

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report**

2-FURALDEHYDE

CAS No: 98-01-1

February 2008

欧州連合
リスク評価書（2008年2月最終承認版）
2-フルアルデヒド

RISK ASSESSMENT

2-FURALDEHYDE

(Furfural)

CAS-No.: 98-01-1

EINECS-No.: 202-627-7

Final report, February 2008

FINAL APPROVED VERSION

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2014年2月

本部分訳文書は、2-furaldehyde (CAS No: 98-01-1)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反応関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、
http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk_assessment/REPORT/2furaldehydereport050.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

動物におけるデータ

Nomeir *et al.* (1992)が、各群4匹ずつの雄の Fischer 344 ラットを用いて、2-フルアルデヒド(以降フルフラル)のトキシコキネティクスを検討している。¹⁴C-フルフラルが、0.13~12.5 mg/kg 体重の範囲の用量で、単回強制経口投与された。コーン油が媒体として用いられた。72 時間後までに、全ての用量群において、放射活性の 85%が尿中に排出された。この排出は、主に最初の 24 時間になされた。また、2%が糞中に排出された。最高用量群では、7%が CO₂ として呼出された。最高用量群ではまた、合計で 0.6% (以下)が、検査に供された組織中に検出された。肝臓や腎臓中に検出された ¹⁴C の濃度は、投与用量に比例していた。最高より低い用量群では、肝臓や腎臓以外の組織(血漿、血球細胞、心臓、肺、脳、脂肪組織、骨格筋、脾臓、胸腺)に、¹⁴C は検出されなかった。¹⁴C は、肝臓および腎臓で最も高濃度で検出され、脳では最も低濃度であった。以下の代謝物が尿中に検出された。フロイルグリシン(放射活性の 76~80%)、フロン酸(放射活性の 1%)、および、フランアクリル酸(放射活性の 3~4%)。試験した用量範囲では、これら代謝物の相対量は、一次関数性を示した。フルフラルの未変化体は、尿中には検出されなかった。フランアクリル尿酸は、測定されなかった。この試験の結果から、¹⁴C-フルフラルをラットに強制経口投与した場合、消化管から少なくとも 90~95%が吸収されると結論付けられる。

Parkash and Caldwell (1994)の試験では、雌雄の Fischer 344 ラット(各群 5 匹)に ¹⁴C-フルフラルが、1、10 もしくは 60 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与され、また、雌雄の CD1 マウス(各群 5 匹)には、1、20 もしくは 200 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与された。ラットとマウスの両方において、60%を超える放射活性が、最初の 24 時間の間に、尿中に検出された。試験終了(72 時間後)までに、76~100%の放射活性が尿中に検出され、糞中排出は 3~7%、呼気中排出は 5%、屠体中に残ったものは 1%未満であった。以下の代謝産物が、尿中に検出された。

- * フロイルグリシン(ラットおよびマウスの全用量群において約 80%の放射活性)
- * フロン酸(雄のラットおよびマウスの高用量群において約 2%の放射活性、雌マウスの中用量および高用量群において 10%以下、他の用量群では検出されず)
- * フランアクリル尿酸(ラットおよびマウスの全用量群において 10~35%の放射活性)
- * フランアクリル酸(雌ラットの高用量群おいてのみ 2%の放射活性、他群では検出されず)
- * 未同定の高極性代謝産物 1 種類(雄ラットの全用量群で 2%の放射活性、他群では検出されず)

高用量になると遊離酸の排出が増加したという結果は、グリシン抱合能(内因性のグリシンが抱合に供されることによると考えられる)に限度があることを示している。代謝プロファイルには、用量や性別および動物種の違いにより、それらの関数として表される、わずかな相違が認められた。この試験の結果から、マウスやラットにフルフルアルを強制経口投与した場合、消化管からの吸収は、81~100%であると結論付けられる。

Laham and Potvin(1989)は、10 匹の Sprague-Dawley ラットを用い、フルフルアルの強制経口投与試験を行っている(蒸留水を媒体として 50 mg/kg 体重を単回投与)。その 3 日後までに、以下の代謝産物が尿中に検出された(GC-MS により分析)。

- フロイルグリシン(投与用量の 33.5%)
- 非抱合型フロン酸(投与用量の 2.8%)
- フランアクリル尿酸(投与用量の 1.6%)
- および、フランアクリル酸(投与用量の 1%)。

この試験結果から、少なくとも 39%のフルフルアルがラットの消化管で吸収されることが示された。投与用量の残りの 60%については説明されていない。このように判明した代謝産物についての回収率が低いため、この試験の意義は乏しいと言わざるを得ない。

フルフルアルを経口投与されたラットおよびマウスについては、以下の代謝経路が提唱されている(Irwin, 1990)。フルフルアルの生体内変換は、2つの経路で起こると考えられる。その主要な経路はフロン酸への酸化であり、フロン酸は遊離型もしくはグリシン抱合体(すなわちフロイルグリシン)の形で排出される。それより小規模な経路は酢酸との縮合であり、2-フランアクリル酸を生じ、抱合体(すなわち 2-フランアクリル尿酸)の形で排出される(Figure 4.1.2.1 参照)。ただし、Figure 4.1.2.1 には、CO₂ 産生に至る経路は示されていない。

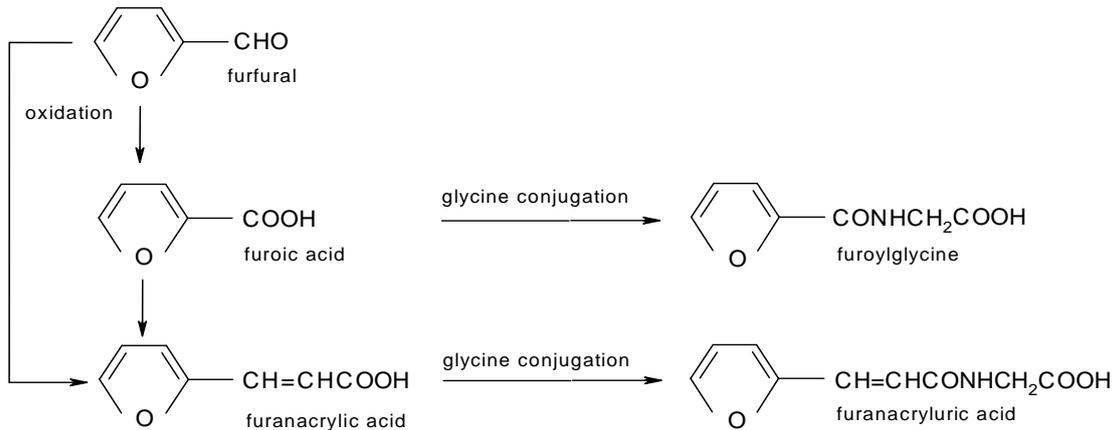


Figure 4.1.2.1 Metabolic pathway in rats and mice, orally exposed to furfural, as proposed by Irwin (1990)

ヒトにおけるデータ

Flek and Sedivec (1978) は、ヒトのボランティアを対象に、フルフラルの吸入曝露試験および皮膚接触曝露試験を、独立して計 4 件行っている。

1 件目の試験では、男性(3 ないしは 4 名)が、15、20、もしくは 31 mg/m³ の濃度のフルフラルに、8 時間全身吸入曝露された。吸気および呼気を分析し、肺内残留、すなわち吸気と呼気におけるフルフラル濃度の差を測定した(曝露 2 時間目と 3 時間目の間に 1 回、曝露 5 時間目と 7 時間目の間に 1 回)。肺内残留率の平均値は、曝露濃度や曝露時間に関係なく、78% (75~82%) であった。採取された尿試料中には、フルフラルの未変化体は検出されなかった。極微量の遊離型フロン酸が検出された(定量はされなかった)。主要な代謝産物は、フロイルグリシンであった(定量はされなかった)。フランアクリル尿酸として、0.5~5% が回収された。24 時間以内に排出されたフロイルグリシンの量は、全ての被験者において、フルフラルの肺内残留量に相当する量よりも多く(120~130%)、全身曝露により、皮膚からの吸収があったことが示された。未変化のまま呼出されたのは、1% 未満であった(吸気および呼気では、フルフラルのみの分析が行われた)。

2 件目の試験では、男性(4 名)が、30 mg/m³ の濃度のフルフラルに、8 時間、吸入経路のみで曝露された。「総フロン酸」、すなわち、遊離型およびグリシンに結合したフロン酸について、尿中排出量を測定した。「総フロン酸」の排出は、曝露終了時に最高となり、その後、急速に正常濃度まで低下した(曝露終了後 11 時間で正常値に戻った)。吸収されたフロン酸のヒトにおける生物学的半減期は、尿中に排泄された「総フロン酸」量に基づくと、約 2~2.5 時間となる。

3 件目の試験では、4 人の男性を、空気中にフルフルアルが混ざっている部屋に、8 時間滞在させた。吸入による吸収を、ガスマスクを介して非汚染空気で呼吸させることにより回避した。ここでもやはり、尿中への「総フロン酸」排出量を測定した。「総フロン酸」の排出は、曝露終了時に最高となり、その後、急速に正常濃度まで低下した(曝露終了後 6 時間で正常値に戻った)。この試験(温度や相対湿度については触れられていない)におけるフルフルアル蒸気の経皮吸収量は、2 件目の試験で測定された、気道を介する吸収量の約 30%であった。排出量については、被験者間でばらつきが大きく、微小気候条件に左右されやすかったと報告されている。気温が高い(27~29°C で相対湿度が 70~80%)の場合には、「総フロン酸」の排出量は倍増したということだが、これらの観察結果は定量的なものではない。

最後の 4 件目の試験では、3 人の男性に、純粋フルフルアル(液体)が入った容器に、彼らの手を手首まで沈めてもらい、15 分間曝露を行った。呼吸マスクを装着してもらい、吸入を防止した。ここでもやはり、尿中への「総フロン酸」排出量を測定した。「総フロン酸」の排出は、曝露終了の 2 時間後に最高となった。排出された代謝産物の総量から算出すると、手の表面から吸収されたフルフルアルは、約 26.6 mg(20.8 から 37.9 mg の範囲)であった(3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{分}$ 、2.2~4.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{分}$ の範囲)。これらの試験については、報告内容が貧弱であることに留意されたい。

結論

ラットに ^{14}C -フルフルアルを経口投与した場合、少なくとも 90%が消化管から吸収される。ヒトをフルフルアルに吸入曝露した場合、肺内残留率は 78%であった。ヒトをフルフルアル蒸気(30 mg/m^3)に曝露した場合、経皮吸収されるフルフルアルの量は、吸入により吸収される量の約 30%である。ヒトを液体のフルフルアルに経皮曝露した場合、皮膚 1 cm^2 あたり、毎分約 3 μg が吸収される。

動物におけるフルフルアルの経口投与後の分布については、わずかなデータしか得られていない。投与の 72 時間後では、合計 0.6%(もしくはそれ未満)の放射活性が、対象とした組織中に検出された。肝臓や腎臓において検出された ^{14}C の濃度は、投与用量に比例していた。最も高濃度で検出された組織は肝臓および腎臓であり、最も低濃度であったのは脳であった。データが乏しかったため、経胎盤移行や乳汁中への分泌については議論不能であった。

ラットやマウスにおけるフルフルアルの生体内変換については、2 つの経路が提唱されている。主要な経路はフロン酸への酸化で、フロン酸は、遊離型もしくはグリシン抱合体(すなわちフロイルグリシン)の形で排出される。それより小規模な経路は酢酸との縮合であり、フランアクリル酸を生じ、これは、抱合体(すなわちフランアクリル尿酸)の形で排出される。

未同定の化学物質が 1 種類、ラットやマウスの尿中に検出されている。代謝プロファイルには、用量や性別および動物種の違いにより、わずかな相違が認められた。吸入曝露を受けたヒトの尿中で検出された主要な代謝産物は、フロイルグリシンである。フロイルグリシンの他に、フランアクリル尿酸が検出されている。フロン酸は、吸入曝露を受けたヒトの尿中には、極微量しか検出されなかった。ヒトや動物で観察された代謝産物の変動は、曝露経路や曝露期間および投与用量の相違に起因するものと考えられ(例えば遊離型フロン酸は、グリシン抱合能を超過したために産出されると思われる)、必ずしも動物種の違いに起因するものではない。

動物に経口投与した場合には、投与した放射活性の 76~100%が尿中に検出され、糞中排出は 2~7%であり、5~7%が CO₂ として呼気中に排出された。屠体では、1%に満たなかった。

吸入曝露されたヒトにおけるフルフラルの生物学的半減期は、約 2~2.5 時間である。

4.1.2.2 急性毒性

動物におけるデータ

経口

ラットの LD₅₀ 値は、50 から 149 mg/kg 体重の間であった[Fassett, 1963; Castelli *et al.*, 1967; Kuznetsov, 1966, 1967(これらは全て労働基準に関するオランダ専門委員会(DECOS),1996で引用); Sax, 1984]。もっと最近に行われたラットにおける試験では、急性経口 LD₅₀ は、上述の範囲の上限よりも高いものであることが示されている。例えば、Nemec(1997a)の発生毒性用量設定試験では、150 mg/kg を 10 日間投与したが、1/8 匹しか死亡は観察されなかった(4.1.2.9 項参照)。また、米国国家毒性プログラム(NTP)による用量設定試験では、反復強制経口投与での NOAEL は、120 mg/kg であり(Irwin 1990)、さらに、Chengelis(1997)や Appel(2001a)の 28 日間試験では、NOAEL は、それぞれ 100[当該試験における最高用量(HDT)]および 96 mg/kg/日であった(4.1.2.6 項参照)。

マウスやイヌおよびモルモットの LD₅₀ は、より高値であった。具体的には、マウスでは 400~500 mg/kg 体重の範囲の値 [Fassett, 1963; Lucik *et al.*, 1961; Kuznetsov, 1967 (全て DECOS, 1996 で引用)]が、イヌでは 650~950 mg/kg 体重の範囲の値[Fassett, 1963; Deichmann, 1969 (両方とも DECOS, 1996 で引用)]が報告されている。モルモットの LD₅₀ は、541 mg/kg 体重であった[Kuznetsov, 1967 (DECOS, 1996 で引用)]。これらの試験は全て、詳細情報を得ることはできていない。

Shimizu and Kanisawa(1986)の試験においては、肝臓の形態学的変化が検討されている。この試験では、6週齢の雄のWistarラット32匹に、フルフラルを50 mg/kg体重の用量で、水溶液として単回強制経口投与し、投与の6、12、24および48時間後に、それぞれ8匹ずつを屠殺した。対照群を設け、結果を比較した。投与群のラットの肝臓には、散在性の好酸性小球が認められ、有糸分裂像を示す肝細胞の数が有意に増加し、この所見は6時間後でも最も顕著であった。6時間後における有糸分裂指数は、対照群で 1.75 ± 0.43 であったのに対し、投与群では 24.88 ± 8.52 であった。有糸分裂指数は、その後の時点での分析では減少していき、単回投与では急速に回復することが示唆された。さらに、単回投与では、局所的もしくは広範におよぶ壊死は認められなかった。致死率に関する報告はなされていない。

吸入

ラットの1時間曝露における LC_{50} 値は、 4075 mg/m^3 と報告されている(Terrill *et al.*, 1989; Terrill, 1987)。4時間曝露の場合は、600[Marhold, 1972 (DECOS, 1996で引用)]および 924 mg/m^3 (Terrill *et al.*, 1989)という値が報告されている。フルフラルの6時間曝露 LC_{50} については、ラットでは 688 mg/m^3 (Terrill *et al.*, 1989)、マウスでは 490 mg/m^3 (Woods and SeEVERS, 1955)という報告がある。

10匹のラット(雌雄5匹ずつ)を 1280 mg/m^3 の濃度で3もしくは6時間曝露した場合には、初回曝露中または初回曝露後に全例が死亡したが、 640 mg/m^3 での3時間曝露では、全く死亡例は認められなかった。 640 mg/m^3 での6時間曝露では、1、4および5日後に、10匹中1匹が死亡し、2匹が曝露の8日後に死亡した(Muijser, 2001; Arts *et al.*, 2004)。

Terrill(1987)およびMuijser(2001)の試験を除くと、これらの試験の殆どについて、詳細な情報は得られていない。

雌雄のSprague-Dawleyラット(各群雌雄5匹ずつ)を、1922、3910、4708もしくは 7223 mg/m^3 の濃度のフルフラルに1時間曝露した場合には、動作の緩慢化(全曝露群)、沈鬱状態や細目および多呼吸(最高濃度群)などの、毒性徴候が認められた。3910もしくは 4708 mg/m^3 で1時間曝露した際に見られた毒性徴候は、沈鬱状態、呼吸困難、分泌増加反応などであった。これらの所見の発生率は、おおそ曝露に関連する様相を示した(重症度に関するデータは得られていない)。 7223 mg/m^3 で1時間曝露した場合には、全てのラットが曝露後30分で死亡した。他の曝露群では、生残したラットのほとんどが、曝露後14日以内に完全に回復した。剖検で認められた曝露に関連した所見は、脾臓の褪色化と気道における変化であった。この試験報告では、生残ラットで見られた影響と死亡ラットで見られた影響とが区別されていない。この試験では、1時間 LC_{50} は 4075 mg/m^3 であると判断された(Terrill, 1987;

Terrill *et al.*, 1989)。体重に対する影響は認められなかった (Terrill *et al.*, 1989; Terrill, 1987; Gupta *et al.*, 1991)。

経皮

ウサギにおける LD₅₀ は 310 mg/kg 体重超 [Moreno, 1976 (Opdijke 1978 で引用)]、モルモットにおける LD₅₀ は 10000 mg/kg 体重未満 [Fassett, 1963 (DECOS, 1996 で引用)] であると報告されている。ウサギでは、620 mg/kg 体重が致死用量であると報告されている [Moreno, 1976 (Opdijke, 1978 で引用)]。ただし、これらの試験に関する詳細な情報は得られていない。Woods and Seevers (1955) は、報告内容が乏しいが、ウサギを用いた試験を行っている。無希釈のフルフルアル 1000 mg/kg 体重を 12 時間皮膚適用 (閉塞条件) した後、全例 (6 匹、系統は不明) が死亡したという結果が得られた。45~500 mg/kg 体重の範囲の用量で 22 匹のウサギに適用した場合には、致死的影响は認められなかった。

皮下

皮下注射の場合、ラットにおける LD₅₀ 値は 148 mg/kg 体重 [Deichmann, 1969 (DECOS, 1996 で引用)]、イヌでは 214~850 mg/kg 体重 [Jeffroy and Servauz, 1896 (DECOS, 1996 で引用) および Sax, 1984]、ウサギでは 119-223 mg/kg 体重 (Sax, 1984; Castellino *et al.*, 1963) であった。

腹腔

マウスにおける LD₅₀ 値は 102 mg/kg 体重 [Klucik *et al.*, 1961 (DECOS, 1996 で引用)]、ラットにおける LD₅₀ 値は 20~121 mg/kg 体重 [Fassett *et al.*, 1963; Castelli *et al.*, 1967, (両方とも DECOS, 1996 で引用)] であった。ウサギにおける LD₅₀ 値は 310 mg/kg 体重超 [Moreno, 1976 (Opdijke, 1978 で引用)] であり、モルモットでは、10000 mg/kg 体重未満 (Fassett, 1963; DECOS, 1996 で引用) であった。

21 匹の雄の Wistar ラットを、7 匹ずつ 3 群に分けた。第 1 群には、0.1 mL のプロピレングリコールを媒体として、20 mg/kg 体重のフルフルアルを腹腔内投与し、第 2 群には 50 mg/kg 体重を投与した。残りを対照群とし、0.1 mL のプロピレングリコールを腹腔内投与した。腹腔内注射の 6 時間後、ラットを解剖し、肝臓の組織酵素学的検討を行った。フルフルアルの投与により、コハク酸脱水素酵素および ATP 分解酵素活性が、用量に関連して低下した。また、酸ホスファターゼおよび DNA 分解酵素 II 活性が、用量に関連して増高した。アルカリホスファターゼ活性は、両投与群で同等に抑制された。組織酵素学および形態学的検討の結果、細胞損傷が明らかとなり、その結果、細胞内異化作用が亢進したことが示され

た(Jonek *et al.*, 1975)。Konecki *et al.* (1974)は、曝露により、小腸において、ミトコンドリアおよびその酵素の損壊が引き起こされることを明らかにした。

ヒトにおけるデータ

Ubaydullayev(1970)により、低濃度のフルフラル蒸気がヒトの反射能力に対して及ぼす影響、フルフラルの臭気閾値、眼の光感受性に対する影響、ならびに大脳皮質の電氣的活動に対する影響に関して、検討が行われている。検討されたパラメータの毒性学的意義が不明確であること、および、長時間高濃度のフルフラル蒸気に曝露された動物において神経症状が現れていないことから、この試験は、リスク評価に有用ではないと考えられる。

刺激作用(4.1.2.3 刺激性の項を参照)を除き、フルフラルのヒトにおける急性毒性については、意義を有しかつ信頼性のあるデータを得ることができていない。

結論

上述の試験は、OECD や EU のガイドラインに準拠して実施されたとは考えにくく、また、データの大部分は古くて詳細に報告されていない。しかし、この文書の作成にあたり、様々な文献から得られた大量のデータについて検討が行われており、急性経口毒性および急性吸入毒性に関しては、付属文書 VIIA の要項を十分満たしていると考えられる。急性経皮毒性については、わずかなデータしか得られなかった。ウサギに関しては、最小致死用量(LD_{low})が 620 mg/kg 体重であると報告されている。しかし、この試験の詳細な情報は得られていない。

得られたデータに基づき、発がん性・変異原性・生殖毒性作業部会(the CMR Working Group)は、フルフラルについて、経口摂取もしくは吸入すると有毒(T)であり、皮膚接触すると有害であると判断し、T; R23/25 および Xn; R21 として(指令 67/548/EEC に従って)分類されるべきであるとの決定に至った(2003年11月)。

4.1.2.3 刺激性

動物におけるデータ

皮膚

フルフラルは、ウサギにおいて、500 mg で 24 時間適用した場合に、皮膚刺激性を示したと報告されている (DECOS, 1996; Sax, 1984) が、詳細情報 (重症度評価点など) は得られていない。また、モルモットにおいては、純粋フルフラル液の 4 時間皮膚適用を 3 日間実施した場合に、重度だが可逆的な皮膚刺激症状が生じたと報告されている。5% フルフラルを用いた場合には、極軽微な反応が示され、1% フルフラルを適用した場合には、試験の間中、刺激症状は全く生じなかった [Agakishiyev, 1989 (Cocker *et al.*, 1992 で引用)]。これに続く試験において、フルフラルの 4 時間適用が、連続 20 日間、損傷のない剃毛皮膚を対象にして実施された。無希釈フルフラルが適用され、過形成、角化亢進ならびに表皮剥離が生じた。5 もしくは 1% フルフラルを適用した場合にも、同様の影響が見られたが、重症度は低かった [Agakishiyev, 1990 (Cocker *et al.*, 1992 で引用)]。報告内容が乏しいが、Woods and Seevers (1955) の試験においては、無希釈のフルフラル (45~1000 mg/kg 体重) が、ウサギの剃毛したが擦過処置を施していない皮膚に、48 時間適用 (閉塞条件) された。さらに 48 時間経過した時点で、45~500 mg/kg 体重群において、軽度の局所刺激症状が観察された。この刺激症状の重症度 (評価点など) や可逆性についてのデータは得られていない。ただし、1000 mg/kg 体重群では、全てのウサギが 12 時間以内に死亡したにも関わらず、フルフラル適用後 12 時間の時点で、適用箇所刺激症状の所見は認められなかった。

これらの試験に関しては、より詳細な情報は得られていない。

上述のデータに基づくと、フルフラルは、長時間 (具体的には 48 時間) の皮膚接触により、軽度の刺激作用を示すと結論付けられる。

眼

記述内容が乏しいが、Woods and Seevers (1955) の試験において、無希釈のフルフラルが、雄の白ウサギ 15 匹の眼に滴下された。0.001~0.002 mL を点眼した群で、軽微な結膜浮腫が認められた。0.04 mL 点眼群では、眼瞼痙攣をともなう顕著な刺激症状が、約 5 日間継続したと報告されている。7 日目には、眼は、おおよそ正常と思われる状態になった。0.09~1 mL 点眼群では、重度の角膜混濁を伴う眼瞼痙攣が 7 日間継続した。9 日目には、眼は、おおよそ正常と思われる状態になった。

フルフルアル蒸気がウサギの眼に対して刺激性を示したことが報告されている (DECOS, 1996; Sax, 1984) が、二次文献であるため、詳細情報 (重症度評価点など) は得られていない。データは少ないが、フルフルアルは、眼に刺激性を示すと結論付けられる。

吸入

フルフルアルの感覚刺激性が、B6C3F1 マウスおよび Swiss-Webster マウスを用いて検討されている。感覚刺激性は、Alarie の方法に準じて、吸入曝露中の呼吸数 (RR) 低下度を測定することにより定量した。その中で、RD₅₀ が、呼吸数に 50% の減少が認められる濃度と定義されている。RR は、曝露前の 5 分間、10 分間曝露の間および回復期間の 5 分間、記録された。著者によると、フルフルアルに曝露された B6C3F1 マウスでは、曝露開始時に急速に RR が低下し、曝露期間中は殆どもしくは全く回復することがなかった。Swiss-Webster マウスは、曝露期間中、特に高曝露濃度の場合 (約 118~3930 mg/m³)、RR の継続的な低下を示した。RD₅₀ 値は、B6C3F1 マウスでは 920 mg/m³ (95% 信頼限界値: 684~1285 mg/m³)、Swiss-Webster マウスでは 1128 mg/m³ (同 849~1580 mg/m³) であった (Steinhagen and Barrow, 1984)。

反復曝露では、気道刺激性が示されている (より詳細な記述は 4.1.2.6 項および 4.1.2.8 項を参照)。関係する試験について、以下に簡潔にまとめた。

いくつかの反復曝露試験において、気道刺激症状が観察されている。フルフルアルが誘発したと考えられる組織病理学的変化が鼻で認められた。しかし、その変化が認められたのは、最高濃度 2165 mg/m³ のフルフルアル蒸気に 1 日 6 時間、1 週間に 5 日で 13 週間にわたって曝露された、Syrian ゴールデンハムスターだけであった。それらの変化は、具体的には、嗅上皮の限局性萎縮 (粘膜固有層の感覚細胞の集簇を伴うもの有り) や、扁平もしくは立方上皮に覆われた嚢胞様構造 (ムチン物質や細胞の破片が詰まったもの有り) の出現であった。これらの変化の発生率や重症度は、明らかに用量に関連していた。

ウサギを用いた試験では、最高 1000 g/m³ の濃度で 1 日 4 時間、1 週間に 5 日で死亡するまで (80 日未満) 吸入曝露が行われた。1000 g/m³ 群のウサギでは、結膜および上部気道粘膜に、刺激症状が現れた。剖検では、肺が鬱血し、水腫様状態を呈していた。供試されたウサギについて、さらに詳しい検討は行われなかった。

F344 ラットをフルフルアル蒸気に曝露した試験が行われている。各群雌雄 5 匹ずつを、最高 1280 mg/m³ の濃度で 1 日 6 時間、28 日間にわたって曝露した。組織病理学的変化が鼻腔に限局的に現れ、扁平上皮化生や異型過形成などの呼吸上皮病変、および、上皮細胞の乱列を特徴とした嗅上皮の変化が認められた。20 や 40 mg/m³ といった低濃度では、影響 (移行

呼吸上皮の化生および過形成)は、ほとんど鼻腔前方に局限して見られた。それより高濃度 ($\geq 80 \text{ mg/m}^3$) では、鼻腔のより後方の部位で、被覆上皮に処置に関連した変化が認められた。影響の発生率や重症度は、高濃度になるほど高かった。

ヒトにおけるデータ

フルフルアル蒸気のヒトに対する刺激性に関するデータが、米国産業衛生専門家会議 (ACGIH, 2001) から提示されている。米国労働安全衛生研究所 (NIOSH) が研磨盤製造工場で実施した調査では、 $20\sim 63 \text{ mg/m}^3$ の範囲の濃度のフルフルアルが検出され、その蒸気によると考えられる眼や気道の刺激症状が、全般的に高率に認められた。眼における刺激症状が、15 人中 11 人の作業員に、痒み、熱感、流涙ないしは発赤として現れた。従業員 10 名は、頻発する鼻の刺激症状(鼻詰まりや乾燥もしくはヒリヒリ感、および散発的な血液様鼻汁分泌 1 例)を訴えていた。7 名は、口やのどの乾燥があることを報告していた (ACGIH, 2001)。

NIOSH は、アルミニウムグラファイト管製造会社において、健康被害評価を実施した。眼や口および鼻への刺激作用、そして呼吸器症状が見られたことが報告されている。従業員が呼吸する空間でのフルフルアルの時間加重平均濃度は、15 箇所中 11 箇所において、許容濃度の 8 mg/m^3 (2 ppm) を超えていた ($0.3\sim 4.2 \text{ ppm}$ の範囲)。しかし、他の有害物質(呼吸可能な径の粒子やフェノール)や要因による影響の可能性も排除できず、しかもそれらについては不明なままである (NIOSH, 1995)。したがって、これらの結果は、フルフルアルの評価をするためには有用ではない。

ヒトにおける皮膚刺激性については、詳細なデータは得られていない。

結論

データが得られた動物試験は、OECD や EU のガイドラインに準拠して実施されたものではなく、また、データは古く、報告内容も乏しいものであった。しかし、得られたデータは、フルフルアルの眼や皮膚への刺激性に関し、付属文書 VIIA の要項を十分満たしていると考えられる。

フルフルアルの液体は、長時間(具体的には 48 時間)の接触や反復曝露により、軽微な皮膚刺激症状を引き起こす。希釈したフルフルアルを皮膚に反復適用した場合は、刺激の徴候は、より軽微なものであった。試験の質は高いものではなく、比較的高濃度で実施されており、それらの設定曝露条件(閉塞下 48 時間または反復曝露)も限定的で、また、認められた影響は穏和な性質のものであった。こうした点はあるものの、分類および危険物質の標識に関する

る CMR 作業部会は、2000 年に、フルフラルを、指令 67/548/EEC に基づいて刺激性を有する物質に分類すべきであると判断した。さらに、指令 67/548/EEC に関する CMR 作業部会は、眼や気道に刺激性を有する(指令 67/548/EEC に基づく分類 Xi; R36/37/38)と結論付けた。

4.1.2.4 腐食性

フルフラルが腐食性であることを示唆する情報は全く得られていない(刺激性の項参照)。

分類は必要ないと考えられる。

4.1.2.5 感作性

フルフラルの感作性について、雌雄 10 匹ずつの Hartley Albino モルモットを用い、ビューラー法により検討されている(Kern, 1997)(感作誘導および感作惹起とも濃度 100%で実施)。マキシミゼーション法ではなくこの方法を用いて実施した根拠については、この試験報告書では詳らかにされていない。感作誘導相では陰性対照が設けられていなかったが、技術的な点では、この試験は OECD 試験ガイドライン 406 に準拠して実施された。いくつかの(非常に)軽微な皮膚反応が、感作惹起の後に観察された。これらの反応は、陰性対照群(感作誘導相でフルフラル投与を受けているが、感作惹起層では投与されていない)でも認められた。したがって、この試験結果に基づく、フルフラルは、皮膚刺激性物質ではないと考えられる。

モルモット・マキシミゼーション法(OECD 406)により、GLP に準拠した試験が行われている。フルフラル(純度 99.62%)が、各群雌雄 10 匹ずつの Hartley 系モルモットに投与され、雌雄 5 匹ずつの対照群が設けられた(Illovo Sugar, 2003)。予備的試験の結果に基づき、皮内感作誘導には、プロピレンを媒体とした 5%フルフラル液が投与され、塗布による感作誘導には、無希釈フルフラル(0.2 mL)が適用された。この皮内投与により、処置を受けた 14/20 匹において、浮腫を伴った非常に軽微な紅斑が出現した。一方、塗布による適用(閉塞下で 48 時間)の場合は、13/20 匹で非常に軽微な紅斑が、8/20 匹で非常に軽微な浮腫が、それぞれ認められた。感作惹起では、アセトンを媒体とした 25%フルフラル 0.2 mL が、閉塞条件下で 24 時間適用された。感作誘導を受けた群において、皮膚反応(非常に軽微な紅斑)が、感作惹起 24 時間後に 3/20 匹で、48 時間後に 2/20 後に認められた。対照群では、反応は認められなかった。利用した技法の感度および信頼性については、本試験の 6 ヶ月以内に陽

性対照試験を行って評価した。陽性対照物質として用いられた 2-メルカプトベンゾチアゾールにより、期待された陽性反応が発現した。この結果に基づき、フルフラルは、この試験系において、感作能は無いと結論付けられる。

フルフラルを含む様々なアルデヒド化合物に関して、試験が行われている。雄の Hartley モルモットに、これらの化合物の 1% 溶液 (媒体は Tween 80 を 1% 含む生理食塩水) 0.1 mL が、7 日間皮内投与された (Watanabe *et al.*, 2001)。3 週間後、0.25、0.50、もしくは 1.0% の濃度のフルフラルを注射し、皮膚反応を最長 24 時間観察した。フルフラルは、供試した 3 匹のモルモットの内、1 匹に反応を生じさせただけであった。供試動物数が少ないなど、この試験デザインは常法を逸しており、また、OECD のガイドラインに準じて適切に実施された試験のデータが得られていることから、この試験は考慮の対象外とする。

呼吸器感作については、データが得られなかった。

ヒトにおけるデータ

フルフラルによる、ヒトにおける感作症例は、得られていない。少数の 2 次的資料が得られている (Sittig *et al.*, 1991; Borelli, 1988; Foussereau *et al.*, 1982) が、その中では、フルフラルが接触アレルギー起因物質である可能性について言及されている。しかし、この知見を実証する詳細な情報は得られなかった。

結論

得られたデータにより、指令 67/548/EEC の付属文書 VIIA に規定されている基本要項は満たされているものと考えられる。それらのデータから、フルフラルには皮膚感作性は無く、指令 67/548/EEC の付属文書 I に基づいて分類ないしは標識する必要は無いと結論付けられる。

4.1.2.6 反復投与毒性

動物におけるデータ

リスク評価において最も意義のあると結論付けられる反復投与試験について、それらの結果を、Table 4.14 にまとめて示した。

経口

フルフルアルの反復毒性が、OECD の試験ガイドライン 407 に準拠して適切に実施された 28 日間試験において検討されている(神経毒性に関する検討も兼ねていた)。この試験では、Sprague-Dawley ラット(各用量雌雄 6 匹ずつ)に、0、30、55 もしくは 100 mg/kg 体重/日の用量で、フルフルアルが強制経口投与された。媒体として、逆浸透処理した水が用いられた。22 日目に、対照群の雌が、1 匹死亡した。投与に関連した所見は認められなかった。全身毒性ならびに神経毒性に関する NOAEL は、100 mg/kg 体重/日(試験した最高濃度)であった(Chengelis, 1997)。

28 日間毒性試験がさらに 1 件、適切に(実質的に OECD 407 に準拠して)実施されている。この試験では、Fisher 344 ラット(各用量雌雄 5 匹ずつ)に、6、12、24、48、96 もしくは 192 mg/kg 体重/日の用量で、フルフルアル(コーン油で希釈)が、強制経口投与された。試験期間中に 2 回、雌雄とも最高用量を、144 および 120 mg/kg 体重/日に低減した。10、11 および 28 日目に、最高用量の雌が 1 匹ずつ、投与に起因して死亡した。最高用量で死亡例が見られたことと、最高用量群の雌で肝重量が増加したこと以外には、投与に関連した所見は認められなかった。この肝重量の増加については、当該群の動物数が少なかった(わずか 2 匹のみ生残)ため、十分な解釈を行うことができなかった。この試験から導かれる NOAEL は、96 mg/kg 体重/日である(Appel, 2001a)。

Table 4.14 Repeated dose toxicity.

| Study | NOAEL | LOAEL | Effects | Ref. |
|---|-----------------------------|-----------------------------|---|-----------------|
| Oral toxicity | | | | |
| subacute, rat (14 days, diet ^a ; 30, 60, 90, 120, and 180 mg/kg bw/d) | 120 mg/kg bw/d | 180 mg/kg bw/d | Decreased plasma ALAT in females, and corresponding increase in liverweight | Jonker, 2000a |
| subacute, rat (5 d/wk, 12 doses over 16 days, gavage; 15, 30, 60, 120, 240 mg/kg bw/d) | 120 mg/kg bw/d ^b | 240 mg/kg bw/d ^b | Increased mortality, laboured breathing | Irwin, 1990 |
| subacute, mouse (5 d/wk, 12 doses over 16 days, gavage; 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg bw/d) | 200 mg/kg bw/d ^b | 400 mg/kg bw/d ^b | Mortality | Irwin, 1990 |
| subacute, rat (7 d/wk, 4 wk, gavage; 6, 12, 24, 48, 96 and 192 (120) ^c mg/kg bw/d) | 96 mg/kg bw/d | 192 (120) | Mortality in females, increased liverweight ? ^d | Appel, 2001a |
| subacute, rat (7 d/wk, 4 wk, gavage; 30, 55, 100 mg/kg bw/d) | 100 mg/kg bw/d | n.a. | No treatment-related findings | Chengelis, 1997 |
| semichronic, rat (13 wk, diet ^a ; 30, 60, 90, 180 mg/kg bw/d) | 53 mg/kg bw/d ^e | 82 mg/kg bw/d ^e | Microscopic liver changes and slight haematological changes (males) | Jonker, 2000b,c |

EURAR: 2-FURALDEHYDE

| | | | | |
|--|--|---|---|---|
| semichronic, rat (13 wk, 5 d/wk, gavage; 11, 22, 45, 90, 180 mg/kg bw/d) | <11 mg/kg bw/d ^b | 11 mg/kg bw/d ^b | Cytoplasmic vacuolization of hepatocytes | Irwin, 1990 |
| semichronic, mouse (13 wk, 5 d/wk, gavage; 75, 150, 300, 600, 1200 mg/kg bw/d) | 75 mg/kg bw/d ^b | 150 mg/kg bw/d ^b | Decrease in body weight, histopathological changes in liver | Irwin, 1990 |
| Inhalation toxicity | | | | |
| subacute, rat (5 d/wk, 4 wk, (20), 40, 80, 160, 320, 640, 1280 mg/m³ (6 h), and (160), 320, 640, 1280 mg/m³ (3h)) | <20 mg/m ³ (local effects); 320 mg/m ³ (systemic effects) | 680 mg/m ³ | Meta- & hyperplasia of transitional resp.epithelium (anterior part nose); Mortality | IMuijser, 2001; Arts <i>et al.</i> , 2004 |
| semichronic, hamster (13 wk, 6 hr/d, 5 d/wk, 77, 448, 2165 mg/m³) | 77 mg/m ³ (local effects); 448 mg/m ³ (systemic effects) | 448 mg/m ³ 2165 mg/m ³ | Atrophy and hyperplasia of the olfactory epithelium; Marginally decreased body weights | Feron <i>et al.</i> , 1979; 1984 |

a) microencapsulated furfural in a carrier of maltodextrin and mixed sugars; b) based on a limited study design, see text below; c) due to mortality this dose level was lowered twice to 144 and 120 mg/kg bw/d resp. during the study; d) the small number of surviving rats precludes a treatment association for this finding; e) actual dose in target dose of 60 mg/kg bw/d.

n.a. not applicable

2年間試験で使う用量を判断するために、NTPによって用量設定試験が実施されている。この試験では、各群雌雄5匹ずつのF344/Nラットに、コーン油に混和したフルフルアルを、1週間に5日の割合で、16日間にわたり12回強制経口投与投与した(Irwin, 1990)。投与用量は、15、30、60、120もしくは240 mg/kg 体重/日であった。240 mg/kg 体重/日の投与を受けていたラットの生残数は減少し、8匹が投与に起因して死亡した。それより低用量の群では、死亡例は無かった。フルフルアルの投与を受けたラットにおける最終的な平均体重は、溶媒対照群の値と同等であった。240 mg/kg 体重/日群のラットには、努力性呼吸が見られた。120 mg/kg 体重/日群のラットは、活動性がやや低下した。

同じ試験において、B6C3F1マウス(各群雌雄5匹ずつ)に対し、25、50、100、200ないしは400 mg/kg 体重/日の用量で、同様の投与が実施されている。最高用量群の雄1匹が、投与に起因して死亡した。25および200 mg/kg 体重/日群では、雌マウスがそれぞれ1匹死亡した。この雌マウスの死亡は、両方とも強制経口処置に関連するものと考えられた。フルフルアルの投与を受けたマウスにおける最終的な平均体重は、溶媒対照群の値と同等であった。死亡率に基づき、この試験におけるNOAELは、200 mg/kg 体重/日と判断された。

どちらの場合においても、臨床症状、餌や水の消費量、検眼鏡検査、血液学的検査、臨床生化学的検査、尿検査および臓器重量についてのデータは、得られていない。剖検と組織病理学的検査は、全動物に対して実施された。投与群において、フルフルアルに関連した組織学的病巣は認められなかった。

さらに1件、2年間試験で使う用量を判断するための用量設定試験が、NTPによって実施されている(Irwin, 1990)。ラットとマウスに、フルフルアルが13週間強制経口投与された。死亡率、体重、臓器重量(生殖器官を含む)などが観察され、剖検による観察や組織病理学的観察(生殖器官を含む全面的なもの)も実施された。これらの観察は、溶媒対照群の動物全て、90もしくは180 mg/kg 体重/日の投与を受けていたラット、試験終了前に死亡した全てのマウス、および300、600もしくは1200 mg/kg 体重/日の投与を受けていたマウスについて行われた。全てのラットに対し、肝臓や肺の病理検査が実施された。

ラットには、F344 系統(各群雌雄 10 匹ずつ)が用いられ、コーン油に混ぜたフルフルアルが、11、22、45、90 ないしは 180 mg/kg 体重/日の用量で投与された。高用量群のラットの生残数は減少し、90 mg/kg 体重/日群の死亡率は 5/20 匹、180 mg/kg 体重/日群の死亡率は 19/20 匹であった。これらの死亡例の中には、強制経口処置によると考えられるものもあった(180 mg/kg 体重/日群の雄 3 匹および雌 1 匹、ならびに、90 mg/kg 体重/日群の雄 1 匹および雌 3 匹)。他の死亡例は全て、フルフルアル投与によるものと考えられた。死因についてはそれ以上詳細には特定されていない。フルフルアルを投与された雄ラットの平均体重は、用量関連的に増加した[有意な増加が 45 mg/kg 体重/日群(+5%)および 90 mg/kg 体重/日群(+7%)で確認された]。雌ではこのような影響は見られなかった。統計学的に有意な増加ではあったが、他の経口反復毒性試験においてこのような影響が見られていないことを考えると、毒性学的意義には疑義がある。肺の絶対重量の増加(用量関連性は無い)が、22、45 および 90 mg/kg 体重/日群の雄で観察された。雄ラットでは、腎臓の絶対重量の増加(45 および 90 mg/kg 体重/日群)、腎臓の相対重量の増加(90 mg/kg 体重/日群)、および肝臓の絶対および相対重量の増加(90 mg/kg 体重/日群)が観察された。雌ラットでは、腎臓の絶対重量の増加(22 および 90 mg/kg 体重/日群)だけが認められた。雄ラットでは、脳の絶対重量に、用量関連性の減少が認められた(22、45 および 90 mg/kg 体重/日群)。肝細胞の細胞質空胞変性が、投与を受けた雄の全用量群において、主として小葉中心領域に増加した(発生率は、対照群、11、22、45、90 mg/kg 体重/日群の順に、それぞれ 4/10、10/10、10/10、10/10、9/10 であり、投与群および溶媒対照群の全てにおいて、その程度は極軽微から軽微であった)。F344/N ラットを用いた経口投与による発がん性試験において、肝臓が主要な標的器官とされ、軽微な小葉中心性壊死が雄で認められている(Irwin, 1990)ことから、上述の影響が、重症度の増高は無いものの、投与に関連して生じている可能性があることを排除することはできない。22 mg/kg 体重/日で観察された肝臓の絶対重量への影響(雄)ならびに腎臓の絶対重量への影響(雌)については、それらが用量関連性を示していなかったため、毒性学的に有意であるとは考えられない。相対脳重量の変化(雄)については、絶対脳重量の変化が見られなかったことから、毒性学的意義は無いと考えられる。したがって、この限定的なデザインの試験結果からは、雄ラットで観察された肝細胞の細胞質空胞変性にに基づき、NOAEL は 11 mg/kg 体重/日未満と判断される。

同様の投与計画の下で、B6C3F1 マウス(各群雌雄 10 匹ずつ)に、75、150、300、600 ないしは 1200 mg/kg 体重/日のフルフラルを投与した試験が実施されている (Irwin, 1990)。高用量群のマウスの生残率は減少し、600 mg/kg 体重/日の投与を受けたマウスの死亡率は 18/20 匹であり、また、1200 mg/kg 体重/日の投与を受けたマウスは全例が死亡した。雄マウスでは、用量に関連する形で、平均体重が低下した〔有意な低下を示したのは 150 mg/kg 体重/日群 (-5%) および 300 mg/kg 体重/日群 (-6%)〕。肝臓や肺の相対重量の増加が、雄マウス (300 mg/kg 体重/日群) で観察された。腎臓や肝臓の絶対重量の増加が、雌マウス (300 mg/kg 体重/日群) で観察された。さらに、肝臓の相対重量の増加が雌で、腎臓の相対重量の増加が雄で、75 mg/kg 体重/日群において認められた。臓器の相対重量に関して認められたこれらの変化は、体重にも変化が認められており、また用量-反応関連性が見られなかったことから、投与に関連して生じたものではないと考えられた。また、肝臓重量の変化は、低用量群においては、組織病理学的変化を伴っていなかった。肝臓における小葉中心性凝固壊死および多巣性亜慢性炎症が、150 mg/kg 体重/日以上群の雄マウス、および 300 mg/kg 体重/日群の雌マウスで認められた。この限定的なデザインの試験結果からは、体重減少および肝臓における組織病理学的変化の基づき、NOAEL は、75 mg/kg 体重/日と判断される。

フルフラルを 90~120 日間経口(混餌)投与して、肝臓の形態学的変化を検討した試験が行われている。その結果、高用量を投与された Wistar ラット(飼料 1 kg 当たり 20~40 mL)において、肝臓への影響(重量増加および壊死を伴った胆管線維症)が示された (Shimizu et al., 1986, 1989)。ただし、この試験における投与用量の信頼性は低い。飼料 1 kg 当たり添加されたフルフラルの容量(mL)で示されたその投与用量は、他の試験における致死用量に相当する。フルフラルの揮発性について考慮されておらず、実際の摂取量はおそらくもっと少ないと考えられる。

マルトデキストリンと混和糖を担体としてフルフラルをマイクロカプセル化して混餌投与した、14 日間の用量設定試験が実施されている。各群雌雄 5 匹ずつの Fischer 344/N ラットに、投与用量が 0、30、60、90、120 および 180 mg/kg 体重/日となるように、フルフラルを含む飼料が与えられた (Jonker, 2000a)。もう 1 群を対照群として設け、カプセル材料のみを含む基礎飼料を与えた。体重測定を毎日行い、飼料消費量を毎週記録した。14 日目に剖検し、組織学的検査も実施した。臨床生化学的検査および尿パラメータに関する検査も実施した。その結果、臨床的な毒性徴候は見られず、全ての群で、体重や飼料消費量は正常であった。高用量側の 2 群の雄では、コレステロールやリン脂質濃度が僅かに上昇したが、これらの変化は用量関連性を示すものではなかった。これらの用量群の雌では、血中尿素窒素やクレアチニン濃度の減少が見られたが、これらの変化はやはり用量関連性を示すものではなかった。最高用量の雌で、血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性が有意に低下し、この変化は当該動物における肝臓の絶対重量ならびに相対重量の増加(それぞ

れ 111%ならびに 115%)と符合していた。したがって、NOAEL は 120 mg/kg 体重/日と判断された (Jonker, 2000a)。

続いて行われた 13 週間毒性試験では、各群雌雄 10 匹ずつの Fischer 344 ラットに、マイクロカプセル(担体はマルトデキストリンおよび混和糖)化されたフルフラルを含む飼料が投与された。目標投与用量は、0、30、60、90 および 180 mg/kg 体重/日であった。飼料の分析により、実際の投与用量は、雄では 0、26、53、82 および 160 mg/kg 体重/日、雌では 0、28、57、86 および 170 mg/kg 体重/日であったことが判明した (Jonker, 2000b)。対照として設けたもう 1 群には、フルフラル以外のカプセル材料のみを含む飼料を与えた。臨床的な毒性徴候を毎日観察し、体重および飼料消費量を毎週測定した。高用量群および対照群の動物については、検眼鏡検査を実施し、全ての動物について、臨床的パラメータを検討した。剖検では、肉眼的検査、臓器重量の測定、および一連の臓器に関する広範な組織学的検査が実施された。

臨床的な毒性徴候は認められず、体重や飼料消費量も、投与により影響を受けることはなかった。眼底検査では、対照群と比較して、最高用量群の動物において、変化は認められなかった。臨床生化学的検査では、いくつか変化が認められた。そのうち、血液学的変化としては、180 mg/kg 体重/日群の雄における赤血球数の減少、90 および 180 mg/kg 体重/日群の雄における赤血球容積ならびに平均赤血球ヘモグロビン量の増加が見られた。最高用量群の雌では、アルカリホスファターゼ活性の低下、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性の上昇、血漿中アルブミン濃度の上昇、ならびに血漿中カルシウム濃度の減少が認められた。最高用量群の雄では、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の低下、血漿中アルブミン濃度の上昇、ならびにアルブミン：グロブリン比の上昇が認められた。アルブミン：グロブリン比の上昇は 30 および 90 mg/kg 体重/日群の雄でも認められたが、60 mg/kg 体重/日群の雄では認められなかった。

剖検では、180 mg/kg 体重/日群の雄における肝臓の絶対ならびに相対重量の上昇が見られたが、肉眼的には病理学的変化は認められなかった。鏡検により、90 mg/kg 体重/日群の雄で 5/10 匹、180 mg/kg 体重/日群の雄で 10/10 匹に、肝臓における変化が明らかとなった。その変化は、主に小葉周囲領域に見られ、細胞質内の粗度が低下した細胞の出現、好酸球の集塊の発生率上昇、周辺部の密度低下、および核内におけるより明確な核小体の出現を特徴としていた。90 mg/kg 体重/日群で見られた変化は重度のものではなく、180 mg/kg 体重/日群のラットで見られた変化は軽微なもので、変性や壊死の徴候を伴うものではなかった。雌の肝臓には何の変化も認められず、変性、壊死ないしは炎症といった肝毒性の徴候も認められなかった。胆管の増殖も認められなかった。NOAEL は、60(実測では 53) mg/kg 体重/日であった (Jonker, 2000c)。

反復投与(慢性曝露)による毒性影響については、4.1.2.8 項「発がん性」において、さらに記載している。

吸入

フルフラルの吸入毒性が、Syrian ゴールデンハムスター(各群雌雄 10 匹ずつ)を用いて検討されている。各群を、0、77、448 ないしは 2165 mg/m³ の濃度のフルフラル蒸気に、1 日 6 時間、週 5 日で 13 週間、反復的に曝露した。死亡率算出、体重測定、血液学的検査、臨床生化学的検査、尿検査、臓器重量測定、組織病理学的検査等を実施した。最高曝露濃度では、フルフラルにより、眼や鼻への刺激、軽微な発育遅延、すなわち主として雄における統計学的に有意な体重低下(6 週目の終わりで-9%、8 週目の終わりで-9%、12 週目の終わりで-8%、13 週目の終わりで-8%)、および、雄における肝臓の相対重量の増加が誘発された。剖検の際の肉眼的検査では、フルフラルへの曝露によると思われる病理学的変化は認められなかった。雄において肝臓の相対重量の増高が認められたが、肝臓に組織病理学的変化が見られなかったこと、Syrian ゴールデンハムスターを用いた 52 週間試験では肝臓への影響が見られなかった(4.1.2.8 項発がん性の「吸入」の欄を参照)のこと、および体重低下が見られたこと(肝臓の絶対重量のデータは示されていない)から、この影響は、曝露処置に関連したものではないと考えられた。フルフラル曝露に関連した組織病理学的変化は、鼻でのみ認められた。具体的には、嗅上皮の限局性萎縮(粘膜固有層の感覚細胞の集族を伴うもの有り)や、扁平もしくは立方上皮に覆われた嚢胞様構造(ムチン物質や細胞の破片が詰まったもの有り)の出現であった。448 および 2165 mg/m³ の曝露における、これらの変化の発生率ならびに重症度は、明らかに用量に関連していた。最低曝露濃度の 77 mg/m³ では、フルフラルに関連した変化は何も認められず、この値が局所的影響に関する NOAEL であると判断された(Feron *et al.*, 1979, 1984)。全身的影響に関する NOAEL は、448 mg/m³ である。

ウサギ(使用動物数や系統に関するデータ無し)を用いた吸入曝露試験が実施されている。200、500 ないしは 1000 g/m³/h の濃度で 1 日 4 時間、1 週間に 5 日、動物が死亡するまで(80 日未満)曝露が行われたが、検討された毒性学的パラメータは数少なかった。500 および 1000 g/m³/h の曝露で、17~20 日および 8~10 日目に、それぞれ死亡が認められた。1000 g/m³/h の曝露を受けたウサギでは、結膜や上部気道粘膜の刺激症状が認められた。剖検では、肺に鬱血や水腫の徴候が認められた。この群のウサギに対しては、これより詳しい検討は為されなかった。500 g/m³/h の曝露を受けたウサギでは、腎臓の病変や貧血が見られた。肝機能に変化は見られなかった。200 g/m³/h の曝露を受けたウサギには、60~80 日の曝露後でも、何ら毒性の徴候は認められなかった(Castellino *et al.*, 1963)。鼻の肉眼的剖検や組織病理学的検討は行われなかった。

F344 ラットを用いた試験では、各群雌雄 5 匹ずつを、フルフラルの蒸気に、目標濃度を 40、80、160、320、640 ないしは 1280 mg/m³ として、1 日 6 時間 28 日間曝露した。対照群には清浄な空気を供給した (Muijser, 2001; Arts *et al.*, 2004)。同時進行の別群 (各群雌雄 5 匹ずつ) を設け、320、640 ないしは 1280 mg/m³ の濃度で、1 日 3 時間、連日曝露を行った。毒性影響を解明するために、臨床症状観察、飼料消費量測定、体重および臓器重量測定、血液学および臨床生化学的検査、肉眼的解剖検査、および組織病理学的検査が実施された。肉眼的解剖検査および組織病理学的検査では、肝臓など、フルフラルの毒性に関する標的として既知の臓器に注目した。高用量の 2 群では、用量に関連して死亡例が認められた。1280 mg/m³ で曝露された動物は全て、最初の曝露処置中または処置後に死亡した (6 および 3 時間のいずれの曝露処置でも)。640 mg/m³ では、6 時間曝露処置の場合にのみ死亡例が認められ、1、4 および 5 日間の曝露後に 1 匹ずつ、そして 8 日間の曝露後に 2 匹が死亡した。死亡例が認められた群は対象から除外し、20 mg/m³ での 6 時間曝露処置群および 160 mg/m³ での 3 時間曝露処置群を追加導入した。320 mg/m³ 以下の群では、検討したパラメータに関して、曝露に関連した有意な変化は観察されなかった。組織病理学的変化は鼻道に局限して見られ、具体的には、扁平上皮化生や異型過形成などの呼吸上皮病変、および上皮細胞の乱列を特徴とした嗅上皮の変化が認められた。20 や 40 mg/m³ といった低濃度では、影響 (移行呼吸上皮の化生および過形成) は、ほとんど鼻腔前方に局限して見られた。それより高濃度 (≥ 80 mg/m³) では、鼻腔のより後方の部位で、被覆上皮に処置に関連した変化が認められた。影響の発生率や重症度は、高濃度になるほど高かった。興味深いことに、1 日 3 時間で曝露を施した動物の鼻道における組織病理学的変化は、発生率や重症度でみると、1 日あたりの曝露量が同じで 6 時間での曝露を施した動物でみられた変化よりも、軽度ないしは非常に軽度なものであった。この試験の結果を受けて、著者は以下の様に結論付けている。

- 曝露-死亡関係の傾きは非常に急であり、死亡は、濃度ではなく曝露量に関連しているものと思われる。
- 鼻で認められた局所的影響は、曝露時間よりもむしろ濃度に対する依存性がより高い。
- 局所的影響に関する NOAEC は、実際には 20 mg/m³ より低く、一方、全身的影響に関しては、320 mg/m³ である。

反復吸入曝露による毒性に関する追加データは、4.1.2.8「発がん性」の項で詳細に言及されている。

経皮

ウサギ (使用動物数や系統に関するデータ無し) を用い、肝臓や腎臓の機能、造血能、およびいくつかの方法により血液凝固能を検討した試験が行われている。フルフラルを連日皮

下注射した(25、2.5、0.5 ないしは 0.2 mg/kg 体重/日)結果、それらの機能に深刻な障害が引き起こされることが示されている。皮下注射は、1 週間に 5 日、動物が死亡するまで(80 日未満)行われた。死亡は、25 mg/kg/日の用量では 7~12 回の注射で、2.5 mg/kg/日の用量では 16~30 回の注射で、0.5 mg/kg/日の用量では 38~66 回の注射で発生した。これらの高用量側の 3 群では、腎臓や肝臓の機能検査において、組織学的影響を伴った変化が認められ、また、血液パラメータへの影響も観察された。最低用量群では、死亡は起こらず、機能検査や剖検における統計学的に有意な変化も見られなかった(Castellino *et al.*, 1963)。報告内容が乏しく、また適用経路が皮下であるため、この試験は、リスク評価においては有用でないと考えられる。

モルモット(1 群 8~10 匹)の無処置皮膚を剃毛し、そこへフルフルを 1 日 4 時間、連続 20 日間適用した試験が行われている。無希釈のフルフルが適用され、その結果、表皮の過形成、過角化および剥離が生じている。5 および 1%フルフル液では、同様の影響は現れたが、重症度は低かった。また、用量に関連した体重低下が観察され、それは肝臓の相対重量増加を伴うものであった(絶対重量増加は伴われなかった)。脾臓や腎臓の相対重量に、影響は見られなかった。他の観察所見としては、肝臓における大型の脂肪滴発現、白脾髄の過形成、および、腎臓の尿細管上皮における局所浸潤、多核化や「アルブミン性栄養障害 "albumin dystrophy"」が挙げられる(Agakishiyev, 1990: Cocker *et al.*, 1992 で引用)。この試験の内容は非常に貧弱であり、フルフルへの経皮曝露によるリスク評価を行う上で利用することはできない。

ヒトにおけるデータ

Vinogradova *et al.* (1968)の調査では、フルフル製造産業に携わる 65 名の作業員について、検査が行われている。調査対象の集団の構成は、男性が 43 名、女性が 22 名であった。曝露濃度は、加水分解作業部門における最高 10 mg/m³を始めとして、加水分解装置近傍では 20~30 mg/m³、洗浄を始めた直後の短い時間については 50~70 mg/m³となっていた。主訴としては、周期的な頭痛、眩暈(低頻度)、全身性虚脱、過敏、および消化不良症状が報告された。血液学的数値、生物学的指標、および内部臓器の機能面に関しては、有意な変化は検出されなかった。血液中の塩素含量が低下した症例が、26 件見られた。血漿および赤血球中におけるコリンエステラーゼに、幾分低下が見られた(詳細な記載は無い)。これらの症状が、フルフルとの接触があってから生じたものか、あるいは既往のものであったのかは不明である。対照集団について、作業員をどのように検査したのか(すなわちフルフル濃度をどのように測定したのか)について、また、どのように曝露量を見積もったのかについて、詳細な情報は提示されていない(Vinogradova *et al.*, 1968)。

結論

得られたデータは、リスクの操業評価に関する指令 67/548/EEC の付属文書 VIIA に定められた基本要項に関し、それを満たしているものと容認される。それらのデータから、反復吸入毒性ならびに反復経口毒性に関する NOAEL を導出することができる。反復経皮曝露による毒性を評価するのに適した試験データは得られていない。しかし、反復曝露において観察された影響は、全身影響に関する指令 67/548/EEC に基づく分類基準を満たすものではないと考えられた。

経口曝露

この曝露経路で実施された試験の多くは、強制経口投与で実施されている。導出された NOAEL は、200 mg/kg 体重/日から 11 mg/kg 体重/日未満の範囲の値をとった。試験デザインの質は多岐にわたり、OECD のガイドラインに準拠(ないしはおおよそ準拠)しているものもあれば、明らかに準拠していないものもあった。最小 NOAEL 値、すなわち 11 mg/kg 体重/日未満は、ラットを用いた亜慢性用量設定試験から導出されている (Irwin, 1990)。全ての強制経口投与用量で、雄ラットに、小葉中心領域の肝細胞の細胞質空胞化が認められた。この影響は、強制経口投与を行った発がん性試験においても、雄ラットに軽度の小葉中心性壊死が発生したことを考慮すると、投与に関連して生じたものと考えられる。

より新しいデータが Jonker による試験 (Jonker, 2000a-c) から得られている。これらの試験では、フルフラルが、揮発により逸失ないようにマイクロカプセル化され、混餌投与された。その中の 13 週間混餌投与試験では、82 および 160 mg/kg 体重/日の用量において、雄ラットで軽微な肝細胞変性などの影響が見られたが、雌ラットでは影響は見られなかった。したがって、この試験からは、NOAEL として、1 段階低い用量であった 53 mg/kg 体重/日 (目標曝露用量の 60 mg/kg 体重/日に相当) が確立され、この値は明らかに、上述の強制経口投与で得られた値よりも高い。

補足的な試験により、フルフラルが水性環境ではそのようにマイクロカプセル化しても、急速かつ完全に放出されてしまうことが示されている (Buck, 2000)。この点に留意しながらも、以下の理由により、上述の混餌投与試験から得られた NOAEL を、反復経口曝露におけるリスクの総合評価の出発点として選択する。すなわち、(i) フルフラルが混餌投与されていることで、強制経口投与の場合に生じ得る、好ましくない一時的な極大曝露が回避されている。(ii) マイクロカプセル化により、揮発によるフルフラルの損失が十分回避されており、結果としてフルフラルが、消化管の水性環境において、瞬間的に放出されるようになっている。(iii) 混餌投与により、コーン油を(フルフラル投与の際に)媒体として使用しな

くて済むようになっており、コーン油を用いて長期曝露をした際に生じ得ることが知られている形態学的な肝臓の変化を除外することができる。(iv) Irwin の強制経口投与試験(1990; ラットにおける 13 週間試験)は、用量設定試験に過ぎず、そのデザインが貧弱である。JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議; WHO, 2001)は、Jonker の 13 週間試験 (Jonker, 2000b,c) の評価を実施し、同様の結論に達している。

吸入曝露

情報が得られた試験の中で、Muijser が、局所的影響に関する NOAEC の最小値である 20 mg/m³ を報告している (Muijser, 2001; Arts *et al.*, 2004)。この濃度において、移行呼吸上皮の化生および過形成が、鼻腔の前方部分で観察された。この試験が、反復吸入曝露による局所的影響に関するリスクの総合評価において有用であると考えられる。

全身的影響に関する NOAEC の最小値は、やはり Muijser の試験で導出された 320 mg/m³ である (Muijser, 2001; Arts *et al.*, 2004)。著者によれば、この濃度は 92 mg/kg 体重/日に相当する (吸収率を 100%、換気率を 0.8 L/kg 体重、経口による吸収が 100%であると想定; Muijser, 2001; Appel, 2001b; Arts *et al.* 2004)。本文書では、経口による吸収率として 90%を採用し、約 100 mg/kg 体重/日という NOAEC を導出した。この 320 mg/m³ という濃度が、反復吸入曝露による全身的影響に関するリスクの総合評価における出発点としてみなされることになる。

フルフラルがもたらす毒性に対する感受性には、明らかに動物種差が存在する。ラットは、Syrian ゴールデンハムスターやウサギに比べ、フルフラルの毒性に対する感受性は、明らかに高いと思われる。代謝における相違が、このような動物種差の根底にある一因であると考えられるが、それを実証するデータは得られていない。

経皮曝露

反復投与経皮毒性に関しては、リスクの総合評価に使用できるデータは得られていない。反復投与毒性試験から、無影響量の値が 2 つ、すなわち経口および吸入曝露に関して得られており、そのうち、ラットを用いた 13 週間混餌投与試験で得られた経口 NOAEL 値を、リスクの総合評価において、経皮曝露による全身毒性を検討する際に使用することとなる。

4.1.2.7 変異原性

ここに記載した全ての試験が変異原性に焦点を当てて実施されたというわけではなく、特に「その他」で扱った試験はその類である。しかし、ここに記載した試験は、フルフラルの遺伝毒性(非遺伝毒性)を評価する上で重要なものと考えられる。

原核細胞, *in vitro*

原核細胞を用いた *in vitro* 試験について、重要と思われるものを多数、Table 4.15 にまとめた。主に TA 100 株を用いた Ames テストにおいて、弱い陽性が示されている。フルフラルに関して行われた細菌を用いた試験の中には、陰性結果を得たものもあったが、それらは概ね報告内容が不十分であった (Soska *et al.*, 1981; Shinohara *et al.*, 1986; Dillon *et al.*, 1992)。フルフラルは、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を用いた DNA 修復試験 (REC アッセイ) において、DNA 損傷を誘発した (Shinohara *et al.*, 1986)。

キイロショウジョウバエ

Woodruff *et al.* (1985) および Rodriguez-Airnaz *et al.* (1992) により、ショウジョウバエにおいて、フルフラルの変異原性が検討されている。結果を Table 4.16 にまとめた。Rodriguez-Airnaz *et al.* (1992) による試験では、フルフラルが、ショウジョウバエの生殖細胞や体細胞に対し、変異原性や染色体異常誘発性を示すことが明らかとされている。Woodruff *et al.* (1985) の試験では、伴性劣性致死突然変異の発生数に、不明瞭な増加が観察されている。対照群における致死例数が非常に少なかった (0/5865) ため、この増加の生物学的意義には疑義が残る。もし、致死例数が 1/5865 であれば、観察された伴性劣性致死突然変異の発生数における相違は、統計学的に有意とは言えず、通常の所見とみなされる。フルフラルは、ショウジョウバエの染色体において、相互転座を引き起こさなかった。したがって、Woodruff *et al.* (1985) の試験結果は、陰性であると考えられる。

哺乳類の細胞, *in vitro*

哺乳類の細胞を用いた *in vitro* 変異原性試験について、重要と思われるものを多数、Table 4.17 にまとめた。フルフラルは、代謝活性化系非存在下において、CHO 細胞および V79 細胞において染色体異常を誘発し、CHO 細胞やヒトリンパ球において姉妹染色体交換 (SCE) を引き起こし、またマウスリンパ腫細胞において遺伝子突然変異を生じた。これらのことから、

in vitro の哺乳類細胞系で遺伝毒性を示すことは明らかである。しかし、フルフルアルは、*in vitro* では、鼻粘膜上皮組織において、DNA 修復を誘発しなかった。

ヒトにおけるデータ

不定期 DNA 合成

Lake *et al.* (2001) は、微小肝切片を 4 人の提供者から入手し、*in vitro* で不定期 DNA 合成 (UDS) 試験を実施した。これらの肝切片を、³Hチミジンと 0~10 mM のフルフルアルを含む媒体中で、24 時間培養した。正味粒子数(すなわち核内粒子数から平均細胞質粒子数を差し引いた値)が、2~10 mM のフルフルアルを用いた場合に観察されたが、この増加は、核内粒子数が増加したことによるものではなかった。この増加は、フルフルアル誘発性の細胞毒性により、平均細胞質粒子数に濃度依存性の減少が生じ、核内粒子数にはそれほどの影響が及ばなかったために生じたものであった。一方、陽性対照物質を肝切片に作用させた場合は、UDS は(正味粒子数および核内粒子数の両方で)増高した(陽性対照物質は、0.02 ないしは 0.05 mM の 2-アセチルアミノフルオレン、0.002 ないしは 0.02 mM のアフラトキシン、および 0.005 ないしは 0.05 mM の 2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-*b*]ピリジン)。この試験からは、このようなヒト由来の試料において、フルフルアルは、UDS を誘発できないと結論付けられる。

哺乳類, *in vivo*

試験の情報を Table 4.18 にまとめた。マウスの骨髄細胞を用いた試験では、染色体異常や SCE の増加は認められなかったと報告されている (Irwin, 1990; Abbott *et al.*, 1991)。腹腔内注射で投与を行ったところ標的細胞に何ら毒性は示されなかったが、投与した用量は十分高いものと考えられた。Subramanyam *et al.* (1989) は、マウスを用いた試験で、分裂中期の骨髄細胞において、染色体突然変異が誘発されたことを示した。しかし、この報告は要約のみであり非常にわずかな内容しか提示されておらず、それ以降は論文審査のある専門誌において公表されていないため、この試験の結果を評価することは困難である。

Lake *et al.* (2001) は、B6C3F1 マウスの雌雄および F344 ラットの雄に *in vivo* 投与を行い、それらの肝細胞における UDS を検討した結果を報告している。フルフルアルは、マウスに対しては 0(対照群)、50、175 ないしは 320 mg/kg 体重の用量で、ラットの雄に対しては、0、5、16.7 ないしは 50 mg/kg 体重の用量で、強制経口投与された。予備的な毒性試験により、マウスや雄ラットでの最大耐用量として、320 および 50 mg/kg 体重がそれぞれ確立されており、それらを最高用量とした。肝細胞は、投与後 2~4 もしくは 12~16 時間後に、肝臓

を灌流して分離し、³Hチミジンを含む培地で4時間培養培養し、オートラジオグラフィーにより粒子数を測定してUDSを検査した。その結果、フルフラルは、マウスやラットの肝細胞において、UDSに関して統計学的に有意な増加や用量関連性の影響を示すことはなかった。一方、3種類の陽性対照物質は、UDSの顕著な誘発を示した。これらの陽性対照物質は、ジメチルニトロソアミン、O-アミノアゾトルエン、および2-アセチルアミノフルオレンであり、それぞれ、20 mg/kg投与の2時間後、200 mg/kg 12~16時間後、および50 mg/kg投与の12~16時間後にUDSが検査された。

肝臓の *lacZ* 遺伝子に対するフルフラルの *in vivo* 突然変異誘発能が、遺伝子導入 CD2F₁ (BALB/c × DBA/2)マウスの40.6系統の雄を対象とし、*lacZ*-をレポーター遺伝子として用いて検討されている (Steenwinkel and Krul, 2003)。遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性試験に関しては、目下のところ、規定ガイドラインは策定されていない。したがって、この試験は、公表文献中の総説に示されたガイドラインに基づいて設定した手順に沿って、GLP条件下で実施された (Gorelick, 1995; Gorelick and Mirsalis, 1996)。この手順は、遺伝形質介在型の間接相互作用に関する外部関係者による審査 (ESR TMII, 2001) に先立ち、EU加盟各国により、意見交換文書のやり取りがなされたのち、暗黙的な了承を得ている。重要な試験とみなされるため、以下により詳細に記載する。

この遺伝毒性試験は、5群を設けて実施された。そのうち3群はフルフラルの投与を受ける群であり、1群は陰性対照群(媒体のみを投与)であり、これらの群には13匹と予備の2匹のマウスを配した。残りの1群は既知の変異原物質(エチルニトロソ尿素, ENU)の投与を受ける陽性対照群で、8匹と予備の2匹のマウスを配した。フルフラル投与群のマウス(予備を含む)には、コーン油に混ぜたフルフラルが、75、150ないしは300 mg/kg 体重/日の用量で、連続28日間、強制経口投与された。ENUは、5%のDMSOを含む生理食塩水に溶解し、50 mg/kg 体重/日の用量で、試験の5~9日目に、腹腔内投与された。28日目に、フルフラル投与群と陽性対照群のそれぞれから3匹を選んで屠殺し、被験化合物の肝毒性に関するデータ収集に供した。肝毒性は、臨床生化学的検査(血漿中のALAT、ASAT、アルカリホスファターゼ、ビリルビン、コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、総タンパク質、アルブミンおよびグロブリン)、および肝切片の組織学的検査により評価した。さらに、試験期間を通して、体重や臓器重量が定期的に測定された。

34ないしは35日の経過観察期間をおき、試験の62ないしは63日目に、生残動物の肝臓や他の消化管組織の試料を採集して固定し、突然変異の解析を行った。突然変異の解析は、対照群2群(媒体対照および陽性対照)およびフルフラル投与群から選択された、それぞれ8匹の肝臓について実施された。肝臓の試料1例あたり、少なくとも5000(好ましくは>120000)PFU(プラーク形成単位)を検査した(1 PFUは*lgt10lacZ* シャトルベクターの復帰変異コピー1個に相当する)。

300 mg/kg 体重/日のフルフルアルを投与されていた群では、3 匹が途中で死亡した (2 匹は投与期間中に何の臨床症状も示さずに死亡、1 匹は経過観察期間中に円背姿勢や立毛症状を示して死亡)。また、75 mg/kg 体重/日のフルフルアルを投与されていた群では、1 匹が死亡した (経過観察期間中に行動が不活発になり死亡)。これらの 4 匹のいずれについても、他の死因が確認できないことから、試験実施者は、これらの死亡例は、投与に関連して起きたものとみなしている。他の動物ではいずれにおいても、臨床症状は全く認められなかった。75、150 および 300 mg/kg 体重/日投与群の体重は、投与期間の第 1 週目において、陰性対照群と比較して、用量関連性の増加を示した。投与後の経過観察期間になると、陰性対照群と 150 mg/kg 体重/日以下のフルフルアル投与群との間の差異は、徐々に無くなっていった。300 mg/kg 体重/日投与群では、投与後の経過観察期間になっても、高体重が維持された。肝毒性評価のために屠殺されたマウスの血液における臨床生化学的パラメータの検査により、300 mg/kg 体重/日の最高用量でフルフルアルを投与した群で、トリグリセリド含量が統計学的に有意に増加したことが判明した。この影響を示したマウスでは、肝臓の絶対および相対重量も統計学的に有意に増加し、また、組織病理学的検査では、肝臓の小葉中心性肥大が認められた。これらのマウスの内 1 匹では、肝臓に、炎症性反応を伴った限局性出血も認められた。肝臓重量の増加は、試験の 62 ないしは 63 日目 (最後の投与の 34 ないしは 35 日後) に屠殺したマウスの肝臓重量には影響が見られなかったことから、不可逆的な変化ではないと考えられた。これらの結果から、最高用量ではある程度肝毒性が発現したと結論付けられる。

試験における PFU 値の範囲と観察された突然変異発生率を、下表に提示した。

| GROUP | range PFUs ¹ | MF ² |
|----------|--------------------------------|-----------------|
| Furfural | 0 | 61 ± 23 (8) |
| | 75 | 41 ± 7 (7) |
| | 150 | 54 ± 21 (8) |
| | 300 | 37 ± 16 (8) |
| ENU | 105 – 118 (2) 131 – 365 (6) | 246 ± 95 (8) |

1 Between brackets, the number of animals is given for the range of PFUs (in thousands). For animals for which < 120000 PFU were recovered the number are given separately. However, for statistical evaluation all animals belonging to one group were taken together.

2 MF mutation frequency. Data in the table are mean ± sd for 10⁶ PFUs

陰性対照群のマウスの肝臓から抽出した DNA について測定された突然変異発生率は、試験施設の背景データと同等であった。陰性対照群とフルフルアル投与群との間で、突然変異発

生率に有意差は認められなかった。遺伝子導入マウスにコーン油に混ぜたフルフラルを 300 mg/kg/日の用量で経口投与しても、肝細胞の *lacZ* 遺伝子に対する突然変異誘発は増高されないと結論付けられる。

ヒトにおけるデータ

Gomez-Arroyo and Souza(1985)は、フルフラルへの職業曝露を受けている作業員を対象に、SCE の分析を実施した。対照群と比較して、統計学的に有意な相違は認められなかった。ただし、曝露に関する十分なデータは得られなかった。

その他, *in vitro*

溶原ファージ誘導試験(Soska *et al.*, 1981)やミドリムシの Z 株を用いた葉緑体褪色化試験(Soska *et al.*, 1981)では、陽性活性は認められなかった。Meyberg *et al.*(1987)は、「花粉試験系」において、フルフラルの細胞毒性を検討した。「花粉」管の成長を 50%阻害すると見込まれる濃度である ED₅₀(影響用量)を、毒性の判定基準として用いた。その結果得られたフルフラルの ED₅₀ 値は 730 $\mu\text{mol/L}$ であり、この値は、植物に対して高い細胞毒性を示す塩化トリエチル鉛の ED₅₀ 値(7 $\mu\text{mol/L}$)よりもはるかに高い。

DNA との相互作用

Alkaline unwinding 試験および様々な制限酵素の作用に対する切断部位の保護試験によって、フルフラルと仔ウシ胸腺 DNA との相互作用が検討されている。Alkaline unwinding 試験の結果から、2 本鎖 DNA に多数の鎖切断が生じたことが示され、この影響は、フルフラルの濃度の上昇や反応時間経過とともに増高した(Uddin and Hadi, 1995; Hadi *et al.*, 1989)。 λ ファージの DNA をフルフラルで処置した場合には、フルフラルは排他的に AT 塩基対と反応するという知見が得られた。この反応が生じるためには、最低 3~4 個の連続した AT 塩基対が必要であった(Hadi *et al.*, 1989)。仔ウシ胸腺の 2 本鎖 DNA 中の AT 塩基対とフルフラルとの反応は、同じ試験グループで、1 本鎖特異的 DNA 分解酵素を用いて裏付けられている(Uddin, 1993)。

HeLa S3 細胞を用いた、免疫学的非放射活性 DNA 合成阻止試験が実施されており、フルフラルは、3 mM の濃度で、DNA 合成を 50%抑制する能力を示した(Heil and Reifferscheid, 1992)。

複製 DNA 合成

雄の B6C3F1 マウスに、0、100 ないしは 200 mg/kg の用量で、フルフルアルを強制経口投与した。24、39 および 48 時間後に、肝細胞を調製して、複製 DNA 合成 (RDS) を検査した。RDS 発生率の最高値は、200 mg/kg 投与群で観察され、曝露 48 時間後において 1.43% に達した。この試験系において、フルフルアルは、細胞分裂促進活性を示している (Miyakawa *et al.*, 1991)。この試験系では、非遺伝毒性 (すなわちサルモネラ菌を用いた試験系で陰性) の発がん物質の多くが、陽性を示していることに留意すべきである。

発がん遺伝子活性化

Reynolds *et al.* (1987) は、B6C3F1 マウスにおいて、フルフルアルにより誘発した肝腫瘍と自然発生した肝腫瘍との間に、発がん遺伝子の活性化様式の相違があることを見出した。この試験の結果から、フルフルアルが、少なくとも一部は、*ras* 遺伝子を軽度に活性化させる新規の点突然変異を誘発することにより、マウスの肝腫瘍を引き起こし、その発生率を上昇させることが示唆される。Reynolds *et al.* が検討した肝腫瘍は、NTP によって実施された B6C3F1 マウスにおけるフルフルアルの経口発がん性試験 (Irwin *et al.*, 1990) から得られたものである。

結論

報告内容が不十分である点が示されているが、得られたデータは、変異原性に関する付属文書 VIIA の基本要項を十分満たしていると考えられる。

フルフルアルは、*in vitro* において、染色体異常や遺伝子突然変異を誘発する能力を有すると結論付けられる。ただし、フルフルアルは、ヒトの肝臓の切片を用いて行った *in vitro* UDS 試験では陰性であった (Lake *et al.*, 2001)。

フルフルアルは、マウスに腹腔内投与した場合は、その骨髄細胞において、染色体異常や SCE を誘発しなかった。1 件の抄録で、フルフルアルが、マウスの骨髄細胞を用いた細胞遺伝学的試験において、陽性を示したことが報告されている (Subramanyam *et al.*, 1989)。しかし、この論文は、その後、審査のある専門雑誌に公表されなかったことから、十分に評価することができなかった。フルフルアルは、ラットやマウスを用いて肝細胞を対象にして行った *in vivo* UDS 試験において、陰性を示した (Lake *et al.*, 2001)。

lacZ 遺伝子導入マウス(系統 40.6)を用いた試験では、経口投与されたフルフラルが、発がん認められている(4.1.2.8 項参照)組織であるマウスの肝臓において、*in vivo* 遺伝子突然変異を誘発しないことが示された。

CMR 作業部会は、変異原性に関して得られたデータは、指令 67/584/EEC に基づく分類基準を満たしていないと考えられるとの決定を下した(2003 年 11 月)。

Table 4.15 Prokaryotic cells, in vitro.

| Cell type | Protocol | Metabolic activation | Concentration | Toxic concentration | Result (note strain indicated) | Comments | Ref. |
|---|---------------------------------|--|--|---|---|--|---------------------------------|
| <i>Bacteria, point mutations</i> | | | | | | | |
| S. typhimurium TA98, TA100 | Ames test (plate incorporation) | With and without (rat liver S9 Aroclor 1254-induced) | TA 100: 1-15 µl/plate TA98: 1-10 µl/plate | from lowest dose in both tested strains | + (TA100, +/- S9) - (TA98, +/- S9) | Normal Ames test procedure except for a larger incubation period (3-4 days); survival has been separately determined in the concentration range 1-10 µl/plate for TA98 en TA100. | Zzienicka <i>et al.</i> , 1978 |
| S. typhimurium TA98, TA100, TA1535 | Ames test (plate incorporation) | With and without (rat liver S9 phenobarbital-induced) | 0.05-60 µmol/plate | toxic, concentration is not reported | * (TA100, -S9, 60 µmol/plate) - (+S9) | Increase in revertants, however, less than 2-fold. | Loquet <i>et al.</i> , 1981 |
| S. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 | Ames test (pre incubation) | With and without (rat and hamster S9 Aroclor 1254-induced) | 33.3-6,666 µg/plate | (1) not toxic (2) toxic at ≥3,333 µg/plate | (1) - (2) * (TA100, -S9) - (+S9; TA98, TA1535, TA1537, -S9) | Substance was tested in two laboratories. The results are given separately for each of the laboratories. The discrepancies between the laboratories are likely due to the fixed en non-optimum protocol. | Mortelmans <i>et al.</i> , 1986 |
| S. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 | Ames test | With and without (no further details) | 500-10000 µg/plate | 1) TA98 > 7500 µg/plate | 1) (+) > 7500 TA100: + at 50000 µg/plate | | Jones, 1979 |
| <i>Bacteria, miscellaneous</i> | | | | | | | |
| Bacillus subtilis H17 Rec⁺, M45 Rec⁻ | Rec-assay | With and without | 1.7 - 17 mg/plate | | + | Results showed an increased killing in the DNA repair deficient strain, pointing to induction of primary DNA damage by furfural. | Shinohara <i>et al.</i> , |

* : means equivocal); (+): means weakly positive

Table 4.16 *Drosophila melanogaster*

| Protocol | Concentration | Result | Comments | Ref. |
|---|--|---|---|---------------------------------------|
| Chromosome loss in germ cells | 3750, 5000 ppm (feeding or injection) | + (repair-deficient females) - (repair-proficient females) | Duration feeding period unknown. | Rodriguez-Arnaiz <i>et al.</i> , 1992 |
| Wing spot test | 3750, 5000, 7500 ppm (inhalation) | + | Statistically significant increase in small single and total spots. | Rodriguez-Arnaiz <i>et al.</i> , 1992 |
| Sex-linked recessive lethal test | 100 ppm (one injection) 1000 ppm (3 days, feed) | - | | Woodruff <i>et al.</i> , 1985 |
| Reciprocal translocation | 1000 ppm (3 days, feed) | - | | Woodruff <i>et al.</i> , 1985 |

Table 4.17 Mammalian cells, in vitro.

| Cell type | Protocol | Metabolic activation | Concentration | Toxic concentration | Result | Comments | Ref. |
|------------------------------------|--|--|--|---|--------|---|-------------------------------|
| Chromosomal aberrations | | | | | | | |
| Chinese hamster V79 cells | Chromosomal aberrations | Without | 500-2000 µg/ml | no data | + | A dose-related increase in number of chromosome aberrations and a dose-related decrease in mitotic index were observed. | Nishi <i>et al.</i> , 1989 |
| CHO cells | Chromosomal aberrations | With (a) and without (b) (rat liver S9 Aroclor 1254-induced) | initial study (1): 1.5-5000 µg/ml independent repeat (2): 94-3000 µg/ml | 1a ≥1500 µg/ml 1b 5000 µg/ml 2a ≥750 µg/ml (20 h); ≥188 µg/ml (44 h) 2b 3000 µg/ml (20 h); ≥375 µg/ml (44 h) | + | Test was performed according to 92/67/EC B.10. | Gudi <i>et al.</i> , 1996 |
| CHO cells | Chromosomal aberrations | With and without (rat liver S9 Aroclor 1254-induced) | 10-40 mM | no data | + | The clastogenic activity of furfural was strongest in the presence of S9. | Stich <i>et al.</i> , 1981 |
| CHO cells | Chromosomal aberrations | With and without (rat liver S9 Aroclor 1254-induced) | 200 - 1230 µg/ml | no data | + | No data on classes of aberrations were available. | Galloway <i>et al.</i> , 1985 |
| Primary DNA damage | | | | | | | |
| CHO cells | SCE | With and without (rat liver S9 Aroclor 1254-induced) | 11.7 - 3,890 µg/ml | no data | + | | Galloway <i>et al.</i> , 1985 |
| Rat nasal epithelial tissue | UDS | Without | 5×10^{-7} - 1×10^{-3} M | no data | - | | Wilmer <i>et al.</i> , 1987 |
| Human liver slices | UDS | Without | $2 - 10 \times 10^{-3}$ M | Marked toxicity at 10×10^{-3} M with subjects B and D | - | Donors A-D; 2-AAF, Aflatoxine B ₁ , PhIP clearly positive at 0.05 mM and/or below. | Lake <i>et al.</i> , 2001 |
| Human peripheral blood | SCE | Without | $3.5-14 \times 10^{-5}$ M | no data | + | A dose-related increase in SCE's was found. Furfural also damaged spindle fibers. | Gomez-Arroyo and Souza, 1985 |
| Gene mutations | | | | | | | |
| Mouse lymphoma cells | TK ⁺ /TK ⁻ assay | Without | 25 - 800 µg/ml | ≥400 µg/ml | + | | McGregor <i>et al.</i> , 1988 |

Table 4.18 Mammals, in vivo.

| Species | Protocol | Concentration | Result | Comments | Ref. |
|--|---|---|--------|--|---|
| B6C3F1 mice | Chromosome aberrations in bone marrow cells | 50 - 200 mg/kg bw (once, intraperitoneal) | - | Dose levels used represented the MTD, 1/2 MTD and 1/4 MTD. Protocol shows, only slight deviations from OECD 475. | Irwin, 1990 (NTP); Abbott <i>et al.</i> , 1991 ³ |
| B6C3F1 mice | SCE in bone marrow cells | 50 - 200 mg/kg bw (once, intraperitoneal) | - | Dose levels used represented the MTD, 1/2 MTD and 1/4 MTD. Protocol shows, only slight deviations from OECD 475. | Irwin, 1990 (NTP); Abbott <i>et al.</i> , 1991 ⁴ |
| B6C3F1 mice | UDS in hepatocytes | 50 -320 mg/kg bw (once, gavage) | - | Dose levels used represented the MTD, 1/2 MTD and 1/6 MTD ⁵ . Protocol apparently according to OECD 486. | Lake <i>et al.</i> , 2001 |
| F344 rats (males) | UDS in hepatocytes | 5 - 50 mg/kg bw (once, gavage) | - | Dose levels used represented the MTD, 1/3 MTD and 1/10 MTD ⁵ . Protocol apparently according to OECD 486. | Lake <i>et al.</i> , 2001 |
| strain 40.6⁴ (males) | mutations in <i>lacZ</i> -gene in liver cells | 37.5-300 mg/kg bw/d (gavage; 28 days) | - | No OECD Guideline available for this type of study. | Steenwinkel and Krul, 2003 |

³ The study of Abbott et al. (1991) shows similarities with the study reported by Irwin (1990). It is not clear whether the same study is reported twice.

⁴ The study of Abbott et al. (1991) shows similarities with the study reported by Irwin (1990). It is not clear whether the same study is reported twice.

⁴ i.e. CD2F₁ (BALB/cxDBA/2) strain of mice

⁵ as established by dose-range finding studies by these investigators

4.1.2.8 がん原性

動物における試験

経口(がん原性)

各群雌雄 50 匹ずつの F344/N ラットに、フルフラル(純度 99%)をコーン油に混ぜて、0、30 ないしは 60 mg/kg 体重/日の用量で、週 5 日、103 週間にわたって強制経口投与した。この試験は、以下の点以外は、OECD 451 に準拠して実施された。すなわち、用量設定が 3 段階ではなく 2 段階であった点、飼料消費量が測定されなかった点、血液学的検査が行われなかった点、および、報告内容が全て(全個体)の結果について及んでいなかった点である。フルフラルの投与を受けた動物と、媒体のみを投与された動物とで、平均体重は、試験期間を通じて同等であった。高用量群の雌では、強制経口投与に関連して死亡が起こり、生残率が減少した(19/50)。しかし、この生残率でも、発がん性を検出するためには十分であると考えられた(0、30 および 60 mg/kg 体重/日群の平均生存日数は、それぞれ 650、670 および 585 日であった)。雌ラットでは、肺に鬱血を示した例数が増加した(0、30 および 60 mg/kg 体重/日群でそれぞれ 6/50、6/50 および 23/50)。雄ラットでは、フルフラルを投与した両群で、軽微な肝毒性を示した例数が増加した(軽微な小葉中心性壊死の例数；媒体対照 3/50、低用量 9/50、高用量 12/50)。腫瘍の発生率を Table 4.19 に示した。扁平上皮癌(低用量群の雄 1 匹)および乳頭腫(高用量群の雄 2 匹、低用量群と高用量群の雌 1 匹ずつ)が、前胃部に認められた。前胃部の過形成の発生率が、低用量群の雄でわずかに増加したが、雌や高用量群の雄ではこのような発生率の増加は見られなかった。したがって、これらの病巣は、投与に関連したものではないと考えられた。この試験の結果に基づくと、30 もしくは 60 mg/kg 体重/日の用量でフルフラル投与を受けた F344/N ラットの雌については、発がん性の証拠は示されなかった。しかし、60 mg/kg 体重/日の用量でフルフラル投与を受けた F344/N ラットの雄については、稀にしかみられない胆管がんが 2 匹で発生し(媒体対照の背景値は、雄ラットで 3/2,145)、また他の 2 匹で線維症を伴った胆管形成不全が見られており、これらに基づくと、フルフラルによる発がん性の証拠がある程度得られたと考えられる。線維症を伴う胆管形成不全は、胆管がん進展の初期段階とみなされる(Irwin, 1990)。

同じ試験(Irwin, 1990)において、各群雌雄 50 匹ずつの B6C3F1 マウスにも、同様の手順により、0、50、100 ないしは 175 mg/kg 体重/日の用量で、フルフラルが投与された。フルフラルの投与を受けた動物と、媒体のみを投与された動物とで、平均体重は、試験期間を通じて同等であった。軽度の肝毒性が示された(慢性炎症：0、50、100 および 175 mg/kg 体重/日の順で、雄で 0/50、0/50、8/49 および 18/50、雌で 0/50、0/50、1/50 および 8/50、色素沈着：0、50、100 および 175 mg/kg 体重/日の順で、雄で 0/50、0/50、8/49 および 18/50、雌で 0/50、0/50、

0/50 および 11/50)。重要と考えられる腫瘍の発生率を Table 4.20 に示した。肝細胞腺腫の発生率が、雄でも雌でも増加した(雌雄とも、比例的に増加し、高用量で有意な増加を示した)。肝細胞がんの発生率上昇は、雄マウスで認められた(比例的に増加し、高用量で有意な増加を示した)。対照群における肝臓腫瘍の自然発生率も高かったが、上述の主要は、フルフルアル投与に起因するものと考えられた。肝臓の慢性炎症が、腫瘍形成に影響を及ぼした可能性が考えられる。

腎皮質腺腫またはがんが雄マウス(0/50、1/50、1/49、1/50)で、前胃部の扁平上皮乳頭腫が雌マウス(1/50、0/50、1/50、6/50)で認められたが、これらはフルフルアル投与に関連して生じた可能性がある。しかし、本質的な腎尿細管細胞の過形成が見られておらず、また、新生物の発生率に用量関連性が見られなかったことから、これらの腎臓腺腫や腎がんは、投与に関連したものではないと考えられた。さらに、前胃部の扁平上皮乳頭腫については、発生率が低く、生物学的な影響力(すなわち非進行性～悪性新生物に至るものなのか)が不明確であり、また強制投与処置に関連して生じた可能性もあるため、フルフルアルへの曝露と関連付けて考えることは難しい。

これらの試験結果に基づき、フルフルアルは、経口投与により、マウスに対して発がん性を示すと結論付けられる。ラットでは、これよりも信頼性の低い知見しか得られていない。

Table 4. 19 Tumour incidences found in the carcinogenicity studies in rats by Irwin (1990).

| Organ/tumour type | Incidences | | | | | |
|-------------------------------------|----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|
| | 0 mg/kg bw/day | | 30 mg/kg bw/day | | 60 mg/kg bw/day | |
| | m | f | m | f | m | f |
| Forestomach Squamous cell carcinoma | 0/50 | 0/50 | 1/50 | 0/50 | 0/50 | 0/50 |
| Squamous cell papilloma | 0/50 | 0/50 | 0/50 | 1/50 | 2/50 | 1/50 |
| Liver Cholangiocarcinoma | 0/50 | 0/50 | 0/50 | 0/50 | 2/50 | 0/50 |
| Bile duct dysplasia with fibrosis | 0/50 | 0/50 | 0/50 | 0/50 | 2/50 | 0/50 |

m = male; f = female

Table 4.20 Tumour incidences found in the carcinogenicity studies in mice by Irwin (1990)

| Organ/tumour type | Incidences | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------|------|-----------------|------|------------------|------|------------------|------|
| | 0 mg/kg bw/day | | 50 mg/kg bw/day | | 100 mg/kg bw/day | | 175 mg/kg bw/day | |
| | m | f | m | f | m | f | m | f |
| Liver Hepatocellular adenoma | 9/50 | 1/50 | 13/50 | 3/50 | 11/49 | 5/50 | 19/50 | 8/50 |
| Hepatocellular carcinoma | 7/50 | 4/50 | 12/50 | 0/50 | 6/49 | 2/50 | 21/50 | 4/50 |

m = male; f = female

経口(助発がん性)

肝硬変と肝がん形成との相互関係を検討するために、フルフルアルで誘発した肝硬変を利用した。Wistar ラットの雄 16 匹から成る群に、フルフルアルを 120 日間混餌投与(飼料 1 kg 中 20~40 mL)し、2 週間基礎飼料で飼育した後、0.03%の N-2-フルオレニルアセトアミド(2-FAA)を 9 週間混餌投与した。その結果、フルフルアルを慢性的に混餌投与したことによって硬変が誘発された肝臓では、2-FAA による化学的肝臓がん形成が助長された(Shimizu, 1986)。しかし、この試験では、試験期間が短く、供試動物数も少なかったため、フルフルアルの(助)発がん性を評価する上では、有用性が低い。さらに、この試験で設定された用量の信頼性にも疑義がある。用量は、飼料 1 kg 当たりの用量 mL で示されているが、その用量は、他の試験での致死用量に相当している。しかし、フルフルアルの揮発性が考慮されておらず、実際のフルフルアル摂取量はおそらくもっと少ないと考えられる。

吸入(がん原性)

Feron and Krusysse(1978)により、短期間の試験が実施されている。各群雌雄 18~30 匹ずつの Syrian ゴールデンハムスターを、1 日 7 時間、週 5 日で 12 ヶ月間、フルフルアル蒸気に曝露し、さらに 29 週間、新鮮な空気中で飼養したフルフルアルの濃度は、試験開始時は 1550 mg/m³であったが、曝露期間の後半 32 週間では 970 mg/m³となった。この試験は、いくつかの点を除いて、OECD 413 に準拠して実施された(18~24 ヶ月とすべき曝露期間が 12 ヶ月となった点、データの記載のし方が不十分な点、目標濃度の記載がない点、および飼料や水の消費量ならびに検眼鏡検査のデータを欠いている点)。フルフルアルへの曝露により、動物の被毛の黄変、成長遅延、嗅上皮の感覚細胞の萎縮および下方伸展、ボウマン腺の変性、および嗅上皮を裏打ちする基底膜における嚢様構造の出現が引き起こされた。フルフルアルは、呼吸上皮に対して、可視的な影響を示さなかった。鼻腔に見られた変化を、52 週目で屠殺した動物と、追加の 29 週間の非曝露期間の後に屠殺した動物とで比較したが、フルフ

ラルにより誘発された病変が回復している所見も、いずれかの病変が進行しているという所見も示されなかった。フルフラルは、気道に腫瘍を誘発しなかった(Feron and Kruyssen, 1978)。

吸入(助発がん性)

Feron(1972)により、短期間の試験について報告がなされている。各群雌雄 35 匹ずつの Syrian ゴールデンハムスターの気管内に、フルフラル(0.9% NaCl 溶液 0.2 mL に 3 mg)を 36 週間、毎週滴下投与した。フルフラルの滴下は、単独もしくはベンゾ(a)ピレン(B(a)P; 1 mg)と組み合わせて行われた。B(a)P を単独投与する群や 0.9% NaCl 溶液のみを投与する群(雄 35 匹だけ)も設けた。30 週目に、各群雌雄 3 匹ずつを中間屠殺に供した。試験は、78 週間後に終了された。B(a)P 単独投与の場合は、62 匹中 41 匹のハムスターに呼吸器の腫瘍が誘発された。それに対し、B(a)P とフルフラルを気管内に滴下した場合には、気管気管支上皮の化生変化が早期に進展し、気管気管支腫瘍が出現するまでの潜伏期間が短縮化され、扁平上皮がんの発生数が、細気管支や肺において若干増加した(細気管支では、雌雄合わせて、B(a)P 対照群では 32 匹中 0 匹であったのに対し、61 匹中 3 匹。肺では、雄において、B(a)P 対照群では 32 匹中 1 匹であったのに対し、32 匹中 2 匹)。これらの結果から、フルフラルがハムスターの気道に対して助発がん性影響を及ぼすことが示唆される。フルフラルは、気管周囲肉腫誘発性を高める影響も示し、B(a)P 単独投与の場合はこの肉腫の誘発率が 2% であったのに対し、B(a)P とフルフラルを投与した群では 33% に上った。最も例数の多かった死因は、気管が腫瘍によって閉塞されることによる窒息であった。これらの結果から、フルフラルが、それ自体だけで発揮できる発がん性は有していないことが示されたと考えられた(Feron, 1972)。この試験の著者は、B(a)P 単独投与を受けた群の担がんハムスターの数が非常に多く、毎週 1 mg の B(a)P 投与が、肺での腫瘍形成を増強する因子を検討する試験において、好適な閾値であるとは考えにくい、ということを確認している。

「吸入(がん原性)」の段落で記載した Feron and Kruyssen(1978)の試験では、別の群に対し、0.9% NaCl 溶液 0.2 mL 中に 0.35 もしくは 0.70 mg の B(a)P を混和して、気管内滴下を実施した。さらに別の群に対し、0.9% NaCl 溶液 0.2 mL 中に 0.125 μ L のジエチルニトロソアミン(DENA)を混和して、3 週間毎の皮下注射を実施した。B(a)P の総投与量は、ハムスター 1 匹当たり 18.2 ないしは 36.4 mg であり、DENA の総投与容量は、ハムスター 1 匹当たり 2.1 μ L であった。フルフラルは、B(a)P や DENA のがん原性を助長しなかった。

経皮(助発がん性)

供試動物数が少ない(CD-1 マウス、1 群 20 匹)短期間の試験において、フルフラルの腫瘍イ

ニシエーター能が検討されている。この試験は、プロモーターとして TPA (12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート) を使用し、マウス皮膚がん形成を 2 段階としたモデル設定で実施された。4.8 mg のフルフラルを含む 0.1 mL の DMSO 液を、週 2 回、5 週間、フルフラル総量として 48 mg を、背中中の皮膚に局所適用した。続く 47 週にわたり、無処置とするか、あるいは 2.5 µg の TPA を含む 0.1 mL のアセトン液を週 2 回塗布した。7,12-7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン (DMBA ; 0.1 mL のアセトン中に 10 µg) を陽性対照物質として、DMSO (0.1 mL) を陰性対照物質として用いた。フルフラルと TPA の処置を組み合わせさせた群では、マウスの 25% に 8 例の皮膚腫瘍 (乳頭腫 7 例、扁平上皮癌 1 例、マウス 1 匹当たり平均 0.4 例) が誘発された。一方、DMBA と TPA の処置を組み合わせさせた群では、全てのマウスに腫瘍が誘発された (マウス 1 匹当たり平均 6.7 例)。フルフラルによる処置だけでは、腫瘍は生じなかった。DMBA 単独では、マウスの 35% に皮膚腫瘍が誘発された (マウス 1 匹当たり平均 0.35 例)。また、TPA 単独では、皮膚腫瘍が生じたマウスは 1 匹だけであった (5%、マウス 1 匹当たり平均 0.05 例) (Miyakawa *et al.*, 1991)。腫瘍の例数が、TPA やフルフラル単独の処置を受けた群と比べ、「フルフラル+ TPA」群で増加したことに基づくと、フルフラルは腫瘍イニシエーターとしての活性を有する可能性がある」と結論付けられる。得られたデータは、皮膚腫瘍の発生率と発症例数、および組織学的種別に関するものだけであった。皮膚刺激など、他の影響の発現については報告されていない。

ヒトにおけるデータ

炭素製品製造施設において、2219 人の白人男性の集団を対象とした死亡例調査が実施されている。彼らは長期雇用された従業員で、1974～1983 年の死亡例について検討が行われた。調査を行った 6 箇所のうち 1 か所で、呼吸器がんによる死亡が過度に認められた (期待値では 1.4 件のところ 5 件を確認)。この過剰は、死亡率の地域差によるものではなかった。その箇所で主に懸念されたのは、ホルムアルデヒド、シリカ、フルフラル、フルフリルアルコールおよびアスベストへの曝露であった。曝露濃度に関するデータは得られていない。被験者は喫煙習慣があり、少なくとも 25 年間その施設で働いていた。アスベストやタバコの煙への曝露がそうしたデータが得られた原因と関わっていることを検証するには、得られた情報は不十分であった。しかし、この調査報告を検証する中で、化学物質への曝露以外に、そうした知見の原因となる他の危険因子を確定することはできなかった (Teta *et al.*, 1987)。この調査は、ヒトにおける呼吸器がんやフルフラルへの曝露に関する結論を導くには適切ではない。

結論

経口曝露

フルフラルは、実験動物(雄ラットおよびマウス)への2年間(強制)経口投与により、がん原性を示すと思われる。雄ラットでは、60 mg/kg 体重/日を強制経口投与した群で、稀にしか認められない胆管がんや、胆管がん進展の初期段階と考えられる胆管の形成不全が認められた。雌ラットでは、がん原性の所見は認められなかった。肝細胞腺腫の発生率上昇が、最高用量の175 mg/kg 体重/日のフルフラルを強制経口投与されたマウスで認められた。この用量群の雄マウスでは、肝細胞がんの発生率上昇も認められた。

ここで上述の強制経口投与試験について、いくつか留意点を記載する。両動物種の標的細胞に対する毒性は、広範にわたるものでも重篤なものでもないが、腫瘍が誘発された用量よりも低い用量で示されている。ラットでは、肝腫瘍は60 mg/kg 体重/日の慢性曝露において認められたが、軽度の小葉中心性壊死は30 mg/kg 体重/日で認められた。実際、最初の小葉中心性変化、すなわち肝細胞の空胞化は、同じ系統の動物を用いて同じ曝露手法、すなわち強制経口投与によって実施された13週間試験において、11 mg/kg 体重/日以上で出現した。既に述べたように、フルフラルは、腫瘍を誘発する用量に近い用量やそれより低い用量で、雄ラットの肝臓重量増加を引き起こす。具体的には、上述の亜慢性試験において、重量増加は、45 mg/kg 体重/日の用量で観察されている。毒性の誘発により、腫瘍も並行して誘発されること、具体的には、小葉中心性壊死が雄ラットだけで認められていることは注目に値する。

B6C3F1 マウスは、肝臓腫瘍の発生に対して、特に肝臓の(慢性的な)損傷が誘発される条件下では、非常に感受性が高いことがよく知られている。同時対照群の雄でも、肝臓腫瘍の発生率は30%を超えていることは、注目すべきである。この動物種の肝臓は、NTP データベースにおいても、最も高率で腫瘍性影響を受ける部位とされており、また、非遺伝毒性発がん物質に対して特に感受性が高いと思われる。これらの腫瘍は、その発生については十分に解明されていないが、試験において腫瘍が誘発された用量以下で見られる肝毒性と関連して認められる場合が非常に多い。既に述べたように、この標的臓器における他の著明な観察所見は、フルフラル誘発性の肝毒性、すなわち、小葉中心性凝固壊死、色素沈着ならびに多巣性炎症であり、こうした所見は、亜慢性試験において100 mg/kg 体重/日の用量で観察されている。これは、慢性曝露で腫瘍の増加が誘発された最高試験濃度の175 mg/kg 体重/日から見て、すぐ下の段階の濃度である。ラットの肝臓で認められた様に、この毒性の誘発により、やはり並行して腫瘍が誘発されているのである。慢性炎症は、マウスでは両性で見られたが、雄の肝臓の方が、明らかに広範に生じていた。さらに、上述の13週間強制経口投与試験でも、75 mg/kg 体重/日、すなわち肝臓腫瘍を誘発した慢性投与用量を下回

る用量の投与を受けたマウスで、肝重量の増加が認められている。

吸入および経皮曝露

吸入や経皮曝露時のフルフルルのがん原性を評価するには、十分な試験データが得られていない。Syrian ゴールデンハムスターを吸入曝露した試験では、発がん性影響の所見は認められていない。しかし、その試験における曝露期間は非常に短く(曝露処置は 12 ヶ月だけでその後非処置期間が 29 週間)、吸入曝露時のがん原性を適切に評価することができない。フルフルルがハムスターの気道に対して助発がん影響を示すことが、ハムスターをフルフルル単独で、もしくはベンゾ(a)ピレンと組み合わせて処置した試験に基づいて、示唆されている。Feron *et al.* (1978, 1979, 1984) の反復吸入曝露試験で影響が認められたことから、吸入曝露により局所毒性が生じると考えられている。ただし、得られたデータからは、局所毒性により腫瘍が誘発されるか否かは明らかではない。これらの試験の中で、52 週間のフルフルルへの曝露後に屠殺した動物の鼻腔における病巣と、追加の 29 週間の非曝露期間後に屠殺した動物の鼻腔における病巣との比較が行われ、それらの病巣が回復したり進行したりすることがないことが示されている。

1995 年、IARC(国際がん研究機関)は、フルフルルがヒトに対してがん原性を示すとする証拠は不十分であり、実験動物における証拠も乏しいと結論付けている(IARC, 1995)。CMR 作業部会は、フルフルルについて、指令 67/548/EEC に基づき、フルフルルを Carc. Cat. 3(がん原性カテゴリー3)に分類すべきであると判定した(2003 年 11 月)。

作用機序

フルフルルへの経口曝露により肝臓においてがん原性がどのように発揮されるのか、その機序については十分に解明されていない。しかし、遺伝子導入動物を用いた *in vivo* 試験で証明されているように、それには遺伝毒性要素は明らかに関与していない。試験データでは、慢性的な細胞毒性が、腫瘍の誘発と合わせて認められており、発がんに関与している可能性が指摘されている。この経路は、他の非遺伝毒性肝がん原性物質においても妥当なものと考えられている。観察された細胞毒性影響が、この機序を妥当と思わせるほど広範にわたるものでも重篤なものでもないという議論はあるかも知れない。しかし、観察された腫瘍反応と整合しているとみなされると考えられる。ラットにおける腫瘍発生率はやはり低く、一方、非常に感受性の高い B6C3F1 種のマウスは、背景値の段階で既に高い発生率を示している。したがって、弱くても慢性的に持続する肝毒性は、低水準の腫瘍を誘発するには十分であるかもしれない。また、様々な非遺伝毒性肝がん原性物質において、毒性と腫瘍誘発の関係の(量的な)特質がいったいどの様なものであるのかが、不明確である。

実際に毒性が発揮される機序は、化学物質ごとに、質的にも量的にも確実に異なっている。フルフラルについては、他の非遺伝毒性肝がん原性物質と比較すると、明確な肝毒性や壊死の代わりに、Shimizu and Kanisawa(1986)の Wistar ラットを用いた急性試験の結果から示唆される様に、有糸分裂の誘発という、より突出した役割を果たしていると思われる。毒性や壊死(小葉中心領域のみで観察される場合であっても)に対するラットの肝臓における再生反応は、胆管近傍で確認されることも多く、いわゆる「卵形細胞」の形成を特徴とした著明な所見である(Laurson et al., 2005)。また胆管領域は、正に胆管がんが生じる部位であり、このがんは、フルフラルでの処置を受けた後に認められている。

以上より、観察された肝腫瘍は、肝毒性が関与する何がしかのメカニズムを介して誘発されるものであり、肝毒性が誘発されない曝露レベルでは、腫瘍は生じてこないものと考えられる。したがって、がん原性のリスク評価の出発点として取り上げるのは、重要な投与経路である経口による、肝毒性に関する NOAEL となる(具体的には、混餌による「反復投与毒性」試験で確立された 53 mg/kg 体重/日)。腫瘍形成機序の正確な背景が不明であるため、反復投与毒性に基づいてがん原性の項目を評価することに関連して曝露の相違を加味し、いくらかの追加的な考慮余地を設けておく必要がある。

4.1.2.9 生殖毒性

動物におけるデータ

フルフラルを用いた生殖試験のデータは得られなかった。しかし、NTP による 2 年間強制経口投与試験において、F344/N ラットでは、雌雄とも 60 mg/kg の用量まで、B6C3F1 マウスでは、雌雄とも 175 mg/kg の用量まで、生殖器官に影響は認められなかった。この試験では、投与は週 5 日実施された。次の関連組織が検査された。精巣上体、陰茎、包皮腺、前立腺、精囊、睾丸、凝固腺、陰核腺、卵巣、子宮、膈、および全内分泌腺組織(Irwin, 1990; がん原性の項参照)。Syrian ゴールデンハムスターを用いた(亜)慢性吸入曝露試験が行われており、最高 2165 mg/m³ のフルフラルへの曝露が、1 日 6 時間、週 5 日の頻度で実施された。次の関連組織が検査された。睾丸、前立腺および子宮(Feron et al., 1978, 1979)。これらの試験では、前述の組織に対して、曝露に関連した影響は、どの濃度においても認められなかった。

OECD 414 試験実施のために行われた発生毒性用量設定試験において、雌の Sprague-Dawley ラット(各群 8 匹)に、妊娠 6~15 日にかけて、10、50、100、150、250、350、500 ないしは 1000 mg/kg 体重/日の用量のフルフラルが、1 日 1 回強制経口投与されている。媒体として、

逆浸透処理水が用いられた。150 mg/kg 体重/日を超える用量では、死亡例が過剰に見られたため、試験結果は、10、50、100 および 150 mg/kg 体重/日群についてのみ報告されている。150 mg/kg 体重/日群では、1 匹が死亡した (1/8 匹)。母体毒性に関する NOAEL は、150 mg/kg 体重/日で観察された、眼球陥入や飼料消費量減少などのいくつかの臨床症状に基づき、100 mg/kg 体重/日と判断された。この用量設定試験では、発生への影響は認められなかった (Nemec, 1997a)。

OECD 414 に準拠した発生毒性試験において、雌の Sprague-Dawley ラット (25 匹ずつ 3 群) に、妊娠 6~15 日にかけて、フルフルアルが 1 日 1 回、強制経口投与された (Nemec, 1997b)。用量は、上述の用量設定試験に結果に基づき、50、100 および 150 mg/kg 体重/日とされた。媒体対照群も設けられた。媒体としては、逆浸透処理水が用いられた。妊娠 6~15 日の間に、中用量群で 3/25 匹、高用量群で 16/25 匹が死亡した。死亡動物数が比較的多く、OECD 414 に規定されている 10% という母体の死亡率上限を超えていることから、最高用量での発生毒性に関する結論は得られない。母体毒性に関する NOAEL は、全群で臨床症状 (妊娠 6~18 日目にかけての眼球陥入) が観察されていることに基づくと、50 mg/kg 体重/日未満であると考えられた。試験計画で予定されていた剖検の結果では、投与に関連した影響は何も認められなかった。発生毒性に関する NOAEL は、少なくとも 100 mg/kg 体重/日である。150 mg/kg 体重/日群では、平均胎仔体重に、統計学的に有意ではない低下 (1 腹) が見られたが、この群では生残率が低かった (妊娠雌は 7 匹しか生残しなかった) ため、この群の結果を評価することはできない。この影響が母体毒性に起因している可能性を排除できない。

ヒトにおけるデータ

ヒトにおける生殖毒性に関するデータは得られていない。

結論

実験動物に経口ないしは吸入による (亜) 慢性曝露を施した場合に、雄や雌の生殖器官への影響は何も認められなかった。Sprague-Dawley ラットにおける OECD 414 に準拠した発生毒性試験の結果に基づくと、発生毒性に関する NOAEL は 100 mg/kg 体重/日と考えられた (本来の最高用量すなわち 150 mg/kg 体重/日では、生残率が低かったため 100 mg/kg 体重/日が最高用量となる)。母体毒性に関する NOAEL は、50 mg/kg 体重/日未満であった。ヒトにおける生殖毒性に関するデータは得られていない。CMR 作業部会は、フルフルアルを指令 67/548/EEC に基づいて生殖毒性に関して分類することは、適切ではないと結論付けている (2003 年 11 月)。