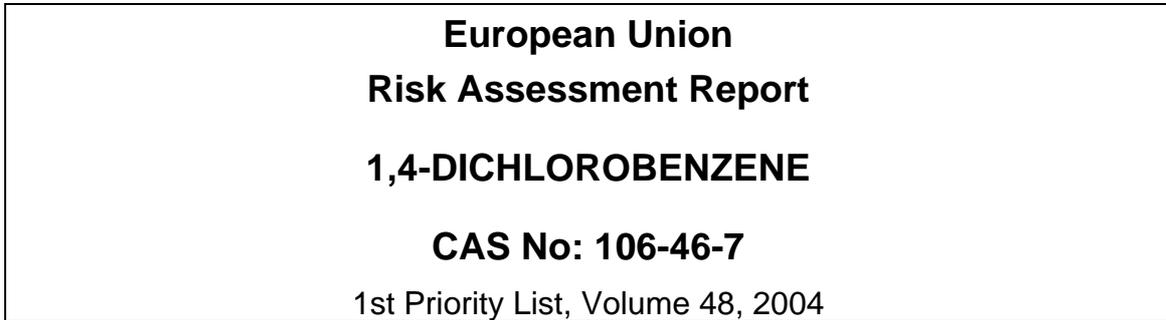
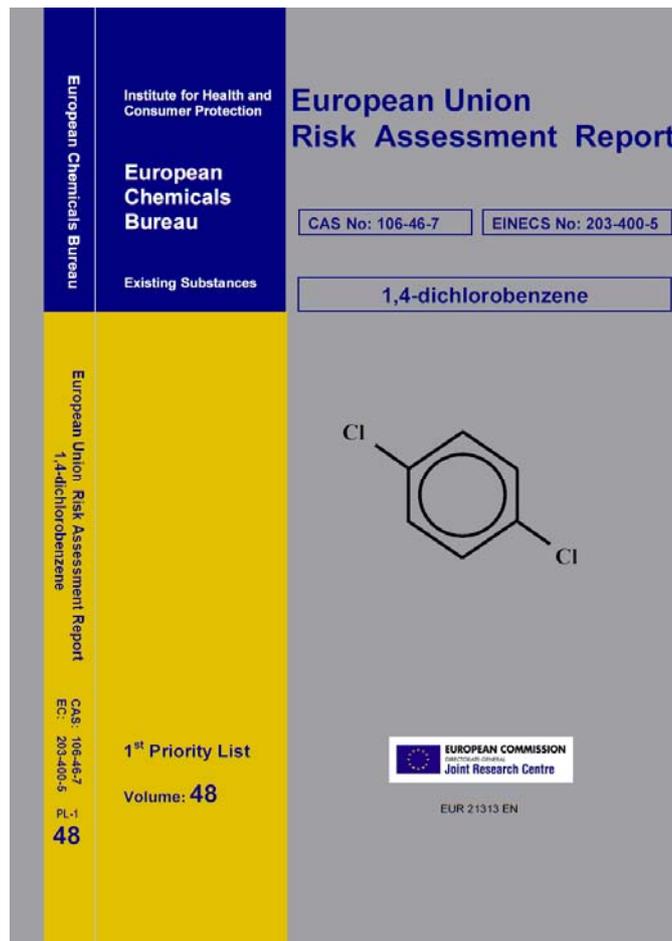


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 48, 2004)
1,4-ジクロロベンゼン



国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2013年8月

本部分翻訳文書は、1,4-dichlorobenzene (CAS No: 106-46-7)に関するEU Risk Assessment Report, (Vol. 48, 2004)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/14dichlorobenzenerereport001.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

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 動物における試験

1,4-ジクロロベンゼンのトキシコキネティクスは、F344 ラット、SD ラットおよび B6C3F1 マウス(経口および呼吸器経路)、Wistar ラットおよびウサギ(経口経路)ならびに SD ラット(皮下経路)を用いた試験で検討されている(Hawkins, 1980; Azouz, 1955; Kimura, 1979; Wilson, 1990; Hissink, 1996b; HRC, 1976)。F344 ラットおよび B6C3F1 マウスにおける経口および吸入曝露試験で、1,4-ジクロロベンゼンのトキシコキネティクス、生体内変化および分布に関して大きな差が認められたのは、吸収率であった。

¹⁴C-1,4-ジクロロベンゼンの分布および動態が、雌雄の F344 ラットおよび B6C3F1 マウスを用いた経口および吸入曝露試験により検討されている。ラットにおける経口曝露試験は、149 mg/kg/日および 305 mg/kg/日の単回投与、ならびに 309 mg/kg/日の反復投与により、吸入曝露試験は、雄ラットでは 160 ppm および 502 ppm、雌ラットでは 161 ppm および 496 ppm の用量で実施された。マウスにおいては、310 mg/kg/日および 638 mg/kg/日による単回経口曝露試験、および、158 ppm および 501 ppm による吸入曝露試験が実施されている。また、雄ラットに 216 mg/kg/日および 217 mg/kg/日を静脈内投与した血中動態試験(Wilson, 1990)、SD ラットに 250 mg/kg/日を 1 日 1 回、10 日間皮下注射した分布試験が行われている。さらに、SD ラットに 250 mg/kg/日を 1 日 1 回、10 日間経口投与、および SD ラットに 1,000 ppm を 1 日 3 時間吸入させた代謝試験(HRC, 1976)も実施されている。他にも、雌の CFY ラットに ¹⁴C-1,4-ジクロロベンゼン 250 mg/kg/日を 5 日間経口投与、または 1,000 ppm を 1 日 3 時間、10 日間にわたり全身曝露により吸入させた試験(Hawkins, 1980)が報告されている。

1,4-ジクロロベンゼンは、消化管および気道から不完全ながら速やかに吸収され、また、皮下吸収も認められた。また、吸入による吸収は、経口に比べ不良であった。B6C3F1 マウスは、吸入曝露では F344 ラットに比べ高い吸収率を示したが(マウスで 59%であったのに対

し、ラットでは 25～33%)、経口曝露では F344 ラットと同等の吸収率であった(単回投与時:ラットで 72%、マウスで 71%、反復投与時:ラットで 62%) (最終曝露後 7 日間採集された試験料で検討) (Wilson, 1990)。用量、投与回数および性別による吸収量への影響は、ほとんど認められなかった。動物における経皮吸収に関する報告は得られていないが、皮膚からの吸収が起こる可能性を除外することはできないと考えられる(4.1.2.2 項および 4.1.2.6.1 項を参照のこと)。

F344 ラットおよび B6C3F1 マウスを用いた強制経口投与試験、ならびに雄の F344 ラットを用いた静脈内投与試験では、次の結果が得られた。経口投与してから血中濃度が最高に到達するまでの時間は、1 時間であった。分布半減期は、静脈内投与されたラットで 4 分、経口投与されたラットでは 3.5 時間であった。また、組織中濃度は、経口および吸入曝露後 6 時間で最高値に達した(Wilson, 1990)。さらに、経口投与および皮下投与 24 時間後の血漿中濃度は、同程度であったと報告されている(HRC, 1976)。

1,4-ジクロロベンゼンは、主として脂肪組織、腎臓、肝臓、肺、性腺および筋組織に分布することが示されている。経口、吸入および皮下のいずれの曝露経路においても、同様の組織分布が認められ(HRC, 1976)、脂肪中にはより高濃度の 1,4-ジクロロベンゼンが検出された(Hawkins, 1980)。SD ラットにおいては、吸入、経口および皮下曝露後の組織中濃度は、いずれも同程度であった(HRC, 1976)。F344 ラットを 500 ppm で 24 時間全身吸入曝露した試験では肝臓中濃度は雌の方が雄に比べ高値を示したが、腎臓中濃度は雄の方が高かった(Umemura et al., 1990; 1992)。雄の F344 ラットを 160 ppm または 502 ppm で 6 時間吸入曝露した試験では、腎組織中濃度の変化は両群で類似しており、投与後 1～3 日に、血中濃度に対する腎臓中濃度の比に増加が認められたことが報告されている(このような所見はマウスや雌ラットでは観察されていない)(Wilson, 1990)。また、雌の SD ラットにおいては、1,000 ppm(約 6 mg/L)を 1 日 3 時間で 10 日間吸入させた場合、または 250 mg/kg/日を 10 日間経口または皮下経路により投与した場合、いずれも組織中 1,4-ジクロロベンゼン濃度は同程度であった(Hawkins, 1980)。

侵入経路にかかわらず、1,4-ジクロロベンゼンは、主として、水酸化を経て 2,5-ジクロロフェノールの硫酸およびグルクロン酸抱合体へと代謝されるが、遊離型の 2,5-ジクロロフェノール(2,5-DCP)および 2,5-ジクロロヒドロキノン(2,5-DCHQ)にも代謝される。なお、1,4-ジクロロベンゼンの代謝には、動物種差が認められている(下述の結果は放射能回収率で示している)。

- F344 ラット：経口および吸入曝露した場合の尿中主要代謝物は、2,5-DCP の硫酸抱合体であり(30%および 20%が硫酸抱合体型、6%がグルクロン酸抱合体型、4%未満が遊離型の 2,5-DCP)、反復経口曝露した場合には、グルクロン酸抱合の増高(3 倍)および遊離型

2,5-DCP の減少が認められた(吸入曝露時にはこのような所見はみられなかった)。また、吸入曝露では、投与量の大半が、硫酸抱合体(20%)、グルクロン酸抱合体(2~6%)および遊離型 2,5-DCP(0.6~2.5%)として排泄された(Wilson, 1990)。また、F344 ラットを単回経口曝露した試験で、少量の 2,5-DCHQ(1.1~1.4%)および 1,4-ジクロロベンゼンメルカプツール酸[2-(N-アセチルシステイン-S-イル)-1,4-ジクロロベンゼン](0.4~1.4%)および 1,4-ジクロロベンゼンメルカプツール酸[(N-アセチルシステイン-S-イル)-2,3-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-1,3-ヒドロキシ-1,4-ジクロロベンゼン]、ならびにモノクロロフェノールのメルカプツール酸抱合物(3,4-エポキシド結合を介して生成)が、尿中に検出されている(Klos, 1994)。

- SD ラット：経口および吸入曝露後の尿中代謝物は、50%が硫酸抱合体、30%がグルクロン酸抱合体であり、微量の 2,5-ジクロロベンゼンメルカプツール酸および 2,5-DCHQ が認められた(Hawkins, 1980)。また、ジクロロカテコールおよび遊離型 2,5-DCP も検出されている(HRC, 1976)。
- Wistar ラット：単回経口曝露後の尿中代謝物には、硫酸抱合体が 50~60%、グルクロン酸抱合体が 20~30%、遊離型 2,5-DCP が 5~10%、エポキシドから生成された 2,5-ジクロロベンゼンメルカプツール酸が 10%含まれていたが、2,5-DCHQ は認められなかった(Hissink, 1996b)。また、別の単回経口曝露試験で、少量の 2,5-ジクロロフェニル-メチルスルホキシドおよび 2,5-ジクロロフェニル-メチルスルホンが検出されている(Kimura, 1979)。
- B6C3F1 マウス：経口もしくは吸入曝露の場合、高用量ではグルクロン酸抱合体の割合が増加し、尿中には、2,5-DCP の硫酸およびグルクロン酸抱合体は同等に排泄され(それぞれ 25~30%)、遊離型 2,5-DCP での排泄は 6~9%であった。(吸入曝露では 2,5-DCP の増加も認められた)(Wilson, 1990)。

F344 ラットおよび B6C3F1 マウスでは、クロマトグラムが類似しており、このほかにもピークが観察されているが、2,5-ジクロロフェニル-メチルスルホキシドおよび 2,5-ジクロロフェニル-メチルスルホンである可能性が示唆されるものの、正確な同定や定量は行われていない(これらのピークの合計値は投与量の 5~21%であるが、個々の値は投与量の 5%未満)(Wilson, 1990; Kimura, 1979)。

ウサギにおける主要代謝物は、2,5-DCP の抱合体(60%)であり、遊離型 2,5-DCP(35%)および 2,5-DCHQ(6%)も生成されるが、メルカプツール酸およびカテコール化合物は検出されていない(Azouz, 1955)。

SD ラットでは腸肝循環が認められ、吸入(1,000 ppm)、経口(250 mg/kg)および皮下(250

mg/kg) 経路による単回投与後、24 時間で、各投与量の約 50% (それぞれ 48%、63% および 46%) が胆汁中に排泄された (糞中への排泄はそれぞれ 0.1% 未満、9% および 0.1% 未満であった) (HRC, 1976)。また、Wistar ラットに 250 mg/kg を単回強制経口投与した試験でも、投与した放射活性の 10~30% が胆汁中に検出されたが糞中には 5% 未満であったことから、腸肝循環がかなり関与していることが示唆されている (Hissink, 1996b)。胆管の膵液には、1,4-ジクロロベンゼンの影響は認められなかった (Holtzman ラット、5 mmol/kg、腹腔内投与) (Yang, 1979)。

Table 4.12 Species specific metabolism of 1,4-dichlorobenzene (results in percentage of recovered activities)

| Strains | Sulphoconjugates of 2,5-DCP | Glucuroconjugates of 2,5-DCP | Free DCP | DCHQ | Mercapturic acids | Methylsulphone methylsulphoxide |
|-------------|-----------------------------|------------------------------|----------|--------|-------------------|---------------------------------|
| F344 rats | 20-30% | 6% | < 4% | <1,4% | < 1,4% | traces? |
| SD rats | 50% | 30% | traces | traces | traces | ? |
| Wistar rats | 50-60% | 20-30% | 5-10% | 0 | 10% | traces? |
| B6C3F1 mice | 25-30% | 25-30% | 6-9% | ? | ? | traces? |

1,4-ジクロロベンゼンの排泄経路および排泄率は、F344 ラットおよび B6C3F1 マウスで同様であった。

SD ラットにおいては、吸入、経口および皮下投与後 5 日間で、97.4%、97.1% および 90.5% (平均値) が、尿中に排泄された (HRC, 1976)。

吸収された ^{14}C -1,4-ジクロロベンゼンは、経口曝露の場合の方が、吸入曝露の場合に比べ、より良く排泄された。詳細には、経口曝露の場合、Wilson (1990) の試験では、F344 ラットおよび雄の B6C3F1 マウスにおける投与後 7 日までの平均累積排泄率は、投与量の 80~99% であり、うち 55~70% が尿中、8~15% が糞中、10~12% が呼気中にであった。また、Klos (1994) の試験では、投与後 72 時間採集した尿に 38~42% が認められた。一方、吸入曝露の場合、投与後 7 日間の平均累積排泄率は、F344 ラットで 35%、雄の B6C3F1 マウスで 55% であり、ラットで 18~32% およびマウスで 32~47% が尿中、ラットで 2% およびマウスで 6~19% が糞中であった。 ^{14}C -1,4-ジクロロベンゼンの尿中排泄率には、用量による有意な影響は認められず、経口および吸入曝露後の排泄経路は、質的には同等であった。主要排泄経路は尿中であり (80% 超)、糞中 (3~11%) および胆汁中にも排泄されやすいと考えられる (HRC, 1976; Wilson, 1990; Hissink, 1996b; Hawkins, 1980)。SD ラットでは、経口経路で 87%、吸入経路で 73%、皮下経路では 41% が尿中に排泄されたのに対し、同一の経路における糞中排泄はそれぞれ、わずか 1.9%、2.5% および 0.1% であった (HRC, 1976)。強制経口投与後の肺からの排泄については、すべての用量で 1% 未満であったことが 2 つの試験で報告されている [Wistar ラットに 10~250 mg/kg/日 を投与した試験 (Hissink, 1997a)、雌の CFY ラット

に 250 mg/kg/日を投与した試験(Hawkins, 1980)]。しかし、Wilson(1990)が行った経口投与試験では、最大で投与量の 12%に及んでいる(F344 ラットに 149 mg/kg および 305 mg/kg、B6C3F1 マウスに 638 mg/kg を単回投与)。

投与した 1,4-ジクロロベンゼンの大半は、48 時間以内に尿中および糞中に排泄される。排泄動態は、二相性を示し、消失半減期は、経口投与の場合、 α 排泄相で 0.4 日、 β 排泄相で 10 日であり、静脈内投与の場合、0.67 日である。CFY ラットにおいては、 ^{14}C -1,4-ジクロロベンゼン 250 mg/kg/日を 5 日間経口投与した場合も、1,000 ppm を 1 日 3 時間で 10 日間吸入させた場合(雌のみを用いた試験)も、腎臓およびその他の組織における排泄動態は、同等と思われた(Hawkins, 1980)。また、排泄動態は、用量、投与経路および動物種によらず、同等と思われた。ただし、雄ラットでは、雌ラットまたは雄マウスに比べ、腎臓における排泄が緩徐であり、さらに、マウスにおける尿中排泄率が、吸入 6 時間後において 2 倍の高値を示した(24 時間後には同等)(Wilson, 1990)。投与 7 日後、組織または血液試料中に認められた放射能は、投与量の 0.1%未満であった(Wilson, 1990)。F344 ラットでは、投与(500 ppm の蒸気を 6 時間、12 時間または 24 時間吸入)後 24 時間で、1,4-ジクロロベンゼンの組織中濃度が 90%減少した(Umemura et al., 1990)。SD ラットを用いた 10 日間反復投与試験では、1,4-ジクロロベンゼンの組織中濃度が検出限界未満となったのは、経口投与(250 mg/kg/日)では 120 時間(5 日)後、皮下投与(250 mg/kg/日)では 192 時間(8 日)後、吸入投与(1,000 ppm、1 日 3 時間)では 96 時間(4 日)後であった(HRC, 1976)。Wistar ラットにおいては、単回経口投与の 4 日後に血漿および組織中に検出された 1,4-ジクロロベンゼンおよび 2,5-ジクロロフェノールはごく微量であり、5 日以内に完全に排泄されることが示されている。加えて、混餌により反復投与(28 日間)した場合には、投与後 35 日において、血漿、肝臓、腎臓および脂肪中に 1,4-ジクロロベンゼンや 2,5-DCP の残留は認められなかった(Schmidt, 1977a)。また、Wistar ラットでは、吸入または経口曝露による 1,4-ジクロロベンゼンの蓄積は起こらないものと考えられる(Schmidt, 1977a,b; HRC, 1976)。

lin vitro 試験

1,4-ジクロロベンゼンの代謝は、F344 ラット、SD ラットおよびヒトのいずれの肝薄切標本においても、定量的および定性的に類似していることが報告されており、グルタチオン/システイン抱合体が主要代謝物として検出されたほか、グルクロン酸および硫酸抱合体も認められている(Fisher, 1995, 1991b, 1990)。

Wistar ラット肝ミクロソーム中では、1,4-ジクロロベンゼンは 2,5-DCP(およびこれより少量の 2,4-ジクロロフェノール)に代謝される。これらは容易に酸化されてヒドロキノン誘導体(すなわち、2,5-DCHQ)となり、さらに酸化を受けてジクロロベンゾキノン化合物(ならびに

3,5-ジクロロカテコールおよび少量の 1-ジクロロベンゾキノン)が生成される (Den Besten et al., 1992)。

In vitro (ミクロソーム)における 1,4-ジクロロベンゼンの変換率は、F344 ラットおよび Wistar ラットで 1.3%、SD ラットで 0.6%、ヒトで 0.3%であり、それに比べ、B6C3F1 マウスでは、はるかに高値(16%)を示した (Hissink, 1997b, 1996a)。ラット肝ミクロソームでは、1,4-ジクロロベンゼンのエポキシドの GSH 抱合体(内在性グルタチオン由来)が認められ、外因性グルタチオン由来の GSH 抱合体と併せると、変換総量の 40~50%を占めた。マウスおよびヒトの肝ミクロソームでは、それぞれ、2%、6%であった(なお、内在性グルタチオン由来の GSH 抱合体は、ラット肝ミクロソームで変換総量の 5~15%、マウスおよびヒトの肝ミクロソームでは不検出)。サイトゾルの添加による、これらの GSH 抱合体生成に対する影響は、ラットおよびマウスの肝ミクロソームではわずかであったのに対し、ヒトの肝ミクロソームでは生成の大幅な増加(6~43%)が認められた。ヒドロキノン代謝物(HQ)(クロロヒドロキノンとして測定)の産生(変換総量に対する割合)を、異なる種/系統で比較すると、B6C3F1 マウスおよびヒトの肝ミクロソームでは同等(16%)、F344 ラットではこれより高値(27%)、SD ラットおよび Wistar ラットではこれより低値(10%)であった。還元剤であるアスコルビン酸(AA)(ヒドロキノンのベンゾキノンへの酸化を抑制)を添加することにより、すべての種の肝ミクロソームでヒドロキノン代謝物の回収率が増加[この影響はヒト肝ミクロソームの場合(変換総量の 28%)に比べ B6C3F1 マウス肝ミクロソームの場合(変換総量の 55%)で最も顕著に認められた]するとともに、共有結合の形成が減少した[マウス肝ミクロソームで 21%から 1.7%、ヒト肝ミクロソームでは 5.8%から 4.4% (このことから、ヒトではベンゾキノンが生成される可能性はあるが、非常に少量であると考えられる)]。

キノンのグルタチオン抱合体は、ラット肝ミクロソーム(3~22%)に比べ、ヒトおよび B6C3F1 マウスの肝ミクロソーム(それぞれ 26%および 39%)で比較的多く生成され、特にマウスで顕著に認められている。また、3 系統のラットを比較すると、キノンのグルタチオン抱合体生成量が最も多いのは、F344 ラットである。

いずれの種/系統においても、2,5-DCP への変換が 1,4-ジクロロベンゼンの変換総量の 60%超を占めており、ラットおよびマウス(27%および 35%)に比べ、ヒト(62%)で最も高値を示した (Hissink, 1997b)。

4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

1,4-ジクロロベンゼンは、消化管および気道から吸収されることが報告されているが、皮膚吸収に関するデータは得られていない (Pagnotto, 1965; Ghittori, 1985)。1,4-ジクロロベンゼン

は、主として脂肪組織に分布するが、肝臓および乳汁中にも認められる (Jan, 1983; Sumino, 1988)。排泄は、主に 2,5-DCP として、尿中へと為される〔偶発的に 1,4-ジクロロベンゼンを摂取した小児で、2,5-ジクロロキノールも検出されている (Hallowell, 1959)〕ほか、健常人を対象とした試験では、気道からの排泄も認められている (Wallace, 1989; Hill, 1989)。1,4-ジクロロベンゼンへの職業曝露を受けたヒト (製造業、包装業) において、勤務時間終了時に採取した抜き取り試料中の 2,5-ジクロロフェノールを測定した結果、排泄は曝露開始とともに始まり、約 8 時間で最高値に達した後、7 日間持続したことが示されている。このときの空気中の平均 1,4-ジクロロベンゼン濃度は 33 ppm であり、勤務時間終了時の尿中濃度の平均は 100 mg/L であった (Pagnotto, 1965)。

職業曝露例では、勤務時間開始から終了時までの間に排泄された 2,5-DCP の量は、曝露量と良好な相関を示し、約 10 ppm の曝露では、勤務時間終了時に尿中に排泄された 2,5-DCP の濃度は約 45 mg/L であった (Ghittori, 1985)。

米国に居住する成人 1,000 人から得た試料では、尿中に 2,5-DCP (最高値 8.7 mg/L、平均値 0.2 mg/L) が、血中に 1,4-ジクロロベンゼン (最高値 49 µg/L、平均値 2.1 µg/L) が検出されている (Hill, 1995)。

東京都市圏に居住し 1,4-ジクロロベンゼンへの曝露 (吸入および食物を介した摂取) を受けていた患者の試料中 (総合病院入院時に採取) で、脂肪組織中に平均濃度 2.3 µg/g、血液中に平均濃度 9.5 ng/mL の 1,4-ジクロロベンゼンが検出されている (この患者たちは、13~80 歳であり、環境曝露を受けたと考えられ、曝露濃度は屋外で 1.5~4.2 µg/m³、屋内で 105~1,700 µg/m³、であり、脂肪組織試料 34 例、血液試料 6 例が集められたが、試料採取日時は不明) (Morita, 1975a, b)。このときの脂肪組織サンプル中の濃度は、女性で 0.13 µg/g、男性で 0.11 µg/g、15~44 歳の患者では 0.13 µg/g であった [著者不明記 1990 (chemical regulation reporter 421)]。また、ユーゴスラビア人被験者 (1979~1980 年の交通事故死亡例) で、脂肪組織中の平均 1,4-ジクロロベンゼン濃度が 0.146 µg/g であったことが報告されており (Jan, 1983)、他の試験においても同等の値が得られている (Sumino, 1988)。

4.1.2.1.3 1,4-ジクロロベンゼンの作用機序

In vitro 試験

ヒトの肝臓切片標本を用いた *in vitro* 試験で、1,4-ジクロロベンゼン異性体は低毒性であり、P 450 阻害剤で前処置を行っても肝毒性に変化が認められなかったことが報告されている (Fisher, 1991a)。

Wistar ラットの肝ミクロソームを用いた試験で、1,4-ジクロロベンゼンの代謝物(反応性キノンは、ウシ胎仔血清の添加により、蛋白質との共有結合を示したが、DNA との結合はわずかしめ示されなかった。また、還元剤であるアスコルビン酸を添加することにより、この蛋白質結合はほぼ完全に阻害され、同時にクロロヒドロキノン類およびクロロカテコール類の生成が増加(35%から 61%)した (Den Besten et al., 1992)。

肝ミクロソーム蛋白質との共有結合量は、B6C3F1 マウス、SD ラット、Wistar ラット、F344 ラット、およびヒトの肝ミクロソームで、それぞれ変換総量の 21%、10%、8%、8%および 6%(生成された全代謝物の割合)であった。B6C3F1 マウス肝ミクロソームでは、還元剤であるアスコルビン酸(AA)(ヒドロキノン代謝物のベンゾキノンへの酸化を抑制)を添加することにより、共有結合が 21%から 1.7%までほぼ完全に抑制(92%抑制)されるとともに、ヒドロキノン代謝物の生成が増加し(マウスでは 16%から 55%に増加、340%増)、関連する反応性代謝物はベンゾキノンであることが示された。ラットにおいては、すべての系統のラット肝ミクロソームで、AA により共有結合が大幅に抑制され(SD ラットおよび F344 ラットで 33%、Wistar ラットで 80%)、ヒドロキノン代謝物の生成が 10~27%から 16~34%まで増加した (Hissink, 1997b)。さらに、ラットの全系統において、外因性グルタチオンを添加することにより、AA では抑制されなかった共有結合が阻害され、これと同時にエポキシドの GSH-抱合体の生成が増加した。ヒト肝ミクロソームでは、他の動物種に比べ共有結合の形成は最も少ないものの(6%)、同様に、AA により 6%から 4.3%まで抑制(25%抑制)されると同時にヒドロキノンの生成が増加し(16%から 28%)、マウスに比べると少ないが反応性代謝物(おそらくベンゾキノン)の産生があることが示された。さらに、外因性グルタチオンを添加することにより、AA では抑制されなかった共有結合が(検出限界以下まで)阻害され、エポキシドの GSH-抱合体の生成が増加した (Hissink, 1997b)。

肝臓の切片標本を用いた試験では、1,4-ジクロロベンゼンの反応性中間代謝物の共有結合量は、ヒトならびに SD ラットおよび F344 ラットの組織中で同程度(ラットで 8~10%)であった (Fisher, 1995)。In vitro の DNA 結合試験では、マウスおよびラットの肝臓および肺の画分とのインキュベーションにより、 $[^{14}\text{C}]$ -1,4-ジクロロベンゼンと仔ウシ胸腺 DNA との結合が認められたが、ラットおよびマウスの腎臓ならびにマウスの胃の画分では DNA 結合は認められなかった。他の試験では、ラット、マウスまたはヒトの肝ミクロソームとのインキュベーションを行っているが、DNA 付加体は検出されていない (Lattanzi et al., 1989; Tian 2001; Paolini, 1998) (4.1.2.7.1 in vitro 試験の項も参照されたい)。

In vitro においては、ヒト肝ミクロソーム中のシトクロム P 450 CYP2E1、および CYP1A1 が 1,4-ジクロロベンゼンに対して最も強い活性を示すことが報告されている (CYP1A1 の方が弱い) (Bogaards, 1995; Hissink, 1996b)。

In vivo 試験

雄の F344 ラットまたは SD ラットに、500 mg/kg の 1,4-ジクロロベンゼンを腹腔内投与して、肝毒性を検討した試験が行われている。1,4-ジクロロベンゼンは、肝臓のグルタチオンが枯渇したラットにおいてのみ、肝毒性(トランスアミナーゼの増加)を発現し、フェノバルビタールで前処置を行っても肝毒性に変化は認められなかった(Brodie, 1971)。一方、1,4-ジクロロベンゼンの肝臓蛋白質との共有結合量は、少量であることが示されている(Stine, 1991)。F344 ラットにおける単回経口投与(900 mg/kg)では、1,4-ジクロロベンゼンと腎臓、肺および脾臓の蛋白質との共有結合量は、検出限界を下回るものであった(Klos, 1994)。

In vivo においては、ラットでは、1,4-ジクロロベンゼンの DNA への結合を示す結果は得られていないが、マウスでは、1,4-ジクロロベンゼンと肝臓、腎臓、肺および胃の DNA との結合を示す結果がいくつか得られている(Lattanzi et al., 1989) (4.1.2.7.1 *in vivo* 試験の項を参照のこと)。

1,4-ジクロロベンゼンの c-fos、c-jun および c-myc の発現誘導活性、ならびに肝臓の標識指数(LI)を検討した試験が行われている。雄の F344 ラット(3 匹)に、コーン油を溶媒として、1,4-ジクロロベンゼンを 300 mg/kg 単回強制経口投与した。複数の動物で、LI の増加に先立ってこれら 3 種の遺伝子の発現が増高している細胞が認められ、c-myc の発現と LI との間に、良好な相関関係が認められた。また、*in situ* ハイブリダイゼーション解析により、c-fos および c-jun を発現した細胞は、肝葉全体にわたり不規則に分布するのに対し、c-myc 発現細胞は、主として肝葉の中心部に多く見られ、周辺部には少ないことが示された(Hasmall, 1997a)。

雄の F344 ラット(3 匹)に 1,4-ジクロロベンゼンを強制経口投与(コーン油を溶媒として、300mg/kg を 7 日間)し、肝細胞の倍数性、核性に関する影響、および倍数性/複数核性細胞を分類して、LI 分布に対する影響を検討した試験が行われている。1,4-ジクロロベンゼンの投与により、4 倍体細胞(4N および 2×2N)の割合が減少し、1 核 8 倍体細胞(8N)の割合が増加した。また、2 核 4 倍体細胞(2×2N)を除く、すべての倍数性/複数核性の肝細胞で、LI の増加が認められ、すなわち、1,4-ジクロロベンゼンの投与により、肝臓の平均 LI が増加するという結果が得られた(Hasmall, 1997b)。

雄の ddY マウスを用いた試験で、1,4-ジクロロベンゼン代謝物(1,4-ジクロロベンゼンのキノン体およびエポキシド体)の蛋白性または非蛋白性の S-付加体が、肝臓および尿中に確認されている。この試験では、マウスに、1,4-ジクロロベンゼンの経口投与(300 mg/kg)のみを、もしくは生理食塩液または BSO(グルタチオン合成阻害剤:ブチオニンスルホキシイミン)の腹腔内投与後 1 時間に 1,4-ジクロロベンゼンの経口投与(300 mg/kg)を行った。この試験

の結果から、肝臓蛋白質のチオール基との共有結合に關与するのは、1,4-ジクロロベンゼンのキノン体であり、エポキシド体ではないことが示唆された。1,4-ジクロロベンゼンと BSO を併用投与されたマウスでは、1,4-ジクロロベンゼンを単独投与されたマウスと対照的に、1,4-ジクロロベンゼンと肝臓蛋白質チオール基との共有結合量に増加は認められなかった。1,4-ジクロロベンゼンは、正常マウスに対しては肝毒性を示さず、BSO の投与により GSH が枯渇したマウスにおいてのみ肝毒性を発現させる。だが、上記の結果は、1,4-ジクロロベンゼンの肝臓蛋白質チオール基への共有結合が GSH 枯渇マウスにおける肝毒性発現機序であるとする見解と整合しない(Mizutani, 1997)。

SD ラットおよび C57 マウスに 1,4-ジクロロベンゼン 500 mg/kg を腹腔内投与した試験では、対照群およびフェノバルビタール処置群に肝毒性の発現はみられておらず、フェノバルビタール処置を行っても肝臓蛋白質との結合量の増加は認められなかった(Reid 1973a, b, c)。また、Wistar ラットを用い、最高用量を 250 mg/kg とし単回経口投与した試験でも、1,4-ジクロロベンゼンによる肝毒性は認められず、肝臓中のグルタチオン濃度への影響はほとんどみられなかった(50 mg/kg 投与群でわずかな GSH 低下が認められたのみ)。したがって、1,4-ジクロロベンゼンの代謝は、グルタチオンを捕捉するような代謝物の生成を介さないと考えられる(Hissink, 1996b)。

雄の ddY マウスを用いた試験により、内在性グルタチオンが、1,4-ジクロロベンゼンによる肝毒性に対して、保護作用を示すことが明らかにされている。この試験では、雄 ddY マウスに、グルタチオン合成阻害剤(ブチオニンスルホキシイミン:BSO)を腹腔内注射して前処置を施し、1,4-ジクロロベンゼン(100~400 mg/kg)を単回経口投与した。この結果、肝毒性(血清 ALT 活性の 100 倍上昇、肝臓の壊死)が用量依存的に認められたが、1,4-ジクロロベンゼンの単独投与(最高用量 1,200 mg/kg)では肝毒性は認められなかった。

マウスに GSH モノエチルエステルを投与した場合、1,4-ジクロロベンゼンと BSO との組み合わせによる肝毒性に対する保護効果が得られている。シトクロム P 450 依存性モノオキシゲナーゼ阻害剤を投与した場合にも、1,4-ジクロロベンゼンと BSO との組み合わせによる肝毒性に対する保護効果が得られることが示されている。これにより、シトクロム P 450 依存性の反応によって生成される代謝物が、1,4-ジクロロベンゼンの肝毒性の原因であることが示唆される。また、マウスにおいて、BSO の非存在下では肝毒性の徴候が認められなかったことから、この代謝物はグルタチオンにより無毒化されるものと考えられる。

一方、シトクロム P 450 依存性モノオキシゲナーゼの誘導剤を投与した試験では、1,4-ジクロロベンゼンと BSO との組み合わせによる肝毒性の増加は認められなかった。これは、誘導剤により、1,4-ジクロロベンゼン代謝の活性化経路だけではなく解毒経路も刺激されたためであると考えられる(Mizutani, 1994)。

ddY マウスに 1,4-ジクロロベンゼンを単独投与した試験では、肝臓のグルタチオン量に有意な変化は認められなかった。1,4-ジクロロベンゼンのキノン体代謝物が肝毒性に関与する可能性を検討する目的で、BSO で前処置したマウスに、2,5-DCP を経口または皮下投与する試験が行われたが、肝毒性の発現は認められなかった。この結果から、著者は、1,4-ジクロロベンゼンによる肝毒性へのキノン体代謝物の寄与について否定的であるが、*in situ* において肝臓で生成される 2,5-DCP の体内動態および代謝経路は、外部から投与した 2,5-DCP のものとは異なる可能性がある (Mizutani, 1994 の文献中でデータ引用)。また、ddY マウスに 1,4-ジクロロベンゼンと BSO を併用投与したとき、投与後 30 時間の間に、肝臓の過酸化脂質〔チオバルビツール酸 (TBA) 反応物質の測定により評価〕および蛋白質チオール含量に有意な変化は認められなかったことから、BSO との併用投与による肝障害が脂質過酸化反応と関連している可能性は低いと考えられる (Mizutani, 1994 の文献中でデータ引用。詳細は不明)。

2,5-DCP やメルカプツール酸のような化合物が、1,4-ジクロロベンゼンの代謝物として出現することは、肝毒性を仲介するとされている代謝中間体アレンオキシドが前駆物質として生成されることを示していると考えられる (Mizutani, 1994; Klos, 1994)。

以下の試験では、1,4-ジクロロベンゼンの投与により、シトクロム P 450 依存性モノオキシゲナーゼの誘導が観察され、用量依存性が認められている。雌雄の F344 ラットに、0、150 ないしは 600 mg/kg/日を、2、8、14 または 28 日間経口投与した試験 (Bomhard, 1992; Allis, 1992)。雄の F344 ラットに、75~300 mg/kg/日を、1、4 または 13 週間投与した試験 (Lake, 1997)。雌雄の CF1 マウスに、800 mg/kg/日を 2 または 4 週間経口投与した試験 (Bomhard, 1996)。ならびに、雄の B6C3F1 マウスに、600 mg/kg/日を 1、4 または 13 週間投与した試験 (この試験では 300 mg/kg では誘導認められていない) (Lake, 1997)。しかし、Wistar ラットに 250 mg/kg/日を 3 日間経口により前投与した試験 (Ariyoshi, 1975a, 1975b)、ならびにアルビノ系ラットに 0、10、20 ないしは 40 mg/kg/日を 90 日間経口投与した試験 (Carlson, 1976) では、シトクロム P 450 含量の増加は認められていない。

F344 ラットおよび B6C3F1 マウスを用いた *in vivo* 試験 (ラットでは 75 mg/kg/日ないしは 300 mg/kg/日、マウスでは 600 mg/kg/日を 1 週間投与) で、投与後、両者の肝ミクロソームで CYP2B の顕著な誘導がみられ、F344 ラットでは、これより軽度だが CYP3A 誘導も認められた (Lake, 1997)。

B6C3F1 マウスに 600、300 または 150 mg/kg/日の用量で、F344 ラットに 300、150 および 75 mg/kg の用量で、最長 4 週間反復投与した試験で、肝細胞の持続的な分裂応答の誘発が、累積複製分率 (cumulative replicating fraction CRF) を測定することにより検討されている。マウスでは、600 mg/kg 群で分裂応答が第 1 および 4 週にみられ、300 mg/kg 群では第 1 週に一過性に認められた (150 mg/kg 群では CRF の増加は認められなかった)。また、ラットにお

いても、300 mg/kg 群および 150 mg/kg 群の肝細胞で、第 1 週に一過性の CRF 増加が観察されている (Umemura et al., 1998)。

雄の B6C3F1 マウスに 1,4-ジクロロベンゼン (600、1,000 ないしは 1,800 mg/kg) を単回経口投与した試験では、肝毒性が認められなかったにもかかわらず、増殖刺激により、1,000 mg/kg/日群で肝細胞増殖が誘導された (Umemura et al., 1996)。

雄の B6C3F1 マウスに 1,4-ジクロロベンゼン (750 ないしは 1,500 mg/kg) を単回経口投与した試験では、投与 24 時間後および 48 時間後に、肝細胞の複製 DNA 合成が誘発された (Miyagawa, 1995)。

ラットおよびマウスに、最高用量を 1,200 mg/kg/日として 1,4-ジクロロベンゼンを単回経口投与した試験で、投与群に、肝細胞増殖および肝重量の増加が認められている (肝細胞壊死や肝酵素の上昇は生じなかった) (Eldridge et al., 1992; Butterworth, 1992)。

1,4-ジクロロベンゼンによる腎および肝細胞増殖の誘発について検討した試験が報告されている (Umemura et al., 1992)。この試験では、コーン油に溶解した 1,4-ジクロロベンゼンを、9 週齢の F344 ラット (1 群雌雄各 5 匹) に 0、150 または 300 mg/kg/日 (雄) もしくは 0、300 または 600 mg/kg/日 (雌) の用量で強制経口投与した。また、9 週齢の B6C3F1 マウス (1 群雌雄各 4 匹) にも、0、300 または 600 mg/kg/日の用量で、コーン油に溶解した 1,4-ジクロロベンゼンを 4 日間強制経口投与した。投与期間の最後の 3 日間は、すべての動物に、ブロモデオキシウリジン (BrdU, 20 mg/kg) を 1 日 3 回腹腔内投与した。投与期間終了後に、各個体から腎臓および肝臓を摘出した。尿細管の各部位の γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性を検討した結果、遠位尿細管には同活性は認められず、近位直尿細管で、近位曲尿細管に比べはるかに高い活性が認められた。DNA への BrdU の取込みの有無は免疫組織化学的手法により検討し、個体ごとにそれぞれ 3,000 個以上の肝細胞核および尿細管細胞核を計数した。4 日間の投与期間を設けたことにより、投与期間中に増殖細胞の分裂が起こり、2 つの娘細胞の核はいずれも標識される。この標識細胞の割合を、CRF とした。

腎臓においては、300 mg/kg/日の 1,4-ジクロロベンゼンを投与した雄ラットの近位曲尿細管細胞および近位直尿細管細胞で、CRF の有意な増加が認められた。増加の程度は近位直尿細管細胞の方が軽度であり、0、150 および 300 mg/kg/日投与群における CRF は、近位曲尿細管細胞ではそれぞれ 2.19 ± 0.19 、 2.29 ± 0.29 および 6.53 ± 1.39 ($p < 0.01$)、近位直尿細管細胞では 2.07 ± 0.41 、 2.24 ± 0.65 および 3.48 ± 1.20 ($p < 0.05$) であった。なお、いずれの用量においても、雄ラットの遠位尿細管細胞の核には CRF の増加は認められなかった。また、雌ラットおよび雌雄のマウスでは、全用量群とも、尿細管のいずれの部位にも CRF の増加は認められていない。

肝臓においては、ラットおよびマウスの雌雄ともに、全用量群で CRF が統計学的に有意な増加を示し、用量依存性が認められた。

F344 ラットを用いた試験では、最高用量で 1 週間処置した群 (300 mg/kg/日) で、1,4-ジクロロベンゼンによる肝細胞の複製 DNA 合成の誘発が観察されたが、4 週間もしくは 13 週間処置した動物には認められなかった。B6C3F1 マウスにおいては、300 および 600 mg/kg/日投与群で、1 および 4 週間後に、肝細胞の標識指数の増加が認められている (Lake, 1997)。

B6C3F1 マウスの 600 mg/kg/日投与群の雌雄で、投与第 1 週に一過性の肝細胞増殖 (肝細胞壊死は認められていない) がみられたが、3、6 および 13 週間後には認められず、300 mg/kg/日投与群にも同所見はみられなかった。また、雌の F344 ラットにおいても、600 mg/kg/日投与群で第 1 週に同所見が認められた (3、6 および 13 週間後には認められなかった)。マウスおよびラットに 1,4-ジクロロベンゼンを 13 週間投与した試験では、投与期間を通じ、対照群と比較して肝酵素活性 (ALT、AST、LDH) の上昇は認められなかったが、肝重量はいずれの観察時点においても対照群に比べ有意な高値を示した (Eldridge et al., 1992; Butterworth, 1992)。

B6C3F1 マウス (600 mg/kg/日) および F344 ラット (300 mg/kg/日) に 2、4 または 5 日間強制経口投与したときの標識細胞の分布は、マウスでは主として小葉中心性であったのに対し、ラットでは汎小葉性に認められた (Eldridge et al., 1990)。また、雄ラットでは、近位尿管細胞の増殖も認められた (この所見は、雌ラットやマウスでは観察されていない) (Umamura et al., 1992; Eldridge et al., 1990; 1991)。

F344 ラットにおいて、1,4-ジクロロベンゼンは、発がん 2 段階モデルの中の、肝細胞増殖巢形成をプロモートしないことが、中期イニシエーション/プロモーション試験により示されている。この試験では、第 0 週に DEN (ジエチルニトロソアミン) の単回腹腔内投与によるイニシエーションを行い、2 週間後より 8 週間試験の終了まで、低用量の 1,4-ジクロロベンゼン (0.1 ないしは 0.4 mmol/kg/日 : 14.7 ないしは 60 mg/kg/日に相当) を 1 日 1 回強制経口投与してプロモーションを行った。第 3 週に部分肝切除を行なった。この結果、DEN によるイニシエーションの有無にかかわらず、細胞増殖巢のいかなるパラメータ (総面積および総数、ならびに大型増殖巢の面積および数) にも、1,4-ジクロロベンゼン投与による有意な影響は認められなかった (Gustafson et al., 1998)。

CF1 マウス (1 群雌雄各 5 匹) に 1,4-ジクロロベンゼン (0、50、200 および 800 mg/kg/日) を 2 週間または 4 週間経口投与した試験で、1,4-ジクロロベンゼンは肝臓におけるペルオキシソーム増殖を誘発しないことが示されている (屠殺時)。この試験では、肝臓のカルニチンアセチルトランスフェラーゼ活性およびペルオキシソームの数に、増加は認められなかった。

800 mg/kg/日投与群では、血漿中および肝臓中のコレステロール値およびトリグリセリド値は、対照群と同等もしくは高値を示した(減少は認められなかった)。同群では、第 2 および 4 週には、肝重量およびシトクロム P 450 活性の増加が認められている (Bomhard, 1996)。

雄の F344 ラットを用いた試験において、1,4-ジクロロベンゼンによる腎毒性発現機序が明らかにされている (Borghoff, 1990 and 1991; Charbonneau, 1989a, b and 1988; Dietrich, 1991; Lehman-McKeeman, 1993 and 1990)。詳細については、4.1.2.6 項を参照されたい。

F344 ラットおよび B6C3F1 マウスに 300 mg/kg/日および 600 mg/kg/日の 1,4-ジクロロベンゼンを経口投与した試験で、細胞の増殖とアポトーシスとの関連が検討された。この試験の結果、投与 2 日後、ラットおよびマウスのいずれにおいても DNA 合成の誘発が観察されたが、アポトーシス肝細胞の割合は有意に減少した(10 匹中 9 匹の動物で検出不能なレベルまで減少)。また、ウェスタンブロット法での解析により、マウスおよびラットの肝臓における CYP2B1/2 および CYP4A1 の発現量が増加したことが示されている (James, 1998)。

4.1.2.1.4 トキシコキネティクス、代謝、および分布についての要約

動物においては、1,4-ジクロロベンゼンは、完全にではないが消化管および気道から速やかに吸収され(投与後 1 時間で最高血中濃度に達する)、皮下吸収も認められた。吸収は、吸入曝露(マウスで 59%であったのに対し、ラットでは 25~33%)の場合、経口曝露(単回投与時:ラットで 72%、マウスで 71%、反復投与時:ラットで 62%)に比べ、不良であった。また、急性経皮毒性試験および経皮投与による反復毒性試験の結果から、経皮吸収は無視できる量であると考えられる。

ヒトでの吸収に関する定量的なデータは、得られていない。

F344 ラットおよび B6C3F1 マウスにおける経口および吸入曝露試験で、1,4-ジクロロベンゼンのトキシコキネティクス、生体内変化および分布に関して大きな差が認められたのは、吸収率であった。

1,4-ジクロロベンゼンは、経口、吸入および皮下のいずれの曝露経路においても同様に、主として脂肪組織、腎臓、肝臓、肺、性腺および筋組織に分布する。

In vivo では、曝露経路にかかわらず、1,4-ジクロロベンゼンは、主として 2,5-ジクロロフェノールの硫酸およびグルクロン酸抱合体へと代謝されるが、ラット、マウスおよびヒトでは遊離型の 2,5-ジクロロフェノールも検出されている。*In vivo* における 1,4-ジクロロベンゼンの代謝には、ラットとマウスとで種差が認められており、F344 ラットおよび SD ラット

で(おそらくヒトでも)認められる 2,5-ジクロロヒドロキノン、Wistar ラットにもマウスにも認められない。しかし、*in vitro* においては、B6C3F1 マウスおよび Wistar ラットの肝ミクロソーム中に 2,5-ジクロロヒドロキノンが検出されていることに注意が必要である (Hissink, 1997b; Den Besten et al., 1992)。

In vivo において、1,4-ジクロロベンゼンによる肝臓のシトクロム P 450 依存性モノオキシゲナーゼの誘導が、用量依存的に認められている。F344 ラットおよび B6C3F1 マウスで CYP2B (Lake 1997, James 1998)、F344 ラットではこのほかに CYP2A (Lake, 1997)、F344 ラットおよび B6C3F1 マウスで CYP4A (James, 1998)、ならびに Wistar ラットおよび B6C3F1 マウスで CYP2E1 (Hissink, 1997a) の誘導が観察されている。*In vitro* においては、ヒト肝ミクロソームで、1,4-ジクロロベンゼンにより、CYP2E1 (全 CYP 活性の 90%超) および CYP2A が誘導されることが報告されている (Bogaards, 1995)。

芳香環の水酸化により中間体エポキシドが生成されると考えられ、肝臓のシトクロム P 450 CYP2E1 を介して 2,3-エポキシド(さらに 2,5-または 2,4-ジクロロフェノールに代謝される)が、CYP2B を介して 1,2-エポキシド(さらに 2,4-ジクロロフェノールに代謝される)が生成される。

エポキシドの代謝経路は、動物種により異なると考えられる。エポキシドは、グルタチオン抱合を受けるか、エポキシド加水分解酵素の触媒作用によりジクロロフェノールに変換されるか、もしくは二次的にヒドロキノン代謝物に代謝される。グルタチオン抱合は、*in vivo* で Wistar ラット、F344 ラットおよび SD (CFY) ラットにおいて、*in vitro* でヒト、Wistar ラット、F344 ラット、SD ラット、および B6C3F1 マウスにおいて認められている。ジクロロフェノールへの変換は、*in vivo* でラット、マウスおよびヒトにおいて、*in vitro* でラット、マウスおよびヒトにおいて認められている。また、ヒドロキノン代謝物への変換は、*in vitro* でラット、マウスおよびヒトにおいて認められており、*in vivo* でも F344 ラット、SD ラット、ヒトにおいて可能性が示されているがマウスにおけるデータは得られていない。

ラット、マウスおよびヒトの肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験における主要代謝物は、ジクロロフェノール(50%)、ヒドロキノン代謝物(10~27%)、ならびにこれより少量のグルタチオン-エポキシドおよびグルタチオン-キノン抱合体である。以下のとおり、ラットとマウス(およびヒト)とで、肝ミクロソーム代謝が異なることが示されている[ただし、Fisher (1995) の試験では、SD ラット、F344 ラットおよびヒトにおいて生成される化学種およびその量は同等であった]。1,4-ジクロロベンゼンの変換量は、F344 ラット、Wistar ラット、SD ラットまたはヒトのミクロソームに比べ、B6C3F1 マウスのミクロソームではるかに高値を示した。ヒドロキノン代謝物の産生は、Wistar ラット肝ミクロソームに比べ、マウス、F344 ラットおよびヒトの肝ミクロソームで多くみられ、アスコルビン酸を添加することにより、

ヒドロキノン代謝物の回収率が増加するとともに蛋白への結合率が低下した。また、ラット肝ミクロソームでは、外因性グルタチオンを添加しない場合にも、グルタチオン-エポキシド抱合体が形成され、外因性グルタチオンを添加した場合には有意な増加を示した。それに対し、マウスおよびヒトの肝ミクロソームでは、同抱合体の形成は、外因性グルタチオンの存在下で非常に微量、外因性グルタチオン非存在下では不検出であった。

主要排泄経路は尿中(80%超)であり、糞中および肺からも排出されやすい。また、ラットでは、かなりの量の1,4-ジクロロベンゼンおよびその代謝物が腸肝循環を経るものと考えられる。生体内滞留時間は短く、投与量の大半が、投与後48時間以内に尿中および糞中に排泄された。1,4-ジクロロベンゼンの排泄経路および排泄率は、ラットおよびマウスで同様であり、経口投与時と吸入曝露時とでも同等であった。

ヒトにおいては、1,4-ジクロロベンゼンは、消化管および気道から吸収され、主として脂肪組織に分布する。主な排泄経路は尿中および気道であり、排泄は、約8時間後に最高となり、数日間継続してみられる。排泄された代謝物の多くは、2,5-ジクロロフェノールならびにその硫酸およびグルクロン酸抱合体であったが、2,5-ジクロロキノールも検出された。

In vitro における蛋白質との共有結合量は、ラットおよびヒトの肝ミクロソームに比べ、マウスで高値を示した。この蛋白結合は、還元剤であるアスコルビン酸を添加することにより抑制され、これと同時にヒドロキノンおよびその代謝物の生成が増加する。アスコルビン酸の添加により、蛋白結合は、マウスではほぼ完全に、ラットでは大幅に抑制されたが、ヒトにおける抑制はこれより軽度であった(このことから、ヒトでもベンゾキノンが生成される可能性はあるが、非常に少量であると考えられる)(Hissink, 1997b)。また、*in vitro* のDNA結合試験では、マウスおよびラットの肝臓および肺の画分とのインキュベーションにより、 $[^{14}\text{C}]$ -1,4-ジクロロベンゼンと仔ウシ胸腺DNAとの結合が認められたが、ラットおよびマウスの腎臓ではDNA結合は認められなかった。他の試験でも、ラット、マウスまたはヒトの肝ミクロソームとのインキュベーションが行われているが、DNA付加体は検出されなかった。

In vivo では、ラットおよびマウスに経口または腹腔内投与した試験で、1,4-ジクロロベンゼンと蛋白質との共有結合が認められている。腹腔内投与の場合、ラットでは、1,4-ジクロロベンゼンのDNAへの結合を示す結果は得られていないが、マウスでは、肝臓、腎臓、肺および胃における、1,4-ジクロロベンゼンのDNAへの結合を示す所見が得られている。

F344ラットおよびB6C3F1マウスにおいては、1,4-ジクロロベンゼンによる肝細胞増殖が用量依存的に認められおり、その際、肝毒性を示さない場合もあった。1,4-ジクロロベンゼンによるペルオキシソーム増殖は、CF1マウスの肝臓では認められていない。

雄ラットにおける 1,4-ジクロロベンゼンの腎毒性発現機序の 1 つが明らかにされているが (雄に特異的にみられる硝子滴腎症)、これにより、他の機序が関与している可能性を排除することはできない。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

経口経路

ラットを用いた 1 件の試験 (OECD 試験法、限度試験) で、LD₅₀ は 2,000 mg/kg を上回るものと判断された。この試験では、投与後第 4 日に毒性徴候 (流涎、異常歩行および円背位) がみられたが、これらの変化は可逆的であり、肉眼的異常は認められなかった (Gardner, 1987a)。また、他の試験においても、経口投与による LD₅₀ は、ラットで 2,000 mg/kg を、マウスでは 2,950 mg/kg を上回ることが示されている (Ben-Dyke, 1970; Gaines, 1986; Domenjoz, 1946)。これら 3 つの試験については、試験プロトコルの詳細が示されておらず、他の 2 試験でも同様で、検討・判断するのは困難である。

経皮経路

ラットにおける LD₅₀ は 2,000 mg/kg を上回り、局所または全身性の徴候ならびに肉眼的異常は認められなかった (OECD 試験法、限度試験) (Gardner, 1987b)。また、別の試験 (プロトコルは示されていない) では、経皮 LD₅₀ は 6,000 mg/kg を超えることが示されている (Gaines, 1986)。

吸入経路

ラットにおける 4 時間 LC₅₀ (EEC 試験法、GLP、限度試験) は 5.07 mg/L (845 ppm) を上回り、第 2 日に、肺刺激の徴候 (曝露 4 時間後までの呼吸数増加)、立毛および可逆的な体重増加抑制がみられたが、肉眼的異常は認められなかった (Hardy, 1987)。別の試験 (7 時間投与量漸増鼻部曝露) では、第 1 日に、徴候として振戦、反射低下および情緒不安定が観察されている (Hoechst, 1981)。

腹腔内経路

検討の対象とした 2 つの試験(プロトコルの詳細は不明)のいずれにおいても、ラットおよびマウスの LD₅₀ は、2,000 mg/kg を上回っている (Zupko, 1949; Mohtashampur, 1987)。また、マウスにおける皮下 LD₅₀ は、5,145 mg/kg であることが報告されている (Irie, 1973)。

ラットに 1,4-ジクロロベンゼンを単回経口投与 (500 または 770 mg/kg) または吸入投与 [500 ppm (約 3 mg/L)、24 時間] した試験で、雄ラットに腎皮質における硝子滴形成の増加がみられ、肝臓の異常 (空胞形成およびアルビノラットで肝性ポルフィリン症) が主として雌で観察された (Umemura et al., 1990; Charbonneau, 1989b; Rimington, 1963)。F344 ラットにおける腹腔内投与試験では、肝臓および腎臓の異常は認められていない (Valentovic, 1993)。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

1,4-ジクロロベンゼンを偶発的に摂取し (摂取量は不明)、溶血性貧血を起こした中毒例が 1 例のみ報告されている (Hallowell, 1959)。1,4-ジクロロベンゼンによる偶発的中毒に関する中毒センターの症例報告によると、低用量の 1,4-ジクロロベンゼン (防虫剤 1 個: 5 g 相当に満たない量) の偶発的な摂取により、消化器障害 (消化管刺激による吐き気および嘔吐) が起こる可能性がある。また、高用量では、神経障害 (けいれん、興奮) が起こる可能性がある (Jougard, 1976)。

これらの症例報告から、著者らは、有害影響が発現する最低用量は 300 mg/kg を超えるとしている。しかし、この用量の設定根拠は明確に説明されていないため、これらのデータの解釈は困難である (Jougard, 1976)。

動物において得られているデータを考慮すると、曝露経路 (経口、経皮または吸入) にかかわらず、1,4-ジクロロベンゼンの急性毒性はかなり低いと判断される。ヒトにおけるデータは限られており、評価は困難である。

したがって、これらのデータから、1,4-ジクロロベンゼンを急性毒性の評価項目に照らして分類するのは、妥当ではないと考えられる。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物における試験

ウサギ(3匹)を用いた試験(OECD試験法)で、1,4-ジクロロベンゼンは、軽度の皮膚刺激性を示すことが明らかにされている(4時間曝露、固体の被検物質 500 mg をオイルパラフィンと混合しペースト状にして適用)。この試験では、スコア 1 以下の軽度の紅斑がみられたが第 7 日には回復し、浮腫は認められなかった(Maertins, 1988)。最高用量を 300 mg/kg/日として、ミネラル油に溶解した 1,4-ジクロロベンゼンを用いて行った 21 日間皮膚刺激性試験(GLP)では、有意な皮膚刺激性は認められていない(Arletta, 1989)。

ウサギ(3匹)を用いた試験(OECD試験法、曝露時間 24 時間、固体の被検物質 90 mg をオイルパラフィンと混合しペースト状にして適用)で、1,4-ジクロロベンゼンは、軽度の眼刺激性(1/3 匹)を示すことが明らかにされている。この試験では、結膜のみに損傷(スコア 1 の発赤および浮腫)が認められたが、72 時間後に回復し、虹彩および角膜には刺激性影響は認められなかった(Maertins, 1988)。

呼吸数の減少を測定し、呼吸数を半減させる用量(RD₅₀)を求めることにより、1,4-ジクロロベンゼンの吸入曝露による感覚刺激性を検討した試験が報告されている。しかし、プロトコルの詳細が示されておらず(各試験濃度における供試動物数が不明)、各動物種の雌雄それぞれにつき 2~3 段階の試験濃度が用いられたのみで、曝露は 10 分間でしか行われていない[米国材料試験協会(American Society for Testing Materials, ASTM)[訳注:原文は"ASTDM"]のプロトコルでは、8 濃度を設定し、各濃度にマウス 8 匹を割り振り、1 時間曝露を行うこととしている]。この試験における RD₅₀は、F344 ラットの雌雄でそれぞれ 613 ppm および 719 ppm、B6C3F1 マウスの雌雄ではそれぞれ 270 ppm および 245 ppm であった。なお、毒性徴候については記述されていない(Wilson, 1990)。

ラットおよびマウスを 500 ppm の 1,4-ジクロロベンゼンに 6 時間吸入曝露した試験で、ラットでは呼吸数の著しい減少がみられ、ラットおよびマウスで平均分時換気量が 50%減少したことが報告されている(Wilson, 1990)。

4.1.2.3.2 ヒトにおける試験

1,4-ジクロロベンゼンの液体または蒸気(高温蒸気)に長期間ないしは繰り返し皮膚接触したケースで、軽度の刺激症状(皮膚のひび割れを伴わない灼熱感)が観察されている。また、1,4-ジクロロベンゼンに曝露された作業員において、粘膜刺激症状が報告されているが、曝

露量は不明である (Waligren, 1953)。

1,4-ジクロロベンゼンを取り扱う業務に従事して職業曝露を受けた作業員[58人、1日8時間、週5日で8ヵ月間～25年間(平均4.75年)曝露]を対象とした調査が、数回実施されている (Hollingsworth, 1956)。

- 第1回調査：62の空気サンプルを分析した結果、1,4-ジクロロベンゼンの蒸気濃度は10～550 ppm(平均85 ppm)であった。80～160 ppmの濃度で目および鼻に疼痛を伴う刺激症状がみられ、160 ppmを超える濃度では、順化していない作業員に吸入不能状態すなわち『呼吸困難』が認められた。
- 第2回調査：しばらくしてから同一の器具および操作手順で調査したところ、データが2群に分けられた。順化した作業員が不快であると感じる曝露条件下で採取した15の空気サンプルにおける1,4-ジクロロベンゼン濃度は、100～725 ppm(平均380 ppm)であった。一方、作業員が許容できると考えられる曝露条件下での作業時に採取した32サンプル中の濃度は、5～275 ppm(平均90 ppm)であった。
- 第3回調査：作業手順および器具が大幅に改善された後の調査となり、1,4-ジクロロベンゼン濃度の低下が認められた。鼻および眼刺激の訴えが生じている条件下で採取した21の空気サンプルにおける1,4-ジクロロベンゼン濃度は、50～170 ppm(平均105 ppm)であった。一方、いかなる刺激の訴えも生じない条件下で採取した25サンプル中の濃度は、15～85 ppm(平均45 ppm)であることが明らかにされた。

この調査結果をまとめると、蒸気濃度50～80ppmで刺激の訴えが明らかにみられ、約160 ppmを超える濃度では刺激が重度になり、肺刺激の徴候も認められた。また、何名かでは、反復曝露による耐性獲得が認められている。この古い調査では、対象とした作業員における1,4-ジクロロベンゼン以外の化学物質への曝露の有無が明確にされていない。また、濃度データは、周辺空気の抜き取りサンプルから求めたもので、濃度範囲と中央値で示されており、極端な曝露濃度が除外されておらず、濃度と影響との相関関係を明らかにすることができない。他の情報をこの調査報告から得ることはできず、呼吸器症状および濃度レベルを明確にすることはできない(Hollingsworth, 1956)。

ヒトにおける吸入曝露に関する他のデータには、曝露量や呼吸器に関するデータを報告するものではなく(Miyai, 1988; Reygagne, 1992)、気道に対する刺激影響への注目度は低いと言える。高濃度の近接曝露を受けたとみられる患者の症例報告が1件あるだけで、その症例でも患者は気道刺激を訴えていない(Harden, 1978)なお、家庭内での曝露については、曝露量は60 ppm未満と推定されている(4.1.1.3項の消費者曝露、防虫剤の使用、洋服ダンス

l"consumer exposure, use of mothballs, wardrobe 1"を参照のこと) (Miyai, 1988; Reygagne, 1992)。したがって、この情報では、気道に対する刺激影響を評価するには不十分であると思われる。

ウサギにおいて得られたデータに基づくと、1,4-ジクロロベンゼンは皮膚および眼に対し軽度の刺激性を示すと考えられる。ヒトにおいても、反復皮膚曝露により、軽度の皮膚刺激(皮膚のひび割れを伴わない灼熱感)が生じることが示されている。

古い調査(極端な曝露濃度が除外されていない濃度範囲と中央値のデータに基づく調査)によると、50 ppm 以上の濃度で眼および鼻刺激が2回の調査でみられており、1回の調査では160 ppm を超える濃度で気道刺激が認められている。

なお、RD₅₀ の判定に関する情報が示されていないため、この情報を検討の対象とすることは困難であり、本評価項目に対しては有効ではないと考えられる。

ヒトにおけるこれらのデータより、1,4-ジクロロベンゼンは、刺激物 R36「眼に刺激性がある」の分類に該当するが、R37「呼吸器系に刺激性がある」および R38「皮膚に刺激性がある」には該当しないと考えられる。なお、この分類は、1998年10月および1999年3月に行われた発がん性、変異原性、生殖毒性(CMR)会議で合意を得ている。

4.1.2.4 腐食性

4.1.2.3 項に記述したデータにより、1,4-ジクロロベンゼンには腐食性はないことが示されている。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物における試験

Magnusson and Kligman の方法による、モルモットを用いた皮膚感作性試験(EEC 試験法、対照群 24 匹、試験群 24 匹、感作誘導の濃度は皮内投与時 0.1%および局所適用時 25%、惹起濃度はワセリンを媒体として 25%、陽性対照群を設定)で、やや弱い感作性が認められている。予備試験では、0.1%溶液の皮内投与により、動物に軽度の刺激が観察された。予備試験時、ワセリンを媒体とした 25%組成物を適用した部位に刺激性が認められなかったことから、最大非刺激濃度は 25%超であった。この試験では、ラウリル硫酸ナトリウムの適用は行わ

れていない。感作誘導後にごく軽微な刺激の徴候(24 匹中 1 匹)が認められた。

対照群の動物における結果は、以下のとおりであった。

- 25%1,4-ジクロロベンゼン適用：24 時間後、24 匹中 1 匹でスコア 1；48 時間後、24 匹中 5 匹でスコア 1、1 匹でスコア 2
- 媒体(ワセリン)のみ適用：24 時間後、すべての個体でスコア 0；48 時間後、24 匹中 4 匹でスコア 1

処置群の動物における結果は、以下のとおりであった。

- 25%1,4-ジクロロベンゼン適用：24 時間後、すべての個体でスコア 0；48 時間後、24 匹中 9 匹でスコア 1、4 匹でスコア 2、1 匹でスコア 3
- 媒体(ワセリン)のみ適用：24 時間後、24 匹中 1 匹でスコア 1；48 時間後、24 匹中 11 匹でスコア 1

Table 4.13 Results of maximisation study

| | | 24 hours (score 1, score 2, score 3) | 48 hours |
|----------|-----|--------------------------------------|------------|
| Controls | 25% | (1, 0, 0) | (5, 1, 0) |
| | 0 | (0, 0, 0) | (4, 0, 0) |
| Treated | 25% | (0, 0, 0) | (9, 4, 1) |
| | 0 | (1, 0, 0) | (11, 0, 0) |

投与群においては、24 時間後にはいずれの動物にも感作は認められなかったが、48 時間後に 24 匹中 5 匹(21%)に感作が認められ、スコアは 2 または 3 であった(対照群の 1 匹にもスコア 2 の反応がみられ、感作されたものと考えられた)。

なお、この試験では、病理組織学的検査は行われていない(Bornatowicz, 1995)。

モルモット(対照群 8 匹、パラフィンオイルに 30%、10%、3%および 1%の濃度で混合した 1,4-ジクロロベンゼンを適用した試験群各 8 匹)を用いた非閉塞皮膚試験[open epicutaneous test(Klecak 法)]では、第 32 日および第 46 日に感作の徴候はみられなかった。なお、感作誘導時に刺激性の徴候が認められている(Schmidt, 1985a, b)。

他の感作性試験では、1,4-ジクロロベンゼンを *in vivo* 適用したモルモットの血清中抗 1,4-ジクロロベンゼン抗体価を検討した受身皮膚アナフィラキシー試験、ならびにマウスおよびヒトの包皮線維芽細胞を用いた *in vitro* 微小管分解試験などが行われているが、いずれも陰

性の結果を得ている。しかし、これらの試験については、感作性の検出についての妥当性は証明されていない(Suzuki, 1991; Leung, 1990)。

4.1.2.5.2 ヒトにおける試験

単発の症例が報告されている。1,4-ジクロロベンゼンで処理した肘掛け椅子に、その日のうちに皮膚接触したもので、接触の 24 時間後から 48 時間後まで急性点状紫斑が現れた。この症例では、5 ヶ月後に実施した、1,4-ジクロロベンゼンを用いた好塩基球脱顆粒試験で、陽性が認められた。しかし、この反応における 1,4-ジクロロベンゼンの役割(アレルギー性に働くのか否か)については、疑義が残る(Nalbandian, 1965)。

全体として、動物においては、1 件の試験で 1,4-ジクロロベンゼンが非常に弱い感作性を有することが示されたのみであり、ヒトにおいては、1,4-ジクロロベンゼンは多年にわたり職業上および消費者において広く使用され、直に触れる場合もあったにもかかわらず、1 例の疑わしい症例が報告されているに過ぎない。動物では、マキシマイゼーション試験を除き、複数の感作性試験 (*in vitro* 試験、非閉塞皮膚試験) で陰性結果を得ているが、これらの試験結果の解釈は困難である(実施内容が不十分であったため)。しかし、1,4-ジクロロベンゼンを感作性物質に分類する根拠や、または新たな動物試験の実施が必要であるとする根拠は不十分である。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

経口曝露

ラットにおける試験

米国国家毒性プログラム(NTP)により、F344 ラットに 1,4-ジクロロベンゼンを 13 週間強制経口投与した試験(GLP に準拠)が、2 件実施されている。第 1 の試験は 300、600、900、1,200 および 1,500 mg/kg/日、第 2 の試験は 0、37.5、75、150、300 および 600 mg/kg/日の用量が適用された。

第 1 の試験では、300 mg/kg/日以上投与群の雄で、尿細管細胞に好酸性封入体を伴う異常が認められ、後に尿細管細胞の変性および壊死が観察された。900 mg/kg/日以上投与群の

雌雄で肝臓の異常(統計学的に有意な肝重量の増加)、1,200 mg/kg/日以上 of 投与群で局所的な肝細胞の変性および壊死が認められた。300 mg/kg/日以上 of 投与群の雄では、ごく軽度の血液学的異常(ヘマトクリット値およびヘモグロビン値の減少)がみられたが、用量依存性は認められなかった。また、高用量群(1,200 および 1,500 mg/kg/日投与群)では、雌雄いずれにおいても骨髓低形成、脾臓および胸腺のリンパ球の枯渇、ならびに一般毒性の徴候が観察された。したがって、この第1の試験では、雌ラットにおける無毒性量(NOEL)は 600 mg/kg/日、雄における最小毒性量(LOEL)は 300 mg/kg/日であった。

第2の試験では、雌にはいかなる影響も認められなかったが、600 mg/kg/日投与群の雄に腎皮質の変性が認められた。したがって、NOEL は、雌で 600 mg/kg/日超、雄では 300 mg/kg/日であった。

これらの2件の試験において雄ラットで観察された影響は、性別および動物種に特異的にみられるものであり、ヒトの健康リスク評価にあたっては重要な所見ではない(US NTP, 1987)。

F344 ラットにおいて、1,4-ジクロロベンゼンの強制経口投与による腎臓への影響に重点を置いた試験(GLP)(4週間ないしは13週間)が実施されている。

4週間試験では、75 mg/kg/日以上 of 投与群の雄で、腎細胞への硝子滴の蓄積が観察され、これは、蛋白および乳酸脱水素酵素の尿中排泄量の増加、ならびに上皮細胞の分泌の増加と連動していた。また、腎細胞壊死および尿細管拡張を伴う尿細管性腎症が、150 mg/kg/日以上 of 投与群の雄で認められた。腎臓相対重量の増加が、300 mg/kg/日以上 of 投与群の雄、および 600 mg/kg/日以上 of 投与群の雌で認められた。300 mg/kg/日以上 of 投与群の雌雄で、肝重量の増加が、300 mg/kg/日以上 of 投与群の雄(5匹中3匹)では、小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。したがって、この試験では、雌ラットにおける NOEL は約 300 mg/kg/日であり、雄ラットにおける LOEL は 75 mg/kg/日(この用量で腎臓への影響が認められた)である。13週間試験では、150 mg/kg/日以上 of 投与群の雄で、4週間試験と同様の腎臓の異常がみられ、150 mg/kg/日以上 of 投与群の雄および 600 mg/kg/日以上 of 投与群の雌で、腎重量の増加が認められた。また、75 mg/kg/日以上 of 投与群の雌雄で肝重量の軽度の増加が、300 mg/kg/日以上 of 投与群の雄(5匹中2匹)のみで肝細胞肥大が認められた。したがって、腎臓への影響に関しては、雄ラットにおける LOEL は 75 mg/kg/日、雌ラットにおける NOEL は約 300 mg/kg/日である。なお、この試験では、血液学的および生化学的項目については十分には検討されていない(Bomhard, 1987, 1988b)。

F344 ラットに 1,4-ジクロロベンゼンを 0、150 および 600 mg/kg/日(強制)経口投与した4週間試験において、シトクロム P 450 モノオキシゲナーゼ肝酵素活性が検討された。この結果、

150 mg/kg/日以上 of 投与群で、シトクロム P 450 モノオキシゲナーゼ酵素の誘導が用量依存的に認められ、これとともに肝重量の増加を認めた(150 mg/kg/日投与群の雄、600 mg/kg/日投与群の雌雄で軽度の増加)。しかし、この試験では、肝臓の病理組織学的分析または他の酵素の活性測定が行われておらず、観察された所見はシトクロム P 450 および肝重量の変化のみであったことから、NOAEL の決定には不十分であると考えられる (Bomhard, 1992)。

ラット(系統は不明)におけるその他の経口投与試験が、以下のように簡潔に報告されている (Hollingsworth, 1956)。

- 雄ラット(各用量群 2 匹のみ)において、最高用量である 500 mg/kg/日を 4 週間投与した群に、肝臓および腎臓の異常が観察された。
- 雌ラットにおいて、188 mg/kg/日以上 of 投与群に、肝臓および腎臓への軽微な影響(重量増加)がみられ、376 mg/kg/日投与群には、肝臓の病理組織学的異常が認められた。

さらに、1,4-ジクロロベンゼンの強制経口投与による肝性ポルフィリン症に重点を置いた(また、ヘキサクロロベンゼン、1,4-ジクロロベンゼンおよび 1,2,4-トリクロロベンゼンによる肝性ポルフィリン症発症率を比較できるようににデザインされた)試験が実施されている。雌ラットに、50、100 および 200 mg/kg/日の用量で、投与が行われた。この結果、50 mg/kg/日以上 of 投与群で、30 および 60 日後に肝重量の軽度の増加が用量依存的にみられたが、肝臓のポルフィリンについては、わずかな増加が 120 日後に認められたのみであった。なお、その他の酵素活性は検討されていない(試験プロトコルの詳細が示されておらず、反復投与毒性の評価に有用な試験であるとはみなされない) (Carlson, 1977)。

F344 ラットを用いた 2 年間強制経口投与試験が実施されており、雄では 150 mg/kg/日以上 of 投与群で腎臓の異常(過形成、石灰化)が、雌では 300 mg/kg/日以上 of 投与群で腎症が認められた。また、雌では、600 mg/kg/日投与群で、軽度の肝毒性(一過性の肝細胞増殖および持続性の肝腫大)が観察された。したがって、LOAEL は、雄で 150 mg/kg/日、雌では 300 mg/kg/日であると考えられた (US NTP, 1987)。

雄の F344 ラットを用いた試験において、1,4-ジクロロベンゼンによる腎毒性発現機序が解明されている (Borghoff, 1990, 1991; Charbonneau, 1987, and 1988, 1989a, b; Dietrich, 1991; Lehman-McKeeman, 1993, 1990; Saito, 1992; Bomhard, 1989; Olson, 1990)。1,4-ジクロロベンゼンは、雄の SD ラットおよび F344 ラットの肝臓で合成される低分子量蛋白質である α -2u-グロブリンと可逆的に結合する。この 1,4-ジクロロベンゼン- α -2u-グロブリン複合体は、リゾチームの異化作用に対して抵抗性を有するため、腎リソソームの蛋白質負荷が過剰となり、尿細管にタンパク質小滴が形成される(正常であれば、低分子量蛋白質は尿細管で再吸

収される) (Den Besten et al., 1991)。このようなリソソームの過負荷は細胞死を招き、二次的に細胞増殖が促進される。この α -2u-グロブリンは、雄ラットに特異的にみられる蛋白質である。1,4-ジクロロベンゼンを強制経口投与した雄の成熟 SD ラット (Saito, 1996) および単回経口投与した雄の F344 ラット (Charbonneau, 1988, 1989a) において、腎型 α -2u-グロブリンの尿中排泄量が増加したことが報告されており、雄ラットにおける腎症と 1,4-ジクロロベンゼン累積量との間には、正の相関が認められている (Charbonneau, 1989b)。雄の NBR ラット (α -2u-グロブリンを合成しない種類) では、1,4-ジクロロベンゼンの経口投与 (500 mg/kg/日を 4 日間) 後に、腎臓病変や硝子滴形成は認められていない (Dietrich, 1991)。雄ラットでは、腎臓での消失動態が他の組織とは異なっていることが示されており、 α -2u-グロブリン蛋白質の存在と関連がある可能性が考えられる (Wilson, 1990)。雄の F344 ラットを用いた試験 (75, 300 ないしは 600 ppm の 1,4-ジクロロベンゼンに 9 ヶ月間吸入曝露) において、曝露中止後の回復期間中、曝露群では α -2u-グロブリンによる腎症が消失したにもかかわらず、対照群に比べ、慢性ネフローゼの発症が早まったことが報告されている (Umemura et al., 1993)。

その他の動物種における試験

B6C3F1 マウスにおける 13 週間 (週 5 日) 強制経口投与試験が、85~1,800 mg/kg/日の用量で実施された [第 1 段階で 0~900 mg/kg/日 (13 週間)、第 2 段階で 600~1,800 mg/kg/日 (13 週間)] (US NTP, 1987)。

- 第 1 段階： 675 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で、肝細胞肥大が認められた。したがって、NOAEL は、雌雄ともに 337 mg/kg/日であると考えられる。
- 第 2 段階： 雌雄とも 600 mg/kg/日以上の投与群で、肝細胞の変性および体重増加の抑制がみられ、900 mg/kg/日以上では、肝重量の増加も認められた。白血球数の統計学的に有意な減少が、雄マウスでは 600 mg/kg/日以上の投与群で、雌マウスでは 1,000 mg/kg/日以上の投与群で観察された。また、高用量群 (1,500 mg/kg/日投与群および 1,800 mg/kg/日投与群) では、骨髄および脾臓の低形成、ならびにこれに起因する造血の低下、脾臓のリンパ球枯渇および胸腺のリンパ球壊死が観察された。腎臓には、いかなる異常も認められなかった。したがって、この第 2 段階における LOAEL は、600 mg/kg/日であると考えられた。

NMRI マウスに 300、600 および 900 mg/kg/日の用量で 4 週間強制経口投与した試験では、肝臓の異常が用量依存的に認められた。雌雄ともに、300 mg/kg/日投与群で肝重量の増加が観察され、これに関連して、600 mg/kg/日以上の投与群で肝細胞の肥大および変性、ならびにアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT) の上昇が認められ、さらに、900 mg/kg/日以上の投与群でコレステロール値の上昇が認められた。したがって、NMRI マウスにおける

LOAEL は、300 mg/kg/日と考えられる (Bomhard,1986)。

B6C3F1 マウスに 0,300 および 600 mg/kg/日の用量で強制経口投与した 2 年間試験では、300 mg/kg/日以上投与群に肝細胞変性および単細胞壊死が報告されている (300 mg/kg/日投与群では軽度)。また、腎症は、雌雄ともに 300 mg/kg/日以上投与群で観察された。したがって、非発がん性の影響に関する LOAEL は、雌雄ともに 300 mg/kg/日であった (US NTP, 1987)。

ウサギに 0,500 および 1,000 mg/kg/日の用量で強制経口投与した 1 年間試験 (非 GLP) では、雌雄ともに 500 mg/kg/日以上投与群で、毒性徴候 (振戦、衰弱) および肝臓の組織学的異常 (巣状壊死による腫脹病巣) が観察されたことが、簡潔に報告されている (Hollingsworth, 1956)。

ビーグル犬を用いた 1 年間経口毒性試験 (GLP) が実施されており、10、50 および 150 mg/kg/日の 1,4-ジクロロベンゼンをカプセル投与し (1 群雌雄各 5 匹)、雌雄各 5 匹の対照群 (投与群と同じ 7 ヶ月齢の動物) を設けた。しかし、最高用量群で重度の毒性が認められたため (12 日後に 150 mg/kg/日投与群で死亡例がみられた)、第 3 週に初期の最高用量 150 mg/kg/日を 100 mg/kg/日に変更し、さらに第 6 週に 75 mg/kg/日に減量した。この試験では、150 mg/kg/日投与群の雄 2 匹および雌 1 匹が試験期間中に死亡した (雄 1 匹は第 12 日、別の雄 1 匹は第 25 日、雌 1 匹は第 24 日)。対照群でも第 83 日に空腸変位による死亡が 1 例認められた。また、投与群の動物 2 匹 (雄 1 匹および雌 1 匹) が、肺の炎症性病変により死亡し、雌の死亡例では肺出血も認められた。3 例目の死亡については、投与に関連して起こった可能性を排除することはできないが、明確な死因は特定されなかった。投与期間中に死亡したすべての動物 (雄 2 匹、雌 1 匹) で、種々の組織にうっ血または出血が認められた [腸のうっ血 (雄 2 匹) および出血 (雄 1 匹)、肺の出血 (雄 1 匹、雌 1 匹) ならびにリンパ節の出血 (雌 1 匹)]。複数のイヌで肺炎が認められており、線虫 (フィラリア、回虫) の寄生に起因する可能性が考えられたが、検査の結果、肺および腸間膜リンパ節にこのような寄生虫は検出されなかった。

最高用量群 (150 mg/kg/日、後に 75 mg/kg/日に減量) では、試験期間中に死亡した動物において、自発運動の低下、嘔吐、脱水、消瘦が観察され、最初の 1 ヶ月間に体重増加の抑制が認められた。同群では、6 ヶ月後に、雌雄ともに軽度の貧血を認めたが、1 年後には回復した。また、高用量群の雌 4 匹中 3 匹で血小板数の増加 [平均値: 413.25 ± 108 ($p < 0.05$)、対照群: 267.00 ± 68] が認められた。また、高用量群の雌 1 匹で骨髄の赤血球過形成が、雌 2 匹および雄 1 匹で脾臓での造血亢進が認められた。

肝臓においては、高用量群および中用量群の雌雄で、肝臓の絶対重量および相対重量に統計学的に有意な増加がみられ (高用量群で 1.5 倍)、用量依存性が認められた。また、肝酵素

にも統計学的に有意な上昇が用量依存的に認められ、アルカリフォスファターゼの上昇は 50 mg/kg/日以上以上の投与群の雌雄で〔高用量群では雄 3 匹中 2 匹(7.3 倍) ($p < 0.05$) および雌 4 匹中 4 匹(7.8 倍) ($p < 0.01$)、50 mg/kg/日投与群では雄 5 匹中 5 匹(7.2 倍) および雌 5 匹中 5 匹(4.3 倍)〕、ALAT の上昇は高用量群の雌 4 匹中 3 匹で(3.5 倍) ($p < 0.05$)、GGT の上昇は高用量群の雌 4 匹中 3 匹で(2.6 倍) ($p < 0.05$)、それぞれ観察された。肝臓の組織学的検査では、中用量群および高用量群の雌雄すべての個体に肝細胞肥大を認め、うち数匹(5 匹中 2 匹)では肝細胞の色素沈着も認められた。また、高用量群では、雄 1 匹および雌 1 匹に胆管過形成がみられ、雄 5 匹中 2 匹には肝門脈域の炎症が認められた。

腎臓においては、腎重量の増加(高用量群および中用量群の雌)、および腎尿細管上皮細胞の空胞化(高用量群の雄 1 匹および雌 2 匹、低用量群の雌 1 匹)が観察された。

また、高用量群の雌の副腎相対重量および中用量群の雌の甲状腺重量が、統計学的に有意な増加を示した。

重要な腫瘍性所見は、認められていない。

したがって、この試験における NOAEL は、10 mg/kg/日であった(Naylor, 1996)。

ビーグル犬(1 群雌雄各 2 匹)に 0、25、75、150 および 300 mg/kg/日の用量で週 5 日、4 週間経口投与(カプセル投与)したパイロット試験(GLP)では、75 mg/kg/日以上以上の投与群の雌雄で、肝臓への影響(肝重量の増加)が認められたことが報告されている。また、アルカリフォスファターゼの用量依存性の上昇が、75 mg/kg/日以上以上の投与群の雌($p < 0.05$) (2.5~3.3 倍) および 150 mg/kg/日投与群の雄(5 倍、統計学的有意差なし)で認められた。さらに、150 mg/kg/日投与群の雄で、ALAT、ASAT およびビリルビンの上昇(5 倍)もみられたが、統計学的に有意ではなかった。

300 mg/kg/日投与群の雄 2 匹で、第 17 日および第 18 日に死亡が認められた(死因は、1 匹では食道穿孔、他の 1 匹では重度の胃腸炎)。雌では、150 mg/kg/日投与群および 300 mg/kg/日投与群で体重増加の抑制がみられ、75 mg/kg/日投与群で胃腸炎が観察された。300 mg/kg/日投与群の雌で下痢を認めたほかは、一般状態のその他の変化は認められなかった。なお、この試験では、病理組織学的検査は行われていない(Naylor, 1996)。

吸入曝露

種々の動物種(ラット、モルモット、マウス、ウサギ、サル)を用い、0、96、158、173、341 および 798 ppm の濃度の 1,4-ジクロロベンゼン蒸気に、1 日 7 時間、週 5 日で 5 ヶ月間また

は7ヵ月間曝露した試験(短報、非GLP、データ不正確、ラットおよびマウスの系統不明)が報告されている。この試験では、96 ppm 曝露群には、有意な毒性影響は認められなかった。158 ppm 以上で曝露されたラットおよびモルモットの群において、軽度の異常が、肝臓(肝細胞変性、統計学的に有意な肝重量増加)および腎臓(統計学的に有意な腎重量増加)で認められた。341 ppm 曝露群では、さらに限局性の肝細胞壊死の徴候が認められた。ラット、ウサギおよびモルモットの173 ppm 以上の曝露群では、肺の異常(浮腫、うっ血)が認められた。また、高濃度(798 ppm)での曝露により、重度の中毒徴候(肺炎、顕著な振戦、衰弱、意識障害および死亡、さらには肝臓、腎臓および肺の組織学的損傷)がみられた。NOAECは、ラットおよびモルモットで96 ppm、ウサギおよびサルで158 ppm、マウスでは158 ppm 超であると考えられた。なお、発生率や重症度には、明確な用量依存性は認められていない(Hollingsworth, 1956)。

Wistar ラットを76週間曝露(1日5時間、週5日、蒸気曝露)した別の試験(詳細なプロトコルが示されたGLP試験)では、500 ppm 曝露群の雌雄で、軽度ではあるが統計学的に有意な肝重量の増加が認められ(用量依存性はなし)た。第26週の途中屠殺で、同群の雌では、肝細胞過形成がみられた。また、同群の雄では、腎臓の異常(腎重量および尿中コプロプロフィリンの増加)が認められた(硝子滴腎症は認められなかった)。75 ppm 曝露群の雌で、第26週の途中屠殺時に、肝重量の軽度の増加(統計学的に有意)および回復の過程にある軽度の肝細胞過形成(79匹中6匹)を認めたが、いずれも第76週の時点では認められなかった。血液学的または血液化学的徴候、および刺激徴候は認められていない。この試験におけるNOAECは、雌雄ともに75 ppmと判断された(Riley, 1980a)。

Swiss マウスを用いた56週間試験(蒸気曝露)では、曝露群の動物に呼吸異常が認められたが、併発感染症がみられていたため、この試験結果の解釈には限界がある。また、血液化学的検査、血液学的検査または病理組織学的検査(雌マウスのみ検査)では、投与に関連した毒性影響は認められていない。このため、この試験では、NOAECを確定することができなかった(Riley, 1980b)。

F344 ラットを0、20、75 および300 ppm の蒸気に、1日6時間、週5日で計104週間曝露した、2年間がん原性試験(GLP)が実施されている。この試験で観察された有意な異常は、300 ppm 曝露群の雄における、腎重量の増加を伴う腎臓の病変(腎乳頭集合管の石灰化および尿路上皮の過形成)のみであった。300 ppm 曝露群では、雌雄ともに肝重量の増加が認められた。300 ppm 曝露群の雌には鼻腺の呼吸上皮化生および呼吸上皮の好酸性変化がみられ、対照群および曝露群の動物の大半に嗅上皮の好酸性変化が認められたが、特に300 ppm 曝露群の雌雄および75 ppm 曝露群の雌にみられた変化は、対照群に比べグレードの高いものであった(屠殺動物において、対照群で雌38/38匹、雄24/33匹、300 ppm 曝露群で雄12/18匹、雌36/36匹、75 ppm 曝露群では雄17/29匹、雌36/38匹)。また、死亡動物においても同

様の傾向が認められた(対照群で雌11/12匹、雄9/17匹、300 ppm曝露群で雄13/32匹、雌14/14匹、75 ppm曝露群では雄4/21匹、雌10/12匹)。NOAECは、腎障害に関して75 ppmと判断された〔日本バイオアッセイ研究センター(JBRC), 1995〕。

BDF1 マウスを0、20、75 および 300 ppm の蒸気に、1日6時間、週5日で計104週間曝露した2年間がん原性試験(GLP)が実施されている。300 ppm群で肝腫瘍が誘発され、また、重度の肝毒性が観察された。肝毒性としては、雌雄における肝酵素(AST、ALT、LDH、アルカリフォスファターゼ)の上昇や肝重量の増加、組織学的変化などが観察された。肝臓の組織学的所見として、雌雄で限局的な軽度の壊死(対照群の雄で7/49匹、雌で2/49匹、曝露群では雄で17/49匹、雌で8/49匹)、雄で小葉中心性肝細胞肥大(34/49匹)が認められた。また、300 ppm群では、雌雄ともに、腎重量の増加がみられた。NOAECは、肝障害に関して75 ppmと判断された (JBRC, 1995)。

経皮曝露

SD ラット(1群雌雄各5匹)を用いて、21日間経皮毒性試験(GLP)が実施されている。鉱物油に溶解した1,4-ジクロロベンゼンに、最高300mg/kg/日の用量で曝露(週5日で3週間)したが、毒性影響または有意な皮膚刺激性は認められなかった。しかし、この試験に用いられた最高用量は、限界用量を反映したものではなかった(Arletta, 1989)。

動物における試験の要約

F344 ラットおよび系統不明のラットを用いた1,4-ジクロロベンゼンの経口投与試験(4~13週間)では、雄のみに、75 mg/kg/日の濃度から硝子滴腎症が認められはじめ、150 mg/kg/日の濃度では顕著となった。これは、1,4-ジクロロベンゼンによる影響には明らかに雌雄差があることを示している。しかし、このような硝子滴腎症は雄ラットに特異的にみられ、ヒトに外挿することはできないため、ヒトの健康に対するリスクを示すものではない(4.1.2.6.1 項の作用機序の記載を参照のこと)。これより高用量(多くの場合、300 mg/kg/日)では、雌雄ともに肝臓の異常(肝重量増加、肝細胞肥大)および腎臓の異常(腎重量増加、腎症)が観察された。ラットにおいて収集されたこれらのデータは、F344 ラットを用いた2年間経口投与がん原性試験によりさらに裏付けられている。したがって、リスク評価の際には、雌ラットにおける腎臓への影響に関するNOAELである、150 mg/kg/日を、考慮に入れなくてはならない。雄ラットでは、腎臓への影響に関するLOAELは、75 mg/kg/日である。

他の動物種(NMRI マウス、B6C3F1 マウス、ウサギ)では、300 mg/kg/日の濃度で肝臓および腎臓の異常(肝重量増加、肝細胞の肥大や変性、および腎症)が観察されたことから、

LOAEL は 300 mg/kg/日以上である。ただし、ビーグル犬については、1 年間試験において 50 mg/kg/日以上投与で肝臓に影響がみられており、NOAEL は 10 mg/kg/日とされる。イヌは適切なヒトのモデル動物であり、これに相反する結果は得られていないため、リスク評価にはこの NOAEL の値を考慮に入れることとする。

1,4-ジクロロベンゼンの吸入による、非発がん性影響に関する NOAEC は、2 つの慢性毒性試験から、75 ppm と推定された。その試験の 1 つは、Wistar ラットにおける 76 週間曝露試験であり、もう 1 つは、BDF1 マウスおよび F344 ラットにおける 104 週間曝露試験である。この NOAEC の値は、これ以前に種々の動物種(ラット、モルモット、マウス、ウサギおよびサル、系統は不明)を用いて実施された、5~7 ヶ月間の吸入曝露試験の結果と整合している。この試験では、ラットにおける NOAEC として 96 ppm が得られている。また、158 ppm 以上の群で、肝臓の軽度の異常(肝重量増加、軽度の肝細胞変性)がみられ、300 ppm 以上の群では、腎臓の異常(腎重量増加、石灰化)がみられた。798 ppm 以上の濃度では、神経症状および肺毒性が認められた。この試験の報告は短報のみであり、不明確なデータも含まれているが、この試験で得られた NOAEC の値は、F344 ラットおよび BDF1 マウスにおける吸入がん原性試験から得た 75 ppm という NOAEC を支持するものである。

1,4-ジクロロベンゼンへの反復経皮曝露(最高用量 300 mg/kg/日、21 日間)では、有意な毒性影響は認められていない。

4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

現場作業員を対象とした 1,4-ジクロロベンゼンの毒性に関する大規模な疫学的調査は報告されておらず、得られたデータの質は十分なものではない。

長期間にわたり大量にまたは故意に家庭内で曝露を受けたため、進行性慢性脳症(大脳性運動失調、構音障害、低血圧、四肢のすべての反射低下)を発症した例が、2 件報告されている。そのうちの 1 件は、防虫剤を粉末にして自室内に散布することにより 1,4-ジクロロベンゼンに接触し、6 年間の曝露(曝露量は不明)を受けていた女性の例であり(Miyai, 1988)、他の 1 件は、故意に防虫剤を吸入し、9 ヶ月以上の曝露(曝露量は不明)を受けていた例であった(Reygagne, 1992)。

可逆性の血液学的障害のみられた症例も報告されている。例えば、職業曝露の症例では、再生不良性貧血および性質不明の貧血が認められている。曝露状況に関しては、1 つの症例では、防虫剤の調合作業のため、90%の 1,4-ジクロロベンゼンを含む粉末混合物に 18 ヶ月間曝露(曝露量不明)されていた。他の症例では、衣類のリサイクルショップで、39 年にわ

たり慢性的にナフタレンとの同時曝露を受けており(曝露量不明)、最後の3週間は5.5 kgの純品1,4-ジクロロベンゼンを扱っていた。しかし、1,4-ジクロロベンゼン曝露との直接的な因果関係は、必ずしも明確とはいえない(Petit, 1948; Harden, 1978)。

8ヵ月～25年間(平均4.75年)にわたり、職場で1,4-ジクロロベンゼン(15～170 ppm)に曝露されていた被験者約50人を対象とした調査では、血液学的異常は認められていない[検討された項目:赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、白血球百分率、ヘモグロビン値(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)](Hollingsworth, 1956)。血液学的障害(白血球減少)がみられたとの報告もあるが、1,4-ジクロロベンゼン曝露との関連性は必ずしも明確とはいえない(Perrin, 1941)。

肝障害の症例も報告されている。長期にわたる職業曝露(2年間、1,4-ジクロロベンゼンを主成分とする防虫剤の販売)を受けた例では、肝細胞溶解および肝硬変が報告されている。別の職業曝露例(1年以上、1,4-ジクロロベンゼン製品の販売)および家庭内曝露例(3～4ヵ月間、防虫剤の蒸気)では、亜急性黄色肝萎縮が報告されている。しかし、因果関係や推定曝露量は明確にされておらず、肝障害の原因について、他方面からの検討はなされていない(Cotter, 1953; Sumers, 1952)。

1,4-ジクロロベンゼンに1ヵ月以上曝露された作業員(曝露量は不明)に、粘膜の炎症、無力症、体重減少、肝炎およびメトヘモグロビン血症などの全身徴候がみられたことが報告されている。しかし、これらの徴候は、1,4-ジクロロベンゼンを含む複数の物質に関連してみられたものであった(Waligren, 1953)。

他にも、記述が不十分ではあるが、古い症例報告がいくつか得られている。例えば、24時間吸入曝露の症例では、関節の浮腫および体重増加が観察された。また、2年半にわたり1日4～5個の防虫剤(20～30 g/日)を摂取した19歳の症例では、『固定薬疹』の様な皮膚色素沈着と、神経学的症状(振戦、情緒不安定)が発現したが、曝露中止後4ヵ月で回復した。しかし、これらの症状と曝露との関連性を明確にすることは困難である(Claytor, 1935; Frank, 1961)。

1,4-ジクロロベンゼンに曝露された女性の症例が、2件報告されている。両女性とも、白内障を発症しており、第1例の女性では一過性の振戦および黄疸がみられ、第2例の女性では黄疸および体重減少がみられたと記載されている。第1例の女性は、主婦業を通じて2年間の職業曝露を受けていた。第2例の女性は、窓のないクローゼット内で1,4-ジクロロベンゼンの缶を使用したことにより、1年間の家庭内曝露(曝露量は不明)を受けていた。しかし、白内障の形成は曝露中止後にみられたため、1,4-ジクロロベンゼンとの関連性は不明である(Berliner, 1939)。他に、12年間継続した家庭内曝露により、肉芽腫形成を伴う肺障害が

みられた症例が報告されている。肺の生検により、1,4-ジクロロベンゼンの結晶に類似した細胞内封入体が認められているが、この症例においても、曝露との関連性は不明確である (Weller, 1953)。

ヒトにおける試験についての要約

現在のところ、ヒトにおける疫学的調査は報告されていない。上に引用した症例報告は質的に不十分なものであり、肝障害や血液学的症状とともに神経学的症状についても言及されているが、1,4-ジクロロベンゼンへの曝露との因果関係は、明確にはされていない。複数の物質に対する混合職業曝露例から得たデータであり、曝露の程度はほとんど不明である。また、家庭内曝露の例では、大量にまたは故意に曝露を受けたものである。そのため、リスク評価にあたり、これらのデータを検討対象とすることは困難である。

4.1.2.6.3 反復投与毒性についての要約

リスク評価には、吸入曝露試験で得られた 75 ppm という NOAEL を採用する。また、イヌを用いた経口投与試験で得られた 10 mg/kg/日という値も、より安全側に立った NOAEL として考慮に入れる。

ヒトにおけるデータは、刺激症状(4.1.2.3 項で検討)を除き、リスク評価の検討対象に含めることが難しい(曝露期間や曝露量が不明、複数の物質への曝露などのため)。

以上のデータからは、反復投与毒性に関して正当な分類はできない。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 動物における試験

In vitro 試験

付加体および DNA との結合

ラットおよびマウスの肝臓または肺のミクロソーム画分(NADPH 添加)は、 $[^{14}\text{C}]$ -1,4-ジクロロベンゼンの仔ウシ胸腺 DNA への結合を触媒するが、ラットおよびマウスの腎臓ならびにマウスの胃のミクロソームでは DNA との結合は認められない。これと同一の組織/動物種

由来のサイトゾル(還元型グルタチオン添加)では、影響が認められないか、またはラットおよびマウスの肺におけるのと同様に、非常に弱い影響がみられるに留まる。DNA 結合に対する影響は、ミクロソーム(NADPH 添加)およびサイトゾル(GSH 添加)の存在下で最も強く、特に、マウス肺由来の画分、続いてラットまたはマウスの肝臓や胃由来の画分で、強い影響が認められた。しかし、ラット腎画分存在下では DNA 結合はみられず、マウス腎画分存在下で観察された結合は非常に弱いものであった。5'-モノヌクレオチドの HPLC 分析では、マウス肝 DNA が低量しか標識されず、ヌクレオチドとの結合増加は認められなかった(Lattanzi et al., 1989)。

Paolini et al.(1998)は、 $[^{14}\text{C}]$ -1,4-ジクロロベンゼンを、仔ウシ胸腺 DNA や、フェノバルビタールおよび β -ナフトフラボン(PB/NF)またはブチルヒドロキシトルエン(BHT)で処置した雄の CD-1 マウスから得た肝臓の種々の細胞成分画分とともにインキュベートした。その後、遠心分離で粒状物質を除去し、DNA を抽出して放射能を測定した。この結果、 $[^{14}\text{C}]$ -1,4-ジクロロベンゼンやその代謝物と DNA との結合は、特に PB/NF 処置マウスのミクロソーム(NADPH および GSH 添加)、もしくは PB/NF または BHT 処置マウスの S9(NADPH および GSH 添加)とのインキュベーションが行われた場合に認められた。なお、この試験は検証されておらず、陰性対照や陽性対照は設けられていない。

^{32}P -ポストラベリング法を用いた試験(Tian et al., 2001a)では、上記の結果と相反する結果が得られている。この試験では、仔ウシ胸腺 DNA を、1,4-ジクロロベンゼン、NADPH 生成系、および、若齢雄 Fischer344/NSlc ラット、雄 BDF1 マウスまたはヒトの肝ミクロソーム(市販品を購入)と混合した。DNA を抽出し、ヌクレアーゼ P1 を用いて検出感度を高めた後に、 ^{32}P -ポストラベリング法により分析を行った。その結果、DNA 付加体は検出されなかった。

Table 4.14 *In vitro* DNA-adducts formation of 1,4-dichlorobenzene

| Test system | Source and purity of chemical | Result ^{a)} | Dose ^{b)} (LED/HID) | Reference |
|--|---|----------------------|--|-------------------------|
| DNA adducts isolated calf thymus DNA Mouse lung and liver Rat liver and lung Rat and mouse kidney | Radiochemical Centre, Amersham, U.K. Sp. Act. 43 mCi/mmol; radiochemical purity 98% | + + - | ([¹⁴ C]-1,4- dichlorobenzene) | Lattanzi et al. (1989)* |
| DNA adducts isolated calf thymus DNA Mouse liver | Radiochemical Centre, Amersham, U.K. Sp. Act. 43 mCi/mmol; radiochemical purity 98% | + | ([¹⁴ C]-1,4- dichlorobenzene) | Paolini et al. (1989) |
| DNA adducts isolated calf thymus DNA (³² P-post-labelling) BDF1 mouse liver F344 rat liver Human liver | Not given | - | 14,7 µg/ml | Tian et al. (2001a) |

* Tests already available in the risk assessment report dated 05/2001

Reference: test not performed from validated internationally accepted test system

a) + positive; (+), weak positive; ? : inconclusive; -, negative; NT, not tested

b) LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose

細菌を用いた試験

細菌を用い、1,4-ジクロロベンゼンによる DNA 修復および遺伝子変異誘発の有無を検討した試験が、いくつか報告されている。これらの試験の概要を **Table 4.15** に示す。

umu 試験には、*umuC'*-*lacZ* 融合遺伝子を運ぶプラスミド *pSK1002* を導入した、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535 が用いられる。DNA 損傷剤の作用により、この融合遺伝子中に *umu* オペロンが惹起される。DNA 損傷後の DNA 修復の誘発量 (*umu* 遺伝子の量) は、共誘発される *lac Z* 遺伝子由来の β-ガラクトシダーゼ活性として測定する。1,4-ジクロロベンゼンの *umu* 試験が、ラット肝 S9 の非存在下および存在下で実施されている (Ono et al., 1991; 1992)。これらの試験 (442 µg/mL で 2 時間曝露および 100 µg/mL で 4 時間曝露) では、β-ガラクトシダーゼ活性の増加率が対照群と比較して 0.5 未満の場合は陰性とみなし、1.0 ~ 2.0 の場合に陽性とした。この結果、いずれの試験においても、1,4-ジクロロベンゼンに、DNA 修復遺伝子の誘導活性は認められなかった。

Ames が開発したプロトコルに準じ、ネズミチフス菌の種々の菌株を用いて変異原活性を検討した試験が、5 件報告されている。これらすべての試験は、マイクロソーム酵素誘導剤を投与したラットの肝臓から調製した S9 の非存在下および存在下で実施されており、最も古い試験を除き、GLP ガイドライン、または広く認められているガイドラインに相当する標準法に従って行われた。また、マウスへの腹腔内投与による宿主経路試験も、1 件報告されている。

Anderson(1976a)は、菌株 TA1535、TA1538、TA98 および TA100 を用い、1,4-ジクロロベンゼンを DMSO に溶解し、最高用量 2,500 µg/plate で試験を行った。さらに、1,4-ジクロロベンゼンの蒸気を発生させ、最高濃度を 682 ppm とした気相曝露試験も行った。報告によると、TA100 の無処置群において、プレートあたりの復帰変異コロニー数が低値を示し、TA100 細胞株からプラスミド pKM101 の脱落のあったことが示唆された。気相曝露試験では変異原活性は認められなかったが、無処置対照群のデータに異常値がみられたことから、この結果の有効性は疑わしい。すなわち、平均値±標準誤差で表すと、TA100 株では、S9 非存在下における対照群での復帰変異コロニー数は、わずか 24 ± 16 (正常値の約 20%) であった。一方、TA98 株の対照群での数値は、S9 非存在下で 55 ± 20 、S9 存在下では 78 ± 18 (正常値のほぼ 2 倍) であった。結果として、気相曝露試験では、TA100 株の 299 ppm 処置群におけるプレートあたりの復帰変異コロニー数は、S9 非存在下で 7 ± 2 、S9 存在下では 6 ± 4 となり、低濃度群や高濃度群の数値の 5~6 分の 1 であった。最高用量を 2,500 µg/plate として実施した標準的なプレート法では、このような矛盾は低減していたが、500 µg/plate の用量において、復帰変異コロニー数が 2 倍以上の高値を示した例が 1 件あり、データの有効性は疑わしい。この試験における問題のいくつかは、500 µg/plate の用量で、知られていない毒性が生じたことによるのではないかと考えられる [Jones and Fenner(1987)の文献に、「不完全菌叢」("incomplete lawns" すなわち、変異していない細菌のマイクロコロニー)のことが報告されているのでそれを参照されたい]。著者は、この試験データから 1,4-ジクロロベンゼンに変異原活性は認められないとしているが、本評価書ではデータの不確実性を考慮し、「不確定 (inconclusive)」なデータであると判断する。

Haworth et al.(1983)の試験では、最高用量を 100 µg/plate として、ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA98 および TA100 株に対する 1,4-ジクロロベンゼンの変異原性を検討した。この結果、いずれの菌株においても、変異原活性や毒性活性を示す結果は得られなかったが、試験用量が低く設定されているため、1,4-ジクロロベンゼンに変異原性がないと明確に結論することはできない。

Connor et al.(1985)は、最高用量を 1,000 µg/plate として、ネズミチフス菌 TA1535 および TA100 株に対する 1,4-ジクロロベンゼンの変異原性を検討した。陰性結果を得ているが、対象菌株が 2 種類のみであり、試行回数も 1 回だけであった。

Jones and Fenner(1987)は、ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA1538、TA98 および TA100 株を用いて、1,4-ジクロロベンゼンの変異原性を検討した。初回の試行で、500、1,500 および 5,000 µg/plate の用量で、毒性徴候が認められた [薄弱菌叢 (thin lawn) や無菌叢 (no lawn) といった、細菌のマイクロコロニー形成もしくは復帰変異コロニー数の減少]。そのため、2 度目の試行では、最高用量を 500 µg/plate として実施した。結局、いずれの試行においても、変異原活性を示す徴候は認められなかった。

Winker et al.(1993)は、GLP に則り、また OECD ガイドラインに準拠し、ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA1538、TA98 および TA100 株を用いて、1,4-ジクロロベンゼンの変異原活性を検討した。最高用量を、2,000 µg/plate または 3,000 µg/plate として、試験が実施された。この結果、1,000 µg/plate 以上の用量で、プレートあたりの突然変異コロニー数の減少として毒性が認められたが、いずれの場合も、変異原活性を示す結果は得られなかった。

雄の CFLP マウス(1 群 5 匹)を用いた宿主経由試験(Urwin and Baldock, 1975)では、コーン油に溶解した 1,4-ジクロロベンゼンを経口投与した。0、4,000、8,000 および 16,000 mg/kg の用量を 2 等に分し、12 時間間隔を開けて強制経口投与した。2 度目の投与後、直ちにネズミチフス菌 G46 株の懸濁液を腹腔内に接種した。2.5 時間後に細菌を腹腔から回収して、毒性および *his* 遺伝子座(ヒスチジン要求性に関する遺伝子座)に対する変異原性を評価した。この結果、16,000 mg/kg 投与群で 5 匹中 2 匹のマウスが死亡したが、総菌数、変異コロニー数または突然変異頻度には、用量依存性の変化は認められなかった。

真菌を用いた試験

発育因子としてメチオニンおよびピリドキシンを必要とするアスペルギルス・ニデュランズ(*Aspergillus nidulans*)の変異株を用いた復帰突然変異試験により、1,4-ジクロロベンゼンの変異原活性が検討されている(Prasad, 1970)。この試験では、胞子を 0 または 200 µg/mL の濃度の 1,4-ジクロロベンゼンに 28°C で 1 時間曝露した後、メチオニン非要求性への復帰変異頻度を測定した。この結果、復帰変異頻度は、対照群では生孢子 10^6 個(生存率 60%)あたり 3 個であり、曝露群では生孢子 10^6 個(生存率 39%)あたり 10 個であった。なお、この試験では、試行は 1 回のみであったと思われる。

Paolini et al.(1998)は、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) D7 株を用い、*trp-5* 遺伝子座における有糸分裂遺伝子変換の誘発、および変異誘発遺伝子 *ilv-92* による突然変異について、検討を行った。静止期の細胞に 0、74、147 または 588 µg/mL の 1,4-ジクロロベンゼンを添加し、上述の種々のマウス肝 S9 画分(付加体および DNA との結合の項を参照のこと)の存在下および非存在下において、37°C で 2 時間インキュベートした。その結果、74 µg/mL の用量で *trp*⁺ への変換頻度が、147 µg/mL の用量では *ilv*⁺ への復帰変異頻度が、統計学的に有意に増加した。

Table 4.15 In vitro tests for gene mutation induction in bacteria and fungi by 1,4-dichlorobenzene

| Test system | Source and purity of chemical | Result ^{a)} | | Dose ^{b)} (LED/HID) | Reference |
|--|--|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | | Without exogenous metabolic system | With exogenous metabolic system | | |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 (pSK1002) DNA repair (<i>umu</i>) test | not given | — | — | 443 µg/ml | <u>Ono et al. (1991), (1992) *</u> |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1538, TA98, reverse mutation | ICI Ltd., U.K. Purity not given | ? | ? | 2,500 µg/plate and 682 ppm atmos. | Anderson (1976a) * |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1538, TA98, reverse mutation | | — | — | Up to 500 µg/plate | Anderson (1976c) * |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537, TA98, reverse mutation | | — | — | 100 µg/plate | Haworth et al. (1983) * |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA98, reverse mutation | source not given. Purity 99.9% | — | — | 1,500 µg/plate | Jones and Fenner (1987) * |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA98, reverse mutation | E. Merck, Darmstadt, Germany. purity not given | — | — | 3,000 µg/plate | Winker et al. (1993) * |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA 98 | | — | — | 1,000 µg/plate | Connor et al. (1985) * |
| <i>Salmonella typhimurium</i> G46, reverse mutation in male CFLP mouse peritoneal cavity host-mediated assay | | — | | 8,000 mg/kg bw, orally · 2 | <u>Urwin and Baldock (1975)</u> |
| <i>Aspergillus nidulans meth3</i> locus reverse mutation | not given | (+) | NT | 200 µg/ml | Prasad (1970) * |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7, mitotic gene conversion | not given | — | + | 74 µg/ml | <u>Paolini et al. (1998)</u> |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7, reverse mutation | not given | — | + | 147 µg/ml | Paolini et al. (1998) |

a) +, positive; (+), weak positive; ? : inconclusive ; —, negative; NT, not tested; b) LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose

* tests already available in the risk assessment report dated 05/2001

Authors underlined : test not performed from validated internationally accepted test system

哺乳類細胞を用いた試験

HeLa 細胞を用い、シンチレーション計測法により不定期 DNA 合成の誘発を測定した試験 (24 時間曝露) では、1,4-ジクロロベンゼンは、ラット肝 S9 非存在下においては最高用量 100 µg/mL まで、存在下においては 500 µg/mL までの濃度で、陰性を示したと報告されている (Pirovano and Milone, 1986a)。

また、ヒトリンパ球を用い、シンチレーション計測法により実施された別の不定期 DNA 合成試験 (4 時間曝露) でも、1,4-ジクロロベンゼンは、ラット肝 S9 の有無にかかわらず、最高用量 147 µg/mL までの濃度で、陰性を示したと報告されている (Perocco, 1983)。

1,4-ジクロロベンゼンの DNA 断片化誘発能について、ラットおよびヒトの初代培養肝細胞を用い、アルカリ溶出法を採用した試験により検討されている (Canonero et al., 1997)。この試験に使用されたヒト肝細胞は、肝細胞がん、胆管がん、もしくは胃がんや大腸がんからの肝転移を有する患者 6 例の手術中に廃棄された、肝臓の断片から得たものであった。20 時間曝露を行い、その後直ちにトリパングルー色素排除法またはニュートラルレッド法により細胞の生存率を評価した結果、1,4-ジクロロベンゼンは、最高 3.2 mM (470 µg/mL) までの濃度で使用できることが示された。これらの方法は、細胞を洗浄して試験化合物を除去した 2 時間後に測定する場合と比べて、毒性を過小評価する可能性のあることが指摘されている (Storer et al., 1996)。その様な難点はあるが、この試験の結果、*N*-ニトロソジメチルアミンに曝露した陽性対照では DNA 断片化誘発の有意な増加が認められたのに対し、1,4-ジクロロベンゼンによる誘発は、ラットおよびヒト肝細胞のいずれにおいても認められなかった。

DNA 断片化の誘発能については、ラットおよびヒトの初代培養腎細胞においても、単細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ) により検討されている (Robbiano et al., 1999)。このアッセイは本質的に、上述のアルカリ溶出法を、微小化して行うものである。この試験に使用されたヒト腎細胞は、腎臓のがんおよび腺腫の手術中に廃棄された、腎臓の断片から得たものであった。細胞を、1,4-ジクロロベンゼンに、最高 5.6 mM (823 µg/mL) の濃度で 20 時間曝露し、その直後に、トリパングルー色素排除法により相対生存率を評価したところ、その平均はラット培養細胞で 0.78、2 人のドナーから得たヒト細胞では 0.84 および 0.96 であった。コメットの尾の長さおよびモーメント値 (尾の長さと尾の DNA 含量の積) の両者から推定すると、ラット腎細胞および 1 例のドナーから得たヒト腎細胞では、1.8、3.2 および 5.6 mM (265、470 および 823 µg/mL) の濃度範囲で、用量依存性の DNA 断片化反応がみられた。また、2 例目のドナーから得た腎培養細胞においても、3.2 および 5.6 mM (470 および 823 µg/mL) の濃度で、用量依存性の反応が認められている。しかし、この論文中にはアポトーシス細胞または損傷細胞の存在に関する記述がないため、試験結果おける細胞毒性の影響

響を正しく評価することは困難である。なお、上記 2 つの文献においては、毒性を過小評価した可能性があること、ならびに肝細胞や腎細胞の初代培養細胞が 1,4-ジクロロベンゼンに対して明らかに耐性を示したことが述べられている。

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いた試験(Galloway et al., 1987)およびヒトリンパ球細胞を用いた試験(Carbonell et al., 1991)により、1,4-ジクロロベンゼンの姉妹染色分体交換(SCE)誘発能が検討されている。この結果、CHO 細胞においては、150 µg/mL までの濃度で、ラット肝 S9 の有無にかかわらず、SCE の有意な誘発は認められなかった(S9 存在下で 2 時間曝露、S9 非存在下では 25 時間曝露)。しかし、これと異なり、2 人のドナーから得たヒトリンパ球細胞では、外因性代謝活性化系が何も添加されない場合にも、0.1 µg/mL および 0.2 µg/mL という非常に低濃度での曝露により、SCE が誘発されたと報告されている(46 時間曝露)。また、0.2 µg/mL の濃度では、増殖率指数($M_1 + 2M_2 + 3M_3/100$ 、ここで、 M_1 、 $2M_2$ および $3M_3$ は、それぞれ 1 回目、2 回目および 3 回目以降の分裂状態にあった細胞の割合)の減少も認められた。なお、この論文の著者が 1,4-ジクロロベンゼンの濃度を表す単位を混同して記した可能性がある。

また、1,4-ジクロロベンゼンによる染色体異常の誘発についても、CHO 細胞を用いた試験(Galloway et al., 1987)、チャイニーズハムスター肺(CHL)細胞を用いた試験(Ishidate, 1988)、およびヒトリンパ球細胞を用いた試験(Pirovano and Milone, 1987)で検討されている。この結果、CHO 細胞では、最高 150 µg/mL までの濃度で、ラット肝 S9 の有無にかかわらず、染色体構造異常頻度の有意な増加は認められなかった(S9 存在下で 2 時間曝露、S9 非存在下では 25 時間曝露)。CHL 細胞では、48 時間の処理により、染色体異常の誘発は認められなかったが、この試験で用いた最高濃度はわずか 5 µg/mL であり、外因性代謝活性化系は何も添加されていなかった。ヒトリンパ球細胞(単一のドナーから得た細胞)においても、最高 100 µg/mL の濃度(500 µg/mL では毒性発現)で、ラット肝 S9 の有無にかかわらず、染色体構造異常の誘発は認められなかった(4 時間曝露)。

1,4-ジクロロベンゼンの小核誘発能が、ラットおよびヒトの肝細胞において検討されている(Canonero et al., 1997、上述の DNA 断片化を参照のこと)。段階希釈した本化学物質に 48 時間曝露した後、低張処理、固定およびフォイルゲン染色(クロマチンの染色)を行った。なお、この試験では、細胞毒性の評価は行っていない。ラット肝細胞を用いて 2 回試行した結果、いずれの回も、単一の濃度[それぞれ 1.0 mM(147 µg/mL) および 1.8 mM(265 µg/mL)]において、小核を有する肝細胞数に、統計学的に有意な増加が認められた。また、2 人のドナーから得た肝細胞についても、0.56~3.2 mM(82~470 µg/mL)の濃度範囲で試験を行った。その結果、小核を有するヒト肝細胞の割合には、有意な増加は認められなかった。

1,4-ジクロロベンゼンの小核誘発能は、ラットおよびヒトの初代培養腎細胞においても検討

されている (Robbiano et al., 1999、上述の DNA 断片化を参照のこと)。段階希釈した 1,4-ジクロロベンゼンに 48 時間曝露した後、低張処理、固定、およびメイ-ギムザ染色を行った。この試験では、細胞毒性の評価は行っていない。試験の結果、ラットおよびヒトの腎細胞のいずれにおいても、1.8、3.2 および 5.6 mM (265、470 および 823 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の濃度範囲で、小核を有する細胞の割合が、用量依存的に増加した。

1,4-ジクロロベンゼンによる遺伝子突然変異の誘発については、マウスリンフォーマ L5178Y 細胞の *tk* 遺伝子座 (McGregor et al., 1988; Myhr et al., 1990)、ならびにチャイニーズハムスター肺 V79 細胞 (Pirovano and Milone, 1986b) および CHO 細胞 (den Boer and Hoorn, 1986a; Loveday, 1989) の *hprt* 遺伝子座を対象にして検討されている。

McGregor et al. (1988) は、7 つの試験を実施した。それらは、彼ら独自の基準を満たしたもので、うち 4 つの試験は外因性代謝活性化系の非存在下で、3 つはラット肝 S9 存在下で行われた。S9 非存在下で実施した最初の試験において、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で統計学的に有意な反応が認められ、相対総増殖率 (RTG) は約 85% であった。しかし、同試験では、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれの濃度においても、有意な反応が得られていない。同様の不確定 (inconclusive) な結果が、2 回目の試験でも得られ、非致死濃度である最高濃度 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、有意ではあるが最低限の反応がみられたのみであった。S9 非存在下で実施した 3 回目の試験では、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの細かく設定された濃度段階において、変異原性応答は認められなかったが、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における RTG は 53% と比較的高値であったため、この試験結果からは結論を導けないと判断された。S9 非存在下で実施した最後の試験では、95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの細かく設定された濃度段階において、変異原性応答は認められなかった。95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での RTG は 16% であり、これより 1 段階高い濃度 (105 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は致死濃度であった。ラット肝 S9 存在下で実施した最初の試験では、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで、突然変異頻度に有意な変化は認められなかった。これより 1 段階高い濃度 (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は、致死濃度であった。しかし、これに続く 2 つの試験では、突然変異頻度の有意な増加が認められた。これらのうち、先に行われた試験では、65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および非致死濃度である最高濃度 95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において有意な反応を認めたが、これらの用量の中間にある 2 用量では有意な変化が認められなかった。さらに、非常に狭い用量範囲 (80~105 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 濃度) で実施した最後の試験においても、これと同様に明らかな用量依存性の反応は認められず、唯一最高濃度においてのみ、有意な反応が観察された。しかし、この濃度における突然変異頻度の増加は、対照値の 1.63 倍に過ぎなかった。以上の結果を総合すると、このアッセイ法に基づいた場合、1,4-ジクロロベンゼンは、変異原性については「疑わしい」物質に分類すべきであると結論される。上述のデータにより、試験でみられた統計学的に有意な反応は、本当に生じたものであり偶然ではないとしても、いずれも非常に弱く変動の大きいものであることが示されている。なお、Myhr et al. (1990) は、上述の結果をまとめただけである。

V79 細胞の *hprt* 遺伝子座を対象とした遺伝子変異原活性試験 (Pirovano and Milone, 1986b) では、ラット肝 S9 の非存在下および存在下で 2 時間培養した後、直ちに、もしくは 3 または 6 日 (培養中に誘導された突然変異体を発現させるための期間) 後に、6-チオグアニンにより突然変異体を選択した。予備試験では、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で毒性が認められた。試験の結果、ラット肝 S9 非存在下では 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで、存在下では 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度で、0 日、3 日の発現期間後または 6 日の発現期間後に、1,4-ジクロロベンゼンの変異原活性を示す結果は得られなかった。

den Boer and Hoorn (1986a) の CHO 細胞を用いた試験では、S9 mix の非存在下または存在下で 4 時間培養した後、7 日間の発現期間を設け、6-チオグアニン処置により突然変異体の選択を行った。この結果、S9 非存在下では、240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度で、1,4-ジクロロベンゼンによる突然変異の誘発を示す結果は得られず、この濃度における相対増殖率 (対照値に対する割合) は 54% であった。これより高濃度の 2 濃度 (最高濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は致死濃度であり、全細胞が死滅した。S9 存在下で実施した最初の試験では、210 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (試験全体を通じた最高濃度) における相対増殖率は 36% まで低下した。この濃度において、突然変異頻度の有意な増加が観察されたが、同様の所見が 140、105 および 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (試験を行った最低濃度) でも認められた (いずれの場合も 2 系列で培養した試料の一方のみ)。しかし、70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 105 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との間、および 105 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 210 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との間の濃度では、突然変異頻度の有意な増加は認められなかった。このように、この試験の結果が疑わしいものがあったため、再度試験が行われた。この再試験では、105~350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で培養を行ったが、この濃度範囲全体にわたり、変異原性を示唆する影響は認められなかった。したがって、この試験からは、1,4-ジクロロベンゼンに変異原性はないものと結論された。

Loveday (1989) もまた、CHO 細胞の *hprt* 遺伝子座を対象として、1,4-ジクロロベンゼンの変異原性を検討した。S9 非存在下で 16 時間培養する試験が 3 回、4 時間培養する試験が 2 回行われ、さらに、ラット肝 S9 存在下で 4 時間培養する試験が 2 回行われた。16 時間培養の試験で使用した培地には血清を添加していたが、4 時間培養の試験では添加しなかった。血清存在下で実施した 16 時間培養では、1,4-ジクロロベンゼンは、濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで耐容されたが、血清も S9 も添加しないで実施した 4 時間培養では、上限濃度は 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。ラット肝 S9 の存在下では、1 つの試験で 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は耐容されたが、別の試験では 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までしか耐容されなかった。突然変異頻度には、同一の試験の中でも別々の試験の間でも一貫性がみられず、いずれの試験においても濃度依存的な増加は認められなかった。また、異なる培養条件下で実施した 3 組の試験のそれぞれにおいてまとめた変換データの分散分析では、試験試料と溶媒対照との間に有意差は認められなかった。

これより後にも、CHO 細胞の *hprt* 遺伝子座を対象にして、1,4-ジクロロベンゼンの変異原性が検討されている。この試験ではラット肝 S9 の非存在下および存在下で、細胞を 4 時間

培養した (Tegethoff et al., 2000)。この結果、S9 非存在下では、240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度で変異原活性の誘発は認められず、この濃度における相対生存率は 77%であった。また、これより 1 段階高い濃度 (320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では、全細胞が死滅した。ラット肝 S9 存在下では、210 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で突然変異頻度の有意な増加が認められ、この濃度における相対生存率は 40%であった。これより 1 段階高い濃度 (280 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では、全細胞が死滅した。しかし、この条件で再度試験を行った結果、280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度で突然変異頻度の有意な増加は認められず、この濃度における相対生存率は 79%であった。また、これより 1 段階高い濃度では、相対生存率はわずか 1%であり、突然変異コロニーは検出されなかった。S9 存在下で実施した 2 回では、異なる結果が生じたが、2 回目における上から 2 つの高用量間の用量間隔は、経験的な観点からすると、大き過ぎるのではないかという議論が生じ得る。著者らは、この試験でみられた統計学的に有意な結果 (生存細胞 10^6 個あたり突然変異体 16.6 個) は、生存細胞 10^6 個あたり突然変異体 1~15 個という彼ら独自の背景対照データからわずかに外れているに過ぎないことを指摘している。本評価書では、この試験の結果全体からは、結論は導けない (inconclusive) と判断する。

また、BALB/3T3 細胞を用いた 1,4-ジクロロベンゼンの *in vitro* 形質転換試験も実施されている (den Boer and Hoorn, 1986b)。一連の予備毒性試験に基づき、形質転換試験に使用する標的細胞を 60~140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 72 時間 1,4-ジクロロベンゼンに曝露した。この処置の後、細胞を 4 週間培養した。正常な培養細胞は円形であり、この時点までには密集した単層を形成する。形質転換細胞は、この単層細胞の上に重層する細胞増殖またはコロニーを形成し、密に凝集してギムザ染色液で濃染する。形質転換コロニーに必須の特徴は、濃染部に線維芽細胞が無秩序に配列することである。この試験では、1,4-ジクロロベンゼンのいずれの濃度においても、培養フラスコあたりの形質転換コロニー数には、統計学的に有意な増加は認められなかった。

ポリアミンの代謝と細胞の形質転換との関係を検討するために実施されたシリアンハムスター胎仔 (SHE) 細胞を用いた研究プログラムの中で、Nguyen-Ba (1996) は、オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) および可溶性 72kDa 蛋白分解酵素に対する 1,4-ジクロロベンゼンの影響を、12-*O*-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (TPA) と対比および併用して検討した。さらに、アポトーシスの結果生じると考えられる、DNA 断片化を測定した。ODC 活性は放射性同位元素法を、蛋白分解酵素活性はカゼインまたはゼラチンを基質としたポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて測定し、アポトーシスの測定には、細胞質中に放出された BrdU 標識 DNA 断片 (180~200bp) を検出する ELISA 法を用いた。この結果、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPA では、最初の 1 時間に ODC 誘導がみられ、酵素活性は 5~6 時間で最高値 (対照値の約 2 倍) に達した後、8~10 時間後に対照値まで回帰した。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 1,4-ジクロロベンゼン単独で 5 時間処置した場合には ODC 活性への影響はみられなかったが、TPA を同

EURAR V48: 1,4-DICHLOROBENZENE

時併用して 5 時間処置した場合、または TPA で 5 時間処置した後に 1,4-ジクロロベンゼンで 2 時間処置した場合には、TPA 単独で観察された ODC 活性に比べ、わずかな影響(軽度の抑制)が認められた。一方、1,4-ジクロロベンゼンで 1 時間処置した後に TPA で 5 時間処置した場合には、ODC 活性は約 2.6 倍上昇した。同様のプロトコルにより蛋白分解酵素活性を測定した結果、同酵素活性は、TPA での 5 時間処置で約 92%に低下し、1,4-ジクロロベンゼン単独での 5 時間処置または TPA と 1,4-ジクロロベンゼンでの同時併用で 5 時間処置した場合には、わずかな増加を示した(それぞれ 105%および 109%)。また、1,4-ジクロロベンゼンで 1 時間処置した後に続けて TPA で 5 時間処置した場合には、これよりやや大きな増加(121%)が認められた。アポトーシスは、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPA により 30%、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 1,4-ジクロロベンゼンにより 25%阻害された。

Table 4.16 *In vitro* tests for genetic and related effects in cultured mammalian cells by 1,4-dichlorobenzene

| Test system | Source and purity of chemical | Result ^{a)} | | Dose ^{b)} (LED/HID) | Reference |
|---|---|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| | | Without exogenous metabolic system | With exogenous metabolic system | | |
| Unscheduled DNA synthesis, HeLa cells (scintillation counting) | not given | — | — | 500 µg/ml | <u>Pirovano and Milone (1986a) *</u> |
| Unscheduled DNA synthesis, human lymphocytes (scintillation counting) | purity 99% | — | — | 147 µg/ml | <u>Perocco (1983) *</u> |
| DNA strand breaks, etc. et alkali labile sites, rat primary hepatocytes cultures (alkaline elution assay) | Aldrich Chimica, Milan, Italy. Purity 99% | — | NT | 470 µg/ml | <u>Canonero et al. (1997)</u> |
| DNA strand breaks, etc. et alkali labile sites, human primary hepatocytes cultures (alkaline elution assay) | Aldrich Chimica, Milan, Italy. Purity 99% | — | NT | 470 µg/ml | <u>Canonero et al. (1997)</u> |
| DNA strand breaks, etc. et alkali labile sites, rat primary kidney cell cultures (Comet assay) | E. Merck, Darmstadt, Germany. Purity 99% | + | NT | 470 µg/ml | <u>Robbiano et al. (1999)</u> |
| DNA strand breaks, etc. et alkali labile sites, human primary kidney cell cultures (Comet assay) | E. Merck, Darmstadt, Germany. Purity 99% | + | NT | 470 µg/ml | <u>Robbiano et al. (1999)</u> |
| Sister chromatid exchange, Chinese hamster ovary CHO cells <i>in vitro</i> | NTP chemical repository (Radian Corp., Austin TX, USA) Purity > 99% | — | — | 150 µg/ml | <u>Galloway et al. (1987) *</u> |
| Sister chromatid exchange, human lymphocytes <i>in vitro</i> | not given | + | NT | 0.1 µg/ml | <u>Carbonell et al. (1991) *</u> |
| Chromosomal aberrations, Chinese hamster ovary CHO cells <i>in vitro</i> | NTP chemical repository (Radian Corp., Austin TX, USA) Purity > 99% | — | — | 150 µg/ml | <u>Galloway et al. (1987) *</u> |
| Chromosomal aberrations, Chinese hamster lung CHL cells <i>in vitro</i> | not given | — | NT | 5 µg/ml | Ishidate Jr. (1988) |

Table 4.16 continued overleaf

Table 4.16 continued *In vitro* tests for genetic and related effects in cultured mammalian cells by 1,4-dichlorobenzene

| Test system | Source and purity of chemical | Result a) | | Dose b) (LED/HID) | Reference |
|---|---|------------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| | | Without exogenous metabolic system | With exogenous metabolic system | | |
| Chromosomal aberrations, human lymphocytes <i>in vitro</i> | source not given. Purity 99.7% | — | NT | 100 µg/ml | Pirovano and Milone (1987) * |
| Micronuclei, rat primary hepatocytes cultures | Aldrich Chimica, Milan, Italy. Purity 99% | (+) | NT | 147 µg/ml | <u>Canonero et al. (1997)</u> |
| Micronuclei, rat primary kidney cell cultures | Aldrich Chimica, Milan, Italy. Purity 99% | + | NT | 470 µg/ml | <u>Robbiano et al. (1999)</u> |
| Micronuclei, human primary hepatocytes cultures | Aldrich Chimica, Milan, Italy. Purity 99% | — | NT | 470 µg/ml | <u>Canonero et al. (1997)</u> |
| Micronuclei, human primary kidney cell cultures | Aldrich Chimica, Milan, Italy. Purity 99% | + | NT | 470 µg/ml | <u>Robbiano et al. (1999)</u> |
| Gene mutation, mouse lymphoma L5178Y cells, <i>tk</i> locus | NTP Chemical Repository (Radin Corp., Austin, TX, USA) Purity > 99% | ? | ? | 105 µg/ml | McGregor et al. (1988) * |
| Gene mutation, Chinese hamster lung V79 cells, <i>hprt</i> locus | not given | — | — | 200 µg/ml | Pirovano and Milone (1986b) * |
| Gene mutation, Chinese hamster ovary CHO cells, <i>hprt</i> locus | Bayer AG, Wuppertal, Germany. Purity not given | — | — | 350 µg/ml | Den Boer and Hoor (1986a) * |
| Gene mutation, Chinese hamster ovary CHO cells, <i>hprt</i> locus | supplier not given. Purity 99.7% | — | — | 250 µg/ml | Loveday (1989) * |
| Gene mutation, Chinese hamster ovary CHO cells, <i>hprt</i> locus | Bayer AG, Wuppertal, Germany. Purity > 98% | ? | ? | 280 µg/ml | Tegethoff et al. (2000) |
| Cell transformation, mouse BALB/3T3 cells, focus assay | Bayer AG, Wuppertal, Germany. Purity not given | — | NT | 140 µg/ml | Den Boer and Hoor (1986b) * |

a) +, positive; (+), weak positive; —, negative; ?, inconclusive; NT, not tested; b) LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose

* tests already available in the risk assessment report dated 05/2001

Authors underlined: test not performed from validated internationally accepted test system

In vivo 試験

昆虫を用いた試験

Valencia (1982) Bioassay System Corp. (1982) が草案として作成した報告文書中に、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた伴性劣性致死試験の結果が示されている。この試験では、野生型 Canton-S の雄ショウジョウバエを、曝露量が 0,6,000 および 15,600 ppm/時間となるよう計算された 1,4-ジクロロベンゼン蒸気に曝露(曝露中および曝露前の死亡率は 3.4~23%であった)した後、X 染色体に逆位があり赤眼 (w^a) および棒眼 (B) の遺伝子を持つ Basc 系の雌と交配した。このとき、処置 7 日後に射出された精液のみを試験に用いるよう繁殖計画を立てた。続いて、F₁ 世代の雌(処置 X 染色体および無処置 X 染色体のヘテロ接合体)を個々に同腹の雄と交配させた。その F₂ 世代について、野生型のハエの有(非致死性)無(致死性)を観察した。この試験では、3 回の試行が反復して実施された。この結果、影響の検出に必要と考えられる試験個体数をはるかに上回っていたにもかかわらず、生殖細胞のいかなる段階においても、変異原性の影響は認められなかった。

DNA 付加体および結合

成熟雄 Wistar ラットおよび BALB/c マウスを用いた 3 つの試験で、¹⁴C]-1,4-ジクロロベンゼン(放射化学的純度 98%)と、DNA、RNA および蛋白質との結合が検討されている (Lattanzi et al., 1989)。第 1 の試験では、ラット 9 匹およびマウス 35 匹に、127 μCi (2.95 μmol)/kg を腹腔内投与し、22 時間後に屠殺して、肝臓、腎臓、肺および胃を摘出した。第 2 の試験では、ラット 6 匹およびマウス 12 匹を用い、放射性標識体投与の 2 日前にフェノバルビタール 100 mg/kg の腹腔内投与による前処置を施し、投与 22 時間後に屠殺した。第 3 の試験では、ラット 4 匹およびマウス 12 匹に¹⁴C]-1,4-ジクロロベンゼンを投与し、投与 72 時間後に屠殺した。ラットの各個体の肝臓および 11~12 匹分ずつ集めたマウスの肝臓、ならびにラットおよびマウスで別々に集めた腎臓、肺および胃について、結合量を測定した。この結果、最初の試験では、放射性標識体とラットの肝臓、腎臓、肺または胃由来の DNA との結合は認められなかったが、これら全臓器の RNA および蛋白質との結合が検出された。一方、マウスの臓器では放射能の DNA との結合が認められ、測定された濃度 (pmol/mg 組織) は、肺で 0.60、肝臓で 0.14、腎臓で 0.09、胃では 0.08 であった。また、マウスの全臓器で、RNA (未測定)の胃を除く) および蛋白質にも、放射能との結合が検出された。いわゆる共有結合指数 (CBI) については、マウス肝の DNA との結合における値は 14 であった。他の 2 つの試験のデータは示されていないが、フェノバルビタールでの前処置により、22 時間後の組織中 1,4-ジクロロベンゼン濃度に「わずかな影響」(増加か減少かは不明)が認められたこと、および 72 時間後の組織中放射能濃度は 22 時間後に比べはるかに低値であったことが報告されている。しかし、この試験で用いられた手法では、DNA との結合が共有結合性であるか否かは

明らかにされない。

Tian et al. (2001a)が行った試験では、無処置、もしくは異なる種類の CYP 酵素を誘導するためにエタノール、フェノバルビタールまたは 3-メチルコラントレンで処置した雄の Fischer 344/NSIc ラットに、オリーブ油に溶解した 1,4-ジクロロベンゼンを、300 または 600 mg/kg の用量で、単回腹腔内投与した。その後、24 時間後にラットを屠殺して肝臓を採取し、肝臓中の DNA を単離した。こうして得た試料を、同著者が *in vitro* 試験で用いたと同様の ³²P-ポストラベリング法(上述参照)により分析した。この結果、無処置ラットもしくはエタノールまたはフェノバルビタール処置ラットの肝臓には DNA 付加体は検出されなかったが、3-メチルコラントレン処置ラットの DNA に 2 箇所スポットが認められた。クロマトグラフィーによりこれらのスポットを分析したが、3-メチルコラントレンを単独で投与したラットで認められた 2 箇所スポットは、1,4-ジクロロベンゼンを単独投与したラットでは認められなかったことが示されている。

雄の F344 ラットの腎臓を用いた試験で、酸化的 DNA 付加体形成の有無が検討されている (Umemura et al., 2000)。この試験では、ラットに、コーン油に溶解した 1,4-ジクロロベンゼンを、0 または 300 mg/kg/日の用量で週 5 日、13 週間強制経口投与した。また、別の群には、臭素酸カリウム (500 ppm) を、13 週間飲水投与した。投与期間終了時にラットを屠殺し、腎臓を摘出してホモジナイズした後、遠心分離して核画分を採取した。ヘリウムを満たしたガラス製容器にこの核画分を入れ、暗所にて自動化法により DNA を抽出した。DNA はデオキシヌクレオチドに分解し、電気化学検出 HPLC により、8-オキシデオキシグアノシン (OH8dG) 含量を測定した。この結果、1,4-ジクロロベンゼン投与群における腎細胞核 DNA 中の OH8dG 濃度 ($0.69 \pm 0.21/10^5$ dG) には、コーン油投与対照群 ($0.56 \pm 0.17/10^5$ dG) に比べ、有意な増加はみられなかったが、臭素酸カリウム投与群では有意な増加が認められた (1.19 ± 0.27 , $p < 0.01$)。

3 人の健常なボランティア (性別は不明) を対照として、1,4-ジクロロベンゼン蒸気に 2.4~2.8 ppm の濃度で 1 時間曝露した試験が行われている。血液試料を、(a) 曝露前、(b) 曝露終了直後および (c) 曝露 1 時間後に採取した。血清を分離し、仔ウシ胸腺 DNA と共に 1 時間インキュベートした。続いて DNA を単離し、ヌクレアーゼ P1 を用いて検出感度を高めた後に、³²P-ポストラベリング法により分析を行った。この結果、曝露前後の付加体の分析結果に、差は認められなかった (Tian et al., 2001b)。

哺乳類を用いた試験

Sasaki et al. (1997) は、アルカリ単細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ) を *in vivo* レベルで実施し、雄の CD-1 マウスにおける 1,4-ジクロロベンゼンの DNA 損傷作用を検討した。

この試験では、6匹のマウスに2,000 mg/kgの1,4-ジクロロベンゼンを腹腔内投与し、3回の試料採取の各時点(投与0時間後、3時間後および24時間後)で、それぞれ2匹を屠殺した。5つの器官(肝臓、肺、腎臓、脾臓および骨髄)を採取し、各器官を静かにホモジナイズした後、遠心分離して核画分を得、これをコメットアッセイに供した。分析結果は、DNAの移動量、すなわち、泳動により展開したDNAの長さとの差として表した。投与3時間後の肝臓試料でDNAの損傷が認められ、脾臓試料でもこれより軽度の損傷を認めたが、0時間後および24時間後には認められなかった。また、腎臓、肺および骨髄においては、有意な損傷は観察されなかった。

Robbiano et al. (1999)は、1,4-ジクロロベンゼンを投与した雄のSprague-Dawleyラットの腎細胞を用いて、*in vivo* コメットアッセイを実施した。ラットには片側腎摘出術を施し、腎細胞の増殖を刺激するため、24時間後に葉酸250 mg/kgを静脈内投与した。これらのラットをコメットアッセイに供した。この試験には、ラット8匹からなる共通の対照群が設けられた(1,4-ジクロロベンゼンは、多くの試験化合物の1つであった)。3匹ずつの2群に対し、コーン油に溶解した1,4-ジクロロベンゼンを投与した。その1群には、250 mg/kgを、葉酸投与の2日後に単回強制経口投与、他の1群には、167 mg/kgを、葉酸投与直後から3日間連続して強制経口投与した。すべての群の動物を葉酸投与の4日後に屠殺した。上述の方法(哺乳類細胞を用いた試験)により、腎細胞を単離した。各個体につき100個の細胞で測定を行った結果、尾の長さ(単位は μm)の平均値および標準偏差は、対照群、250 mg/kg \times 1回投与群および167 mg/kg \times 3回投与群のそれぞれで、 3.2 ± 10.8 、 9.1 ± 14.7 および 8.0 ± 11.3 であった。いずれの投与群における値も、対照群に比べ、統計学的に有意な高値であった($p < 0.05$, Dunnettのt検定)。ただし、得られた結果の標準偏差は、かなり大きいものである。

このような試験結果であったため、より標準的な試験法により再検討されている(Brendler-Schwaab, 2002)。この試験では、Hsd:Sprague-Dawleyラット(1群4匹)に、コーン油に溶解した1,4-ジクロロベンゼンを強制経口投与した。雄を用いた試験および雌を用いた試験の2回を実施した。1回目は、0、1,000または2,000 mg/kgの用量で投与し、投与24時間後に動物を屠殺した。2回目は、1群に0 mg/kg(溶媒対照)、2群に2,000 mg/kgの用量で投与し、溶媒対照群および2,000 mg/kg投与群のうち1群を投与16時間後に、残る1群を24時間後に屠殺した。すべてのラットにおいて、*in situ*でEDTAを灌流させた後、コラゲナーゼ灌流によって無傷の腎細胞を採取し、電気泳動を用いてDNA損傷を評価した。なお、1,4-ジクロロベンゼンを投与した雌雄ともに毒性徴候がみられたが、トリパンプルー色素排除法による判定では、単離腎細胞には1,4-ジクロロベンゼンに関連した細胞毒性は認められなかった。データは、各個体につき100個の細胞で測定したコメットの尾の長さ(頭部の中心から尾の先端まで、単位は μm)の平均値および標準偏差として示した。尾の長さの平均が溶媒対照群に比べ25%を超えて用量依存的に増加した場合、生物学的に有意な増加で

あるとみなし、15%以下の増加の場合は対照群との差はないものとした。増加率が15~25%であった場合は、個別に検討を行い、科学的根拠に基づいて判断した。分析の結果、雄ラットにおいては、尾の長さの群平均および標準偏差は、0、1,000 および 2,000 mg/kg 投与群で、それぞれ 22.89 ± 1.3 、 24.25 ± 1.9 および 27.34 ± 5.8 であった。このとき、高用量群における尾の長さの増加率は対照値の19.4%であり、確定できない結果であると判断された。また、雌を用いて実施した2回目における対応データは、0、2,000(16時間)および2,000(24時間)mg/kg 投与群で、それぞれ 22.38 ± 1.7 、 31.25 ± 3.1 および 21.30 ± 4.2 であった。投与16時間後における尾の長さの増加率は対照値の39.6%であったことから、生物学的に有意な増加であると判断された。24時間後の場合には、尾の長さの増加は認められなかった。

上記2件の試験報告では、データ特性が異なっている[すなわち、Robbiano et al.(1999)の試験では平均値が小さく標準偏差が大きいのに対し、Brendler-Schwaab(2002)の試験では平均値が高く標準偏差が小さい]。

肝臓における、不定期 DNA 合成(UDS)およびS期 DNA 合成(SPS)が検討されている。この試験では、1群雌雄各6匹(一部例外あり)のB6C3F1マウスおよびF344ラットに、コーン油に溶解した1,4-ジクロロベンゼンを、0、300、600または1,000 mg/kgの用量で強制経口投与した(Sherman et al., 1998)。UDSの評価に際しては、各動物種、性別、用量群につき、それぞれ3匹の動物を投与16時間後に屠殺した。一方、SPSの評価には、マウスについては各用量群の雌雄それぞれ3匹を投与48時間後に、ラットでは各用量群の雌雄それぞれ3匹を投与96時間後に屠殺した。マウスの肝臓は*in situ*でのコラゲナーゼ灌流により、ラットの腎臓はコラゲナーゼ-トリプシン中で細切することにより、分析に供する細胞を単離した。UDSの検討では、マウス肝臓およびラット腎臓中の核1個当たりの正味粒子数は、全用量群で0未満であり、いずれの組織においても、1,4-ジクロロベンゼンによるUDSの誘発はなかったことが示された。これに対し、SPSは、雌ラットの腎臓では認められなかったが、雌雄のマウスの肝臓および雄ラットの腎臓で誘発が認められた。S期肝細胞の比率は、0、300、600 および 1,000 mg/kg 投与群の雄マウスでそれぞれ0.24%、0.46%、1.90%および1.52%、雌マウスではそれぞれ0.29%、2.61%、1.18%および4.45%であった。また、ラットにおけるS期腎細胞の比率は、0、300、600 および 1,000 mg/kg 投与群の雄でそれぞれ0.38%、0.87%、0.67%および1.01%、雌ではそれぞれ0.52%、0.48%、0.43%および0.32%であった。

このSPSアッセイの結果は、先に行われたUmemura et al.(1992)の観察結果を、ある程度裏付けるものである(4.1.2.1.3項に示した1,4-ジクロロベンゼンの肝毒性に関する他の試験も参照されたい)。

1,4-ジクロロベンゼン蒸気に全身曝露された雄のAlderley Parkラットの骨髄細胞を用いた試験により、染色体構造異常の誘発について、検討されている(Anderson and Richardson, 1976c)。

曝露蒸気は、恒温槽に入れた液体 1,4-ジクロロベンゼンに一定量の乾燥した清浄な空気を通すことにより生成した。恒温槽の温度および流量の調節、ならびに空気での希釈により、チャンバー内の蒸気濃度を所定濃度に調整した。曝露チャンバー内の濃度は、赤外線分光光度計(Walks Miran 1A)を用いてモニタリングした。この試験では、以下の 3 回の試行が実施された。(1)0 ppm(4 匹)、299 ppm(3 匹)および 682 ppm(3 匹)の 2 時間単回曝露。(2)0、75 および 500 ppm(1 群 2 匹)、1 日 5 時間、5 日間連続の複数回曝露。(3)0、75 および 500 ppm(1 群 2 匹)、1 日 5 時間、週 5 日の 3 ヶ月間反復曝露。これらの曝露において、毒性および細胞毒性は報告されていない。陽性対照群には、1 回目ではベンゼン 10、750 および 7,500 ppm を、2 および 3 回目では塩化ビニル 1,500 ppm を吸入させた。各回とも、曝露終了後 22 時間で動物を屠殺した。骨髄細胞を調製し、ラット 1 匹あたり 50 個(1 回目)または 100 個(2 および 3 回目)の細胞について、異常に関する分析を行った。ギャップ(最も多く記録された異常)を含め、データの統計学的解析を行った。その結果、3 回のいずれにおいても、対照群と 1,4-ジクロロベンゼン曝露群との間に、統計学的有意差は認められなかった。1 回目における陽性対照群では、ベンゼンによる統計学的に有意な反応が、すべての濃度にかけて用量依存的に認められた。塩化ビニル陽性対照群については、2 回目では統計学的に有意な反応を認めたが、3 回目では有意ではなかった。試験に用いられた動物数は少数であったが、2 および 3 回目(対照群の条件および曝露濃度ともに同一)のデータを併せると、1,4-ジクロロベンゼンによる統計学的に有意な影響は認められないという一貫した結論が得られた。また、陽性対照物質である塩化ビニルへの曝露では、異常細胞の比率が統計学的に有意に増加した。

In vivo における小核誘発に関しては、少なくとも 6 つの試験が実施されている。骨髄細胞を用いた 1 件の小核試験では、雄の NMRI マウス(1 群 5 匹)に、コーン油に溶解した 1,4-ジクロロベンゼン 0、94、188、266 および 355 mg/kg を、24 時間間隔で 2 回腹腔内投与した(Mohtashamipur et al., 1987)。この試験の最高用量は、同系統のマウスにおける急性腹腔内 LD₅₀ 値(2,000 mg/kg)に基づいて選択した。2 回目の投与の 6 時間後にマウスを屠殺し、骨髄塗抹標本で多染性赤血球中の小核の有無を観察した。この結果、1 回目の試行では、小核を有する多染性赤血球の発現頻度に増加はみられなかったが(毒性徴候はなかったが、細胞毒性は認められた)、2 回目では、用量依存性の増加が認められ、対照群および 4 用量の投与群のそれぞれで、細胞 1,000 個あたり 1.80、4.00、4.90、6.00 および 6.60 個であった。この試験の結果から、1,4-ジクロロベンゼンによる小核誘発は、統計学的に有意であったことが示される。

1 群雌雄各 5 匹の Bor:NMRI(SPF Han)マウスを用いて、OECD の GLP ガイドラインに準拠した試験が実施されている。この試験では、コーン油に溶解した 1,4-ジクロロベンゼンを、0 または 2,500 mg/kg(3 群)の用量で、単回強制経口投与した(Herbold, 1986; Tegethoff et al.,

2000)。溶媒対照群および投与群のうち1群を投与24時間後に、残る2群の1,4-ジクロロベンゼン投与群は投与48時間後および72時間後に屠殺した。骨髓塗抹標本を作製し、多染性赤血球中の小核の有無を観察した。投与群のマウスには、1,4-ジクロロベンゼンによる毒性徴候が持続してみられたが、試験終了まで全個体が生存した。多染性赤血球1,000個あたりの正染性赤血球の割合(雌雄合わせた結果)は、溶媒対照群ならびに投与後24時間、48時間および72時間に屠殺した群で、それぞれ928、1,058、1,604および1,921であった。投与72時間後に屠殺した群でみられた骨髓中の成熟赤血球の割合の低下が統計学的に有意であったことから、1,4-ジクロロベンゼンが造血系細胞に対して毒性を示すこと、ならびに1,4-ジクロロベンゼンやその代謝物がこの試験の標的組織に到達していたことは明らかであると考えられる。小核を有する多染性赤血球の出現頻度(雌雄合わせた結果)は、細胞1000個あたり、溶媒対照群で1.2個、投与後24時間、48時間および72時間後に屠殺した群で、それぞれ1.6、1.6および1.2個であった。なお、シクロホスファミドを20 mg/kg投与した群では、小核を有する多染性赤血球の発現頻度が有意に増加し、投与24時間後の値は、細胞1000個あたり10.0個であった。この試験の結果は、毒性用量の1,4-ジクロロベンゼンを経口投与しても、骨髓中における小核を有する細胞の割合は増加しないことを示すものである。

NMRI マウス(1群雌雄各5匹)を用い、コーン油に溶解した1,4-ジクロロベンゼン0、355および710 mg/kgを、等量に2分割して24時間間隔で腹腔内投与⁵した試験が報告されている(Herbold, 1988; Tegethoff et al., 2000)。この試験は明らかに、前出のMohtashamipur et al. (1987)の試験結果を再検討したものである。マウスは2回目の投与の6時間後に屠殺し、骨髓塗抹標本を作製して、多染性赤血球中の小核の有無を観察した。多染性赤血球1,000個あたりの正染性赤血球の割合(雌雄合わせた結果)は、溶媒対照群および2用量の投与群で、それぞれ1,072、1,184および1,307であった。最高用量群における骨髓中の成熟赤血球の割合の低下が統計学的に有意であったことから、1,4-ジクロロベンゼンが造血系細胞に対して毒性を示すこと、ならびに1,4-ジクロロベンゼンやその代謝物がこの試験の標的組織に到達していたことは明らかであると考えられる。小核を有する多染性赤血球の出現頻度(雌雄合わせた結果)は、細胞1000個あたり、溶媒対照群および2用量の投与群でそれぞれ1.6、1.3および2.1個であった。この試験の結果は、毒性用量の1,4-ジクロロベンゼンを腹腔内投与しても、骨髓中における小核を有する細胞の割合は増加しないことを示すものである。

日本環境変異原学会の小核試験共同研究グループ/哺乳動物試験研究会(CSGMT/JEMS.MMS)による第6回の共同研究において、対象化学物質の1つとして、1,4-ジクロロベンゼンが検討されている(Morita et al., 1997)。この研究では、1,4-ジクロロベン

⁵ 方法の項の表中には「p.o.(経口)」と記載されているが、本文およびその他の表では「腹腔内」とされている。

ゼンを用いた 2 つの試験、すなわち、腹腔内投与試験および強制経口投与試験が同一の研究機関で実施されている。予備試験の結果、2,150 mg/kg という急性 LD₅₀ 値(投与経路は不明)が得られた。一方の試験では、雄の CD-1 (ICR) マウス(1 群 5 匹)に、0、400、800 および 1,600 mg/kg の 1,4-ジクロロベンゼンを、24 時間間隔で 2 回腹腔内投与し、投与の 24 時間後、48 時間後および 72 時間後に屠殺した。末梢血を採取して、小核を有する赤血球の分析を行った。その結果、4 つの試験群における小核を有する赤血球の割合は、赤血球 1,000 個あたり、24 時間後でそれぞれ 1.6、1.6、1.4 および 1.8 個、48 時間後でそれぞれ 1.6、1.0、1.2 および 1.2 個、72 時間後ではそれぞれ 1.4、2.6、1.4 および 1.2 個であった。もう一方の試験では、雄の CD-1 (ICR) マウス(1 群 5 匹)に、0、500、1,000 および 2,000 mg/kg の 1,4-ジクロロベンゼンを、24 時間間隔で 2 回強制経口投与し、投与の 24 時間後、48 時間後および 72 時間後に屠殺した。末梢血を採取して、小核を有する赤血球の分析を行った。その結果、4 つの試験群における小核を有する赤血球の割合は、赤血球 1,000 個あたり、24 時間後でそれぞれ 1.6、2.2、1.6 および 0.8 個、48 時間後でそれぞれ 1.6、1.8、3.0 および 0.8 個、72 時間後ではそれぞれ 1.4、1.8、2.2 および 0.0 個であった。したがって、これらの試験により、1,4-ジクロロベンゼンは、マウスに腹腔内投与または経口投与した場合、急性 LD₅₀ 値にかなり近い用量でも、末梢血中の小核を有する赤血球の割合増加を誘発しないことが明らかにされた。

NTP(1987)は、がん原性試験と併せ、雌雄の B6C3F1 マウスを最高用量 1,800 mg/kg までの 1,4-ジクロロベンゼンに 13 週間曝露し、循環血中の赤血球について小核の有無を検討した。この結果、小核を有する細胞の出現頻度には、投与に関連した影響は認められなかった。

Robbiano et al.(1999)は、上述の処置(*in vivo* コメットアッセイの記述を参照のこと)を施されたのと同じ雄の Sprague-Dawley ラットから採取した腎細胞を観察し、小核を有する腎細胞の出現頻度を検討した。各個体につき 1,000 個の細胞を観察した結果、小核を有する細胞の出現頻度の平均値および標準偏差は、対照群、250 mg/kg × 1 回投与群および 167 mg/kg × 3 回投与群のそれぞれで、 0.73 ± 0.49 、 3.01 ± 0.45 および 3.52 ± 0.70 であった。各投与群における値は、対照群に比べ、統計学的に有意な高値を示した($p < 0.001$ 、Baily 法による出現率の比較検定)。

雄マウスを用いた優性致死作用試験が行われており、生殖能試験済みの雄の CD-1 マウス(1 群 16 匹)を、1,4-ジクロロベンゼン蒸気に 75、225 および 450 ppm の濃度で 1 日 6 時間、5 日間連続して全身曝露した(全身毒性が認められる用量であった)(Anderson and Hodge, 1976b)。雄マウス 35 匹の対照群を設け、空気に曝露した。曝露蒸気は、恒温槽に入れた液体 1,4-ジクロロベンゼンに、一定量の乾燥した清浄空気を通して生成した。恒温槽の温度および流量の調節、ならびに空気での希釈により、チャンバー内の蒸気濃度を、所定濃度に調整した。この際、赤外線分光光度計(Walks Miran 1A)を用いて、曝露チャンバー内の蒸気

濃度をモニタリングした。曝露後、雄マウス(10~12 週齢)は別々にして、それぞれ無処置の雌(9~10 週齢)2 匹と共に、5 日間ケージで飼育した。5 日後に雌をケージから出し、さらにその 2 日後に、未交配の別の雌 2 匹と同居させた。このような 1 週間単位の交配スケジュールを、8 週間連続して行った。各回の雌マウスは、雄との同居から 15 日後に屠殺し、妊娠に関する検査を実施した。この結果、交配が成立した雄の割合、または妊娠した雌の割合および個体数には、用量依存的低下は認められなかった。また、第 8 週目に交配した群を除き、妊娠雌 1 匹あたりの全着床数の平均値に、差異は認められなかった。なお、第 8 週交配群における同平均値は、対照群および投与群の用量順に、それぞれ 12.4、11.5 ($p < 0.05$)、12.2 および 10.8 ($p < 0.01$, Dunnett の t-検定)であった。第 8 週交配群における所見と投与との関連性は明確ではない。陽性対照群の 1 つとして、メタンスルホン酸エチルを使用し、150 mg/kg/日の用量で 5 日間連続経口投与した。非常に早い時期(おおよそ第 1 および第 2 週目)に交配した群では、通常の陽性影響が認められたが、ここでも、第 8 週交配群における妊娠雌 1 匹あたりの全着床数の平均値が、有意な低値を示した(10.4, $p < 0.05$)。優性致死作用の評価は、(1) 早期死亡が 1 つ以上認められた妊娠雌動物の割合、(2) 一腹あたりの平均早期死亡数、および(3) 一腹あたりの全着床数に対する平均早期死亡率のデータを指標として行った。その結果、いずれのパラメータにも、用量依存的な有意な投与の影響は認められなかった。したがって、雄マウスにおいて、1,4-ジクロロベンゼンは、優性致死作用を示さなかったと結論される。

遺伝子損傷により精子の異常が生じるかどうかは不明だが、この種の試験の 1 つをここに示す。Murthy et al. (1985) は、Sprague-Dawley の若齢雄ラット(1 群 3 匹)に、クロロホルム(0.5 mL/匹)または 0.5 mL のクロロホルムに溶解した 1,4-ジクロロベンゼン 800 mg/kg を腹腔内投与した。10 日後にラットを屠殺して、各個体につき 1,000 個以上の精巢上体精子を観察した。この結果、溶媒対照群および 1,4-ジクロロベンゼン投与群において、頭部に異常がみられた精子の平均比率は、それぞれ 1.72 ± 0.77 および 11.02 ± 1.14 ($p < 0.001$)であった。また、尾部に異常がみられた精子の比率は、それぞれ 2.92 ± 0.88 および 8.26 ± 2.35 ($p < 0.05$)であった。

Table 4.17 *In vivo* tests in mammals for the genotoxicity of 1,4-dichlorobenzene

| Test system | Source and purity of chemical | Result ^a | Dose ^b (LED/HID) | Reference |
|---|--|---|--|--------------------------------|
| DNA adducts, male Wistar rat liver, kidney, lung and stomach ([¹⁴ C]-1,4-dichlorobenzene) | Radiochemical Centre, Amersham, U.K. Sp. Act. 43 mCi/mmol.; radiochemical purity 98% | — | 127 µCi (2.95 µmol)/kg bw · 1, i.p. | <u>Lattanzi et al. (1989)*</u> |
| DNA adducts, male BALB/c mouse liver, kidney, lung and stomach ([¹⁴ C]-1,4-dichlorobenzene) | Radiochemical Centre, Amersham, U.K. Sp. Act. 43 mCi/mmol.; radiochemical purity 98% | + | 127 µCi (2.95 µmol)/kg bw · 1, i.p. | <u>Lattanzi et al. (1989)*</u> |
| DNA adducts male F344/NSIc rat liver (³² P-post-labelling) | Not given | — | 600 mg/kg bw · 1, i.p. | <u>Tian et al. (2001a)</u> |
| DNA oxygen adduct (8-oxodeoxyguanosine), male F344 rat kidney. | Wako Chemical Co., Osaka, Japan. Purity not given | — | 300 mg/kg bw/day, 5 days/wk, 13 wks, p.o. | <u>Umemura et al. (2000)</u> |
| DNA adducts human serum (3 human volunteers) (³² P-post-labelling) | Not given | — | 2,4-2,8 ppm, 1 hour, inhalation | <u>Tian (2001b)</u> |
| DNA strand breaks, etc. et alkali labile sites, male CD-1 mouse liver, lung, kidney, spleen and bone marrow (Comet assay <i>in vivo</i>) | Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan. Purity not given | + (liver > spleen) — (lung, kidney, bone marrow) | 2,000 mg/kg bw · 1, ip. | <u>Sasaki et al. (1997)</u> |
| DNA strand breaks, etc. et alkali labile sites, male Sprague-Dawley rat kidney (Comet assay <i>in vivo</i>) | E. Merck, Darmstadt, Germany. Purity 99% | (+) | 250 mg/kg bw · 1, p.o.; or 167 mg/kg bw · 3 p.o. | <u>Robbiano et al., 1999</u> |
| DNA strand breaks, etc. et alkali labile sites, male and female Sprague-Dawley rat kidney (Comet assay <i>in vivo</i>) | Bayer AG, Wuppertal, Germany. Purity 99.9% | (+) (females) ? (males) | 2,000 mg/kg bw x 1 p.o. (16 h) 2,000 mg/kg bw x 1 p.o. (24 h) | <u>Brendler-Schwaab (2002)</u> |

* tests already available in the risk assessment report dated 05/2001

Authors underlined : test not performed from validated internationally accepted test system

Table 4.17 continued overleaf

Table 4.17 continued *In vivo* tests in mammals for the genotoxicity of 1,4-dichlorobenzene

| Test system | Source and purity of chemical | Result ^a | Dose ^b (LED/HID) | Reference |
|---|--|---------------------|---|---|
| UDS in male and female B6C3F ₁ mouse liver | Standard Chlorine of Delaware, Inc., DE, USA. Purity 99.5% | — | 1,000 mg/kg bw · 1, p.o. | <u>Sherman et al. (1998)</u> |
| UDS in male and female F344 rat kidney <i>in vivo</i> | Standard Chlorine of Delaware, Inc., DE, USA. Purity 99.5% | — | 1,000 mg/kg bw · 1, p.o. | <u>Sherman et al. (1998)</u> |
| Chromosomal aberrations, Alderley Park rat bone marrow <i>in vivo</i> | ICI Ltd., Runcorn, Cheshire, U.K. Purity not given | — | 682 ppm, 2 h; or 500 ppm, 5 h/day, 5 days or 5 d/wk, 13 wks; inhalation | Anderson and Richardson (1976c)* |
| Micronucleus test, male NMRI mouse bone-marrow cells <i>in vivo</i> | E. Merck, Darmstadt, Germany. Purity 99.0% toxicity + ; ; cytotoxicity ? | + | 355 mg/kg bw · 2, i.p. | Mohtashampur et al. (1987)* |
| Micronucleus test, male and female Bor:NMRI (SPF Han) bone-marrow cells <i>in vivo</i> | Bayer AG, Wuppertal, Germany. Purity 99.9% toxicity + ; cytotoxicity + | — | 2500 mg/kg bw · 1, p.o. | Herbold (1986); Tegethoff et al., 2000* |
| Micronucleus test, male and female NMRI bone-marrow cells <i>in vivo</i> | Bayer AG, Wuppertal, Germany. Purity not given | — | 355 mg/kg bw · 2, i.p. | Herbold, 1988; Tegethoff et al. (2000)* |
| Micronucleus test, male and female B6C3F ₁ mouse peripheral blood cells <i>in vivo</i> | toxicity + ; cytotoxicity ? | — | 1,800 mg/kg bw, 13 weeks, p.o. | NTP (1987)* |
| Micronucleus test, male CD-1 (ICR) mouse peripheral blood cells <i>in vivo</i> | Not given toxicity - toxicity - | — | 2,000 mg/kg bw · 2, p.o.; or 1,600 mg/kg bw · 2, i.p. | Morita et al. (1997)* |
| Micronucleus test, male Sprague-Dawley rat kidney <i>in vivo</i> | E. Merck, Darmstadt, Germany. Purity 99% | + | 250 mg/kg bw · , p.o.; or 167 mg/kg bw · 3 p.o. | <u>Robbiano et al., 1999</u> |
| Dominant lethal test, male CD-1 mice | ICI Ltd., Runcorn, Cheshire, U.K. Purity not given toxicity + | — | 75, 225, 450 ppm, 6 h/day, 5 days, inhalation | Anderson and Hodge, (1976b)* |
| Sex linked recessive lethal mutation assay, male <i>Drosophila melanogaster</i> , germ cells | toxicity + | — | 0, 6,000, 15,600 ppm/h, inhalation | Valencia et al. (1982)* |

^a +, positive; (+), weak positive; —, negative; ?, inconclusive; NT, not tested; ^b LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose

2,5-ジクロロヒドロキノン

野生型 DNA を、銅の存在下で 2,5-ジクロロヒドロキノンとインキュベートした試験で、一本鎖および二本鎖の切断、ならびに OH8dG 形成を含む DNA 塩基の変化が観察されている。DNA 損傷は、NADH(還元型)の存在下で増大し、カタラーゼの存在下では完全に抑制された(過酸化水素の関与が示唆される)(Oikawa and Kawanishi, 1996a)。

要約

1,4-ジクロロベンゼンの遺伝子毒性に関しては、様々な短期試験において十分に検討されている。これらの試験の大半は GLP の原則に従って実施されており、ガイドライン試験法に適合するものであるが、これに該当しない試験(特に、近頃行われた試験)も含まれている。

In vitro 試験

In vitro の DNA 結合試験で、ラットやマウスの肝臓および肺の種々の細胞内画分とのインキュベーションがおこなわれ、 $[^{14}\text{C}]$ -1,4-ジクロロベンゼンと仔ウシ胸腺 DNA との結合が認められたが、腎臓の画分では DNA 結合は認められなかった。なお、付加体の単離および同定を行う試みはなされていない。また、仔ウシ胸腺 DNA を、ラット、マウスおよびヒトから得た肝ミクロソームとインキュベートした試験では、 ^{32}P -ポストラベリング法により分析を行った結果、DNA 付加体は検出されなかった。

ネズミチフス菌の TA100、TA1535、TA1537、TA1538 または TA98 株を用いて適切に実施された 2 件の試験において、1,4-ジクロロベンゼンは、代謝活性化の有無にかかわらず、変異原性を示さなかった。また、他の試験(実施または報告に不備のある試験)の結果も、この結論を支持している。出芽酵母 D7 株を用いた試験において、1,4-ジクロロベンゼンは、酵素誘導処置を施したマウスの肝臓から得た代謝活性化系の存在下で、有糸分裂遺伝子変換および復帰突然変異を誘発した。アスペルギルス・ニデュランスのメチオニン要求性変異株においては、外因性代謝活性化系が何も添加されない場合にも、復帰突然変異が誘発されたことが報告されている。ラットやヒトの初代培養肝細胞を用いた試験では、1,4-ジクロロベンゼンは、DNA 断片化を誘発しなかったが、コメントアッセイを用いた別の試験では、ラットやヒトの初代培養腎細胞において、DNA 損傷が誘発された。

1,4-ジクロロベンゼンは、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞においては、ラット肝 S9 の有無にかかわらず、姉妹染色分体交換を誘発しなかった。しかし、ヒトの末梢血リン

パル細胞では、外因性代謝活性化系が何も添加されない場合にも、姉妹染色分体交換頻度に中程度の有意な増加が認められている。また、チャイニーズハムスター細胞株およびヒトリンパ球細胞を用いた3件の *in vitro* 試験では、染色体異常の誘発はみられなかった。しかし、ラットの初代培養肝細胞、ならびにラットやヒトの初代培養腎細胞において、小核を有する細胞の発現頻度に有意な増加が認められた。なお、ヒトの初代培養肝細胞では、同所見は認められなかった。

CHO 細胞または V79 細胞の *hprt* 遺伝子座に関して実施された独立した3件の試験では、1,4-ジクロロベンゼンが遺伝子突然変異を誘発しなかったことが報告されている。一方、他の独立した2件の試験、すなわち、CHO 細胞の *hprt* 遺伝子座に関する試験およびマウスリンフォーマ細胞の *tk* 遺伝子座に関する試験では、確定的な結果は得られなかった。また、BALB/3T3 細胞を 1,4-ジクロロベンゼンで処置した試験では、形質転換の頻度の増加は認められなかった。

In vivo 試験

マウスにおける腹腔内投与試験で、肝臓、腎臓、肺または胃の DNA と [¹⁴C]-1,4-ジクロロベンゼンとの結合が観察されているが、ラットでは同所見はみられていない。また、種々の CYP 酵素を誘導するために前処置を施したラットに 1,4-ジクロロベンゼンを腹腔内投与した試験では、肝臓 DNA を ³²P-ポストラベリング法により分析したが、DNA 付加体は検出されなかった。また、ラットにおける経口投与試験では、腎細胞中の酸化的 DNA 付加体の増加は認められなかった。このように、ラットにおいては 1,4-ジクロロベンゼンと DNA との結合または付加体の形成を示す結果は得られていないが、マウスでは結合に関していくつかの証拠が示されている(付加体は分離されていない)。

コメットアッセイを用いた2件の試験において、1,4-ジクロロベンゼンを経口投与したラットの腎細胞、ならびに腹腔内投与したマウスの肝臓および脾臓で、アルカリ感受性 DNA 損傷部位の出現頻度に、有意な増加が認められた(腹腔内投与したマウスの腎臓、肺、骨髄では認められなかった)。しかし、雌雄のラットまたはマウスを用いた単回経口投与試験では、ラット腎細胞またはマウス肝細胞において、不定期 DNA 合成の誘発は認められていない。また、雌雄のマウスの肝臓および雄ラットの腎臓において、S 期 DNA 合成の増加が認められたが、雌ラットの腎臓では認められなかった。

ラットを 1,4-ジクロロベンゼンに単回または反復吸入曝露した試験では、骨髄細胞における染色体異常の出現頻度に増加は認められなかった。

等量の 1,4-ジクロロベンゼンを2回腹腔内投与した雄のマウスの骨髄において、小核を有す

る多染色性赤血球の出現頻度に用量依存的増加が確認されている。しかし、他の試験では、マウスの雌雄いずれにおいても、腹腔内投与によっても経口投与によっても、このような反応は認められていない。また、1,4-ジクロロベンゼンを腹腔内または経口投与された雄マウスにおいても、13 週間にわたり毒性用量まで経口投与された雌雄のマウスにおいても、末梢血中での小核を有する網状赤血球の出現頻度には、有意な増加は認められていない。このように、大半の試験の結果は、成熟赤血球中の小核を有する細胞の出現頻度に対して1,4-ジクロロベンゼンが影響を示すことを支持していない。しかし、腹腔内投与されたラットの腎細胞を用いた 1 件の追加的試験において、小核を有する腎細胞の出現頻度の増加が報告されている。

1,4-ジクロロベンゼンは、マウスを用いた試験で、8 週間の精子形成周期のいずれの成熟段階においても、優性致死突然変異を誘発しなかった。

全体として、1,4-ジクロロベンゼンの遺伝子毒性に関しては、細菌を用いた試験では陽性を示す結果は得られておらず、哺乳類細胞を用いた試験では、*in vitro* では不明確な結果しか得られず、*in vivo* のデータには一貫性がみられないため、明解な結論に達していない。これらのデータを考慮すると、1,4-ジクロロベンゼンは DNA との反応性を有する物質であるとは結論しがたい。いわゆる標準法による遺伝子毒性試験では1,4-ジクロロベンゼンの遺伝子毒性を示唆する結果は示されていない。標準法以外の試験では、陽性を支持する様な結果が得られているが、規制当局に完全には受け入れられない可能性がある。だが、これらの試験結果は無視できないものと考えられる。それでも、最も信頼性の高いいくつかの試験で得られた証拠の全体的な重みづけに基づいて評価すると、1,4-ジクロロベンゼンは、有意な遺伝子毒性を示さないものと判断される。

2003 年 5 月に行われた CMR の会議では、1,4-ジクロロベンゼンには有意な変異原性は認められないと判断され、危険物質の分類およびラベル表示に関する基準[第 18 次理事会指令 67/548/EEC に関する技術的進歩に適応するための 1993 年 4 月 17 日付け委員会指令 93/21/EEC の付属書 IV (Annex IV to Commission Directive 93/21/EEC of 27 April 1993 adapting to technical progress for the 18th time Council Directive 67/548/EEC)]に従い、変異原性物質の分類に該当しないとされている。

4.1.2.8 がん原性

4.1.2.8.1 動物における試験

Annex 2 を参照のこと。

経口曝露

適切に実施された 2 件の試験において、1,4-ジクロロベンゼンが、ラットおよびマウスに 2 年間経口投与された。その結果、雌雄のマウスで肝腫瘍が、雄ラットでは腎臓尿細管細胞に腺がんの発生が認められた (US NTP, 1987)。

F344/N ラットを用いた 2 年間強制経口試験では、雄ラットには 0、150 および 300 mg/kg/日、雌ラットには 0、300 および 600 mg/kg/日の用量が投与された。一般毒性が、雄では 300 mg/kg/日以上、雌では 600 mg/kg/日以上で認められた。また、腎症の発生率が、雌ラットでは 300 mg/kg/日以上用量群で (21/49、32/50、41/49)、雄では 150 mg/kg/日以上投与群で、用量依存的に増加した。この増加に伴い、腎臓に組織学的病変が認められた (腎盂の上皮過形成、腎集合管の石灰化)。さらに、雄ラットでは、腎細胞がんの発生率にも、用量依存的増加 (1/50、3/50、7/50) が認められた (300 mg/kg/日投与群で統計学的に有意な増加)。なお、試験を実施した研究所の背景対照データにおける発生率は、0.4%であった。肝腫瘍の発生はなかったが、600 mg/kg/日投与群で、軽度の肝毒性 (一過性の肝細胞増殖および肝肥大) が認められた。雄ラットでは副甲状腺の過形成もみられており、腎障害に起因するものと考えられた。雄ラットで単核細胞性白血病の発生率もわずかに増加した (5/50、7/50、11/50) が、この数値は試験を実施した研究所の対照データの範囲内にあり、統計学的に有意ではなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。雌においては、悪性腫瘍の発生数に、増加は認められなかった。

B6C3F1 マウスを用いた試験では、0、300 および 600 mg/kg/日の用量で、強制経口投与が行われた。雌雄ともに 300 mg/kg/日以上投与群で、肝臓の非腫瘍性病変 (肝細胞の過形成、変性ならびに単細胞壊死) および腎病変 (腎症、尿細管再生) の発生率に増加が認められた。600 mg/kg/日投与群では、肝細胞がんの発生率が、雄 (14/50、11/49、32/50) においても雌 (5/50、5/48、19/50) においても増加した ($p < 0.001$ で統計学的に有意)。なお、この試験では、対照群の雌における悪性肝腫瘍の発生率 (10%) が、背景対照データ (3%) に比べ高値を示していた。肝細胞腺腫の発生は、用量順に、雄で 5/50、13/49、16/50、雌で 10/50、6/48、21/50 であり、600 mg/kg/日投与群で統計学的に有意であった。600 mg/kg/日投与群の肝細胞がんを発症した雄マウスに、肝芽腫が認められた (全雄マウス 4/50 匹、肝細胞がん発症マウス 4/32 匹で統計学的有意差はなし)。肝芽腫は、マウスでは非常に発生が少ない腫瘍である (1/2080)。また、統計学的に有意ではなかったが、副腎褐色細胞腫が雄にみられ (0/47、2/48、4/49)、300 mg/kg/日投与群の 1 例は悪性であった [数値は試験を行った研究所の背景データの範囲 (2.2 ± 3.1%) 内]。この腫瘍に伴い、副腎および甲状腺の過形成が認められた。

上記 2 件の試験により、1,4-ジクロロベンゼンのがん原性が明確に示され、B6C3F1 マウスでは、雌雄とも 600 mg/kg/日以上用量で肝細胞がんが認められ、F344/N ラットでは、150

mg/kg/日以上の投与を受けた雄に、腎細胞がんが認められた。

吸入曝露

3 件の吸入試験の情報が得られている。うち 1 件は、十分な曝露期間(ラットおよびマウスにおける 104 週間試験)を設けたものであり (JBRC, 1995)、他の 2 件は、短期間(ラットにおける 76 週間試験、マウスにおける 56 週間試験)のものである (Loeser 1983, Riley 1980b)。

ラットやマウスを用いた 2 件の吸入試験(短期間)では、いずれの試験においても、1,4-ジクロロベンゼンががん原性を示すとする結果は得られていない。

Wistar ラットを用いた GLP 試験では、1 群雌雄 76~79 匹を、0、75 および 500 ppm の蒸気に、1 日 5 時間、週 5 日で 76 週間曝露した。この試験で観察された有意な異常は、500 ppm 曝露群の雌雄にみられた肝細胞過形成を伴う軽度の肝重量増加、ならびに 75 ppm 曝露群の雌で第 26 週にみられた肝重量の増加(第 76 週には認めず)および回復期間にみられた肝細胞過形成(第 76 週には認めず)だけであった。500 ppm 曝露群の雌雄では、腎重量および肝重量の増加、ならびに尿中の蛋白質およびコプロプロフィリンの増加が認められた。雄ラットに、硝子滴腎症は認められなかった。また、用量にかかわらず、悪性病変は(少なくとも毒性学的に意義のあるものは)認められなかった。したがって、非がん原性の影響に関する NOAEC は、75 ppm と判断された (Loeser, 1983; Riley, 1980a)。

Swiss マウスを 0、75 ないしは 500 ppm の蒸気に 1 日 5 時間、週 5 日で 56 週間曝露した試験(供試験動物に呼吸器感染症が認められたため、短期間で終了)では、雌マウスにおける良性または悪性腫瘍の発生率に、増加は認められなかった(75 ppm 曝露群で副鼻腔の骨肉腫が 1 例みられたのみ、雄マウスについては組織学的検査を行っていない)。5 ppm 以上の曝露群の雌では、呼吸器疾患(肺炎、マクロファージの増殖)の発生率増加も認められた。この試験では呼吸器感染症の発生がみられたため、試験結果の解釈は非常に困難である。したがって、この試験では NOAEC を確定することができなかった (Riley, 1980b)。

3 件目の吸入試験(GLP)は、F344 ラットおよび BDF1 マウス(1 群雌雄各 50 匹)を用いて実施され、0、20、75 および 300 ppm の蒸気に、1 日 6 時間、週 5 日で計 104 週間曝露した。

ラットでは、雌における死亡率は、投与群および対照群で同等であったが、雄では、300 ppm 群(64%)および 75 ppm 群(42%)で、対照値を上回った。この試験で観察された有意な異常は、腎臓(雄の 300 ppm 群)および鼻腔(雌の 300 ppm 群での呼吸上皮の好酸性変化および鼻腺の呼吸上皮化生)の非腫瘍性病変のみであった。嗅上皮の好酸性変化が、曝露群のみではなく対照群においても観察された(屠殺した動物において、対照群で雌 38/38 匹、雄 24/33 匹、

300 ppm 群で雄 12/18 匹、雌 36/36 匹、75 ppm 群では雄 17/29 匹、雌 36/38 匹)。死亡した動物にも同様の傾向が認められたが、300 ppm 群の雌雄および 75 ppm 群の雌にみられた変化の程度は、対照群に比高かった。単核細胞性白血病が、雄における背景対照データが 6~22% であるところ、9/50、14/50、10/50、13/50 の割合でみられた(統計学的有意な増加ではない)が、そのほかは、F344 ラットの雌雄に、1,4-ジクロロベンゼンに関連した腫瘍性病変の発生率増加は認められなかった。

BDF1 マウスでは、肝細胞がんの発生率の統計学的に有意な($p < 0.01$)増加が、300 ppm 群の雄(12/49、17/49、16/50、38/49)および雌(2/50、4/50、2/49、41/50)で観察された。この試験機関では、同系統のマウスにおける肝腫瘍発生率の背景対照データは、雄で 2~36%、雌では 0~4%である(Katagiri, 1998)。また、肝細胞腺腫が、統計学的に有意な($p < 0.01$)割合で、300 ppm 群の雌(2/50、10/50、6/49、20/50)において観察された(雌における背景対照データは 2~10%)。さらに、肝臓の組織球性肉腫が、300 ppm 群の雄で統計学的に有意な($p < 0.05$)割合で(0/49、3/49、1/50、6/49)、肝細胞がんを発症した個体のみ認められた(雄における背景対照データは 0~6%) (Katagiri, 1998)。肝芽腫様腫瘍(肝細胞がんの垂型、肝細胞がんの部分に肝細胞がん様病変と肝芽腫様病変が連続している)が、統計学的に有意な割合で、300 ppm 群の雌(肝細胞がんを発症した雌の 6/41 匹)および 300 ppm 群の雄(肝細胞がんを発症した雄 0/12 匹、2/17 匹、1/16 匹、8/38 匹)に認められた(無処置の BDF1 マウスにおける背景対照データは、雄で 6%、雌で 0%) (Yamate, 1990)。また、気管支肺胞がんが、統計学的に有意な($p < 0.05$)割合で、300 ppm 群の雌(4/50 匹)に認められ、この数値は、この試験施設における背景データ(0~8%)の上限値であった。300 ppm 群では、肝毒性も観察されている[肝酵素(AST、ALT、LDH、アルカリフォスファターゼ)の上昇、雌雄両方での肝重量の増加、および組織学的変化(雌雄で限局的な軽度の壊死、雄で小葉中心性肝細胞肥大)]。なお、この JBRC の報告書は、査読済みである(JBRC, 1995)。

国際がん研究機関(IARC)は、1998年11月に1,4-ジクロロベンゼンの再検討を行い、本物質を、『グループ 2B(ヒトに対して発がん性を示す可能性のある物質。現環境は、ヒトにがんを誘発する可能性のある曝露を生じ得る)』に分類すべきであると評価した。グループ 3 への下方変更(8人が賛同)が検討されたが、最終的に、作業部会はこれまでの評価『グループ 2B』を保持することを採択した(9人がグループ 2B に賛同)。

4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

血液学的な問題が生じた症例が2件報告されているが、いずれの症例についても1,4-ジクロロベンゼンとの因果関係は明らかにされていない。1件は、急性骨髄芽球性白血病で、3種のジクロロベンゼン異性体の混合物(1,2-ジクロロベンゼン 80%、1,4-ジクロロベンゼン 15%

および1,3-ジクロロベンゼン 2%)を用いて10年間電気材料の洗浄に従事していたことによる職業曝露の例であった。もう1件は、慢性リンパ球性白血病で、衣類の洗濯に前者と同様の混合物を1年に1~2L使用したことによる家庭内曝露の例であった(Girard, 1969)。

4.1.2.8.3 がん原性についての要約および考察

作用機序 - 考察

1,4-ジクロロベンゼンのがん原性については、F344 ラットおよび Wistar ラット、ならびに B6C3F1 マウス、BDF1 マウスおよび Swiss マウスへの経口投与試験や吸入曝露試験により、検討がなされている。

2年間経口投与試験では、F344 ラットの雄において150 mg/kg/日以上の用量で腎尿細管細胞の腺がんの発生が、B6C3F1 マウスにおいて600 mg/kg/日以上の用量で肝細胞がんの発生が認められた。吸入曝露によるがん原性試験では、BDF1 マウスにおいて300 ppm以上の用量で肝芽腫および組織球性肉腫を伴う肝細胞がんが観察された。一方、Wistar ラットおよび Swiss マウスを用いた吸入曝露試験(短期間曝露)では、がん原性は認められなかった。

ラットにおいて150 mg/kg/日以上の濃度でみられた腎腫瘍の形成は、動物種および性別に特異的であると考えられる。雄ラットでは、1,4-ジクロロベンゼン/ α -2u-グロブリン複合体が腎リソソームに蓄積することにより、硝子滴の蓄積および尿細管腎症が生じることが認められている。この複合体はリゾチームの異化作用に抵抗するため、腎リソソームの過負荷および細胞死が起こり、二次的に細胞増殖が促進される。これにより、腎腫瘍が形成されやすくなると考えられる(4.1.2.6.1 項の作用機序を参照のこと)。このような腎腫瘍の発生は、雄ラットに特異的にみられる硝子滴腎症に起因しており、ヒトに外挿することはできないことから、ヒトの健康における意義はないものと考えられる。したがって、これらのデータに基づいたNOAELの確定は行わない。

肝細胞腺がんは、B6C3F1 マウスへの経口投与(強制投与)では600 mg/kg/日(試験を行った最高用量)で認められ(雄の64%、雌の38%)、BDF1 マウスの吸入曝露では300 ppm(試験を行った最高用量)で認められた(雄の78%、雌の82%)。なお、この試験施設で行った過去の試験データによると、B6C3F1 マウスの対照群における肝細胞腺がんの発生頻度は雄で21.8 ± 7.7%、雌では3.1 ± 2.3%であり、BDF1 マウスにおける肝腫瘍の背景対照データは雄で2~36%、雌では0~4%である。

個体によっては、肝細胞がんに加え、肝芽腫や組織球性肉腫の併発がみられた。肝芽腫の

発生は、B6C3F1 マウスへの経口投与では 600 mg/kg/日 (雄 4/50 匹、背景対照値は 1/2,080 匹) で、BDF1 マウスの吸入曝露では 300 ppm (雄で 8/38 匹、雌では 6/41 匹) であった。また、組織球性肉腫は、BDF1 マウスの吸入曝露で、雄の 300 ppm 群に認められた (6/49 匹、この試験機関における雄の背景対照値は 0~8%)。これら 2 種類の腫瘍 (肝芽腫および組織球性肉腫) はいずれも、マウスでは非常に発生の少ない腫瘍である。マウスでは、600 mg/kg/日の用量は平均 262 ppm の濃度での吸入曝露に相当し⁶、これは、吸入曝露によるがん原性試験で得られた、肝細胞がんに関する NOAEC (75 ppm) から LOAEC (300 ppm) の範囲内にある濃度である。

なお、ラットを用いた 2 件のがん原性試験 (吸入曝露および経口曝露による試験) では、肝細胞がんの発生が認められていないことに留意すべきである。

1,4-ジクロロベンゼンは遺伝毒性物質ではないと考えられることから、肝腫瘍についてはその他の機序を検討する必要がある。

肝細胞がん (個体により肝芽腫や組織球性肉腫を併発) は、B6C3F1 マウスおよび BDF1 マウス (強制経口投与および吸入曝露) で、600 mg/kg/日および 300 ppm の用量で認められ、これらの用量では、肝毒性 (肝細胞の巨細胞化、変性および単細胞壊死) が観察された。

対照的に、ラットにおける 2 年間試験では、肝腫瘍の発生はみられず、600 mg/kg/日 (試験を行った最高用量) において、軽度の肝毒性 (一過性の肝重量増加、軽度の小葉中心性肝細胞肥大) が観察されたのみである。

ラットおよびマウスを用いた 1,4-ジクロロベンゼンの単回経口投与試験 (最高用量 1,800 mg/kg/日) または反復経口投与試験 (最高用量 600 mg/kg/日) において、細胞分裂刺激による肝細胞増殖が認められたが、このとき、肝酵素の上昇または肝細胞壊死は認められなかった (Umemura et al., 1996; Eldridge et al., 1992)。1,4-ジクロロベンゼンを投与した F344 ラットおよび B6C3F1 マウスの肝臓でも、がん原性試験と同用量において肝細胞増殖が観察されているが、ラットでは、肝がんに行進した例は全く認められなかった (Umemura et al., 1992; Butterworth, 1992)。細胞増殖については、これを下回った場合は増殖反応がみられないという閾値効果 [ラットでは 75 mg/kg/日以上 (一過性)、マウスでは 150 mg/kg/日以上 (持続性)]

⁶ 注記：経口経路から吸入経路への外挿には、以下の計算式を使用した。

$$[\text{mg}/\text{m}^3] \times \text{吸入速度} (\text{L}/\text{時間}) \times \text{曝露時間} (\text{時間}) \times \text{吸入経路による吸収率} (\%/ \text{kg}) \times 1,000 \\ = \text{mg}/\text{kg}/\text{日} \times \text{経口経路による吸収率} (\%)$$

ここで、マウスの体重 = 0.030 kg、曝露時間 = 6 時間/日、吸入経路による吸収率 = 59%、経口経路による吸収率 = 62%、吸入速度 = 多くの場合 2 L/時間 [2.8 L/時間 (Wallace-Hayes, 1994) ~ 1.8 L/時間 (Dybing et al., 1997)]。

のあることが示唆されている (Umemura et al., 1998)。しかし、持続性の増殖反応を発がんの前兆と考える場合でも、肝細胞増殖の測定だけでは、肝腫瘍の発生機序を明らかにするにも、肝がん発症を予測するにも不十分である (Melnick, 1993)。したがって、肝細胞増殖、肝毒性および肝腫瘍の関連性は、不明確である。

CF1 マウス肝を用いた試験でペルオキシソーム増殖が陰性の結果を示した (Bomhard, 1996) ことを考慮すると、マウスの肝臓に対するがん原性は、ペルオキシソーム増殖によるものではないと考えられる。

別の可能性として、肝臓に対するがん原性は腫瘍プロモーションに関連しているのではないかと考えられる。しかし、ラットの発がん 2 段階モデルにおいては、1,4-ジクロロベンゼンは、肝病巣の形成をプロモートしないことが報告されている。

発がんの機序における 1,4-ジクロロベンゼンの肝代謝の役割についても、ラット、マウスおよびヒトでの差異を考慮して、検討されるべきであろう。

In vivo では、ラットとマウスとで代謝に種差が認められており、F344 ラットや SD ラットでは 2,5-ジクロロヒドロキノンが検出されるのに対し、Wistar ラットやマウスにおいては同代謝物は検出されない。

In vitro では、ラット、マウスおよびヒトの肝ミクロソームにおける主要代謝物は、ジクロロフェノール (50%)、ヒドロキノン代謝物 (10~27%)、ならびにこれより少量のエポキシドおよびキノンのグルタチオン抱合体である。ただし、以下のとおり、ラットとマウス (およびヒト) とで、肝ミクロソーム代謝が異なることが示されている。1,4-ジクロロベンゼンの変換量は、F344 ラット、Wistar ラット、SD ラットまたはヒトのミクロソームに比べ、B6C3F1 マウスのミクロソームではるかに高値を示し、ヒドロキノン代謝物の産生量は、Wistar ラット肝ミクロソームに比べ、マウス、F344 ラットおよびヒトの肝ミクロソームで高値を示した。また、*in vitro* では、蛋白質との共有結合量は、ラットおよびヒトの肝ミクロソームに比べ、マウスで高値を示した。

クロロ(ヒドロ)キノンおよびこれらのグルタチオン抱合体の酸化還元活性が、ヒドロキノン代謝物の酸化時に活性酸素種を形成する (酸化 DNA 損傷を含む) ことを介して、発がんに関与している可能性が考えられる。*In vitro* において、野生型 DNA を 2,5-ジクロロヒドロキノンの存在下でインキュベートすると、DNA の一本鎖および二本鎖の切断、ならびに DNA 塩基の変化が起こり、このような DNA 損傷は、細胞内還元補酵素 (NADH) の存在下で増大し、過酸化水素の捕捉剤であるカタラーゼの存在下では完全に抑制されたことが示されている (Oikawa, 1996a)。アスコルビン酸の添加により、マウスでは蛋白質との共有結合

が大幅に抑制され(ヒトでも軽度に抑制)、これと同時にヒドロキノン代謝物の生成が増加(マウスだけではなくヒトでも)したことから、ベンゾキノン化合物(ヒドロキノン代謝物の酸化により生じる)が、共有結合に関与することが示唆されてはいる。しかし、ヒトおよびマウスにおいて *in vitro* で生成されるヒドロキノン代謝物の割合が同等であることを考慮すると、ヒドロキノン(ベンゾキノン)の酸化生成物が肝腫瘍の発生に関与しているという仮説は、明確に立証されているとは言えない。現在のところ、このような肝代謝の違いによっては、がん原性試験の結果を完全に説明することはできない。

マウスにおける肝腫瘍誘発の機序は、完全には解明されていない。しかし、肝腫瘍発生率が当該試験施設の背景対照値(BDF1 マウス:雄で 2~36%、雌で 0~4% ; B6C3F1 マウス:雄で 14~29%、雌で 1~5%)を超えない用量を、肝腫瘍の発生に関する NOAEL および NOAEC とすることができる(75 ppm および 300 mg/kg/日)。これより 1 段階高い用量(試験を行った最高用量)である 300 ppm および 600 mg/kg/日では、高率で肝細胞がんがみられている(BDF1 マウスの吸入曝露:雄で 78%、雌で 82%; B6C3F1 マウスへの経口投与:雄で 64%、雌で 38%)。

ヒトにおける報告例は、異性体混合物への曝露であり、情報の質が不十分で、かつ 1,4-ジクロロベンゼンとの因果関係が明確にされていない。このことを考慮すると、ヒトに関して得られたデータからは、ヒトのリスク評価において意義のある情報を得ることはできない。

要約

B6C3F1 マウスおよび BDF1 マウスを用いた試験で、肝臓に対する 1,4-ジクロロベンゼンのがん原性が明らかにされている。これらの試験では、600 mg/kg/日以上および 300 ppm 以上の用量で、肝細胞がん、肝芽腫および組織球性肉腫といった 3 種の腫瘍の発生が認められており、後 2 者はマウスでは非常にまれな腫瘍である。雄ラットでは腎腫瘍がみられているが、その発症は雄ラットに特異的な硝子滴腎症を介するものであり、ヒトに外挿することができないため、ヒトのリスク評価における意義はない。

肝臓へのがん原性については、B6C3F1 マウスでの経口投与による NOAEL は 300 mg/kg/日、BDF1 マウスでの吸入曝露による NOAEC は 75 ppm である。また、腎細胞の腺がんについては、F344 ラットでの経口投与による LOAEL は 150 mg/kg/日である。マウスにおける肝腫瘍の発生機序は明らかではないが、75 ppm および 300 mg/kg/日の投与による肝腫瘍発生率が背景データを上回らなかったことから、1,4-ジクロロベンゼンのがん原性には閾値メカニズムが存在することが考えられる(Annex 3 のグラフを参照のこと)。

動物データに関連した新たな遺伝毒性データ(ただし、1,4-ジクロロベンゼンは遺伝毒性物質ではないとされている)により、1,4-ジクロロベンゼンのがん原性を再検討し、発がん性

カテゴリ 3 (Carc. Cat 3) に分類することの妥当性が示されている。なお、この分類は、2003 年 5 月に行われた CMR 会議で承認されている。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物における試験

生殖能に対する影響

Sprague-Dawley ラット (1 群雌雄各 28 匹) を用いて、吸入曝露による 2 世代試験 (GLP) が実施されている。1,4-ジクロロベンゼンの蒸気に、0、66、211、および 538 ppm の濃度で、交配前 10 週間、交配期間中、妊娠期間中および授乳期間中 (妊娠 19 日～分娩後 5 日までの期間を除く) にわたり曝露 (1 日 6 時間、週 7 日) したところ、陰性の結果を得ている。

最高用量 (538 ppm) 群では雌雄ともに親動物に毒性の徴候がみられ、交配前の F0 親動物および F1 親動物 (第 1 世代) ならびに授乳期間中 (F1 世代) に、体重増加抑制 (対照群より 10% 減)、粘膜刺激症状や振戦、流涎といった症状が認められた。また、66 ppm 以上の曝露群の雄では、腎臓の組織学的異常 (硝子滴腎症) および腎重量の増加が認められた。さらに、538 ppm 曝露群の雌雄では、肝臓の異常 (重量増加および肝細胞肥大) が認められた。したがって、雌ラット (F0 親動物および F1 親動物) における NOAEL は約 211 ppm である。また、雄ラットでは硝子滴腎症が生じたため、LOAEL は 66 ppm である。

仔動物に毒性徴候が観察されたのは 538 ppm 群のみであるが、有意な体重減少、周産期死亡率の有意な増加、同腹仔数の減少、一腹あたりの生存胎仔数の減少が認められた。臓器の肉眼的異常、ならびに卵巣および精巣の組織学的異常は、いずれも観察されなかった。なお、発生・発達毒性影響は報告されていない。したがって、仔動物における NOAEL は、約 211 ppm である。

雄ラットでは最低用量においても腎臓の異常がみられたことから、雄における NOAEL は確定できない。したがって、雄については、親動物の NOAEL/仔動物の NOAEL の比 (P/D) も推定することができない。雌のデータから算出した P/D は 1 (211/211) であり、親動物に毒性徴候がみられない場合は、これを上回る生殖リスクはないことが示された。したがって、ラットの吸入曝露によるこの 2 世代試験における NOAEC は、211 ppm と確定される (Neeper-Bradley, 1989; Tyl, 1989)。

Sprague-Dawley ラット (1 群雌雄各 24 匹) に 0、30、90 および 270 mg/kg/日の用量で、週 7

日強制経口投与した、2世代試験(OECD試験法)が実施されている(OECD 416)。F0の雄には交配の77日前から、F0の雌には交配の14日前から分娩後21日まで、交配期間、妊娠期間、授乳期間を通じて投与を行った。切迫屠殺や途中死亡動物、および不妊の雌についてのみ組織学的検査を行い、F1およびF2仔動物には肉眼的検査を行った。この結果、まず、270 mg/kg/日投与群で親動物毒性の徴候がみられ、F1の雌雄で、軽度の体重減少(10%減)が認められた。F0およびF1の雄で、腎臓および肝臓の絶対重量および相対重量の増加がみられ、F1雄の中用量群においても相対肝重量の増加がみられた。なお、高用量群の雄における腎臓および肝臓の絶対重量および相対重量の増加は統計学的に有意で、腎毒性(変性、間質性腎炎)を伴うものであった。また、F0およびF1の雄の高用量群で、脾臓の絶対重量および相対重量の減少が認められた。なお、F0およびF1親動物では、いずれの用量においても毒性学的意義のある一般状態の変化は認められなかったと報告されているが、一般状態への影響をまとめた表は示されておらず、対照群および高用量群における体系的な組織学的検査は行われていない。

どちらの世代においても、交配開始から交尾成立までの時間、妊娠期間、受胎率、妊娠指数、総出生仔数、仔の性比、仔動物における耳介反射、把握反射および探索行動の陽性率、精巣、精巣上体または卵巣の絶対重量および相対重量に、1,4-ジクロロベンゼンによる影響は認められなかった。

270 mg/kg/日投与群で統計学的に有意な毒性徴候がみられ、2世代ともに、出生時生存仔数の減少、総死産仔数の増加および授乳期間中(授乳1~4日と5~21日の間)の一腹あたりの生存仔数の減少、仔動物の平均体重の減少(第1日、4日、7日、14日および21日)、ならびに皮膚の変化が認められた。また、同用量では、F0/F1世代における開眼日、F1/F2世代で開眼した仔動物が50%および100%に達した日、ならびにF1/F2世代の仔動物の耳介展開率が100%に達した日に、統計学的に有意な遅延が認められた。さらに、一腹あたりの正向反射試験陽性率は、両世代で統計学的に有意($p < 0.01$)に低下した。

90 mg/kg/日投与群では、F0/F1世代において、平均体重の可逆的な減少が認められた。この減少は、出生時にのみ統計学的に有意($p < 0.05$)で、出生後第4、7、14および21日には体重は顕著に増加し、陰性対照値の範囲内となった。また、F1/F2世代において、第1~4日に、総死亡仔数の統計学的に有意な($p < 0.05$)増加が観察された(第4~21日およびF0/F1世代、ならびに一腹仔数を考慮しない場合には、増加は認められなかった)。また、F1/F2世代仔動物における正向反射試験の陽性率は、統計学的に有意($p < 0.05$)に低下した。

したがって、生殖能に関するNOAELは、270 mg/kg/日と判断された。また、F0およびF1親動物におけるNOAELは90 mg/kg/日であることが判明した。しかし、仔動物では、90 mg/kg/日の用量で毒性[F1/F2で1~4日の死亡仔数の増加、および、F0/F1で平均出生時体重の減少

(孤発性、可逆性であり、出生後は回復)]が認められ、これ以上の用量群では仔動物の行動にも軽度の変化がみられた。このことから、このような発生・発達毒性影響に関する NOAEL は、30 mg/kg/日であると考えられる (Bornatowicz, 1994)。

マウスを用いた吸入曝露による優性致死試験では、生殖能に関連した異常は認められていない (Anderson, 1976b)。

発生毒性

雌の Alderley-Park ラット(各群雌 20 匹)を用い、吸入曝露(蒸気)による催奇形性試験が行われている。妊娠 6~15 日に、75、200 および 508 ppm(5%の母動物に妊娠期間の短縮がみられた以外、母体毒性徴候が認められなかった濃度)で曝露を行ったが、陰性の結果が得られている。この試験では、いかなる胎仔毒性も認められなかった(黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎仔数、一腹および胎仔体重、ならびに胎仔性比に、対照群との有意差はなかった)。また、骨格または軟組織の異常も観察されなかった(75 ppm 群の胎仔 212 例中 1 例、200 ppm 群の 203 例中 1 例で限局性腹壁ヘルニアがみられたのみ)。総じて、母体毒性の認められない用量では、胚毒性も胎仔毒性も認められなかった。したがって、母体毒性に関する NOAEL および催奇形性に関する NOAEL は、ともに 508 ppm である (Hodge, 1977)。

New Zealand ウサギ(1 群 30 匹)を用い、妊娠 6~18 日に 1,4-ジクロロベンゼンの蒸気への吸入曝露を施した催奇形性試験 (GLP) が行われている。その結果、最高用量である 800 ppm 群で母動物に軽度の毒性徴候(統計学的に有意な体重増加抑制のみ)が認められたが、胎仔毒性の徴候はみられなかった。黄体数、着床数、生存胎仔数、一腹および胎仔体重、ならびに胎仔性比には、対照群との有意差は認められなかった。吸収胚数の統計学的に有意な増加が、300 ppm 群のみで認められたが、試験機関の背景対照データの正常範囲内の値であり、胚致死作用を示唆するものではないと考えられた。800 ppm 群では、鎖骨下動脈起始異常[胎仔の 5%(6/119 例)、試験機関の対照群では 2%]、および四肢の屈曲変形(胎仔の 5%、対照群では 0%)といった、軽度の異常が認められたが、催奇形作用を示唆するものではないと考えられた。全体として、重大な先天異常、ならびに骨格および内臓の先天異常の総数には、対照群と比較して有意差は認められなかった。上記の結果から、1,4-ジクロロベンゼンは、軽度の母体毒性のみられる用量では、催奇形作用を示さないものと考えられた。したがって、母体毒性に関する NOAEL および催奇形性に関する NOAEL は、ともに 300 ppm である (Hayes, 1982, 1985)。

別の催奇形性試験(結果の短報のみ)では、雌の CD ラットを用い、250、500、750 および 1,000 mg/kg/日の用量が、妊娠 6~15 日に経口投与された。その結果、500 mg/kg/日以上で、

母体毒性徴候(体重増加抑制)が認められた。また、平均胎仔体重のごく軽微な減少が、1,000 mg/kg/日投与群で観察された(黄体数、着床数、吸収胚数および生存胎仔数に、対照群との有意差なし)。胎仔における骨格や内臓の重大な先天異常の発生率は、投与群および対照群で同等であった。骨格変異が複数みられており、500 mg/kg/日以上の用量で、過剰肋骨の発生率に用量依存的増加が認められた。これらの異常、および1,000 mg/kg/日投与群で観察された胎仔体重の減少は、ともに母体毒性の徴候と関連している可能性がある。しかし、この試験では、胚毒性や胎仔毒性を示す結果は得られていない。以上より、この試験における母体毒性に関する NOAEL および催奇形性に関する NOAEL は、ともに 250 mg/kg/日である (Giavini, 1986)。

雌の SD ラットを用い、低用量(最高用量 200 mg/kg、母体毒性徴候がない用量)の経口投与を行った催奇形性試験では、1,4-ジクロロベンゼンが催奇形性を示すという結果は得られなかった。ただし、この試験については、非常に簡潔な短報が得られているのみである (Ruddick, 1983)。

ラットおよびウサギにおいて、3 件の催奇形性試験が、経口および吸入曝露により実施されている(明らかな母体毒性が3件中1件で、軽度の母体毒性が3件中1件で報告されている)。これらの試験では、1,4-ジクロロベンゼンの催奇形性を示す結果は得られなかった。また、発生毒性影響は報告されていない。これらの試験で観察された胎仔の異常は、いずれも軽微なものであった(体重減少、軽度の先天異常)。

4.1.2.9.2 ヒトにおける試験

妊娠期間を通じて 1,4-ジクロロベンゼンを経口摂取(週に 1~2 個、5~10 g に相当)した妊娠女性の例で、出産児には異常が認められなかったことが報告されている。母親には毒性徴候(溶血性貧血)が認められたが、曝露中止後に回復がみられた (Campbell, 1970)。

ヒトのリスク評価において意義ある情報を提示するヒトのデータは、得られていない。

4.1.2.9.3 生殖毒性についての要約

ラットを用いた強制経口投与による、2 世代試験が行われている。90 mg/kg/日以上の用量で、仔動物に発生毒性がみられた[F0/F1 世代における孤発性で可逆的な出生時平均体重減少、および、F1/F2 世代における第 1~4 日での総死亡仔数増加(第 4~21 日および F0/F1 世代、ならびに一腹仔数を考慮しない場合は認められなかった。)]これとともに同用量で、軽度

の行動異常が観察されている (F1/F2 世代の仔動物における正向反射試験陽性率低下) (4 件の試験のうち 1 件で観察された。耳介反射陽性率、正向反射陽性率、眼瞼反射、把握反射および探索行動も調べられた)。270 mg/kg/日投与群で、親動物に毒性影響がみられているが、対照群および高用量群において、組織学的検査は体系的に行われていない。これらの発生毒性影響に関する NOAEL は、30 mg/kg/日と判断される。また、ラットを用いた吸入曝露による、2 世代試験が行われている。この試験においても、親動物毒性が認められた 538 ppm 群の仔動物で、毒性徴候が観察されている (体重減少、周産期死亡率の増加、同腹仔数の減少、一腹あたりの生存胎仔数の減少)。これらの毒性徴候は、経口投与試験における高用量 (270 mg/kg/日) 群にみられたと同等ないしはそれを上回るものであった。したがって、ラットを用いた吸入曝露 2 世代試験からは、NOAEC として、211 ppm が導かれる。これら 2 つの濃度 (538 ppm および 270 mg/kg/日) を比較するため計算を行った結果、血中濃度は同程度であることが明らかにされている。

中用量 (90 mg/kg/日および 211 ppm) では 2 つの試験の結果が異なっていた。いずれの試験においても親動物には毒性がみられなかったが、強制経口投与試験で仔動物に軽度の毒性が認められたのに対し、吸入曝露試験では認められなかった。このような差異 (仔動物だけの可逆性の軽度の体重減少) を検討するには、曝露経路を考慮する必要がある。強制経口投与では、吸入試験で連続曝露 (1 日 6 時間) を行った場合よりも、最高血中濃度が高値となり、より強い毒性影響が仔動物に及ぶことが考えられる。

その他のデータ (ラットにおける吸入曝露による 2 世代試験 1 件、ラットおよびウサギにおける経口および吸入曝露により実施された催奇形性試験 3 件) では、親動物毒性がみられない条件下で、生殖毒性作用または催奇形性作用が発現するという結果は示されていない。

以上のデータより、1,4-ジクロロベンゼンを生殖毒性に関して分類するのは、妥当ではないと考えられる。