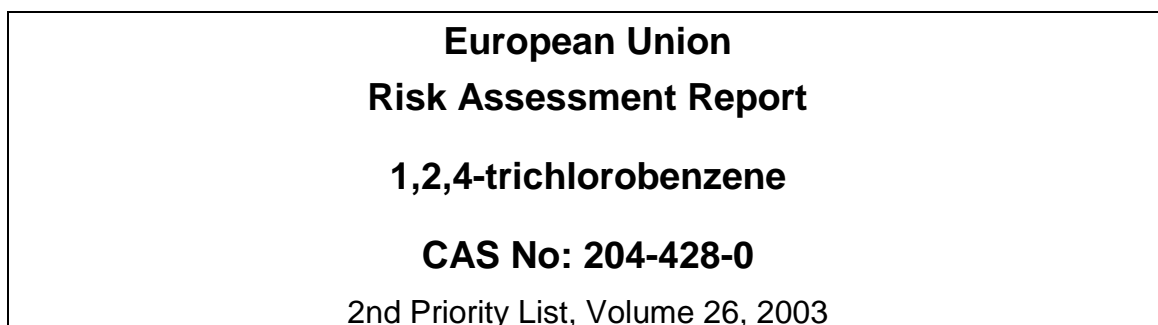
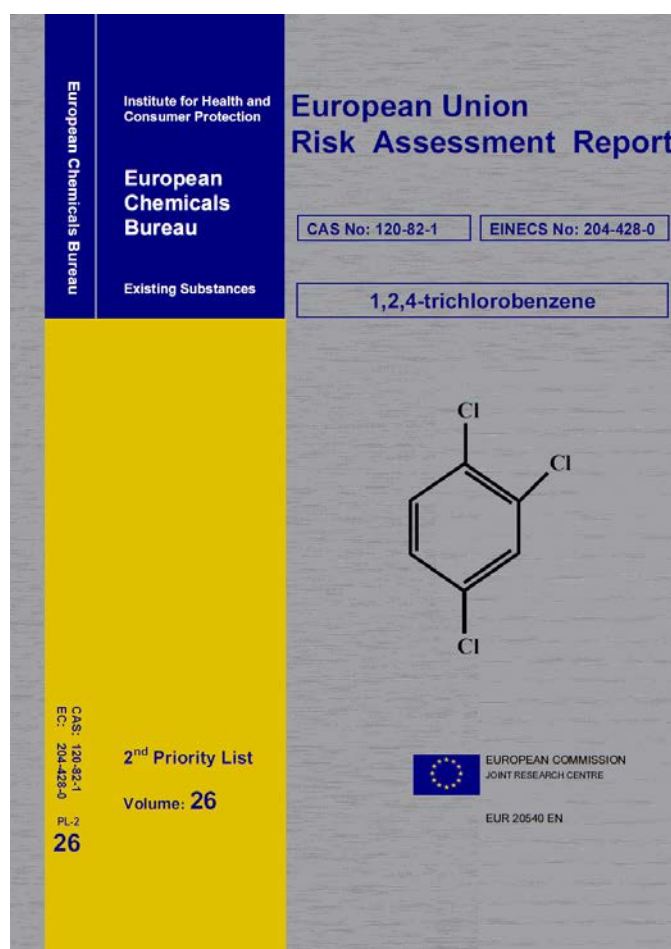


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 26, 2003)
トリクロロベンゼン



国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2013年2月

本部分翻訳文書は、1,2,4-trichlorobenzene (CAS No: 204-428-0)に関するEU Risk Assessment Report, (Vol. 26, 2003)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/trichlorobenzenerereport039.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）評価

1,2,4-トリクロロベンゼン(TCB)による健康影響については、数多くの検討・報告がなされてきた。これらには、IPCS (WHO, 1991)、BUA (1987)、US EPA (1981, 1987, 1992)およびスウェーデンの職業曝露基準専門委員会 (Swedish Criteria Group for Occupational Standards; 1993) による評価書が含まれる。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

以下の試験で示されたとおり、1,2,4-TCB を経口投与した場合の吸収性は高い。

1群5匹のラットに、¹⁴C 標識 1,2,4-TCB (10 mg/kg 体重)を単回強制経口投与し、0.5 時間後、1 時間後、2 時間後および 4 時間後、1 日後、2 日後、7 日後、14 日後、28 日後および 56 日後に放射能の測定を行った。放射能は、0.5 時間後(初回サンプル採取時)で血液中および組織中に認められ、投与後 2~4 時間前後に最高値を示した(Chu et al., 1987)。放射能は、さまざまな器官において測定され、1,2,4-TCB 濃度(ppm)に換算した平均値として報告されている。投与後 0.5 時間に放射能が認められた組織は、濃度の高い順に、消化管(173 ppm)、膀胱(12.9 ppm)、腎臓(9.7 ppm)、副腎(9.6 ppm)、脂肪(8.9 ppm)、肝臓(7.1 ppm)、膵臓(5.7 ppm)および肺(4.4 ppm)であり、その他の器官ではおおよそ同濃度の放射能(4~1 ppm)が検出された。放射能が最も低濃度を示したのは、精巣であった(0.6 ppm)。その後のサンプル採取時には、消化管では放射能の相対濃度が減少し、皮膚、肝臓、腎臓、副腎、脂肪および膀胱では相対濃度が増加した。体内の放射能濃度は概ね 4 時間前後で最高となり、その後徐々に減少した。1,2,4-TCB の体内からの排泄は二相性を示し、半減期はそれぞれ 12 時間および 93 時間であった。

特に ¹⁴C-1,2,4-TCB 投与後の ¹⁴C の排泄に的を絞った試験は行われていないが、2 種類の異性体(1,2,3-および 1,3,5-TCB)の排泄が、同時に試験・測定されている。これら 2 種の異性体では、投与した放射能の 89~95%が、48 時間後に尿中および糞便中に排泄された。腎臓お

よび膀胱の放射能濃度のデータから、1,2,4-TCB またはその代謝物は尿中に排泄され、一部は糞便中に排泄されるものと推察することができる。

組織分布試験(Kato et al., 1993)では、ラットに 1,2,4-TCB 1.36 mmol/kg を腹腔内投与し、投与後時間を置いて(最長 120 時間)動物を屠殺した。その結果、血液中、肝臓および腎臓における 1,2,4-TCB の半減期は、それぞれ 5.8 時間、5.2 時間および 6.2 時間であると推定された。脂肪組織では、血液中および他の組織に比べはるかに高濃度の 1,2,4-TCB が認められた。

Tanaka et al.(1986)による別の試験では、1,2,4-TCB の分布、代謝および排泄を明らかにするため、1 群 5 匹のラットに、 ^{14}C 標識被験物質 50 mg/kg を強制経口投与した。各器官中の放射能の分析結果から、7 日間の観察期間を通じて放射能は、脂肪組織が多めであった以外は、各組織に均等に分布していたことが明らかにされた。この 7 日間の尿中および糞便中への放射能の排泄率は、それぞれ 66% および 17% であった。呼気中には、放射能の 2.1% が 1,2,4-TCB および脱ハロゲン化誘導体として認められ、 $^{14}\text{CO}_2$ は検出されなかった。放射能のほぼ全量(80%)が、最初の 3 日間で排泄された。

2 匹のラットを用いた別の試験では、胆汁中への排泄率が 45% であることが明らかにされた。このときの糞便中への排泄率は 20% であったことから、1,2,4-TCB の腸肝循環が存在することが示唆される。糞便中および尿中に認められた主要代謝物は、抱合型および遊離型の 2,3,5-トリクロロフェノールおよび 2,4,5-トリクロロフェノールであった。また、糞便中には未変化の 1,2,4-TCB も認められた。

Smith et al.(1985)は、ラットおよびサルを用い、強制経口投与および静脈内投与による 1,2,4-TCB の分布試験を行った。

この試験では、雄の Charles River ラット 4 匹を 1 群とする 7 群に、 ^{14}C 標識 1,2,4-TCB 10 mg/kg を強制経口投与し、投与後 3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間および 96 時間の各時点で、それぞれ 1 群の動物を屠殺した。尿および糞便の採取は、投与後 24 時間ごと、および屠殺時に行った。放射能の測定は、全血、血漿、肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、精巣、脳、脂肪、筋肉および皮膚について実施し、消化管については、胃、小腸、盲腸および大腸の各部に分け、各部とその内容物の放射能の総量を測定した。

放射能の約 80~90% は尿中に回収され、10~20% が糞便中に回収された。放射能の排泄は、24 時間後までにほぼ完了し(96%)、48 時間後には完了していた(101%)。ラットにおける 1,2,4-TCB の第一相の $T_{1/2}$ は 4~6 時間の範囲であり、これに続く第二相はこれよりはるかに長時間にわたる(推定 $T_{1/2}$ は示されていない)。

組織中の最高濃度が観察されたのは3時間後であった。組織中の¹⁴C濃度は、消化管を除く大部分の組織で、24時間後までに2 µg ¹⁴C/g未満に減少した。胃の¹⁴C濃度は非常に低く、他の消化管中の¹⁴Cの約3.5%であり、他のすべての組織中における値のわずか1%であった。

Smith et al.(1985)はまた、雄のCharles Riverラット4匹を1群とする7群を用い、¹⁴C標識1,2,4-TCB 10 mg/kgを大腿静脈に注入した。この試験でも、投与後3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間および96時間の各時点で、それぞれ1群の動物を屠殺し、投与後24時間ごと、および屠殺時に尿および糞便の採取を行った。放射能の測定は、全血、血漿、肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、精巣、脳、脂肪、筋肉および皮膚について実施し、消化管については、胃、小腸、盲腸および大腸の各部に分け、各部とその内容物の放射能の総量を測定した。

放射能の主要な排泄経路は尿中であり(83~86%)、糞便中には約12%が検出された。放射能の排泄は24時間後までに90%が完了し、48時間後には実質的に100%完了していた。血液、血漿、肝臓および腎臓の組織中放射能含量が最高値を示したのは6時間後であったが、他の組織では、最高値が3時間後に認められたか、または3時間後と6時間後の値が同等であった。放射能濃度は、測定を行った中では、他の組織に比べ、脂肪で高値を示した。24時間後の脂肪、腎臓および肝臓の放射能濃度は、1 µg/gを超えていた。¹⁴Cが最も維持されていた組織は脂肪(96時間後に0.8 µg/g)であったが、腎臓および肝臓でも、96時間後に明らかな残留が認められた(約0.5 µg/g)。小腸、盲腸および大腸にも測定可能な量の放射能が検出され、投与後12時間で最高値を示した。これにより、1,2,4-TCB またはその代謝物に腸肝循環が存在することが示唆される。

1群2匹の雌のアカゲザルを用いた試験では、¹⁴C-1,2,4-TCB 10 mgの単回経口投与または静脈内投与を行った。血液サンプルは投与前ならびに投与後1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、48時間、72時間および96時間に、尿サンプルは投与後6時間、12時間、24時間、48時間、72時間および96時間に、糞便は24時間間隔で7日間採取した(Smith et al., 1985)。

¹⁴C-1,2,4-TCBを静脈内投与した場合、全血中の¹⁴C含有量は、投与後1時間で推定初期濃度112 µg/mLから2.0~2.9 µg/mLまで劇的に減少した。その後の減少は緩徐であり、続く4日間で0.2 µg/mLまで減少した。血漿中の¹⁴C-1,2,4-TCB濃度は同時点における全血中の濃度より高く、1時間後で3.1~4.9 µg/mLであり、その後二相性の減少を示し、96時間後の濃度は0.24 µg/mLであった。

経口投与した場合、1匹のサルでは1時間後に血中濃度の最高値を認め(全血中濃度3.9 µg/mL、血漿中濃度4.6 µg/mL)、もう1匹では2時間後に最高濃度に達した(全血中濃度2.3

μg/mL、血漿中濃度 3.6 μg/mL)。その後の観察期間中には、静脈内投与群および経口投与群の動物の全血中および血漿中濃度に有意差は認められなかった。

静脈内投与後の尿中排泄量は、4 日間で投与量の 38%であり、最初の 24 時間までに 22%が排泄された。1,2,4-TCB を経口投与したサルにおける尿中排泄率は有意に高く、投与後の最初の 24 時間で投与量の 36~40%、4 日間では 56~73%が回収された。

経口投与後および静脈内投与後の排泄量がこのように異なる理由としては、1,2,4-TCB は非常に脂溶性が高く、静脈内投与後急速に脂肪組織に貯蔵されることが考えられる。本化合物を経口投与した場合は肝臓に運ばれて、そこで貯蔵されたり、全身循環に入る前に代謝を受けたりする。

アカゲザルにおいては、¹⁴C-1,2,4-TCB の経口投与後または静脈内投与後の糞便中への排泄量はわずかであり、全投与量の 4%未満であった。これにより、本化合物は消化管から容易かつ完全に吸収され、速やかに尿中に排泄されやすい物質に代謝されることが示唆される。

1,2,4-TCB 代謝物の腸肝循環の有無を明らかにするため、Bakke et al.(1992)は、無処置のラットおよび胆管カニューレを挿入したラットに ¹⁴C-1,2,4-TCB 23 mg/kg を経口投与した。この結果、無処置のラットでは、投与量の 70%が尿中に、9%が糞便中に排泄されることが示された。胆管カニューレを挿入したラットでは、投与量の 61%が胆汁中に、21%が尿中に、2%が糞便中に排泄された。これらのデータから、無処置のラットで尿中に排泄された代謝物の大部分は腸肝循環を経たものであることが示唆される(この場合は、投与量の 85%)。1,2,4-TCB の代謝物として提示されていた種々の物質を用いて試験を行うことにより、1,2,4-TCB の代謝において芳香族エポキシド化合物が生成されることを証明することができ、Lingg et al.,(1982)によって見出されていた代謝物の類型が確認された。

吸入による亜慢性および慢性曝露試験の結果からは、1,2,4-TCB は気道から吸収されることが推察される (Coate et al., 1977 ; Kociba et al., 1981 ; Watanabe et al., 1978)。しかし、単回吸入曝露後の吸収に関する正確なデータは得られていない。

皮膚に関する注意喚起表記のための基準を定める目的で、1,2,4-TCB の経皮吸収性を、物理化学特性から予測される皮膚透過速度と規定して、その算出が行われている (Fiserova-Bergarova et al., 1990)。本物質はまた、職業曝露限界に関する科学委員会 (Scientific Committee on Occupational Exposure Limits; SCOEL, 1993) による評価も受けており、皮膚に関する注意喚起表記が勧告されている。1,2,4-TCB の経皮吸収に特化した情報は得られていないが、急性および慢性的経皮適用した場合におけるデータはいずれも、1,2,4-TCB が皮膚から吸収され得ることを示唆するものである。

1,2,4-TCB の代謝は、動物種により異なる (Figure 4.1 を参照のこと)。

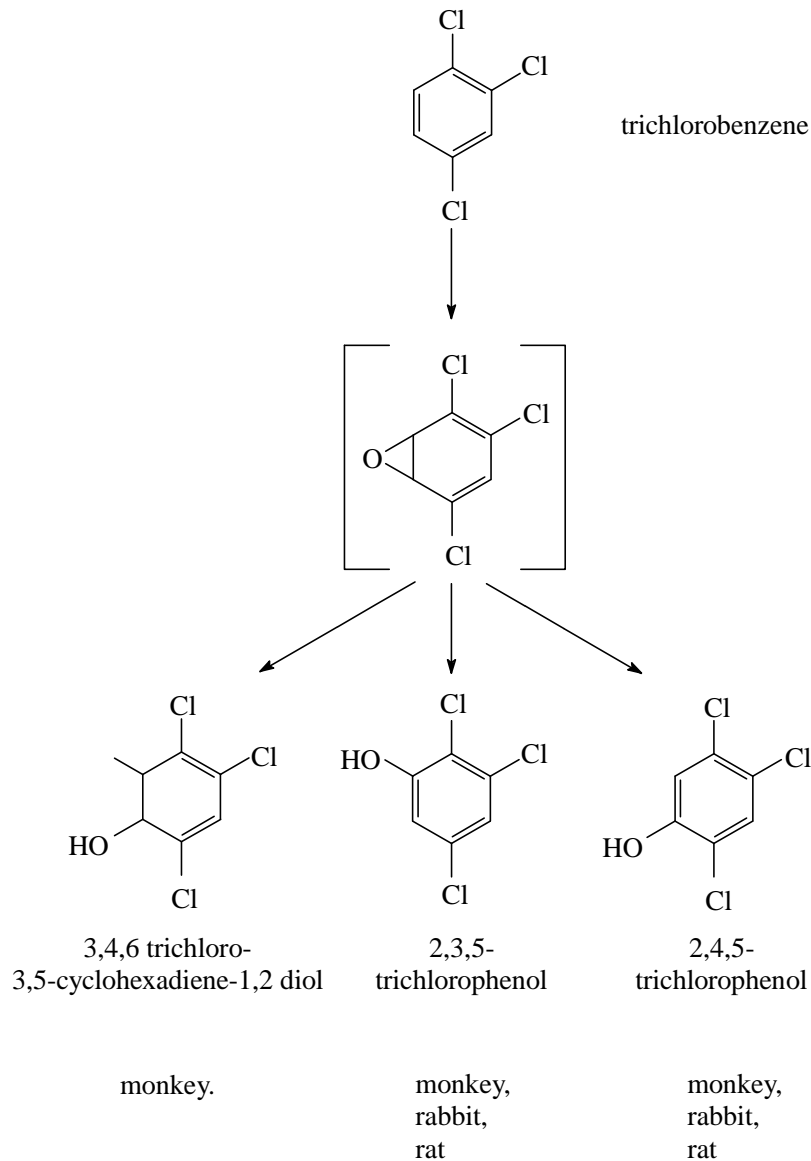


Figure 4.1 Metabolism of 1,2,4-TCB in laboratory animals

以下の試験で示されたとおり、1,2,4-TCB の代謝におけるラットとサルとの主な相違点は、最初に起こる芳香族酸化化合物生成に続く、一連の反応である。ラットではグルタチオン抱合を受けるのに対し、サルでは加水分解を受け、これにより生じたジヒドロジオール化合物がグルクロン酸抱合体として排泄される。ウサギでは、主として 2 種のフェノール化合物として排泄されるが、少量のトリクロロカテコールおよび 2 種類のメルカプツール酸の排泄も認められる。

放射性標識 1,2,4-TCB を、ラットおよびアカゲザルに、経口投与(10 mg/kg) もしくは静脈内

投与(10 mg/kg)した。この結果、ラットにおける投与後 24 時間までの排泄率は、経口投与で 95% (尿中 84%、糞便中 11%)、静脈内投与では 85% (尿中 78%、糞便中 7%) であることが示された。サルでは排泄率が低く、投与後 24 時間までに、経口投与では尿中に 40%、糞便中に 1%未満、静脈内投与では尿中に 22%、糞便中に 1%未満が排泄されたに過ぎなかった。これら 2 種の動物では、放射性標識した尿中代謝物の HPLC パターンは大きく異なっており、サルでは等しく重要な 3 種類の代謝物が認められ、ラットでは 4 種類の代謝物のうち 1 種が多量に認められた。サルで認められた代謝物は、3,4,6-トリクロロ-3,5-シクロヘキサジエン-1,2-ジオール、2,3,5-トリクロロフェノールまたは 2,4,5-トリクロロフェノールのグルクロン酸抱合体であった。ラットでは、代謝物の 60%が N-アセチル-S-(トリクロロフェニル)-L-システインの 2,4,5-および 2,3,5-の異性体混合物であり、遊離型トリクロロチオフェニルの 2,4,5-および 2,3,5-異性体が、経口投与後の尿中代謝物の 33%を占めた (Lingg et al., 1982)。

1,2,4-TCB 181 mg (1 mmol)/kg 体重/日をラットに投与し(総放射能 6,660,000 dpm)、7 日間の投与期間中および投与後 21 日まで尿中および糞便中の放射能を測定した結果が報告されている。観察期間を通じ、最も高濃度の放射能が検出されたのは尿であった。投与期間中の尿中の放射能の最大値が 1,000,000 dpm であったのに対し、糞便中は 50,000 dpm であった。また、糞便中の放射能は投与後 15 日にバックグラウンドレベルまで減少したが、尿中には投与後 21 日にもなお 1,100 dpm の放射能が検出された (Smith and Carlson, 1980)。これと同じ試験において、腹部脂肪には、少なくとも投与後 16 日までは放射能が残留した(投与後 1 日 2,033 dpm/g、投与後 16 日 408 dpm/g)。

Jondorf et al. (1955) は、3 匹のウサギに 1,2,4-TCB 0.5 g/kg を経口摂取させ、グルクロン酸抱合体、エーテル硫酸抱合体およびメルカプツール酸抱合体、ならびに遊離型トリクロロフェノールの形で存在する代謝物に関して、尿の分析を行った。この結果、トリクロロフェノールのグルクロン酸抱合体は投与量の 18~33%、エーテル硫酸抱合体は投与量の 10~12% であることが示された。トリクロロフェノールまたはその抱合体の形での排泄量は、合計すると投与量の 33~51%であった。

Kohli et al. (1976) によるウサギを用いた試験においても、定性的に同様の結果が得られており、トリクロロベンゼン酸化物の生成が、検出された代謝物の由来と考えられることが示唆された。

他の塩素化合物の代謝物としての 1,2,4-TCB の生成

1,2,4-TCB は、*in vivo* で他の多くの塩素化合物の代謝により生成される。この生成経路は、動物やヒトで検出される 1,2,4-TCB に関連する可能性があるため、ここで簡潔に述べておく

(第 4.1.1.4 項を参照のこと)。

大部分の報告は、ヘキサクロシクロヘキサン(HCH)またはペンタクロシクロヘキサンに関連したものである。 γ -HCH を経口投与または噴霧されたブタの脂肪組織中(Mottram et al., 1983)、および α -HCH を混餌投与されたラットの尿中(Macholz et al., 1982)に、1,2,4-TCB が検出されたことが報告されている。また、*in vitro* では、肝酵素液または肝ミクロソームとのインキュベーションにより、リンデンおよびその関連化合物から、1,2,4-TCB が生成されることが報告されている(Foster and Saha, 1978; Kurihara et al., 1979a, 1979b; Tanaka et al., 1979; Fitzloff and Pan, 1984)。

トキシコキネティクスについての結論

1,2,4-TCB は、経口、経皮および吸入曝露により体内に吸収される。経口経路についてのみ、吸収に関する定量的なデータが報告されており、このデータによると吸収性は高い(70~90%)と考えられる。吸入または経皮投与後の吸収率についての定量的な評価は行われていない。

1,2,4-TCB は胆汁中への排泄率が高く、糞便中への排泄率が低いため、1,2,4-TCB の腸肝循環が存在する。

ラット、サルおよびウサギの尿中に排泄される代謝物のプロファイルから明らかなように、1,2,4-TCB の代謝は動物種により異なっている (Figure 4.1 を参照のこと)。最初の共通段階としてトリクロロベンゼンのエポキシド体が生成されると考えられるが、この中間体は実験的に観察されてはいない。ヒトでは、ベンゼンの代謝においてもエポキシド体が生成されることが報告されている[ラットの血液中での推定半減期：8~10 分(Lindstrøm et al., 1997)]。化学的な根拠(分子内の塩素の誘起効果)に基づくと、1,2,4-TCB がエポキシド体に代謝されることにより、 $T_{1/2}$ が長くなるものと考えられる。アカゲザルでは、1,2,4-TCB のエポキシド体は、シクロヘキサジエンジオール化合物およびトリクロロフェノールに変換され、さらに抱合を受けてグルクロン酸抱合体として排泄される(グルクロン酸抱合)。ラットおよびおそらくウサギでは、トリクロロベンゼン酸化物はトリクロロフェノールに変換され、GSH 抱合により主に N-アセチル-S-(トリクロロフェニル)-L-システインとして排泄される。

経口投与後の主要な排泄経路は尿中であり、ラットで投与量の 84%、サルでは 40%が 24 時間以内に尿中に排泄される。糞便中への排泄は、ラットで 11%、サルでは 1%である。

1,2,4-TCB は、多くの高塩素化合物の代謝物である。

4.1.2.2 急性毒性

急性経口毒性

OECD TG 401 (draft, OECD, 1979) に準拠した唯一の試験は、純度 98% の 1,2,4-TCB を用いて実施され、LD₅₀ は雄ラットで 0.76 mL/kg (1,107 mg/kg)、雌ラットでは 0.70 mL/kg (1,019 mg/kg) であった (Korte and Greim, 1981)。この試験の結果の詳細は不明である。

雌雄各群 4 匹のラット (体重 150~250 g) に、純度 98% の 1,2,4-TCB を強制経口投与した試験が行われている。用量および溶媒に関する情報は報告されていない。LD₅₀ は、756 mg/kg (95% 信頼限界: 556~939 mg/kg) と推定された (Brown et al., 1969)。この試験で観察された中毒症状は、低用量における活動性の低下、および致死量域における死亡前の伸展性痙攣であった。

雌雄各群 5 匹のラット (試験開始時体重 159~173 g) に 1,2,4-TCB を強制経口投与した試験では、LD₅₀ は 0.93 g/kg であった (Bayer, 1982)。

雌雄各群 5 匹のラット (試験開始時の平均体重 169 g) にトリクロロベンゾール S (1,2,4-TCB および 1,2,3-TCB の混合物を 83~91% 含有) を強制経口投与した試験では、LD₅₀ は 0.98 mL/kg (1,421 mg/kg) であった (Bayer, 1980)。

経口 LD₅₀ に関し、その他の値も多く報告されているが、動物数、用量、溶媒、徴候および病理学的所見のデータは一部しか得られていない。完全を期するため、これらの試験についても記述する。

Côté et al. (1988) による亜慢性試験のための用量設定試験では、ラットの経口 LD₅₀ は 0.88 g/kg であった。Dow Chemical (1958) の報告では、LD₅₀ (動物の 1/2) は 1,000 mg/kg であった。Du Pont de Nemours (1982) による 1,2,4-TCB と *o*-ジクロロベンゼンとの比較毒性試験では、1,2,4-TCB の「概略致死量」(最小致死量) は 2,250 mg/kg であった。この報告では、これら 2 つの物質の毒性は概ね同等であると結論されている。

他の動物種における LD₅₀ も報告されている。

雌雄各群 4 匹のマウス (体重 18~23 g) に純度 98% の 1,2,4-TCB を強制経口投与した試験では、LD₅₀ は 766 mg/kg (95% 信頼限界: 601~979 mg/kg) と推定された (Brown et al., 1969)。

モルモットにおける LD₅₀ は、1,600 mg/kg (LD₀) ~ 2,000 mg (LD₁₀₀) の間であった (Dow Chemical, 1938)。

また、別の試験では、1 群 3 匹の雌の Wistar ラットに 1,2,4-TCB 0、125、250、500、750、1,000 または 1,500 mg/kg を単回経口投与し、投与 24 時間後に体重、肝重量および肝抽出物中の種々の生化学的パラメータを測定した。この結果、250 mg/kg 以上の投与により、薬物代謝酵素アニリンヒドロキシラーゼ、アミノピリンデメチラーゼおよびシトクロム P450 が誘導されたことが示された。また、すべての用量群で、ポルフィリン合成経路の律速酵素である d-ALA 合成酵素の活性が亢進した (Ariyoshi et al., 1975)。

1,2,4-TCB 0 mg/kg または 500 mg/kg を単回経口投与されたラット (各群 4 匹) において、3 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後、5 日後および 15 日後にサンプルを採取し、上述のパラメータの経時変化を評価した。この結果、24 時間後~5 日後に、アニリンヒドロキシラーゼおよびシトクロム P450 活性の有意な亢進が認められた。また、アミノピリンデメチラーゼについても、24 時間後に活性の増加が認められ、15 日後にも対照群を有意に上回っていた。d-ALA 合成酵素の活性は、最初の 3~6 時間ででは減少したが、24 時間後には対照群を上回った (Ariyoshi et al., 1975)。

急性吸入毒性

ラットにおける 4 時間 LC₅₀ に関するデータは得られていない。

ラットを用いた唯一の 4 時間吸入曝露試験が、1982 年に Du Pont de Nemours (1971a) により行われている。この試験では、418 ppm (3.1 mg/L/4 時間) の単回吸入曝露による死亡例は観察されなかった。

Kociba et al. (1981) は、2 つの試験について簡潔に報告している。第 1 の試験では、ラットを約 330 ppm (2.5 mg/L) の 1,2,4-TCB に 7.5 時間吸入曝露させたが、毒性症状はみられず、剖検によっても毒性徴候は認められなかった。第 2 の試験では、1,2,4-TCB を 100°C に熱して蒸発させ、1,800 ppm (13.6 mg/L) の蒸気で 7 時間、ラットを曝露した。この結果、曝露中に有害な影響は認められなかった。曝露後第 1 日に実施された 1 匹のラットの病理学的検査で、肺および腎臓のうっ血、ならびに肝臓の斑状変色が認められたが、第 14 日に実施された 3 匹のラットの病理学的検査では、肉眼的な病理学的変化は認められなかった。

ACGIH (1991) は、Treon (1950) の文献を引用しており、そこでは、ネコ、イヌ、ラット、ウサギおよびモルモットを非致死的に曝露した場合、毒性の標的臓器は肝臓、腎臓、脳神経

節細胞などであり、粘膜刺激症状が引き起こされることが報告されている。

急性経皮毒性

OECD TG 402 (draft, OECD, 1979) に準拠した試験の情報が 1 件だけ得られている。2 種類のラットに対して純度 98% の 1,2,4-TCB が適用された。14 日後での LD₅₀ は、両種類とも 7.8 mL/kg (11,356 mg/kg) であった (Korte and Greim, 1981)。この試験の結果の詳細データは得られていない。

ラット (1 群雌雄各 4 匹) の腰背部に純度 98% の 1,2,4-TCB の原液を塗布し、密封包帯をして 24 時間曝露を施した。この結果、1,2,4-TCB の LD₅₀ は、6,139 mg/kg (95% 信頼限界 : 4,299 ~ 9,056 mg/kg) と推定された。中毒徴候は、低用量における活動性の低下、および致死量域における死亡前の伸展性痙攣であった。全ての死亡例は、曝露後 5 日以内に観察された。死亡例および 10 日の観察期間後に屠殺された動物の剖検では、本化合物に起因する病変は認められなかった (Brown et al., 1969)。

ウサギにおける経皮 LD₅₀ は、純正 1,2,4-TCB で約 5,000 mg/kg であり (Dow Chemical, 1982)、工業用 1,2,4-TCB では 5,000 mg/kg 超 (Dow Chemical, 1980) であることが報告されている。

ddY マウス (1 群雌雄各 10 匹) を用いた急性経皮毒性試験では、雄で 300 mg/kg (95% 信頼限界 : 243 ~ 369 mg/kg)、雌では 305 mg/kg (95% 信頼限界 : 247 ~ 375 mg/kg) という値が得られている (Yamamoto et al., 1978)。この試験で得られた LD₅₀ がこのような低値であった理由については、明らかにされていない。

その他の投与経路

ラットに腹腔内投与したときの LD₅₀ が 1,223 mg/kg であったことが報告されている (Mohtashamipur et al., 1987)。この試験の詳細は、明らかにされていない。

急性毒性についての結論

ラットにおける純正 1,2,4-TCB の経口 LD₅₀ 値は、756 ~ 1,107 mg/kg の範囲である。リスク総合判定においては、750 mg/kg の値が EUSES (欧州化学物質影響評価システムのソフトウェア) への入力に用いられている。

LC₅₀(4 時間)に関するデータは、得られていない。7 時間の曝露を行った 1 件の試験では、1,2,4-TCB の LC₅₀ は、1,800 ppm (13.6 mg/L) を上回っていた。リスク総合判定においては、恣意的に 20 mg/L (Xn; R20 に分類される化学物質の限度値) という値が EUSES への入力に用いられている。

1,2,4-TCB の急性経皮毒性は低く、ラットにおける経皮 LD₅₀ は 6,000 mg/kg を上回っている。リスク総合判定においては、6,000 mg/kg の値が EUSES への入力に用いられている。

急性毒性試験の大部分は試験の詳細が明らかにされていないか、または OECD 試験ガイドラインが策定される以前に実施されたものであった。しかし、動物種および曝露経路ごとに得られた LD₅₀ 値には一貫性がみられたことを考慮すると、1,2,4-TCB のリスクアセスメントにおいて、このデータセットは有効であると考えられる。

1,2,4-TCB は、Xn; R22 (飲み込むと有害) に分類される。分類については、第 1 節を参照されたい。

Table 4.13 Data on acute toxicity of 1,2,4-TCB

| Application | Species | Effect | Value | Reference |
|-------------|--------------------------------------|--|---|-----------------------------|
| Oral | Rat | LD ₅₀ | 1,107 mg/kg (male) - 1,019 mg/kg (female) | Korte and Greim, 1981 |
| | | | 756 mg/kg | Brown et al. (1969) |
| | | | 930 mg/kg | Bayer (1982) |
| | | | 1,421 mg/kg ¹⁾ | Bayer (1980) |
| | | | 880 g/kg | Côté et al. (1988) |
| | | | ca. 1,000 mg/kg | Dow Chemical (1958) |
| | LD _{Lo} | 2,250 mg/kg | Du Pont de Nemours (1982) | |
| Mouse | LD ₅₀ | 766 mg/kg | Brown et al. (1969) | |
| Guinea pig | LD ₀ LD ₁₀₀ | 1,600 mg/kg 2,000 mg/kg | Dow Chemical (1938) | |
| Inhalation | Rat | LC ₀ | 3.1 mg/litre/4 hr | Du Pont de Nemours (1971a) |
| | | | 2.5 mg/litre/7½ hr - 13.6 mg/litre/7 hr | Kociba et al. (1981) |
| Dermal | Rat | LD ₅₀ | 11,356 mg/kg | Korte and Greim, (1981) |
| | | | 6,139 mg/kg | Brown et al. (1969) |
| | Rabbit | LD ₅₀ | 5,000 mg/kg | Dow Chemical (1982) |
| | | | >5,000 mg/kg ²⁾ | Dow Chemical (1980) |
| Mouse | LD ₅₀ | 300 mg/kg (male) - 305 mg/(kg (female) | Yamamoto et al. (1978) | |
| i.p | Mouse | LD ₅₀ | 1,223 mg/kg | Mohtashamipur et al. (1987) |

¹⁾ Test performed on trichlorbenzol S

²⁾ Test performed on technical trichlorobenzene

4.1.2.3 刺激性および腐食性

皮膚刺激性/腐食性

OECD TG 404 (draft, OECD, 1979) に準拠した試験の情報が 1 件だけ得られており、純度 98% の 1,2,4-TCB の使用により、軽度の刺激性が認められた。この試験の結果の詳細データは、得られていない。本物質による影響は、軽度の発赤および軽度の浮腫であった。したがって、単回曝露による影響に関する EU 分類基準には該当しない (Korte and Greim, 1981)。

Dow Chemical (1958) により実施された用量設定試験では、1,2,4-TCB の原液は、無処置皮膚および擦過皮膚に対し、軽度から中等度の刺激性を有することが示された。

Schreiber (1980a) は、16 CFR (連邦規則集第 16 巻) 1500.41 に準拠して、New Zealand White ウサギを用いてトリクロロベンゾール S (1,2,4-TCB および 1,2,3-TCB の混合物を 83~91% 含有) による皮膚刺激性試験を行い、皮膚一次刺激指数 7.1 という結果を得た。この試験では、被験物質は密封包帯法により 24 時間適用された。採用した基準に従うと、強い刺激性および腐食性を有する物質に分類された。しかし、密封包帯の使用が 24 時間という長時間であったため、指令 67/548/EEC の付属書 V に記載されている試験法 B.4 に準じてこの試験結果を解釈することは困難である。

Haskell Laboratories は、モルモットを用いて、1,2,4-TCB について 75% および 95% の濃度で試験を行った。この結果、若齢モルモットでは刺激性が認められないか、または軽度の刺激性を示したにすぎなかったが、高齢モルモットでは中等度から重度の皮膚刺激性が認められた (Du Pont de Nemours, 1971b)。

Yamamoto et al. (1978) は、マウスを用いて 100% の 1,2,4-TCB の試験を行い、8 匹中 4 匹のマウスに紅斑が観察された。

Brown et al. (1969) は、ウサギ (雌雄各 4 匹ずつ) を用い、純度 98% の 1,2,4-TCB の皮膚刺激性を検討した。剃毛皮膚に 1 mL の 1,2,4-TCB を含ませたリント布のパッチを、1 日 6 時間、3 日間閉塞貼付した。また、ウサギ (雌雄各 1 匹) およびモルモット (雌雄各 5 匹) の背部に、週 5 日で 3 週間、1,2,4-TCB を直接塗布した。この結果、連日で 3 週間曝露されたウサギにおいて、表皮の炎症が散見された。著者らは、皮膚接触が反復または長期的でなければ (このような場合には、脱脂作用が問題となることがある)、接触により皮膚炎が生じる可能性は低いと結論している。

Powers et al. (1975) は、1,2,4-TCB の座瘡誘発性を検討した。この試験にはウサギが用いられ、溶媒 (石油エーテル) 対照、陽性対照または 1,2,4-TCB 溶液 (5%、25% または 100%) を、週 3

回で 13 週間、耳介内側表面に投与した。1,2,4-TCB を投与した動物において、塩素座瘡は認められなかったが、軽度から重度の刺激症状が観察された。皮膚刺激はおそらく脱脂作用に起因したものであり、被験物質の濃度に直接関連があると考えられた。

New Zealand ウサギ(1 群雌雄各 5 匹)の約 4×4 インチ(約 100 cm²)の皮膚に、蒸留水(対照群)、もしくは無希釈 1,2,4-TCB 液を 30、150 または 450 mg/kg の用量で塗布し、非閉塞状態とした。この処置を、週 5 日で 4 週間続けた(Rao et al., 1982)。この試験で用いられた 1,2,4-TCB 液は、1,2,4-TCB70%、1,2,3-TCB30%含からなる工業用等級の TCB であった。塗布部位には、1,2,4-TCB の脱脂作用に相応した皮膚病変が観察され、用量が多くなるほど病変部が大きかった。

Slc:ddY マウス(1 群雌雄各 75 匹)の皮膚に、週 2 回で 2 年間、アセトンを経媒とした 1,2,4-TCB の 60%または 30%溶液 0.03 mL(18 mg または 9 mg の 1,2,4-TCB)を塗布した。対照群(雌雄各 50 匹)には、アセトンのみを塗布した(Yamamoto et al., 1982)。この結果、1,2,4-TCB の適用部位には表皮の肥厚および角化がみられ炎症が生じたが、アセトン単独の塗布ではいかなる皮膚病変も認められなかった。

眼刺激性

OECD TG 405 (draft, OECD, 1979)に準拠した試験の情報が 1 件だけ得られており、純度 98% の 1,2,4-TCB が軽度の刺激性を有することが示された。角膜および虹彩には影響が認められず、結膜の発赤および浮腫のスコアは、それぞれ 1 および 0~2 であった。試験結果の詳細データは、得られていない。

Brown et al.(1969)は、米国官報 (US FDA, 1964) に記述された方法に従って試験を行い、純度 98% の 1,2,4-TCB はウサギの眼に対して刺激性を有するとの結論に至った。この試験法は、指令 67/548/EEC の付属書 V に示された試験法 B.5 に非常に類似するものである。試験の結果、1,2,4-TCB による疼痛が明らかであり、重度の結膜炎、結膜浮腫および分泌物がみられたが、角膜病変は認められなかった。また、眼瞼腫脹が著しく、結膜の炎症は 48 時間以上継続してみられた。眼の洗浄は曝露後直ちに行われた場合に限り有効であった。試験結果の詳細データは得られていない。

Dow Chemical (1958) により実施された用量設定試験では、1,2,4-TCB の原液およびプロピレングリコールを経媒とした 10%液はいずれも、眼に対し軽度の刺激性を有することが示された。

Schreiber(1980b)は、16 CFR1500.42 に準拠し、New Zealand White ウサギを用いてトリクロロベンゼン S (1,2,4-TCB および 1,2,3-TCB の混合物を 83~91%含有)による眼刺激性試験を行い、眼一次刺激の平均評点について、0.7 という結果を得た。角膜および虹彩には、影響が認められなかった。24 時間後および 48 時間後に 2 匹のウサギで結膜発赤が認められた。それ以外は、24 時間後、48 時間後、72 時間後および 8 日後における評点はゼロであった。著者らは、本物質には眼刺激性はないと結論付けている。

ヒトにおけるデータは、事例報告 1 件のみである(次の肺刺激の項を参照のこと)。

肺刺激

米国産業衛生専門家会議(ACGIH 1991)によって引用されている労務上のデータでは、ある被験集団の人々において、3~5 ppm(23~37 mg/m³)の濃度で、軽微な眼刺激および喉頭刺激が認められたことが報告されている(Rowe, 1975)。

未公表の急性・亜急性吸入毒性試験には、吸入曝露を受けた動物が、肺の局所刺激症状および呼吸機能変化(呼吸困難など)を示し、後に瀕死状態となったことが報告されている(Treon, 1950、ACGIH, 1991 に引用)。

Coate et al.(1977)は、1 群 9 匹の雄のカニクイザルを、1 日 7 時間、週 5 日で 26 週間、純度 99.1%の 1,2,4-TCB に、0、25、50 または 100 ppm の濃度で吸入曝露させた。1 ヶ月後、3 ヶ月後および 6 ヶ月後に肺機能検査を行った結果、曝露群で得られた値は対照群の値と同等であり、用量依存性の変化は認められなかった。

Kociba et al.(1981)による試験では、ラット、ウサギまたはイヌに、曝露に関連した刺激の影響は認められなかった。

ACGIH(1991)によって引用されている労務上のデータでは、ある被験集団の人々における臭気閾値は約 3 ppm であったことが報告されている(Rowe, 1975)。また、本物質の臭気閾値は、1.4 ppm という低い値であるという報告もある(Amoore and Hautala, 1983)。

腐食性および刺激性についての結論

EU 分類基準によると、1,2,4-TCB は腐食性物質に該当しない。

1,2,4-TCB は、複数の製造者により暫定的に Xi; R38 に分類されている〔国際統一化学物質情

報データベース (IUCLID)]。単回曝露では一般に軽度の炎症が生じるにすぎないが、繰り返し接触すると明らかな炎症が認められることから、1,2,4-TCB は Xi; R38 に分類される。分類については、第 1 節を参照されたい。

ヒトにおいて比較的低濃度で呼吸刺激を生じることを示唆する報告がいくつかあるが、この影響に関する証拠はほとんど得られていない。しかし、本物質の刺激性に基づき、ACGIH の曝露限界値 (TLV) が定められている。サルを用いた慢性曝露試験においては、肺機能に対する影響は認められていない。

眼刺激に関しては、報告に一貫性がみられず不明な点が多い。OECD ガイドラインのドラフトに沿って Korte and Greim (1981) が実施した試験では、1,2,4-TCB は、EU 判定基準に従うと、眼に対して非刺激性であることが示された。Schreiber (1980) の試験では、被験物質は純正 1,2,4-TCB ではなかったが、これを支持する結果が得られている。Brown et al. (1969) の試験では、1,2,4-TCB が中等度から重度の眼刺激性を有することが示されたが、詳細な評点データは得られておらず、EU 判定基準に従って評価することができない。米国および EU の試験法は類似しており、いずれの場合も Draize 採点法を用いて評価を行うが、評点の解釈が異なっており、米国の判定基準を用いると、概してより重度側に分類される。本物質は眼に対してある程度の刺激性を有すると考えられるが、この影響は、Xi; R36 の分類基準には該当しないとみなされる。

4.1.2.4 感作性

皮膚感作性

OECD TG 406 (draft, OECD 1979) に準拠したモルモットにおける皮膚感作性試験 (モルモットマキシマイゼーション法) が、純度 98% の 1,2,4-TCB を用いて実施されており、この結果陽性反応が認められた動物は 10% 以下であった。試験結果の詳細データは得られていない。陰性対照群についての情報、設定用量での刺激の有無を判断するために行ったパイロット試験の結果、また、本試験で用いられた 1,2,4-TCB の濃度に関する情報は示されていない。一般に、この試験では 0.5~10% の濃度で被験物質の検討が行われる。採用した判定基準によると、この陽性率からは、弱い感作性を有しているとみなされる (Korte and Greim, 1981)。

別の試験 (Brown et al., 1969) では、0.1% w/v の 1,2,4-TCB (純度 98%) を含む軽質流動パラフィン油を、剃毛したモルモットの背部に週 3 日で連続 3 週間、皮下投与および開放経皮適用した。その後、10 日間の無処置期間が設けられ、第 11 日に、右腹側部に同一の溶液、左腹側部に溶媒の「惹起」投与が行われた。「惹起」後、1 時間、24 時間および 48 時間に感作反応

の徴候の有無が観察された。この試験の結果は陰性であり、同一の動物を用いて行われた再試験においても陰性の結果が得られた。

Haskell Laboratories は、モルモットを用い、3 週間にわたる 9 回の局所塗布、または同期間に 4 回の皮内注射により、1,2,4-TCB の感作性を検討した (Du Pont de Nemours, 1971b)。この試験では、2 週間の休息期間後に皮膚適用により惹起を行ったが、動物に感作の徴候は認められなかった。しかし(上述の皮膚刺激性の項で述べたとおり)、惹起後、処置群および対照群のいずれの動物にも皮膚刺激の徴候が認められた。

感作性についての結論

情報が得られたすべての試験において、さまざまな形での不備があるため、この影響に関するデータベースは限られたものとなっている。しかし、これらの試験の結果では、弱い感作性しか示されておらず、1,2,4-TCB について EU 判定基準に従って感作性に関する分類を行う必要はない。

このような不備はあるが、追加の試験は不要であると考えられる。

呼吸器感作性

呼吸器感作性に関するデータは、得られていない。

4.1.2.5 反復投与毒性

3 つの主要な曝露経路を用いた 1,2,4-TCB の反復投与毒性試験が、いくつか報告されている。

経口投与

ラット(1 群雌雄各 5 匹)を用い、1,2,4-TCB を 0、600、1,200、2,400、4,800 または 9,600 ppm で 15 日間混餌投与した (Bio/dynamics, 1987)。被験物質の平均摂取量は、600、1,200、2,400、4,800 または 9,600 ppm 投与群で、それぞれ 57~71、117~141、237~277、466~542 および 853~939 mg/kg であった。

投与前および投与期間中に、一般状態の観察ならびに体重および摂餌量の測定を行った。屠殺時には、所定の臓器について、重量を測定し、体重に対する重量比を算出した。

試験期間を通じ、死亡例は認められなかった。試験期間中、肛門生殖器周囲の黄変が、高用量群の雄 1 匹で第 2 週に、高用量群の雌 2 匹で第 1 週に、高用量群のすべての雌で第 2 週に、それぞれ観察された。9,600 ppm 投与群の第 1 週および第 2 週の平均体重は、雌雄ともに対照群に比べ有意に低値を示した。

全投与群の雄ならびに 2,400、4,800 および 9,600 ppm 投与群の雌で、肝臓の重量および対体重比が統計学的に有意に増加した ($p < 0.01$)。肝臓の対体重比の増加は、1,200 ppm 投与群の雌でも認められた ($p < 0.05$)。腎臓の対体重比は、全投与群の雄で対照群に比べ有意に高値を示したが ($p < 0.01$)、明らかな用量依存性は認められなかった。1,200、2,400 および 4,800 ppm 投与群の雄では、腎臓の絶対重量も対照群に比べ統計学的に有意な高値を示した。9,600 ppm 投与群の雄では、対照群に比べ体重が著しく低値であったことから腎臓重量の平均値は対照群を下回ることが予測されたが、両群の腎臓重量の平均値は同等であった。雌で見られた唯一の差異は、9,600 ppm 投与群における平均腎臓重量が低値であったことだけであった。

標的臓器は、肝臓および腎臓であった。雄ラットにおける 1,2,4-TCB の LOAEL は、飼料中濃度で 600 ppm (57~71 mg/kg 体重/日に相当) であった。雌ラットにおける 1,2,4-TCB の LOAEL は 1,200 ppm (117~141 mg/kg 体重/日)、NOAEL は 600 ppm であった (57~71 mg/kg 体重/日)。

OECD TG 408 に類似した試験において、Sprague Dawley 系の離乳期のラット (1 群雌雄各 10 匹) に、1,2,4-TCB (純度 99%) を 1、10、100 または 1,000 ppm で 13 週間混餌投与した (Côté et al., 1988)。

1,2,4-TCB の摂取量は、雄で 0.07、0.78、7.8 および 82 mg/kg 体重/日、雌では 0.11、1.4、15 および 101 mg/kg 体重/日と算出された。

投与期間中、毒性徴候は認められなかった。雄では、最終屠殺時の体重には群間差が認められなかったが、高用量群で、肝臓の相対重量、腎臓重量および腎臓の相対重量が統計学的に有意に増加した。雌については、体重および臓器重量の具体的なデータが示されていないことから、統計学的に有意な影響は認められなかったことが推察される。1,000 ppm 投与群の雄で、肝臓のアニリン水酸化酵素およびアミノピリンデメチラーゼの活性が有意に増加した。後者の酵素の増加は、1,000 ppm 投与群の雌でも認められた。病理組織学的検査では、肝臓、甲状腺および腎臓において投与に関連した変化が認められたが、有意であっ

たのは高用量群のみであった。全般に、雌よりも雄で、より重度の変化が認められた。

肝臓には、集簇性の好塩基球増加、および脂肪浸潤による小葉中間帯の空胞化を特徴とする変化が顕著に認められた。腎臓については、病理組織学的検査においても尿検査においても明らかな異常は認められなかった。甲状腺では、濾胞の萎縮、上皮の高さの増加(扁平な立方上皮が円柱状に変化)およびコロイド密度の減少が特徴的に認められた。

標的臓器は、肝臓、腎臓および甲状腺であった。この試験における NOAEL は、雌雄ともに 100 ppm(雄で 7.8 mg/kg 体重/日、雌では 15 mg/kg 体重/日)であった。また、LOAEL は、雄ラットで 1,000 ppm(82 mg/kg 体重/日)であったが、雌ラットについては、情報不足のため確定することができない。

Fischer F344 ラット(1 群雌雄各 10 匹)を用い、1,2,4-TCB を 0、200、600 または 1,800 ppm で 1 ヶ月間混餌投与した(Bio/dynamics, 1989)。算出された被験物質摂取量は、雄で 27~10 mg/kg 体重/日(200 ppm)、96~32 mg/kg 体重/日(600 ppm)および 242~96 mg/kg 体重/日(1,800 ppm)であり、雌では 33~13 mg/kg 体重/日(200 ppm)、108~40 mg/kg 体重/日(600 ppm)および 276~108 mg/kg 体重/日(1,800 ppm)であった。この試験は、ガイドラインまたは GLP に沿ったものであることを明示していないが、OECD TG 408 試験に極めて類似した観察が行われている。

一般状態の観察においては、投与群の動物で流涙および色素涙の発生頻度の増加がみられたが、用量-効果関係は認められなかった。

眼の異常や体重の群間差は認められなかった。

週ごとの平均摂餌量は、600 ppm 投与群で試験中の 3 週間、1,800 ppm 投与群で試験中の 5 週間、有意に増加していた。

試験終了時の臨床検査の結果、1,800 ppm 投与群の雄で、平均赤血球数、ヘモグロビン値およびヘマトクリット値に有意な低下が認められた。1,800 ppm 投与群の雌でも同様の傾向がみられたが、統計学的に有意な低値を示したのは、平均ヘモグロビン値およびヘマトクリット値のみであった。また、1,800 ppm 投与群の雄では、平均血小板数の有意な増加が認められた。このほか、1,800 ppm 投与群の雌雄で血中尿素窒素(BUN)の上昇、1,800 ppm 投与群の雄で総タンパク、アルブミンおよびカルシウムの増加、600 ppm および 1,800 ppm 投与群の雄で血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの低値が認められた。高用量群の雌雄ともに BUN の上昇がみられたことから、1,2,4-TCB は腎機能に影響を及ぼすことが示唆され、雄における顕微鏡検査でもこれに一致する所見が得られている。

剖検時には、200、600 および 1,800 ppm 投与群の雄、ならびに 600 および 1,800 ppm 投与群の雌で、平均肝臓重量ならびに肝臓の対体重比および対脳重量比が、対照群に比べ統計学的に有意に高い値を示した。また、投与群の雄では腎臓の平均重量指標値にも用量依存性の増加が明らかに認められ、600 ppm 投与群の雄では対体重比のみ、1,800 ppm 投与群ではすべての指標が対照群に比べ統計学的に有意に増加した。600 および 1,800 ppm 投与群の雌でも、腎臓の平均対体重比が対照群に比べ統計学的に有意な高値を示した。1,800 ppm 投与群の雄の平均精巣重量は、対照群に比べ統計学的に有意な高値であった。

病理学的検査において、1,800 ppm 投与群の雄の腎臓に投与に関連した変化が顕著に認められ、600 ppm 投与群の雄でこれより軽度の変化が認められた。観察された変化は、尿細管拡張、顆粒円柱、硝子滴および腎乳頭部の鉍質沈着であった。間質性腎炎の発生率や重症度にも増高がみられ、尿細管上皮の再生像も認められた。1,800 ppm 投与群の雌では、尿細管の鉍質沈着の程度が増高する傾向がみられたが、明確なものではなかった。肝臓では、1,800 ppm 投与群の雄で小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、これより軽度の病変が 600 ppm 投与群の雄および 1,800 ppm 投与群の雌で認められた。肝臓における変化は、雌よりも雄のラットでより顕著であった。

肝重量の増加および腎臓の病理学的所見に基づき、雌における LOAEL は、食餌中 1,2,4-TCB 濃度 600 ppm(40 mg/kg 体重/日)、NOAEL は 200 ppm(13 mg/kg 体重/日)と決定された。雄ラットでは、LOAEL は 200 ppm(11 mg/kg 体重/日)であったが、NOAEL は確定することができない。

F-344 ラット(1 群雌雄各 50 匹)に、1,2,4-TCB を 0、100、350 または 1,200 ppm で 104 週間混餌投与した(Moore, 1994b)。この試験は、GLP および米国の試験ガイドライン 40 CFR 798.3300(OECD TG 451 と同等)に準拠して実施された。

この 104 週間の 1,2,4-TCB の平均摂取量は、雄でそれぞれ 0、5.5、18.9 および 66.7 mg/kg 体重/日であり、雌ではそれぞれ 0、6.7、22.9 および 79.3 mg/kg 体重/日であった。

この試験における主要な標的臓器は、肝臓および腎臓であった。

Table 4.14 Incidence of specific liver changes in the rat after chronic oral administration of 1,2,4-TCB (Moore, 1994b)

| | | 1,2,4-TCB (ppm) | | | |
|--|---------|-----------------|-------|-------|-------|
| | | 0 | 100 | 350 | 1200 |
| Enlargement of centrilobular hepatocytes | males | 2/50 | 1/50 | 5/50 | 30/50 |
| | females | 6/50 | 5/50 | 5/50 | 37/50 |
| Diffuse fatty liver changes | males | 5/50 | 3/50 | 5/50 | 14/50 |
| | females | 15/50 | 6/50 | 21/50 | 30/50 |
| Liver focal cystic degeneration | males | 9/50 | 3/50 | 4/50 | 19/50 |
| | females | 0/50 | 0/50 | 0/50 | 0/50 |
| Renal papillary mineralisation | males | 34/50 | 14/50 | 44/50 | 49/50 |
| | females | 39/50 | 18/50 | 47/50 | 48/50 |
| Renal transitional cell hyperplasia | males | 2/50 | 0/50 | 2/50 | 34/50 |
| | females | 0/50 | 0/50 | 0/50 | 0/50 |

高用量(1,200 ppm)での混餌投与により、雄における生存率が有意に減少し、雌雄ともに第1週から第24週までの平均体重増加が有意に減少した。雌雄ともに、肝臓の平均絶対重量および相対重量の有意な増加、ならびに腎臓の平均絶対重量および相対重量の増加(統計学的に有意ではない)が認められた。また、雄で慢性進行性腎症の重症度が増高した。

350 ppm 投与群の雌で、腎乳頭の石灰化の発生率および重症度に軽微な増高、また、肝臓のびまん性脂肪変性の発生率に軽度の増加が認められた。

飼料中濃度 100 ppm では、投与に関連した影響は認められなかった。

全身毒性に関する LOAEL は、腎乳頭の石灰化および肝臓の脂肪変性の発生率が軽微な上昇を見せたことに基づき、飼料中濃度 350 ppm(1日の投与量 19~23 mg/kg 体重に相当)であると考えられる。また、F-344 ラットを用いた 104 週間混餌投与試験における NOAEL は、飼料中濃度 100 ppm(1日の投与量 5.5~6.7 mg/kg 体重に相当)であると考えられる。この試験におけるがん原性に関する結論については、第 4.1.2.7 項を参照されたい。

GLP に準拠したガイドライン試験において、B6C3F1/CrlBR マウス(1群雌雄各 10 匹)に、1,2,4-TCB(純度 99.48%)を 0、220、3,850 または 7,700 ppm で 13 週間混餌投与した(Hiles, 1989)。

飼料からの 1,2,4-TCB の蒸発による損失については適切な対処がなされた。すなわち、実際の投与量は、概ね上述の理論値より 10%少ない量であった。被験物質の摂取量算出値(損失に対する補正は行っていない)は、雄で 58~76 mg/kg 体重/日(220 ppm)、651~1,112 mg/kg

体重/日 (3,850 ppm) および 1,064~1,341 mg/kg 体重/日 (7,770 ppm)、雌では 80~92 mg/kg 体重/日 (220 ppm)、933~1,337 mg/kg 体重/日 (3,850 ppm) および 1,192~1,531 mg/kg 体重/日 (7,700 ppm) であった。

投与に関連した毒性徴候は認められなかった。

体重は、1,2,4-TCB 220 ppm 投与群では、雌雄とも試験期間を通じて低値を示す傾向がみられた。7,700 ppm 投与群では、雄で第 1 週および第 5 週~第 13 週、雌で第 4 週~第 13 週に統計学的に有意な体重の低値が認められた。また、3,850 ppm 投与群の雄で第 8 週、11 週および 12 週に、220 ppm 投与群の雄で第 11 週および 12 週に有意な低値を示した。

累積体重増加量は、1,2,4-TCB 220、3,850 ppm 投与群および 7,700 ppm 投与群の雄で、第 1 週から有意な低値を示した(ただし、220 ppm 投与群では第 2 週以降に有意差が認められた)。雌では、7,700 ppm 投与群で第 3 週~13 週に、3,850 ppm 投与群で第 4 週および第 5 週に有意な低値が認められた。

摂餌量は、7,700 ppm 投与群の雌雄で、第 1 週~第 13 週に有意な低値を示した。また、3,850 ppm 投与群でも、雄で第 1 週~第 7 週に、雌で第 1 週~第 6 週および第 10 週に低値が認められた。

屠殺時に行われた臨床病理学的検査では、3,850 ppm 投与群および 7,700 ppm 投与群の雄ならびに 7,700 ppm 投与群の雌における総タンパクの高値、7,700 ppm 投与群の雌雄におけるアルブミンおよびグロブリンの高値、3,850 ppm 投与群の雄および 7,700 ppm 投与群の雌雄における ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)の高値、3,850 ppm 投与群および 7,700 ppm 投与群の雌雄における SDH(ソルビトール脱水素酵素)の高値が、投与に関連した影響として認められた。

解剖病理学的検査では、3,850 ppm 投与群または 7,700 ppm 投与群の雌雄における脳の絶対重量が統計学的に有意な低値を示し、3,850 ppm 投与群または 7,700 ppm 投与群の雌雄における肝臓の絶対重量、対体重比および対脳重量比は統計学的に有意な高値を示した。これらの重量の変化には、核の巨大化や多核化を伴う肝細胞の巨細胞化、血管変性ならびに壊死を特徴とする肝臓の顕微鏡的变化との相関が認められた。

B6C3F1/CrIBR マウスの雌における飼料中 1,2,4-TCB の NOAEL は、理論値で 220 ppm(80 mg/kg 体重/日)、実効値で 195 ppm であった。また、LOAEL は 3,850 ppm(約 1000 mg/kg 体重/日)であった。同系統の雄については、最低用量(220 ppm、62 mg/kg 体重/日)においても投与による影響(低体重)がみられたため、NOAEL を確定することができなかった。雄では、この濃度が LOAEL である。

B6C3F1 マウス(1 群雌雄各 50 匹)を用い、1,2,4-TCB を 0、150、700 または 3,200 ppm で 104 週間混餌投与した (Moore, 1994a)。この試験は、GLP および米国の試験ガイドライン 40 CFR 798.3300(OECD TG 451 と同等)に準拠して実施された。

0、150、700 および 3,200 ppm 投与群における 104 週間の 1,2,4-TCB 平均摂取量は、雄でそれぞれ 0、20.9、100.5 および 522 mg/kg 体重/日であり、雌ではそれぞれ 0、26.2、127.2 および 574.9 mg/kg 体重/日であった。

高用量群では、第 52 週以降に生存率の低下が認められた。3,200 ppm 投与群では、試験終了時の生存率が雌雄ともに有意に低下し、この時点で雌の 100%および雄の 90%が死亡していた。他の試験群における死亡率は、700 ppm 投与群の雄で 18%、雌で 16%、150 ppm 投与群の雄で 12%、雌で 24%、対照群の雄で 10%、雌で 22%であった。

週ごとの平均体重は、3,200 ppm 投与群の雌雄で、対照群と比較して有意な低値が認められた。これとは逆に、150 ppm および 700 ppm 投与群では、雌雄ともに週平均体重が高値(統計学的に有意であったものも多い)を示した。

Table 4.15 Incidence of specific liver changes in the mouse after chronic oral administration of 1,2,4-TCB (Moore, 1994a)

| Results measured at 104 weeks | | 1,2,4-TCB (ppm) | | | |
|---|---------|-----------------|---------|---------|---------|
| | | 0 | 150 | 700 | 3200 |
| Surviving animals | males | 45/50 | 44/49 | 41/50 | 5/50 |
| | females | 39/50 | 37/49 | 42/50 | 0/50 |
| Absolute liver weight in g | males | 1.6±0.6 | 1.8±0.4 | 3.0±1.7 | 7.4±1.8 |
| | females | 1.4±0.2 | 1.9±0.4 | 4.0±2.3 | no data |
| Relative liver weight | males | 5.0±2.3 | 5.0±1.4 | 9.5±5.5 | 27±5.7 |
| | females | 5.1±0.5 | 6.0±0.9 | 12±6.8 | no data |
| Enlargement of centrolobular hepatocytes. | males | 0/50 | 0/50 | 27/50 | 20/50 |
| | females | 0/50 | 0/50 | 1/50 | 8/50 |

この試験における 1,2,4-TCB の主要標的臓器は、肝臓であった。3,200 ppm 投与群における死亡率が非常に高かったことが試験終了時の結果評価に大きく影響した。臓器重量データの評価により、150 ppm 投与群の雌雄、700 ppm 投与群の雌雄および 3,200 ppm 投与群の生存雄における肝臓絶対重量の増加、ならびに 150 ppm 投与群の雌、700 ppm 投与群の雌雄および 3,200 ppm 投与群の雄における肝臓の相対重量比の増加が明らかにされた。病理組織学的検査では、肝重量の増加に整合した小葉中心性肝細胞肥大が認められた。これらの所見は、1,2,4-TCB の投与の結果生じたものと考えられる。

この試験で観察された腫瘍については第 4.1.2.7 項を、精巣に対する影響については第 4.1.2.8

項を参照されたい。

この試験における全身毒性については、肝重量の変化に基づき、150 ppm(21~26 mg/kg 体重/日)を LOAEL とすることが妥当であると考えられる。

Carlson and Tardiff(1976)は、成熟雄アルビノラット(1群6匹)に、コーン油に溶解した試薬等級の1,2,4-TCBを0、150、300または600 mg/kg 体重/日の用量で、もしくは0、10、20および40 mg/kg 体重/日の用量で14日間強制経口投与し、肝臓、いくつかの肝酵素およびヘキサバルビタール誘発睡眠時間に対する投与の影響を検討した。

この結果、300 mg/kg 体重/日群および600 mg/kg 体重/日群のラットで、グルコース-6-ホスファターゼの活性に統計学的に有意な減少が認められた。ヘキサバルビタール誘発睡眠時間の測定は、対照群および高用量群(600 mg/kg 体重/日)のみで行われ、高用量群では睡眠時間が有意に短縮された。種々の酵素活性の測定は、0、10、20および40 mg/kg 体重/日の投与について行われ、1,2,4-TCBの投与量の増加に伴い、O-エチル-O-(4-ニトロフェニル)フェニルホスホチオエート (EPN) 解毒作用が増高するとともにシトクロム c レダクターゼ、シトクロム P-450、グルクロン酸転移酵素およびアゾレダクターゼの活性が上昇した。また、設定用量において、肝臓の対体重比にも増加が認められた (Carlson and Tardiff, 1976)。

この試験からは、肝臓に対する影響に基づき、14日間の投与によるラットにおける1,2,4-TCBのLOAELは、10 mg/kg 体重/日と決定される。なお、NOAELについては確定することができない。

Carlson and Tardiff(1976)は、投与群の雄ラット12匹に、1,2,4-TCBを、0、10、20および40 mg/kg 体重/日で90日間強制経口投与した。この試験では、ラットの半数に、投与後30日間の回復期間が設けられた。

肝臓の対体重比は用量依存性に増加し、高用量群では30日間の回復期間後もこの増加は消失しなかった。90日間の投与後、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値には、群間差は認められなかった。

異物代謝のパラメータに関しては、90日後、シトクロム c レダクターゼ、シトクロム P-450、EPN 解毒作用、ベンゾピレンヒドロキシラーゼおよびアゾレダクターゼの活性に統計学的に有意な用量依存性の増加が認められ、グルクロン酸転移酵素の活性には統計学的に有意な用量依存性の減少が認められた。40 mg/kg 投与群では、30日間の回復期間後も肝臓の対体重比の増加がみられ、90日後に増加が認められた異物代謝のパラメータも増加したままであった (Carlson and Tardiff, 1976)。

この試験からは、肝臓に対する影響に基づき、90 日間の投与によるラットにおける 1,2,4-TCB の LOAEL は、10 mg/kg 体重/日とすることができる。しかし、この用量で観察された肝臓への有意な影響は、30 日間の回復期間終了時には消失していた。30 日間の回復期間終了時でも残存した不可逆的な肝臓への影響に基づく、90 日間の投与での 40 mg/kg 体重/日を LOAEL とすることができる。なお、NOAEL については、確定することができない。

雌のアカゲザル(1 群 4 匹)に、1 回目の試験では 1,2,4-TCB を 0、1、5 または 25 mg/kg の用量で、これに続く 2 回目の試験では、週 7 日で 3 ヶ月間、0、90、125 または 174 mg/kg 体重/日の用量で、強制経口投与した(Smith et al., 1985)。体重測定は、週に 1 回行った。臨床化学的検査のための血液サンプルの採取は月に 1 回行い、30 日間隔でクロログアニド代謝物プロファイルが検討された(これは、P-448 と P-450 系との相対比を求めるための方法である)。

125 mg/kg 投与群では、2 ヶ月および 3 ヶ月の時点で LDH および GOT の明らかな低下が認められた。1、5 および 25 mg/kg 投与群では投与に関連した影響が認められず、これらの群の動物には、続いて 90、125 および 174 mg/kg の投与を 10 週間行った。

死亡例は、90mg/kg 投与群で第 7 週に 1 例、125 mg/kg 投与群で第 3 週に 1 例、174 mg/kg 投与群では 3 例(第 4 週に 2 例、第 6 週に 1 例)観察された。

この試験の報告は全体的に詳細性に欠けているが、示されたデータから、アカゲザルを用いた 3 ヶ月間強制経口投与試験における 1,2,4-TCB の LOAEL は 90 mg/kg、NOAEL は 25 mg/kg であると推定される。

Robinson et al.(1981)は、ラットを用いた 2 世代試験を行った。この試験では、1,2,4-TCB を 0.125% Tween 20 で 0、25、100 および 400 ppm に調製して飲水投与させ、分娩後 37 日および 95 日に、F₀ および F₁ 両世代を各群雌雄 10 匹ずつ屠殺した。屠殺時に、肝臓、肺、心臓、腎臓、副腎および生殖腺、ならびに雄の精嚢を摘出し、重量測定を行った。また、心穿刺により血液を採取し、20 種の血清パラメータを測定した。

F₀ 世代(83 日齢)の各群における 1,2,4-TCB の摂取量は、雌で 3.7、14.8 および 53.6 mg/kg 体重/日、雄では 2.5、8.9 および 33.0 mg/kg 体重/日であった。400 ppm 投与群では両世代の雌雄において、副腎重量の有意な増加が認められた。

この試験では、親世代で観察された影響は、1 臓器の重量増加のみであった[400 ppm(33~55 mg/kg 体重/日)投与群における副腎重量の増加]。この試験における NOAEL は、100 ppm(9~15 mg/kg 体重/日)である。

経皮投与

New Zealand ウサギ(1群雌雄各5匹、体重約3 kg)を用い、週5日で4週間、蒸留水(対照群)、もしくは無希釈の1,2,4-TCB30、150または450 mg/kgを、約4×4インチ(約100 cm²)の皮膚に塗布し、非閉塞状態に置いた(Rao et al., 1982)。この試験で用いられた被験物質は、1,2,4-TCBが70%、1,2,3-TCBが30%含まれた工業用等級のTCBであった。

動物の体重測定を、週2回行った。曝露の10日前および投与期間の最終週に、すべてのウサギについて、基本的な血液学的検査および臨床化学的検査を実施した。また、曝露前、処置の約2週間後、および屠殺の直前に、各用量群の雌雄それぞれ3匹から24時間尿検体を採取した。尿量を記録し、コプロポルフィリン、ウロポルフィリンおよびクレアチニンの測定を行った。

ウサギの屠殺後、外部および内部の全身にわたる肉眼的剖検を実施し、脳、心臓、肝臓、腎臓および精巢(雄のみ)の重量を測定した。対照群および高用量群については44の器官を固定・切片化し、これらの病理組織学的検査を行った。加えて、30 mg/kgおよび150 mg/kg投与群において、皮膚、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、骨髄を含む脊椎、および肉眼病変が見られた部位の病理組織学的検査を行った。

雄では、評価が行われたいずれの血液学的パラメータにも、有意な変化は認められなかった。雌では、試験25日目に総赤血球数、ヘモグロビン値およびヘマトクリット値に用量依存性の減少が認められ、この減少は高用量群では有意であった。中用量群(150 mg/kg 体重/日)では、総赤血球数のみが減少していた。しかし、31日目の屠殺時には、これらの減少に統計学的有意差は認められなかった。

臨床化学的検査では、評価が行われたいずれのパラメータについても、投与に関連した変化は認められなかった。

尿検査では、試験25日目に高用量群(450 mg/kg 体重/日)の雄で、コプロポルフィリン排泄の軽度かつ有意な増加が認められた。

病理学的検査では、塗布部位に、1,2,4-TCBの脱脂作用によると考えられる皮膚病変が観察され、用量が多くなる(0.9、4.5および13.5 mg/cm²)ほど、病変部は大きくなった。投与群のウサギには、表皮の反応性変化を伴う亜急性炎症を特徴とする組織学的変化が認められた。投与群の全個体で投与に関連すると考えられる影響が塗布部位に認められ、皮膚反応は低用量および中用量では軽度であり、高用量では中等度であると判断された。

剖検時、450 mg/kg投与群の動物に、肝臓全体にわたる軽度の褪色化が認められたが、この

変化に整合する組織学的変化は認められなかった。

Rao et al.(1982)の試験で観察された肝臓およびコプロポルフィリン排泄に対する影響に基づき、1,2,4-TCBを4週間経皮投与したときの全身毒性に関するLOAELは450 mg/kg 体重/日、NOAELは150 mg/kg 体重/日とされた。なお、中用量群(150 mg/kg 体重/日)で観察された総赤血球数の変化は、投与と関連がないと考えられた。

皮膚への局所的な影響に関しては、LOAECが0.9 mg/cm²であることだけが確定された。

Slc:ddY マウス(1群雌雄各75匹)を用い、週2回で2年間、アセトンを溶媒とした1,2,4-TCBの60%または30%溶液0.03 mL(1,2,4-TCB約500 mg/kgまたは250 mg/kg)を皮膚に塗布した。対照群(雌雄各50匹)には、アセトンのみを塗布した(Yamamoto et al., 1982)。

3用量の投与群のすべてについて、全身的な毒性徴候の観察、および組織学的検査が行われた。

毒性の全身徴候として、興奮、自発運動の亢進および浅速呼吸が認められた。試験終了時の生存率は低く、投与群における死亡率の増加が認められた。この試験では、皮膚の炎症も観察されている(第4.1.2.3項を参照のこと)。

投与群ではアミロイドシスの発生率が増加し、主として、肝臓、脾臓、腎臓および副腎に認められた。また、投与群では、肝臓、腎臓および副腎の炎症の発生率にも明らかな増加が認められた。

一般に、この種の試験は特に週2回の投与を行う場合、NOAELの決定には適していない。また、同著者により、この系統のマウスについて、例外的に低いLD₅₀(第4.1.2.2項を参照のこと)が報告されていることにも留意されたい。

吸入投与

Gage(1970)は、109種の工業用化学物質について、亜急性吸入毒性試験を行った。各試験の詳細についての情報は限られている。この試験では、1群雌雄各2匹のラットを70 ppmないしは200 ppmの濃度で15~16時間曝露した。いずれの用量群においても嗜眠および体重増加遅延が認められた。臓器の「肉眼的検査」を行い、組織学的検査のために肺、肝臓、腎臓、脾臓および副腎を摘出した。剖検では、投与を受けたいずれの動物においても、臓器に異常は認められなかった。

この試験では供試動物数が少なく、報告されたデータも限られているため、LOAEC を 70 ppm (520 mg/m³) に確定することはできない。

Coate et al. (1977) は、雄ラット (1 群 30 匹)、雄ウサギ (1 群 16 匹) および雄のカニクイザル (1 群 9 匹) を、1,2,4-TCB (純度 99.1%) に、0、25 ppm (188 mg/m³)、50 ppm (377 mg/m³) または 100 ppm (754 mg/m³) の濃度で、1 日 7 時間、週 5 日で 26 週間吸入曝露した。

曝露期間中は、毒性徴候の観察を 1 日 1 回行った。体重測定は、最初の 4 週間は週に 1 回、続く 8 週間は 2 週間に 1 回、その後は 4 週間間隔で実施した。

サルを用いた試験では、曝露の 5 日後ならびに 4 週間後、13 週間後および 26 週間後に、血中尿素窒素、総ビリルビン、血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ、アルカリホスファターゼおよび乳酸脱水素酵素の測定を行った。また、すべてのサルに対し、CBC (訳注: おそらく "clinical bloodcell count" 「全血球計算」を指すと思われる) を実施した。

第 4 週、第 13 週および第 26 週に、すべてのサルに対し、検眼鏡検査および肉眼的検眼、ならびに一連の肺機能検査を実施した。

すべての動物で、全身剖検および肉眼的病理検査を行った。各個体の脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、眼、脊髄、骨髄および腹部の皮膚片を固定し、染色して病理組織学的検査を行った。

生存率、体重ならびに検眼鏡検査、血液学的検査、血清生化学検査および肺機能検査のパラメータには、投与の影響は認められなかった。

26 週間後の病理組織学的検査では、投与に関連した変化は認められなかった。

この一連の試験において、ウサギについては、肺機能検査を除きサルにおけるものと同様の検査が実施された。

ウサギにおいても、生存率、体重ならびに検眼鏡検査、血液学的検査および血清生化学的検査のパラメータには、投与の影響は認められなかった。また、26 週間後の病理組織学的検査では、投与に関連した変化は認められなかった。

サルおよびウサギにおいては、吸入による 1,2,4-TCB の NOAEC は、100 ppm (754 mg/m³) を上回っている。

上述のウサギやサルでの試験と同じ試験の中で、ラットについては、曝露 4 週間後、13 週間後および 26 週間後に屠殺し、血液生化学的検査および CBC を実施した。全身剖検を行い、上記と同様の臓器について検査を行った。

生存率、体重ならびに血液学的検査および血清生化学的検査のパラメータには、投与の影響は認められなかった。ラットでは、いずれの投与群においても、第 4 週および第 13 週に肝臓(肝細胞の巨細胞化)および腎臓(硝子変性)に病理組織学的変化が認められた。しかし、曝露 26 週間後には、これらの変化は消失した。

Coate et al.(1977)の試験の結果から、ラットで第 4 週および第 13 週に肝臓および腎臓に認められた影響に基づき、吸入による 1,2,4-TCB の LOAEC は、25 ppm(188 mg/m³)に設定することができる。

Kociba et al.(1981)は、雄ラット(1 群 20 匹)、雄ウサギ(1 群 4 匹)および雄イヌ(1 群 2 匹)を、1,2,4-TCB(純度 99.4%)の蒸気に、0、30 ppm(226 mg/m³)または 100 ppm(754 mg/m³)の濃度で、1 日 7 時間、週 5 日の頻度で、44 日間で 30 回曝露した。

動物の観察を 1 日 1 回行い、体重測定を週 3 回実施した。曝露第 28 日～第 30 日に、各群 10 匹のラットならびにすべてのウサギおよびイヌについて、総赤血球数、白血球百分率数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度などの基本的な血液学的パラメータの測定を行った。加えて、同一動物で、血中尿素窒素、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼおよびアルカリホスファターゼ活性などの標準的な生化学的パラメータを測定した。また、最終曝露の直後に、高用量群および対照群のラット各 5 匹から 24 時間尿を採取し、尿サンプル中のコプロポルフィリン濃度およびウロポルフィリン濃度を測定した。

病理検査では、肝臓、腎臓、脾臓、副腎(イヌおよびウサギのみ)、心臓、脳、胸腺(ラットのみ)および精巣の重量測定を行った。すべての動物から、30 種の臓器を摘出、固定した。2 匹のイヌ、4 匹のウサギ、ならびに対照群および 100 ppm 曝露群の各 5 匹のラットから作られた、固定組織のほとんどについて、病理組織学的検査を行った。

イヌでは、100 ppm 曝露群で、統計学的に有意な肝重量の増加が認められた。

ウサギにおいては、30 ppm および 100 ppm 曝露群の両群で肝臓の対体重比が統計学的に有意に減少し、100 ppm 曝露群では精巣の絶対重量および相対重量が統計学的に有意な高値を示した。

ラットでは、100 ppm 曝露群で、肝重量および腎臓の相対重量に統計学的に有意な増加が認められた。また、30 ppm または 100 ppm 曝露群のラットで、ポルフィリンの尿中排泄量が

増加した。

病理学的検査では、被験物質に関連した明らかな変化は認められなかったが、3種すべての動物種で肺にわずかな変化が認められた例があったが、「軽度の慢性感染症の経過」によるものと考えられた。

Kociba et al.(1981)の試験の結果から、肝臓および腎臓への影響に基づき、ラットにおける吸入曝露による1,2,4-TCBのLOAECは、30 ppm(226 mg/m³)とされる。なお、NOAECについては、確定することができない。

ウサギおよびイヌについては、LOAECおよびNOAECを確定するには、供試動物数が少なすぎると考えられる。

Watanabe et al.(1977)は、ラットにおいてポルフィリンの尿中排泄量を増加させることのない濃度を検討するため、追加試験を行った。この試験では、Sprague Dawley系ラットを、1,2,4-TCBに、10 ppm(75 mg/m³)、3 ppm(23 mg/m³)および0 ppmの濃度で、1日6時間、週5日の頻度で3ヵ月間に計65~66回曝露した。この結果、10 ppm曝露群で、ウロポルフィリンの尿中排泄量の軽度の増加が90日間にわたり観察された。しかし、この影響は可逆的であり、曝露終了から2ヵ月後または4ヵ月後には、この増加は消失していた。3 ppm(23 mg/m³)曝露群では、ポルフィリンの尿中排泄量の増加は認められなかった。したがって、この濃度が、この試験条件下でのラットのNOAECであると考えられる。

ポルフィリン症

上述の多くの試験において、ポルフィリン症に関連する影響が言及されている(Rao, 1982; Kociba et al., 1981; Watanabe et al., 1977)。この他にも、ポルフィリン症に関する問題を検討するための多くの試験が、1,2,4-TCBを用いて行われている。殺菌剤であるヘキサクロロベンゼンへの曝露によるヒトの皮膚ポルフィリン症がトルコで報告されたことを受け、この影響に高い関心が寄せられている。

多くのクロロベンゼン誘導体について、ラットへの経口投与後の尿中および肝臓のポルフィリン濃度に対する影響が検討された(Rimington and Ziegler, 1963)。この試験では、1,2,4-TCBを最高730 mg/kg体重/日の用量で15日間投与した結果、尿中のコプロポルフィリンおよびウロポルフィリン濃度への影響が認められた。1,4-ジクロロベンゼンでは、同様の濃度でこれより強い影響が認められた。1,2,4-TCB 500 mg/kgの投与により、肝臓のグルタチオン量の減少が認められた。還元型グルタチオンの同時腹腔内投与により、1,2,4-TCB

のポルフィリン生成作用を抑制することができた。

コーン油に懸濁させた 1,2,4-TCB を最高 200 mg/kg 体重/日の用量で経口投与した試験では、肝重量の増加が認められたが、ポルフィリンの排泄量に対する影響は認められなかった (Carlson, 1977)。この試験では、1,4-ジクロロベンゼンによる影響も同時に検討され、ポルフィリン症を発症させる可能性が(強度は低い)1,2,4-TCB よりも高いことが示された。

多種類のクロロベンゼン類について、経口投与によるラットのハーダー腺のポルフィリン含量への影響を検討した (Eida et al., 1977)。1,2,4-TCB 500 mg/kg 体重/日の投与後 1 日、3 日および 5 日に、ポルフィリン含量の増加が認められた。1,4-ジクロロベンゼンによる影響はこれとは大きく異なっており、ハーダー腺のポルフィリン含量は減少した。ハーダー腺に対する影響が肝臓にみられた影響と異なるのは、ハーダー腺では ALA 合成酵素の反応性が欠如しているためである。これは、つまりは、この腺で、シトクロム P 450 が欠如していることに関連があると考えられている。

1,2,4-TCB のポルフィリン生成作用は、ニワトリおよびウズラにおいても検討された (Miranda, 1983)。この結果、ウズラは最も感受性の高い種であることが明らかにされたが、ニワトリ胚では反応が認められなかった。

ピンク色に蛍光する骨を持ったヒツジの希少例が、オーストラリアのビクトリア州で報告されているが、これは、ポルフィリンの蓄積に起因したものである。このヒツジの骨脂には、120 $\mu\text{mol/kg}$ の濃度で 1,2,4-TCB が含まれていた。このヒツジには 1,2,4-TCB への曝露歴がなく、骨脂中の 1,2,4-TCB の存在および骨中のポルフィリンの存在はともに、リンデンへの曝露によるものと考えられた (Nichol et al., 1981)。

反復投与毒性についての結論

1,2,4-TCB による慢性毒性の標的臓器は、肝臓(肝重量の増加、病理組織学的変化および肝酵素活性の有意な変化)、腎臓および副腎であると考えられる。全般に、雌ラットよりも雄ラットの方が、1,2,4-TCB による毒性の影響を受けやすいと考えられる。

上述の経口投与試験のいくつかから得られた用量-反応関係を、**Table 4.16** に示す。

Table 4.16 Relationship between exposure and effect in some rat studies after oral administration of 1,2,4-TCB

| Dose (mg/kg bw/day) | Length of exposure (days) | Effects | Reference |
|---------------------|---------------------------|---|--|
| 8 | 90 | No significant effects | Côté et al. (1988) |
| 10-20 | 14 | Induction of liver enzymes | Carlson and Tardiff (1976) |
| 45-133 | 30-120 | Elevated adrenal weights, elevated relative liver and kidney weight, histological changes in liver and thyroid, porphyria | Robinson et al. (1981) Côté et al. (1988) Carlson (1977) |

種々の反復毒性試験で得られた NOAEL および LOAEL を、以下の **Table 4.17** および **Table 4.18** に示す。性差が認められた場合には、より低濃度で影響がみられた性別における値が示されている。

Table 4.17 Subchronic and chronic systemic toxicity of 1,2,4-TCB: Oral administration

| Species | Route | Doses | Duration | LOAEL | NOAEL | Ref. |
|---------|-------------------|---|------------------------------------|---|------------------------------------|-------------------------------|
| Rat | diet | 0, 600, 1,200, 2,400, 4,800, 9,600 ppm | 2 weeks | 600 ppm ≈ 60 males (60 mg/kg bw/d) | 600 ppm females (67 mg/kg bw/d) | Bio/Dynamics, (1987) |
| Rat | | 0, 1, 10, 100, 1,000 ppm | 13 weeks | 1000 ppm (82 males (82 mg/kg bw/d) | 100 ppm males (7.8mg/kg bw/d) | Côté et al. (1988) |
| Rat | | 0, 200, 600, 1,800 ppm | 13 weeks | 200 ppm males (11 mg/kg bw/d) | 200 ppm females (13 mg/kg bw/d) | Bio/Dynamics (1989) |
| Rat | | 0, 100, 350, 1,200 ppm | 2 years | 350 ppm (19-23 mg/kg bw/d) | 100 ppm (5.5-6.7 mg/kg bw/d) | Moore (1994b) |
| Mice | | 0, 220, 3,850, 7,700 ppm | 13 weeks | 220 ppm males (62 mg/kgbw/d) | 220 ppm females (80 mg/kg bw/d) | Hiles (1989) |
| Mice | | 0, 150, 700, 3,200 ppm | 2 years | 150 ppm (21-26 mg/kg bw/d) | - | Moore (1994a) |
| Rat | gavage | 0, 10, 20, 40 mg/kg bw/d | 2 weeks | 10 mg/kg bw/d | - | Carlson and Tardiff (1976) |
| Rat | | 0, 10, 20, 40 mg/kg bw/d | 13 weeks (+ 30 day recovery) | 10 mg/kg bw/d 40 mg/kg bw/d (for non-reversible effects) | - | Carlson and Tardiff (1976) |
| Monkey | | 0, 1, 5, 25, 90, 125, 174 1 – 173 mg/kg bw/d | 13 weeks | 90 mg/kg bw/d | 25 mg/kg bw/d | Smith et al. (1985) |
| Rat | drinking water | 0, 25, 100, 400 ppm | 10 to 12 weeks | 400 ppm (33-53 mg/kg bw/d) | 100 ppm (9-15 mg/kg bw/d) | Robinson et al. (1981) |

Table 4.18 Subchronic and chronic systemic toxicity of 1,2,4-TCB: Dermal and inhalation exposure

| Species | Route | Doses | Duration | LOAEL/LOAEC | NOAEL/NOAEC | Ref. |
|---------|------------|---|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Rabbit | dermal | 0, 30, 150, 450 mg/kg bw/d | 4 weeks | 450 mg/kg bw/d | 150 mg/kg bw/d | Rao et al. (1982) |
| Mice | | 9, 18 mg 1,2,4-TCB | two years (twice weekly) | - | - | Yamamoto et al. (1982) |
| Rat | inhalation | 70, 200 ppm 520, 1,500 mg/m ³ | 3 weeks 15 exposures | 70 ppm 520 mg/m ³ | | Gage (1970) |
| Rat | | 0, 30, 100 ppm 0, 226, 754 mg/m ³ | 44 days 30 exposures, | 30 ppm 226 mg/m ³ | - | Kociba et al. (1981) |
| Rat | | 0, 3, 10 ppm 0, 23, 75 mg/m ³ | 3 months | 10 ppm 75 mg/m ³ | 3 ppm 23 mg/m ³ | Watanabe et al. (1977) |
| Rat | | 0, 25, 50, 100 ppm 0, 188, 377, 754 mg/m ³ | 26 weeks | 25 ppm 188 mg/m ³ | - | Coate et al. (1977) |
| Rabbit | | 0, 25, 50, 100 ppm 0, 188, 377, 754 mg/m ³ | 26 weeks | | ≥ 100 ppm 754 mg/m ³ | Coate et al. (1977) |
| Monkey | | 0, 25, 50, 100 ppm 0, 188, 377, 754 mg/m ³ | 26 weeks | | ≥ 100 ppm 754 mg/m ³ | Coate et al. (1977) |

Moore(1994b)によるラットを用いた2年間がん原性試験に基づくと、経口 NOAELは6 mg/kg 体重/日、LOAELは20 mg/kg 体重/日であると考えられる。この NOAELは、Côté et al. (1988)のラットを用いた13週間混餌投与試験で得られた8 mg/kg 体重/日、およびRobinson et al. (1981)の飲水投与試験で得られた9~15 mg/kg 体重/日という値に整合する。ただし、これよりわずかに高い用量で可逆的な影響が認められる場合がある(Carlson and Tardiff, 1976)ことに留意しなければならない。

ウサギを用いた4週間試験に基づくと、経皮投与では、LOAELは450 mg/kg 体重/日、NOAELは150 mg/kg 体重/日である。

ラットにおける LOAECは、26週間試験における臓器の変化については25 ppm(188 mg/m³)、90日試験におけるポルフィリン排泄量の増加については10 ppm(75 mg/m³)である。これに対応する NOAECは、それぞれ20 ppm(150 mg/m³)および3 ppm(23 mg/m³)である。

1,2,4-TCB への長期曝露後にみられた影響(例えば、肝重量および血清肝酵素の増加、副腎および腎臓の重量ならびにポルフィリン排泄量の増加)は、経口曝露での慢性影響の分類における限度値である50 mg/kg 体重/日や、吸入曝露後による限度値である0.25 mg/L、1日6時間を下回る用量でも観察されている。しかし、これらの用量で認められた影響は、EU分類基準に従ってR48/22またはR48/20に分類する必要があるほど重度なものではない。

リスクアセスメントにおいては、以下の **Table 4.19** に示す値が用いられている。

Table 4.19 Summary of systemic NOAEL/NOAEC values used for the risk characterisation

| Route | NOAEL/NOAEC | LOAEL/LOAEC | Duration of exposure | Reference |
|------------|---|---|----------------------|------------------------|
| Oral | 6 mg/kg bw/day | 20 mg/kg bw/d | 2 years | Moore et al. (1994b) |
| Dermal | 150 mg/kg bw/day | 450 mg/kg bw/day | 4 weeks | Rao et al. (1982) |
| Inhalation | 23 mg/m ³ , 6 hr/d, 5 days/week | 75 mg/m ³ , 6 hr/d, 5 days/week | 3 months | Watanabe et al. (1977) |

皮膚への局所的な影響に関しては、LOAEL が 0.9 mg/cm² であることだけが確定された (Rao et al., 1982)。

4.1.2.6 変異原性

in vitro における遺伝毒性

Simmon (1975) は、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の菌株 TA1535、TA1537、TA1538、TA98 および TA100 を用い、ラット肝ミクロソームによる代謝活性化の存在下および非存在下で、1、10、50、100、500、1,000 および 5,000 µg/plate の濃度で、1,2,4-TCB の変異原性を検討した。この結果、500 µg/plate 以上の濃度で毒性が認められたが、この化合物に変異原性はなかった。また、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) D3 株においても、2 濃度 (0.02% および 0.2%) で被験物質の検討が行われ、この場合も被験物質には毒性が認められたが、有糸分裂組換え頻度は増加しなかった。

Schoeny et al. (1979) は、菌株 TA1535、TA1537、TA98 および TA100 を用い、1,2,4-TCB または PCB で酵素誘導したラット肝ミクロソームによる代謝活性化の存在下および非存在下で *Salmonella*/ミクロソームアッセイを実施し、102~1.4×10⁵ µg/plate の範囲の 8 用量で、1,2,4-TCB の変異原性を評価した。この結果、1,599 µg/plate 以上の用量で毒性が認められたが、102~2,914 µg/plate の範囲では、1,2,4-TCB に変異原性は認められなかった。

ネズミチフス菌の菌株 TA1535、TA1537、TA98 および TA100 を用いた 1,2,4-TCB の Ames 試験が行われている。プレインキュベーション法を採用し、アロクロール 1254 で誘導したラットおよびハムスターの肝 S-9 の存在下および非存在下で、0、3.3、10、33.3、100 および 333.3 µg/plate の用量で行われた。この試験は、250 の化学物質を検討した試験の中で実施されたもので、各被験試料はコード化されて行われた。用量は毒性学的指標に従って設定され、毒性が認められない場合は 10 mg/plate を最大用量とした。1,2,4-TCB についての

結果は、陰性であった(Haworth et al., 1983)。

Nohmi et al.(1985)は、菌株 TA100、TA2637 および TA98 を用いた Ames 試験において、代謝活性化の存在下および非存在下で、0.03、0.1、0.3、1.0 および 3.0 mg/plate の濃度で、1,2,4-TCB の変異原性を検討した。この試験で用いられた S-9 mix の詳細は、明らかにされていない。この試験の結果は、陰性であった。

Matsui et al.(1989)は、枯草菌(*Bacillus Subtilis*)を用いた *rec* 試験により、DNA 修復に対する 1,2,4-TCB の影響を検討した。1,2,4-TCB には、S9 で活性化した場合、「強い DNA 損傷能力」と述べられた作用が認められた。

Ono et al.(1991)は、代謝活性化の存在下および非存在下で、*umu* 試験により 1,2,4-TCB の変異原性を検討した。代謝活性化は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンで前処置を行ったラットの肝 S9 を用いたマイクロソームによる。この結果、S9 の非存在下で陽性結果が得られた。認められた影響は、試験菌株との培養時間(通常の 2 時間から最長 20 時間まで)の増加に伴って増強された。マイクロソームによる代謝活性化の存在下では毒性は認められたが、変異原性は陰性であった。Ono et al.(1992)は、1,2,4-TCB について 100 µg/mL の濃度で第 2 の試験を行い、上述の結果を裏付ける結果を得ている。すなわち、第 2 の *umu* 試験においても、マイクロソームによる代謝活性化の存在下では 1,2,4-TCB による DNA 修復の誘導が認められなかったが、非存在下では陽性結果が認められた。

Sofuni et al.(1985)は、チャイニーズハムスターの培養細胞を用いて、1,2,4-TCB の染色体異常誘発能を検討した。DMSO を溶媒として 0、0.0313、0.0625 および 0.125 mg/mL の用量で、処理時間は 24 時間または 48 時間として、代謝活性化系非存在下で実施した。0.125 mg/mL の濃度では細胞毒性が示された。いずれの濃度においても染色体異常の発現が認められなかったことから、染色体異常誘発能は陰性と判断された。

Ishidate et al.(1987)は、チャイニーズハムスター肺由来細胞株(CHL 細胞)を用い、代謝活性化系非存在下で、62.5 mg/L(0.34 mM)の濃度で 1,2,4-TCB の染色体異常誘発能を検討した。この試験の結果は、陰性であった(Ishidate et al., 1988 中に引用)。

Shimada et al.(1983)は、成熟 F344 ラット由来の肝細胞を用い、DNA 修復に対する 1,2,4-TCB の影響を *in vitro* で検討した。この DNA 修復試験では、肝細胞初代培養系(HPC)を用い、被験物質の濃度は、10⁻⁵% (v/v) (0.15 µg/mL)～1% (v/v) (14560 µg/mL)であった。DNA 修復は、核 DNA に取り込まれた ³H-チミジン(オートラジオグラフィで核内粒子として認められる)の検出により定量化された。細胞核あたりの正味の核内粒子数が 5 個以上であった場合、被験化合物は陽性であると報告されている。この試験の結果、10⁻²% (v/v) (146 µg/mL)以上

の濃度では、細胞毒性が認められた。1,2,4-TCB は、 $10^{-3}\%$ (v/v) (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および $10^{-4}\%$ (v/v) (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の濃度では、陰性であった。15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における核あたりの粒子数は、1 回目の試験では 0.6 個であり、2 回目の試験では 0 個であった。陽性対照 (2-AF および B(a)P) では、核あたりの粒子数は 69~218 個であり、明らかに陽性を示した。陰性対照 (フルオレンおよび DMSO) では、核あたりの粒子数は 0~1.7 個であり、明らかに陰性を示した。

Williams et al. (1989) は、300 の化学物質について行われた、ラット肝細胞を用いた DNA 修復試験の中で、1,2,4-TCB の評価を行っている。1,2,4-TCB は陰性であり、 8.1×10^{-5} M (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の濃度で認められた核内粒子数は、核あたり 0.9 個であった。また、この化合物による DNA 修復の誘導は認められなかった。

タンパク質および DNA への結合に重点を置いた、1,2,4-TCB のミクロソーム代謝試験が行われた (den Besten et al., 1991)。1,2,4-TCB は、主に 2,3,6-トリクロロフェノールおよび 2,4,5-トリクロロフェノールに代謝され、2,4,6-トリクロロフェノール、2,3,5-トリクロロフェノールおよびトリクロロヒドロキノンへの代謝も認められた。タンパク質との共有結合は、全代謝物の約 10% で認められた。タンパク質との結合はアスコルビン酸により完全に阻害されたことから、キノン化合物だけが結合反応に関与していることが示唆される。1,2,4-TCB は DNA をアルキル化したが、タンパク質との結合に比べると非常に少量であった (全代謝物の 0.5%)。なお、培養後に、 ^{14}C 標識タンパク質が単離 DNA に混入した可能性を除外することはできない。

in vivo における遺伝毒性

NMRI マウス (1 群 5 匹) に、105、210、315 または 420 mg/kg の 1,2,4-TCB を 24 時間おきに 2 回腹腔内投与し、最初の投与の 30 時間後に 1000 個の多染性赤血球中の小核を計測した結果、染色体異常誘発作用 (小核を有する多染性赤血球の出現頻度の増加) が認められたことが報告されている (Mohtashampur, 1987)。この試験では、9 種類の物質における試験結果が報告されているが、これらに対して溶媒対照が共通の 1 群しか設けられていなかった。また、1 群あたりの動物数 (5 匹) は、OECD ガイドラインで推奨される動物数 (雌雄差を考慮する必要のない場合を除いては 1 群 10 匹) より少なく、多染性赤血球と正染性赤血球との比率に関する情報も示されていない。この試験では、試験対象とされた 9 種類の物質 (大部分は 1,4-ジクロロベンゼンなどのクロロベンゼン類) のすべてで、小核の増加が用量依存的に認められた。

Table 4.20 Micronucleus test with 1,2,4-TCB (study 1) (Mohtashamipur et al., 1987)

| Treatment | Vehicle (corn oil) | 1,2,4-TCB dose (mg/kg bw) | | | |
|-----------------------|--------------------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 210 (2·105) | 420 (2·210) | 630 (2·315) | 840 (2·420) |
| Micronuclei /1000 PCE | 1.80 ± 0.748 | 3.50 ± 0.806 * | 4.50 ± 0.806 * | 5.80 ± 0.871 * | 7.40 ± 0.916 * |

* p < 0.01 (Student's *t* test).

Swiss CD1 マウス(1 群 3 匹)に、ジメチルスルホキシド/オリーブ油に懸濁した 1,2,4-TCB 0 または 500 mg/kg を 24 時間おきに 2 回腹腔内投与し、最初の投与の 30 時間後に 3000 個の多染性赤血球中の小核を計測した結果、染色体異常誘発作用(小核を有する多染性赤血球の出現頻度の倍増)が認められたことが報告されている(Parrini et al., 1990)。この試験は、推奨されるガイドラインに準拠して行われたものではないと考えられる。使用された動物数は OECD ガイドラインに推奨される供試動物数(1 群 10 匹)ではなく、わずか 3 匹であった。また、被験物質による設定用量での動物への毒性影響に関する情報も示されていない。

Table 4.21 Micronucleus test with 1,2,4-TCB (study 2) (Parrini et al., 1990)

| Treatment | Vehicle (DMSO/olive oil) | Negative control | 1,2,4-TCB dose (mg/kg bw) |
|----------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|
| | | | 1,000 (2·500) |
| Micronuclei/1000 PCE | 1.88 ± 1.28 | 1.16 ± 0.98 | 3.66 ± 1.73 * |

* significant difference compared to vehicle (Mann-Whitney).

Lehn(1990)は、GLP および OECD ガイドライン 474 に準拠して、小核試験を実施した。この試験では、ポリエチレングリコールに溶解した 1,2,4-TCB 0、100、330 および 1,000 mg/kg を単回経口投与し、投与 24 時間後、48 時間後および 72 時間後に塗沫標本を作製した。この結果、最高用量で明らかな毒性徴候が認められた(Table 4.22 を参照のこと)。330 mg/kg および 1,000 mg/kg 投与群の 72 時間後の塗沫標本で有意差が認められたが、この試験の結果は陰性と判定された。この有意差は、この時点における対照群の計測値が非常に低値であったために生じたものと考えられる。

Table 4.22 Micronucleus test with 1,2,4-TCB (study 3) (Lehn, 1990)

| | Sample time: | Vehicle | 1,2,4-TCB (mg/kg) | | | Cyclophos phamide |
|-----------------------|--------------|-----------|-------------------|------------|------------|-------------------|
| | | | 100 | 330 | 1,000 | 40 |
| Micronuclei /1000 PCE | 24 h | 0.7 | 0.5 | 1.2 | 0.3 | 10.4 * |
| PCE/NCE | | 1,000/792 | 1,000/878 | 1,000/814 | 1,000/986 | 1,000/841 |
| Micronuclei /1000 PCE | 48 h | 0.9 | 0.5 | 0.1 | 0.22 | - |
| PCE/NCE | | 1,000/925 | 1,000/921 | 1,000/1081 | 1,000/1246 | - |
| Micronuclei /1000 PCE | 72 h | 0.1 | 0.1 | 0.7 * | 0.71 * | - |
| PCE/NCE | | 1,000/871 | 1,000/953 | 1,000/858 | 1,000/909 | - |

* $p \leq 0.05$ compared to vehicle (Mann-Whitney).

変異原性についての結論

独立して行われた 3 件の Ames 試験で、陰性の結果が得られている。細菌を用いた DNA 修復試験の 2 件では、それぞれ擬陽性および陽性の結果が得られている。また、哺乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験も 2 件報告されており、いずれも陰性結果が示されているが、これらの試験では代謝活性化系は用いられていない。

In vivo における遺伝毒性に関しては、複数の試験でわずかに陽性が認められており、1 件の小核試験では陰性結果が得られている。

陰性結果が得られた試験は経口投与により行われたもので、GLP および OECD ガイドライン 474 に準拠している。この試験では、毒性用量の投与により骨髄に毒性影響が認められている。わずかに陽性が認められたその他の 2 件の試験では、被験物質の投与経路は腹腔内であった。これらの試験のプロトコルは、いずれも OECD ガイドラインの規定に適合していない部分があるため、陽性結果の妥当性は疑義が残る。

遺伝毒性に関するデータベースは複雑であり、明確な結論は得られない。DNA 損傷を示す証拠がいくつか示されており、不十分な試験ではあるが 2 件の *in vivo* 小核試験で弱い陽性結果が得られている。Ames 試験における陰性結果は、遺伝毒性がないとする十分な証拠にはできない。また、陰性結果が得られた染色体異常試験には、代謝活性化系が用いられなかったという問題点がある。しかし、初代肝細胞を用いた試験では DNA 修復に対する影響は認められておらず、適切に実施された *in vivo* 小核試験の結果は陰性であった。

総合的にみて、1,2,4-TCB は、*in vivo* で全身遺伝毒性を示さないものと考えられる。

4.1.2.7 がん原性

In vitro 試験

Shimada et al.(1983)は、成熟 F344 ラットの肝細胞を用い、1,2,4-TCB の影響を *in vitro* で検討した。成熟ラット肝上皮(ARL)細胞を用いた形質転換試験が行われ、1,2,4-TCB の設定濃度は、15 µg/mL および 73 µg/mL であった。この結果、強い細胞毒性を示す用量で、形質転換の誘発が認められた。これらの細胞には、低値であるが明確な足場依存性増殖が認められた。

In vivo 試験

Slc:ddY マウス(1群雌雄各 75 匹)の皮膚に、アセトン溶媒とした 1,2,4-TCB の 60%または 30%溶液 0.03 mL(18 mg または 9 mg) を、週 2 回で 2 年間、塗布した。対照群(雌雄各 50 匹)には、アセトンのみを塗布した(Yamamoto et al., 1982)。

3 用量群すべての動物に対し、組織学的検査を行った。

この結果、1,2,4-TCB の塗布部位に、細胞浸潤ならびに表皮の肥厚および角化が認められた。高用量群の雄 2 匹(2.7%)および対照群の雌 1 匹(2%)で乳頭腫、高用量群の雌 1 匹(1.3%)で扁平上皮がんが発生したが、全身性腫瘍の発生率には増加は認められなかった。

この試験により、Slc:ddY マウスでは腫瘍発生率は増加しないことが示された。

B6C3F1 マウス(1群雌雄各 50 匹)を用い、1,2,4-TCB 0、150、700 または 3,200 ppm を 104 週間混餌投与した(Moore, 1994a)。この試験は、GLP および米国の試験ガイドライン 40 CFR 798.3300(OECD TG 451 に相当)に準拠して実施された。試験結果については、Table 4.23 を参照されたい。

0、150、700 または 3,200 ppm 投与群における 104 週間の 1,2,4-TCB 平均摂取量は、雄でそれぞれ 0、20.9、100.5 および 522 mg/kg 体重/日であり、雌ではそれぞれ 0、26.2、127.2 および 574.9 mg/kg 体重/日であった。

高用量群で、第 52 週以降に生存率の低下が認められた。3,200 ppm 投与群では、試験終了時の生存率が雌雄ともに有意に低下し、この時点で雌の 100%および雄の 90%が死亡していた。他群における死亡率は、700 ppm 投与群の雄で 18%、雌で 16%、150 ppm 投与群の雄で 12%、雌で 24%、対照群の雄で 10%、雌で 22%であった。

週ごとの平均体重は、3,200 ppm 投与群の雌雄で試験のほぼ全期間を通じ、対照群と比較して有意に低値であった(3,200 ppm 投与群の雌では第 104 週に生存例がなかったため、この群の試験終了時の体重は評価されていない)。これとは逆に、150 ppm および 700 ppm 投与群では、雌雄ともに週平均体重が高値を示した(高頻度で統計学的有意差あり)。病理組織学的検査では、3 用量の全投与群および同時対照群に肝腫瘍が認められた(**Table 4.23**)。

Table 4.23 Liver tumour incidences in the mouse after chronic oral administration of 1,2,4-TCB (Moore, 1994a)

| | | 1,2,4-TCB (ppm) | | | |
|--------------------------------|--------|-----------------|-------|-------|-------|
| | | 0 | 150 | 700 | 3,200 |
| Surviving animals (104th week) | Male | 45/50 | 44/49 | 41/50 | 5/50 |
| | female | 39/50 | 37/49 | 42/50 | 0/50 |
| Hepatocellular adenomas | Male | 4/50 | 7/50 | 16/50 | 2/50 |
| | female | 3/50 | 4/50 | 16/50 | 8/50 |
| Hepatocellular carcinomas | Male | 8/50 | 5/50 | 27/50 | 50/50 |
| | female | 1/50 | 1/50 | 28/50 | 46/50 |

高用量群および中用量群では、肝細胞がんの発生率が有意に増加した。

3,200 ppm 投与群の雄を除き、上位 2 つの高用量群で、肝細胞腺腫の発生率にも増加が認められた。

この長期混餌投与試験には、不十分な点が認められる。高用量群(3,200 ppm)における死亡率が雌雄ともに高く、この群における結果の解釈が困難となっている。しかし、肝細胞がんは高用量群のほぼ全個体に認められており、700 ppm 投与群における腫瘍発生率は同時対照群に比べ有意な高値を示した。B6C3F1 系のマウスでは、肝毒性を有する物質への曝露により肝細胞がんが高頻度で発生することが知られており、この系統のマウスをがん原性試験に使用した場合、結果の解釈は困難となる。しかし、この試験の結果から、この系統のマウスに対する 1,2,4-TCB のがん原性が示された。

B6C3F1 マウスにおける 1,2,4-TCB のがん原性に関する NOAEL は、飼料中濃度 150 ppm(21 ~26 mg/kg 体重/日)であった。

F-344 ラット(1 群雌雄各 50 匹)を用い、1,2,4-TCB 0、100、350 または 1,200 ppm を 104 週間混餌投与した(Moore, 1994b)。この試験は、GLP および米国の試験ガイドライン 40 CFR 798.3300(OECD TG 451 に相当)に準拠して実施された。試験結果については、**Table 4.24** を参照されたい。

試験期間中 104 週間の 1,2,4-TCB の平均摂取量は、雄でそれぞれ 0、5.5、18.9 および 66.7 mg/kg

体重/日であり、雌ではそれぞれ 0、6.7、22.9 および 79.3 mg/kg 体重/日であった。

高用量群における試験終了時の生存率は、雄で 60% (30/50)、雌では 72% (36/50) であった。全試験群における計画屠殺前死亡の主要な原因は、単核細胞白血病ならびに下垂体やジンバル腺の腫瘍を含む、新生物であった。

Table 4.24 Incidences of the predominant tumours in the rat after chronic oral administration of 1,2,4-TCB (Moore, 1994b)

| | | 1,2,4-TCB (ppm) | | | |
|--|--------|-----------------|---------|-------|-------|
| | | 0 | 100 * | 350 * | 1,200 |
| Surviving animals (104th week) | male | 41/50 | 39/49 | 42/50 | 30/50 |
| | female | 38/50 | 37/49 | 36/50 | 36/50 |
| Mononuclear cell leukaemia | male | 15/50 | 13/49 | 18/50 | 21/50 |
| | female | 10/50 | 10/49 | 13/50 | 10/50 |
| Pituitary gland tumours (carcinomas/adenomas) | male | 19/50 | 13/49 | 8/50 | 12/50 |
| | female | 19/50 | 22/49 | 19/50 | 21/50 |
| Zymbal's gland * tumours (carcinomas/adenomas) | male | 1/50 | 0/49 | 1/50 | 4/50 |
| | female | 0/50 | 2/49 ** | 0/50 | 2/50 |

* Histological examination carried out only on indication

** 1 of these tumours was reported as an adenoma. All remaining Zymbal's gland tumours were carcinomas. On re-examination (Moore, 2000) all tumours were classified as carcinomas

単核細胞白血病および下垂体腫瘍は、老齢 Fisher F-344 ラットでよくみられる所見であり、対照群および高用量群における発生率に有意差は認められなかった。ジンバル腺腫瘍については、高用量群で増加傾向が認められたが、有意な増加ではなかった。しかし、ジンバル腺腫瘍(がんおよび腺腫)の発生率は、通常 1%未満であることが報告されている (Seely, 1991)。また、米国環境衛生情報サービス (Environmental Health Information Service; EHIS) の米国国家毒性プログラム (NTP) 背景対照情報サービス (Historical Control Information Service) (EHIS, 2000) によると、ジンバル腺腫瘍の発生率は 4%を上回ることはなく、多くの場合 2%以下であると考えられている。

この腫瘍の組織学的検査は徴候が認められた場合にのみ実施されていたため、この試験の供試動物すべてのジンバル腺について、追加の病理組織学的検査が実施された (Moore, 2000)。

この結果、試験群における発生率に、対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった ($p : 0.21 \sim 0.32$)。雄での発生率の傾向検定では、有意水準 5%を満たさなかった ($p = 0.0547$)。また、雌雄合計した発生率については、Fisher の直接法で $p = 0.056$ であった。

ラット肝におけるがんイニシエーション活性やがんプロモーション活性の指標となる、ラ

ット肝病巣バイオアッセイ (rat-liver foci bioassay) が行われている。雌の Sprague-Dawley 系ラットを用い、ジエチルニトロソアミンによるイニシエーション後に 1,2,4-TCB を腹腔内投与した。この結果、 γ -グルタミントランスフェラーゼ (GGT) 陽性巣の出現率増加は認められなかった (Herren-Freund and Pereira, 1986)。

Table 4.25 Incidences of Zymbal gland tumours in the rat after chronic oral administration of 1,2,4-TCB (Moore, 2000)

| Incidence | 1,2,4-TCB (ppm) | | | |
|-----------|-----------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 100 | 350 | 1,200 |
| Male | 1/50 | 0/50 | 1/50 | 4/50 |
| Female | 0/50 | 3/50 | 0/50 | 2/50 |
| Combined | 1/100 | 3/100 | 1/100 | 6/100 |

がん原性についての結論

In vitro の細胞形質転換試験の結果は陽性であったが、非常に強い細胞毒性が認められた。

Slc:ddY マウスを用いた試験では、皮膚適用による 1,2,4-TCB のがん原性は認められなかった。

B6C3F1 マウスにおける 1,2,4-TCB の 2 年間混餌投与により、がん原性が認められた。B6C3F1 マウスは、肝毒性を有する多くの物質によって肝細胞がんを発症することが知られている。ヒトにおけるこの腫瘍の意義については、多くの議論がなされている。B6C3F1 マウスでは、飼料中濃度 150 ppm (21~26 mg/kg 体重/日) の 1,2,4-TCB で肝腫瘍が誘発されなかったことから、この濃度が肝腫瘍の発生に対する閾値であることが示唆され、肝腫瘍の発生は肝臓に対する一般毒性影響の結果生じるものであるという見解が支持される。また、マウスでは 1,2,4-TCB の投与により他の臓器での腫瘍の発生がみられなかったことも、これを支持するものである。

F344 ラットにおける 1,2,4-TCB の 2 年間混餌投与により、ジンバル腺腫瘍の発生率に、統計学的有意差有りに近い増加が認められた。雄での発生率の傾向検定における有意水準は $p = 0.0547$ であった。また、雌雄の合計発生率については、Fisher の直接法で $p = 0.056$ であった。3つの投与群 (100 ppm 投与群の雌および 1,200 ppm 投与群の雌雄) における発生率は、同系統のラットにおけるがん発生率に関する背景対照データのほとんどを上回っている。一般に、遺伝毒性を有する発がん物質は、ジンバル腺腫瘍を誘発することが知られている。ジンバル腺はヒトには存在しないが、この器官にみられる腫瘍は、ヒトの皮脂腺にみられ

る腫瘍に関連する可能性がある。また、雄で観察された発生率の増加は、1,2,4-TCB 投与に起因するものである可能性を除外できない。

総合的にみて、1,2,4-TCB は *in vivo* で遺伝毒性を示さないと考えられ、結合試験では DNA との付加物の形成は認められないか、またはわずかに認められたのみであった。B6C3F1 マウスにおける 1,2,4-TCB 誘発肝腫瘍についてはヒトとの関連性はないと考えられるが、F344 ラットにおけるジンバル腺腫瘍は懸念事項である。ここで報告されている発生率は、統計学的に有意な増加を示していないが、複数の試験群におけるがんの発生率が、一般的に認められる値をかなり上回っている。

ジンバル腺腫瘍を誘発する物質は、遺伝毒性を有していることが多い。がん原性の評価が行われた 222 種の化学物質について NCI/NTP が行った調査において、ラットにジンバル腺腫瘍を誘発すると断定された 9 種の化学物質は、ネズミチフス菌に対しても変異原性を示した。ジンバル腺のホモジネート中にシトクロム P-450 依存性酵素の活性があることから、ジンバル腺で化学物質から発がん活性代謝物が生成されている可能性がある〔Seely (1991) の文献中でレビュー〕。

しかし、上述の試験結果からは、EU 分類基準に基づくがん原性物質のと要件を満たすものではないと考えられる。

4.1.2.8 生殖毒性

亜慢性試験および慢性試験で認められた生殖器官に対する毒性影響

亜慢性経口毒性試験において、剖検時に生殖器官の検査が行われている (Côté et al., 1988; Hiles, 1989; Bio/Dynamics, 1989)。また、がん原性試験において、病理組織学的検査が行われている (Moore, 1994a; 1994b)。

OECD TG 408 に相当する試験が行われており、Sprague Dawley 系離乳ラット (1 群雌雄各 10 匹) に、1,2,4-TCB (純度 99%) を 1、10、100 または 1,000 ppm の濃度で 13 週間混餌投与した (Côté et al., 1988)。1,2,4-TCB の摂取量は、雄で 0.07、0.78、7.8 および 82 mg/kg 体重/日、雌では 0.11、1.4、15 および 101 mg/kg 体重/日と算出された。この試験では、臓器重量に対する影響も生殖器官に対する組織学的影響も認められなかった。

GLP に準拠したガイドライン試験が行われており、B6C3F1/CrlBR マウス (1 群雌雄各 10 匹) に、1,2,4-TCB (純度 99.48%) を 0、220、3,850 または 7,700 ppm の濃度で 13 週間混餌投与し

た(Hiles, 1989)。この結果、全投与群の雄において、左右の精巣/精巣上体の絶対重量が有意に低値であった。また、220 ppm 投与群および3,850 ppm 投与群では、精巣/精巣上体の対脳重量比も有意に低値であった。しかし、精巣や精巣上体には、これに伴う肉眼的変化または顕微鏡的变化は認められなかった。この有意差は、蓄積脂肪の減少に関連して生じたものと考えられる。

Fischer F344 ラット(1群雌雄各10匹)に、1,2,4-TCBを0、200、600または1,800 ppmの濃度で3ヵ月間混餌投与した(Bio/dynamics, 1989)。この試験は、ガイドラインまたはGLPに基づいたものではないが、OECD TG 408試験で行われる観察と非常に近い観察が行われている。この試験では、1,800 ppm 投与群における雄の精巣の平均重量が、対照群に比べ統計学的に有意な高値を示した。

B6C3F1 マウス(1群雌雄各50匹)に、1,2,4-TCBを0、150、700または3,200 ppmの濃度で104週間混餌投与した(Moore, 1994a、試験の詳細については前項を参照のこと)。この試験では、対照群、700 ppm 投与群および3,200 ppm 投与群において、精巣および精囊の顕微鏡的検査を行った。精巣に変性(片側または両側)が認められた雄の割合は、それぞれ2%、6%および20%であった。精囊分泌物の減少(両側)が認められた雄の割合は、それぞれ0%、2%および53%であった。著者らは、高用量群の雄で認められた退行性変化は、二次的な影響によるものであると結論している。

この試験では、NOAELを決定するための証拠は、ほとんど示されていない。

F-344 ラット(1群雌雄各50匹)を用い、1,2,4-TCBを0、100、350または1,200 ppmの濃度で104週間混餌投与した(Moore, 1994b、試験の詳細については前項を参照のこと)。この試験では、生殖器官に、投与に関連した影響は認められなかった。

発生毒性および受胎能：2世代生殖毒性試験

Charles River ラットを用いた1,2,4-TCBの2世代生殖毒性試験(Robinson et al., 1981)では、F₀世代の出生からF₂世代の離乳まで、継続的に1,2,4-TCBを0、25、100または400 ppmの濃度で飲水投与した。溶媒対照群には、0.125%のTween 20を飲水投与した。すべての世代において、各投与群につき、17~23腹の妊娠動物が含まれていた。成熟動物における1,2,4-TCBの推定摂取量は、雄で2.5、8.9および33 mg/kg 体重/日、雌では3.7、14.8および53.6 mg/kg 体重/日であった。

受胎能、成長、生存率、自発運動および血液化学的検査の結果に、投与の影響は認められ

なかった。また、腎臓および肝臓に、組織学的変化は認められなかった。

400 ppm(雌では 53 mg/kg 体重/日、雄では 33 mg/kg 体重/日に相当)の投与により、F₀および F₁の雌雄とも、95 日齢時に、副腎の絶対重量および相対重量の統計学的に有意な増加が認められた。なお、摘出されたのは左側の副腎のみであり、副腎の組織学的検査は行われていない。

副腎の肥大の原因を検討するため、離乳前のラットを用いた急性毒性試験が実施された。この試験では 1 群 9~10 匹の雌ラットを用い、22、23 および 24 日齢時に 0、250 または 500 mg/kg の 1,2,4-TCB を腹腔内投与した。25 日齢時に体重を記録し、断頭後、子宮、卵巣、肝臓、腎臓および副腎を摘出し、重量測定を行った。この結果、体重および子宮重量の減少、ならびに肝臓および副腎重量の増加が、用量依存性に認められた。子宮の相対重量については報告されていないが、3 群の平均値から相対重量には変化がなかったことが示唆される。したがって、この減少は、比較的高用量の腹腔内投与により生じた全身毒性に起因するものと考えられる。著者らは、副腎重量の増加について明確な説明を行っていないが、この試験では子宮重量の増加が認められなかったことから、エストロゲンが関連した可能性は除外している。また、1,2,4-TCB の急性投与によって副腎の肥大が起こったことから、長期的なストレスに起因する可能性も除外されると主張している。

Robinson et al.(1981)の試験において、副腎の肥大が観察されていることには、留意すべきである。離乳前の動物を曝露した試験は、これらのほかには行われていない。このため、副腎へのこのような影響が、この日齢で投与された場合にのみ生じる可能性を除外することはできない。したがって、母体毒性の発現によると断言することはできない。

400ppm を最高用量とした飲水投与では、ラットの受胎能に対する 1,2,4-TCB の影響はないものと考えられる。また、親動物の体重には影響が認められず、影響が認められたのは副腎重量のみであった。この試験の結果から、発生毒性および受胎能に関する NOAEL は 400 ppm であると結論される。この濃度は、雄では 33 mg/kg 体重/日、雌では 53 mg/kg 体重/日に相当する。

発生毒性試験

Sprague-Dawley 系の妊娠ラット(1 群 13~14 匹)を用い、妊娠 6 日~15 日に、コーン油に懸濁した 1,2,4-TCB を 0、75、150 および 300 mg/kg の用量で強制経口投与した(Black et al., 1988)。これらの動物のうち分娩が認められるのは、各群 10~12 匹であった。先に行われた用量設定試験では、600 mg/kg 体重/日の用量で母動物の死亡例が認められた。この試験で観

察された母体毒性は、同時に試験が行われた 1,3,5-TCB および 1,2,3-TCB に比べ、1,2,4-TCB で最も明確に認められた。1,2,4-異性体について選択された用量は 75、150 および 300 mg/kg であり、その他の 2 種の異性体については 150、300 および 600 mg/kg の用量が用いられた。母体体重は、1,2,4-TCB の高用量群で減少が認められたが、有意な減少ではなかった。その他の母体毒性の外部徴候は認められなかった。

剖検により、150 mg/kg 投与群の母動物に肝臓の軽度の変化(門脈周囲の細胞質の好酸性化および肝細胞核の軽度の大小不同)が認められた。このような影響に加え、300 mg/kg 投与群で肝臓の相対重量に 5.7%の有意な増加が認められ、肝臓の絶対重量も有意に増加したが、その他の臓器重量は統計学的に正常値を示した。また、300 mg/kg 投与群では、甲状腺の変化も観察された。これらの影響は、母体毒性の発現によるものと考えられる。

血液学的検査および臨床化学的検査では、150 mg/kg 体重/日以上用量群で、ヘモグロビン値およびヘマトクリット値の有意な低下、ならびに肝臓のタンパク質含有量およびアミノピリン-N-デメチラーゼ活性の有意な増加が認められた。

中用量群で、胎仔の眼の水晶体に、組織学的な病変が認められた。この影響は、他の 2 つの投与群では認められなかった。眼における変化は中心部で見られ、膨化および顆粒変性を伴う細胞の配列の乱れおよび解離が認められた。著者らは、この所見は初期の白内障の進行を示すものであろうと解釈している。しかし、これらの所見の発生率または重症度に関するデータは示されていない(同試験で検討された 1,3,5-TCB でも、3 用量の全群において、同様の影響が認められた)。著者らは、自己融解および不適切な保存が原因で、他の胎仔組織の病理組織学的検査がより困難であったことに注意を向けている。このため、眼における所見の妥当性には疑義がある。

著者らは、「この試験で検討したトリクロロベンゼン異性体のいずれにおいても、催奇形性または胎仔毒性作用は認められなかった」と結論している。

この試験における母動物の NOAEL は、75 mg/kg 体重/日である。胎仔の NOAEL については、中用量群の胎仔で観察された眼の病変の意義によるが、眼へのこの影響は被験物質に関連したものではないと考えられる。したがって、胎仔における NOAEL は、300 mg/kg 体重/日とする。しかし、用量依存性は認められないものの、胎仔の眼にみられた影響が被験物質に関連したものである可能性、および中用量のみで生じる可能性を完全に除外することはできない。これに基づくと、母動物および胎仔のいずれにおいても、NOAEL を 75 mg/kg 体重/日とすることができる。

Sprague-Dawley 系の妊娠ラット(1 群 6 匹以上)を用い、妊娠 9 日～13 日に、1,2,4-TCB を 0、

36、120、360 または 1,200 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与した (Kitchin and Ebron, 1983)。動物は妊娠 14 日に屠殺され、母動物の肝臓への影響および生殖への影響の有無が評価された。

母体毒性の最初の徴候(肝酵素誘導)は、120 mg/kg 体重/日の用量で観察された。360 mg/kg 体重/日では、母動物の体重増加量が減少し、死亡率がわずかに増加した(2/9)。1,200 mg/kg 体重/日投与群の母動物はすべて、試験期間中に死亡した。

この論文では催奇形性に関しては、対照群および 360 mg/kg 体重/日投与群(各群 12 匹)のデータのみが示されている。360 mg/kg 投与群では、胚の発生遅延(頭長短縮、頭臀長短縮、中胚葉体節数の減少およびタンパク質含有量の減少)が認められた。胚吸収率、生存胎仔数および奇形発生率については、対照群との差は認められなかった。

360 mg/kg 体重/日の用量で胎仔に対する影響が認められたことから、母体毒性が発現する用量で 1,2,4-TCB の胎仔毒性が発現することが示唆される。

この試験の結果から、母動物における NOAEL は 36 mg/kg 体重/日とすることができる。

Chernoff and Kavlock(1983)は、催奇形性試験系の妥当性検証の一環として、CD-1 妊娠マウス(1 群 25 匹)に、1,2,4-TCB を 0 mg/kg ないしは 130 mg/kg 投与した。1,2,4-TCB は、妊娠 8 日~12 日に、コーン油に懸濁して強制経口投与された。この結果、1,2,4-TCB による胎仔への影響は認められなかった。この試験では、母体の最小毒性量(MTD)と同量またはそれに近い用量で被験化合物が投与された。

内分泌かく乱作用

1,2,4-TCB の代謝過程において、2,4-ジクロロフェノールが生成される。後者は、環境ホルモンとして疑われている化学物質である。OECD の提言(1996)に従い、化学物質およびその分解産物の内分泌かく乱作用の有無を検討しなければならない。

化学物質の内分泌かく乱作用を予測するため、QSAR(定量的構造活性相関)という手法が開発されている。Mekenyan et al.(1998)は、エストロゲン受容体リガンドとして挙動する可能性を判断するためのアルゴリズムを開発した。1,2,4-TCB はエストロゲン受容体に結合しないと予測されることから、エストロゲン様作用を示さないと考えられる(Mekenyan, 1998)。

Walker(1998a)は、内分泌かく乱物質のスクリーニングおよび検査用に、化学物質を迅速に分類し、優先順位を付けるツールを開発した。これには、HQSAR(Hologram QSAR)に関する

るデータが含まれている (Tong et al., 1998; Waller, 1998)。1,2,4-TCB の HQSAR は-1.84 であり、これは、エストロゲン受容体への結合親和性が低いことを示している。因みにエストラジオールの HQSAR は、2.41 である (Walker, 1998b)。

上述の Robinson et al. (1981) の試験では、離乳前のラットに 1,2,4-TCB を腹腔内投与したが、子宮重量の増加は認められなかった。これにより、被験物質はエストロゲン様作用を有さないことが示唆される。しかしながら、これらの動物における副腎重量の増加に関しては全く説明がついておらず、他の内分泌ホルモンに関する変化がある可能性は残っている。

1,2,4-TCB のアンドロゲン様作用、抗アンドロゲン作用および細胞毒性作用についても、*in vitro* で検討されている (Vinggaard, 1999)。

Vinggaard et al. (1999) が記述した方法で、アンドロゲン受容体アッセイが実施された。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を 1 ウェルあたり 5,000 個の密度で播種し、翌日、0.5、2.5、5、25 および 50 μM の 1,2,4-TCB 存在下で培養した。抗アンドロゲン活性の測定に際しては、R1881 (0.1 μM) を添加した。被験化合物の添加直後に、各ウェルに対し、ヒトアンドロゲン受容体 (pSVAR0) およびルシフェラーゼレポーター遺伝子 (MMTV-LUC) の発現ベクターからなる DNA 50 ng により、非リポソームタイプのトランスフェクション試薬である FuGene を用いて、トランスフェクションを施した。24 時間の培養後、細胞を融解し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。

AlamarBlue を用い、細胞毒性作用の試験も行った。CHO 細胞に所定濃度の化合物を添加して 24 時間培養した後、記述のとおり (Vinggaard et al., 1999)、AlamarBlue の還元度を測定することにより細胞数を求めた。このアッセイは、AlamarBlue 色素が代謝還元されて蛍光種が生成されることを利用したものであり、還元色素を励起波長 560 nm、発光波長 590 nm で検出する。

上述のアッセイにおいて、50 μM までの 1,2,4-TCB では、影響は認められなかった。

生殖毒性についての結論

亜慢性および慢性毒性試験における生殖器官の所見には一貫性がみられないが、1,2,4-TCB が生殖能に有害な影響を及ぼす可能性を除外できない。

受胎能や発生毒性に関する情報が得られた試験は、現行の OECD 試験ガイドラインの要件を満たしていない。これらの試験の不十分な点は、以下のとおりである。

Robinson et al.(1981)による2世代試験では、親動物の体重に影響がみられなかったことから、設定用量が低過ぎたと考えられる。しかし、NOAELは33~53 mg/kg 体重/日以上であることが示された。ただし、得られた情報からは、生殖毒性のLOAELを確定することはできない。

Black et al.(1988)による催奇形性試験では、1群10~12匹の動物を使用した。300 mg/kg 体重/日投与群における母動物の体重増加の減少はわずかであったが、600 mg/kg 体重/日投与群では全例が死亡した。150 mg/kg 体重/日投与群では、若干の影響(軽度の肝臓の変化および血液学的変化)が認められた。胎仔の眼に対する影響はこの用量群でのみ認められ、用量依存性はみられなかった。母動物については、NOAELを75 mg/kg 体重/日に確定できる。上述の中用量群における胎仔に対する影響が被験物質に関連したものであるとみなされた場合、NOAELは75 mg/kg 体重/日であるが、被験物質に関連しないとみなされた場合は、NOAELは300 mg/kg 体重/日である。

Kitchin and Ebron(1983)による試験では、投与期間が妊娠9日~13日までと短く(OECD TG 414における妊娠6日~15日と比較して)、動物の屠殺は妊娠21日ではなく14日に行われた。設定用量で母動物の体重増加の減少は認められたが、投与期間が短く早期に屠殺が行われたため、奇形についての評価を適切に行うことができない。したがって、この試験によって確定できるのは、LOAELが360 mg/kg 体重/日以下であるということだけである。

Chernoff and Kavlockによる試験では、検知し得る胎仔への影響は認められなかった。しかし、この試験は、単回投与によるスクリーニング試験にすぎない。

ここに示されたデータは、生殖毒性に関する分類の必要性を示すものではない。しかし、より高用量の投与が行われていれば、生殖(受胎能および発生)への影響が観察された可能性がある。軽度の母体毒性があっても、生殖毒性に関する分類を必要とさせる様な影響が認められる可能性を無視することはできない。

生殖毒性試験に関して得られた情報も、LOAELまたはNOAELを確定するには不十分な点が多い。

いずれの亜慢性または慢性毒性試験においても、NOAELの設定に十分な根拠が得られていない。Robinsonによる2世代試験に基づいて、胎仔への影響のNOAELは33 mg/kg 体重/日以上とされるが、LOAELを確定することはできなかった。発生毒性については、眼に対する影響に基づき、胎仔におけるNOAELを75 mg/kgと算出することができる。しかし、この影響は被験物質に関連しないものと考えられ、この影響を無視した場合は、NOAELは300 mg/kgとなる。

EURAR V26: 1,2,4-trichlorobenzene

上記のように、ここに示された試験には不十分な点はあるが、追加の生殖毒性試験は不要であると考えられる。

1,2,4-TCB には、エストロゲン様作用または抗アンドロゲン作用は認められない。