

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report
CUMENE**

CAS No: 98-82-8
1st Priority List, Volume 6, 2001

欧州連合
リスク評価書 (Volume 6, 2001)
クメン

Institute for Health and Consumer Protection

European Chemicals Bureau

Existing Substances

**European Union
Risk Assessment Report**

CAS No.: 98-82-8 EINECS No.: 202-704-5

cumene

Cc1ccccc1 N

1st Priority List
Volume: 6

EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
EUR 19726 EN

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
2018年8月

本部分翻訳文書は、Cumene (CAS No: 98-82-8)に関するEU Risk Assessment Report, (Vol. 6, 2001)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、<https://echa.europa.eu/documents/10162/c44474a0-e926-451d-9efd-810b230008f4>を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量（濃度）－反応（影響）評価

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝および分布

4.1.2.1.1 動物での研究

In vivo の研究

F-344ラットにクメンを経口投与、静脈内投与または経鼻吸入曝露し、その代謝、生体内分布および薬物動態を調べた研究が1989年に Research Triangle Institute で実施された。

7～9週齢のFischer F-344雌雄ラットを用いた。試験期間中動物は代謝チャンバー内で個別飼育し、尿、糞便、二酸化炭素および呼気中の揮発性物質を収集した。 [¹⁴C]クメンは胃管により経口投与、または側尾静脈より急速静脈内投与した。また、 [¹⁴C]クメンをガス状にしてチャンバー内に注入した。投与量としては、単回静脈内投与、単回および8日間反復経口投与では33 mg/kg、単回経口投与では1,350 mg/kg、単回の6時間経鼻吸入曝露では100、500および1,500 ppm とした。

経口投与では、 [¹⁴C]クメンは胃から速やかにかつほぼ完全に吸収されたが、最高用量では吸収がわずかに遅れた。 [¹⁴C]クメンは肺からも速やかに吸収され、曝露開始5分以内には血中に検出された。

概して、経口投与および吸入曝露における排泄率および排泄経路は非常に良く似ていた。経口投与および吸入曝露の主要排泄経路は尿であり、用量の平均70%以上が尿中に排出された。低用量の [¹⁴C]クメンの投与または曝露では、放射能活性は呼気や糞便中には僅かにしか検出されず、ほとんどが尿中に排泄された。用量の増加に伴い呼気中に大量の放射能活性が認められ、糞便中にはかなり少なくなった。

組織内分布データの解析から、 [¹⁴C]クメンを投与した全ての投与経路において、多くの組織で全放射能活性の組織対血液比 (TBR) が上昇した。脂肪組織では全ての用量および投与経路でTBRの上昇が認められた。これはクメンの親油性が既知であることと一致しており、予想外のことでなかった。肝臓および腎臓組織では、ほとんどの研究でTBRの上昇が認められた。哺乳動物ではこれらの組織は酸化的代謝に大きく関与しており、他の組織よりクメン代謝物の濃度が高い傾向にある。加えて、腎臓はクメンおよび放射性標識代謝物の主要排泄臓器でもある。残留尿の腎臓組織への混入も、この組織での放射能活性濃度を増加させることが予測される。

クメンを静脈内投与したラットの血液からの放射性標識の排出は、2-コンパートメント薬物動態モデルとして報告された。観察されたデータはこのモデルに良く合致していた。このことは、血液からの放射性標識の消失は恐らく双指数関数的プロセスである可能性を示している。放射性標識を用いた他の全ての試験は、1-コンパートメントモデルにデータを合致させる必要があった。放射性標識の吸収速度および組織への分布に関する情報を得るための適切なタイミングの血液標本が不足していることから、これは必要なことであった。この情報無しには双指数関数的プロセスの初期（早い）段階を定義することはできない。何が 2-コンパートメントプロセスらしいかをシミュレーションするために 1-コンパートメントモデルを適用した結果が第一で、それは時間の関数として血液の放射性標識濃度を適切には予測できないモデルであるが、第二としては実際には双指数関数的プロセスの早い段階と遅い段階の組み合わせだった単一指数関数的プロセスにおける半減期の分布 (THALF1) の推測である。このことは、早い初期段階の THALF1 の値を真の値より大きくし、

また遅い後期段階の値を幾分小さくする原因となる。この問題を回避し全ての投与経路と用量で 2-コンパートメントモデルの適用を可能にするためには、投与後 8 時間の間に数回の追加の血液採取が必要である。

33 mg/kg を静脈内投与後、2-コンパートメントオープンモデルを用いて薬物動態学的変数を算出した。 $[^{14}\text{C}]$ クメンについて、分布半減期 (THALF1) は雄では 0.21 時間、雌では 0.27 時間と算出された。排泄 (終末) 半減期 (THALF2) は雄では 8.6 時間、雌では 7.3 時間と算出された。

クメンの抱合代謝物は尿中に排泄される。尿および呼気に排出されたクメンの放射性標識代謝物について逆相HPLCを用いて調べた。保持時間 (リテンションタイム) に基づくと、クメンの静脈内投与後に見られた6個の放射性標識代謝物のピークは、経口投与および吸入曝露で認められた6個と同じものである。概して、全ての投与量および投与経路において、尿中排出物は50%以上が2-フェニル-2-プロパノール (2-phenyl-2-propanol) およびそのグルクロニドか硫酸抱合体であると結論した。代謝物1、4および5は全て遊離の2-フェニル-1,2-プロパンジオール (2-phenyl-1,2-propanediol) に変換されることで尿における排泄の平衡が説明された。

未知の尿中代謝物6は2-フェニル-2-プロパノールに変換されることが見いだされ、また尿中代謝物2は脱抱合酵素の β -グルクロニダーゼやスルファターゼ処理の影響を受けないため同じリテンションタイムに保持された。尿中代謝物3に対する酵素処理の効果は不明確であり、おそらく変化しないが代謝物のマイナーな性質のため解明するのが難しい。さらに、少量の遊離した非抱合のクメン代謝物として2-フェニル-1,2-プロパンジオール、2-フェニル-2-プロパノールおよび2-フェニルプロピオン酸 (2-phenylpropionic acid) が検出された。

結論として、クメンは経口投与または経鼻吸入曝露により十分に吸収されることが示された。クメンは、吸収後広範に代謝され排泄される。高用量や反復投与によるクメンの蓄積の証拠は認められなかった。

ラットにおけるクメンの代謝および薬物動態の試験の中で、いくつかの尿中代謝物が同定できていなかった (Research Triangle Institute, 1992)。これらの代謝物の1つが代謝物2であり、尿中に排泄される放射能活性の3~40%を占めていた。代謝物2として排泄される分画は、用量により直接的に変化した。クメンおよびその放射性標識代謝物の排泄の主要経路は尿であり、投与量の70%以上を占めることから、この代謝物を同定することは重要な関心事であった。この報告書では、代謝物2の化学的同定に関する研究結果を報告する。

以前の試験の経過の中で、1.35 g/kg のクメンを経口投与した動物から得られプールされた混合尿を、この試験では代謝物2の原料として用いた。1989年の研究以降プールされた尿は凍結保存されており、HPLCにより放射性標識代謝物は定性的・定量的組成に影響を受けていないことが示された。酵素処理および複数のクロマトグラフィー工程により濃縮および部分精製して代謝物2のサンプルとした。2つの異なる分析用HPLCを用いた分析で、このサンプルの放射化学的均質性が示された。

^{13}C および $^1\text{H-NMR}$ スペクトロスコピーを用いた分析では、少なくとも 2 つの物質の存在が示された。分光分析結果を注意深く比較すると、2 つのうち 1 つはフェニルマロン酸 (phenylmalonic acid) である可能性が示された。このジカルボン酸はクメンの酸化代謝物であると予測できる。フェニルマロン酸と共に代謝物 2 をコクロマトグラフィー解析する試みでは、2 つの異なるクロマトグラフィーシステムで異なる結果が得られた。部分精製した代謝物の HPLC-MS 解析では、試料中に少なくとも 2 つの異なる物質が存在するため有用な情報は得られなかった。

続いて、分光分析で研究された部分精製した代謝物2から、順相HPLCを用い2つの放射性標識成分が分離された。2つの物質を明確に同定するためにはさらなる研究が必要である。現在の研究結果からは、2つの成分のうち1つがフェニルマロン酸 (2-phenylpropane-1,3-dicarboxylic acid) であることに間違いはない。

クメンの経皮浸透性は、初期の1つの研究に基づき、ベンゼン、トルエンおよびp-キシレンと同程度であることがたびたび言われていた (Valette and Calver, 1954)。ラットを用いたこの研究では、エゼリン適用の媒体としてクメンや他の溶媒をそれぞれ用いた。筆者らはエゼリンの生物作用を評価項目として測定した。

クメンの代謝についてはRobinson et al. (1954) により研究された。2 mL (1,720 mg) のクメンをウサギに経口投与すると、投与用量の40%が2-フェニルプロパン-2-オール (2-phenylpropan-2-ol) に、25%がそれぞれ2-フェニルプロパン-1-オール (2-phenylpropan-1-ol) および α -フェニルプロピオン酸 (alpha-phenylpropionic acid) に代謝され、これらはグルクロン酸抱合、トリアセチルメチルエステル (triacetyl methyl ester) として排泄された。

van Doorn et al. (1981) はクメンの排泄について研究した。120.2 mg/kgのクメンを雄のWistarラットに単回腹腔内投与し、 73 ± 6 mmol SH/mol クレアチニンを尿中に検出した。一方無処理対照群では 6 ± 2 mmol SH/mol クレアチニンであった。尿中のS化合物の3.4 mmol SH/molクレアチニンはメルカプツール酸として排泄された。

4.1.2.1.2 *In vitro* の研究

ウサギ肝臓の可溶性酵素画分により200 mg/Lのクメンを*in vitro*で代謝した初期の研究では、37°C、pH7.4で1時間培養すると、2-フェニルプロパン-1-オール (0.04~0.07 mol/min/g liver)、2-フェニルプロパン-2-オール (0.17~0.35 mol/min/g liver) および 2-フェニルプロピオン酸 (0.03~0.05 mol/min/g liver) が産生した。代謝物はFID検出器を備えたガス-液体クロマトグラフィーにより測定した。検出限界は0.01g/ metabolitesであった (Chakraborty and Smith, 1967)。

1986年にPyykköは、クメンによるチトクロームP-450依存性モノオキシゲナーゼの*in vitro*での抑制について研究した。アシルヒドロカーボンヒドロキシラーゼ (AHH) のIC50は564.9 mg/L、7-エトキシマリンO-ジエチラーゼ (ECD) のIC50は132.2 mg/Lであった。試験条件は、ラット肝臓ミクロソーム分画で10分間培養し、酵素基質として0.08 mM (AHH) または 0.1 mM (ECD) を用いた。

SatoおよびNakejima (1987) は、*in vitro*での代謝速度について研究し、ラット肝臓: 12.3 μ g/min (2.6 nmol/nmol cytochrome P-450/min)、ラット肺臓: 17.3 μ g/g/min (42.4 nmol/nmol cytochrome P-450/min) であることを報告した。

4.1.2.1.3 ヒトでの研究

いくつかの非職業的曝露の研究において、クメンはヒトの代謝に関連していることが報告されており、非喫煙の健全な都会人 (男性および女性) 集団の呼気の構成有機成分の1つとして検出され、平均濃度は約0.35 ng/Lであった (1sigma信頼限界 0.25~0.45 ng/L) (Conkle et al., 1975; Krotoszynski et al., 1977)。

血液、肺胞気および尿における13の工業用溶媒を検出する研究 (Parbellini et al., 1988) において、49人のイタリア人血液提供者のクメン濃度を調べた。環境中の大気の濃度の幾何平均値は 6 ± 2 ng/L (範囲 1~2 ng/L: [訳注] 濃度範囲の記載は間違いと思われる。)

であり、分析した標本の結果は以下の通りであった: 肺胞気の幾何平均 3 ± 2 ng/L (範囲 1~14 ng/L)、血液の幾何平均 199 ± 2 ng/L (範囲 17~963 ng/L) および尿の幾何平均 202 ± 2 ng/L (範囲 20~1,190 ng/L)。

肺胞および血液のクメン濃度について58人の病院従事者 (幾何平均環境濃度 6.4 ± 2.4 ng/L、範囲 2~36 ng/L)、および28人のベンゼン製造工場の化学労働者 (幾何平均環境濃度 10.7 ± 5.6 ng/L、範囲 1~279 ng/L) について調べた (Brugnone et al., 1989)。肺胞濃度については、病院従事者と化学労働者の間で有意な差はなかった。喫煙者と非喫煙者の間には相関は認められなかった。肺胞濃度は、病院および工場内診療所の環境濃度に有意に相関していた ($p < 0.001$)。肺胞のクメン保持率は、病院従事者の70.4%から工場労働者の77.8%の範囲であった。血中のクメン濃度は化学労働者に比べ病院従事者は有意に低かった ($p < 0.002$)。喫煙習

慣は、両従事者グループ共に血中濃度に影響しなかった。唯一、化学労働者では血液と肺胞クメン濃度、および血液と環境濃度の間に有意な相関が認められた ($p < 0.001$)。

クメンの吸収およびジメチルフェニルカルビノール (2-フェニルプロパン-2-オール) の排泄に関する研究が、10人の健康なボラティア (20~35歳の男女各5人) を使って実施され、49、98あるいは147 ppm (それぞれ、240、480または720 mg/m³) の濃度で7時間、頭部だけで吸入曝露した (Senczuk and Litewka, 1976)。曝露中の肺におけるクメン蒸気の保持率は、曝露0.5時間目は64%であったが曝露終了時には45%まで減少した。曝露中および曝露後 (曝露開始後2.5~48時間) の尿を集め、抽出物におけるジメチルフェニルカルビノールを測定した。最大排泄は曝露6~8時間後に観察されたが、曝露終了後には減少し始め、48時間後にはゼロに近づいた。クメンから2-フェニルプロパン-2-オールへの変換率は平均35%であった。

4.1.2.1.4 トキシコキネティクスの要約

動物を用いた研究では、クメンは吸入曝露により速やかに吸収され、また消化管からも吸収される。ヒトでは、クメンは血液、肺胞中の空気および尿中に存在する有機成分として認められるヒトの代謝に関係し、血液と肺胞のクメン濃度との間に有意な相関がある。ヒトにおける研究の1つでは、吸入されたクメンの50%は肺に取り込まれることが示唆され、また他の研究では肺胞のクメン保持率は77.8%であると計算された。皮膚吸収に関して満足できる研究はない。クメンとその代謝物は、動物に吸入曝露あるいは経口投与後は広い範囲に分布するが、組織濃度が最も高いのは体脂肪組織である。

放射性標識されたクメンの大部分は、主として尿中に抱合代謝物として72時間にわたって排泄される (投与用量の70%以上)。動物の研究では、糞便および呼気は排泄経路としてはマイナーである。動物およびヒトの主要代謝物は、2-フェニルプロパン-2-オールである。

他の尿中代謝物としては、2-フェニルプロパン-1,2-ジオールおよび2-フェニルプロピオン酸である。単回および反復経口投与動物試験を比較すると、非常に類似したトキシコキネティクスが認められた。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物での研究

経口

経口急性毒性に関しては、IUCLID (国際統一化学情報データベース) に6つの参考文献が記載されている。全ての試験はラットで実施されている。

Dow Chemical Company (1948) が実施した研究では、全ての動物が生存できる最大用量は1,400 mg/kg であることが報告されている。クメンはラットに単回投与した。全ての動物が死亡する最小用量は5,000 mg/kg であった。

Smyth et al. (1951) は、雄ラットに経口投与した用量設定試験で、LD50 の推定値は2,910 mg/kg であることを報告した。

Wolf et al. (1956) は、20匹の若い成熟 Wistar ラットを用いてクメンの毒性について検討した。薬物は胃管を用いて経口投与した。クメンは原液またはオリーブオイル溶液として用いた。全ての生存ラットは回復が保証されるまで観察した (通常2週間)。LD50 は約1,400 mg/kg と報告された。ラットを剖検すると、肝臓の軽度な変化および一部の腎臓で意義の疑わしい所見が報告された。イソプロピルベンゼン (クメン) は胃および腸にいくらかの刺激性を示すことが明らかになった。

Gerarde and Linden (1959) は、クメンとオリーブオイルの 1:1 v/v 混合液 2.5 mL を体重約 250g の絶食ラットに単回投与し、急性毒性について検討した。生存動物は、行動および活動異常の有無について投与後 3 週間観察した。クメン投与により 10 匹中 6 匹が死亡した。LD50 は約 4,000 mg/kg であった（希釈法に基づく）。この報告ではいくつかのアルキルベンゼン化合物について行われた。毒性症状には中枢神経抑制が含まれていた。死後検査により、これら化合物による死亡の主な原因は、肺の水腫および出血を伴う化学性肺炎であることが明らかになった。

もう少し最近の研究 (Monsanto, 1985) では、LD50 は 2,700 mg/kg と報告された。1 群 5 匹の Sprague Dawley 白色ラットに、クメン原液を 2,000、2,510、3,160 および 3,980 mg/kg の用量で投与した。毒性症状としては、体重減少（生存動物 1~3 日目）、衰弱の増加、眼漏、虚脱および死亡であった。死亡例の肉眼的剖検所見としては、肺出血、肝臓の変色および胃腸の急性炎症であった。生存例の内臓所見は正常であった（14 日目）。

Dow Chem Company で報告された試験 (1985) では、クメン 3,980 mg/kg の単回経口投与はラット LD50 値に相当することが報告されている。投与直後に呼吸困難が発現し、投与 2.5 時間後に死亡した。クメン 2,000 mg/kg を投与したラットには致死作用は認められなかったが、剖検時には両グループ共に肝臓と腎臓に軽度の損傷が認められた。

経皮

Smyth et al., (1951) は、雄の白色ウサギに 4,310、8,620 または 17,420 mg/kg を単回閉塞投与した用量設定試験で、経皮の LD50 は 10,600 mg/kg (12.3 mL/kg) であることを報告した。観察は投与後 14 日間行った。もう少し最近の研究では、Monsanto (1985) が LD50 は 3,160 mg/kg 以上であることを報告している。New Zeland 白色ウサギに、クメン原液を 2,000、3,160、5,010 または 7,940 mg/kg の用量で 24 時間曝露した。

毒性症状には、体重減少、衰弱の増加、虚脱および死亡が含まれた。死亡例の肉眼的剖検所見としては、肺の出血部位、肝臓の変色、胆嚢の肥大、腎臓および脾臓の暗色変化および胃腸の炎症であった。

吸入

ラットの研究

ラット急性毒性についていくつかの参考文献がある。

Smyth et al. (1951) は、1 群 6 匹のラットに 8,000 ppm (40 mg/L) のクメンを 4 時間曝露後、14 日以内に 4 匹が死亡したことを報告した。1 時間の曝露では死亡は認められなかった。

ある研究では、814 ppm (4 mg/L) および 1,323 ppm (6.5 mg/L) の高用量曝露で死亡が報告されており、曝露後 16 時間以内に死亡した。これらの動物は、歩行障害、協調運動失調および傾眠を示した (Fabre et al., 1955)。

1949 年付けの 2 つの引用では、40 mg/L で 4 時間の曝露では 6 匹のラットのうち 4 匹が死亡し、20 mg/L では同じような曝露時間で死亡は認められなかった (Smyth et al., 1951; Union Carbide Corporation, 1985)。

Monsanto (1985) は、17.6 mg/L 以上の 6 時間曝露で死亡例がないことを報告した（急性吸入の OECD プロトコールは 4 時間曝露）。6 匹の Sprague-Dawley 白色雄ラットを用いた。毒性兆候は全く認められなかった。14 日後の肉眼的剖検所見では内臓は正常であった。

Gerarde (1960) は、急性曝露による動物死亡の主な原因として、呼吸麻痺、肺水腫および出血を挙げ、肺

出血は胸腺、膀胱および副腎のさらなる出血と関連すること報告している。また肝臓肥大は、脾臓の変形と同様、薬物に起因する代謝的ストレスの代償の結果であることを報告した。またクメンの 20~25 mg/mL では虚弱および反射消失が認められた。

クメン蒸気を単回曝露し、ラットの行動機能に対する影響について、振戦、立直り反射、歩行、驚愕反応、活動、流涎および直腸温度を含む様々なパラメータについて評価した (Bushy Run Research Centre, 1989a)。1 群雌雄各 10 匹のラットにクメンの 0、490 (100 ppm)、2,450 (500 ppm) または 5,880 mg/m³ (1,200 ppm) を 6 時間鼻部曝露した。歩行異常、直腸温度の下降および活動量の増加が高用量の 2 群で観察された。症状は曝露後 1 時間後に観察されたが、6 および 24 時間後には認められなかった。クメンの 490 mg/m³ では曝露に関連した作用は認められなかった。

マウスの研究

Lazarew (1929) は、クメン 20 mg/L を白色マウスに 2 時間以上曝露すると催眠効果を示すことを報告している (すなわち、マウスは横倒しとなっていた)。25 mg/L の曝露では、反射喪失が観察された (Nielsen et al., 1994 に引用)。

Werner et al., (1944) は、若い成熟白色マウス (平均体重 21g) にクメンを 7 時間曝露した場合の LC50 は 2,000 ppm (10 mg/L) であると報告した。マウスでは、石油のクメン画分の毒性は純粋なクメンと類似していることをこの試験は示した。クメンおよびテクニカルグレード品ともに遅発性かつ持続性の催眠作用を持つことが示された。クメンの毒性は僅かながら年齢に依存した。すなわち、「年上」マウス (平均体重 27g) の 7 時間曝露の LC50 は 11.5 mg/L であった。この報告書 (80 匹の老齢マウスを使用) から得られた用量-死亡率曲線を外挿すると、クメンの曝露 (6~8 時間) 期間中または曝露後の短い時間には少数のマウスが死亡するだけである。一般に、大部分の死亡は 7 時間の曝露開始から 8~24 時間で認められるが、少数の死亡は曝露後 1~3 日までに認められた。毒性症状としては、昏睡、運動失調、反射消失、意識消失および致死性の呼吸抑制が含まれた。クメン蒸気に曝露中または曝露直後に死亡したマウス 22 匹について組織病理学的検査を行った。テクニカルグレード品あるいは純粋なクメンに 7 時間曝露した 22 匹のマウスでは、肝臓、腎臓および脾臓に本質的に同様の有意な病理変化が認められた。22 匹のマウス全てで肝臓中の脂肪量が少量から中程度あり、また一部の動物では腎臓の脂肪が認められた。検査した 19 匹全ての脾臓の小胞に、軽度~顕著な核断片の食作用が認められた。

Izmerov et al. (1982) によりマウスで類似の作用が報告され、クメンの毒性作用はベンゼンやトルエンのそれと類似しているが、より遅発的かつ持続的であるとしている。Izmerov らは、2 時間以上の曝露では、LC50 は 121 mg/L、NC50 (曝露動物に 50%の昏睡を起こす濃度) は 53.35 mg/L であると報告した (Nielsen et al., 1994 より引用)。

Dow Chemical Company (1948) によるマウスを用いた研究結果では、クメンの 7 時間単回曝露による 50% 致死濃度は 10 mg/L であることを報告している。過度の曝露は、肝臓、腎臓および脾臓に病理学的変化を起こすが、基本的な作用および致死を起こすのは麻酔作用であった (中枢神経系の単独の抑制)。

Tegeris and Balster (1994) は、クメンの 2,000、4,000 および 8,000 ppm を 20 分間吸入曝露後に、機能観察バッテリー (FOB) により急性神経行動作用を評価した。最小濃度 (2,000 ppm) (10 mg/L) で曝露中の立ち上がり行動に有意な影響が認められたことから、最小有効濃度は確認できなかった。2,000~8,000 ppm の濃度での作用は、中枢神経系抑制剤のペントバルビタールを 5、10、20、30 および 40 mg/kg 腹腔内投与した場合のプロファイルとほぼ同じであった。

姿勢の変化、覚醒および立ち上がり行動の減少、ハンドリングし易さの増加、歩行障害、移動性、立直り反射、前肢握力の低下、着地脚の広がり増加、および精神運動協調の障害などが作用として含まれた。これらの急性作用は長続きせず、曝露が無くなると数分以内に回復し始めた。

この研究は、クメンがペントバルビタールと類似した神経行動作用のプロファイルを生成することを指摘している。

4.1.2.2.2 毒性の作用機作に関する研究

Pyykkö et al. (1987) は、ラット肝臓および肺におけるシトクロム P-450 濃度および3つのモノオキシゲナーゼ活性に及ぼす影響、ならびにシトクロム P-450 とは独立した2つのミクロソーム酵素について検討した。クメンはコーンオイルに溶解し (2M)、5 mmol/kg (600 mg/kg に相当) の用量で腹腔内投与した。動物は24時間後に屠殺した。600 mg/kg の用量では一般毒性症状は認められなかった。

クメンはラット肝臓ミクロソームのシトクロム P-450 濃度を 20~50%増加させた。肺では状況は逆だった。シトクロム P-450 濃度を、対照群より 40~60%減少させた。

肝臓のアリル炭化水素水酸化酵素 (AHH) 活性に対するクメンの作用は、シトクロム P-450 濃度に対する作用と同じだった。また、クメンが肝臓の 7-エトキシマリン O-デエチラーゼ (7-ethoxycoumarin O-deethylase) および 7-エトキシレソルフィン O-デエチラーゼ (7-ethoxyresorufin O-deethylase) 活性を増加させる作用は非常に強く、次いでシトクロム P-450 濃度や AHH 活性であった。

肺では 7-エトキシマリン O-デエチラーゼ活性が減少したが、AHH 活性は変化せず、7-エトキシレソルフィン O-デエチラーゼ活性も減少しなかった。

シトクロム b5 および NADPH-シトクロム c リダクターゼに対する作用としては、クメンは肝臓のシトクロム b5 の濃度を僅かに増加させたが、肺では有意な変化は認められなかった。NADPH-シトクロム c リダクターゼは、肝臓ミクロソームで対照群より 20~40%増加した。

最終結論として、肺のシトクロム P-450y 依存性 7-エトキシマリン O-デエチラーゼに対するクメンの分解作用がこの研究によって示された。

哺乳動物におけるアルキルベンゼンの主要代謝経路は、側鎖酸化を介してアリルアルコールになり、さらに酸化されてアリルアルデヒドになり、そして共役する酸および内因性の酸になる。アルデヒドはアルデヒドデヒドロゲナーゼにより速やかに代謝されるが、肺にはアルデヒドデヒドロゲナーゼが欠損しているため肺では代謝されない。これが、アルデヒドおよびいくつかの活性中間体が形成されるシトクロム P-450 による代謝のメカニズムであると考えられる。

4.1.2.2.3 *In vitro* の研究

Holmberg et al. (1974) は腹水がん細胞由来のエールリッヒ二倍体細胞 (ELD) を用い、短時間の *in vitro* 培養で 33 種類の有機溶媒の急性細胞毒性を調べた。細胞死に至る不可逆的細胞障害ステージにある細胞の頻度を推定するために色素排除試験を用いた。

クメンの 50 および 100 mg/L を腹水がん細胞と共に 5 時間培養すると、細胞死亡率はそれぞれ 5 および 18% であった (対照群の死細胞は 4.2%であった)。

腹水肉腫 BP8 細胞を *in vitro* で懸濁培養し、クメンの一般毒性試験系として用いた。毒性作用としては、被験物質が細胞培養の増殖率を抑制する能力を測定した。クメン 1 mM で 48 時間では 100%の増殖率抑制であったが、0.1 mM では 3%の抑制であった (Pilotti et al., 1975)。

Thelestam et al. (1980) は、ヒト胎児肺組織由来の二倍体線維芽株細胞 (MRC-5) を用い、短時間 (30 分)

曝露後の細胞内マーカーの放出を測定することによって、464種類の化合物の細胞膜透過性の増加について調べた。試験方法は単純な原理に基づいており、細胞内物質の漏出は細胞膜の損傷を意味し、漏出物質の分子サイズは、被験物質により誘発された「穴」のサイズという点で細胞膜の損傷の程度を示す。

高い感受性を得るため、また細胞毒性による損傷から生じる二次的作用を防ぐために短時間処理とした。クメン 25 mM はヌクレオチドの 84% を放出する細胞膜損傷が認められた。この細胞膜障害は高度と分類された。

単離したハムスター褐色脂肪細胞におけるノルアドレナリン誘発呼吸の抑制を測定することにより、320種類の煙成分の細胞代謝に対する作用について検討した。被験物質 1 mM をエタノールまたはジメチルスルホキシドに溶解し、細胞と共に 5 分間培養し、その間の酸素消費量を記録した。この前培養の後にノルアドレナリンを添加し、さらに 5 分間酸素消費量を測定した。ノルアドレナリンの濃度は 1 μ M で、これは最大呼吸速度を誘発する用量のおよそ 2 倍である。

被験物質存在下のノルアドレナリン誘発酸素消費量と対照群のそれを比較することで毒性を決定した。クメンはノルアドレナリン誘発呼吸を 73% 抑制した。これは中程度の作用と考えられた (Pettersson et al., 1980)。

Pettersson et al. (1982b) は、*in vitro* 系でニワトリ胎児気管に曝露することにより、クメンを含む 316 物質の繊毛に対する毒性について調べた。クメン 5 mM は 37°C で 11 分間曝露により繊毛活動を抑制した。この作用は毒性と考えられた。繊毛活動の抑制は除去能力を低下させることで浮遊微小粒子が気道に残ることになり、その結果急性および慢性の障害リスクが増加することになる。

4.1.2.2.4 ヒトでの研究

利用できる情報はない。

4.1.2.2.5 急性曝露試験の要約

この物質は揮発性であるので、利用可能な急性毒性データの大半は吸入曝露に関係したものである。

クメンは動物に対しては急性毒性が低い。17.6 mg/L の 6 時間曝露 (OECD プロトコールでは急性吸入曝露は 4 時間曝露) しても死亡は認められなかったという観察結果、さらに 40 mg/L の 4 時間曝露では 2/3 のラットが死亡したという結果に基づき、ラットにおける LC50 は 17.6 mg/L 以上であると結論できる。急性曝露動物の主要な死亡原因は、呼吸麻痺、肺水腫、ならびに胸腺、膀胱および副腎のさらなる出血に結びつく出血であった。

マウスに 7 時間吸入曝露した LC50 は約 2,000 ppm (10 mg/L) であることが報告されている。死亡は最小曝露用量の 1,425 ppm でみられた。死亡原因は CNS 抑制による呼吸不全であった。ラットにクメンを 6 時間曝露後の行動検査では、500 および 1,200 ppm (2.5 および 6 mg/L) で活動量の増加と歩行異常が認められたが、100 ppm (0.5 mg/L) では認められなかった。

ウサギの経皮曝露 LD50 は 3,160 mg/kg 以上と報告されている。毒性症状としては、体重減少、衰弱の増加、虚脱および死亡が含まれていた。死亡例の肉眼的剖検所見としては、肺の出血部位、肝臓の変色、胆嚢の肥大、腎臓および脾臓の暗色変化、ならびに胃腸の炎症であった。

ラットの急性経口曝露の LD50 は 1,400~4,000 mg/kg と報告されている。毒性症状には中枢神経抑制が含まれている。死後検査により肺の出血、肝臓の変色および急性胃腸炎が認められた。

これらの試験には GLP 情報は無い。これらの全ての試験は、吸入あるいは皮膚経路によるクメンの急性毒性は低いことを示唆している。われわれの提案するリスク分類は、低い粘性 ($0.73 \times 10^{-6} \text{m}^2/\text{s}$) と経口急性毒性試験の死亡動物検査で肺水腫および出血が認められたことを付記した R65 (有害: 飲み込むと肺に損傷を引き起こす可能性がある) である。

毒性のメカニズムに関する 1 つの研究では、哺乳動物におけるアルキルベンゼンの主要代謝経路は、側鎖酸化を介してアリルアルコールになり、さらにアリルアルデヒドに酸化されることを報告した。

一方、*in vitro* 研究から得られたデータでは、クメンは以下のことが認められた。

- 長時間 (48 時間) 培養すると細胞増殖率を抑制する。
- ヒト胎児肺組織由来の二倍体線維芽細胞と培養すると高度な細胞膜損傷を起こす。
- ニワトリ気管組織と培養すると繊毛活動を抑制する。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物での研究

気道

クメン蒸気による気道の刺激性については、マウスで 2 つの研究がある。1 つの研究では、2,058 ppm で最初の 2 分以内に感覚刺激が認められ、上気道に対する作用のため呼吸速度が 50% 抑制された。肺刺激反応は弱かった (Kristiansen et al., 1986)。

もう 1 つの研究では、上気道の感覚刺激による呼吸速度 50% 抑制 (RD50) に必要な用量は 2,490 ppm であった。2,900 ppm までは素早い明確でない呼吸速度の減少が正常マウスで認められたが、反応の大幅な減衰は伴わなかった (Nielsen and Alarie, 1982)。

薬物動態研究 (Research Triangle Institute, 1989) の前に実施した見当付け試験において、クメン蒸気を 0、580 および 1,480 ppm の用量で曝露した雌雄各 3 匹のラットの呼吸頻度が報告されている。クメンを曝露しない (0 ppm) ラットの呼吸頻度を対照として用いた。クメン蒸気 1,480 ppm は、雄ラットでは曝露開始 3 時間後に、また雌ラットでは曝露開始 5 時間後に呼吸頻度の有意な抑制が 95% の信頼水準で認められた (Student's t-distribution)。また、重度の運動機能障害および昏睡が、1,480 ppm で 6 時間曝露の終了直後に雌雄共に認められた。クメン蒸気 580 ppm 曝露では呼吸頻度の抑制は認められなかった。

皮膚

IUCLID のデータシートには 6 件の皮膚刺激性試験が含まれており、5 件はウサギ 1 件はウシであった。これらの試験が GLP 基準に従って実施されたかどうかのデータは無い。これらの試験は、Huntingdon Research Center (1979) の未公表報告書、Union Carbide Corporation (1985)、Smyth et al. (1951)、Wolf et al. (1956)、Monsanto Company (1985) および Turner et al. (1962) により報告された。ウシで実施された研究および中程度の刺激性を報告した Wolf et al. (1956) の研究を除いて、結果は全て刺激性が軽微なことで一致していた。この研究ではクメンを反復投与している。被験物質原液を 10~20 回耳に塗布し、また 2~4 週間にわたって剃毛した腹部上に同じ回数を塗布し包帯を施した。動物には明瞭な紅斑および剥離をもたらす薄い死亡組織層の発達が認められた。

もう少し最近の研究 (Monsanto Company, 1985) では、原液 0.5 mL を 24 時間曝露した。平均刺激スコアは 1.9 (24、72 時間の平均) で、7~10 日に軽微な損傷作用による皮膚剥離が認められたが深い傷ではなかった。

眼

データシートには眼刺激の研究が5つ含まれている。Huntingdon Research Center (1979) の未公表報告書、Union Carbide Corporation (1985)、Smyth et al. (1951)、Wolf et al (1956)および Monsanto Company (1985) である。全ての試験でウサギが用いられており、全ての結果はEC分類で刺激性なしで一致していた。

Wolf et al. (1956) および Monsanto Company (1985) の2つの研究では、結果は軽微な刺激性で一致していた。

Wolf et al. (1956) は、右眼球上にクメンの液体を2滴垂らすことで試験した。刺激性および角膜損傷（内部および外部）の目視観測を、処理した眼について処理後3分間、1時間および1、2、7日目に行った。最初の観察（3分間）後の全ての観察において、角膜の外部損傷を可視化するためにフルオレセイン色素5%水溶液を用いて染色した。クメンによるウサギの眼の反応としては、結膜の知覚刺激は起こしたが角膜損傷はなかった。

もう少し最近の研究（Monsanto Company, 1985）では、クメン原液0.1 mLの曝露で平均刺激スコアは110の7.6（24、48、72時間の平均）であり、120時間のスコアは110の0であった（ドレイズ法による：スコアレンジ0～110）。

4.1.2.3.2 ヒトでの研究

イソプロピルベンゼンの溶媒としての使用で1～2年間にわたる曝露において、容易に耐えられる蒸気濃度での毎日の曝露では、毒性学的な損傷は認められなかった。大部分のヒトでは、300～400 ppmの蒸気により眼および上気道の痛みが認められたが、一部のヒトでは400 ppmを大幅に超える濃度でも容易に耐えることができた。

クメンの取り扱いおよび使用経験から、皮膚炎に対して特別な危険性はないことが明らかになった。皮膚に対する作用は、明らかにベンゼンおよびトルエンに類似している（Dow Chemical Company, 1948）。

4.1.2.3.3 刺激性の要約

ヒトでの限られた情報では、400 ppm以上の濃度のクメン蒸気は眼および上気道の強い痛みを示す。クメンの取り扱いおよび使用経験は、皮膚炎の軽微な危険性を明らかにした。

マウスの研究から得られた情報は、クメン蒸気は上気道を刺激し、2,058～2,490 ppmの濃度範囲で呼吸速度を50%抑制することを示している。

1,480 ppmのクメン蒸気に6時間曝露した他の試験では、雌雄ラット共に毒性反応を示し、呼吸頻度の有意な抑制、重度の運動機能障害および昏睡が認められた。

肺刺激反応は弱かった。クメンにはEU分類での皮膚刺激および眼刺激はなかった。しかしながら1つの公表された研究では、クメンの反復投与により、より明確な皮膚刺激が起こる可能性を示している。

セーフティフレーズ S24（皮膚との接触を避けること）が提案され承認された（section 1.4 参照）。

4.1.2.4 腐食性

4.1.2.3 項で示した動物およびヒトの研究は、クメンは皮膚および眼に対して腐食性がないことを示してい

る。

4.1.2.5 感作性

IUCLID に報告された研究が 1 件だけある。これは未公表研究である (cf. Huels Report, 1988b)。

試験方法は OECD ガイドライン 406 モルモットのマキシマイゼーション試験に従い実施されたが、クメンは感作性を示さなかった。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物での研究

経皮

Wolf et al. (1956) により公表された研究では、白色ウサギの皮膚に対するクメンの作用を報告している。量未記載のクメン原液を定期的に耳に 10~20 回塗布し、また 2~4 週間にわたって剃毛した腹部上に同じ回数を塗布し包帯を施した。動物は毎日観察し、体重は週に 1 度測定した。投与期間中のウサギの外観、行動および体重から判断して、クメンが皮膚を通して急性毒性量を吸収されたという兆候は認められなかった。しかしながら、クメンの反復投与により中程度の皮膚刺激 (明瞭な紅斑) が認められ、また剥離をもたらす薄い死亡組織層の発達が認められた。

Procter and Gamble (1985) による未公表の研究では、クメン 30%含む混合物を 2 mL/kg の用量で、週 5 日間で 28 日間、New Zealand 白色ウサギの全表面積の 10%以上の背中の局所に塗布した。試験期間中にも剖検時にも全身的な毒性作用は認められなかった。皮膚浮腫、亀裂および中~重度の紅斑が動物に認められた。肉眼的および顕微鏡的検査で、皮膚炎および他の細胞学的皮膚作用が明らかになった (Environmental hazard assessment: Cumene を引用)。

経口

Wolf et al. (1956) により報告された研究では、1 群 10 匹のラットに 0、154、462 および 769 mg/kg の用量で投与した。クメンはオリーブオイルに溶解し、1 日 1 回、週 5 日間で 6 ヶ月間経口投与した。1 群 20 匹のラットは対照群とし、2.5 mL のオリーブオイルを投与した。血液学的パラメータはいくつかの間隔で評価し、それらには赤血球および白血球の総数、ヘモグロビン含量、ならびに血球型分類の計数が含まれた。他の評価項目としては、体重、摂餌量、外観および行動、死亡動物の肉眼的および顕微鏡的検査、ならびに肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓および精巣の臓器重量が含まれた。副腎、膵臓および大腿骨骨髄についても顕微鏡的検査を行った。462 mg/kg では軽度の、769 mg/kg では中等度の作用が平均腎臓重量に認められた。154 mg/kg では腎臓重量に変化は認められなかった。造血系には何ら影響は認められず、また肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、副腎、大腿骨骨髄、および膵臓に組織病理学的所見は認められなかった。NOAEL は 154 mg/kg、LOAEL は 462 mg/kg とされた。

吸入

91 日間の亜慢性毒性試験 (Cushman et al., 1995) は GLP 基準に従って実施された。雌雄 Fischer 344 ラット (20 匹/群) にクメン蒸気を 0、100、500 および 1,200 ppm で 1 日 6 時間、週 5 日間で 13 週間曝露した。またサテライト群として、同一濃度で 6 時間曝露し、その後 4 週間の回復期間を伴う 13 週間試験を 0、50、100、500 および 1,200 ppm で実施した (Cushman et al., 1995)。

動物の毒性症状について、曝露毎に曝露前、曝露中および曝露後に観察した。

亜慢性毒性試験のいずれにおいても、曝露に関連した死亡は認められなかった。症状観察では、1 番目の試験の開始 2～3 週間後に 1,200 ppm で運動失調が、また眼周囲組織の腫脹、着色尿、尿生殖器部位の濡れ、鼻孔周囲の付着物の増加が、主に 500 および 1,200 ppm で認められた。

1 番目の試験では、1,200 ppm 群のラットで自発運動の抑制が現れ、眼瞼痙攣、および驚愕反射の遅延または消失が認められた。500 ppm 群のラットでは曝露中に自発運動が抑制された。

トーンピップを用いた聴性脳幹反応（ABR）を 2 番目の亜慢性毒性試験（サテライト群）の曝露終了 1 週目に実施した。各群雌雄 10 匹のラットを無作為に選んだ。ABR は、4、8、16 および 30 KHZ において、ABR 閾値を超えた 50 dB で実施した。クメン曝露の動物に聴覚機能の変化は認められなかった。4、8、16 および 30 KHZ で ABR 閾値を超えた 50 dB に対し、ABR 反応に変化は認められなかった。

1 番目の試験で、500 および 1,200 ppm を曝露した雄ラットは、13 週目では総自発運動量の低下が認められ、また 4、9 および 13 週目に歩行活動が有意に減少した。これらの症状は 2 番目の亜慢性毒性試験では再現しなかった。

体重に差は認められなかった。1 番目の試験で、500 および 1,200 ppm で雌ラットの 1 週目の摂餌量が減少した。500 および 12,000 ppm の雄ラットで 2～13 週を通して一貫して摂水量の増加が認められた。

2 番目の亜慢性毒性試験では摂餌量および摂水量は測定しなかった。

1 番目の亜慢性毒性試験の終わりに、白内障が対照群および曝露群ともに 14～55%の雌雄動物で認められた。対照群の動物で高頻度の白内障（雌雄合わせて 19%）が見られたことから、1 番目の試験の曝露群での白内障については解釈不能と考えられた。2 番目の試験の終わりに、2 人の獣眼科医がそれぞれ個別に有害所見の可能性について眼科検査を行い、クメンに関係した眼科的な所見はないと結論した。この結論は、白内障発症日を統計学的に解析した結果が有意でないことから支持された。

500 および 1,200 ppm 群では、いくつかの血液学的および臨床化学的パラメータの変化が認められた。総白血球数、リンパ球数および血小板数が増加した。総タンパク、アルブミン、グロブリン、カルシウムおよびリンの増加が雌雄ラットに、主に 1,200 ppm 群で認められた。500 および 1,200 ppm 群の雌ラットでは、血清グルコース値が対照群に比べて低かった。

精子形成については曝露に関連した作用は認められなかった。1 つまたは両方の亜慢性毒性試験において、1,200 ppm 群の雌雄ラットの肝臓、腎臓および副腎の 3 つの臓器重量が統計学的に有意に増加した。500 ppm 群では、雌雄ラットの肝臓重量が増加し、雌ラットでは腎臓重量の軽度な増加が 1 番目の試験で認められた。雄ラットでは副腎重量の軽度な増加が認められた。肺、精巣、卵巣および脳の重量は全ての用量でクメンに関連した変化はなかった。100 ppm 群のラットでは臓器重量の変化はなかった。還流固定し摘出した脳の重量、長さおよび幅に関して、クメン曝露したラットと空気だけ曝露した対照ラットの間で差は無かった。末梢および中枢神経系組織に、クメンに関連した顕微鏡的变化はなかった。残りの神経以外の組織および臓器では、クメン曝露に関連した所見は雄ラットの腎臓だけであった。

腎近位尿細管細胞の肥大過形成および硝子滴形成が 500 および 1,200 ppm の雄ラットで観察された。しかしながら、この作用は雄ラットに特異的なものであり、ヒトの健康には関連しないものと考えられる。

結論として、クメン蒸気を 1 日 6 時間、週 5 日間で 13 週間 Fischer 344 ラットに曝露すると、1,200 ppm では軽度の毒性作用、500 ppm では最小の作用がみられ、また 50 および 100 ppm では観察可能な作用は認められなかった。この試験では、クメン蒸気は神経毒性も聴器毒性も示さなかった。NOAEL は 100 ppm、LOAEL は 500 ppm とされた。

実験動物を用いたクメンの長期吸入スクリーニング試験が Jenkins et al. (1970) により実施された。ラット、モルモット、サルおよびイヌについて、244 ppm のクメンを 1 日 8 時間、週 5 日間のスケジュールで合計 30 回曝露した。体重を測定し、限られた範囲の血液学的パラメータと臓器（剖検時）について調べた。

モルモットでは体重増加の顕著な減少が認められた。曝露に関連した他の作用は報告されていない。同じ試験において、ラット、モルモット、イヌおよびサルにクメンの 0、3.7 および 30 ppm を 90 日間連続して曝露したが、ラット、モルモットおよびイヌでは、体重増加、および限定された血液学的検査や組織病理学的検査において、曝露に関連した毒性作用は観察されなかった。しかしながら、3.7 ppm の 11 日目に 1 匹のラットの死亡が報告された。同一レジメンで曝露したサルでは体重増加には何ら影響が認められなかった。

吸入試験は Gulf Oil Corporation (1985a) により GLP 基準に従って適切に実施された。クメンの 0、2,000 および 5,000 ppm を 1 日 6 時間で 5 日間、1 群雌雄各 15 匹の Fischer 344 ラットに曝露した。

高用量群 (5,000 ppm) では、クメンを 6 時間で 2 回曝露した後に全ての動物が死亡した。これら死亡ラットの剖検では、多くの組織での鬱血、腸の異常内容物、眼および鼻分泌物の過剰な蓄積、および赤色液の充満した膀胱が認められた。低用量群 (2,000 ppm) では、クメンを 5 回曝露後も死亡は起こらなかったが、努力性呼吸、昏睡および高用量群で見られたのと同様の臨床症状がこの群での動物でも認められたが、その発生率ははるかに低いものであった。

Fabre et al. (1955) による試験では、ラットおよびウサギに異なった濃度のクメンを 1 日 8 時間、週 6 日間で 130~180 日間曝露した。509 ppm で曝露したラットに、試験の初期部分に限定された体重増加の減少、ならびに肺、肝臓、脾臓、腎臓および副腎の鬱血が認められた。ウサギにおいては、1,323 ppm とは違い 509 ppm 群では行動や体重増加に変化は認められなかった。

Branch and Ribelin (1985) は、Sprague-Dawley ラットにクメンの 0、105.1±2.5、300.1±3.5 および 599.3±6.7 ppm を 1 日 6 時間、週 5 日間で 28 日間曝露した未公表研究を報告した。試験中に死亡した動物はいなかった。曝露中に自発運動の抑制が起こり、また、鼻、眼および口に対する軽度の刺激反応が認められた。また、肝臓や腎臓の絶対および相対重量が増加したが有意性は不明である。平均体重に変化はなく、臨床的、肉眼的および顕微鏡的な病理所見は認められなかった。

4.1.2.6.2 ヒトでの研究

イソプロピルベンゼンの溶媒としての使用で 1~2 年間にわたる曝露において、容易に耐えられる蒸気濃度での毎日の曝露では、毒性学的な損傷は認められなかった。

大部分のヒトでは、300~400 ppm の濃度の蒸気により眼および上気道の痛みが認められたが、一部のヒトでは 400 ppm を大幅に超えても容易に耐えることができた (Dow Chemical Company, 1948)。

4.1.2.6.3 反復投与試験の要約

GLP 基準に従って実施された最近の吸入試験において、Fischer 344 ラットにおいては、NOAEL は 100 ppm (0.5 mg/L に相当)、LOAEL は 500ppm であり、また 1,200 ppm では軽度の毒性があることが示された。

これらの所見は、以前に実施されたクメンのラット亜慢性吸入試験と一致していた (Fabre et al., 1955; Jenkins et al., 1970)。毒性症状として CNS の抑制、および肝臓、腎臓、副腎重量の増加が報告されている。

500～1,200 ppm で曝露した雌雄ラットに摂水量の増加がみられた。摂水量の増加は他のアルキルベンゼン、トルエン (Roberts et al., 1993) およびスチレン (Cruzan et al., 1993) でも報告されており、曝露による刺激反応または尿排泄量の増加を反映しているのかもしれない。

腎近位尿細管細胞の肥大および硝子滴形成を伴う過形成が雄ラットでのみ観察された。クメンを曝露したラットで α メンをグロブリンは特異的には同定されていないが、ここに報告された所見は他の化学物質に曝露された雄ラットで報告されたものと同様であった (US EPA, 1991a; 1991b)。このグループの化学物質に対する反応が雌ラットやヒトでの反応とは異なることから、雄ラットはこのタイプの腎症のヒトに対するリスクを予測する良い動物モデルではない。

白内障発生率の増加が全ての曝露レベルで認められた。2 番目の試験において、この眼科所見はこれまでの背景データと一致しており、クメン曝露は白内障形成の増加の原因ではないことを示している。

自発運動量の減少が雄ラットで認められた。この所見は 2 番目の亜慢性試験では再現しなかった。曝露に関連しない変化が、機能観察バッテリー、脳のサイズおよび重量、末梢および中枢神経系の顕微鏡的变化に認められた。

1,200 ppm までの曝露では、クメンは聴覚脳幹反応で示される末梢聴覚系障害は起こさなかったもので、高濃度で聴神経障害を起こすトルエン、スチレンやキシレン混合物のような他の芳香族溶媒とは異なるようである。クメン蒸気への曝露は、これらの試験で Fischer 344 ラットに対して中枢神経毒性も聴神経毒性も示さなかった。

経口毒性としては、現在の厳しい基準では実施されていない 1 つの試験 (6 ヶ月) があるだけである。試験はラットを用いて実施され、NOAEL は 154 mg/kg で、腎重量の増加が 462 と 769 mg/kg で認められた。

クメンを皮膚に反復投与すると中程度の皮膚刺激が認められ、また剥離および皮膚炎をもたらす薄い死亡組織層の発達が認められた。

一方、ヒトでの限定された情報では、300～400 ppm の濃度のクメン蒸気で眼および上気道の痛みが認められた。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro* での研究

クメンの変異原性および遺伝毒性の研究にはいくつかの *in vitro* 系試験法が利用できる。変異原性および遺伝毒性の基本データ要件およびその他のデータは、GLP 法令に準拠して Microbiological Associates Inc. で実施された (1987)。

全ての試験において被験物質の溶媒として F127 を用いた。Pluronic Polyol F127 (CAS No. 9003-11-6) はエタノールと混合して 50% (w/w) 懸濁液として調製した。

細菌を用いる試験

Lawlor and Wagner (1987) は、*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 および TA1537 を用いた Ames 試験において、クメンの 33、67、100、333、667、1,000 および 2,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で試験した。試験は Aroclor 誘導ラット肝 S9 (S9mix 中 10%) の存在下および非存在下で行った。この試験では 37°C で 20 分間のブレインキュベーションを行った。

各菌株の代謝活性化群について、適切な陽性対照薬の3用量を、50 μL の Pluronic F127 の添加あるいは無添加の両方に設定した。陽性対照の反応に対する F127 の影響を調べるために、試験にはクメンの水に対する可溶最大量を1用量含めた。

S9 の存在下および非存在下で、2,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量まで復帰変異体コロニー数が減少した。この試験条件下では、クメンは代謝活性化の有無にかかわらず全ての菌株に対して陽性反応は認められなかった。

さらに、Florin et al. (1980) は Ames 試験を用いたタバコ煙成分の変異原性のスクリーニングを実施し、TA98、TA100、TA1535 および TA1537 を用い Aroclor 誘導のラット S9 の存在下および非存在下での定性的な試験では、クメンの 3 $\mu\text{mol}/\text{plate}$ は陰性であった。TA98 および TA100 を用い 3-メチルコラントレン誘導のラット S9 の存在下および非存在下での定量的な試験では、クメンの用量は 0.03、0.3、3 および 30 $\mu\text{mol}/\text{plate}$ とした。クメンには変異原性は認められず、3 $\mu\text{mol}/\text{plate}$ の用量で使用菌株に対して毒性を示した。

哺乳動物細胞を用いる試験

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用い、適切に実施された染色体異常試験が Putman (1987a) により実施された。試験は Aroclor-1254 誘導ラット肝臓による代謝活性化の非存在下および存在下で実施され、クメンの用量はそれぞれ 19、31、49、78、125、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 24、38、61、98、156、225 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

非代謝活性化試験では、細胞は 37°C で 8 時間 (遅延回収では 14 時間) 薬物処理した。S9 による代謝活性化試験では、細胞は 37°C で 2 時間薬物処理した。薬物処理終了後、細胞は更に 6 時間培養した。この間にコルセミドを添加し細胞を 2 時間処理をした。非代謝活性化処理試験においては、クメンの 125 および 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞周期の遅延が認められたため、これらの用量では細胞回収時期を遅らせた。細胞毒性が、各処理条件 (S9 の存在下および非存在下) の高用量 (220~225 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で認められた。

代謝活性化系の非存在下では、クメンは CHO 細胞に構造異常も数的異常も誘発しなかった。一方 S9 存在下では、156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞当たりの異常数が溶媒対照群と比べて統計学的に有意に増加した。しかしながら、背景対照の範囲と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった。この増加は、F127 溶媒対照群の値が低いことに起因するものであり、クメン処理による増加ではないと考えられた。このことから、クメンは CHO 細胞染色体異常試験において陰性であると結論された。

CHO 細胞を用いた遺伝子突然変異 (HGPRT) 試験が Yang (1987) により実施されている。突然変異試験では、以下に示す播種効率に基づく予備的な毒性試験により最適な試験用量を選択した。Aroclor 誘導ラット肝臓による代謝活性化存在下では 8~225 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲のクメンで 37°C で 5 時間 CHO 細胞を曝露し、また代謝活性化非存在下では溶媒単独あるいはクメンの 8~175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の 9 用量で 37°C で 8 時間または 18 時間曝露した。

突然変異試験の試験用量は、S9 の有無にかかわらず 100、125、150、175、200 および 225 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

非代謝活性化系の突然変異試験としては 18 時間処理を行った。100~125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の相対播種効率は 29~110% であった。150、175、200 および 225 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の相対播種効率は 10% 以下であった。

クメン処理群の突然変異頻度はいずれも対照群より有意に増加しなかった。S9 存在下で 5 時間処理した突然変異試験において、クメンの突然変異活性は対照群より有意に増加しなかった。

陽性および陰性対照は試験の妥当性の要件を満たしていた。

ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験によりクメンを評価した。Curren (1987) が実施したこの試験の目的は、オートラジオグラフィによりラット初代培養肝細胞の不定期 DNA 合成誘

発能についてクメンを評価することである。

1~128 µg/mL の範囲の 13 用量で評価したクメンの UDS 予備試験および細胞毒性試験の結果に基づき、本試験では 1、2、4、8、16 および 24 µg/mL の 6 用量で評価した。24 µg/mL 以上の用量では UDS を評価するには毒性が強すぎた。

18~20 時間曝露した後、細胞の UDS について評価した。UDS 試験の結果、本試験条件下では、被験物質は全ての試験用量で平均正味核粒子数（すなわち対照群より 5 以上の増加）を有意に増加させなかった。従って被験物質はこの試験において陰性と考えられた。なお、陽性対照薬として用いた 2-アセチルアミノフルオレン（2-AAF）は平均核内粒子数を溶媒対照より有意に増加させた。

変異原性試験ではないが、BALB/3T3 マウス胚細胞を用いた代謝活性化系非存在下での細胞形質転換試験が Putman（1987b）により実施された。

形質転換試験での用量設定のために、播種効率による毒性試験が実施された。

クメンの 50、100、150、200、250、300、350、400 および 500 µg/mL、ならびに培地、溶媒および陽性対照薬に、36±1°C で 3 日間細胞を曝露した。処理開始から 7~10 日後に、同時細胞毒性用ディッシュは固定・染色してコロニー数を計測した。処理開始から 4~6 週間培養後に、形質転換用ディッシュはタイプ II および III の形態的形質転換巣を計測した。

クメンの 250~500 µg/mL の処理では、BALB/3T3 細胞に対して完全な毒性が認められた。4 つの低用量（50、100、150 および 200 µg/mL）の生存率は、それぞれ 102、87、19 および 4% であった。200 µg/mL では生存率は低かった（4%）が、細胞は単層にディッシュ全面に達しており形態的形質転換巣を計測できた。

クメン処理によるタイプ III の形質転換巣は、溶媒対照（F127）と比べて増加しなかった。従って、クメンは BALB/3T3 細胞形質転換試験において陰性であると結論した。

4.1.2.7.2 *In vivo* での研究

In vivo の遺伝毒性については、Gulf Oil Corporation（1985b）による 1 つの未発表研究の要約が利用できるのみである。

CDR-1 (ICR) BR Swiss マウスを用いた小核試験によりクメンを評価した。パラフィン油に 5% の割合で溶解したクメンを 2 日間経口投与した。半数の動物を 3 日目に、残りを 4 日目に屠殺し、1 群雌雄各 10 匹のマウスについて、個体当たり 1,000 個の多染性赤血球および全成熟赤血球について調べた。

骨髄小核試験は GLP 基準に従って実施されており、250、500 および 1,000 mg/kg の用量において、正染性赤血球に対する多染性赤血球の比率に変化は無く、また小核を有する赤血球の増加もなかったことから、クメンは *in vivo* において染色体異常誘発作用を持たないことが示された。

4.1.2.7.3 ヒトでの研究

利用可能な情報は無い

4.1.2.7.4 変異原性の要約

クメンの *in vitro* 遺伝毒性試験については、いくつかの利用可能なデータがある。細菌に関しては、37°C で

20 分間のプレインキュベーション法においても、クメンはサルモネラ試験で変異原性を示さなかった。CHO 細胞を用いた染色体異常試験においても、代謝活性化処理の有無にかかわらず、クメンは構造的および数的染色体異常を誘発しなかった。CHO 細胞を用いた遺伝子突然変異 (HGPRT) 試験においても、クメンは S9 代謝活性化系の有無にかかわらず陰性と考えられた。

クメンはラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験においても、全ての処理濃度で平均正味核粒子数の有意な増加を示さなかった。

BALB/3T3 マウス胚細胞を用いた非代謝活性化系での試験において、細胞形質転換頻度の増加は認められなかった。

全体として、利用可能なデータからは、クメンは *in vitro* 試験においては変異原性を示さないことが示された。マウス骨髄小核試験において、1,000 mg/kg の用量まで小核誘発作用は認められなかったことから、*in vivo* においても染色体異常誘発作用を持たないことが示された。

4.1.2.8 発がん性

発がん性に関する実験動物のデータはない。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物での研究

繁殖への影響

繁殖に特定して調査した研究はない。しかしながら、もとはクメンの神経毒性研究として設計された試験において、精巣および卵巣重量を測定し、また精巣精子頭部および精巣上体精子を調べている。Fischer 344 雌雄ラットにクメン蒸気を 0、100、500 および 1,200 ppm で 1 日 6 時間、週 5 日間で 13 週間曝露した。高濃度群 (1,200 ppm) および対照群のラットから生殖器官を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定・パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色し光学顕微鏡で評価した。生殖器官に変化は認められなかった。雄ラットの右側精巣について精子形成ステージを評価した。また左側精巣については凍結し、精子細胞計数のためホモジナイズした。

精子形成の定量的または形態的評価にクメン曝露による大きな影響はなく、また精巣重量にも影響はなかった。精巣の萎縮が 1,200 ppm で 1 例認められただけであった。精子の頭部/尾部/結合部の異常が対照群を含む全ての群で認められたが、個々に起因する異常であり曝露に関連した作用ではなかった (Cushman et al., 1995)。

発生に関する研究

米国 EPA ガイドラインに基づく発生毒性に関する 2 つの試験が GLP 基準に従って実施された。

ラットの研究

1 群 25 匹の Sprague-Dawley 雌ラットに、0、100、500 および 1,200 ppm のクメン蒸気を妊娠 6~15 日の間 1 日 6 時間曝露し、妊娠 21 日目に屠殺した。

母動物の死亡はなく、また流産、早産も認められなかった。500 ppm で 3 匹、100 と 0 ppm でそれぞれ 2 匹の雌が妊娠していなかった。21 日目の屠殺時に、妊娠雌すべてに生存児 (1 匹以上の生存胎児) が認めら

れた。

屠殺時に生殖器官の広範囲な調査を行った。

全ての生存胎児は体重測定、性別、ならびに口蓋裂および変異を含む外表奇形を検査した。各腹生存胎児の約 50%については、胸部および腹部の内臓異常、および頭蓋・顔面の構造異常を調べた。残り 50%については骨格奇形および変異について調べた。

500 および 1,200 ppm で母体毒性が認められ、1,200 ppm では有意な体重増加抑制（約 20%）、および曝露に関連した毒性臨床症状が毎日の曝露後（口腔周囲の濡れおよび付着物）および曝露中（自発運動の抑制および眼瞼痙攣）に認められ、さらに曝露期間中の摂餌量の減少、および屠殺時に肝臓の相対重量の増加が認められた。摂餌量の減少と曝露中の臨床症状は 500 ppm でも認められた。

1 腹当たりの生存着床数、性比（雄の割合）、1 腹当たりの胎児体重を含む妊娠パラメータに曝露の影響はなかった。全ての曝露レベルで、個々の奇形あるいはプールした外表、内臓または骨格奇形の頻度に有意な増加はなかった。

1,200 ppm において、両側尿管の拡張および膀胱の膨張の発生頻度が有意に減少した。81 の骨格変異が記録されたが、曝露に関連した頻度の増加はなかった。以下の 3 つの骨格変異の頻度は有意に減少した：1) 100 ppm における 11 番胸椎二裂中心の減少、2) 100 および 1200 ppm（500 ppm では認められない）における頭頂骨の骨化不全の減少、3) 500 ppm における 5 番胸骨二裂骨化部位の減少。しかしながら、これらの異常の頻度は対照群と比べて有意差はなかった。

この研究において、母体毒性の NOEL は 100 ppm であった。発生毒性（催奇形性を含む）の NOEL は、試験した最高用量の 1,200 ppm より大きかった。

この研究において、クメンには催奇形性はないと著者らは結論した（Bushy Run Research Centre, 1989a）。

ウサギの研究

ウサギ（New Zealand 白）を用いた催奇形性試験では、1 群 15 匹のウサギに 0、500、1200 および 2300 ppm のクメン蒸気を、妊娠 6～18 日の間 1 日 6 時間曝露した。

妊娠 29 日目に屠殺し、子宮およびその内容物について完全な検査を実施した。生存および死亡胎児全てについて体重、性別、および外表奇形・変異および内臓異常（胸部および腹部内臓）を調べた。骨格奇形および変異についても評価した。約半数の生存胎児については頭蓋顔面異常について検査した。

2,300 ppm で 2 匹の母動物死亡と 1 匹の流産があり、曝露期間中に体重増加および摂餌量の有意な減少、日々の曝露中および曝露後に毒性臨床症状が認められ、さらに相対肝重量の有意な増加が認められた。500 および 1,200 ppm でも母動物に対する影響が認められ、摂餌量は曝露期間中一貫して減少した。

2,300 ppm で 4 匹の肺に変色（12 匹中 4 匹で 33%）が認められた。屠殺前に死亡した雌における最も顕著な所見は、毛玉、および胃の非腺部位での潰瘍および出血であった。肺および肝臓の変色は 2 回投与（死亡例と流産例）でも認められた。

1 腹当たりの黄体数、総着床数、死亡着床数および生存着床数、性別、着床前または着床後死亡、および 1 腹当たりの胎児体重（雄または雌の合計）を含む妊娠パラメータに有意な変化は認められなかった。

個々の奇形、カテゴリー別（外表、内臓あるいは骨格）の奇形、あるいは全奇形の発生率に有意な差はなかった。頭部の斑状出血が外表変異として唯一記録され、500 ppm で有意に増加した（1,200 および 2,300 ppm

では無かった)。この外表変異はカテゴリー別で評価しても有意な増加を示した（観察された唯一の外表変異のため）。

個々の内臓、または骨格変異の発生率に有意な増加はなかった。2つの骨格変異：13番片側性痕跡肋骨（2,300 ppm）および3番両側性痕跡肋骨（1,200 ppm）の発現頻度の減少が認められた。

結論として、New Zealand 白色ウサギの器官形成期にクメン蒸気を曝露すると、2,300 ppm では母体毒性が一貫して認められ、また 500 および 1,200 ppm では母体に対する影響は比較的軽度であった。曝露に関連した発生毒性はいずれの曝露濃度でも認められなかった。

母体毒性に関する NOEL は確立されず、また発生毒性に関する NOEL は少なくとも 2,300 ppm 以上であった。催奇形性を含む発生毒性は実施した曝露濃度では認められなかった（Bushy Run Research Centre, 1989b）。

4.1.2.9.2 ヒトでの研究

データはない。

4.1.2.9.3 生殖毒性の要約

繁殖に関しては、ヒトで利用できる情報はなく、またそのような影響の調査に特化した動物試験もない。しかしながら、クメンの 0、100、500 および 1,200 ppm を 13 週間曝露したラットの生殖器官には何の変化も認められなかった。発生に対する影響に関しては、ヒトで利用できる情報はない。

ラットとウサギで適切に実施された 2 つの試験において、発生に対する影響は認められなかった。

13 週間曝露での雌雄ラットに一般的な所見が認められないことは、クメンを吸入曝露したラットとウサギの試験で発生毒性がないことの報告（Bushy Run Research Center, 1989a; 1989b）と併せると、クメンは生殖毒物ではないことを示している。

4.1.2.10 その他の特定の研究

4.1.2.10.1 神経毒性

Tham et al. (1984) は種々の工業用溶媒について、ラットの前庭動眼反射（VOR）に対する影響を調べた。

Sprague Dawley 雌ラットを用いた。被験物質は 60 分間持続静脈内投与した。ヒト経静脈栄養（Intralipid）として使われている脂質のエマルジョンに溶解した。被験物質の濃度は 0.1～10%とした。また、Intralipid 溶液の注入速度は 32 μ L/分とした。

ラットにおける前庭動眼反射に対するクメンの興奮効果の限界値は 144 mg/L・血液であり、この濃度はクメンを 4.8 mg/kg/分で 60 分間静脈内投与した結果である。

クメンをラット（15 匹/性/群）に 90 日間の亜慢性吸入曝露した試験には、神経毒性および聴神経障害の評価も含まれていた（Cushman et al., 1995）。1,200 ppm までの濃度で 1 日 6 時間、週 5 日間曝露において、クメンは脳幹聴覚反応で示される末梢聴覚機能障害を起こさなかった。マイナーな自発運動量の減少が 500 および 1,200 ppm の雄ラットで見られたに過ぎなかった。また、この結果は 2 番目の試験では再現しなかった。

クメンの 500 および 1,200 ppm の 6 時間単回吸入曝露で、FOB（機能観察バッテリー）のいくつかのパラメータが 1 および 6 時間目で影響を受けたが、24 時間目では受けなかった。

4.1.2.10.2 神経毒性の要約

神経毒性作用は、高用量（500 ppm）で非特異的中枢神経系を抑制する限定的なものである。それは容易に可逆的である。クメン蒸気曝露は、Fischer 344 ラットに神経毒性も聴覚毒性も起こさなかった。

4.1.2.10.3 免疫毒性

0、0.3 および 3 mg/L のクメンをラットに反復投与（投与経路および投与回数は不明）すると、投与 5～6 ヶ月後に白血球数が減少し、それらの特性のいくつかが変化した。

イソプロピルベンゼンおよび -メチルスチレンのラットおよびウサギに対する慢性的作用は、白血球の浸透圧抵抗の低下および好中球、グリコーゲン、脂質およびペルオキシダーゼのレベル変化をもたらした（Makarieva, 1972）。

より最近の GLP 試験では、これらの影響の証拠はない（Cushman et al., 1995）。