性所見から、2,4-TDA が肝毒性を示すことが明らかとなった。投与を受けた動物では、肝臓において、投与により引き起こされた様々な非腫瘍性の形態学的変化が現れ、それらは、軽度の脂質代謝異常を示す散在性病巣や肝細胞の巣状壊死から、重度の瀰漫性の毒性学的変性病巣にわたるものであった。ラットにおける主要な肝病巣の発生率は、下表の通りであった。

Number of rats with primary nonneoplastic lesions in the liver

Dose	Males	Females
Low dose	25/49 (51%)	23/50 (46%)
High dose	36/50 (72%)	42/49 (86%)
Control	2/20 (10%)	1/20 (5%)

さらに、雌雄両方において、腎臓にも病巣が見られた(雄の方が顕著)。腎臓の鏡検では、5 段階評価システムでさまざまな重症度の非腫瘍性病変が明らかとなった(Cardy 1979)(下表に続く記載を参照)。用量ごとならびに性別ごとの平均数値を下表に示した。

Scoring of chronic renal disease in rats

Dose	Males (mean average of severity grades/ number of animals tested)	Females
Low dose	3.7/49	2.0/50
High dose	3.9/50	2.8/49
Control	2.1/20	1.3/19

5 段階評価システムとは： 1 = 主にボーマン囊で見られる軽度の基底膜の肥厚として検出される極微細な変化。2 = 軽度の糸球体変化、管腔にタンパク質性円柱を伴う尿細管の散在性萎縮性拡張性変化。3 および 4 = 上述の変化の程度に関する主観的な区分で、糸球体の萎縮や硬化、リンパ組織凝集体、および様々な度合いの間質性線維症ならびに構造上の不整を伴う。スコア 4 は、重度の意味合いを示す。5 = 末期の腎臓を示すために確保された段階。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

腎臓の症状に呼応して、低用量群や高用量群の雄では、二次的に出現した上皮小体機能亢進症が、高頻度で認められた。影響を受けた上皮小体は、球状化し、摘出した甲状腺の表面から膨出していた。これに関連する病変としては、数多くの部位における転移性の石灰化、および破骨細胞の増殖や骨髄線維症を伴う骨吸収が挙げられる。ラットにおける 2,4-TDA による腫瘍性影響についての詳細な情報は、4.1.2.8 項に記載している。F344 ラットにおいては、平均用量 5.9 mg/kg bw/日、2,4-TDA は肝毒性を示し、この系統のラットで慢性的な腎疾患が引き起こし、また、腫瘍の発生頻度を増加させた。全体として、ラットの NOAEL は導出されなかった (NCI 1979; Cardy 1979)。

マウス

マウスに、100 もしくは 200 ppm (約 15 もしくは 30 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA が、101 週間混餌投与された。同時対照群は、雌雄各 20 匹ずつの、投与を受けていないマウスで構成された。生残マウスは、被験物質投与の終了時に屠殺した。

B6C3F1 マウスの雌雄どちらにおいても、死亡率は用量依存性を示していなかった。生残率は、投与群と対照群とで同等であった。101 週間の投与期間終了時でも生残していたマウスの数は、下表の通りである。

Number of mice which were still alive at termination of the study (week 101)

Dose	Males	Females
Low dose	45/50 (90%)	40/50 (80%)
High dose	43/50 (86%)	39/50 (78%)
Control	18/20 (90%)	15/20 (75%)

投与を受けた雌雄のマウスの平均体重は、対応する対照群の値よりも低く、低用量の雄マウスを除いて用量依存性を示していた。低用量の雄マウスでは、平均体重は対照群の値よりもわずかに低いだけであった。雌の B6C3F1 マウスでは、体重増加量の 23~50% の減少が、用量依存性に認められた。100 もしくは 200 ppm (約 15 もしくは 30 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA が混餌投与された雌マウスでは、肝臓がんの発生数が、有意に上昇した。また、被験物質投与群のマウスでは、肝臓において、過形成結節の発生も見られた。肝病巣の発生率は、2,4-TDA の投与を受けていた雄マウスでは、増加していなかった。マウスにおける 2,4-TDA による腫瘍性影響についての詳細な情報は、4.1.2.8 項に記載している。腎臓の組織検査では、2,4-TDA に関連した変化は、何も示されなかった。全体として、NOAEL は導出されなかった (NCI 1979; Reuber 1979)。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

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。

皮下投与

2年間試験(ラット)

2,4-TDA を含む 6 種類の芳香族アミンおよび誘導体について、Sprague-Dawley ラットを用いた皮下注射試験により、発がん性が検討された。各群雌雄 30 匹ずつに、0、8.33 もしくは 25 mg/kg bw の 2,4-TDA (業務用等級の純度) が、1 週間に 1 度皮下注射された。投与は、被験物質に関連した最初の腫瘍が現れるまで、最長で 2 年間行われた。媒体(ピーナッツ油)の投与を受ける対照群に加え、別の同規模の無投与群、およびベンジジンの投与を受ける陽性対照群が設けられた。投与を終えた後、ラットは、自然死を迎えるまで、もしくは瀕死状態になって屠殺されるまで、飼育され続けた。

生残率は、25 mg/kg bw 投与群の雄で生存期間が対照群よりも短かった以外は、投与群と対照群とで同等であった。投与群の雌雄のラットの平均体重は、対応する対照群の値よりも、用量依存的に低かった。いくつかの臓器や組織について、鏡検が行われたが、肝臓以外には、投与に関連した病巣は認められなかった。25 mg/kg bw 投与群の 16 匹のラット(雌雄合わせて)、および 8.33 mg/kg bw 投与群の 7 匹のラットは、肝細胞の巣状壊死や単在性の肝硬変を示していた。肝細胞腫瘍は、1/120 匹のラットで認められた。また、雄では、注射部位における局在性の悪性腫瘍の発生率が、用量依存的に統計学的有意に上昇していた。全体として、NOAEL は導出されなかった(Steinhoff and Dycka 1981)。

他の情報

2,4-TDA の毒性については、前世紀の初頭から検討されている。これらの初期の試験は、質は低いですが、肝臓に対する損傷的影響を明らかにしている。いくつかの試験では、使用した被験物質の仕様や純度等のデータについては言及しているが、試験記録の詳細さには不

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

十分な点があった。それらの多くは、対象としたパラメータも少ない。しかしこれらの試験の所見は整合性が良くとれており、したがって、影響を検討する上で、やはり有用であるとみなされる。以下の記載では、これらの初期の動物試験から得られたデータを要約してある。

ラットに、2.5%の2,4-TDAを、オリーブ油を媒体として飼料に混ぜ(米1g当たり約1mg)、80日間以上投与した。投与の5日目から3週目にかけて、死亡率が増加したことが記載されている。対照に関するデータ、および血液学的ならびに生化学的パラメータに関するデータは得られていない。肝臓の組織病理学的検査についてのみ、報告がなされている。ラットへの2,4-TDAの投与を60日間以上続けると、著者により「小胆管性増生性輪状肝硬変」と名付けられた、肝硬変が生じた。ラットに2,4-TDAを60日間混餌投与し、その後無添加試料を与えると、肝硬変の病変は速やかに消失した。肝臓における組織形態学的所見は、著者によって、小葉間胆管のがん様非定型増殖と解釈されている(Nagata 1937, 1944)。

2,4-TDAへの反復曝露による毒性に関する動物データの要約

数多くの動物試験から得られた、2,4-TDAによる主要な毒性影響に関する情報を、Table 4.1.2.6Aにまとめた。

Table 4.1.2.6 A

Summary table: Animal toxicity data after repeated exposure to 2,4-TDA

Species/strain (male/female) Group size Exposure Route	Dose Exposure duration	NOAEL for nonneoplastic effects	Adverse effects ↑ increase ↓ decrease	Reference
Rat/Sprague-Dawley (9m) oral in feed	0, 30 mg/kg bw/day 1 week or 3 weeks	-	600 ppm (30 mg/kg bw/day) after 1 week: ↓ body weight gain	Varma et al. 1988

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

<p>(5m) oral in feed</p> <p>(9m) oral in feed</p>	<p>daily</p> <p>0, 15 mg/kg bw/day 4, 6, 8, or 10 weeks, daily</p> <p>0, 15 mg/kg bw/day</p> <p>10 weeks, daily</p>		<p>↓ epididymal weight ↓ epididymal sperm content very small findings in Sertoli cell ultrastructure (few small cytoplasmic vacuoles) <u>after 3 weeks:</u> ↑ testes weight (more than doubled)</p> <p>↓ epididymal sperm count small findings in Sertoli cell ultrastructure</p> <p>300 ppm (15 mg/kg bw) <u>after 4, 6, or 8 weeks:</u> ↑ of testes/body weight ratios ↑ seminiferous tubule fluid volume <u>after 6, 8 or 10 weeks:</u> ↓ epididymal sperm content</p> <p>300 ppm (15 mg/kg bw) ↑ rABP in testes and serum ↑ rABP in epididymidis variable degenerative effects in Sertoli cell ultrastructure</p>	
<p>Rat/F344 (5m/5f) oral in feed</p>	<p>0, 18, 36, 72, 144, 216 mg/kg bw/day 7 weeks, daily, one week recovery period</p>	<p>250 ppm (18 mg/kg bw/day)</p>	<p>2000 ppm (ca. 144 mg/kg bw/day) mortality (5/5m, 4/5f, no data on time point of death) 1000 ppm (ca. 72 mg/kg bw/day) ↑ liver cell vacuolation (m/f), bile duct hyperplasia (m) > 500 ppm (ca. 36 mg/kg bw/day) ↓ body weight gain (m/f)</p>	<p>NCI 1979</p>

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Table 4.1.2.6 A (contin.):

Summary table: Animal toxicity data after repeated exposure to 2,4-TDA

Species/strain (male/female) Group size Exposure Route	Dose Exposure duration	NOAEL for nonneoplastic effects	Adverse effects ↑ increase ↓ decrease	Reference
Rat/Sprague-Dawley (8-10m) oral in feed	0, 5, 15 mg/kg bw/day 10 weeks daily followed by recovery of 4 weeks	100 ppm (5 mg/kg bw/day) for light microscopic findings	300 ppm (15 mg/kg bw/day) ↓ body weight gain ↓ testes weights ↓ epididymal sperm count ↑ focal to diffuse hypospermia	Thysen 1985a
Rat/Sprague-Dawley (8-10m) oral in feed	0, 5, 15 mg/kg bw/day 10 weeks daily followed by recovery of 11 weeks	-	<u>After 10 weeks:</u> 300 ppm (15 mg/kg bw/day) ↓ body weight gain ↓ seminal vesicles and epididymal weights ↓ epididymal sperm count ↓ serum testosterone ↑ serum LH 100 ppm (5 mg/kg bw/day) ↓ epididymal sperm reserve <u>After 10 weeks + recovery:</u> 300 ppm (15 mg/kg bw/day) ↓ sperm count ↓ testes and epididymal weights ↓ serum testosterone ↑ serum LH	Thysen 1985b
Rat/Wistar (11m in low dose, 9m in high dose) oral in feed	0, 45, 75 mg/kg bw/day 36 weeks daily	-	600 ppm (45 mg/kg bw/day) ↓ survival time ↓ body weight gain ↑ liver weight, proliferation of oval cells, fatty degeneration, cirrhosis, cholangiofibrosis, nodular hyperplasia, hepatocarcinoma	Ito et al. 1969
Rat/ChP-CD (36m/36f per test group; 12m/12f in control group)	Calculate d average over total time: 28 mg/kg	-	367 ppm (28 mg/kg bw/day) ↑ mortality rate (m/f), ↓ body weight gain (m/f), slight anemia, leucocytosis (m/f),	Stula and Aftosmis 1976

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

<p>oral in feed</p>	<p>bw/day 75 mg/kg bw/day for 2 weeks, 38 mg/kg bw/day for 5,5 months, 19 mg/kg bw/day for 9 months total exposure of 15 months daily</p>	<p>-</p>	<p>↑ serum ALP, GPT, bilirubin (m/f), focal necrosis of hepatocytes (m/f), cystic bile ducts (m/f), severe atrophy of the spleen (m/f), liver, and mammary tumors (m/f) severe testicular atrophy (m) inflammation on renal pelvis (m) ↑ lung tumors (m)</p>	<p></p>
<p>Rat/F344 (50m/50f per test group; 20m/20f in control group) oral in feed</p>	<p>calculated average: 5.7, 13 mg/kg bw/day: 0, 9, 18 mg/kg bw/day for 40 weeks, then reduction to 3.7, 7.4 mg/kg bw/day due to depressed body weight gain until end of study, m: 79 weeks, f: 84 weeks, control m/f: 103 weeks; high dose exposure premature ly terminated because of morbidity daily</p>	<p>-</p>	<p>≥ 5.9 mg/kg bw/day ↓ survival rate (m/f), ↓ body weight gain (m/f) liver cell degeneration, lipidosis (m/f) chronic renal disease (m/f) ↑ liver tumors (m/f) ↑ mammary gland tumors (f)</p>	<p>NCI 1979 Cardy 1979 Sontag 1981</p>

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Table 4.1.2.6 A (contin.):

Summary table: Animal toxicity data after repeated exposure to 2,4-TDA

Species/strain Group size (male/female) Exposure route	Dose Exposure duration	NOAEL for nonneoplastic effects	Adverse effects ↑ increase ↓ decrease	Reference
Mouse/CD-1 (10f) oral by gavage	0, 150, 175, 200, 225, 250 mg/kg bw/day 8 days, 8 days recovery period daily	150 mg/kg bw/day	≥ 175 mg/kg bw/day mortality: from the fifth dosing day to the fifth post-dosing day ↓ body weight gain (10%) rough coat, and hunched posture during recovery period	Smith 1983
Mouse/B6C3F 1 (f no number per group available, a total of 864 females were used) oral by gavage	0, 25, 50, 100 mg/kg bw/day 14 days daily	- 25 mg/kg bw/day for liver effects	≥ 25 mg/kg bw/day <u>immune parameters:</u> ↓: splenic macrophage phagocytosis (45%), IgM (46%) and IgG (56%) responses in sheep erythrocytes, serum C3 production, host resistance to bacteria, NK cell activity (39%) ↑: number of blood leucocytes, proportion of lymphocytes in the blood, proportion of T and B lymphocytes in the spleen, delayed hypersensitivity response (123%), hepatic reticuloendothelial activity ≥ 50 mg/kg bw/day ↑ liver weights (42%) mild to moderate centrolobular necrosis ↓ spleen weights <u>serum chemistries:</u> ↑ ALAT ↓ urea nitrogen	White et al. 1989 Burns et al. 1994
Mouse/B6C3F 1 (-5m/5f) oral in feed	0, 15, 30, 45, 75, 105, 150 mg/kg bw/day 7 weeks, one week recovery - daily	100 ppm (15 mg/kg bw/day)	≥ 1000 ppm (150 mg/kg bw/day) mortality (2/5m, 0/5f, no data on time point of death) 200 ppm (30 mg/kg bw/day) ↓ body weight gain (f)	NCI 1979

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Mouse/B6C3F1 (-50m/50f per test group; 20m/20f control group) oral in feed	0, 15, 30 mg/kg bw/day 101 weeks daily	-	≥ 100 ppm (>15 mg/kg bw/day) ↓ body weight gain (m/f) ↑ nodular hyperplasia in the liver (f) ↑ hepatocarcinoma, lymphomas (f)	NCI 1979 Reuber 1979 Sontag 1981
Rat/Sprague-Dawley (30m/30f) subcutaneous application	0, 8.33, 25 mg/kg bw 2 years once a week	-	25 mg/kg bw ↓ survival time (m) ↓ body weight gain (m/f), focal necrosis of hepatocytes (m/f), single cirrhosis, liver tumor in 1/120 ↑ incidence of malign tumors at the injection site (m)	Steinhoff and Dycka 1981

m: male; f: female

2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物

試験データからは、2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物の毒性は、主要成分である 2,4-TDA により引き起こされることが示されている。

経口

データは得られていない。

吸入

吸入毒性試験はいくつか行われているが、予備試験的なものに過ぎない。これらの吸入試験は、現行のガイドラインである B.8, OECD TG 412 の試験デザインに準じて実施されたものではない。これらの多くは、限られたパラメータだけを対象としている。提示されたデータは、要約の形式のもののみである。検討したパラメータ、方法、および測定器具についての詳細な情報は得られていない。したがって、これらの試験の結果は、追加的な情報として検討された。

28 日間試験(ラット)

28 日間吸入試験が、100°C で気化した 2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物を用いて実施されている。分析測定された濃度は、9.5 および 83 mg/m³ であり、概ね 20°C における飽和蒸気濃度の 10 mg/m³ を上回っていた。20 匹の雄の Wistar ラットが、2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物の蒸気に、1 日 4 時間、週 5 回で 4 週間曝露された(全身曝露)。空気中の平均濃

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

度が 83 mg/m^3 (約 9 mg/kg bw/日) の場合、曝露を受けたラットには、対照群(動物数や性別のデータ無し)と比べて、外観や一般状態への影響は認められなかった。しかし、体重増加量は減少し、肝臓、腎臓および甲状腺の相対重量が増加し、また血液検査では相対的なリンパ球減少が認められた。剖検では、曝露に関連した肉眼病変は認められなかった。 9.5 mg/m^3 、すなわち約 1 mg/kg bw/日 (呼吸容量を 6 L/時 とし、吸収が 100% であるとして算出) の場合、4 週間の曝露期間中、被験動物は、行動や成長に関して、対照群と同等の成績を示した。曝露終了時、2,4-TDA に関連した所見は、血液学的検査、肝ならびに腎機能検査、および肉眼的病理検査において、何も認められなかった。組織病理学的データは得られなかった。全体として、 $\text{NOAEC}_{\text{sys}}$ は、 9.5 mg/m^3 (約 1 mg/kg bw/日) であった (Kimmerle and Solmecke 1971)。

21 および 28 日間試験(ネコ)

2 匹の雄ネコが、2,4-/2,6-TDA (80/20) の蒸気に、平均 41.6 mg/m^3 (約 4.5 mg/kg bw/日) の濃度で、1 日 4 時間、週に連続 5 日で 3 週間曝露され(全身曝露)、その後、10 日間の回復期間が設けられた。ネコの一般状態は徐々に悪化し、体重が減少した。1 匹は、曝露後に死亡した(これ以上のデータ無し)。曝露終了時には、重度のメトヘモグロビン(30%)血症が認められた。最後の曝露から 10 日後の時点では、血液学的パラメータに対する影響は認められなかった。鏡検では、肺、肝臓、腎臓に病変(詳細な記述無し)が認められた(これ以上のデータ無し)。

別の試験では、雌雄 3 匹ずつのネコが、 9.5 mg/m^3 の濃度で、1 日 4 時間、週に 5 日で 4 週間曝露された。曝露期間中は、体重増加がみられなかった。2 週間後、低レベルのメトヘモグロビン形成(2.07%)が認められた。網状赤血球やハインツ小体の数は、曝露されたネコと対照群とで同等であった(これ以上のデータ無し)。

まとめると、 9.5 mg/m^3 の 2,4-/2,6-TDA (80/20) では、低レベルのメトヘモグロビン形成(2.07%)が認められた。 41.6 mg/m^3 の濃度では、ネコは、重度のメトヘモグロビン(30%)血症を示し、体重増加量が低下し、肺、肝臓および腎臓に病理形態学的変化(詳細な記述無し)を示した(これ以上のデータ無し)。全体として、 NOAEC は導出されなかった (Kimmerle and Solmecke 1971)。

経皮

データは得られていない。

皮下投与

2年間試験(ラット)

皮下注射による試験が行われており、30匹の Sprague-Dawley ラットに、0、8.33 もしくは 25 mg/kg bw の用量で、2,4-/2,6-TDA (80/20) が投与された。投与は週1回、被験物質に関連した最初の腫瘍が現れるまで、最長で2年間行われた。詳細な情報は、4.1.2.8 項に記載している。

8.33 mg/kg bw 群の生残率は、対照群と同等であった。25 mg/kg bw 群では、雌雄とも、対照群よりも生存期間が短縮していた。いずれの投与群でも、雌雄共に、平均体重は、対応する対照群の値よりも低く、その低下は用量依存的であった。いくつかの臓器や組織について、鏡検が行われたが、肝臓以外には、投与に関連した病巣は認められなかった。25 mg/kg bw 投与群の11匹のラット(雌雄合わせて)、および 8.33 mg/kg bw 投与群の8匹のラットは、肝細胞の巣状壊死や単在性の肝硬変を示していた。全体として、NOAEL は導出されなかった(Steinhoff and Dycka 1981)。

他の情報

いくつかの短期試験が Wistar ラット、NMRI マウス、Syrian ゴールデンハムスター、およびウサギを用いて実施されており、それらから 2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物を反復吸入した場合の毒性に関する情報が得られる。それらの試験のデータを、追加情報として検討した。

10匹の雄の Wistar ラット、20匹の雄の NMRI マウス、5匹の雄の Syrian ゴールデンハムスター、および2匹の交雑種のウサギが、2,4-/2,6-TDA (80/20) の蒸気に、1日4時間で5日間曝露された(全身曝露)。平均曝露濃度は、8.367 mg/L(ラットおよびマウス)もしくは 7.557 mg/L(ハムスターおよびウサギ)で、2週間の回復期間が設けられた。

被験動物は、曝露中、一般状態の悪化と呼吸困難を示した。被験動物は回復し、死亡例は認められなかった。これ以上のデータは得られていない(Kimmerle and Solmecke 1971)。

2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物の反復曝露による毒性に関する動物データの要約

動物試験から得られた、2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物による主要な毒性影響に関する情報を、Table 4.1.2.6.B にまとめた。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Table 4.1.2.6. B

Summary table: Animal toxicity data after repeated exposure to the mixture of the isomers 2,4-/2,6-TDA (80/20)

Species/strain group size (male/female) Exposure Route	Dose/Concentration Exposure duration	NOAEL / NOAEC for nonneoplastic effects	Adverse effects ↑ increase ↓ decrease	Reference
Rat/Wistar (20m) inhalation (whole body)	0, 0.0095, 0.083 mg/l 28 days, 4 hours/day 5 days/week	9.5 mg/m ³ (1 mg/kg bw/day)	83 mg/m ³ (9 mg/kg bw/day) ↓ body weight gain ↑ relative organ weight of liver, kidney, and thyroid gland, lymphopenia	Kimmerle Solmecke 1971
Cat/no data (2m) Inhalation (whole body)	0.0416 mg/l 3 weeks, 4 hours/day, 5 days/week	-	41.6 mg/m ³ (4.5 mg/kg bw/day) general deterioration, ↓ body weight gain ↑ methemoglobin formation (30%) pathomorphological findings (not specified) in the lung, liver, and kidneys	Kimmerle, Solmecke 1971
Cat/no data (3m/3f) inhalation (whole body)	0.0095 mg/l 4 weeks, 4 hours/day, 5 days/week	-	9.5 mg/m ³ (1 mg/kg bw/day) low level of methemoglobin formation (2.07%) after 2 treatment weeks	Kimmerle Solmecke 1971
Rat/Sprague-Dawley (30m/30f) subcutaneous application	0, 8.33, 25 mg/kg bw 2 years once a week	-	≥ 8.33 mg/kg bw focal necrosis of hepatocytes, single cirrhosis ↑ incidence of malign tumors at the injection site 25 mg/kg bw ↓ survival time ↓ body weight gain	Steinhoff Dycken 1981

m: male; f: female

ヒトにおけるデータ:

データは得られていない。

反復曝露による毒性影響の要約：

2,4-TDA

経口曝露による 2,4-TDA の反復投与毒性については、げっ歯類において良く検討されている。混餌投与により 2,4-TDA に短期もしくは長期曝露した場合の主要な標的臓器は、肝臓である。2,4-TDA は肝臓を損傷し、また、慢性腎疾患の発症を早め、ラットの雄の生殖系に損傷を与える能力を有する。短期試験における 2,4-TDA による毒性影響の特徴は、体重増加量の減少と、体重に対する肝臓重量の比率の増加である。ラットに約 15 mg/kg bw/日の用量で、8～12 週間投与した場合に、体重増加量の減少が認められている (Ito 1969, Stula 1976)。混餌投与により 5.9 mg/kg bw/日 (飼料中濃度が 125 から 50 ppm に減量された場合の時間加重平均) の用量で 2,4-TDA に 2 年間曝露された場合には、明らかに用量に依存した体重増加量の減少と、やはり用量依存性の生残率低下が引き起こされた。F344 系ラットにおいては、5.9 mg/kg bw/日以上以上の用量で、肝毒性影響、および慢性腎疾患の発症が見られ、後者は、投与を受けた動物における生残率の著明な低下に寄与していた。肝毒性影響は、脂肪変性、胆管線維症および肝硬変 (36 週間試験で 45 mg/kg bw/日以上において; Ito 1969) として、さらに巣状肝細胞壊死から肝臓における重度の瀰漫性の毒性学的変性病変 (長期試験で 5.9 mg/kg bw/日以上において; Cardy 1979, NCI 1979) として、確認された。腎臓の病変は、5.9 mg/kg bw/日以上以上の用量で、雌雄両方で観察された (雄でより著明)。腎疾患に呼応して、被験物質投与群の雄では、二次的に生じる上皮小体機能亢進症の発生率が高かった (長期試験; NCI 1979)。さらに、肝細胞がんや腫瘍性結節が見られ、それらの発生率は、雌雄のラット両方で、用量依存性を示した。

ラットを用いた試験データから、2,4-TDA は以下に示す、健康への深刻な影響を引き起こすことが示された。28 mg/kg bw/日を 15 ヶ月間与えた試験における、精巣萎縮 (Stula and Aftosmis 1976)。15 mg/kg bw/日を投与した試験 (10 日間、経口) における、精巣重量や精巣上体重量の有意な減少、セルトリ細胞の形態学的損傷、および血清テストステロン濃度の低下や血清黄体形成ホルモンの上昇と、それらに関連した精子形成抑制 (66%) (Thysen et al. 1985a, 1985b, Varma et al. 1988)。精巣上体精子の貯蔵量への有害影響は、まず、10 日間の経口投与試験で 5 mg/kg bw/日を混餌投与した場合に認められた (Thysen et al. 1985b)。

マウスはラットよりも、2,4-TDA に対する感受性が低い。マウスを、2,4-TDA が 100 ppm 含まれる飼料 (15 mg/kg bw/日) で 101 週間曝露した場合でも、生残率には、対照群と比較して、有意な差は示されなかった。ただし、体重増加量は、25～50% 低下した。この影響は、用量依存性であったが、低用量群の雄マウスは例外で、この群では対照群よりわずかに平均体重が低下しただけであった。B6C3F1 マウスを用いた試験では、肝病変の発生率は上昇せず、腎臓でも投与に関連した所見は認められなかった。2,4-TDA を、100 もしく

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

は 200 ppm の濃度(15 もしくは 30 mg/kg bw/日)で、101 週間混餌投与された雌マウスでは、肝臓で、有意な数のがんが発生した。投与を受けたマウスでは、雌雄ともに、肝臓に過形成結節の発生も見られたが、2,4-TDA を最長 101 週間混餌投与された場合でも、マウスに退行性の影響は認められなかった(NCI 1979, Reuber 1979)。

吸入による 2,4-TDA のげっ歯類への影響を検討した試験は、反復毒性試験では見あたらなかった。4.1.2.8 項に記載した経皮曝露に関連した、マウスの皮膚に塗布を行った試験からは、確固とした結論を導くことはできなかった。

2,4-TDA は、週 1 回で 2 年間にわたり反復的に皮下投与した場合に、ラットにおいて、局所の肉腫を発生させた。25 mg/kg bw/日の用量の場合、雄でも雌でも、生存期間が短縮した。8.33 mg/kg bw/日以上で、体重増加量の減少、肝細胞の巣状壊死および単在性の肝硬変が観察された。

2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物

2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物の吸入毒性試験は、予備試験的に行われたものであったが、ラットへの全身的な影響に関して、9.5 mg/m³(約 1 mg/kg bw/日、亜慢性試験)という NOAEC が得られた。この用量は、ネコにおいては、軽度のヘモグロビン形成(2.07%)を引き起こすことが明らかとされており、ネコはこの影響に対して高い感受性を示す(そのため NOAEC は導出できなかった)。ネコへの影響は、別の試験でも確認された。41.6 mg/m³の濃度(約 4.5 mg/kg bw/日、亜慢性試験)で、ネコは、重度のメトヘモグロビン(30%)血症、体重増加量の低下、および肺、肝臓ならびに腎臓における病理形態学的変化(明確な記載無し)を示した(これ以上のデータ無し)。83 mg/m³(約 9 mg/kg bw/日、亜慢性試験)の濃度では、ラットにおいて、体重増加量の減少、肝臓、腎臓ならびに甲状腺の相対重量の増加、および血液検査における相対的なリンパ球減少が認められた。ラットを用いた試験では、メトヘモグロビン形成に関するデータは得られなかった(Kimmerle and Solmecke 1971)。

ラットに反復的に 2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物を皮下投与した場合には、局所に肉腫が発生した。25 mg/kg bw/日の用量の場合、雄でも雌でも、生存期間が短縮した。8.33 mg/kg bw/日以上で、体重増加量の減少、肝細胞の巣状壊死および単在性の肝硬変が観察された。

市販の 2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物を用いて、経口もしくは経皮曝露を行った動物試験は見あたらなかった。

無/最小影響量/濃度**2,4-TDA - 経口投与**

ラットの2年間試験から、5.9 mg/kg bw/日(時間加重平均用量)という LOAEL が導出された(NCI 1979)。NOAEL は算定されなかった。この長期混餌投与試験は、既存化学物質に関する基礎試験に求められる事項を完全に満たすものではなかった(2 用量のみでの試験であり、血液学的ならびに生化学的パラメータに関するデータを欠く)が、重要な毒性影響が観察される、最小影響濃度を提示している。この用量では、生残率の低下、体重増加量の顕著な低下、肝臓や腎臓における病変、ならびに高頻度での肝臓腫瘍の発生が認められた。

約 15 mg/kg bw/日の用量で 10 週間曝露された雄ラットでは、セルトリ細胞の構造変化が生じ、4、6 および 8 週間の曝露では、体重増加量の減少および精巣重量の増加(体重に対する比率が約 2 倍)が生じた。約 30 mg/kg bw/日の 2,4-TDA を 3 週間与えた場合には、雄ラットにおいて、精巣上体精子貯蔵量の減少、およびセルトリ細胞の超微細構造の変化の増加が示された。これらの精子数や超微細構造の変化は、2,4-TDA を約 30 mg/kg bw/日の用量で 3 週間与えた場合と 15 mg/kg bw/日の用量で 10 週間混餌投与した場合とで、その重症度だけが異なっていた(Varma et al. 1988)。精子形成に対する毒性影響は、約 15 mg/kg bw/日を 10 週間与えられた雄ラットで報告されている。鏡検では、精細管や精巣上体尾部における局在性もしくは瀰漫性の精母細胞低形成が示された。このような変化は、約 5 mg/kg bw/日の用量では報告されていない(Thyssen et al. 1985a)。別の試験では、約 15 mg/kg bw/日を 10 週間与えられた雄ラットで、体重増加量の減少、精囊重量および平均精巣上体重量の減少、精子数の減少、および血清テストステロン濃度の減少が認められたが、5 mg/kg bw/日の用量では認められなかった。ただし、5 mg/kg bw/日の 2,4-TDA を投与された雄ラットでも、精子貯蔵量の減少は認められている(Thyssen et al. 1985b)。したがって、5 mg/kg bw/日は、厳密にみて、精子形成への影響に関する LOAEL とみなされる。

2,4-TDA の中期投与を行った他の反復投与毒性試験で得られたデータから、NOAEL を確定することができた。これらの試験の中には、現行の試験ガイドラインに(完全には)準拠しておらず、限られたパラメータしか検討していないものもある。亜慢性投与を行った限定的な試験から得られた NOAEL は、ラットでは 250 ppm(約 18 mg/kg bw/日)、マウスでは 100 ppm(約 15 mg/kg bw/日)であった(7 週間試験; NCI 1979)。しかし、これらの値は、前述の LOAEL より高いこと、またそのデータが、前述の 2 年間試験のものよりも信頼性が低いとみなされることから、推奨されない。

LOAEL 5.9 mg/kg bw/日 (103 週間経口投与/F344 ラット, NCI 1979)

市販の 2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物 - 吸入

2,4-TDA への吸入曝露を行った動物試験のデータは得られなかった。

市販の 2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物に反復吸入曝露した試験は存在するが、試験デザインは、現行のガイドライン B.8; OECD TG 412 に準拠していなかった。したがって、市販の 2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物の吸入による影響について、妥当性のあるデータは得られていない。予備試験的に行われた吸入毒性試験から、ラットへの全身影響に関する NOAEC として 9.5 mg/m^3 (約 1 mg/kg bw/day /日、亜慢性試験) という値が得られている。この用量では、ネコにおいては 2.07% のメトヘモグロビン血症が生じている。ネコはメトヘモグロビン血症に対する感受性が非常に高く、 41.6 mg/m^3 (約 4.5 mg/kg bw/day /日、亜慢性試験) の用量では、30% という重度のメトヘモグロビン血症が生じている。このようにネコにおいてはメトヘモグロビンの形成が見られたため、NOAEC は導出することができなかった (Kimmerle and Solmecke 1971)。気道への局所的影響を検討した試験は見あたらなかった。

NOAEC_{sys} 9.5 mg/m^3 (約 1 mg/kg bw/day) (28 日間吸入/Wistar ラット)

分類

経口曝露に関しては、2,4-TDA を用いた反復投与毒性試験のデータが、様々な曝露期間について、いくつか得られているが、吸入曝露に関しては、2,4-/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物を用いて行われた、ガイドライン非準拠の試験のデータがわずかに得られているだけである。2,4-TDA に関しては吸入曝露のデータが無く、2,4-/2,6-TDA に関しては経口投与のデータを欠いているため、純化合物および混合物の慢性毒性影響については、同じ分類の起案が採用されることが提言される。

経口

2,4-TDA についても 2,4-/2,6-TDA 混合物についても、ヒトにおける反復投与毒性データは得られていない。

分類の起案の根拠は、F344 ラットを用いて適切に実施された発がん性試験 (NCI, 1979, Cardy, 1979) のデータ、ならびに、許容され得る制限の下にガイドライン試験と同等に実施された、Sprague-Dawley ラット、ChP-CD ラットおよび Wistar ラットを用いた中・長期試験 (Ito et al. 1969, Stula and Aftosmis 1976) から得られたデータである。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

2,4-TDA をラットに長期間投与した場合に雌雄両方に見られた重要な有害影響は、肝毒性と慢性腎不全であり、これらは 5.9 mg/kg bw/日以上での用量で示された、生残率の顕著な低下につながっている。肝毒性影響は、脂肪変性、胆管線維症および肝硬変(36 週間試験での 45 mg/kg bw/日以上; Ito 1969)、ならびに、肝細胞の巣状壊死から重度の瀰漫性の毒性学的変性病変に至る変化(長期試験での 5.9 mg/kg bw/日以上; Cardy 1979, NCI 1979)として現れた。5.9 mg/kg bw/日以上で観察された腎毒性の特徴は、糸球体の萎縮や硬化を伴う慢性糸球体腎症、間質性炎症および線維症、ならびに尿細管の変性および萎縮であった。慢性的な腎疾患に付随して、二次的に上皮小体機能亢進が生じ、骨吸収や上皮小体の過形成といった症状が顕著に出現した。

さらに、ラットを用いた混餌投与試験のデータからは、2,4-TDA が用量依存性に、精巣に毒性影響を及ぼすことが示された。精巣の萎縮が、28 mg/kg bw/日の用量で観察された(15 ヶ月間試験; Stula and Aftosmis 1976)。15 mg/kg bw/日の用量(10 週間混餌投与試験)では、精子形成の阻害やセルトリ細胞の損傷、副生殖腺の萎縮、血清テストステロン濃度の低下とそれに呼応した黄体形成ホルモン濃度の上昇が、精巣毒性に関連して出現した(Thyssen et al. 1985a, 1985b, Varma et al. 1988)。約 5 mg/kg bw/日の用量の 2,4-TDA でも、精子形成の抑制を示す精子貯蔵量の減少が認められた(10 週間混餌投与試験; Thyssen et al. 1985b)。

死亡ならびに肝臓、腎臓および雄の性腺における変性/壊死性病変といった毒性影響は、R48(Annex VI of 67/548/EEC)の基づく、深刻な健康被害とみなされる。これらの影響は、R48 のガイドライン値、すなわち、50 mg/kg bw/日(げっ歯類における 90 日間経口毒性試験)よりも低い用量で生じている。また、これらの影響は、5.9 mg/kg bw/日以上で用量依存的に(肝臓や腎臓への影響および死亡)、もしくは 5 mg/kg bw/日の用量で(雄の生殖器系)観察された。さらに、それら観察された影響に関しては、頻度、強度および重症度の点において、明確な用量依存関係が存在した。

指令 67/548/EEC の基準に基づき、2,4-TDA については、Xn、有害への分類、ならびに、R48/22(有害：飲み込んだ場合、長期曝露により健康への深刻な被害が及ぶ恐れ有り)の表記が提唱される。

吸入

2,4-TDA や 2,4-/2,6-TDA 異性体混合物については、長期吸入曝露により、全身的な毒性影響が生じることが懸念される。しかし、既存の限られたデータベースからは、長期反復吸入による影響に関して、分類を要するか否かについての確固とした結論を導くことはできない。

経皮

2,4-TDA に関しても 2,4-/2,6-TDA 混合物に関しても、データは得られていない。

4.1.2.7 変異原性

In vitro 試験

細菌の遺伝子突然変異

細菌を用いた遺伝毒性試験では、何件かで、S-9 mix 存在下において、明確な陽性が示されている。

2,4-トルエンジアミン(2,4-TDA)は、S-9 mix を用いた場合、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)の TA 98、TA 100、TA 1537 および TA 1538 株において、20 µg/plate 以上の用量で、遺伝子突然変異を誘発した(JETOC, 1996; George and Westmoreland, 1991; Shahin et al., 1985; Haworth et al., 1983; Shahin et al., 1980; Green et al, 1979)。すべての試験において、強い用量依存性が見られ、細胞毒性は認められなかった。それらの菌株では、S-9 mix を用いなかった場合、10000 µg/plate の用量まで、陰性結果が得られた。2,4-TDA は、S-9 mix を用いたマイクロ懸濁バイオアッセイでも、TA 98 株において、陽性を示した。

Cunningham and Matthews(1990)は、代謝活性系存在下での細菌を用いた変異原性試験において 2,4-TDA が変異原性陽性を示したことに関し、細菌のアセチルトランスフェラーゼの関与について言及している。彼らは、ネズミチフス菌の TA 98/1,8-DNP6 株(アセチルトランスフェラーゼ欠損株)、TA 98(アセチルトランスフェラーゼ正常株)およびアセチルトランスフェラーゼを過剰に生産する TA 98(pYG219)株を用い、試験を行った。TA 98 株と比較して、TA98/1,8-DNP6 では変異原性が約 90%減少し、一方、TA 98(pYG219)株では変異原性が著しく上昇した。著者は、2,4-TDA が S-9 mix のチトクロム P450 により N-水酸化を受け、ヒドロキシルアミノ中間体が生成され、それは、さらに細菌のアセチルトランスフェラーゼにより活性化され、4-アセトキシアミノ-2-アミノトルエンと考えられる、極度に反応性の高い中間体を形成する、と結論付けている。

S-9 mix を用いなかった場合の陰性結果は、ネズミチフス菌 TA 1535 株では 10000 µg/plate まで(JETOC, 1996; Haworth et al., 1983)、大腸菌(*Escherichia coli*) WP2uvrA 株では 5000 µg/plate までの用量で(JETOC, 1996)、それぞれ得られている。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Table 1. In vitro tests: bacterial genotoxicity

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
Gene mutation, Salm. typh. TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, E.coli WP2uvrA	0.07 63-5000 µg/plate	0.07 63-5000 µg/plate	positive	no toxic effects	positive only with S-9 mix	JETOC, 1996
Gene mutation, Salm. typh. TA 98	100 - 3333 µg/plate	not done	positive	no toxic effects		George and Westmoreland, 1991
Gene mutation, Salm. typh. TA 97, TA 1537, TA 1538	50 - 500 µg/plate	not done	positive	no toxic effects		Shahin et al., 1985
Gene mutation, Salm. typh. TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537	10 - 10'000 µg/plate	10 - 10'000 µg/plate	positive	no toxic effects	positive only with S-9 mix	Haworth et al., 1983
Gene mutation, Salm. typh. TA 98, TA 100, TA 1538	5.0 -1000 µg/plate	5.0 - 1000 µg/plate	positive	no toxic effects	positive only with S-9 mix	Shahin et al., 1980
Gene mutations Salm. typh. TA 98; TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	500 - 5000 µg/plate	500 - 5000 µg/plate	positive	no toxic effects	positive only with S-9 mix	Green et al., 1979
Gene mutation, Salm. typh. TA 98	100 - 1666 µg/plate	not done	positive	no data		Cunningham and Matthews, 1990
Gene mutation, Salm. typh. TA 98, TA 100 (microsuspension bioassay)	10-500 µg/plate	10-500 µg/plate	positive	no data	positive only with S-9 mix	George et al., 2001

In vitro 試験

哺乳類細胞系

遺伝子突然変異試験

総じて、2,4-TDA は、哺乳類細胞を用いた tk 遺伝子座および hprt 遺伝子座に関する遺伝子突然変異試験において、陰性を示した。L5178Y マウスリンフォーマ細胞においては、S-9 mix 非存在下で、tk 遺伝子座について、弱い陽性影響が示されているが、この影響は、強い細胞毒性も伴っていた (Coppinger et al. 1984)。この試験では、2,4-TDA の変異原性について、tk 遺伝子座および hprt 遺伝子座の両方に関して、L5178Y マウスリンフォーマ細胞と CHO-AT3-3 を用い、検討が行われた (Coppinger et al. 1984)。どちらの試験系に置いても、陽性対照では、突然変異の頻度の増加が認められた。L5178Y 細胞の tk 遺伝子座において、S-9 mix の非存在下で、かすかな陽性反応が観察された。この陽性反応は、87.8~1000 µg/mL の用量範囲において用量依存性を示し、突然変異の頻度は、87.8 µg/mL での 1.3 倍から、1000 µg/mL での 4.1 倍の範囲であった。この遺伝毒性影響に伴い、強い細胞毒性が現れており、相対的な総生育率は(溶媒対照との比較で)、87.8 µg/mL では 47%であり、1000 µg/mL では9%にまで低下した。S-9 mix 存在下では、58.5~1000 µg/mL の範囲で、陰性であった。

CHO-AT3-2 細胞の tk 遺伝子座については、2,4-TDA は、S-9 mix の存在下および非存在下において、6000 µg/mL の用量まで陰性であった。hprt 遺伝子座については、2,4-TDA は、S-9 mix の存在下および非存在下において、L5178Y 細胞でも(1000 µg/mL まで)CHO-AT3-2 細胞でも(10000 µg/mL まで)、陰性を示した。

V79 細胞でも、hprt 遺伝子座について、S-9 mix の存在下および非存在下において、0.3~3.0 mmol/L(36.6~366.5 µg/mL)の用量範囲で、陰性結果が示されている (Fassina 1990)。陽性対照では、突然変異の頻度上昇が確認されている。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Table 2. In vitro tests: mammalian cell gene mutations

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
tk locus, L5178Y cells (mouse lymphoma assay)	58.5 - 1000 µg/ml	58.5 - 1000 µg/ml	positive	with and without S-9 mix strong effects from 87.8 µg/ml upward	4-h treatment; positive only without S-9 mix: marginal response	Coppinger et al., 1984
tk locus, CHO-AT3-2 cells	2000 - 6000 µg/ml	2000 - 6000 µg/ml	negative	with and without S-9 mix at high concentrations	4-h treatment	
hprt locus, L5178Y cells	250 - 1000 µg/ml	250 - 1000 µg/ml	negative	no toxic effects	4-h treatment	
hprt locus, CHO-AT3-2 cells	1000 - 10'000 µg/ml	1000 - 10'000 µg/ml	negative	with and without S-9 mix at high concentrations	4-h treatment	
hprt locus, V79 cells	0.3 - 3.0 mmol/l (36.6 - 366.5 µg/ml)	0.3 - 3.0 mmol/l (36.6 - 366.5 µg/ml)	negative	without S-9 mix at doses of 1.0 mmol/l and higher	1-h treatment	Fassina, 1990

染色体異常試験

哺乳類細胞での染色体異常試験では、S-9 mix の存在下および非存在下において、陽性であった。

Loveday et al.(1990)は、2,4-TDA が、CHO 細胞において、S-9 mix の存在下および非存在下で染色体異常を誘発したことを報告している。残念ながら、細胞毒性に関してのデータは示されておらず、染色体異常について、ギャップを含めた場合と除いた場合の区別も行わ

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

れていない。S-9 mix を用いた試行は 1 例だけで、1370 ないしは 4550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で 2 時間曝露した場合に、それぞれ 7%と 12%の異常頻度の上昇が認められた(12 時間後に標本作製。陰性対照では異常頻度は 1.0%)。S-9 無しでの試行は 3 例行われており、98.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量での 2 時間(20.5 時間後に標本作製)および 8 時間(10 時間後に標本作製)の処置で、最大異常頻度は 41.7%(陰性対照では 4.0%)であった。

CHO 細胞を用いた染色体異常試験で、2,4-TDA は、陽性を示している(Armstrong et al. 1992)。この試験は、S-9 mix 非存在下でのみ実施された。245.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量での 3 時間(10 時間後および 24 時間後に標本作製)処置により、染色体異常が誘発され、最大頻度は約 15%(陰性対照では 2.0~3.0%)であった。細胞毒性が、490.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で観察された。

Bean et al.(1992)は、2,4-TDA による CHO 細胞における S-9 mix 非存在下での染色体異常の誘発に関し、その頻度に及ぼす標本作製時間の影響を検討した。試験用量の 2.0 および 6.0 mmol/L(244.3 および 733.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)では、染色体異常の頻度増加が誘発された。3 時間曝露を行ったところ、17 時間後の作製標本に、最大の異常頻度が認められた(6.0 mmol/L では異常細胞が 70%、2.0 mmol/L では異常細胞が 12%、陰性対照における異常細胞の頻度は 3.4%)。

別の試験では、CHL 細胞における染色体異常が、0.78~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量範囲で、S-9 mix 非存在下においてのみ検討された(JETOC 1996)。高用量側の 13 および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、24 時間ないしは 48 時間の曝露により、強い陽性反応が、用量依存性に示された。最大異常頻度は、65%であった(陰性対照では 0.5%)。細胞毒性に関するデータは示されていない。

Table 3. In vitro tests: chromosomal aberrations

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
Chromosomal aberration, CHO cells	455 - 4550 µg/ml	13.7 - 4920 µg/ml	positive	no data	positive with and without S-9 mix	Loveday et al., 1990
Chromosomal aberration, CHO cells	not done	1.0 - 10 mmol/l (123 - 1227 µg/ml)	positive	at doses of 4 mmol/l and higher		Armstrong et al., 1992
Chromosomal aberration, CHO cells	not done	2.0 - 6.0 mmol/l (244 - 733.0 µg/ml)	positive	no data		Bean et al., 1992
Chromosomal aberration, CHL cells	not done	0.78 - 50 µg/ml	positive	no data		JETOC, 1996

姉妹染色分体交換 (SCE) 試験

2,4-TDA は、哺乳類細胞における SCE 誘発について、S-9 mix の存在下および非存在下で、陽性を示した。

Loveday et al.(1990)は、S-9 mix 存在下および非存在下での、CHO 細胞における SCE の誘発について報告している。S-9 mix 存在下では、468 から 4680 µg/mL までの全ての試験用量において、2 時間の処置(26 時間後に標本作製)により、陽性影響が観察され、最大 SCE 頻度は、陰性対照の 1.6 倍であった。S-9 mix 非存在下では、14.1~130 µg/mL の用量範囲で、26 時間の連続処置により、用量依存性に SCE 頻度が上昇した。最大 SCE 頻度は、最高試験用量の 130 µg/mL で観察され、陰性対照の値の 2.7 倍であった。細胞毒性影響に関するデータは、示されていない。

Table 4. In vitro tests: tests for induction of sister chromatid exchanges (SCE)

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
CHO cells	468 - 4680 µg/ml	4.68 - 130 µg/ml	positive	no data	positive with and without S-9	Loveday et al., 1990

不定期 DNA 合成試験(UDS 試験)

2,4-TDA は、肝細胞初代培養における UDS の誘発について、陽性を示した。

Selden et al.(1994)は、ラットの肝細胞における 2,4-TDA の UDS 誘発に関して、オートラジオグラフィ手法を用いて、0.0005～10 mmol/L(0.06～1222 µg/ml)の用量範囲で、検討を行った。結果に関する詳細なデータは示されていないが、0.01 mmol/L(1.2 µg/mL)が、陽性影響が観察された最低用量であると述べられている。この用量では、正味粒子数は 22.1 個であった。細胞毒性影響に関するデータは、示されていない。

ラットの初代培養肝細胞を、0.01 から 1.0 mmol/L(1.22～122.2 µg/mL)の用量の 2,4-TDA で 18 時間処置した試験では、0.01 および 0.1 mmol/L で、UDS 反応が陽性となった(Bermudez et al.; 1979)。オートラジオグラフィの手法により測定したところ、平均正味粒子数が、8.1 個(0.01 mmol/L)および 7.6 個(0.1 mmol/L)と、有意な上昇を示していた。試験における最高用量の 1.0 mmol/L では、陰性結果が得られた(平均正味粒子数 0.7 個)。溶媒対照の平均正味粒子数は、マイナス 3.2 個であった。ジメチルニトロソアミンと 2-アセチルアミノフルオレンが、陽性対照として用いられた。ジメチルニトロソアミンは、正味粒子数が 6.7 個と、有意な増加を誘発した。一方、2-アセチルアミノフルオレンは、1 µM の用量で、自動計数システムで定量するには過大な反応を誘発した。細胞毒性に関するデータは示されていない。

外科手術での廃棄物から調製したヒト肝細胞を用いた試験でも、陽性反応が示された(Butterworth et al., 1989)。UDS は、2 人のドナー由来の肝細胞を、0.1 および 1.0 mmol/L(12.2 および 122.2 µg/mL)の用量で 18 時間処置し、オートラジオグラフィ手法により検出した。正味核内粒子数の最高値は 11.3 で、一方、溶媒対照での値は-4.7 であった。細胞毒性に関するデータは示されていない。

S 期の後に新しく分離したラット精子細胞と一次精母細胞を懸濁し、0.01～1.0 mmol/L(1.22～122 µg/mL)の 2,4-TDA に 18 時間曝露して、UDS の計測を行ったところ、精子形成

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

のいずれの段階についても、結果は陰性であった(Working and Butterworth, 1984)。2,4-TDAを用いた試験は、S-9 mix 非存在下でのみ、実施された。著者は、この試験系においては、精母細胞や精子細胞には、直接作動性のアルキル化剤に曝露された場合にしか、UDS は生じないと述べている。遺伝毒性を発揮するのに代謝活性化を要する化合物の中には、精子細胞形成のいずれかの段階において、UDS を引き起こすものは無いとしている。しかし、S9 活性系の存在下で、UDS が誘発されている。すなわち、アフラトキシン B1 および 2-アミノフルオレンは、S-9 mix 非存在下では陰性であったが、S-9 mix 存在下では陽性を示した。

Table 5. In vitro tests: tests for induction of unscheduled DNA synthesis (UDS)

Test System	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
Primary rat hepatocytes	not applicable	0.0005 - 10 mmol/l (0.06 - 1222 µg/ml)	positive	no data	autoradiography procedure	Selden et al., 1994
Primary rat hepatocytes	not applicable	0.01 - 1.0 mmol/l (1.22 - 122.2 µg/ml)	positive	no data	autoradiography procedure	Bermudez et al., 1979
Human hepatocytes	not applicable	0.01 - 1.0 mmol/l (1.22 - 122.2 µg/ml)	positive	no data	autoradiography procedure	Butterworth et al., 1989
Rat spermatides & primary spermatocytes	not done	0.01 - 1.0 mmol/l (1.22 - 122.2 µg/ml)	negative	strong toxic effect at 1.0 mmol/l	autoradiography procedure	Working and Butterworth, 1984

DNA 鎖切断

2,4-TDA は、哺乳類細胞において、S-9 mix の存在下および非存在下で、DNA 鎖切断について、陽性を示した。

Nordenskjöld et al.(1984)は、アルカリ溶出法を用い、2,4-TDA がヒトの皮膚の繊維芽細胞

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

において DNA 鎖切断を誘発することを示した。繊維芽細胞は、S-9 mix 非存在下および別の活性系の存在下(フェノバルビタールまたは 3-メチルコラントレンで誘導したラットの肝マイクロソーム、アラキドン酸を追加した雄羊の精囊由来のマイクロソーム)で、100 µmol/L (12.2 µg/ml)の 2,4-TDA に、30 分間曝露された。雄羊の精囊由来のマイクロソームを用いた場合に最大の影響が現れ、DNA 鎖切断は、陰性対照と比較して、21 倍増加した。フェノバルビタールで誘導したラット肝マイクロソームの存在下では、弱い影響(3.7 倍の DNA 鎖切断)が得られ、3-メチルコラントレンで誘導したラット肝マイクロソームの存在下では、反応は陰性であった。S-9 mix 非存在下では、DNA 鎖切断の 2.3 倍の増加という、弱い影響が誘発された。細胞毒性に関するデータは示されていない。

Swenberg(1981)は、アルカリ溶出法を用い、S-9 mix 存在下で、V79 細胞における DNA 鎖切断の誘発を検討した。詳細なデータは示されていない。陽性反応が得られたのは、ラット肝 S-9 mix 存在下で、0.3~3.0 mmol/L(36.6~366.5 µg/mL)の範囲の用量で、2 ないしは 4 時間の処置を行った場合であった。細胞毒性に関するデータは示されていない。

Sina et al.(1983)は、やはりアルカリ溶出法を用い、ラットの初代培養肝細胞を、0.03~3.0 mmol/L(3.7~367 µg/mL)の用量の 2,4-TDA で 3 時間処置したが、DNA 鎖切断の増加は誘発されなかったことを報告している。細胞毒性については観察は行われなかった。

Table 6. In vitro tests: DNA strand breaks in mammalian cells

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
Alkaline elution technique; human skin fibroblasts	100 µmol/l (12.3 µg/ml)	100 µmol/l (12.3 µg/ml)	positive	no data	positive with and without S-9 mix	Nordenskjöld et al., 1984
Alkaline elution technique; V79 cells	0.3 - 3.0 mmol/l (36.6 - 367 µg/ml)	not done	positive	no data		Swenberg, 1981
Alkaline elution technique; primary rat hepatocytes	not applicable	0.03 - 3.0 mmol/l (3.7 - 367 µg/ml)	negative	no data		Sina et al., 1983

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

DNA 付加体

2,4-TDA は、S-9 mix の存在下および非存在下で、哺乳類細胞の DNA と、付加体を形成する能力を有する。

ラットの初代培養肝細胞を用い、¹⁴C 2,4-TDA と DNA との結合性について、30 から 300 mol/L (3.6~36.6 µg/mL) の用量範囲において、液体シンチレーション法により、検討が行われた (Furlong et al., 1987)。DNA 付加体は、時間依存的に、処置時間 24 時間まで、直線的に増加した。2,4-TDA の肝細胞 DNA への結合は、100 µmol/L まで基質濃度との正の相関を示し、それ以上ではプラトー状態となった。

子ウシ胸腺から精製した単鎖 DNA を 2,4-TDA とインキュベートしたところ、クロマトグラフィーによって、DNA 付加体が形成されたことが示された (Citro et al., 1993)。この試験は、S-9 mix 存在下でのみ実施された。様々な 2,4-TDA 濃度 (12~200 µg/mL) および様々な曝露期間 (12~60 時間) で実施され、影響が最大となったのは、150 µg/mL の 2,4-TDA で 20 時間の曝露を行った場合であった。

Table 7. In vitro tests: DNA adducts formation

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
Primary rat hepatocytes	not applicable	30 - 300 µmol/l (3.6 - 36.6 µg/ml)	positive	no data		Furlong et al., 1987
Single stranded calf thymus DNA	12 - 200 µg/mL	not done	positive	no data		Citro et al., 1993

Table 8. Overview on in vitro findings

<u>Negative effects</u>	<u>Inconclusive effects</u>	<u>Positive effects</u>
<u>Mutation tests in vitro</u>		
		Bacterial gene mutations with S-9 mix
Mammalian cell mutagenicity (hprt locus) with and without S-9 mix		
Mammalian cell mutagenicity (tk locus) with S-9 mix	Mammalian cell mutagenicity (tk locus) without S-9	
		chromosomal aberrations with and without S-9 mix
<u>Indicator tests in vitro</u>		
		SCE in mammalian cells with and without S-9 mix
		UDS with primary hepatocytes
		DNA strand breaks in mammalian cells with and without S-9 mix
		DNA adducts in mammalian cells with and without S-9 mix

In vivo 試験小核試験

全般的には、小核試験の結果は陰性であった。PVG ラットにおいては、弱い陽性影響がみられたが、それは、重度の急性毒性がみられた用量の場合に限られていた。

雄マウス(系統：BDF1)の末梢血中多染性赤血球における小核形成を検討した試験では、2,4-TDA が 30 から 240 mg/kg bw の範囲で単回腹腔内投与されたが、結果は陰性であった (Morita et al., 1997)。標本作製は、投与後、24、48 および 72 時間の時点で行われた。最高用量は、LD₅₀ の 80%に匹敵していた。局所的な細胞毒性や毒性徴候に関する情報は示されていない。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

George and Westmoreland(1991)は、雌雄のラット(系統：Fischer-344)の骨髄細胞における、*in vivo* 小核試験を実施した。50 から 150 mg/kg bw の用量範囲で単回経口投与を行い、結果が陰性であったことを報告している。標本作製は、投与後、24 および 48 時間の時点で行われた。最高用量の 150 mg/kg bw では、局所的な細胞毒性(多染性赤血球/正染性赤血球の比に関して)が誘発され、予備試験においては、この用量で 4 匹中 1 匹が死亡している。陽性対照としてシクロホスファミドが用いられ、5 および 10 mg/kg bw の用量で、小核の出現頻度が適切に上昇したことが報告されている。

別の *in vivo* 小核試験が、George and Westmoreland (1991) により、雄ラット(系統：PVG; Piebald Virol Glaxo 有色素近交系)を用いて行われており、骨髄における、小核出現頻度のわずかに有意な増加が報告されている。最高用量の 300 mg/kg bw で処置を行った場合に、24 時間後に、2 倍の頻度で小核が観察された。すなわち、小核を有した多染性赤血球は、対照では 0.17%であったのに対し、0.34%であった。150 および 225 mg/kg bw の用量では、結果は陰性であった。どの用量においても、細胞毒性影響は認められなかった。2 回目の標本作製時、すなわち 48 時間後では、全ての用量で、結果は陰性であった。一般毒性に関する詳細なデータは示されていない。ただし、300 mg/kg bw の投与を受けた被験動物は、その半数が、投与後 48 時間の標本作製時には死亡してしまっている。したがって、300 mg/kg bw での小核の弱い誘発については、毒性学的意義が小さい。陽性対照としてシクロホスファミドが用いられ、10 mg/kg bw の用量で、小核の出現頻度が適切に上昇したことが報告されている。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Table 9. In vivo tests: Micronucleus (MN) test

Test system	Doses	Expos. regimen	Sampl. times	Result	Local cytotox.	General toxicity	Remarks	Reference
BDF 1 mice, peripheral blood erythrocytes	30 - 240 mg/kg bw	1 x i.p.	24 h, 48 h, 72 h	negative	no data	240 mg/kg = 80% of LD ₅₀		Morita et al., 1997
Fischer 344 rats; bone marrow erythrocytes	50 - 150 mg/kg bw	1 x p.o.	24 h, 48 h	negative	at 150 mg/kg	pilot study: 1/4 animals dosed with 150 mg/kg died		George and Westmoreland, 1991
PVG rats; bone marrow erythrocytes	150 - 300 mg/kg bw	1 x p.o.	24 h, 48 h	positive	no effects	300 mg/kg = LD ₅₀	doubling of the MN frequency at 300 mg/kg bw only after 24-h treatment	George and Westmoreland, 1991

姉妹染色分体交換 (SCE)

2,4-TDA は、マウスの骨髄細胞における SCE 誘発について、弱い陽性を示した。

雄の Swiss マウスに、2,4-TDA を 9.0 ないしは 18 mg/kg bw に用量で単回腹腔内投与したところ、骨髄細胞に SCE が誘発された (Parodi et al., 1983)。影響は弱く、SCE の頻度の増加率は、9.0 mg/kg bw の場合に 1.5 倍、18 mg/kg bw の場合に 1.3 倍であった。標本作製は、24 時間の時点で行われた。毒性に関するデータは示されていない。

Table 10. In vivo tests: Tests for induction of sister chromatid exchanges (SCE) in mice

Test system	Doses	Expos. regimen	Sampl. times	Result	Local cytotox.	General toxicity	Remarks	Reference
Swiss mice, bone marrow cells	9.0 - 18 mg/kg bw	1 x i.p.	24 h	positive	strong toxicity at doses > 18 mg/kg		weak effect	Parodi et al., 1983

不定期 DNA 合成(UDS)の誘発

2,4-TDA は、ラットの肝臓における UDS の誘発に関して、陽性を示した。

Mirsalis et al.(1982)は、雄ラット(系統 : Fischer-344)を用い、単用量の 150 mg/kg bw で単回経口投与を行い、肝細胞において強い陽性が示されたことを報告している。投与後 2 時間における正味粒子数は 15.9 個/核で、12 時間後では 11.0 個/核であった(陰性対照ではそれぞれ-5.1 および-4.4 個/核)。毒性に関するデータは示されていない。

George and Westmoreland(1991)は、雄ラット(Fischer-344)に、150 ないしは 300 mg/kg bw を単回経口投与し、2 時間後(150 mg/kg bw)ないしは 16 時間後(150 および 300 mg/kg bw)に、肝臓での影響を検討した。150 mg/kg bw の場合、16 時間後の作製標本において、弱い陽性の結果が得られたが、300 mg/kg bw では、影響は認められなかった(平均正味粒子数は、陰性対照では-3.19 個であったのに対し、150 mg/kg bw では 1.86 個であった)。標本作製が 2 時間後の場合は、150 mg/kg bw の用量でも陰性であった。毒性に関するデータは示されていない。

Table 11. In vivo tests: Tests for induction of unscheduled DNA synthesis (UDS) in rats

Test system	Doses	Expos. regimen	Sampl. times	Result	Local cytotox.	General toxicity	Remarks	Reference
Fischer-344 rat liver	150 mg/kg bw	1 x p.o.	2 h, 12 h	positive	no data	no data	autoradiography	Mirsalis et al., 1982
Fischer-344 rat liver	150 - 300 mg/kg bw	1 x p.o.	2 h, 16 h	positive	no data	pilot study: 1/4 animals dosed with 150 mg/kg died	autoradiography	George and Westmoreland, 1991

げっ歯類の生殖細胞を用いた試験

2,4-TDA は、マウスを用いた優性致死試験および精子異常試験において、陰性を示した。

Soares and Lock(1980)によれば、2,4-TDA は、雄マウス(系統 : DBA/2J)に、40 mg/kg bw を連続 2 日間、経口もしくは腹腔内投与した優性致死試験において、陰性を示した。経口投与を受けた雄も、腹腔内投与を受けた雄も、投与後 48 時間後に、3 匹の雌 CD-1 マウスと交配させた。7 日後に、雌の入れ替えを行った。この交配の試行を、投与終了後、合計で 7 週間繰り返した。どちらの投与形態によっても、精子に形態学的異常は誘発されなかった。精子の検査は、投与後 8 週間まで実施した。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

C57Bl/6xC3H マウス(各用量群 10 匹ずつ)に、111 から 375 mg/kg bw の用量で、2,4-TDA を腹腔内投与した結果、マウスの精巣での DNA 合成に、用量依存性の低下が認められた (Greene et al. 1981)。被験物質投与の 3 時間後に、10 μ Ci の¹²⁵ヨードデオキシウリジンを腹腔内投与し、その 30 分後に精巣を摘出した。生理食塩水を陰性対照として用い、陽性対照群には、100 mg/kg bw のジメチルニトロソアミンが経口投与された。被験物質での試行における、毒性に関するデータは示されていない。これと並行して行われた試行では、2,4-TDA は、用量依存性の体温低下を誘発した。著者は、マウスの精巣における DNA 合成の低下は、体温の低下によっては完全には説明することはできない(体温自体が精巣における DNA 合成を低下させる可能性はあるが)と結論付けている。

この試験は、DNA 合成の抑制が、一般毒性の評価項目ではなく、どちらかと言えば細胞毒性に関する非特異的なパラメータであることから、付加的な情報とみなされる。

Table12. In vivo tests: Rodent germ cell tests with mice

Test system	Doses	Exposure regimen	Result	General toxicity	Reference
Testicular DNA synthesis	111, 167, 250, 375 mg/kg bw	1 x i.p.	positive	hypo-thermia	Greene et al., 1981
Dominant lethal test, DBA/2J mice	40 mg/kg bw	2 x p.o., treated on two consecutive days	negative	no data	Soares and Lock, 1980
		2 x i.p., treated on two consecutive days	negative	no data	
Sperm morphology test, DBA/2J mice	40 mg/kg bw	2 x p.o., treated on two consecutive days	negative	no data	Soares and Lock, 1980
		2 x i.p., treated on two consecutive days	negative	no data	

キイロショウジョウバエを用いた試験

2,4-TDA は、ショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験 (SLRL 試験) において、陽性を示した。

Blijleven (1977) は、雄のショウジョウバエ (系統 : Berlin K) を用いて伴性劣性致死試験を行い、陽性の結果を得ている。この試験では、5.9 もしくは 15.2 mmol/L (それぞれ 721 および 1857 μ g/mL) の 2,4-TDA が、3 日間混餌投与された。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Fahmy and Fahmy(1977)は、ショウジョウバエ(系統：Oregon-K)を用いて 2,4-TDA の伴性劣性致死試験を行い、陽性の結果を報告している。この試験では、頸微注射により、5.0～20 mmol/L(611～2443 µg/m)の用量が、雄の体腔に投与された。

Table 13. In vivo tests: tests with *Drosophila melanogaster*

Test system	Doses	Exposure regimen	Result	General toxicity	Reference
Sex-linked recessive lethal test	5.9 - 15.2 mmol/l (721 - 1857 µg/ml)	3 days; feeding of males	positive	no data	Blijleven, 1977
Sex-linked recessive lethal test	5.0 - 20 mmol/l; (611 - 2443 µg/ml)	1 x injection into the haemocoel of males	positive	no data	Fahmy and Fahmy, 1977

DNA 鎖切断

2,4-TDA は、いくつかのげっ歯類の組織を用いて DNA 鎖の切断の誘発について検討を行ったところ、陽性を示した。

マウスの様々な器官の細胞における DNA 鎖切断の誘発について、アルカリ溶出単細胞ゲル電気泳動法(コメットアッセイ)によって、検討が行われている(Sasaki et al. 1999; 1997)。

Sasaki et al.(1999)の試験では、雄マウス(系統：ddY)に、最大耐量である 60 mg/kg bw が投与された。単回投与により、胃、肝臓および腎臓の細胞において、DNA 損傷が、統計学的に有意に増加した。最も強い影響は、肝臓で見られた。大腸、膀胱、脳および骨髄では、陰性の結果が得られた。試料採取は、3、8 および 24 時間目に行われ、毒性影響に関するデータは示されていない。

Sasaki et al.(1997)の試験では、雄マウス(系統：CD-1)に、240 mg/kg bw が腹腔内投与された。3 および 24 時間後、肝臓、腎臓および肺の細胞において、陽性影響が確認された。肝臓の細胞では、最も強い陽性反応が認められた。脾臓や骨髄の細胞では、影響は認められなかった。毒性影響に関するデータは、示されていない。

雄の Wistar ラットの複数の器官における DNA 鎖切断について、コメットアッセイにより検討が行われている(Sekihashi et al., 2002)。130 mg/kg bw の単回強制経口投与により、核 DNA の移動度の統計学的に有意な上昇が、胃、大腸、腎臓および脳において認められた。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

最も強い影響は、胃において認められた。肝臓、膀胱、肺および骨髄では、影響は認められなかった。試験用量は、LD₅₀ 値の 0.5 倍に相当すると報告されている。

雄ラット(系統：Sprague-Dawley)の肝臓における DNA 鎖切断の誘発について、粘性解析手法、すなわち、DNA の粘性プロファイルを測定することにより、検討されている (Brambilla et al. 1985)。被験動物に、37 ないしは 147 mg/kg bw の用量を単回腹腔内投与し、2、4、12 および 24 時間後に試料採取した。いずれの用量でも、陽性影響が誘発された。高い方の用量は、LD₅₀ 値に相当していた。毒性に関するデータは、示されていない。

Table 14. In vivo tests: DNA strand breaks

Test system	Doses	Expos. regimen	Sampl. times	Result	General toxicity	Positive organs	Negative organs	Reference
Comet-assay on ddY mice	60 mg/kg bw	1 x p.o.	3 h, 8 h, 24 h	positive	no data	liver kidney stomach	lung bone marrow colon bladder brain	Sasaki et al., 1999
Comet-assay on CD-1 mice	240 mg/kg bw	1 x i.p.	3 h, 24 h	positive	no data	liver kidney lung	bone marrow spleen	Sasaki et al., 1997
Comet assay on Wistar rats	130 mg/kg bw	1 x p.o.	3h, 8 h, 24 h	positive	0.5 x LD50	stomach, colon, kidney, brain	liver, bladder, lung, bone marrow	Sekihashi et al., 2002
Viscometric technique, Sprague-Dawley rats	37 - 147 mg/kg bw	1 x i.p.	2 h, 4 h, 12 h, 24 h	positive	147 mg/kg = LD ₅₀	hepato-cytes		Brambilla et al., 1985

DNA 付加体

2,4-TDA は、ラットの様々な器官の DNA と、付加体を形成した。

³²P ポストラベル法(核酸分解酵素 P1 で増強)：

Delclos et al.(1996)は、10～180 ppm(1.2～22.1 mg/kg bw)を混餌投与された雌ラット(系

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

統：Fischer-344)の肝臓および乳腺において、時間および用量依存性の DNA 付加体形成を確認した。試料採取は、試験開始から 0.5、1、3 および 6 週間後に行われた。DNA 付加体の最大生成量は、相対付加量(RAL)として約 200×10^7 倍で、最高用量での 6 週間の曝露後に認められた。主要な DNA 付加体が 1 例と、それより少ない付加体が 2 例同定された。毒性に関するデータは、示されていない。

Wilson et al.(1996)は、雄ラット(系統：Fischer-344)に、0.5 から 250 mg/kg bw の範囲の用量で、単回腹腔内投与を行い、肝細胞における DNA との結合を検討した。試料採取は 24 時間後に行った。影響は、用量依存性に現れた。付加体の最高濃度は、DNA 1 g 当たり約 120 nmol で、試験における最高用量の 250 mg/kg bw で測定された。150 mg/kg bw の単回腹腔内投与での試行では、経時的な検討が行われた。付加体の濃度を、0.5~30 日の、様々な時点で測定した。付加体の濃度は、曝露後 24 時間に最高となった(DNA 1 g 当たり約 60 nmol)。毒性データは、示されていない。

Taningher et al.(1995)は、雄ラット(系統：Fischer-344)の肝細胞における、2,4-TDA の DNA 付加体誘発能を検討した。125 ないしは 250 mg/kg bw を単回腹腔内投与したところ、曝露 18 時間後に、用量依存性の陽性影響が観察された。オートラジオグラフィーで定量的に調べたところ、主要なスポットが 1 つと淡いスポットが 2 つ出現していた。毒性に関するデータは、示されていない。

La and Froines(1994)は、雌雄のラット(系統：Fischer-344)における DNA 付加体形成を検討し、発がんの標的器官(肝臓および乳腺)と、非標的器官(腎臓および肺)での付加体形成を比較した。その結果、器官特異的かつ用量依存性の影響が示された。付加体の持続性には、差異は認められなかった。相対付加量は、総ヌクレオチド量に対する付加が生じたヌクレオチドの割合で示された。5.0 および 50 mg/kg bw の単回腹腔内投与では、ラットの肝細胞における DNA 付加体の形成量は、用量依存的であることが示された。どちらの用量でも、18~24 時間後に最大量に達し、2 週間にわたり持続した。50 mg/kg bw を単回腹腔内投与された被験動物では、18 時間後の試料採取で、肝臓と乳腺に、3 種類の明確な DNA 付加体の形成が確認された。腎臓や肺では、1 種類だけが観察された。検討した器官の中では、DNA 付加体の形成が最も顕著であったのは肝臓(付加体 1: 17.5×10^7 RAL; 付加体 2: 2.12×10^7 RAL; 付加体 3: 1.05×10^7 RAL)で、それに続いたのは、乳腺(付加体 1: 1.8×10^7 RAL; 付加体 2: 0.3×10^7 RAL; 付加体 3: 0.15×10^7 RAL)であった。さらに、非標的器官の肺(付加体 1: 0.57×10^7 RAL)および腎臓(付加体 1: 0.37×10^7 RAL)が続いた。毒性に関するデータは、示されていない。

La and Froins(1992)は、それより以前にも、ラット(系統：Fische-344)に 2,4-TDA を単回腹腔内投与し、18 時間後に試料採取を行い、雄の肝臓、肺および腎臓における DNA 付加体

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

形成、雌の乳腺における DNA 付加体形成についての報告を行っている。肝細胞における DNA 付加体は、最低用量の 4.1 $\mu\text{mol/kg bw}$ (0.5 mg/kg bw) から 2046 $\mu\text{mol/kg bw}$ (250 mg/kg bw) の用量範囲で検出された。この影響は、用量依存性を示した。2046 $\mu\text{mol/kg bw}$ (250 mg/kg bw) の用量では、DNA 付加体は 4 つの器官全てで認められ、それぞれ主要なスポット 1 つとそれより弱いスポット 2 つが出現した。形成された付加体は、定性的にはどの器官のものも同等であったが、量的には差異が認められた。肝臓や乳腺では付加体の形成量が多く(それぞれ RAL で 29.2×10^7 および 4.2×10^7)、最大で、腎臓や肺での形成量(それぞれ RAL で 1.1×10^7 および 1.4×10^7) の 30 倍であった。小量な方の付加体の形成量は、主要な付加体の量の約 1/10 であった。

Delclos et al.(1996)は、雄ラット(系統：Fischer-344)に、40 ないしは 180 ppm(4.9 ないしは 22.1 mg/kg bw) の 2,4-TDA を、32 週間毎日混餌投与し、脾臓から分離した T リンパ球における DNA を検査したが、付加体は検出されなかった。

トリチウム化による DNA 付加体検出：

雄ラット(系統：Wistar)に、100 mg/kg bw のトリチウム化した 2,4-TDA (2,4-(^3H)-TDA) を単回腹腔内投与した試験では、肝細胞の DNA との相互作用は引き起こされなかったが、肝臓のタンパク質や肝細胞のリボソーム RNA との結合が誘発された(Aune et al.; 1979)。トリチウム化による DNA 付加体形成の検出限界は、ポストラベル法よりもはるかに劣る。

ヘモグロビン付加体

Wilson et al.(1996)は、ガスクロマトグラフィー/質量分析法を用い、雄ラット(系統：Fischer-344)に 2,4-TDA を単回腹腔内投与することにより、ヘモグロビン付加体形成が誘発されることを示した。ヘモグロビン付加体形成は、用量および時間に呼応して増加した。150 mg/kg bw を投与した場合に、24 時間後に付加体の量が最大(ヘモグロビン 1 g 当たり約 0.32 nmol)となった。投与用量とヘモグロビン付加体形成量との関連性を調べるため、被験動物の曝露は、0.5~250 mg/kg bw の用量範囲で行い、24 時間後に試料採取を行った。付加体濃度の最大値は、試験した最大用量の 250 mg/kg bw で認められ、その値は、ヘモグロビン 1 g 当たり約 0.36 nmol であった。毒性に関するデータは、示されていない。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Table 15. In vivo tests: DNA adducts in rats

Test system	Doses	Expos. regimen	Sampl. times	Result	Positive tested organs	General toxicity	Reference
³² P-post-labeling, Fischer-344 rats	10 - 180 ppm (1.2 - 22.1 mg/kg day)	feeding daily for 6 weeks	week: 0.5, 1, 3, 6	positive	liver mammary gland	no data	Delclos et al., 1996
³² P-post-labeling, Fischer-344 rats	0.5 - 250 mg/kg bw	1 x i.p.	0.5 - 30 days	positive	liver	no data	Wilson et al., 1996
³² P-post-labeling, Fischer-344 rats	125 - 250 mg/kg bw	1 x i.p.	18 h	positive	liver	no data	Taningher et al., 1995
³² P-post-labeling, Fischer-344 rats	5.0 - 50 mg/kg bw	1 x i.p.	0.5 - 14 days	positive	liver	no data	La and Froines, 1994
	50 mg/kg bw	1 x i.p.	18 h	positive	liver mammary gland kidney lung	no data	
³² P-post-labeling, Fischer-344 rats	4.1 - 2046 µmol/kg bw (0.5 - 250 mg/kg)	1 x i.p.	18 h	positive	liver mammary gland kidney lung	no data	La and Froines, 1992
³² P-post-labeling, Fischer-344 rats	40 - 180 ppm (4.9 - 22.1 mg/kg/day)	feeding daily for 32 weeks	week: 1, 4, 8, 20, 32	negative (spleen T lymph.)		no data	Delclos et al., 1996
Tritiated DNA-adducts; Wistar rats	100 mg/kg bw	1 x i.p.	4 h	negative	liver	no data	Aune et al., 1979
Hb adducts, Fischer-344 rats	0.5 - 250 mg/kg bw	1 x i.p.	0.5 - 30 days	positive		no data	Wilson et al., 1996

遺伝子導入マウス

2,4-TDA は、遺伝子導入マウスを用いた試験で陽性を示した。

Suter et al.(1996)は、遺伝子導入 C57BL/6 Big BlueTM マウスにおいて、2,4-TDA が肝臓の DNA に対して弱い遺伝毒性を示したことを報告している。雌雄のマウスを用いて、肝臓における lacI 遺伝子の突然変異誘発が調べられた。非遺伝子導入 C57BL/6 において最大耐量を求めた結果に基づき、被験動物には、80 mg/kg bw/日の用量が 10 日間経口投与された。ただし、5 回目と 6 回目の投与の間に、2 日間の非投与期間が設けられている。最後の投与から 10 日後と 28 日後に、試料採取を行った。28 日の発現期間後に、2,4-TDA の投与を受けた動物では、雌雄両方で、突然変異の自然発生率が 2 倍となった(雄では陰性対照で 4.32×10^{-5} であったのに対し 8.46×10^{-5} 、雌では 4.32×10^{-5} に対し 9.67×10^{-5})。発現期間が 10 日間の場合には、雌のみでわずかな反応が観察された(陰性対照で 5.15×10^{-5} であったのに対し 7.48×10^{-5})。投与の 10 日後では、肝細胞の増殖が誘発されている。

Hayward et al.(1995)は、Big Blue[®]遺伝子導入 B6C3F1 マウスを用いた試験において、肝臓での lacI 遺伝子の突然変異誘発率増加を報告している。雄マウスに、2,4-TDA が、1000 ppm(123 mg/kg bw)の用量で、30 ないしは 90 日間混餌投与された。30 日間の混餌投与では、影響は認められなかった。90 日間では、突然変異の頻度が上昇した(平均突然変異頻度が、対照群では 5.7×10^{-5} であったのに対し 12.1×10^{-5})。試験用量は、90 日間亜慢性試験における、最高無毒性用量に匹敵するものであった。

Table 16. In vivo tests: Transgenic mouse

Test system	Doses	Expos. regimen	Sampl. times	Result	Tested organ	General toxicity	Reference
Big Blue TM mouse	80 mg/kg bw/d	oral gavage (ten daily doses)	10 and 28 days after the last treatment	positive	liver	80 mg/kg = MTD	Suter et al., 1996
Big Blue [®] mouse	1000 ppm (123 mg/kg/d)	feeding for 30 and 90 days	on the day after feeding period	positive	liver	1000 ppm = highest non-toxic dose in a 90 day study	Hayward et al., 1995

Table 17. OVERVIEW ON IN VIVO FINDINGS

<u>Negative effects</u>	<u>Questionable effects</u>	<u>Positive effects</u>
<u>Mutation tests in vivo</u>		
Micronuclei in mice and rats (bone marrow; peripheral blood)	Micronuclei in rats at a highly toxic dose (bone marrow)	Gene mutations in transgenic mice (liver)
Dominant lethals in mice		Drosophila (SLRL test)
<u>Indicator tests in vivo</u>		
Sperm morphology in mice		SCE in mice (bone marrow)
		UDS in rats (liver)
		DNA strand-breaks in mice and rats (liver, kidney, lung, stomach)
		DNA adducts in rats (liver, mammary gland, kidney, lung)
		Reduction of testicular DNA-synthesis in mice

結論

2,4-トルエンジアミンは、遺伝毒性影響を、細菌(遺伝子突然変異)および哺乳類培養細胞(染色体異常、SCE、UDS、DNA 鎖切断、DNA 付加体形成)において誘発する。

全般的に、げっ歯類を用いた *in vivo* 小核試験では、骨髄においても末梢血においても陰性であった。1 系統のラットで弱い陽性影響が見られたが、それは急性毒性が強く現れた用量に限られていた。他の組織では、一般に、弱い遺伝毒性影響が認められた。例えば、骨髄細胞における SCE、遺伝子導入マウスの肝臓における遺伝子突然変異、ラットの肝臓における UDS、ならびに、肝臓、胃、大腸、肺、脳および腎臓における DNA 鎖切断が見られ、さらに肝臓、乳腺、腎臓および肺において、DNA 付加体の形成が認められた。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

2,4-TDA を投与してネズミの精巣における DNA 合成の抑制を検討した非標準的な試験からは、精巣に対する影響を示す結果は得られなかった (Greene et al. 1981)。並行して行われた試験では低体温が認められており、DNA 合成の減少は DNA の反応性の変化を特異的に示す影響ではなく、また、この陽性結果は、生殖細胞における変異原性を調べた他の *in vivo* 試験 (優性致死試験および精子の形態学的検査) によって支持されていない。そのため、これらのデータは、2,4-TDA をカテゴリー2 の変異原性物質として分類するためには、不十分であるとみなされる。しかし、優性致死試験および精子の形態学的検査は感受性が低いため、これらの試験系での結果から、生殖細胞における変異原性を除外するのは適切ではない。改訂技術指針書 (TGD) によれば、生殖細胞におけるさらなる変異原性試験は要求されない [結論 i (保留)]。体細胞については *in vitro* でも *in vivo* でも陽性所見が得られていることから、カテゴリー3、変異原性物質、R68 (不可逆的影響を生じる恐れ有り) に分類することが提唱される。

4.1.2.8 発がん性

2,4-TDA

動物データ:

2,4-TDA の発がん性については、様々な系統のラットやマウスを用い、経口投与により、多数の長期動物試験が実施されている。これらの試験は、2,4-TDA がラットやマウスに対して発がん性であることを示す、明確な証拠を提示している。しかし、これらの長期試験の多くは、現行のガイドライン (B.30、32、33、OECD TG 451、452、453 の発がん性もしくは慢性毒性影響に関する試験のもの) に、試験デザインが (完全には) 準拠していない。試験の多くでは、対象としたパラメータが限られており、生化学的パラメータや血液学的パラメータが検討されていない。試験手順や結果の報告内容は、概ね、規制に係る現行の試験プロトコルに準じて行われた試験のものと同様であった。

2,4-TDA を経皮適用した場合の発がん性が、Swiss-Webster マウスを用いた 1 件の試験で検討されている。被験動物群の規模が小さく、投与が単回しか行われていないなど、試験デザインが限定的であるため、マウスの皮膚に塗布を行ったこの試験からは、確固とした結論を導くことはできなかった。

2,4-TDA の吸入曝露による発がん性については、動物における試験の情報は得られていない。

- 経口

強制経口投与試験

30 日間投与・9 ヶ月間経過観察試験(ラット)

45 日齢の雌の Sprague-Dawley ラット 22 匹に、100 mg/kg bw の 2,4-TDA (業務用等級の純度)を、30 日間にわたり 10 回胃内投与した。試験は、さらに設けられた 9 ヶ月間の観察期間後に終了した。血液学のおよび臨床生化学的パラメータについてのデータは、示されていない。乳腺組織だけが、組織検査に供された。

乳腺の組織検査では、繊維腺腫や線維肉腫が認められた。アセトン/コーン油を投与された 20 匹の対照ラットでは、乳腺腫瘍を生じたものは見られず、被験物質を投与された雌では、23%が乳腺腫瘍を有していた (Stula Aftosmis 1976)。

- 混餌投与試験

36 週間試験(ラット)

2,4-TDA を投与されたラットの肝臓におけるがんの発生を検討するため、12 匹ずつの雄の Wistar ラット 2 群を、600 ないしは 1000 ppm (約 45 ないしは 75 mg/kg bw/日) の 2,4-TDA (業務用等級の純度)を含む飼料で、30~36 週間飼育した。第 3 群(雄 6 匹)を対照とし、基礎飼料を与えた。この長期混餌投与試験は、発がん性や慢性毒性影響に関する現行のガイドラインによる試験デザインに、完全には準拠していない(投与方法、1 用量当たりの動物数など)ため、この試験の信頼性には制限がある。この試験では、限られたパラメータしか対象にされていない。発がん性試験であり、臨床生化学的および血液学的パラメータは検討されていない。しかし、試験プロトコルや結果の報告内容は、規制に係る現行の試験プロトコルに準じて行われた試験のものと同様であった。この試験でみられた主要な所見は、F344 ラットを用いて適切に行われた発がん性試験で得られたデータと、良い整合性を示した (NCI, 1979, Cardy, 1979)。2,4-TDA の非腫瘍性影響に関する詳細情報は、4.1.2.6 項に記載している。

2,4-TDA の 36 週間にわたる経口投与により、雄の Wistar ラットの肝臓に、腫瘍の発生が見られた。600 ppm (約 45 mg/kg bw/日) の以上の用量を投与された雄 Wistar ラットで肝臓がんが認められ、浸潤と転移も見られたが、対照群ではそうした所見は見られなかった。肝細胞がんは、高度に分化したもの、分化度が低いもの、それから未分化のものと、様々であった。肝臓の鏡検により、両用量において、さらに以下の所見も認められた。すなわ

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

ち、門脈周辺領域における卵形細胞の浸潤、肝実質細胞の脂肪変性、胆管の増殖、肝硬変、結節性過形成、および胆管線維症である。1000 ppm(約 75 mg/kg bw/日)群では、100% (9/9 匹)のラットにおいて、多数の結節性過形成領域や肝硬変を伴う肝臓がんが認められ、また、67% (6/9 匹)においては、リンパ節、腹膜、肺および精巣上体への複数の転移が認められた。600 ppm(約 45 mg/kg bw/日)群では、リンパ節や腹膜への転移を伴う肝臓がんが、64% (7/11 匹)のラットに認められた。リンパ節、腹膜、精巣上体、および肺における転移領域では、組織学的に同様な肝細胞がんが見られ、大型の不規則な核や多数の有糸分裂像を伴っていた。ラットの肝臓がんの発生率は、600 ppm(約 45 mg/kg bw/日)投与群よりも1000 ppm(約 75 mg/kg bw/日)投与群の方が高かった。結節性過形成の領域の数も、やはり600 ppmよりも1000 ppmにおいて多かった。2,4-TDA を投与された被験動物では、肝臓以外の器官では、一次腫瘍は認められなかった。

要約すると、2,4-TDA は、雄の Wistar ラットにおいて、600 ppm(約 45 mg/kg bw/日)以上の用量で、肝細胞がんを引き起こした(Ito et al.1969)。

15 ヶ月試験(ラット)

クロロトルエンジアミン混合物の長期毒性を評価する試験において、2,4-TDA が陽性対照として用いられている。雌雄 36 匹ずつの ChP-CD ラットに、2,4-TDA(業務用等級の純度)を 1000 ppm(約 75 mg/kg bw/日)含む餌が 2 週間投与され、500 ppm(約 38 mg/kg bw)含む餌が 5.5 ヶ月間、さらに、250 ppm(約 19 mg/kg bw)含む餌が 9 ヶ月間投与された。1 日当たりの平均摂取量は、367 ppm(約 28 mg/kg bw)と算出された。対照群は、非投与の雄 12 匹と雌 10 匹で構成されていた。この長期経口毒性試験は、現行のガイドラインの試験デザインに準拠していない(投与計画、1 用量当たりの被験動物数、対照として選択されたパラメータなどの点において)。試験手順や結果の報告内容は、規制に係る現行の試験プロトコルに準じて行われた試験のものと同等であった。

1000→500→250 ppm の 2,4-TDA を最長 15 ヶ月間ラットに混餌投与したことにより、雌雄両方で、肝臓や乳腺腫瘍の発生が有意に増加し、雄では肺腫瘍(主に腺腫)の有意な増加も認められた。肝臓の腫瘍は、雌では、ほとんどが腫瘍性結節であった。一方、雄では、中等度から高度に分化した肝細胞がんであった。乳腺腫瘍は、線維腺腫であった。2,4-TDA の慢性経口投与により、雌雄両方において、死亡率の上昇、体重増加量の著明な減少、軽度の貧血と白血球増多症、血清 ALP、GPT およびビリルビンの上昇が引き起こされた。これらの所見は、肝臓における組織病理学的な所見、すなわち、肝細胞壊死、嚢胞性胆管、胆管炎、胆管線維症、髄外造血およびヘモジデリン沈着といった所見と整合していた。雌雄両方において、重度の脾臓萎縮が見られた。2,4-TDA の非腫瘍性影響に関する詳細情報は、4.1.2.6 項に記載している(Stula and Aftosmis 1976)。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

長期試験(ラットおよびマウス)

2,4-TDA の発がん性に関する生物試験が、F344 ラットや B6C3F1 マウスへの混餌投与により実施されている。各群雌雄 50 匹ずつの F344 ラットに、2,4-TDA(純度 99.9%)が、まず、125 ないしは 250 ppm の濃度(約 9 ないしは 18 mg/kg bw/日)で、40 週間混餌投与された。平均体重増加量が過剰に抑制されたため、その後、用量を、50 および 100 ppm(約 3.7 および 7.4 mg/kg bw/日)に減らした。1 日当たりの平均摂取量は、5.9 および 13 mg/kg bw/日と算出された。50 ppm での投与は 63 週間続けられ、生残ラットは屠殺した。100 ppm 群の生残ラットは、39 週目(雄) および 44 週目(雌)の終わりに切迫屠殺した。同時対照群は、雌雄 20 匹ずつの非投与ラットで構成されていた。この慢性毒性/発がん併合混餌投与試験は、現行のガイドライン B.33、OECD TG 453 の試験デザインに、(完全には)準拠していなかった。例えば、2 用量しか設けられていない、血液学的検査が行われていない、尿検査や臨床生化学的検査が行われていないなどである(特に血液学的検査については、試験期間中、被験物質投与群の動物で健康悪化を示す観察結果が得られていたにも関わらず、そうした動物に対して血球分画百分率の検査も行われていない)。全体としては、試験手順や結果の報告内容は、規制に係る現行の試験プロトコルに準じて行われた試験のものと同等であった。

ラット

死亡率は、雄でも雌でも用量依存的に上昇した。両用量において、雄も雌も、対照群と比べ、生存期間が短縮していた。非投与群の雌雄のラットでは、平均体重が、対応する対照群のラットより、用量依存的に減少していた。F344 ラットを用いたこの発がん性試験における、2,4-TDA による非腫瘍性所見としては、肝毒性、早期の慢性腎疾患発生が見られ、後者は、投与を受けた動物における顕著な生残率低下の要因となっていた。腎疾患に呼応して、低用量および高用量群の雄では、二次的な上皮小体機能亢進症の発生率が上昇していた。2,4-TDA の非腫瘍性影響に関する詳細情報は、4.1.2.6 項に記載している。

F344 ラットに 2,4-TDA を 79 週間混餌投与することにより、雌雄両方において、肝臓に良性および悪性腫瘍が発生し、肝臓病変が高頻度で発生した。これらの病変は、主として限局性ないしは広範囲にわたる細胞変性で構成されていた。これらの病変の多くでは、核異型が認められ、いくつかにおいては、細胞変性から腫瘍への移行状態の様な領域も認められた。肝腫瘍が見つかったほぼ全例において、細胞変性巣も認められた。これらの病変の重症度および細胞や核の異型度は、高用量群の雌(42/49 匹、86%)で最も高かった。肝細胞がんや腫瘍性結節の発生は、雄において(P = 0.014)も雌において(P = 0.008)も、用量依存性であった。対照群と被験物質投与群とで腫瘍の発生率を直接的に比較すると、高用量群の雄では、P 値が 0.026 で発生率の上昇が見られている。発生率は、対照群では 0/20 匹

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

(0%)、低用量群では 5/49 匹(10%)、高用量群では 10/50 匹(20%)であった。雌においては、対照群では 0/20 匹(0%)、低用量群では 0/50 匹(0%)、高用量群では 6/49 匹(12%)であった。肝腫瘍(良性および悪性)の発生率は、投与群の雄で、有意に上昇していた。雌では、傾向検定でのみ、有意性が示された。増殖性病変の発生率上昇が認められており、これらの病変は、おそらく被験物質投与による肝臓がんの発生に関連していると考えられる。雌雄両方における肝細胞腫瘍発生率の有意な上昇は、投与群における肝臓の非腫瘍性病変の出現率が高いことにより支持されている。

さらに、2,4-TDA は雌において、乳腺腫瘍の統計学的に有意な発生率増加を引き起こした。雌ラットにおいて、乳腺のがんおよび線維腺腫は、用量依存性に発生し(P = 0.002)、高用量群では対照群との直接的な比較で有意に高率であった(P = 0.001)。発生率は、対照群では 1/20 匹(5%)、低用量群では 38/50 匹(75%)、高用量群では 42/50 匹(84%)であった。乳腺腫瘍に転移は見られなかった。雄ラットでは、皮下組織の線維腫が用量依存性に(P = 0.004)に発生し、高用量群では対照群との直接的な比較で有意に高率であった(P < 0.020)。発生率は、対照群では 0/20 匹(0%)、低用量群では 15/30 匹、高用量群では 19/50 匹であった。また、肺の腫瘍、がんおよび腺腫の発生率も、雌雄両方で上昇していた(統計学的に有意ではない)。肺腫瘍を全て合わせた発生率は、被験物質投与群において、非投与対照群よりも高かった(雄：対照群で 0/20 匹、低用量群で 5/50 匹、高用量群で 5/50 匹；雌：対照群で 1/20 匹、低用量群で 4/50 匹、高用量群で 3/50 匹)。

総括的に言うと、2,4-TDA は、F344 ラットに対し、明らかに発がん性を示し、雌雄両方において、肝臓の増殖性変化および肝細胞がんを誘発した。また、2,4-TDA は、雌において、良性および悪性乳腺腫瘍の発生率を増加させた。統計学的検討に基づくと、雄ラットの皮下組織における線維腫の発生は、2,4-TDA の投与に関連しているとみなされる(NCI 1979; Cardy 1979)。

マウス

各群雌雄 50 匹ずつの B6C3F1 マウスに、2,4-TDA(純度 99.9%)が、100 ないしは 200 ppm の濃度で(約 15 ないしは 30 mg/kg bw/日)、101 週間混餌投与された。同時対照群は、雌雄 20 匹ずつの非投与マウスで構成されていた。投与群の雌雄の平均体重は、対応する対照群の平均体重より低かった。この体重低下は、低用量群の雄マウスを除いて用量依存性であった。低用量群の雄では、対照群よりわずかに低値を示したのみであった。B6C3F1 マウスの雌では、23~50%の体重増加抑制が、用量依存性に認められた。死亡率については、雌雄のマウスのいずれにも、用量依存性の上昇は認められなかった。生存率は、被験物質投与群と対照群とで同等であった。2,4-TDA の非腫瘍性影響に関する詳細情報は、4.1.2.6 項に記載している。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

B6C3F1 マウスの雌では、肝細胞がんの発生が認められ、発生率は用量依存性に (P = 0.002) 上昇し、直接的な比較で、被験物質投与群の方が対照群よりも有意に高率であった (P < 0.007)。発生率は、対照群では 0/19 匹 (0%)、低用量群では 13/47 匹 (28%)、高用量群では 18/46 匹 (39%) であった。雄では、肝細胞がんが、対照群で 5/20 匹 (25%) に、低用量群で 17/50 匹 (34%) に、高用量群で 13/49 匹 (27%) に認められた。がんは、高度に分化したのものから分化度が低いものまで多岐にわたっていた。過形成ならびに結節性過形成は、投与を受けた雌雄で発生していたが、対応する対照群では認められなかった。肝臓に腫瘍を有していたマウスの数を、Table 4.1.2.8 A に示した。

Table 4.1.2.8 A: Number of mice with neoplastic lesions of the liver

Sex	Dose	Hyperplasia	Hyperplastic nodules	Carcinomas	Hepatic neoplasms
Males	0	0/20	0/20	5/20	5/20 (25%)
	low dose	4/50	5/50	17/50	22/50 (42%)
	high dose	26/48	3/48	14/48	17/48 (33%)
Females	0	0/19	0/19	0/19	0/19 (0%)
	low dose	18/46	8/46	13/46	21/46 (48%)
	high dose	5/44	14/44	18/44	32/44 (64%)

リンパ腫が、低用量群の雌で、有意な (P < 0.001) 発生率で認められた。発生率は、対照群で 2/19 匹 (0%)、低用量群で 29/47 匹 (62%)、高用量群で 11/46 (24%) であった。雄マウスでは、有意な発生は認められなかった。雌雄のマウスで、造血細胞系の腫瘍 (リンパ節の血管腫や血管肉腫を除く) が認められた。雄における発生率は、対照群で 2/20 匹 (4%)、低用量群で 15/50 匹 (30%)、高用量群で 8/49 匹 (16%) であった。雌における発生率は、対照群で 2/19 匹 (4%)、低用量群で 29/47 匹 (62%)、高用量群で 11/46 匹 (24%) であった。被験物質投与群の雄では、肺や脈管系の腫瘍の発生率が、わずかに増加していた。肺がんは、高度に分化した乳頭腺がん、または分化度の低いがんであった。雄マウスにおける肺がんの発生率は、対照群で 0/20 匹 (0%)、低用量群で 9/50 匹 (18%)、高用量群で 6/49 匹 (12%) であった。

総括的に言うと、2,4-TDA は、雌マウスに対して明らかに発がん性を示し、肝臓の過形成、過形成結節および肝細胞がんを誘発した。肺や脈管系の腫瘍が、雄マウスでわずかに増加し、造血細胞系の腫瘍が、雌雄のマウスでわずかに増加した (NCI 1979; Reuber 1979)。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Sontag (1981) は、13 種類の置換ベンゼンジアミン化合物 (SBD) について実施された、発がん試験の要約を報告している。これらの試験の中には、2,4-TDA を用いて実施されたものも含まれている。NCI による試験 (NCI 1979) の結果を用い、変異原性試験、染色体損傷試験および細胞形質転換試験の結果との比較検討が行われている。遺伝毒性影響に関する試験では、全ての SBD が、少なくとも 1 つの試験系において、陽性を示した。2,4-TDA については、遺伝子突然変異試験 (細菌を用いた遺伝毒性試験)、ショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験 (SLRL 試験)、およびハムスターの胚細胞の形質転換試験において、陽性結果が得られている。また、ラットやマウスにおける SBD の発がん性の検討で得られた腫瘍発生率に関するデータや、F344 ラットや B6C3F1 マウスにおける対照発生率データについても、比較のため、記載されている。対照データは、NCI で行われた生物試験の結果を数年にわたって蓄積して得られたものである。ラットのデータは、雄 1795 匹、雌 1754 匹に基づいており、マウスのデータは、雄 2543 匹、雌 2522 匹に基づいている。2,4-TDA は、ラットとマウスの両方において、統計学的に有意な発生率で、腫瘍を引き起こしている。ラットやマウスにおける、2,4-TDA による腫瘍発生率の詳細データ (NCI による試験) および背景対照発生率データについて、その概要を Table 4.1.2.8 B および Table 4.1.2.8 C に示した。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

Table 4.1.2.8 B: Number of rats with neoplasms

Sex	Control	High	Low	Historical control
Urinary bladder				
Male	-	-	-	2 (0.1%)
Female	0/20 (0.0%)	1/43 (2.3%)	0/43 (0.0%)	4 (0.2%)
Kidney				
Male	0/20 (0.0%)	0/50 (0.0%)	1/50 (2.0%)	4 (0.2%)
Female	-	-	-	3 (0.2%)
Liver				
Male	0/20 (0.0%)	10/50 (20%)	5/49 (10.2%)	31 (1.7%)
Female	0/20 (0.0%)	6/49 (12.2%)	0/50 (0.0%)	55 (3.1%)
Mammary gland				
Male	-	-	-	24 (1.3%)
Female	1/20 (5.0%)	42/50 (84.0%)	38/50 (76.0%)	300 (17.1%)
Thyroid gland				
Male	1/20 (5.0%)	1/47 (2.1%)	8/44 (2.1%)	129 (7.2%)
Female	0/20 (0.0%)	1/48 (2.1%)	2/49 (4.1%)	117 (6.7%)
Skin and associated glands				
Male	0/20 (0.0%)	0/50 (0.0%)	2/50 (4.0%)	29 (1.6%)
Female	-	-	-	16 (0.9%)

Table 4.1.2.8 C: Number of mice with neoplasms

Sex	Control	High	Low	Historical control
Liver				
Male	5/20 (25.0%)	13/49 (26.5%)	17/50 (34.0%)	55 (21.7%)
Female	0/19 (0.0%)	18/46 (39.1%)	13/47 (27.7%)	98 (3.9%)
Thyroid gland				
Male	-	-	-	23 (0.9%)
Female	0/17 (0.0%)	0/44 (0.0%)	3/44 (6.8%)	36 (1.4%)

2,4-TDA に関しては、肝臓腫瘍の発生率が、雄では両用量群において有意に上昇(背景対照群で 1.7%であったのに対し、22%および 10.2%)し、雌では高用量群においてのみ、有意に

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

上昇(背景対照群で 3.1%であったのに対し 12.2%)した。乳腺腫瘍は、雌ラットにおいて、背景対照群では 17.1%に見られたのに対し、被験物質投与群では 80%を超えるラットに認められた。雌マウスでも、肝臓腫瘍の発生率の有意な上昇が認められている(背景対照群で 3.9%であったのに対し、39.1%および 27.7%)。

- 吸入

データは得られていない。

- 経皮

2 年間試験(マウス)

2,4-TDA を反復局所適用した際の毒性や上皮腫瘍の誘発性を検討するために、マウスの皮膚への 2 年間の塗布試験が行われている。雌雄の Swiss-Webster マウス 28 匹に、2,4-TDA (業務用等級の純度)の 6%溶液 0.05 mL が、1 週間に 1 度(3 mg/匹/週、約 75 mg/kg bw/週)、2 年間にわたって、剃毛した背中の中肩甲骨間の領域に適用された。同様に、別の様々な群に対して、様々な濃度で 2,4-TDA を含む毛髪染料混合液が適用された。適用は、毒性の現れ方によって、様々な時点で中断された。また、何も適用されない対照群と、アセトン媒体とした 9,10-ジメチルベンゼンアントラセンを適用された陽性対照群も設けられた。血液学および臨床生化学的パラメータに関する情報は、示されていない。限られた器官や組織についてのみ、組織病理学的検査が実施されている。皮膚塗布法によるこの試験は、被験動物群の規模が小さい、および 1 用量の設定で行われているという点で、現行のガイドラインによる試験デザインに準拠していない。

2,4-TDA の適用を受けたマウスで多く見られた腫瘍は、一次性の肺腺腫および腺がんであった(雄では対照群で 6/21 匹であったのに対し 17/21 匹、雌では対照群で 6/9 匹であったのに対し 3/9 匹)。皮膚の腫瘍は、非投与群を含め、ほとんどの群のマウスで認められ、発生率は群間で同等であった。2,4-TDA の皮膚適用により、マウスの皮膚に対しては毒性や発がん性は示されなかったが、肺腫瘍が高率で引き起こされた(Giles and Chung 1976)。

- 皮下投与

2 年間試験(ラット)

各群雌雄 30 匹ずつの Sprague-Dawley ラットを用い、皮下投与試験が実施されている。2,4-

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

TDA(業務用等級の純度)が、0、8.33 ないしは 25 mg/kg bw の用量で、週 1 回皮下注射により投与された。投与は、被験物質に関連した腫瘍が最初に現れるまで、最長 2 年間実施された。媒体(ピーナツ油)の投与を受ける対照群が設けられた他に、何も投与されない群、およびベンジジンの投与を受ける陽性対照群が設けられた。投与終了後、ラットは自然死するまで、もしくは切迫屠殺されるまで、飼育され続けた。2,4-TDA の非腫瘍性影響に関する詳細情報は、4.1.2.6 項に記載している。

生存率は、25 mg/kg bw 群の雄で対照群より生存期間が短かったのを除き、被験物質投与群と対照群とで同等であった。平均体重は、被験物質投与群の雌雄において、対応する対照群の値よりも、用量依存的に低かった。多くの器官および組織について鏡検が行われたが、肝臓以外には、投与に関連した病変は認められなかった。被験物質の投与を受けた動物の全てにおいて、肝細胞の巣状壊死が認められ、肝硬変を有する動物も見うけられた。肝細胞腫瘍は、1/120 匹に認められた。被験物質を投与された全てのラットの内、16%に、注射部位における悪性腫瘍が認められた。傾向検定で有意性が示されたのは、雄のみであった(Steinhoff and Dycka1981)。

実験動物における発がん性影響に関する他の試験

他にも、半接合体の Tg:AC マウスや p^{53def} マウスという 2 種類の遺伝子導入動物を用いて、試験が実施されている。第 1 の試験では、半接合 Tg:AC マウスの剃毛した皮膚に、2,4-TDA(300 mg/kg bw)が 24 週間適用された(媒体はエタノール:水の 1:1 溶液)。第 2 の試験では、2,4-TDA が 200 ppm の濃度で、 p^{53def} マウスに混餌投与された(Eastin et al, 1998)。雌雄 15 匹ずつが週 5 日の投与を受け、他に雌雄 15 匹ずつの対照群が設けられた。1 日 2 回観察が行われ、週 1 回、体重測定が行われた。全身的な剖検が、全ての被験物質投与群および対照群の動物について実施されたが、臓器重量は測定されなかった。約 15 の器官から得られた組織について、鏡検が実施された。

いずれの試験においても、2,4-TDA 投与群と対照群との間に、生存率の差異は認められなかった。終了時の体重は、Tg:AC マウスにおいては、2,4-TDA 投与群と対照群との間に、差異は見られなかった。 p^{53def} マウスでは、被験物質投与群の体重は、対照群と比べて低かった(雄で-25%、雌で-12%)。Tg:AC マウスでも、 p^{53def} マウスでも、統計学的に有意な腫瘍数増加は認められなかった。Tg:AC マウスを用いた試験では、対照群では皮膚腫瘍は全く検出されなかったが、2,4-TDA 投与群では、雄 1 匹と雌 2 匹に扁平上皮乳頭腫が、雄 2 匹に扁平上皮がんが認められた。2,4-TDA を混餌投与された p^{53def} マウスでは、雄 1 匹と雌 2 匹に悪性リンパ腫が認められたが、対照群の p^{53def} マウスには、腫瘍性反応は確認されなかった。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

いずれの試験においても、腫瘍性の反応は、同じ媒体を用いて調製した陽性対照物質 (TPA : 12-O-テトラデカノイルホルポール-13-アセタート) によるものよりも弱かった。ちなみに、TPA は、NIEHS による検証試験では、26 週間の投与終了時に、100%の発生率で皮膚乳頭腫を誘発している (Tennant et al., 2001)。2,4-TDA を投与された Tg:AC マウスで見られた皮膚腫瘍の発生率のわずかな増加は、有意なレベルには達していなかった。p^{53def} マウスにおける腫瘍性反応は、この試験では明確にすることはできなかった。

結論として、これらの試験は、2,4-TDA の作用機序をよりよく理解する上では有用ではない。これらの試験自体がいわゆる陰性試験であるのかは、同時陽性対照を置いた内部検証が為されていないため不明確であり、これらの試験モデルが、2,4-TDA による既知の発がん性を例証するのに適切であるかどうか不明である。

別の試験では、短期発がん性試験系を用いて、2,4-TDA の検討が行われている。この試験系では、結節性硬化症-2 (Tsc-2) 腫瘍抑制遺伝子の対立遺伝子の一方に変異が挿入された Eker ラットが用いられ、腎細胞がんの自然発生が起きやすくなっている (Morton et al., 2002)。1 歳齢の Eker ラットにおける、腎臓腫瘍の自然発生率は、100%とされている。この動物モデルは、ヒトの結節性硬化症の表現型特質を有しており、それぞれ 16 および 9 番染色体にある TSC2 ないしは TSC1 遺伝子に突然変異を有し、この変異は、神経学的疾患およびいくつかの器官 (脳、心臓、皮膚および腎臓) における様々な増殖性病変と関連している (レビュー: Lendvay and Marshall, 2003)。15 匹の雄 Eker ラットに、6.5 mg/kg bw/日の 2,4-TDA が、1 週間に 7 回、4 ヶ月間強制経口投与された。投与はラットが 10 週齢の時に始められた。対照群は、雄の Eker ラット 10 匹で、媒体 (0.01 M HCL) のみが与えられた。徹底した剖検が全ての動物について実施され、一連の組織が採取され、鏡検に供された。2,4-TDA を投与されたラットにおいて、腎毒性の徴候は認められなかったが、腎尿細管に、平均で 1.5 倍の過形成が認められた。2,4-TDA を投与されたラットでは、腎腺腫の平均数が増加しており、2 匹では腎細胞がんが 3 個見つかри、一方、同じ時点の対照群の Eker ラットにおいては、がんは全く検出されなかった。他の (腎臓以外の) 腫瘍は認められなかった。2,4-TDA の発がん性の標的臓器である肝臓には、このモデルにおいては、影響は見られなかった。

ニトロソアミンを投与された Eker ラットに生じた腎細胞がんの中には、TSC2 遺伝子の対立遺伝子の両方において、化学物質誘発性の突然変異を有するものが認められている (Satake et al., 1999)。このことが、ラットにおける腫瘍発生率の増加や潜伏期間の短縮を解釈するのに役立つかもしれない。2,4-TDA が腫瘍性の反応を促進させる機序に関するデータは得られていないため、Morton et al. の試験の解釈は不確定なままである。腎臓は、誘発性の遺伝子変異を有していない系統のラットでは、2,4-TDA の発がん性の標的臓器とは考えられない。ただし、TSC 腫瘍抑制遺伝子の機能が欠損しているヒトについては、2,4-

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

TDA に曝露された際の腎臓がん発生に対して、感受性が高くなる可能性を排除することはできない。

NTP による生物試験においては、2,4-TDA と 2,6-TDA との結果に整合性がみられておらず、その要因を明らかにするために、いくつかの試験が実施され、これら 2 種類の化合物が肝臓の細胞増殖に及ぼす影響が検討されている (Cunningham et al., 1990, 1991)。雄の F344 ラットに、0.01M HCl を媒体として、2,4-TDA (純度 99%超) が 12.5 ないしは 25 mg/kg bw/日の用量で、また、2,6-TDA (純度 99%超) が 25 ないしは 50 mg/kg bw/日の用量で、9 日間強制経口投与された。これらの用量は、前述の長期試験の初期用量の、125 および 250 ppm (2,4-TDA)、250 および 500 ppm (2,6-TDA) に相当する。媒体対照群には 0.01M HCl が投与され、陽性対照群にはコーン油を媒体とした四塩化炭素 (CCl₄) が 0.4 mL (ip) 投与された。投与開始の翌日、全てのラットの背中 of 皮下に、ブロモデオキシウリジン (BrdU、30 mg/mL) を入れた浸透圧ミニポンプを埋め込んだ。9 日後、ラットを屠殺し、肝臓右前葉の中央部の放射断面切片を固定し、パラフィン包埋し、新たに複製された細胞に取り込まれた BrdU を、免疫染色した。スライド標本の無作為に選んだ部位で、標識化されたおよび未標識の核を数え (1 スライドあたり肝細胞 1000 個超)、合計の (標識化+非標識化) 肝細胞数に対する標識化肝細胞数の割合を計算して、標識化指数 (LI) とした。9 日間の連続投与の後、体重に対する肝臓重量の割合は、2,4-TDA を 25 mg/kg bw/日投与した群で増加していた。50 mg/kg bw/日の 2,6-TDA を投与されたラットでは、体重に対する肝臓重量の割合が、軽度だが有意に上昇していた。媒体を投与されていた群の肝臓の平均 LI は 1.1%であったのに対し、CCl₄ を投与されていた群では 50%に上った。2,4-TDA の投与により、肝臓における細胞増殖が、用量依存性に増高した。2,4-TDA の投与を受けていた動物における平均 LI は、12.5 mg/kg bw/日群で 12.5%、25 mg/kg bw/日群で 20.4%であった。一方、2,6-TDA は、媒体対照群と比べても、細胞増殖の増高を引き起こさなかった。2,6-TDA の投与を受けていた動物では、両用量において、平均 LI は 0.7%であった。これらの結果から、2,4-TDA により誘発された細胞増殖の増加と肝臓がんの発生には、正の相関関係があることが示された。

遺伝子導入 Big Blue[®] B6C3F1 マウスを用いた別の試験では、2,4-TDA の 90 日間混餌投与により、肝臓において、*lacI* 遺伝子の突然変異頻度が上昇したことが報告されている。一方、2,6-TDA の投与では、突然変異頻度が上昇しなかったことが示されている (Cunningham and Matthews 1995)。

Taninger et al. (1995) は、雄の F344 ラットを用い、2,4-および 2,6-TDA が肝臓に前腫瘍性病巣を誘発する能力について、ジエチルニトロソアミン (DENA) でイニシエートした肝細胞を γ -グルタミントランスペプチターゼ (GGT) で染色することにより、検討を行った。この前腫瘍性病巣検出試験では、各群 6 匹ずつのラットに 200 mg/kg bw の DENA を同時に

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

腹腔内投与して、イニシエートを行った。それから 2 週間基礎飼料により飼育し、被験物質投与群に、25 mg/kg bw の 2,4-TDA (純度 98%) もしくは 50 mg/kg bw の 2,6-TDA (純度 97%) を、0.01M HCl を媒体として、1 週間に 5 日で 6 週間にわたり強制経口投与した。陽性対照群のラットには、フェノバルビタールナトリウム塩(PB)が、500 ppm の濃度で飲水投与された。3 週目に部分肝切除(PH)が全ての群のラットに対して行われ、試験は 8 週間で終了した。屠殺後に肝切片を作製し、液体窒素で冷却した 2-メチルブタンで固定し、-80°C で保存した。染色を施し、平均直径が 0.2 mm の GGT を有する領域を記録した。右後葉および尾状葉から 1 枚ずつ、右前葉から 2 枚の切片を得て、合計 4 切片についてスコア付けをおこなった。その結果、2,4-TDA だけが、DENA でイニシエートされた肝細胞の増殖を有意に増高し、前腫瘍性病巣の有意な増加を誘発した。

Cheung et al.(1996)は、ジアミノトルエン類の酵素誘発性、主として、ジアミノトルエン類の活性化を誘発するチトクロム P450 タンパク質の誘発性、および、細胞質の芳香族炭化水素(Ah)受容体に対するジアミノトルエン類の結合性について報告している。試験の結果、2,4-TDA が、比較的弱いながらも CYP1A を誘発し、^[3H]テトラクロロジベンゾジオキシン(TCDD)を肝細胞質の Ah 受容体から引き離し、自己を活性化することが示された。この試験では、雄の Wistar ラットに対し、別々のジアミノトルエン化合物が、10、20 ないしは 40 mg/kg bw の用量で単回腹腔内投与され、対照群には、対応する容量の媒体(コーン油)が与えられた。被験動物は全て、投与の 24 時間後に屠殺した。チトクロム P450 タンパク質を明確に選択的に誘発するため、被験動物に、ベンゾ[a]ピレン(25 mg/kg bw)、フェノバルビタール(80 mg/kg bw)またはクロフィブラート(80 mg/kg bw)の腹腔内投与、もしくはイソニアジド(100 mg/kg bw)またはデキサメサゾン(100 mg/kg bw)の強制経口投与が、1 日 1 回行われた。投与は 3 日間実施され、すべての被験動物は、最後の投与から 24 時間後に屠殺された。

妥当性は低いが、2,4-TDA の発がん影響に関する試験の情報は、他にも得られている。げっ歯類を用いて様々な経路で 2,4-TDA の投与を行った古い試験について、以下に要約する。これらの試験の結果は、他の発がん試験の結果と、少なくとも一部は整合性を有する。上述した発がん試験での、投与を受けた雌雄のラットまたは雌マウスにおける肝臓腫瘍の発生、投与を受けた雄ラットにおける皮下線維腫の発生、および、雌ラットにおける乳腺がんや乳腺腺腫の発生は、以下に示す古い試験の結果と一貫性がある。データベースを万全にするため、それらの試験についてここに記載する。

2,4-TDA の反復経口投与もしくは反復皮下投与による影響を検討するために、ラットやマウスを用いて、長期試験が実施されている(Pylev et al., 1979)。血液学および臨床生化学的パラメータに関するデータは示されていない。組織病理学的検査が、乳腺、副腎、下垂体、腸、膀胱および肺などの 13 の組織・器官について行われている。雌雄 35 匹ずつのラ

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

ルビノ近交系ラットに、初期用量として1匹当たり4 mgの2,4-TDAが、0.5 mLの生理食塩水を媒体として、週5日の頻度で強制経口投与された。その後投与用量は1匹当たり2.1および0.5 mgに、投与頻度は週3回とされ、試験は最長16ヵ月続けられた。雄39匹、雌30匹の対照群が設けられていた。被験物質投与群の動物の5.5%に白血病が発生し、雌の29.4%に乳性腫瘍が発生した。

CC57マウスの雌58匹に、1匹当たり2 mgの2,4-TDAが、0.2 mLの生理食塩水を媒体として、週5日の頻度で強制経口投与された。その後、週3日の1 mg投与とし、最長16ヵ月の投与が行われた。104匹の対照群が設けられた(性別のデータ無し)。被験物質投与群での腫瘍発生は、非投与対照群のマウスよりも少なかった。被験物質投与群では早期死亡が発生し、それが腫瘍発生頻度を押し下げたものと考えられる。

雌雄25匹ずつのラットに、1匹当たり8 mgの2,4-TDAが、0.5 mLの生理食塩水を媒体として、週1回、16ヵ月にわたって皮下投与された。試験期間中に、用量レベルは減じられた。すなわち、まず4 mgとされたあと、さらに1 mgとされた。雄39匹、雌30匹の、非投与対照群が設けられた。2,4-TDAの皮下投与により、16ヵ月未満でも、投与を受けた動物の12%に白血病が生じ、雌ラットの45.5%で乳腺腫瘍が認められた。

CC57マウスの雌26匹に、1匹当たり2 mgの2,4-TDAが、0.2 mLの生理食塩水を媒体として、週1回で16ヵ月にわたり皮下投与された。104匹の対照群が設けられた(性別のデータ無し)。16ヵ月にわたる皮下投与により、56%のマウスに、注射部位での腫瘍形成が誘発され、白血病の発生もわずかに増加した。

交雑系のSaitamaラット(雌雄20匹ずつ)に、1,2-プロピレングリコール(CAS No. 57-55-6)を媒体とした2,4-TDAの0.4%溶液を皮下投与したところ、投与部位に肉腫が発生した。0.5 mLの被験物質が、週1回、246日にわたってラットの背部に投与された。同時対照群は、設けられなかった。11匹のラットが、特に投与に関連した影響を示すことなく、8ヵ月以内に死亡した。9匹のラットが246日の投与期間を生き残り、期間中28回の投与を受けた。血液学および臨床生化学的パラメータに関するデータは示されていない。少数の器官や組織について、組織病理学的検討が行われた。生残ラット全てにおいて、投与部位に肉腫の発生が確認された。皮下結合組織は肥厚し、様々な大きさの小さな固い連結体を形成し、8~12ヵ月にかけては触診可能となっていた。これらの連結体は徐々に不定形の結節となり、その後すぐに、致死的な大きな腫瘍へと成長した。これらの腫瘍の中には、少なくとも一部が横紋筋肉腫となっているものも見られた。単体の腫瘍の中に、線維肉腫となった領域も見うけられた。剖検では、転移は認められず、内部臓器にも深刻な病変は認められなかった。肝臓の組織学的検査では、充血およびクッパー細胞の増加が認められ、後の段階の試料では、肝細胞の空胞化が認められた。しかし、この試験においては、肝細

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

胞腫瘍形成については記載されていない。

2,4-TDA の投与による肝臓毒性に関する限られた情報が、ラットを用いた試験から得られているが、この試験は古く、適切に実施されていない(動物の数、性別や系統のデータ、対照群のデータ、血液学および臨床生化学的パラメータに関するデータが示されていない)。組織病理学的データは、肝臓についてのみ報告されている。ラットに、2.5%の 2,4-TDA が、オリーブ油を媒体として 80 日間以上混餌投与された。肝臓には、がんや結節性過形成は誘発されなかったが、瀰漫性の胆汁性肝硬変が認められた。2.5%の 2,4-TDA を 80 日間以上にわたって混餌投与したラットの肝臓で見られたこれらの組織形態学的所見について、著者は、小葉間胆管のがん様異型増殖と解釈している(Nagata 1937, 1944)。

Yoshida et al.(1941) は、ラットの膀胱に、コロジオン製の小囊に入れた 2,4-TDA を挿入し、肝臓がんの発生と並行した膀胱がんの誘発を試みた。被験物質は、結晶の形でコロジオンに包まれ、手術により膀胱に挿入され、その後膀胱は縫合された。少なくとも 125 日の間には、がん様新生物は検出されなかった。

イタリア語で書かれた試験報告から、わずかな情報が得られている(Russo et al. 1981)。2,4-TDA を含む 3 種類の芳香族アミンを対象とし、ラットの肝臓の DNA を損傷する能力について検討が行われた。被験化合物は、「*in vivo*」/DNA アルカリ溶出法による試験に供された。雄の Wistar ラット 11 匹に、2,4-TDA が、0 ないしは 3.54 mg/kg bw/日の用量で、9 ヶ月間混餌投与された。2,4-TDA は、「強い陽性」を示したと報告されている。この試験での毒性用量についても報告されている。

2,4/2,6-TDA の異性体混合物(80/20)

経口

データは得られていない。

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。

皮下投与

2年間試験(ラット)

各用量群につき雌雄 30 匹ずつの Sprague-Dawley ラットを用い、皮下投与試験が実施されている。2,4/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物(業務用等級の純度)が、0、8.33 ないしは 25 mg/kg bw の用量で、週 1 回、被験物質に関連した最初の腫瘍が現れるまで、最長 2 年間皮下投与された。媒体のピーナツ油を投与する対照群が設けられ、さらに同等の無処置対照群、およびベンジジンを投与する陽性対照群が設けられた。投与の中止後、被験動物は自然死するまで、もしくは瀕死状態になり屠殺されるまで、飼育された。血液学のおよび臨床生化学的パラメータに関するデータは、示されていない。

8.33 mg/kg bw 群の生残率は、対照群と同等であった。25 mg/kg bw 群では、雄も雌も、対照群と比べ、生残期間が減少した。被験物質を投与された両用量群の雌雄とも、平均体重は、対応する対照群の値よりも低く、その低下は用量依存性を示した。2,4/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物による非腫瘍性影響に関する詳細情報は、4.1.2.6 項に記載されている。悪性腫瘍(不特定)は、被験物質投与群の全てのラットの 53%に、主として投与部位で認められたが、統計学的有意性は、雄だけに認められた(Steinhoff and Dycka 1981)。

動物を用いた 2,4-TDA もしくは市販の 2,4/2,6-TDA(80/20)異性体混合物への長期曝露毒性試験データの要約 / 2,4-TDA の作用機序に関する考察

実験動物に対する 2,4-TDA の発がん性については、十分な証拠が得られている。

ラットに 5.9 mg/kg bw/日以上用量で 2,4-TDA を経口投与した場合、雌雄において、肝細胞がんや腫瘍性結節の発生が、用量依存的に増加した。また、2,4-TDA は、雌において、乳腺の腺腫やがんを誘発した。雄においては、皮下組織の線維腫を誘発し、肺腫瘍の発生率を増加(統計学的に有意ではないが)させた(Cardy 1979, NCI 1979, Sontag 1981, Ito et al. 1969, Stula and Aftosmis 1976, Pylev et al. 1979)。マウスでは、15 もしくは 30 mg/kg bw/日の用量で 101 週間経口投与した場合、雌において、肝細胞がんが有意に発生した。さらに、2,4-TDA の長期経口投与によると思われるリンパ腫発生率の増加が、雌マウスにおいて認められた。雄マウスでは、肺腺腫、肺腺がん、および造血系の腫瘍の発生が、わずかに増加した。しかし、雄マウスでは、発生率が有意に上昇した腫瘍は認められなかった(NCI 1979, Reuber 1979)。

吸入による 2,4-TDA の発がん性は、実験動物においては検討されていない。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

皮膚適用による 2,4-TDA の発がん性は、Swiss-Webster マウスを用いた 1 件の試験で検討されている。皮膚腫瘍は、無処置対照群を含め、ほとんどの群のマウスで認められた。2,4-TDA は、皮膚の扁平上皮の異常増殖や成熟性の変化を引き起こすことはなかったが、試験デザインが限定的であったため、確固とした結論を導くことはできなかった。この試験は、群の規模が小さく、単用量しか設けられていないなどの難点を有している。

市販の TDA 混合物である 2,4/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物については、吸入、経皮、および経口曝露による発がん試験の情報は、得られていない。

2,4-TDA や 2,4/2,6-TDA (80/20) 異性体混合物を、ラットに最長 2 年間、反復皮下投与した試験では、雄においても雌においても、投与部位に肉腫の誘発が認められた。経口投与試験とは対照的に、肝臓や乳腺における腫瘍発生率の増加は認められなかった (Steinhoff and Dycka 1981)。

肝腫瘍

2,4-TDA は、げっ歯類を用いて NCI によって行われた 2 年間経口発がん性試験において、F344 ラットに対し、肝毒性および発がん性を示した。2,4-TDA は、雌雄両方において、良性および悪性の肝腫瘍を誘発し、また、肝腫瘍に結びつく肝病変の発生率を上昇させた。ラットにおける肝細胞がんや腫瘍性結節の発生は、雌雄両方において、用量依存性であった。雌雄両方において、肝細胞腫瘍の発生率が有意に上昇しており、この系統のラットにおける背景対照では、肝腫瘍の発生率は低いことが示されていることから、2,4-TDA が発がん性を有することが証明されている。肝臓がん発生に関連すると思われる、増殖性病変の発生率増加も示されている。これらの病巣は、主として変性細胞巣で構成されていた。これらの病変の多くでは、核異型が認められ、いくつかにおいては、細胞変性から腫瘍への移行状態の様な領域も認められた。肝細胞増殖に関する試験からは、前述の長期試験での開始用量に匹敵する用量の 2,4-TDA を 9 日間経口投与したことより、F344 ラットの肝臓における標識指数が 20% を超える程度にまで上昇することが示された (Cunningham et al., 1990, 1991)。また、Big Blue[®] 遺伝子導入 B6C3F1 マウスを用いた試験では、2,4-TDA を 90 日間混餌投与することにより、肝臓の *lacI* 遺伝子における突然変異発生率の増加が示された (Cunningham and Matthews 1995)。F344 ラットに、2,4-TDA を、25 mg/kg bw の用量で、週 5 日で 6 週間経口投与した場合には、雄の肝臓における変性病巣の有意な増加が観察された (Taningher et al. 1995)。B6C3F1 マウスでは、被験物質投与群の雌における肝細胞がんの発生率が、対照群に比較して高く、その上昇は、用量依存性であった。がんを有していたマウスは、同時に、肝臓の瀰漫性過形成および過形成結節も発症していた (NCI 1979)。中期毒性試験では、600 ppm (約 45 mg/kg bw/日) を投与された Wistar ラットの雄で、浸潤

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

性を示す肝臓がんが見られ、その転移も認められた。被験物質を投与された動物においては、肝臓以外の器官で一次腫瘍が観察された例は無く、対照群の肝臓は、基本的に正常であった(Ito 1969)。高率な腫瘍形成および腫瘍形成の早期化は、投与による発がん性の徴候となっている。ラットに最長 15 ヶ月間、2,4-TDA を 1000→500→250 ppm と(約 28 mg/bw/日)混餌投与した場合には、雌雄両方において、肝腫瘍の統計学的に有意な増加が認められた。雌では、肝腫瘍はほとんどが腫瘍性結節であったが、雄では、中等度から高度に分化した肝細胞がんが認められた(Stula and Aftosmis 1976)。2,4-TDA の発がん性については古い試験の情報が数多く得られており、それらでは、2,4-TDA はラットやマウスにおいて、肝硬変や、場合によっては肝腺腫を引き起こすことが示されているが、悪性腫瘍であることが確実な所見は示されていない。

乳腺腫瘍

2,4-TDA は、F344 ラットの雌において、乳腺の良性および悪性腫瘍発生率を、統計学的に有意に上昇させた。乳腺腫瘍の転移は認められなかった(NCI 1979)。Sprague-Dawley ラットへの投与(100 mg/kg bw の 2,4-TDA を 30 日かけて 10 回胃内投与し、その後 9 ヶ月の観察期間を設けた)では、雌の 23%に、乳腺の線維腺腫や線維肉腫が発生した。ラットに最長 15 ヶ月間、2,4-TDA を 1000→500→250 ppm と(約 28 mg/bw/日)混餌投与した試験では、雌雄両方において、乳腺腫瘍の統計学的に有意な増加が認められた。組織学的には、それらの腫瘍も線維腺腫であった(Stula and Aftosmis 1976)。妥当性が低い試験ではあるが、雌ラット(系統の記載無し)において、乳腺腫瘍の発生率が 29.4%であったことが報告されている(Pylev et al. 1979)。

肺腫瘍

統計学的に有意ではなかったが、F344 ラットに約 5.9 mg/kg bw/日を 103 週間経口投与したところ、雌雄両方で肺腫瘍発生率の上昇が見られた。肺腫瘍の発生率は、B6C3F1 マウスでも、わずかに上昇した。肺で見られたがんは、高度に分化した乳頭腺がんもしくは分化度の低いがんであった(NCI 1979)。ラットに最長 15 ヶ月間、2,4-TDA を 1000→500→250 ppm と(約 28 mg/bw/日)混餌投与した試験では、雄において、肺腫瘍(主として腺腫)の有意な増加が認められた。これらの所見は、それより前に行われていたマウスでの試験結果と整合するものであった。その試験では、マウスの皮膚に 2 年間の塗布が行われ、一次肺腺腫および腺がんが、処置を受けた Swiss-Webster マウスで認められた(Giles and Chung 1976)。

腫瘍の発生機序

肝腫瘍の発生機序は、未だ明確にされていない。得られた遺伝毒性データからは、2,4-TDA が遺伝毒性発がん物質であることが強く懸念される。一方、2,4-TDA の試験データは、特に雄ラットにおける、肝細胞壊死と肝細胞腫瘍発生との関連を示唆している。ラットを用いた発がん性試験(NCI 1979, Cardy 1979)では、最小用量の 5.9 mg/kg bw/日(飼料中濃度を 125 から 50 ppm に減じた投与における時間加重平均用量)を投与された雌雄両方において、生存率の低下と、明らかな体重増加量の低下(約 25%)が認められた。同じ用量で、肝臓における壊死や腫瘍が、雌雄両方で認められた。肝臓への毒性影響は、脂肪変性、胆管線維症および肝硬変(中期試験, Ito 1969)、ならびに肝臓の退行性変性(長期試験, NCI 1979, Cardy 1979)として現れている。この試験では、肝腫瘍が発生した全例で、細胞変性病巣も出現している。これらの病変の重症度や細胞および核の異型度は、高用量(13 mg/kg bw/日)の投与を受けた雌において最大(42/49 匹, 86%)であった。マウスでも、投与を受けた動物では、肝臓に過形成結節が生じたが、前駆的な肝病変は認められなかった。要約すると、肝臓において細胞損傷後に腫瘍誘発が見られていることは、非遺伝毒性的な作用機序があることを示唆していると解釈できるかもしれない。しかし、*in vitro* および *in vivo* で、遺伝毒性を陽性とするデータが得られている。肝臓への毒性と肝腫瘍発生との相関関係は、ラットの雄についてのみ認められており、マウスでは雌雄どちらにも認められていないことから、2,4-TDA による肝細胞壊死と肝細胞腫瘍発生との間に関連性があるとは考えにくい。

さらに、2,4-TDA は他の器官でも、細胞毒性とは無関係に腫瘍を誘発している。雌ラットでは、乳腺の良性および悪性腫瘍が統計学的に有意に高率で認められており、肺腫瘍も、ラットやマウスで頻発していた(統計学的に有意ではない)。

結論として、ラットやマウスにおける試験の結果、および 2,4-TDA の遺伝毒性を検討した試験の結果に基づく、いずれの標的器官についても、腫瘍発生には、遺伝毒性的機序が介在しているものと考えられる。2,4-TDA についての試験結果からは、遺伝毒性以外の機序も示唆される。細胞毒性影響と腫瘍の発生については、詳しく検討されているようには思われない。目下のところ、これらの機序が、種特異的であると根拠づけるデータは得られておらず、ヒトにおいても当てはまる可能性がある。

ヒトにおけるデータ:

データは得られていない。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

細胞形質転換試験

細胞形質転換試験が S-9 mix 非存在下でのみ実施されているが、それらの結果は一貫していない。

Le Boeuf et al.(1996)は、シリアンハムスター胚細胞(SHE 細胞)を用い、pH 6.7(通常用いられる pH 7.1~7.3 ではない)で培養して、形質転換頻度が増加したことを確認している。この試験では、0.5~65 µg/mL の用量範囲で、2,4-TDA への7日間曝露が行われた。20 µg/mL 以上のいずれの濃度においても、形態学的形質転換頻度(MTF)に、統計学的に有意な上昇が認められた。陰性対照における MTF が 0.39%であったのに対し、最大で 3.21%の MTF が認められた。最高濃度では、細胞毒性が認められた。

従来法(pH7.1~7.3)による SHE 細胞の形質転換試験では、Holen et al.(1990)は、5.0~30 µg/mL の用量範囲で陰性であったことを報告しており(10 µg/mL を超える用量で細胞毒性を認めた)、Green and Friedman(1979)も、62.5~1000 µg/mL の用量範囲で陰性結果を得ている(細胞毒性に関するデータは示されていない)。

安定的に遺伝子導入されたマウス胚繊維芽細胞の非標準の培養細胞を用いた細胞形質転換試験では、2,4-TDA は陽性を示した(Kowalski et al., 2000)。この試験における 2,4-TDA の用量範囲は、0.1~100 µg/mL であった。著者によれば、10 µg/mL 以上の用量で、形質転換巢の統計学的に有意な増加が認められた。100 µg/mL では、細胞毒性が示された。

Table 4.1.2.8 D: In vitro tests: cell transformation

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
SHE cells	not done	0.5 - 65 µg/ml	positive	at the highest concentrations	pH 6.7	Le Boeuf et al., 1996
SHE cells	not done	5.0 - 30 µg/ml	negative	> 10 µg/ml	pH 7.1-7.3	Holen at al., 1990
SHE cells	not done	62.5 - 1000 µg/ml	negative	no data	pH 7.1-7.3	Green and Friedman, 1979
Stable transfected mouse embryo fibroblast cell line	not done	0.1-100 µg/ml	positive	at 100 µg/ml (decrease in number of foci)		Kowalski et al., 2000

結論

分類:

2,4-TDA は既に、「カテゴリー2 の発がん物質、T、有毒、R45、がんを引き起こす恐れ有り」と表記すべきものとして分類されている。この分類は、以下のことのより再確認される。

- 2,4-TDA は、雌雄のラットにおいて発がん性を示す。
- 2,4-TDA の発がん性は、経口で投与した場合に示されている。吸入に関するデータは得られておらず、経皮曝露に関する情報は、重要なものが見当たらない。
- ガイドラインに準拠した生涯試験 (NCI, 1979) から妥当なデータが得られており、他の長期試験 (Ito et al. 1969, Stula and Aftosmis 1976) から裏付けるデータが得られている。それらは、2,4-TDA の経口投与により、肝臓や肺(ラットおよびマウス)、乳腺(ラット)、皮下組織(ラット)、造血系および血管系(マウス)において、腫瘍が生じることを示している。2,4-TDA は、雌雄のラットおよび雌マウスにおいて、肝細胞がんや腫瘍性結節(肝臓がんと同義)を誘発した。さらに、別の系統のラットで実施された 3 件の試験において、乳腺における腫瘍発生率の増加が認められた。雄ラットでは、皮下線維腫が、用量依存的に増加した。また、肺におけるがんや腺腫などの腫瘍の発生率は、対照群の値に比べ、投与を受けた雌雄のラットや雄マウスでは、高い値であった。肺の腫瘍発生率は、ChP-CD ラットを用いて常法によらない方法で実施された試験でも、雄において上昇していた (Stula and Aftosmis, 1976)。マウスでは、投与を受けた群ではいずれの用量においても、血管腫や血管肉腫(雄のみ)、およびリンパ腫(雌のみ)の発生率が、対照群の値よりも高かった。肝臓以外の腫瘍に関しては、マウスにおいて、用量依存性の発生率上昇は認められなかった。
- 2,4-TDA は、細菌を用いた(遺伝子突然変異)試験や哺乳類の培養細胞を用いた試験(染色体異常、SCE、UDS、DNA 鎖切断、DNA 付加体形成)において、変異原性を示した。したがって、2,4-TDA は遺伝毒性発がん物質と考えられる。
- さらに別の腫瘍誘発機序が関与している可能性も示されている。肝細胞壊死に続く細胞増殖の増高も、2,4-TDA による肝臓がん発生に寄与している可能性がある。しかし、マウスの肝臓では、毒性を示す前駆的な病変が見られておらず、分裂促進性の影響を及ぼすような細胞毒性については疑義が残る。肝臓以外の標的部位における腫瘍に関しては、遺伝毒性以外の他の機序の関与は示唆されておらず、確証がない。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

- 2,4-TDA の発がん影響に関するデータは、ヒトにおいては得られていない。上記所見が動物に限ったものであるとする、発現機序上の根拠は得られていない。

分類と表記指針に関する指令 93/21/EEC の EC 基準に基づいて、2,4-TDA は、カテゴリー2の発がん物質に分類され、T、毒性、R45(がんを引き起こす恐れ有り)の表記が提唱される。

2,4-/2,6-TDA(80/20)異性体混合物

市販の 2,4-/2,6-TDA(80/20)異性体混合物の発がん性を検討した試験データは、吸入、経皮および経口のいずれについても得られていない。

業務用の TDA は、2,4-と 2,6-TDA の異性体混合物であるが、主成分が 2,4-TDA であるため、発がん性を有することが疑われる。したがって、2,4-TDA に関する現行の分類が、市販の 2,4-/2,6-TDA 混合物に対しても提唱される。

4.1.2.9 生殖毒性

2,4-TDA

動物データ

受胎能への影響:

目下のところ、ガイドラインに準拠した世代試験のデータは得られていない。しかし、2,4-TDA の雄の受胎能への影響については、Sprague-Dawley ラットを用いた一連の混餌投与試験において検討されている(Thysen et al. 1984; Thysen 1985 a, b; Varma et al. 1988)。これらの試験の詳細は、4.1.2.6 項に記載してある。

それらの内の 1 件は、予備試験的に行われたもので、不特定の数の動物に、0.1%の 2,4-TDA を含む実験室用飼料が 9 週間与えられた。1 日当たりの摂取量は、約 50 mg/kg bw に相当していた(Thysen et al. 1984, 要旨のみ入手)。何回かの交配が施行され、その結果、生殖障害が認められた。全ての雌で、膣スメアに精子が見られず、妊娠も成立しなかったため、投与を受けた全ての雄が不妊症であることが明らかとなった。この用量の 2,4-TDA により、体重や精巣重量の減少が引き起こされたと報告されている。投与を受けた雄の病理学的検査により、精子形成の停止、精液をほとんど含まない精囊、腹側弾力性の凝塊物で満たされた前立腺、精巣上体の脂肪体の過剰な退縮、といった所見が認められた。血漿黄

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

体化ホルモンの上昇が認められ、一方、血漿テストステロン濃度は正常であった。

もう 1 件の試験では、0、0.03 ないしは 0.01%の 2,4-TDA (純度 98%) を含む飼料が、各群 8 ~10 匹の雄ラットに 10 週間、絶え間なく与えられた。1 日当たりの 2,4-TDA の摂取量は、約 15 および 5 mg/kg bw であった (Thysen et al. 1985a)。10 週間の投与期間後、2 週間の交配期間が設けられ、その期間中各雄は、合計 4 匹ずつの未交配雌との交配に供された。体重測定は、毎週行われた。雌は、授精を確認してから 2 週間後に屠殺し、着床部位、生存胚および吸収胚の有無を調べ、計数を行った。雄は、交配期間を終えてから 2 週間後、すなわち、通常飼料に戻してから 4 週間後に屠殺した。精巣と精巣上体を摘出し、組織病理学的検査に供した。0.03%の 2,4-TDA を混餌投与されていたラットでは、4~10 週の間には体重増加量の減少が見られ、これは飼料消費量がかなり減少したためと考えられた。0.03%で 2,4-TDA を投与されていた雄の 10 中 5 匹で、不妊が確認された (不妊とされた雄に関しては、交配 14 日後に着床が確認された数/精子が確認された雌の数の比は、0/2、0/4、0/3、0/3 および 0/4 であった)。この群の残りの雄では、受胎能は、概して損なわれていなかった。対照群と低用量群の雄は、全て受胎能を有していた。交配指数 (精子が確認された雌の数/交配に供された雌の数の比) は、対照群では 1.00、0.01%群では 0.95 であったのに対し、0.03%群では統計学的に有意に ($p < 0.01$) 低く、0.73 であった。受胎率 (妊娠した雌の数/精子が確認された雌の数の比) は、対照群では 0.74、0.01%群では 0.72 であったのに対し、0.03%群では統計学的に有意に ($p < 0.05$) 低く、0.41 であった。生存胚の数については、投与群の雄で成立した妊娠例と対照群の雄で成立した妊娠例との間に、有意な差は認められなかった。平均の吸収胚数も、全ての群で同等であった。0.03%の 2,4-TDA を含む飼料を投与されていたラットの精巣を鏡検したところ、精細管や精巣上体尾部において、限局性もしくは瀰漫性に、精母細胞の低形成像が認められた。

この 2 件目の試験の結果は、追加的に行われた定量試験により支持される。この試験では、2,4-TDA を 0、0.01 ないしは 0.03%含む飼料での曝露を 10 週間行い、その後通常飼料での飼育を 11 週間行って、精巣上体精子数、生殖器官重量、および血中の性腺刺激ホルモンやテストステロン濃度に与える影響を検討した (Thysen et al. 1985b)。この試験においても、2,4-TDA を 0.03%含む飼料を投与されていたラットでは、10 週後に、飼料消費量がかなり減少したためと思われる体重増加量の減少 (対照より 36%減) が確認された。雄ラットにおける長期にわたる飼料摂取の減少が精子形成に悪影響を及ぼすという知見は得られておらず、したがって、2,4-TDA の投与に関連した精子数の減少は、体重増加量の減少に続発した影響であるとは説明し難い。2,4-TDA を 0.03%含む飼料を投与されていた群では、精巣上体および精囊の平均重量が、統計学的に有意に ($p < 0.05$) 低かった (精巣上体: 対照群で 650 ± 57 mg であったのに対し 525 ± 129 mg ; 精囊: 対照群で 238 ± 22 mg であったのに対し 197 ± 19 mg)。一方、精巣や前立腺の重量は、被験物質投与群と対照群とで同等であった。

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

精巣上体の精子貯蔵量(精巣上体尾部の総精子数)は、2,4-TDA の飼料中濃度が 0.01%の場合であっても減少していた(対照群で $323 \pm 52 \times 10^6$ であったのに対し $267 \pm 70 \times 10^6$)。高用量群においては、精巣上体尾部の総精子数は、 $110 \pm 87 \times 10^6$ 個までのかなりの減少を示し、この減少は統計学的に有意で($p < 0.05$)、精子減少症とみなされ、これは投与期間中に見られた主要な影響であった。11 週間の回復期間後も、0.03%の 2,4-TDA を含む飼料を投与された群では、精子数が統計学的に有意に($p < 0.001$)少ないままであった(精巣上体尾部の精子数が、対照群では $342 \pm 58 \times 10^6$ であったのに対し $139 \pm 144 \times 10^6$)。精巣や精巣上体重量は、共に有意に減少し、精子濃度と良い相関性を示した。精嚢や腹側前立腺の平均重量には、有意な変化は認められなかった。血清テストステロン濃度は、2,4-TDA を 0.03%含む飼料を投与された群において、10 週間の投与期間後の時点で、統計学的に有意に($p < 0.05$)低かった(対照群で 4.48 ± 0.95 ng/L であったのに対し 2.24 ± 1.56 ng/L)。血清テストステロン濃度は、11 週間の回復期間後も、統計学的に有意ではなかったが、低い状態のままであった(対照群で 2.33 ± 0.81 ng/L であったのに対し 1.66 ± 0.51 ng/L)。このアンドロゲン濃度の低下は、黄体形成ホルモン濃度の上昇(統計学的に有意ではない)と整合していた。卵胞刺激ホルモン濃度には、投与に関連した有意な影響は認められなかった。

Thyssen et al.の試験に追従してさらに一連の試験が行われ、2,4-TDA による、アンドロゲン結合タンパク質(rABP)産生への影響、精細管の微細構造への影響、および精巣の形態学的変化や精子形成に対する影響が検討された(Varma et al. 1988)。1 件目の試験では、各群 9 匹ずつのラットに、2,4-TDA を含まないあるいは 0.03%含む飼料が 10 週間与えられ、血清、精細管の培養液、および精巣や精巣上体のサイトゾルについて、rABP の分析が行われた。血清中や精巣のサイトゾル中の rABP 濃度は、投与群のラットでは、対照群のラットに比べ、それぞれ 3.8 倍および 8.9 倍高い値であった。TDA 投与群の精細管培養液には、対照群の 7 倍の rABP が含まれていた。しかし、精巣上体のサイトゾルの rABP 含量は、被験物質投与群において 67%減少していた。精巣を透過電子顕微鏡で検査したところ、セルトリ細胞において、対照群と比べて、様々な退行性変化が生じていることが明らかとなった。生殖細胞は、観察された限りでは、正常な成熟変化を示していた。続いての試験では、各群 5 匹ずつのラットに、2,4-TDA を含まないあるいは 0.03%含む飼料が最長 10 週間与えられ、その間 2 週間毎に中間屠殺が行われた。4、6 および 8 週間の時点では、体重に対する精巣重量の比が倍になっていた。精巣重量の増加は、精細管の体液容量における、2~3 倍という大幅な増加と、強い相関関係を示していた。投与 10 週間の時点では、精巣重量は、対照群での重量まで減少していたが、精細管の体液容量は、上昇したままであった。TDA の投与が 6、8 または 10 週に及んだ時点では、精巣上体の精子貯蔵量が、約 50%減少していた。精巣に関連したこれらの変化は、2,4-TDA が、セルトリ細胞の機能や、精巣および精巣上体からの rABP の放出に影響を及ぼし、おそらく精細管の体液輸送にも影響を及ぼすことを示していると解釈される。3 件目の試験では、各群 9 匹ずつのラットに、2,4-TDA

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

を含まないあるいは 0.06% 含む飼料が、1 週間または 3 週間与えられた。1 週間の時点では、被験物質を投与された動物において、体重増加量および精巣上体精子貯蔵量の 25% 減少、精巣上体重量の減少、およびセルトリ細胞のわずかな構造変化が認められた。投与 3 週間に時点では、精子数はさらに減少し、精巣重量の倍化やセルトリ細胞の微細構造の変化も認められた。血清テストステロン濃度には、有意な変化は認められなかった。この試験の結果から、精巣の精子形成に対する 2,4-TDA の毒性は、投与 3 週間以内に現れることが示され、2,4-TDA による精子形成のこのような早期の抑制は、セルトリ細胞の損傷を介して生じることが示唆された。

追加的な情報が、*in vivo* モデルを用いた短期試験から得られている。この試験は、発がん性を調べる「迅速試験」として行われたものであり (Topham 1980)、特殊な近交系のマウスにおいて、2,4-TDA は、精子の頭部に異常を誘発しなかった。

また、雄の DBA/2J マウスを用いて優性致死試験が実施されている。この試験では、2,4-TDA が、各回 40 mg/kg bw の用量で、2 日連続で合計 2 回、経口もしくは腹腔内投与された。その結果、投与後 7 週間までの観察では、繁殖に至った交配の割合、着床数、および着床後死亡の平均割合に、変化は認められなかった。投与後 8 週間の時点で、精子の形態学的異常の増加も示されなかった (Soares and Lock 1980)。2,4-TDA を、111~375 mg の高用量で、C57Bl/6xC3H マウスに単回腹腔内投与した場合には、精巣における DNA 合成が、投与後 6.5 時間以内に 53~86% 抑制されたことが観察された (Greene et al. 1981)。しかし、曝露が急性かつ高用量で行われたこと、ならびに検討したパラメータが異なることから、ラットで得られたデータと比較することはできない。

発生・発達毒性:

目下のところ、ガイドラインに準じて行われた発生・発達毒性試験の情報は、得られていない。しかし、合計 60 種類の化学物質を単用量のみで検討したスクリーニング試験の中で、2,4-TDA の検討も行われている。この試験では、50 匹の CD-1 アルビノマウスに、2,4-TDA が、150 mg/kg bw/日の用量で、コーン油を媒体として容量が 10 mL/kg bw となる様に、妊娠 6~13 日にかけて、強制経口投与された (Hardin et al. 1987 a, b)。この用量は、非妊娠動物で先行して実施された用量設定試験から推算された LD₁₀ に相当していた。明らかな母体毒性が現れ、50 匹中 17 匹の雌親が死亡し、平均体重の有意な減少が認められた。2,4-TDA の投与を受けて生残した雌親では、一腹仔数が有意に減少し (20 匹中 5 匹で)、一腹当たりの生産仔数も有意に減少した。生産仔については、出生時体重や出生後 3 日間の体重増加量および生存率に、対照群との有意な差は無かった。

データベースを補完する他の情報:

In vitro でのエストロゲン様活性に関して、酵母ツーハイブリッド法を用いて、517 の化学物質がまとめてスクリーニングされており、その中に 2,4-TDA も含まれている (Nishihara et al., 2000)。試験に供された 517 の化合物のうち、64 化合物が陽性と判定されたが、2,4-TDA にはエストロゲン様活性は認められなかった。

ヒトにおけるデータ

米国において、ジアミノトルエンを製造するいくつかの施設の男性従業員について、調査が何件も行われており、自然流産率、死産率、彼らの子供における先天性奇形発生率が調べられ、精液検査も実施された (Ahrenholz 1980; Anonymous 1980; Ahrenholz and Meyer 1982; Hamill et al. 1982; Levine et al. 1985, reviewed by WHO 1987)。これらの調査における職業曝露は、通例、ジアミノトルエン類 (異性体については不明) とジニトロトルエンの両方への、無分別な曝露を指す。これらの調査が進められる間に、一方で、曝露群において精子細胞に損傷影響が認められたという報告が得られ、曝露された従業員の妻において自然流産率の上昇が認められたという報告が得られたが、他方、精液の検査結果や流産率に、特段の差異が認められなかったという調査報告も得られている。これらの職業曝露調査については、混合曝露であることや精巣を損傷する影響はジニトロトルエンでも生じると論じられていることから、総括的に評価することは不可能である。また、群の規模が小さいもののみであり、集団がボランティアに限られているために選択バイアスのおそれかなり存在するなど、いくつかの理由から、これらの調査結果で得られた生殖障害を示す結果は、価値が限定的である。したがって、ヒトに関して現在得られているデータは、2,4-TDA が生殖に及ぼす有害性を判定するためには、適切なものとはみなされない。女性に関するデータは得られていない。

結論:

動物試験により、2,4-TDA の反復的な経口摂取は、ラットの雄において、受胎能や精子形成を、用量依存的に損傷することが明らかとされている。約 15 mg/kg bw/日での 10 週間混餌投与により、交配指数や受胎率が有意に低下した。また、精子形成に対しても明らかな毒性影響が示され (66%抑制)、これは、精嚢や精巣上体重量の有意な減少、セルトリ細胞の形態学的な損傷、ならびに血清テストステロン濃度の低下や血清黄体化ホルモンの上昇と、関連性を有していた。精子数やテストステロン濃度は、11 週間の回復期間後も、低値のままであった。約 5 mg/kg bw/日で最初に精巣上体精子貯蔵量への影響が見られていることから、厳密にみて、この値が LOAEL とみなされる。精子パラメータへの影響に関する

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

NOAEL は、導出できなかった。

入手された動物データの検討に基づくと、2,4-TDA は、カテゴリー3 の生殖毒性物質、R62 (生殖機能を害するリスクを有する可能性有り)への分類が妥当である。

雌の受胎能に関する試験データは、得られていない。

マウスにおいて、1 件のスクリーニング試験からデータが得られているが、これは発生・発達への損傷影響を評価するのに妥当なものではなく、したがって、生殖に関する有害性については、目下のところ完全には特定することはできない。現在得られている疫学的調査の結果は、結論につながるものではなく、それらの中には妥当性の低いものもある。したがって、生殖に関する有害性の特定は、主として動物試験の結果に基づくことになる。

2,4/2,6-TDA(80/20)異性体混合物

動物データ

受胎能への影響:

データは得られていない。

発生・発達毒性:

データは得られていない。

データベースを補完する他の情報:

2,6-TDA に関する試験で、30～100 mg/kg bw をマウスに単回腹腔内投与することにより、精巣における DNA 合成が 40～56%抑制されたことが示されている (Greene et al. 1981)。被験動物の体温を調べた結果から、この抑制は、被験物質投与により誘発された低体温によって引き起こされたとする仮説が導かれている。精巣への毒性に関しては、これ以上のデータは報告されていない。

結論:

2,4-/2,6-TDA (80/20) を用いた試験データが得られていないため、生殖毒性に関する有害性

EURAR: 4-METHYL-M-PHENYLENEDIAMINE (TOLUENE-2,4-DIAMINE)

を特定することはできない。また、現在得られている疫学的調査の結果は、結論につながるものではなく、それらの中には妥当性の低いものもある。

ラットを用い、優勢な異性体、すなわち 2,4-TDA について行われた試験からは、約 5 mg/kg bw/日という低用量でも、反復経口投与により、雄の受胎能や精子形成に対し、有害影響が及ぶことが示されている。2,4-TDA は 2,4-/2,6-TDA (80/20) の主成分であることから、この異性体混合物についても、カテゴリー3 の生殖毒性物質、R62(生殖機能を害するリスクを有する可能性有り)への分類が妥当である。