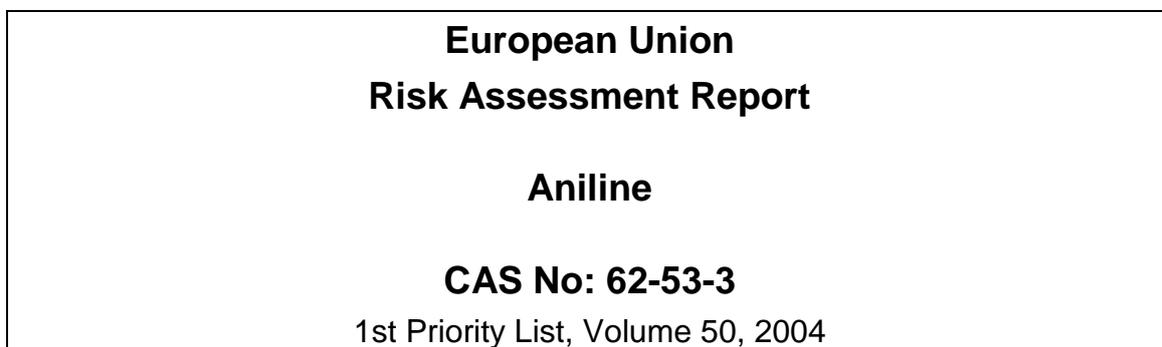


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 50, 2004)

アニリン



国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
2011年3月

本部分翻訳文書は、Anilineに関するEU Risk Assessment Report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://ecb.jrc.ec.europa.eu/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/anilinereport049.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反応関係

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、分布

4.1.2.1.1 経口曝露

動物における試験

ウサギに ^{14}C -アニリン（160～500 mg/kg 体重）を単回経口投与すると、3～8 日間で放射能の 60～90%が体内から尿中に、0.7～1.5%が糞中に、0.2%未満が呼気中に排出され、3～7%が体内に残留する（Parke, 1960）。

ラット、ヒツジおよびブタに ^{14}C -アニリン（50 mg/kg）を経口投与すると、各動物種とも 24 時間以内に投与量の半分以上が排泄された。ラットでは 24 時間以内に投与量の 96%が尿中から回収された一方、ヒツジの回収率は約 80%であった。ブタでは最初の 24 時間に 56%が尿中に排泄された。糞中へのアニリンの排泄は、3 動物種とも投与量の 2%であった（Kao et al., 1978）。

Busら（1978）の観察では、ラットに ^{14}C -アニリン塩酸塩 10、30 および 100 mg/kg を単回経口投与すると、血漿中放射能は 0.5、1.0 および 2.0 時間後に最高に達し、投与 24 時間後までに全用量とも最高濃度の 2%未満に減少した。 ^{14}C の放射能は検査した全組織に認められ、いずれの用量も腎臓が最高で、次いで肝臓、血漿、肺、心臓、脾臓、脳の順であった。投与 48 時間後の残留放射能は、3 用量とも検査した全組織で 0.1%未満であった。尿中に排泄された投与放射能の 48 時間後の回収率は、10、30 および 100 mg/kg でそれぞれ 96、91 および 77%であった。

雄 Fischer 344 ラットに ^{14}C -アニリン塩酸塩 100 mg/kg/日を1日または10日間経口投与し、最終投与の24時間後に殺処分した (Bus and Sun, 1979)。その結果、1日投与のラットにおける放射能(1 mL または湿重量 1 g 当たりのアニリン塩酸塩 μg 当量)は、赤血球が 25.2、血漿、脾臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、脳、脂肪が 0.4~4.0 であった。10日間投与後では、脾臓の放射能濃度は1日投与のラットの12.3倍に増加したが、他の組織の濃度は1.8~3.8倍に増加したのみであった。1日投与後の脾臓および肝臓における放射能の共有結合はごくわずかであった。10日間投与後の脾臓における共有結合は、肝臓よりも有意に多かった(265対 46 ng 当量/mg 蛋白)。

ラットおよびマウスに非標識アニリン (それぞれ 50 および 100 mg/kg) をあらかじめ7日間連続強制経口投与し、8日目にラットには ^{14}C -アニリン 50 または 250 mg/kg を、マウスには ^{14}C -アニリン 100 または 500 mg/kg を強制経口投与した (McCarthy et al., 1985) と、ラットおよびマウスは24時間以内に投与量のそれぞれ 89 および 72% を尿中に排泄した。検査した 11 組織のうち、 ^{14}C 放射能の DNA への結合が最も高濃度であったのは、高用量群のラットの腎臓、大腸および脾臓であった。

雄 F-344 ラットに ^{14}C -アニリン塩酸塩 100 mg/kg を1日または10日間毎日強制経口投与した (Sun and Bus, 1980) と、単回投与2時間後および6日後における共有結合した放射能 (1 mL または湿重量 1 g 当たりの pmol) は、赤血球で 160 および 4、脾臓で 5 および 1、肝臓で 15 および 1.5 であった。また、10日間投与したラットでは、赤血球で 360 および 170、脾臓で 85 および 44、肝臓で 28 および 5 であった。すなわち、アニリン塩酸塩の反復投与により、赤血球および脾臓では共有結合した放射能の蓄積が生じた。

ラットに ^{14}C -アニリン (1 mmol/kg) を1回または3回 *in vivo* 投与したとき、血液成分との結合では赤血球が最大であった。1回および3回投与後の血漿中放射能は、赤血球のそれぞれ 40 および 16% にすぎなかった。肝臓では3回の投与による放射能の増加はほとんど認められなかった (Khan et al., 1995)。

ヒトにおける経験的知見

情報なし。

4.1.2.1.2. 吸入曝露

動物における試験

ラットを 100 ppm のアニリンに、1 日における 8 もしくは 12 時間にわたり曝露した (Kim and Carlson, 1986) ところ、メトヘモグロビン濃度は 8 時間で定常状態に達した。曝露後のメトヘモグロビンの半減期は、8 時間曝露群、12 時間曝露群とも 75 分と推定された。血液または脂肪中のアニリン濃度は、曝露期間を 12 時間に延長しても増加しなかった。

動物における経口経路と吸入経路の比較

ビーグル犬の成犬 4 匹を濃度 174 mg/m³ のアニリン蒸気に 4 時間鼻部曝露した。総曝露量は 14.6 mg/kg であると算出された。3 匹は本曝露量で特異的な症状を示さず忍容したが、1 匹はストレス症状に苛まれた。メトヘモグロビン濃度は 4 時間の曝露終了時に最大となり、その値は約 5%であった。

同用量のアニリンの強制経口投与 (15 mg/kg、溶媒：生理食塩液、ビーグル犬の成犬 4 匹) では、メトヘモグロビン濃度は投与約 3 時間後に最大となり、その値は 25~30%であった。すべての犬で、鼻口部可視粘膜のチアノーゼ様変色が認められた (Bayer AG, 2000)。

ヒトにおける経験的知見

あるアニリン工場におけるアニリン曝露量 8 mg/m³ 未満の労働者 14 人中 7 人では、勤務時間終了時の平均血中メトヘモグロビン含量が 0.9%であった。健常人のメトヘモグロビン含量は、NADH 依存性還元酵素による還元のため、1%未満である (Rapoport, 1983)。また、尿中に検出されたアセトアニリドはクレアチニン 1 g 当たり 0.34 mg、アニリン (ヘモグロビン抱合体から遊離) は血液 1 L 当たり 10 µg 未満であった。一方、残りの労働者 7 人では、メトヘモグロビン含量が 1.4%、アセトアニリドがクレアチニン 1 g 当たり 27 µg、遊離アニリンが血液 1 L 当たり 123 µg であった (Lewalter and Korallus, 1985、Table 4.9 参照)。欧州人の 50%は遺伝的に N-アセチル転移酵素活性が低く、「fast acetylator」に対して「slow acetylator」と呼ばれている。

4.1.2.1.3 経皮曝露

動物における試験

情報なし。

ヒトにおける経験的知見

ヒトにおける液体アニリンの経皮吸収および代謝物 4-アミノフェノールの尿中排泄に関する試験が行われた (Piotrowski, 1957)。試験では志願者 11 人の前腕に新たに蒸留したアニリン 10 mg/cm² (ガーゼの大きさ 25 cm²) を塗布した。ガーゼは外界から遮断し、吸収時間は 5 時間とした。なお、実験用バブラーを 2 台連結したもの (吸収効率約 95%) を用いて呼気中へのアニリンの排出を調べた結果、本経路での排泄は 0.5%以下と推定された。ガーゼ層からの吸収速度は、皮膚温度 29.8~35°C で 0.18~0.72 mg/cm²/h と変動し、ガーゼを湿らせると急激に増加した (3.8 mg/cm²/h、1 時間曝露による 1 試験のみに基づく値)。アニリンの吸収量は、尿中の 4-アミノフェノール排泄量から統計解析により推測した。直線回帰分析を用いれば、アニリンの吸収量を±35%の正確さで求めることができる。

ヒト志願者での実験では、空気中のアニリン (5~30 mg/m³) の気道からの取込み (2~11 mg/h) と皮膚からの取込み (3~11 mg/h) は同程度であった (Dutkiewicz, 1961)。また、肺では 90%超の滞留が認められた。しかし、アニリンが低濃度 (10 mg/m³ 未満) の場合は、経皮吸収の方が高いという計算結果が得られた。アニリンの取込みは、空気の湿度と温度が上がるに連れて増加した (Dutkiewicz, 1961; Dutkiewicz and Piotrowski, 1961)。

男女の健康志願者 10 人 (アニリンとの職業的な接触がないもの) について、アニリン、水分 3%を含むアニリンおよびアニリン水溶液 (1 または 2%) の 30 または 60 分間の経皮吸収を検討した。試験では、志願者ごとに手 (347~459 cm²、水溶液に浸漬) または前腕 (液体アニリンおよび水分 3%を含むアニリン、26.3 cm² の限定区域となる時計皿を用いてアニリン 0.25 mL を適用) の曝露面積を幾何学的に測定・算出した。また、すべての被検者において、曝露開始後 24 時間以内の尿中 4-アミノフェノール排泄量からアニリン吸収量を算出した。4-アミノフェノールの排泄速度は、大部分の被検者で曝露開始から 4~6 時間に最大となった。アニリン吸収量と 4-アミノフェノール排泄量の比は、上述の Piotrowski (1957) の方法で算出した。曝露時間 30 分の場合の吸収速度は、水分 3%を含むアニリンと液体アニリンでそれぞれ 2.5 および 3.0 mg/cm²/h であったが、水溶液からの吸収速度はより遅かった (0.2~1.2 mg/cm²/h、曝露時間 30 または 60 分) (Baranowska-Dutkiewicz, 1982)。

種々の実験デザインおよび条件 (曝露時間、温度、水分) で行われたこれらの試験結果を総合すると、経皮吸収は最大 38%と推定される。

Table 4.9 Biological monitoring on workers being exposed to aniline under workplace conditions (Lewalter and Korallus, 1985)

Group	Met-Hb*	Compounds in urine				Aniline from
		p-amino-phenol	p-acet-aminophenol	aniline	acet-anilide	Hb-adduct
	[%]		[mg/g creatine]			[µg/l blood]
Fast acetylators**	0.9	3.6	3.4	0.38	0.34	10
Slow acetylators**	1.4	3.9	1.2	0.40	0.03	123

* Hb: haemoglobin

** n = 7

4.1.2.1.4 その他の投与経路

雄 Fischer 344 ラットに ^{14}C -アニリン 3、30 または 100 mg/kg を単回静脈投与したとき、投与直後の放射能濃度が最も高かったのは、血液、肝臓、腎臓、膀胱、および胃腸管であった。0.5 および 6 時間後では、胃および小腸の濃度が最も高かった。100 mg/kg の用量では、脾臓のみが 24 時間の間に時間依存性の放射能の減少を示さなかった。著者らは、この静脈内投与のデータから、アニリンとその代謝物アセトアニリドには腸胃循環があると結論している (Irons et al., 1980)。

アニリンは胎盤関門を通過する。これは、妊娠 Sprague-Dawley ラット (妊娠 10~12 日) に ^3H -アニリン 1.3 mg/kg を皮下投与した試験で示されている (Maickel and Snodgrass, 1973)。同試験において投与 1、2 および 4 時間後の胎仔の血漿中 ^3H 濃度は、母動物の血漿中濃度よりもわずかに (10~15%) 高かった。血漿中の半減期は、胎仔および母動物とも同様に 1.5 時間であった。アニリンは胎仔の脳と心臓からも速やかに回収されたが、母動物より明らかに低濃度であり、肝組織では母動物の濃度の約半分であった。

4.1.2.1.5 代謝的変換

動物における試験

実験動物では、アニリンは次の主要代謝経路、すなわち、N-アセチル化、芳香環水酸化、N-水酸化および抱合 (グルクロン酸抱合、硫酸抱合) またはこれらの反応の組合せによって代謝される (Figure 1 に示す。Appendix E 参照)。

ウサギでは、アニリン (160~500 mg/kg の単回経口投与) の平均 70% が 3 日以内に 4-アミノフェノールとして尿中に排泄される。アニリン 200 mg/kg を単回経口投与したウサギでは、4-アミノフェニルグルクロニド 9%、4-アセトアミドフェニルグルクロニド 17% であ

り、500 mg/kg では、これらがそれぞれ 22 および 25%となるのに加え、2-アミノフェノール (9%)、3-アミノフェノール (0.1%)、フェニルスルファミン酸 (5.5%)、アニリン-N-グルクロニド (3.5%) およびアセトアニリド (0.2%) が生成される。異性体のジヒドロキシアニリン類と遊離の 2-および 4-アセトアミドフェノールは尿中にはみられない。一方、イヌでは、アニリン (175 および 200 mg/kg の単回経口投与) の約 20%が 16 時間以内に、約 50%が 2 日以内に尿中に排泄される。主要代謝物は 2-アミノフェノール (25%)、4-アミノフェノール (11%) およびアニリンの抱合体 (5%) である。ウサギおよびイヌとも、尿中の代謝物からは N-メチル化または脱アミノ化の形跡は認められなかった。アニリンを投与した各動物種において尿中に排泄された 4-アミノフェノールと 2-アミノフェノールの比は、スナネズミ 15、モルモット 11、ゴールデンハムスター10、ウサギ 6、ラット 6 (雄) および 2.5 (雌)、ニワトリ 4、マウス 3、フェレット 1、イヌ 0.5、ネコ 0.4 であった (Parke, 1960)。

ヒツジ、ブタおよびラットにおいて、経口投与したアニリン (50 mg/kg) の *in vivo* での代謝を検討した。その結果、24 時間後のアニリンの主要代謝物は N-アセチル誘導体であり、ヒツジ、ブタおよびラットの尿中代謝物のそれぞれ 82、85 および 76%を占めていた。ヒツジおよびブタでは N-アセチル-4-アミノフェニルグルクロニドが主要代謝物(それぞれ 60 および 66%) であったのに対し、ラットでは N-アセチル-4-アミノフェニル硫酸塩が主要代謝物 (56%) であった。これらの動物種ではより少量の尿中代謝物として、2-および 4-アミノフェノールの O 抱合体 (約 20%)、アセトアニリド (約 3%) および N-アセチル-4-アミノフェノール (約 10%) が認められた。アニリンの N-グルクロン酸抱合体類や硫酸抱合体類、または遊離アニリンは、尿中代謝物としては検出されなかった (Kao et al., 1978)。

ラットでは、主要代謝物 N-アセチル-4-アミノフェノールは主に硫酸抱合体として排泄される (50 mg/kg まで) が、高用量になると飽和がみられ、4-アミノフェニル硫酸塩および N-アセチル-4-アミノフェニルグルクロニドが生成されるようになる。一方、マウス、ヒツジおよびブタではグルクロン酸抱合が主要経路であり、飽和は認められなかった (Kao et al., 1978; McCarthy et al., 1985)。高用量でもこの排出経路を維持していることで、マウスはラットよりアニリンおよびその代謝物を効果的に排泄できる。マウスはラットより 2 位が水酸化されたアニリン誘導体の生成が多く、4-アミノフェノールと 2-アミノフェノールの比は、ラットで 8.1、マウスで 1.6 であった。ラットおよびマウスに前投与しても肝臓のアニリン 4-水酸化酵素や N-水酸化酵素の動態値は変化しなかったが、マウスの肝チトクロム P-450 は 0.23 nmol/mg 蛋白から 0.49 nmol/mg 蛋白に増加した。McCarthy ら (1985) は、肝酵素活性の量的解析、種々の組織における高分子と結合した放射能標識物活性、および尿中に排泄されるアニリンの代謝物から、マウスはラットよりアニリンの代謝能 (N-アセチル化を介するもの) と解毒能が高く、(ラットとは異なり) 曝露量が増加しても代謝は限

界に達せず、さらに「反応性代謝物」の生成量も少ないと結論した。また、アニリンの影響に対する雄ラットの感受性の高さも、アニリン代謝（アニリン水酸化酵素活性、チトクロム P-450 量、ミクロソームのアニリン誘導性結合スペクトル）における雌雄間の量的な差に関連している可能性があることが、Sprague-Dawley ラットを用いた試験で示されている（Pence and Schnell, 1979）。

ラットでは、50 もしくは 100 mg/kg のアニリンを 7 日間強制経口投与しても、肝臓のミクロソーム酵素に変化はみられなかった（McCarthy et al., 1985）。アニリンと高分子との結合の検討では、腎臓、脾臓、肝臓および消化管が標的組織となり、蛋白、RNA、および少量ながら無視できないレベルの DNA との結合が認められた。マウスではラットより高分子との結合が少なかった（4.1.2.7 項参照）。また、ヘモグロビン結合指数もマウス（2.2）の方がラット（22.0）より低かった（Albrecht and Neumann, 1985; Birnerand Neumann, 1988）。

アニリンのアセトアニリド（N-アセチルアニリン）への N-アセチル化は、肝臓の N-アセチル転移酵素によって触媒される。一方、アニリンの 2-または 4-アミノフェノールへの芳香環水酸化にはチトクロム P-450 酵素系（アニリン水酸化酵素）が関わっている。また、アニリンがチトクロム P-450 酵素系によって N-水酸化される代謝経路では、N-フェニルヒドロキシルアミンが産生される。N-アセチル化はアニリン解毒の重要な経路であり、N-水酸化はアニリンがメトヘモグロビン血症などの毒性を発現させる主要経路であると考えられている。

Eyer ら（1980）は、ラットの摘出灌流肝臓（ヘモグロビン非含有）でアニリンの N-水酸化を検討した。その結果、単回の灌流では N-水酸化はみられなかったが、灌流液が赤血球を含んでいる場合には、循環灌流でわずかに N-水酸化が認められた。

アニリンのメトヘモグロビン形成能はフェニルヒドロキシルアミンの生成に基づくものであるが、代謝物 2-および 4-アミノフェノールも関係している。ただし、これらのうちでフェニルヒドロキシルアミンの活性が最も高い。酸素存在下でヘモグロビンは酸化されてメトヘモグロビンになり、代謝物フェニルヒドロキシルアミンはニトロソベンゼンになる（「共役酸化」）。ニトロソベンゼンは酵素的に還元され、赤血球内でのサイクルが再開される。この共役酸化の起こりやすさは種類によって異なるが、このようにして芳香族ヒドロキシルアミン 1 分子はメトヘモグロビン数分子を形成できる（Kiese, 1974）。*In vitro*（ラット赤血球懸濁液）におけるフェニルヒドロキシルアミン、2-アミノフェノールおよび 4-アミノフェノールの相対的メトヘモグロビン形成能は、おおよそ 10 : 5 : 1 であった。この *in vitro* のデータに比べ、それらアミノフェノール類をラットに腹腔内投与したときのメト

ヘモグロビン血症の相対的誘発能は、フェニルヒドロキシルアミンとの比較で 100 : 4 : 1 と低い、これは明らかに *in vivo* におけるそれらアミノフェノール類の速やかな排泄によるものである (Harrison Jr. and Jollow, 1987)。

電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法を用いて、雄 Sprague Dawley ラットとヒトの赤血球および血液における *in vitro* または *in vivo* での 5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキサイド (DMPO)/ヘモグロビンチイルラジカル付加体および DMPO/グルタチイルラジカル付加体形成を検討した。その結果、アニリン、フェニルヒドロキシルアミンおよびニトロソベンゼンはすべて、*in vivo* で同一代謝物、おそらくはフェニルヒドロニトロキシドラジカル類 (フェニルヒドロキシルアミンと酸化ヘモグロビンとの反応で生成) となり、これが赤血球内のチオール類を酸化することが示された (Maples et al., 1990)。

ヒトにおける経験的知見

欧州人の 50% は遺伝的に N-アセチル転移酵素活性が低く、「fast acetylator」に対して「slow acetylator」と呼ばれている。アセチル化が遅い (N-アセチル転移酵素活性が低い) 状態ではアニリンからアセトアニリドへの反応が遅延し、フェニルヒドロキシルアミン、ニトロソベンゼンおよびアミノフェノールの形成、ひいてはメトヘモグロビンの形成が起きやすくなる (Lewalter and Korallus, 1985、Table 4.9 参照)。

4.1.2.1.6 トキシコキネティクス、代謝、分布の結論

アニリンは、経口、経皮および吸入曝露後の吸収が良好である。経口摂取後の吸収量は、ラットで 89~96% に達する。また、マウス、ヒツジおよびブタでの吸収量は、それぞれ 72、80 および 56% である。ヒトにおける経皮吸収は最大 38% と推定されている。代謝的変換後、代謝物は主に尿中に排泄される。イヌにおける単回経口投与後のメトヘモグロビン形成は、吸入曝露後のその 1~6 倍である。

ラットに放射能標識アニリンを 1 日投与したときの各組織中の放射能の分布は、赤血球が最高濃度を示し、これに血漿、脾臓、腎臓、肺、心臓、脳、脂肪が続く。反復投与では脾臓に放射能の蓄積がみられる。

アニリンの排除には、主にアセチル化反応と水酸化反応の組合せが関与しているようである。アセトアニリドは脱アセチル化されてアニリンに戻るか、4-水酸化されて 4-ヒドロキシアセトアニリドになる。4-ヒドロキシアセトアニリドのグルクロン酸および硫酸抱合体は、アニリンの主要尿中代謝物である。アニリンの N-アセチル化は、肝臓の N-アセチル転移酵

素で触媒される。一方、アニリンの芳香環水酸化にはチトクロム P-450 酵素系が関与する。N-水酸化によるアニリンから N-フェニルヒドロキシルアミンへの変換（さらにニトロソベンゼンへの酸化、グルタチオンとの抱合、アニリンへの再還元が起きる場合がある）は、アニリンがメトヘモグロビン血症などの毒性を発現させる主要経路である。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

アニリンの急性毒性は、ラットおよびウサギを用いた実験では投与経路にかかわらず重度である。また、ネコはメトヘモグロビン形成が著しい動物種であるため、反応の感受性が高くなる。アニリンは皮膚と肺から吸収されてメトヘモグロビンを形成させ、主な毒性としてチアノーゼ、振戦、流涙、呼吸障害を発現させる。

経口曝露

ラットの経口 LD₅₀ は、442 mg/kg (Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 1969) から雌は 780 mg/kg、雄は 930 mg/kg (Bier and Oliveira, 1980) までであった。一方、ネコでは高度なメトヘモグロビン形成のため、50 mg/kg および 100 mg/kg の経口投与後、2 匹中 1 匹が死亡した。

雄ラットに未希釈のアニリン（純度の記載なし）を 215、316、464、681 および 1000 mg/kg の用量で投与した試験では、経口 LD₅₀ は 442 mg/kg であった。経口投与後に死亡が認められたのは、464 mg/kg (4/5 例)、681 mg/kg (4/5 例)、1000 mg/kg (5/5 例) であった。臨床症状としては、振戦、線維性収縮、呼吸数増加、チアノーゼ、痙攣、体温低下、流涎、虚脱が認められた。剖検では、生存動物において消化管の炎症が、死亡動物において肺の充血および消化管の出血が観察された。その他の詳細については報告されていない (Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 未公開報告, 1969)。

1978 年の EPA ガイドラインに従って行われた試験において、経口 LD₅₀ は雌ラットで 780 mg/kg、雄ラットで 930 mg/kg と算出された。試験では、ラット（1 群雌雄各 5 匹以上）に未希釈のアニリン（純度の記載なし）を 500、622.9、775.9、866、966.6、1204.1 および 1500 mg/kg の用量で投与した。経口投与後に死亡が認められたのは、622.9 mg/kg（雌 1/5 例、雄 0/5 例）、775.9 mg/kg（雌 4/5 例、雄 2/5 例）、866 mg/kg（雌 5/10 例、雄 2/10 例）および 966.6 mg/kg 以上（全例）であった。死亡は投与 24 時間以内に認められ、さらに遅発性の死亡が投与後 7 日間に散見された。臨床症状としては、チアノーゼ、流涙、振戦、

頻呼吸、嗜眠が認められた。剖検では、胃出血、膀胱拡張および回腸に対する刺激性の徴候が観察された (Bier and Oliveira, 1980)。

経口投与後のメトヘモグロビン形成を検出する試験において、雄ネコ 2 匹中 1 匹がアニリン p.a. (MERCK) 102.2 mg/kg の強制経口投与後に死亡した。試験では、アニリン (トラガンスに混ぜた 0.05~1% の水性乳剤) をネコ 10 匹に 1.0、2.6、5.1、10.2、25.6、51.1 および 102.2 mg/kg の用量で経口投与した。その結果、2.6 mg/kg 投与 1 日後に軽度のチアノーゼが認められ、51.1 mg/kg では高度のチアノーゼならびに歩行失調、弛緩および異常発声が観察された。102.2 mg/kg では雄ネコ 2 匹中 1 匹が死亡した (BASF AG, 未公開報告, 1970)。

経口投与後のメトヘモグロビンを検出する同様の試験では、51.1 mg/kg の経口投与後にネコ 2 匹中 1 匹が死亡した (アニリン p.a. (MERCK) を、チローゼに混ぜた 0.5% の水性乳剤として投与)。投与約 2 時間後、ネコは浅速呼吸とチアノーゼを示し、1 匹では加えて嘔吐と流涎も認められた。投与 4 日後に死亡したネコでは、チアノーゼが 2 日間認められ、その後、弛緩、散発的な異常発声、散瞳が観察された。病理学的検査では、肺に投与されてしまったことによると考えられる急性肺炎が認められた。双方のネコともメトヘモグロビン濃度は 4 時間以内に 80% を超えたが、2~3 日以内に正常の割合にまで減少した (BASF AG, 未公開報告, 1971)。

さらにネコを用いて、アニリン (99%、溶媒：ポリエチレングリコール 400) の経口投与後のメトヘモグロビンおよびハイツ小体形成について検討が行われた。試験では、ネコ 2 匹に 10 mg/kg および 50 mg/kg の用量で経口投与したところ、メトヘモグロビン含量が 60%、ハイツ小体量が 55% 増加した。また、メトヘモグロビン濃度とハイツ小体量を投与 0、3、7、24 および 30 時間後に測定した結果、値は投与 24 時間後に最大となり、30 時間後に減少した。報告された症状は、50 mg/kg 投与後の体重減少のみであった (Bayer AG, 未公開報告, 1984)。

ビーグル犬 4 匹 (雌雄各 2 匹、約 1 歳齢、体重約 11~18 kg) にアニリン (純度 98% 以上) 15 mg/kg を、生理食塩液を溶媒として経口投与し、メトヘモグロビン濃度を投与前、投与後 5 回 (45 分後~4 時間 30 分後) および投与 24 時間後に測定した。その結果、最高濃度は 3 時間後に認められ、同時点のメトヘモグロビン濃度は 19~29% であった。翌日の濃度は投与前と同程度であった (0.6% に対し 0.8%)。アニリン投与直後から可視粘膜 (結膜、鼻腔、口腔などの粘膜) にチアノーゼ様の変化が観察されたが、投与翌日にはすべてのイヌが見たところ正常であった。被験物質による死亡はなかった。これらのイヌは 2 週間前に濃度 0.174 mg/L のアニリンに 4 時間吸入曝露されていた。用量 15 mg/kg は、本用量と

吸入濃度 0.174 mg/L とを直接比較できるように設定されていた (Bayer AG, 2000)。

雄ラット (非絶食) にアニリン (再蒸留) を、生理食塩液を溶媒として単回経口投与した。その結果、20 mg/kg では、メトヘモグロビン濃度が対照群のラット 2.4% に対し 3.3% と軽度増加した。メトヘモグロビン濃度は、20、40、100 または 200 mg/kg では 12% から 16% まで増加し、300 mg/kg では 18% に、1000 mg/kg では 48% になった。これらの最高値は通常、投与後 1~4 時間以内に認められた。メトヘモグロビン濃度の可逆性に関するデータはなかった。また、死亡は報告されなかった。著者らは、ラットにおけるアニリンの単回経口投与後の無影響量を 20 mg/kg と結論している (Jenkins et al., 1972)。

吸入曝露

ラットの吸入 LC₅₀ は曝露方法によって異なり、頭部曝露で 3.3 mg/L/4 時間、全身曝露で 1 mg/L/4 時間 (Carpenter et al., 1949) または 1.9 mg/L/4 時間 (DuPont de Nemours and Co., 1982) であった。

1982 年の EPA ガイドラインに従って行われた試験で、頭部曝露法により、ラット各群 10 匹をアニリン (純度の記載なし) の蒸気/エアロゾルに濃度 681、790、834 および 896 ppm で 4 時間単回曝露したところ、LC₅₀ は 839 ppm/4 時間 (3.27 mg/L/4 時間) であった。試験では、80~100°C に加熱した三口丸底フラスコ中の液体アニリン上に窒素を通してアニリンを含む空気を発生させ、このアニリン蒸気/エアロゾルを、酸素を豊富に含む加湿した空気で希釈して曝露チャンバーに送り込んだ。チャンバー内の空気サンプルは 30 分ごとに分析した。死亡は 790 ppm (2/10 例)、834 ppm (5/10 例)、896 ppm (8/10 例) で認められた。曝露時には、チアノーゼ、振戦、虚脱などの症状が曝露 48 時間後まで、角膜混濁が曝露 14 日後まで認められ、更に赤褐色鼻汁と紅涙が観察された。曝露後の症状としては、蒼白、ラッセル音および頭部と顔面の脱毛が認められ、790 ppm の曝露 4 時間後には軽度から高度の角膜損傷が観察された (DuPont de Nemours and Co., 未公開報告, 1982)。

1982 年の EPA ガイドラインに従って行われた試験で、全身曝露法により、ラット各群 10 匹をアニリンの蒸気/エアロゾルに濃度 359、400、453、530 および 786 ppm で 4 時間単回曝露したところ、LC₅₀ は 478 ppm/4 時間 (1.86 mg/L/4 時間) であった。試験では、80~100°C に加熱した三口丸底フラスコ中の液体アニリン (純度の記載なし) 上に窒素を通してアニリンを含む空気を発生させ、このアニリン蒸気/エアロゾルを、酸素を豊富に含む加湿した空気で希釈して曝露チャンバーに送り込んだ。チャンバー内の空気サンプルは 30 分ごとに分析した。死亡は 400 ppm (2/10 例)、453 ppm (4/10 例)、530 ppm (7/10 例)、786 ppm (10/10 例、24 時間以内) で認められた。曝露時には、チアノーゼ、振戦、

流涙、流涎などの症状が曝露 48 時間後まで認められ、更に虚脱とラッセル音が観察された。曝露後の症状としては、蒼白、頭部と顔面の脱毛、ならびに口部、鼻部および鼻端の赤褐色の汚れが認められた (DuPont de Nemours and Co., 未公開報告, 1982)。

全身曝露法により、ラット 6 匹をアニリン (純度の記載なし) の蒸気/エアロゾルに 4 時間単回曝露したところ、概略の LC₅₀ 値は 250 ppm/4 時間 (約 1 mg/L/4 時間) であった。250 ppm では 6 匹中 2~4 匹が死亡した。その他のデータは報告されていない (Carpenter et al., 1949)。

ビーグル犬 4 匹 (雌雄各 2 匹、約 1 歳齢、体重約 11~18 kg) を濃度 0.174 mg/L のアニリンに 4 時間 (鼻部) 曝露した。イヌを選択した理由は、この動物種の呼吸パターンがヒトにより類似しているためである。用量は、0.174 mg/L の 4 時間曝露と 15 mg/kg の経口投与とを直接比較できるように設定されており、総曝露量は 14.6 mg/kg と計算された。計算では毎分呼吸量を 0.35 L/min/kg と仮定し、平均体重 8.5 kg を用いた。0.174 mg/L という濃度は、現在の職業許容曝露濃度 (MAK) 7.7 mg/m³ (= 0.0077 mg/L) の約 50 倍である。その物理化学的性質 (中等度可溶性の脂溶性ガス/蒸気で、蒸気として吸入) から、アニリンは気道に留まった後、換気制御機構よりもむしろ拡散による機序で吸収されていく。保持係数は約 20% である (すなわち、吸入されたアニリンの 80% は再呼出される)。0.174 mg/L の曝露に対し、3 匹のイヌでは特異的な症状はなく、忍容性が認められた。1 匹のイヌでは高度の過呼吸など、ストレス症状に苛まれたが、曝露翌日には完全に消失した。メトヘモグロビン濃度は曝露期間と関連していた。最高濃度は 3 匹では 3~7% (平均最大メトヘモグロビン濃度約 5%) であり、1 匹 (症状を示した個体) では 24% に達した。このばらつきは、毎分呼吸量の差によるものと考えられる。吸入後、メトヘモグロビンは半減期 100 分で正常に復した。この復帰は曝露終了直後にみられるようである。これらは、アニリンの血液への溶解が限定的であること、および血液からのアニリンの排除は大部分が呼出によることを間接的に示すものと考えられる。したがって、経口用量を吸入曝露濃度に変換することは重大な誤りを招くおそれがあると結論される。両摂取経路間にみられる明らかな相違は、アニリン蒸気の物理化学的性質 (気道内でガスとして振る舞うと考えられる) に関連しているのであろう。定常状態の曝露量について経口経路から吸入経路への変換を行う場合には、保持係数 0.2 を考慮に入れる必要がある。なお、この種の試験について適用できる特定のガイドラインはないが、曝露方法は経済協力開発機構 (OECD) の試験ガイドライン 412 に従っていた (Bayer AG, 2000)。

経皮曝露

アニリンの急性経皮毒性に関しては、LD₅₀ がウサギで 1540 mg/kg (Bio-Fax Industrial

Bio-Test Laboratories, 1969)、モルモットで 1290 mg/kg (Roundabush et al., 1965)、ネコで 254 mg/kg (Kondrashov, 1969) である。

ウサギに未希釈のアニリン (純度の記載なし) を 1000、1470、2150 および 3160 mg/kg の用量で経皮投与した試験では、投与後の死亡が 1000 mg/kg (1/5 例)、1470 mg/kg (1/5 例)、2150 mg/kg (5/5 例)、3160 mg/kg (5/5 例) で認められ、経皮 LD₅₀ は 1540 mg/kg となった。症状としては、自発運動の低下、易刺激性、流涎などが認められた。また、局所所見として皮下出血、高度の浮腫、発赤が報告された。剖検において、生存動物には特に異常はみられなかったが、死亡動物では肝臓と腎臓の充血が観察された。その他の詳細は報告されていない (Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 未公開報告, 1969)。

21 CFR (連邦規則集) 191.11 に従って行われた試験において、未希釈のアニリン (純度の記載なし) を各用量 (用量の記載なし) 4 羽のウサギの擦過皮膚に閉塞適用したところ、経皮 LD₅₀ は 820 mg/kg であった。その他のデータについては記載がない (Roundabush et al., 1965)。

21 CFR 191.11 に従って行われた試験において、雄モルモットの経皮 LD₅₀ は 1290 mg/kg であった。この試験では、未希釈のアニリン (純度の記載なし) を各用量 (用量の記載なし) 4 匹のモルモットの健常皮膚に閉塞適用した。また、モルモットの擦過皮膚で同様の試験を行ったところ、経皮 LD₅₀ は 2150 mg/kg であった。その他のデータについては報告がない (Roundabush et al., 1965)。

ネコの皮膚にアニリン (純度の記載なし) を適用したところ、経皮 LD₅₀ は 254 mg/kg であった。試験に関するその他のデータは不明である (Kondrashov, 1969)。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

アニリン/アニリン蒸気によるヒトの急性中毒は、しばしば報告がある。ヒトではアニリン 60 mL の経口摂取で死に至る。これは、体重 70 kg として約 876 mg/kg に相当する (Janik-Kurylcio et al., 1973)。

ベンゼンアミン類はすべて、肺だけでなく皮膚からも非常に速やかに吸収される。アニリン中毒はまず重篤なチアノーゼとして現われ、中毒の犠牲者は「blue boys」と呼ばれる。戦時中に訪れたあるアニリン工場では、中毒事例が日常的に発現し、「blue boys」が普通にみられた。中毒患者では、チアノーゼに続いて、頭痛、めまい、嚥下困難、悪心、嘔吐、胸部および腹部痛、または痙攣、脱力、不穏、動悸およびゆっくりした不規則呼吸 (心臓

の動きは早くて弱い) が認められる。瞳孔は収縮するが、光には反応する。体温は下降する。呼気と汗にはアニリン臭がする。尿はヘモグロビンが含まれるため暗色を呈する。重症例では、括約筋制御の喪失(尿失禁、便失禁)および肺浮腫がみられることもある。0.4~0.6 mg/L の 0.5~1 時間曝露であまり悪影響がでない場合もあるが、0.1~0.25 mg/L でも数時間曝露で軽度の症状が生じる。ヒトにおける平均致死吸入濃度は 25 mg/L または 0.35~1.43 g/kg と報告されている。労働者ではある程度の耐性を生じる場合もあるが、チアノーゼは持続し得る (Smyth, 1931)。

自殺目的でアニリン 60 mL を経口摂取した例では、摂取後 4 日目に死亡した。メトヘモグロビン濃度は初期に 85%まで増加し、4 日目には 27%に減少した。この期間中の p-アミノフェノール排泄量は約 8.4 mg/時間であった。病理学的検査では、心筋、肝臓および腎臓の変性、肺および脳の浮腫ならびに延髄の出血が認められた (Janik-Kurylcio et al., 1973)。

職場での事故 13 件の記録では、1967 年から 1992 年の間に、不慮のアニリン曝露後、チアノーゼ、悪心、めまい、呼吸障害、心臓痛がみられている。メトヘモグロビン濃度の最高値は 60%であった (BASF AG, 未公開報告, 1993 年 3 月 2 日)。

より古い報告 (Fairhall, 1957; Kiese, 1974; Sekimpi and Jones, 1986) によると、アニリン中毒の労働者では、軽度から中等度のチアノーゼ、ハインツ小体を伴う貧血、全身衰弱、精神障害、痙攣、呼吸困難が認められた。

志願者 20 人 (男性 17 人、女性 3 人) にアニリン 5、15 および 25 mg/人を 1 回ずつ、3 日間連続経口投与し、血中メトヘモグロビン濃度を測定した。その結果、メトヘモグロビン濃度の平均最大増加量は投与後 4 時間以内に認められた。アニリン用量 5 および 15 mg ではメトヘモグロビンの有意な増加はみられなかったが、25 mg ではメトヘモグロビン値がより低い用量における 1.2/1.8%に対して 2.5%にまで増加した。45 mg (志願者 5 人) ではその値は 7%まで上昇し、65 mg を投与された志願者 1 人では 15%になった。各投与の 24 時間後に採取した血液サンプルでは、男性志願者 2 人で 45 および 65 mg 投与後に軽度の血清ビリルビン増加がみられた以外、ヘマトクリット、網赤血球数、ビリルビンおよびウロビリノーゲンに有害な影響は認められなかった。また、血清蛋白、血清酵素 (種類の記載なし)、血中尿素およびチモール混濁試験にもアニリンによる有害な影響はみられず、ハインツ小体も検出されなかった。著者らは、メトヘモグロビン産生がアニリン代謝物、すなわちフェニルヒドロキシルアミン (血中濃度を *in vitro* で測定) によるものであること、またフェニルヒドロキシルアミンの触媒作用はグルコースによって促進されることがこの試験によって裏付けられたと結論している。単回経口投与 (20 mg/kg) 後のアニリンの毒性はラットの方がヒトより弱く、成人におけるアニリンの無影響量は約 15 mg/人 (約 0.21

mg/kg) であった。なお、各用量の投与間隔については特に記載がなかった (Jenkins et al., 1972)。

ナフサ (50~100%)、エチルアルコール (25~50%) およびアニリン (10~25%) を成分とする調合液で染色された靴に触れたことによる中毒が 3 例認められている。これらの症例では主たる症状として重篤なメトヘモグロビン血症が認められ、病院での緊急治療を必要とした (National Network of Vigilance, Control and Sanction of Chemical Products, 1999)。

4.1.2.2.3 急性毒性の結論

アニリン/アニリン蒸気によるヒトの急性中毒は、しばしば報告がある。ヒトではアニリン 60 mL の経口摂取で死に至る。0.4~0.6 mg/L の 0.5~1 時間曝露であまり悪影響がでない場合もあるが、0.1~0.25 mg/L でも数時間曝露で軽度の症状が生じる。ヒトにおける平均致死吸入濃度は 25 mg/L または 0.35~1.43 g/kg と報告されている。メトヘモグロビン形成に関して、成人におけるアニリンの無影響量は約 15 mg/人 (約 0.21 mg/kg) である。一方、動物実験におけるアニリンの急性毒性には、投与経路にかかわらず大きな種差がみられる (ラット経口 LD₅₀: 442~930 mg/kg、ウサギ経皮 LD₅₀: 1540 mg/kg、ラット吸入 LC₅₀: 1~3.3 mg/L/4 時間)。ネコは反応の感受性がはるかに高く、経皮 LD₅₀ は 254 mg/kg であり、経口投与では約 50~100 mg/kg という低用量で死に至る。アニリンは皮膚および肺から吸収される。イヌでは、アニリン 15 mg/kg の経口投与後 24 時間でメトヘモグロビン濃度は正常範囲内の約 0.7% となる (3 時間後は 19~29%)。同じ動物種の急性吸入試験では、メトヘモグロビン濃度の最高値は 3~24% で曝露開始 3 時間以内に認められ、約 20 時間後には正常濃度 (1% 未満) まで減少した。メトヘモグロビン濃度は半減期 100 分で正常に復した。ラットではアニリン 20 mg/kg の経口投与によってメトヘモグロビン濃度が軽度増加した (対照群 2.4% に対し、3.3%)。成人における 3 日間連続経口投与後の無影響量は、約 15 mg/人 (約 0.21 mg/kg) であった。動物およびヒトにおけるすべてのデータを考慮すると、アニリンの分類は「T、毒性」、表示は「R23、24、25、吸い込んだり、皮膚に触ったり、飲み込んだりすると危険」となる。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物における試験

皮膚

皮膚一次刺激性試験では、未希釈のアニリン（純度の記載なし）0.5 mLを投与したところ（曝露期間不明）、ウサギ6羽中6羽にグレード1の発赤が3日間を超えて認められた。浮腫は認められなかった（Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 未公開報告, 1969）。別の皮膚刺激性試験では、未希釈のアニリンをウサギの皮膚に投与したところ、軽度の発赤がみられたが、8日以内に回復した（BASF AG, 未公開報告, 1972）。

一方、ウサギで行われた急性経皮毒性の評価を目的とする未希釈のアニリンの試験（曝露期間は24時間と推察される）では、皮下出血と高度の発赤が観察された（Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 未公開報告, 1969）。

眼

Draize 試験では、未希釈のアニリン（純度の記載なし）50 mgをウサギの眼に滴下したところ、不可逆的な刺激が認められた。認められた変化は高度の角膜混濁ならびに高度の結膜発赤および浮腫で（評点法は使用せず）、8日以内には回復しなかった。被験物質液投与8日後にはパンヌス形成が認められた（BASF AG, 未公開報告, 1972）。

1949年に実施された眼刺激性試験では、未希釈のアニリン（純度の記載なし）をウサギの角膜に投与したところ、流涙、結膜の炎症および角膜の損傷が認められた。これらの影響は投与約1時間後に最大で、24～48時間以内に完全に消失した。最も高度な角膜損傷では角膜表面の約半分に変化がみられ、フルオレセインでかなり濃く染色された。損傷部分の大きさは投与量によって異なり、被験物質が涙液と混じって角膜表面に均一に広がることはなかったことが示された。飽和水溶液は同一量の未希釈アニリンと同程度の影響を及ぼすようであった。著者らは、少量でも眼に入ると眼の損傷が起こり得ると結論している（Medical Division Army Chemical Center, 1949年6月30日報告）。

ある眼刺激性試験ではウサギ6羽にアニリン（純度の記載なし）0.1 mLを投与したが、可逆性に関しては報告されていない。本試験における投与後3日以内の角膜、虹彩および結膜に対する影響の平均スコアは約52/110であった。その他の詳細については記載がない（Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 未公開報告, 1969）。

1957年に実施された Draize 法による眼刺激性試験では、ウサギの眼にアニリン（純度の記載なし）0.1 mLを投与した。その結果、角膜混濁は2日以内に回復したが、結膜刺激は投与後2日以内に最も高度になり、96時間の観察期間中には回復しなかった（Sziza and Podhragyai, 1957）。

急性吸入試験においてラットをアニリン蒸気に平均濃度約 3 mg/L/4 時間で曝露(頭部曝露)したところ、他の多くの症状に加えて眼の損傷が報告された。認められた変化は軽度から高度の角膜損傷ないし角膜混濁で、14 日後まで観察された (DuPont de Nemours, 1982)。

気道

情報なし。

4.1.2.3.2 ヒトにおける試験

アニリンの局所刺激性に関するヒトにおける入手データなし。

4.1.2.3.3 刺激性の結論

刺激性に関するヒトのデータは入手できていない。適切な皮膚刺激性/腐食性試験法による試験では、アニリンはウサギの皮膚に対して弱い刺激性しか示さない (Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 1969; BASF AG, 1972) が、眼に対しては持続的かつ重度な刺激性を示す (Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 1969; Sziza and Podhragayai, 1957; BASF AG, 1972; Medical Division Army Chemical Center, 1949)。ウサギの眼では、持続的で重度な角膜混濁および重度な結膜刺激が認められ、被験物質投与 8 日後にはパンヌス形成が観察された。したがって、アニリンの分類は「Xi、刺激性」、表示は「R41、眼に対する重篤な損傷のおそれがある」となる。

4.1.2.4 腐食性

4.1.2.4.1 動物における試験

適切な皮膚刺激性/腐食性試験法における通常曝露期間では、アニリンはウサギの皮膚に対して腐食性を示さない (Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 1969; BASF AG, 1972) が、少量でも眼に入ると眼の損傷が起こり得る (Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 1969; Sziza and Podhragayai, 1957; BASF AG, 1972; Medical Division Army Chemical Center, 1949)。

ただし、ウサギで行われた急性経皮毒性の評価を目的とする未希釈のアニリンを用いた試験 (曝露期間は 24 時間と推察される) では、皮下出血および重度の発赤が観察された (Bio-Fax Industrial Bio-Test Laboratories, 未公開報告, 1969)。

4.1.2.4.2 ヒトにおける試験

局所腐食性に関するヒトのデータは入手できていない。しかし、動物試験のデータから、眼の損傷は永続的ではないとしても、痛みのために数日間は作業ができなくなる可能性がある」と結論される (Medical Division Army Chemical Center, 1949)。

4.1.2.4.3 腐食性の結論

ウサギを用いた適切な皮膚刺激性／腐食性試験から判断すると、アニリンは皮膚に対して腐食性を示さないが、眼に対しては重篤な損傷を引き起こす可能性がある。この局所刺激性データに基づくと、アニリンは EU 規制によって皮膚に対する腐食性ありとは分類されない。

4.1.2.5 感受性

4.1.2.5.1 動物における試験

アニリンの皮膚感受性を、モルモットを用いて以下の 3 種類の試験法で調べた。これらの試験法では最適濃度を用いた (Goodwin et al., 1981)。

- 1) 試験群にモルモット 10 匹を用いた Magnusson Kligman 試験 (皮内感作濃度 1.5%、貼付感作濃度 25%、貼付惹起濃度 10%) では、1/10 例 (10%) で陽性反応が報告された。
- 2) 単回注射アジュバント (SIAT) 試験では、0.9%生理食塩液を溶媒とする 1.5%アニリンを単回皮内投与して感作し、その 12~14 日後に 20%アニリンを 6 時間閉塞適用して初回の惹起を行った。複数回の惹起後、モルモット 5/10 例 (50%) に陽性反応が認められた。すなわち、SIAT 試験における反応率はより高感度の Maximisation 試験よりも高かった。
- 3) Draize 試験変法を用いた 3 種類目の試験法では、アニリンの皮膚感受性は認められなかった。この方法では、2.5%アニリンを腋窩および鼠径リンパ節を覆う 4 か所の領域に同時に注射して感作を行い、その 14 日後に、1%アニリンを剃毛した両脇腹に皮内投与および開放適用して惹起した。

アニリンの動物における呼吸器感作性に関する情報は入手できていない。

4.1.2.5.2 ヒトにおける試験

Maximisation 試験（塗布感作濃度 20%、塗布惹起濃度 10%）では、志願者 25 人中 7 人がアニリン（純度の記載なし）に対して陽性反応を示し、反応率は軽度と判定された（Kligman, 1966）。

ヒトにおける感作性が報告されているが、これらの結果の多くは類似物質群間の交差反応性によるものである（Schulz, 1962）。芳香族アミノ化合物に対する交差アレルギーについては実験的に検討されている。試験では芳香族アミノ化合物に対する交差感作性が確認されている 181 人について、モニター調査中にパッチテストを行った。アニリンの試験濃度は 1% で、成分不明の軟膏と混合されていた。その結果、24 人（13%）が軽度から中等度の陽性反応を示した。アニリンはパラ置換アミノ芳香族化合物（*p*-フェニレンジアミン、*p*-トルイレンジアミンなどで、これらの化合物も接触性アレルギーを引き起こす）と構造的に類似していることが示されている（Düngemann and Borelli, 1966）。

原因不明の職業性湿疹様接触性皮膚炎患者 1377 人中 67 人（4.9%）がアニリンに陽性反応を示した。試験方法およびアニリン濃度は報告されていない（Meneghini et al., 1963）。

うっ滞性皮膚炎（潰瘍の有無や湿疹型のアレルギー性接触性皮膚炎の有無を問わない）の患者 306 人（男性 187 人、女性 119 人）について、63 物質のパッチテストを行ったところ、8.8% がアニリンおよび関連物質に対して陽性であった。パッチテストではワセリンに混合した 5% アニリンを用いた。交差感作性があり、類似物質群とされたものは、ベンゾカイン、アニリンおよびジアミノジフェニルメタンであった。したがって、これらの物質はほとんどの場合、交差感受性が示されるものとして考えるべきである（Angelini et al., 1975）。

ある皮膚科病院の患者では 5.1~13% の反応率がみられた（スイートアーモンドオイルを溶媒とした 10% アニリン、他の詳細なし）。アニリンのパッチテストに反応する患者の割合は、1956 年から 1965 年の間に著しく減少した（Scarpa and Ferrea, 1966）。

6 ヶ月以上続く脚の潰瘍と皮膚炎を示す患者 200 人中 8 人で、パッチテストが陽性であったと報告されている。パッチテストではワセリンに混合した 5% アニリンを用いた（Ebner and Lindemayr, 1977）。

4.1.2.5.3 感作性の結論

動物データでは軽度から中等度の感作率が認められた。モルモットを用いた 3 種類の試験では、2 種類で 10～50%の陽性率が報告されている。このうち 50%の陽性結果を示した試験では惹起に 20%アニリンが用いられていた一方、反応が弱いかまたは陰性結果であった試験では惹起濃度が非常に低かった（10%アニリンによる惹起では感作動物 10 匹中 1 匹、1%アニリンによる惹起では感作性なし）。陽性反応はヒトでも主として湿疹様皮膚炎患者において報告されているが、これらの陽性反応の多くは類似物質群間の交差反応性によるものである。呼吸器感作性は観察されていないが、皮膚感作性が認められていることからみて、その発現も否定できない。

また、アニリンはヒトにおいてパラ置換化合物群の物質と交差反応性を示し、これ自体をひとつの有害性と考えべきである。動物およびヒトのデータから、アニリンの表示はリスク警句 R43「皮膚に触れると感作性を引き起こすおそれがある」となる。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

主な毒性：血液毒性

ラット

ラットにアニリンを反復吸入曝露または反復経口投与すると、投与経路にかかわらず、造血器系に主な毒性が生じ、それに対応して脾臓、骨髄、腎臓、肝臓に変化がみられた。反復投与時のラットの症状は、チアノーゼ、体重増加抑制および摂餌量減少であり、高用量では試験途中で動物が死亡した。アニリン投与は赤血球を障害し、溶血性貧血をもたらした。メトヘモグロビン濃度は対照動物より高く、ハインツ小体が観察された。障害を受けた赤血球は主にラットの脾臓の赤脾髄で除去され、その結果、脾臓ではヘモジデリンの蓄積、脾洞うっ血、重量増加および色の暗調化が認められた。アニリン曝露の長期化は赤血球の持続的な障害をもたらし、4 週間の経口投与では多発性の脾周囲炎がみられた。更に長期の投与では脾臓の間質過形成および線維化、ならびに乳頭状の突起を伴う慢性被膜炎も認められた。腎臓および肝臓にヘモジデリン沈着症がみられる場合もあった。また、溶血作用に対する反応として、網赤血球数、血清トランスフェリンおよび総鉄結合能が増加し、骨髄および髄外部位（主に脾臓）で赤血球造血活性が上昇した。発がん性については 4.1.2.8 項で考察する。

マウス

マウスに対する長期投与では低体重がみられたが、病理組織学的検査において血液毒性を示す所見は認められなかった。血液学的検査、メトヘモグロビン血症および臨床化学的検査に関するマウスのデータは得られなかった。脾臓に対する影響に関して情報となり得る唯一の所見は、8 週間用量設定試験のマウスで認められた脾臓の黒色化であった (NCI, 1978) が、残念ながら、この試験には血液データや病理組織データが含まれていなかった。

赤血球関連項目を中心とする反復投与毒性データを表に示した。Table 4.10 には、ラットをアニリンに反復吸入曝露したときの全身性の影響を示した。現在のところ、マウスその他の動物種については信頼できる吸入試験データが得られていない。Table 4.11 には、ラットとマウスにおける短期および長期経口投与試験データを示した。なお、表中のラットのデータに加え、Oberst ら (1956) は、雌のアルビノマウス (各群 20 匹)、モルモット (各群 10 または 9 匹、性別の記載なし) および雄のビーグル犬 (各群 2 匹) を、チャンバー内濃度 0 または 5 ppm のアニリン蒸気に 1 日 6 時間、20 週間 (マウスおよびモルモット) または 26 週間 (イヌ) 曝露したと報告している。検査項目と観察結果は、特にマウスおよびモルモットでは断片的にしか記載されていないが、供試した動物種では毒性症状はみられなかった。また、正常値からの逸脱がなかったため、(定量的) 血液学的検査結果 (メトヘモグロビン濃度を含む) および生化学的検査結果は記載されていない。いずれの動物にも曝露に関連した病理所見はなかった (肉眼的および組織学的検査方法に関する記載なし)。

Figure 2 アニリン反復投与の一次的小および二次的毒性 : Appendix F 参照。

Table 4.10 Repeated inhalation of aniline vapour to rats/non neoplastic lesions

Study design	MetHb ↑	Heinz bodies	Reticuloc ytes↑	RBC↓	Hb↓	HCT↓	MCV↑	MCH↑	Clinical /post mortem findings	NOEC [LOAEC]	Reference
Rat, male, Sprague-Dawley 5/group, 5 d, 8 h/d 10, 30, 50, 150 ppm#	≥30 ppm	ND	ND	ND	ND	≥30 ppm	ND	ND	ND, maximum metHb levels at 30 ppm: 5%, 50 ppm: 13%, 150 ppm: 55%, daily metHb levels prior and after exposure increased with number of exposure days indicating a cumulative effect, decrease of metHb level during the nonexposure time •	NOEC 10 ppm	Kim and Carlson (1986)
Rat, male, Sprague-Dawley 5/group, 4 d, 12 h/d 10, 30, 50, 150 ppm#	≥30 ppm	ND	ND	ND	ND	≥30 ppm	ND	ND	ND, maximum metHb levels at 30 ppm: 5%, 50 ppm: 14%, 150 ppm: 60%, daily metHb levels prior and after exposure increased with number of exposure days indicating a cumulative effect, decrease of metHb level during the nonexposure time •	NOEC 10 ppm	Kim and Carlson (1986)
Rat, 14 males / group (strain?) 2 wk, 3, 6, or 12 h/d, 5 d/wk 0, 10, 30, 90 ppm, with/without 14d recovery	≥30 ppm (no quantitative data)	ND	ND	≥30 ppm	ND	ND	≥30 ppm non reversible at 90 ppm	≥30 ppm non reversible at 90 ppm	≥30 ppm (at 3, 6 and 12 h): splenic congestion/ haemosiderosis, spleens appeared nearly normal at 14 d post exposure, metHb levels plateaued after 4 exposures, remained at steady-state concentration until the 10th exposure, decreased to normal 14 days post exposure••	NOEC 10 ppm	Burgess et al. (1984a; b)
Rat, 16 males/group, Crl:C d, 2 wk, 6 h/d, 5 d/wk + 13-d recovery, head-only exposure to analytical concentrations of 0, 17, 45, 87 ppm	≥45 ppm (2-8 fold increase, max. at day 5 of exposure)	ND	≥45 ppm	≥45 ppm @ persistent in 87 ppm group	≥45 ppm	≥45 ppm	≥45 ppm@	≥87 ppm	≥17 ppm: dose-dependent effects in spleen (minimal at 17 ppm): RES hypertrophy, hemosiderosis @persistent in all dose groups, hematopoiesis ↑, ≥45 ppm: MCHC ↓, urine: bilirubin ↑, spleen: weight ↑, congestion, bone marrow myeloid:erythroid ratio ↓@persistent in 87 ppm group 87 ppm: cyanosis, diuresis ↑, Ly ↑, PMN ↓, platelets ↓, Liver: haematopoiesis ↑,••	NOEC not estimated [LOAEC 17 ppm]	EPA (1981)

Table 4.10 continued overleaf

Table 4.10 continued Repeated inhalation of aniline vapour to rats/non neoplastic lesions

Study design	MethHb ↑	Heinz bodies	Reticuloc -ytes↑	RBC↓	Hb↓	HCT↓	MCV↑	MCH↑	Clinical /post mortem findings	NOEC [LOAEC]	Reference
Rat, male, Wistar (9 rats for 26 wk + 11 rats intercurrently sacrificed), 5 d/wk, 6 h/d, 5 ppm (≈19mg/m ³)	5 ppm (no quantitativ e data, described as slight and mild)	ND	ND	ND	NCE	NCE	ND	ND	5 ppm: cyanosis, no pathological (macro finding) • ⁵	NOEC not estimated [LOAEC-5 ppm]	Oberst et al. (1956)

ND not done, NCE no change evident, • Histopathology not performed, •• Histopathology from selected organs.

Blood parameters: MethHb↑ increased methaemoglobin concentration, RBC↓ reduced red blood cells, Hb↓ reduced haemoglobin, HCT↓ reduced haematocrit, MCV↑ increased mean corpuscular volume, MCH↑ increased mean corpuscular haemoglobin, PMN polymorphnuclear granulocytes, Ly lymphocytes, RES retikuloendothelial system in the spleen

no controls

≈ 6 rats/group exclusively used for MethHb determinations with 1 h following exposures on day 1,3,5,6,8, 10 and on recovery days 3,5,7,11.

@ not reversible

Table 4.11 Repeated oral studies of aniline in rats and mice/non neoplastic lesions

Study design	MetHb ↑	Heinz bodies	Reticulocytes ↑	RBC ↓	Hb ↓	HCT ↓	MCV ↑	MCH ↑	Clinical/post mortem findings	NOAEL [LOAEL]	Reference
Rat, 5 males/group Sprague-Dawley 4 d/ 0.25, 0.5, 1, 2 mmol/kg in drinking water* by gavage (≈23, 46, 93, 186 mg/kg bw/d aniline)	2mmol/kg sign. ↑ (no quantitative data)	ND	ND	2 mmol	≥1 mmol	≥1 mmol	ND	ND	≥0.5 mmol/kg: dose-related sign, higher iron content of spleen (+72%, 172%, and 325% in spleen homogenates at 0.5, 1, and 2 mmol/kg, iron not characterised), increased lipid peroxidation (+ 24%, 32%, resp. 44%) - histopathology/spleen: expansion of red pulp ≥1mmol/kg: increased spleen weights (rel/abs), histopathology/spleen: increased red pulp cellularity, cellular fragmentation, vascular congestion, stainable iron (Fe3+) deposits in phagocytes, erythropoietic - increased protein oxidation 2 mmol/kg: increased No. of WBC	NOAEL 0.25 mmol ≈23 mg/kg bw/d [LOAEL 0.5 mmol ≈46 mg/kg bw/d]	Khan et al. (1997)
Rat, F-344 0 (on 5, 10, or 20 d, each 10 males) or 110 mg/kg bw/d, on 5, 10, or 20 d (6, 8, resp. 8 males/group) gavage	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	110 mg/kg bw/d: premature deaths (4 before d 5, 2 on d 5-10, 2 on d 10-20), transient cyanosis after dosing, body weight gain ↓ (only at 5 d), spleen: weight ↑, mild-moderate congestion, severe graded haemosiderosis (only at 20 d), mild-severe haematopoiesis ↑, bone marrow: moderate-severe hypercellularity, kidneys: mild haemosiderosis ●●	NOAEL not estimated [LOAEL 110 mg/d]	Short et al. (1983)
Rat, F-344, 12 male/group, 4 wk; 10, 30, 100 mg/kg bw/d in diet* (≈ 4, 12 and 41 mg/kg bw/d aniline?)	100 mg: non-sign. ↑	≥10 mg	≥30 mg	≥30 mg	≥30 mg	≥100 mg	≥30 mg	≥30 mg	cf. summary Table 4.12 and Table 4.13	NOAEL not estimated, [LOAEL 10 mg ≈4 mg/kg bw/d]	BASF (2001)
Rat, 6 animals/sex/group, Coworth-Wistar 13 d/0 or 0.093% in diet (≈65.1 mg/kg bw/d)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	spleen: weight ↑, erythropoiesis ↑, sinusoidal engorgement, haemosiderosis (no data on grading) liver: slight erythropoiesis	NOAEL not estimated [LOAEL 0.093%]	Jenkins et al. (1972)

Table 4.11 continued overleaf

Table 4.11 continued Repeated oral studies of aniline in rats and mice/hon neoplastic lesions

Study design	MethHb↑	Heinz bodies	Reticulo-cytes↑	RBC↓	Hb↓	HCT↓	MCV↑	MCH↑	Clinical/post mortem findings	NOAEL [LOAEL]	Reference
Rat, 15 male/group, Sprague-Dawley 14 d/0 or 0.7 mmol/kg bw/d (≈65 mg/kg bw/d in mineral aniline) in mineral oil by gavage, groups of 5 rats each were killed on d 1, 7, and 28 post exposure	0.7 mmol on day 1**	ND	ND	0.7 mmol on day 1 and 7	0.7 mmol on day 1	0.7 mmol on day 1	ND	ND	WBC cell counts increased on day 1, no effect on differential WBC counts, lower concentrations of serum transaminases AST and ALT on day 7, increased IgA levels on day 1, spleen: increased rel. weights on day 1 and 7, increased abs. weights on all time points, higher iron content at all time points in spleen homogenates. histopathology: day1: vascular congestion, heavy iron deposits in macrophages (haemosiderin) of the red pulp sinoids, day 7 decreased vascular congestion, iron deposition remained indistinguishable from day 1, day 28: congestion disappeared, iron deposition (haemosiderin) remained high, focal fibrosis, especially in the capsule, no changes found in heart, liver, lung, brain, kidneys, testes, thymus, pancreas••	NOAEL not estimated [LOAEL 0.7 mmol/kg≈65 mg/kg bw/d]	Khan et al. (1995b)
Rat, 10 males/group (strain?) 28 d/0, 25, 150, 600 ppm (≈2.22, 13.5, 48.5 mg/kg bw/d) in diet	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≥150 ppm: enlarged, blackened spleen•	NOAEL 25 ppm ≈ 1.75 mg/kg bw/d [LOAEL 150 ppm ≈ 10.5 mg/kg bw/d]	Anonymous (1969)
Rat, 10 males and 10 females/group F344, 30 d/0, 30, 100, 300, 1,000 mg/kg bw/d in diet*	≥30 mg/kg	≥30 mg/kg	≥30 mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	1,000 mg/kg: 10 premature deaths/moribund sacrifices of females on d 24-27, body weight gain↓, black discolored cortex of kidneys, enlarged pancreatic lymph nodes, food consumption ↓ ≥300 mg/kg: cyanosis, ≥100 mg/kg: spleen and liver: irregular surface + enlargement, discoloration of spleen and kidneys•	NOAEL not estimated [LOAEL 30 mg/kg]	CIIT (1977)

Table 4.11 continued overleaf

Table 4.11 continued Repeated oral studies of aniline in rats and mice/iron neoplastic lesions

Study design	MethHb↑	Heinz bodies	Reticulo-ocytes↑	RBC↓	Hb↓	HCT↓	MCV↑	MCH↑	Clinical/post mortem findings	NOAEL [LOAEL]	Reference
Rat, 5 males and 5 females/group F344 8 wk/0, 0.01, 0.03, 0.3, 1% (≅5, 15, 151, 504 mg/kg bw/d aniline⊕) and Mouse, 5 males and 5 females/group B6C3F1 8 wk/0, 0.01, 0.03, 0.3, 1% (≅10.8, 32.4, 324, 1080 mg/kg bw/d aniline⊕) 8 wk/0.01, 0.03, 0.3, 1.0% in diet*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≥0.3%: black granular enlarged spleen in rats and mice, 1%: body weight gain↓ in rats• (dose finding studies)	NOAEL 0.03% in rats and mice	NCI (1978)
Rat, 15 males/group, Sprague-Dawley 0, 600 ppm in drinking water, 5 rats/ group sacrificed on day 30, 60 or 90 * (≅43 mg/kg bw/d aniline)	43 mg/kg on all time points**	ND	ND	43 mg/kg all time points	43 mg/kg on 30 d and 90 d	43 mg/kg on 30 d and 90 d	43 mg/kg on 60 d and 90 d	43 mg/kg on 60 d and 90 d	increased relative spleen weights on all time points; rel. liver weights decreased on day 30 and increased on day 60, increased WBC counts on day 30 only, increased IgA levels on days 60 and 90, decreased CD4+/CD8- T-helper cells at 90 days. Reduced AST activity on day 30 and 60. Spleen histopathology findings with time-related progression: marked red pulp expansion due to increased sinusoidal cells, fibroblasts, marked-massive iron (haemosiderin) deposition in macrophages/ red pulp, pericapsular fibrosis•••	NOAEL not estimated [LOAEL 43 mg/kg]	Khan et al. (1993)
Rat, male and female (no./ group?, control?), F344 ≤ 1 y/ 10, 30, 100, 300, 1,000 mg/kg bw/d n diet*, abstract	≥30 mg/kg	≥30 mg/kg	≥30 mg/kg	≥30 mg/kg	ND	ND	ND	ND	≥30 mg/kg: spleen: enlarged, thickened capsule, fibrous hyperplasia of white pulp, red pulp hyperplasia, haematopoiesis, bone marrow: erythroid hyperplasia, 10 mg/kg: little toxic effects without further details•••	NOAEL not estimated [LOAEL 10 mg/kg]	Gralla et al. (1979)

Table 4.11 continued overleaf

Table 4.11 continued Repeated oral studies of aniline in rats and mice/iron neoplastic lesions

Study design	MetHb↑	Heinz bodies	Reticulo-ocytes↑	RBC↓	Hb↓	HCT↓	MCV↑	MCH↑	Clinical/post mortem findings	NOAEL [LOAEL]	Reference
Rat, male (15, 10, 18, resp. 16 rats) Wistar 80 wk/0, 0.03, 0.06, 0.12% aniline in drinking water	ND	ND	ND	≥0.03 %	≥0.03 %	NCE	ND	ND	≥0.03%: dose-related increased incidence of slight-moderate bile duct proliferation, ●● (no data on spleen effects)	NOAEL not estimated [LOAEL 0.03% in water]	Hagiwara et al. (1980)
Rat, 130 males and 130 females/group F344 104 wk/ 10, 30, 100 mg/kg bw/d in diet*, (≈7, 22, 72 mg/kg bw/d aniline), 10 rats/sex/ group killed at wk 26 and 52, 20 rats/sex/ group killed at wk 78	≥30 mg/kg	100 mg/kg	≥10 mg/kg	≥10 mg/kg	≥10 mg/kg	≥10 mg/kg	≥10 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg: survival rate↓, spleen: firm, enlarged, discolored, irregular surfaces, chronic capsulitis (at wk 26 and thereafter), stromal hyperplasia + fibrosis (wk 104), lymphoid atrophy (wk 104), fatty metamorphosis, bone marrow activity↑, pigment accumulation in pancreatic lymph nodes, adrenals and liver; liver weight↑ ≥30 mg/kg: spleen weight↑, dose-related increase of extramedullary haematopoiesis (at wk 26) ≥10 mg/kg: spleen: increased mean severity grades of pigment accumulation (haemosiderosis) and haematopoiesis (at wk 52 and thereafter)	NOAEL not estimated [LOAEL 10 mg/kg of aniline hydrochloride ≡ 7 mg/kg bw/d aniline]	CIIT (1982)
Rat, F344 103 wk/0.3, 0.6% in diet* (≈174.4 or 350.5 mg/kg bw/aniline)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≥0.3%: spleen: fibrosis of capsule and trabeculae, fatty metamorphosis, papillary hyperplasia of capsule kidneys: tubular haemosiderosis 0.6%: liver: Kupffer cell haemosiderosis	NOAEL not estimated [LOAEL 0.3% in diet]	NCI (1978)

Table 4.11 continued overleaf

Table 4.11 continued Repeated oral studies of aniline in rats and mice/hon neoplastic lesions

Study design	MetHb↑	Heinz bodies	Reticulo-ocytes↑	RBC↓	Hb↓	HCT↓	MCV↑	MCH↑	Clinical/post mortem findings	NOAEL [LOAEL]	Reference
Mouse, male and female, B6C3F1 103 wk/ 0.6 1.2% in diet*, (aniline ≅737 or 1,510 mg/kg bw/d in males and 733 or 1,560 mg/kg bw/d in females) both species: 25 animals/sex/control group and 50 animals/sex/ dose groups	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.2%: body weight gain↓, ≥ 0.6%: liver: bile duct inflammation in males	NOAEL not estimated [LOAEL 0.6% in diet]	NCI (1978)

* Aniline hydrochloride as test substance, 100 mg of aniline hydrochloride is equivalent to 72 mg aniline

** Analysis of MetHb was performed 24 hr after collection of blood

§ Calculation based on limited stability of test substance (56.6%) in diet (6, 17, 56 mg/kg bw/d aniline hydrochloride), test substance concentration was weekly adjusted, aniline content was 72% of test substance (see *)

⊕ Calculations based on relative food consumption of 7% of body weight for rats and 15% for mice

ND not done, NCE no change evident, ● Histopathology not performed, ●● Histopathology from selected organs, MetHb↑ increased methaemoglobin concentration, RBC↓ reduced red blood cells, Hb↓ reduced haemoglobin, HCT↓ reduced haematocrit, MCV↑ increased mean corpuscular volume, MCH↑ increased mean corpuscular haemoglobin, WBC white blood cells, AST aspartate aminotransferase, ALT alanine aminotransferase

No controls

作用様式 (mode of action) に関する反復投与試験

アニリンの毒性作用様式に関する最近の試験 (BASF, 2001) で、アニリン塩酸塩を各群 12 匹の雄 F344 ラットに 1 週間または 4 週間混餌投与した。試験では、被験物質を 3 用量群 (名目用量 10、30 および 100 mg/kg/日) に投与し、ラット 12 匹からなる別の 1 群を対照とした。試験開始後 28/29 日に全動物を殺処分した。飼料中での被験物質の安定性が十分ではなかったため (1 週後で 56.6%)、被験物質濃度を毎週調整した。補正後の被験物質摂取量は、アニリン塩酸塩として 6、17 および 57 mg/kg/日 (アニリンとして約 4、12 および 41 mg/kg/日) であった。

試験デザインは OECD 407 に完全に従ったものではなかった。毒性症状観察、摂餌量および体重の測定ならびに肉眼的観察は標準的な要件を満たしていたものの、投与はより感受性の高い雄でしか行わず、臨床化学的検査を実施せず、また臓器重量測定および病理組織学的検査は標的臓器である可能性のあるもののみ限定されていた。病理組織学的検査および血液検査には各群 6 匹のラットを用いた。残りの各群 6 匹については、脾臓切片を用いて細胞増殖率測定およびフィラメント (中間径フィラメント) の免疫組織学的検査を行った。

試験結果の概要を **Table 4.12** に示した。

Table 4.12 Results from an oral 28-day study with 1 week or 4 week administration of aniline

Test design	Treatment period*	1 week application	1 week application	4 week application	4 week application	Assessment
Dose groups (6 males/group):	4A (10 mg), 5A (30 mg), 6A (100 mg)	4B (10 mg), 5B (30 mg), 6B (100 mg)	0A (control), 1A (10 mg), 2A (30 mg), 3A (100 mg)	0B (control), 1B (10 mg), 2B (30 mg), 3B (100 mg)		
Examinations	Hematology®, Pathology#, Histopathology\$	Pathology#, Spleen histopathology* in 6B, Cell replication® in 6B	Hematology®, Pathology#, Histopathology\$	Pathology#, Spleen histopathology* in 0B, 3B, Cell replication in 3B		
Hematology	≥ 10 mg: Hb adducts↑, Heinz bodies in 2/6 m ≥ 30 mg: Hb↓, MCHC↓, PLT↑, Heinz bodies↑, serum iron (non-sign)↑ 100 mg: RBC↓, anisocytosis, polychromasia, hypochromasia of RBC, HCT↓, WBC↑, Reticulocytes↑, Methb (nonsign.)↑, transferrin ↑, total iron binding capacity↑	≥ 10 mg: Hb adducts↑, Heinz bodies in 4/6 m ≥ 30 mg: RBC↓, Hb↓, MCV↑, MCH↑, Reticulocytes↑, hypochromasia of RBC, Heinz bodies↑, serum iron ↑ 100 mg: normoblasts↑, polychromasia, RBC, HCT↓, MCHC↓, WBC↑, Methb (nonsign.)↑, transferrin↑, total iron binding capacity↑	≥ 10 mg: Hb adducts↑, Heinz bodies in 4/6 m ≥ 30 mg: RBC↓, Hb↓, MCV↑, MCH↑, Reticulocytes↑, hypochromasia of RBC, Heinz bodies↑, serum iron ↑ 100 mg: normoblasts↑, polychromasia, RBC, HCT↓, MCHC↓, WBC↑, Methb (nonsign.)↑, transferrin↑, total iron binding capacity↑		Onset of erythrotoxicity at 10 mg. dose and time related significant macrocytic hemolytic anemia ≥ 30 mg, hypo/anisochromasia indicated unstable/degenerated haemoglobin, accelerated iron metabolism, tendency for methaemoglobinemia, leucocytosis	
Organ weight/spleen	≥ 30 mg: ↑ of abs/rel weight	100 mg: ↑ of abs/rel weight	≥ 30 mg: ↑ of abs/rel weight↑	≥ 30 mg: ↑ of abs/rel weight		Dose-related effects on spleen weight and spleen enlargement were attributed to vascular congestion
Macroscopy/spleen	100 mg: enlargement in 6/6 m	100 mg: enlargement in 6/6 m	100 mg: enlargement in 6/6 m	100 mg: enlargement in 6/6 m		

Table 4.12 continued overleaf

Table 4.12 continued Results from an oral 28-day study with 1 week or 4-week administration of aniline

Results	Treatment period*	1 week application	1 week application	4 week application	4 week application	4 week application	Assessment
	Histopathology/spleen	30 mg: minimal vascular congestion in 6/6 m 100 mg: moderate vascular congestion in 6/6 m, single focus of perisplenitis in 1/6 m	100 mg: moderate vascular congestion in 6/6 m, single focus of perisplenitis in 1/6 m	10 mg: minimal vascular congestion in 4/6 m 30 mg: slight vascular congestion in 6/6 m 100 mg: moderate vascular congestion in 6/6 m mild-moderate multifocal perisplenitis in 6/6 m	100 mg: slight hypercellularity in 6/6 m	100 mg: slight-moderate vascular congestion in 6/6 m mild-moderate multifocal perisplenitis in 6/6 m	Dose- and time related increase of incidence and severity of vascular congestion \geq 10 mg, time-related increase of incidence and multiplicity of perisplenitis at 100 mg,
	Histopathology/ bone marrow						
	Histopathology/liver			100 mg: minimal hemosiderin deposition in 6/6 m minimal extramedullary hematopoiesis in 1/6 m			
	Immunohistology/ spleen					No treatment-related effects on the content and distribution of actin, desmin, vimentin, VEGF	
	Cell replication/spleen		100 mg: lymphoid, polymorphnuclear or solitary fibroblastic cells invading the perisplenic foci positive for BrdU			100 mg: lymphoid, polymorphnuclear or fibroblastic cells invading the perisplenic foci positive for BrdU	higher mitotic activity in perisplenic plaques reflecting proliferation of inflammatory cells and fibrocytic cells

* Animals of all groups were necropsied on day 28/29, \uparrow / \downarrow increase or decrease of values, significant if not indicated as nonsignificant (nonsign)

Pathology included macroscopy and weight of anesthetized animal, liver, spleen, kidneys

* Histopathology in 0B, 3B and 6B: HandE, Perl's Iron reaction, Elastic van Gieson and immunohistology on actin, desmin, vimentin and vascular endothelial growth factor (VEGF) on spleen sections

§ Histopathology in groups 0A, 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A: HandE, Perl's Iron reaction: spleen, bone marrow, liver, kidneys, mandibular and mesenteric lymphnodes, Elastic-van Gieson: spleen

@ Hematology: Standard blood parameters according to OECD 407 plus hemoglobin adducts, methaemoglobin, serum transferrin, iron, total iron-binding capacity (TIBC)

© Cell replication: S phase response using BRDU in corporation

データは、溶血性貧血がヘモグロビン障害に関連していることを明らかに示していた。主にヘモグロビンの変性タンパク質からなるハインツ小体が、全用量群の動物で認められた。同小体は正常な健康動物ではみられないもので、対照群の動物（0A 群）では観察されなかった。ハインツ小体が有意に増加したのは 30 mg/kg 以上の群であるが（上記参照）、10 mg/kg 群でも多くの動物でその形成が認められた。同小体の平均および最小／最大数は用量と共に増加した（Table 4.13 参照）。なお、10 mg/kg におけるハインツ小体の発現は、個々の動物間の感受性の差を示すものと解釈できる。

赤血球の低色素症はヘモグロビン濃度の低下を示すものであり、また 100 mg/kg 群の動物ではヘモグロビン分布の異常（色素不同症）が認められた。

平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球容積（MCV）および平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）は平均を示す値であるため、正常赤血球と異常赤血球が混じった血液では異常を検出できない場合がある。実際、グレード 1 の低色素症の発生頻度は全試験群（10 mg/kg 以上）で用量に関連して増加したが、MCHC の統計学的に有意な減少が認められたのは 100 mg/kg のみであった。

形態、大きさまたは染色性が異常な赤血球の出現は、貧血を示す MCH、MCV、MCHC などの平均値の有意な変化よりも感受性が高いことが知られている。

赤血球大小不同（鉄欠乏性貧血時の赤血球の形態変化を示す初期のマーカー）は 100 mg/kg 群において 1 週間投与後のみ認められ、4 週間投与後には認められなかった。

Table 4.13 Erythrocyte morphology in blood film examination

Treatment period	1 week			4 weeks			
Dose groups (6 males/group)	4A (10 mg)	5A (30 mg)	6A (100 mg)	0A (control)	1A (10 mg)	2A (30 mg)	3A (100 mg)
Heinz bodies(%₀₀ RBC · 10⁻³)							
No. of males/group	2/6	6/6	6/6	0/6	4/6	6/6	6/6
Range within group (mean)	1-6 (4)	15-47 (27)	420-548 (473)	0	4-9 (4)	32-54 (44)	276-315 (289)
Hypochromasia							
No. of males/ group (total)	0/6	2/6	6/6	0/6	1/6	3/6	6/6
Grade 1	0/6	2/6	6/6		1/6	3/6	5/6
Grade 2							1/6
Anisochromasia							
No. of males/ group (total)	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	6/6
Grade 1			1/6				5/6
Grade 2			3/6				1/6
Grade 3			2/6				
Anisocytosis							
No. of males/ group (total)	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Grade 1			3/6				
Grade 2			3/6				

本試験の限界

アクチン、ビメンチン、血管内皮増殖因子 (VEGF) およびブロモデオキシウリジン (BrdU) 取込みについての免疫組織学的検査に用いた陽性対照組織は評価されなかった。使用した方法および結果 (BrdU 取込みの陽性結果またはその他の成分の陰性結果) は本報告書には記載されていない。また、VEGF に対する特異的反応は、脾臓切片にも、陽性対照として用いた肺組織にもみられなかった。このため、これらの検査への信頼性は限定的である。

溶血性貧血を示した投与動物の脾臓では、ヘモジデリン沈着の増加が予想されていた。しかし、プルシアンブルー反応では、脾臓におけるヘモジデリン沈着について、投与動物と対照動物間の比較で差を明示することができなかった。

結論

本試験で設定された用量では、無毒性量 (NOAEL) は推定できなかった。低用量の 10 mg/kg

(アニリン 4 mg/kg) (最小毒性量 (LOAEL)) 投与は、赤血球に対して明らかに毒性を示し、末梢血中でヘモグロビン付加体を形成させた。また、慢性脾臓毒性に繋がる一連の事象の初期病変として知られている脾臓のうっ血も、10 mg/kg で観察された。赤血球関連項目と脾臓に対するこのような有害作用は用量に関連して増加した。

低色素性溶血性貧血を特徴づける赤血球関連項目の有意な変化が 30 mg/kg 以上で認められた。10 mg/kg 群の動物では平均赤血球数は対照群と同様であったが、雄 6 匹中 4 匹で少数のハイツ小体が、1 匹で低色素/色素不同症が認められ、これらは初期の赤血球毒性を示すものと考えられた。さらに、10 mg/kg 以上の用量で背景値より多くのヘモグロビン付加体形成が観察された。

30 mg/kg 以上における網赤血球増多症ならびに 100 mg/kg 投与動物におけるトランスフェリン濃度と総鉄結合能の増加、骨髓細胞過形成および髄外造血活性は、貧血状態の代償作用を反映していた。

高用量群ではメトヘモグロビン濃度の増加傾向が認められた。メトヘモグロビン形成の顕著な増加が予想されていたにもかかわらず、このような所見 (増加傾向) しかみられなかったのは、ラットのメトヘモグロビン還元酵素活性が高いこと、飼料からのアニリン摂取が夜間であったこと、および採血前の絶食時間が長かったことに起因している可能性がある。

他のアニリンの試験から予測されていたにもかかわらず、本試験では脾臓におけるヘモジデリン沈着および造血活性の顕著な増加は確認できなかった。著者らは、投与動物と対照動物との間に差がなかった理由を、試験方法の感度の低さと対照動物における生理的な背景値の高さのためと説明している。実際、肝臓では両所見が観察されたことから、投与によってヘモジデリン沈着および髄外造血が引き起こされたことは明らかであった。ただし、溶血性物質に関する他の試験から、脾臓は赤血球破壊の主要な場所であり、通常、ヘモジデリン沈着および代償性の造血活性は、肝臓や腎臓でこれらの二次的影響が生じるよりも早く、かつ低用量で発現することがよく知られている。

脾臓の肉眼的腫大および重量増加はうっ血に起因するものであった。うっ血は全用量群で認められ、その頻度および平均的な重症度は用量に関連して増加した。赤脾髄の変化の組織学的検査は、肉眼的検査および重量測定よりも感度が高かった。一方、試験終了時、アクチン、デスミンおよびビメンチンフィラメントの量と分布には差がなかったと報告されている。これは、本試験において、投与に関連した筋細胞または線維芽細胞によるフィラメント産生の増加や、これらの細胞の増殖がなかったことを示していた。このことは、間

質部分や内皮部分の肥大または過形成など、構造的な変化が検出されなかったこと、したがってこれらは脾洞うっ血の原因ではなかったことを意味している。

白血球増多症と脾周囲炎との間には関連性があるかもしれない。著者らの意見によれば、脾周囲炎の発生は白血球数（WBC）の増加と関連していた。しかし、WBC の増加が最も顕著であったのは 1 週間投与後であるが、同時期、脾周囲炎は弧在性の初期病巣（プラーク）として散見されるのみであった。また、4 週間投与後には WBC の増加量は増えなかったが、脾周囲炎のプラークは重症化し、数も増加した。したがって、白血球増多症の推移は、脾周囲炎病変の急性から亜急性への経時的変化を反映しているとも考えられる。

4 週間投与後の脾周囲炎は、脾臓表面の脾膜と中皮との間の扁平、茸状または乳頭状の細胞集簇として認められた。大部分の細胞は線維芽細胞と線維細胞で、コラーゲンが豊富な基質に包まれ、中心に結合織の芯を有していた。またその他の細胞として、リンパ系細胞、少数の多形核顆粒球および担鉄マクロファージが観察された。脾周囲炎の病巣では細胞増殖率が高かったが、これはリンパ系細胞と線維芽細胞の有糸分裂活性によるものであった。

脾臓表面の細胞集簇は、アニリン塩酸塩を 1 週間投与した動物でも観察された。しかし、4 週間投与後に認められたものとは異なり、個々の線維芽細胞が非常に少量のコラーゲン線維とともにみられるのみであった。これらの線維芽細胞は不定形の細胞間基質に埋め込まれ、小出血を示す少数の赤血球と非常に少数かつ非常に小型の担鉄顆粒が混在していた。

両投与期間を比べると、4 週間投与後にはプラークはより線維性となり、赤血球の貪食や細胞間の鉄陽性顆粒も認められた。興味深いことに、リンパ系細胞は両投与期間とも低分化細胞で、円形ないし卵円形の淡青～暗青色の核を有し、細胞質はないか、またはほとんど見えなかったと報告されている。炎症反応や線維化反応におけるこれらの細胞の役割は現時点では不明であり、脾周囲のプラーク形成の転帰を知るには更なる試験が必要である。また、脾周囲炎および線維芽細胞増殖が、種々の肉腫形成の初期病変として、アニリン塩酸塩の発がん性に関連しているか否かについても明らかにする必要がある。

著者らの結論によれば、アニリンによる脾臓腫瘍は、脾臓に対する持続的な炎症性毒性の遅発性の続発症であり、その毒性は先行する血液毒性メカニズムによって生じたものである。彼らはまた、二つの用量範囲、すなわち、血液毒性のみで脾臓に対する有害な影響のない低用量 10 mg/kg と、脾臓毒性、血液毒性および関連する腫瘍形成を引き起こすより高い用量（30 mg/kg 以上）を区別できるかもしれないとしている。しかし、この意見に反して、本試験では低用量の 10 mg/kg でも明らかな血液毒性および脾臓毒性の所見が認められており、脾臓毒性を生じさせない用量を特定するに至っていない。

投与によるその他の影響

投与による有害な影響は、副腎と卵巣にも認められた。雌ラットにアニリン 300 mg/kg を 6 日間反復経皮投与すると、副腎皮質の肥大および副腎重量の顕著な増加が観察された。重量増加は糖質コルチコイドの前処置によって抑制され、エストラジオールの前処置によって増強した (Lefebvre and Szabo, 1971)。副腎皮質の肥大は、ラットにアニリン 30 mg/kg/日を 7 日間または 14 日間皮下投与した場合にも認められた。組織化学的検査では、コハク酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素およびステロイド-3 β -オル脱水素酵素活性の低下が認められ、ステロイド合成阻害が示唆された。

雌ラット 6 匹にアニリン 50 mg/kg/日を 7 日間皮下投与すると、対照群のラット 6 匹と比較して、卵巣重量の減少、黄体における多数の大きく透明な脂肪貯蔵細胞の出現、およびステロイド-3 β -オル脱水素酵素活性の低下が認められた。ただし、卵巣重量の減少は軽度で、有意ではなかった (平均が対照群 17.5 ± 0.9 mg に対し 19.3 ± 1.0 mg)。超微細構造的には、小胞体が部分的または完全に消失していた (Hatakeyama et al., 1971)。また、ラットにアニリン塩酸塩 100 mg/kg/日を 104 週間投与したところ、卵巣重量 (絶対および相対) の有意な減少が認められたが (CIIT, 1982)、26、52 および 78 週間の投与では重量の変化は明らかでなかった。本試験では、試験終了時にも中間殺処分時にも、投与に関連した組織学的病変はみられなかった。

アニリン投与は精巣重量にも影響を及ぼした。雄ラットにアニリン塩酸塩 600 ppm (アニリン 43 mg/kg/日に相当) を飲水投与すると、投与 60 日および 90 日に精巣重量が低下した (Khan et al., 1993)。ただし、本試験ではラットの精巣における組織学的変化は報告されていない。精巣の重量測定と組織学的検査は Khan ら (1995b) による 14 日間試験でも行われたが、0.7 mmol/kg/日 (65 mg/kg/日) を投与したラットでは、これらの項目に、投与に関連した変化はみられなかった。

卵巣に対するアニリンの影響 (Hatakeyama ら (1971) の試験) に関するコメント：ラットの卵巣の萎縮を明確に示すには、投与動物数と投与期間が不十分と考えられた。また、黄体における脂肪貯蔵細胞の出現および小胞体の消失は、無処置動物の黄体退行期にみられる正常所見である。このため、本試験からは何も結論を導けないというのが報告者の意見である。すなわち、精巣にも卵巣にもアニリンによる有害な影響を示す明らかな所見は認められなかった。

Sprague-Dawley ラットにアニリン塩酸塩を経口投与すると、90 日間の投与後に血清免疫

グロブリン IgA および IgG 濃度の増加ならびに脾臓のヘルパーT 細胞 (CD4+/CD8-) の減少が観察された (Khan et al., 1993)。これらの変化が免疫毒性の可能性を示すものかどうかについては、更に試験が必要である。

アニリン毒性のバイオマーカー

亜急性/亜慢性試験の結果から、以前はメトヘモグロビン血症やハインツ小体などの項目が、アニリンによる毒性に対して感度が高いとされていた。実際、形態学的な病変を引き起こす用量と比べた場合、これらの項目の変化は同じ用量 (Burgess et al., 1984a; b; Oberstet al., 1956) またはより低い用量 (CIIT, 1977) で発現した。しかし、これらの試験はいずれも現在の試験プロトコールガイドラインに準拠した血液学的検査、臨床化学的検査、肉眼病理学的検査および病理組織学的検査の全項目/器官を網羅しているわけではないため、この比較は不完全である。これに対し、104 週間の試験 (CIIT, 1982) では、メトヘモグロビン血症 (30 mg/kg 以上の投与群) およびハインツ小体 (100 mg/kg 投与群) は、他の赤血球関連項目 (赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積) や網赤血球数の変化、また脾臓において色素沈着や造血がみられた用量よりも、高用量で発現していた。したがって、後者 (赤血球関連項目以下) が血液毒性の最も感度の高い指標となる。

一部の試験ではメトヘモグロビン濃度が最高濃度に達した後に減少し、メトヘモグロビン濃度増加の可逆性が示された。しかし、この可逆性から、赤血球の障害もメトヘモグロビン濃度の経時的変化と同様にある時間に限ってみられるものであると解釈することはできない。メトヘモグロビン血症に伴い、影響を受けた個々の赤血球はおそらく不可逆的に障害され、主に脾臓で活動するマクロファージによって分解される。一方、造血器系では、赤血球毒性のために増大した要求に反応して、造血亢進が起きる。現在得られている試験データからは、幹細胞の不可逆的障害などの骨髄障害の徴候はみられていないため、造血器系による再生が可能という意味において、赤血球毒性は可逆的であった。

入手可能なデータからは、メトヘモグロビン形成が最大になる時点について考えない限り、ラットにおけるメトヘモグロビン濃度およびハインツ小体の情報が、アニリンによる毒性を最も鋭敏に予測する指標として適切であるとは考えられない。したがって、量的なリスク計算にあたっては、これらに基づいて NOAEL などの制限用量を決定すべきではない。加えて、ラットはメトヘモグロビン形成に関する感受性が比較的低いことがよく知られている (Jenkins et al., 1972)。

4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

ヒトの健康に対するアニリンの影響についての研究には、あまり質の高いものがなかった。参考文献には曝露データ（空気/液体中のアニリン濃度、曝露期間、分析方法など）がないか、または限定的な記載しかなく、検討された人々は同時に他の化合物や発がん性があると思われる物質にも曝露されていた。また、ほとんどの曝露の報告は、曝露群と非曝露群に分けるだけの質的なものであった。このため、曝露されたヒトに対する影響に関しては1件の報告しか引用しなかった。

Jenkins ら（1972）による臨床試験では、志願者 20 人にアニリンを 5、15 または 25 mg の用量（総投与量）で 3 日間連続経口投与した。さらに、これらの志願者のうち一部にはより高い用量を投与した。すなわち、5 人には 35 または 45 mg を、2 人には 55 mg を、1 人には 65 mg を続けて投与した（総投与日数についての詳細な記載は得られず）。アニリン投与 1、2、3、および場合によっては 4 時間後に、指先の穿刺により血液を採取し、メトヘモグロビンを測定した。また、各アニリン投与の 24 時間後に静脈穿刺により血液を採取し、ハインツ小体の染色；血液塗抹およびバフィーコート の検査；メトヘモグロビン、ヘマトクリット値、網赤血球数（%）、血清総蛋白、血清アルブミン、グロブリン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・アラニンアミノトランスフェラーゼ・アルカリホスファターゼ活性、血清総ビリルビン、直接ビリルビンおよび血中窒素の測定；チモール混濁試験を行った。赤血球沈降速度、ヘマトクリット値、網赤血球数（%）および白血球百分率も検査した。さらに、午後 2 時に膀胱を空にした後、午後 4 時に尿を採取し、ウロビリノーゲン、グルコースおよび蛋白を検査した。これらの結果、メトヘモグロビン濃度は、5 mg 投与時の値に比べて、25 mg 以上の用量で有意に増加した。アニリン 65 mg の投与では、投与後 2 時間でメトヘモグロビン濃度が最高値 16.1% に達したが、その 1 時間後には正常範囲内となった。メトヘモグロビン濃度の平均最大増加率は、アニリン用量 25、35、45 および 55 mg でそれぞれ 2.46、3.68、7.08 および 5.17% であった（最高値の到達時間については記載なし）。アニリン 45 および 65 mg（0.6 および 0.9 mg/kg/日）摂取後には、男性 2 人で軽度な血清ビリルビンの増加が認められ（数値の記載なし）、ヘモグロビン異化の増加を示していた。血液学的検査、臨床化学的検査および尿検査の設定項目には、上記以外に有害な影響はみられなかった。なお、本試験では志願者が slow acetylator か、fast acetylator かは調べなかったが、slow acetylator ではアニリンに対する感受性の増加を予期すべきである。

あるゴム産業関連工場の男性労働者におけるがんの罹患率および死亡率に関するコホート試験では、アニリンによる膀胱腫瘍の明確な証拠は得られなかった (Sorahan et al., 2000)。曝露期間 6 ヶ月以上の労働者 385 人ではがんによる死亡がわずかに多かった（例数 4、予測数 2）が、有意ではなかった。ただし、喫煙習慣のデータはなく、また多くの労働者は膀胱

膀胱がんの発生頻度を有意に増加させる他の化学物質と同時に曝露されていた。

4.1.2.6.3 無毒性量 (NOAEL)

経口曝露

ラットにおける慢性毒性および発がん性併合試験 (CIIT, 1982, **Table 4.11**) は、793/93/EEC 規制の最小限の要件を満たしているとみなされた。実際、臨床化学的検査項目にはアルカリホスファターゼ、血中尿素窒素および血清アラニンアミノトランスフェラーゼしか含まれていなかったが、本試験は OECD の試験ガイドライン 407 の標準的試験項目に最も合致していた。NOAEL/LOAEL の決定に際して本試験が最も適していると考えたのは、主にこの理由による。また、本試験を選択した第二の理由は、アニリンの長期投与が行われていたことである。この CIIT (米国化学工業毒性研究所) の試験では NOAEL は決定できず、全身毒性 (腫瘍性病変を伴わない) に関する LOAEL はアニリン 7 mg/kg/日であった。

アニリンに関するその他の亜急性および亜慢性毒性試験 (**Table 4.11**) は、現在の試験ガイドラインに (完全には) 準拠しておらず、その多くは特定の項目に焦点を絞ったものであった。しかし、これらの試験の主要所見は良好な一貫性を示していたため、影響評価ではこれらも考慮に入れた。

吸入曝露

既存の反復吸入曝露試験は、現在のガイドラインの試験デザインに合致していなかったため、アニリンの吸入による影響については妥当なデータが得られていない。既存の試験ではいずれも気道に対する局所的な影響を検討していなかった。全身的な影響に関しては、ラットにおける亜急性吸入試験 (EPA, 1981) が最も信頼できる試験と考えられる。これは、血液学的、臨床化学的および病理形態学的検査が行われているためである。本試験と実際の標準的試験との相違点は、試験に雌動物を用いなかったこと、曝露期間が限られていること (28 日間ではなく 14 日間)、検査器官の種類が限られていること、および EPA 文書は要約のみであるため詳細な報告ではないことであった。本試験から得られた最小毒性濃度 (LOAEC) は 17 ppm であった (2 週間試験、1 日 6 時間、週 5 日曝露)。これはラットにおける 26 週間試験 (Oberst et al., 1956) の乏しいデータと一致している。この 26 週間試験では、5 ppm (19 mg/m³) の用量でラットにメトヘモグロビン血症とチアノーゼが発現したと報告されているが、その他の詳細は不明である。

4.1.2.6.4 反復投与毒性の結論

明らかな血液毒性またはその徴候は、溶血性貧血とそれに続発する変化からなる。反復経口投与試験でこれらの変化が認められた用量から、本物質の分類は「毒性」、表示は「T, R 48/25」とする必要がある。

検査項目、検査の感度および結果の定量化方法は実施された試験それぞれで非常に異なっていたが、アニリンの長期曝露後の毒性分析結果はラットでの試験の間でよく一致していた。ヒトにおける反復経口摂取後の経験的知見からも、0.4 mg/kg/日以上の用量で血液毒性（メトヘモグロビン形成以外の変化を含む）が示された（Jenkins et al., 1972）。一方、吸入経路に関するデータベースは乏しいが、限られた試験から、アニリンは非常に低濃度（5 ppm (19 mg/m³) /26 週間（Oberst et al., 1956）；17 ppm（約 66 mg/m³）以上/2 週間（EPA, 1981））で血液毒性を発現させることも示されている。なお、経皮試験データは得られていないが、アニリンはあらゆる曝露経路からよく吸収されるため、表示には経皮経路も含まれた。

以上より、アニリンの分類は「毒性」、表示は「T, R 48/23/24/25」となる。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

細菌を用いる突然変異試験

細菌を用いる遺伝子突然変異試験は、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535 および TA1537 試験株において、S9 mix 非存在下で、またアロクロール誘導ラット肝またはシリアンハムスター肝 S9 mix 存在下で、6666 µg/plate まで陰性であった。最高用量では S9 mix 存在下、非存在下ともすべての株で毒性が認められた（Haworth et al., 1983）。細菌を用いる突然変異試験でアニリンが陰性であることは、他の著者らによっても報告されている（Simmon et al., 1979; de Flora, 1981; Dunkel et al., 1984; Nakamura et al., 1987; Jung et al., 1992 など）。

ネズミチフス菌 TA98 にアニリンと共変異原物質ノルハルマンを加えて S9 mix 存在下で培養すると、アニリン濃度 20~200 µg/mL で復帰突然変異株が用量依存性に増加した（Nagao et al., 1977）。なお、ごく最近になって、アニリンとノルハルマンの反応生成物として、非常に強力な直接変異原物質、アミノフェニルノルハルマンが特定された（Totsuka et al., 1998）。

哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験

5 件のマウスリンフォーマ試験において、アニリンの結果は微妙であった。Wangenheim と Bolcsfoldi (1988) によれば、S9 mix 存在下の 0.5~5.0 mmol/L (46.5~465 µg/mL) および S9 mix 非存在下の 10~15 mmol/L (930~1395 µg/mL) で明らかな陽性結果が得られた。また、Mitchell ら (1988)、Myhr と Caspary (1988)、McGregor ら (1991) は、S9 mix 存在下および非存在下の高用量で弱陽性であったと報告している。一方、Amacher ら (1980) は、S9 mix 存在下でのみ行った試験で 1100 µg/mL まで陰性であったと発表している。なお、いずれの試験でもコロニーの大きさの測定は行われなかった。

V79 細胞を使用した、詳細な記載のないある HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 試験では、アニリンは S9 mix 存在下、50 および 60 mmol/L (4650 および 5580 µg/mL) という非常に高い用量で陽性を示した。外因性の活性化系がない状態では 20 mmol/L (1860 µg/mL) まで陰性であった。また、ラット初代培養肝細胞存在下では不確定な結果しか得られなかった (Fassina et al., 1990)。

In vitro 染色体異常試験

S9 mix 存在下の *in vitro* 染色体異常試験では、高用量のアニリンによる陽性結果が、チャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞 (Galloway et al., 1987; 1600 および 5000 µg/mL)、チャイニーズハムスター肺由来 (CHL) 細胞 (Ishidate, 1988; 1000 および 2000 µg/mL)、ならびに V79 細胞 (Miltenburger, 1986; 4300 µg/mL) で認められた。細胞毒性データについては記載がなかった。

S9 mix 非存在下では、陰性結果が、Galloway ら (1987) により CHO 細胞 (最高用量 1600 µg/mL) で、また Ishidate と Odashima (1977) により CHL 細胞 (最高用量 250 µg/mL) で、それぞれ確認された。一方、陽性所見が、Ishidate ら (1988) により CHL 細胞 (1000 および 2000 µg/mL) で、また Miltenburger (1986) により V79 細胞 (4300 µg/mL) で、それぞれ認められた。

小核試験

シリアンハムスター胎仔 (SHE) 細胞を用いた *in vitro* 小核試験では、アニリンは S9 mix 非存在下で陰性であったと報告されている (Fritzenschaf et al., 1993) が、試験の記載は不完全であった。

姉妹染色分体交換 (SCE)

アニリン (塩酸塩) は、チトクロム P-450 と NADPH・チトクロム P-450 還元酵素をほとんど含まないと記載されたヒト線維芽細胞において、5 および 10 mmol/L (465 および 930 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の濃度で SCE を誘発した (Wilmer et al., 1981)。本試験では一連のアニリン代謝物についても検査が行われたが、そのうち SCE 誘発能が最も高かったのは *o*-アミノフェノールと *N*-フェニルヒドロキシルアミンで、それぞれ 0.1 および 0.05 mmol/L 以上ではやくも SCE を誘発した。

全血培養法によって得たコンカナバリン A 誘導 T リンパ球において、アニリンは 0.1~1.0 mmol/L (9.3~93 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の範囲で用量依存性に SCE を誘発した (Wilmer et al., 1984)。本作用は純化したリンパ球の培養細胞では認められなかったが、純化したリンパ球をヘモグロビン 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の存在下でアニリンに曝露するとわずかな SCE の増加が観察された。この結果に基づき、アニリンから遺伝毒性のある中間代謝物への変換には赤血球が関与していると結論される。

CHO 細胞において、アニリンは代謝系非添加の 50~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で SCE を誘発した。S9 mix 存在下での作用濃度は 3000~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。SCE の増加は非常にわずかであったが、S9 mix 存在下および非存在下で再現性が認められた。S9 mix 存在下と非存在下における作用濃度の差は、S9 mix 非存在下では長時間曝露、S9 mix 存在下では短時間曝露であったことを反映していた (Galloway et al., 1987)。

不定期 DNA 合成 (UDS)

ヒト初代培養肝細胞 (Butterworth et al., 1989) およびラット初代培養肝細胞 (Yoshimi et al., 1988) において、アニリンは 1.0 mmol/L (93 $\mu\text{g}/\text{mL}$) まで DNA 修復 (不定期 DNA 合成, UDS) を誘発しなかった。細胞毒性についてのデータは記載されていなかった。

DNA 鎖切断

マウスリンフォーマ細胞において、S9 mix 存在下、21.5 mmol/L という非常に高濃度のアニリンによって、DNA 鎖切断が増加した。ただし、著者らはこの結果を「不確定」としている (Garberg et al., 1988)。S9 mix 非存在下では結果は陰性であった (Garberg et al., 1988; Kozumbo et al., 1992)。Garberg ら (1988) の試験では、S9 mix 存在下、非存在下とも軽度の毒性が報告された。

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験

宿主経路試験

ラット約 10 匹（各群 8～12 匹の複数群を使用）にアニリン 300 mg/kg を経口投与し、24 時間後に尿サンプルを採取した。この尿のエーテル抽出物について、ネズミチフス菌 TA100 および TA98 を用いて変異原性試験を行った。その結果、TA98 では S9 mix 存在下で用量依存性のある明らかな影響が認められた（Tanaka et al., 1980）。

小核試験

アニリンの小核誘発能に関しては、経口または腹腔内投与後のマウスまたはラットの骨髄細胞について、幾つかの独立した試験が行われている。これらの試験はおおむね最近のガイドラインに従って行われた。詳細については **Table 4.14** を参照のこと。

Table 4.14 Aniline: Overview on *in vivo* micronucleus tests with mouse and rat bone marrow cells

Species	Sex	Type of exposure	Sampling times (h)	Dose range (mg/kg)	LOED (mg/kg)	Max. MN freq. (neg.co)	Genetic effect	Decrease in P/N ratio	Reference
Mouse	m	2·i.p.	6 to 48	100-380	380	1.43% (0.27%)	positive	no	Ashby et al. (1991)
Mouse	m	1·i.p.	24	380	380	0.31% (0.03%)	positive	inconcl.	Westmoreland and Gatehouse (1991)
Mouse	m	1·p.o.	24 to 48	400-1,000	1,000	0.61% (0.04%)	positive	inconcl.	Westmoreland and Gatehouse (1991)
Mouse	m + f	2·i.p.	24 to 48	30-300	300	2.58% (0.16%)	positive	yes	Vlachos (1989)
Mouse	m	1·p.o.	24	125-250	-	-	negative	no data	Harper et al. (1984)
Mouse	m + f	1·p.o.	24, 48, 72	610			negative	yes	BG Chemie (1985)
Rat	m	1·p.o.	24	215-500	287	0.36% (0.17%)	positive	yes	George et al. (1990a)
			48	215-500	400	0.41% (0.17%)	positive	no*	
Rat	m	1·p.o.	48	500			negative	no	Bayer AG (2001a)

LOED lowest observed effective dose
P/N ratio, PCE/NCE ratio, increase in P/N ratio
f females
m males

マウスでは、Ashby ら（1991）、Vlachos（1989）および、Westmoreland と Gatehouse（1991）が、陽性の骨髄小核試験について報告している。これらの試験では、小核は最高用量でのみ誘発され、同用量で高度の毒性も認められた。腹腔内投与による作用量は 300

mg/kg (Vlachos, 1989) および 380 mg/kg (Ashby et al., 1991 ; Westmoreland and Gatehouse, 1991) であり、後者は LD₅₀ の 80% に相当した (Ashby et al., 1991)。経口投与では 1000 mg/kg で陽性反応が認められた (Westmoreland and Gatehouse, 1991)。一方、Harper ら (1984) は、ベンゼンとアニリンの同時曝露の影響を調べることを目的として 125 および 250 mg/kg という比較的低い用量を用いた結果、陰性であったと報告している。適切に実施された BG-Chemie (1985) の小核試験では、経口最大耐量 (MTD) は 610 mg/kg (LD₅₀ の 80%) と推定されたが、610 mg/kg 投与動物はいずれも毒性徴候を示さず、雄マウスで多染性赤血球/正染性赤血球 (PCE/NCE) 比が軽度に低下したのみであった。雌雄とも対照動物と投与動物における小核の頻度は同様であった。

マウスはアニリン誘発性の発がんに対して非応答性であるため、同動物種における小核陽性データについては文献上で詳細な考察が行われた。Ashby ら (1991) は、小核の誘発はメトヘモグロビン血症による赤血球変性/鉄沈殿の間接的な結果である可能性を考察している。しかし、この考えは、他のメトヘモグロビン血症誘発物質のデータからは裏付けられなかった。Westmoreland と Gatehouse (1991) は、通常メカニズムにより生じたと思われる異常な形の小核の発現について強調している。また、高用量を用いたことがデータの意味を乏しいものにした可能性もあると述べている。

ラットでは、アニリンを 215~500 mg/kg の用量で単回経口投与したところ、骨髄細胞で小核の弱い誘発が認められたと George ら (1990a) が報告している。24 時間後の試料採取時における 287、400 および 500 mg/kg の遺伝的影響は、PCE/NCE 比の減少と呼応していた。48 時間後の試料採取時には、試験した最も高い 2 用量 (400 および 500 mg/kg) で遺伝的影響が認められた一方、全用量で PCE/NCE 比が増加した。臨床症状は認められなかった。なお、本試験の問題点は、染色法 (ヘマトキシリン・エオジン) の DNA に対する特異性が低く、小核の計数の信頼性が乏しいおそれがあることであった。このため、George ら (1990a) の報告によるこの陽性結果について Bayer AG (2001a) が再試験を行って確認したところ、反応は陰性であった。ただし、この再試験では 500 mg/kg での 48 時間後における影響を調べたのみであった。再試験では投与動物で臨床症状が認められたが、細胞毒性は観察されなかった。この再試験の陰性結果は、方法が不完全である (特に 1 用量のみで、後期の 1 回しか試料採取していない) ことから、完全には信頼できない。

染色体異常試験

マウスの骨髄細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験の結果は陰性であった (Bayer AG, 2001b)。試験では、220、300 および 380 mg/kg の用量を 24 時間間隔で 2 回腹腔内投与し、2 回目の投与の 16、20 および 24 時間後に試料を採取した。その結果、すべての用量で臨

床症状がみられたが、細胞毒性は認められなかった。

姉妹染色分体交換の誘発

マウスにアニリン 61~420 mg/kg を腹腔内投与すると、骨髄細胞において弱いながら用量依存性のある姉妹染色分体交換 (SCE) の誘発が認められた (Parodi et al., 1982)。試験では各群 3~9 匹を用い、投与 24 時間後に試料を採取した。

DNA 鎖切断

ラットおよびマウスにアニリンを腹腔内投与し、種々の組織についてアルカリ溶出法により DNA 鎖切断の誘発を調べた。その結果、Parodi ら (1982) は、ラットの肝臓 (105 mg/kg 以上) と腎臓 (210 mg/kg) で陽性所見が得られたが、ラットの脾臓 (210 mg/kg) およびマウスの肝臓、腎臓、骨髄 (210 mg/kg) の所見は陰性であったと報告している。一方、Cesarone ら (1982) によれば、アニリン 300 mg/kg の腹腔内投与によって、マウスの腎臓では DNA 鎖切断が誘発されたが、肝臓での所見は陰性であった。

DNA 結合

ラットにアニリンを単回腹腔内投与したところ、25 および 60 時間後に肝臓、腎臓および脾臓で比較的弱い DNA 結合能が認められた (Roberts and Warwick, 1966)。ただし、本試験では ^3H 標識アニリンを用いたが、ヌクレオチドの分析を行わなかったため、 ^3H の DNA への非特異的取り込みを除外することはできない。なお、Lutz (1979) によれば、共有結合指数 (CBI) は肝臓において 3.7 と低かった。

McCarthy ら (1985) は、 ^{14}C -アニリンを 250 mg/kg までの用量で単回投与したときの DNA 結合を、前投与を 7 回行った場合 (最高で 50 mg/kg を 7 回前投与後、最後に 250 mg/kg を投与) と比較した。その結果、最高用量群のラットでは前投与を行った方が腎臓における DNA 結合が多かった (CBI は前投与なしの 7.4 に対し、14.2)。脾臓および大腸の CBI はそれぞれ 3.7 および 4.3 であった。ラットの肝臓とマウスの諸器官では DNA 結合はほとんどみられなかった。なお、脾臓の CBI については、この器官がリンパ球を高割合で含むなど、種々の細胞からなっていることを考慮する必要がある。

生殖細胞変異原性

Wistar 系ラットを用いた優性致死試験が、最近のガイドラインに従って行われた (CTL,

1998)。試験では、生殖能が確認された雄ラット各群 40 匹にアニリン 47、150 または 200 mg/kg/日を 5 日間連続腹腔内投与した。また、適切な陰性および陽性対照を設けた。これらの雄を同系統の雌と 1 対 1 で 1 週ずつ、10 週間連続して交配した。

所見はおおむね陰性であったが、アニリン 200 mg/kg/日群では、3 週時に生存着床数が軽度ながら統計学的に有意に減少した。また、早期死亡数が増加した。これらの所見は、40 匹中 7 匹で明らかな生存着床数の減少と早期死亡着床数の増加が認められたためであった。全体の結果は（影響の弱さから）陰性とも陽性とも判断できないため、この試験からは結論が得られないと考えられる。

Table 4.15 Aniline - Dominant lethal assay with rats: relevant data from negative controls and from animals treated with 200 mg/kg aniline

	No. of implants per female		Live implants per female		Early deaths per female	
	neg. contr.	200 mg/kg aniline	neg. contr.	200 mg/kg aniline	neg. contr.	200 mg/kg aniline
Pre-exptl.	14.3	14.3	13.8	13.8	0.5	0.5
Week 1	14.4	13.3	13.5	12.2	0.7	0.9
Week 2	15.1	13.8	14.6	13.0	0.6	0.7
Week 3	14.9	13.8	13.9	12.3	0.8	1.4
Week 4	15.2	14.4	14.1	13.9	1.0	0.5
Week 5	14.4	14.7	13.4	13.9	0.7	0.6
Week 6	14.4	13.8	13.7	13.5	0.6	0.8
Week 7	15.6	15.9	14.6	13.5	0.9	0.7
Week 8	14.9	14.2	14.2	13.9	0.6	0.8
Week 9	14.0	13.4	13.4	14.6	0.6	0.7
Week 10	15.2	14.0	14.5	13.4	0.6	0.6

精子頭部異常

雄マウス各群 5 匹にアニリン塩酸塩 17~200 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。その結果、最終投与の 5 週間後において精子頭部異常の発生頻度の増加は認められなかった (Topham, 1980a)。

アニリンの構造的類似化合物に関する *in vivo* 変異原性データ

アニリンの主要代謝物であり全身性に分布する 4-アミノフェノールについては、意義のある *in vivo* 変異原性データが得られている。4-アミノフェノールは、マウスでの *in vivo* 小核試験において、種々の組織で陽性を示す。骨髄細胞では、109~436 mg/kg の 2 回経口投与で小核の頻度が増加した (Wild et al., 1980a)。また、肝臓の細胞では、107~214 mg/kg

の2回腹腔内投与で小核が誘発された (Cliet et al., 1989)。Benningら (1994) は、53～214 mg/kg の経口投与によって、マウスの脾臓細胞中の小核を有する細胞の頻度が増加したと報告している。この著者らの考察によれば、4-アミノフェノールは短命な代謝物を生じる間接的染色体異常誘発物質であり、どの化合物も、肝臓で活性化されそこで産生された代謝物が循環リンパ球が肝臓を通過する際にその中に取り込まれるか、または脾臓細胞で代謝されるものと推測している。

アゾベンゼン (アニリンの「二量体」で、代謝されてアニリン 2 分子になる) は、ラットおよびマウスの骨髄細胞で小核を誘発する (George et al., 1990a; 1990b)。アニリンと同様、その影響はマウスよりもラットではるかに顕著である。

さらに、二つの構造的関連化合物群、すなわち、アミノアニリン類およびアルキルアニリン類についても *in vivo* 小核試験のデータがある。

アミノアニリンである 1,2-フェニレンジアミンはマウス、チャイニーズハムスターおよびモルモットで陽性であった (Wild et al., 1980b)。一方、1,3-フェニレンジアミンについては陰性結果が報告されている (Fraunhofer-Institut-ITA, 1994)。

3種類のアニリン、すなわち、2,6-キシリジン (Parton et al., 1988; 1990)、o-トルイジン (McFee et al., 1989; Morita et al., 1997) および 2,4-ジアミノトルエン (Morita et al., 1997) が、マウスの小核試験で陰性結果を示した。ラットでは、2,4-ジアミノトルエンについては結論を得るに至る所見が認められず (George and Westmoreland, 1991)、2,6-ジアミノトルエンについては陰性所見と結論を得るに至らない所見が報告されている (Allavena et al., 1992; George and Westmoreland, 1991)。

4.1.2.7.3 変異原性の結論

アニリンは、通常の細菌を用いる変異原性試験では陰性である。哺乳動物の培養細胞では、染色体に対する影響および SCE が陽性で、さらに遺伝子突然変異もおそらく陽性である。一般に、外因性の代謝活性化系存在下の方が非存在下より強い影響が誘発される。*In vivo* においては、マウスの骨髄を用いた試験では、染色体異常に関する 1 試験で陰性反応が認められたが、小核試験では弱陽性であった。ただし、後者は細胞毒性が認められる高用量に限られていた。一方、ラットでは数用量で小核の誘発が認められた。再試験では陰性の結果が得られたが、完全に信頼できるものではなかった。*In vitro* および *in vivo* におけるアニリンの変異原性は、*in vivo* 試験において種々の器官で DNA 鎖切断と DNA 付加体が認められたことから裏付けられる。

さらに、代謝物（4-アミノフェノール）および構造的関連物質（アゾベンゼン）の変異原性データも、動物の体細胞におけるアニリンの変異原性に関する根拠を強固なものにしている。一方、現在入手可能な生殖細胞変異原性に関するデータでは、陰性（精子頭部異常）または不確定（優性致死試験）であるが、いずれも試験系の感度が比較的低いため、予測にはあまり役立たない。なお、精祖細胞を用いた染色体異常試験は行われていなかった。

現在入手可能な変異原性データは、アニリンを区分 2 の変異原性物質に分類するには不十分であるが、数種の *in vitro* および *in vivo* 試験、特にラットを用いた骨髄小核試験で陽性所見が得られていることから、アニリンの分類は区分 3 の変異原性物質、表示は「R68、不可逆的な影響を生じるおそれがある」となる。

4.1.2.8 発がん性

4.1.2.8.1 動物における試験

アニリン塩酸塩の経口投与による発がん性試験

ラット

CIIT の試験（1982）では、F344 ラット（各群雌雄各 130 匹）にアニリン塩酸塩を 10、30 および 100 mg/kg/日（アニリン 7、22 および 72 mg/kg/日に相当）の用量で 104 週間混餌投与したところ、原発性脾臓肉腫の発生頻度が増加した。試験では、26 および 52 週時に各群雌雄各 10 匹を、78 週時に各群雌雄各 20 匹を中間殺処分し、残りの各群雌雄各 90 匹については試験終了まで投与を続けた。試験報告書には、非腫瘍性所見の集計表、総死亡率の統計学的評価および腫瘍発生頻度を含む病理所見の統計学的評価は記載されていなかった。しかし、個別所見表のデータから、高用量群の雄では 78 週から試験終了まで明らかにより多くの死亡が認められており、試験途中の死亡または瀕死殺処分動物は、対照群の雄で 13 匹、低および中間用量群の雄でそれぞれ 14 および 11 匹であったのに対し、高用量群の雄では 20 匹であった（総死亡数は **Table 4.16** に示した）。死因は報告書中に述べられていないが、高用量群の雄の試験途中の死亡は明らかに毒性によるものではなく、そのうち数例は担腫瘍動物であった。対照群の動物では原発性脾臓腫瘍がみられなかったのに対し、高用量群の雄では 35 匹（27%）が脾臓腫瘍を示し、うち 9 匹が試験途中死亡群であった（**Table 4.16**）。中間用量群では 1 匹の雄に脾臓腫瘍（間質肉腫）が認められた。雌では、高用量群の 1 匹における血管肉腫を除き、脾臓腫瘍はみられなかった。なお、上記以外に非腫瘍性所見も投与に関連して認められた。そのうち間質過形成は間質肉腫の細胞と形態

的に類似しており、前腫瘍性病変である可能性が考えられた。投与に関連したその他の所見としては、慢性被膜炎および脂肪変性が認められた（発生頻度を **Table 4.16** に示す）。また、高用量群の雄におけるヘモジデリン沈着の程度と髄外造血の程度、高用量群の雌雄における脾臓萎縮の発生頻度、ならびに投与群の雄および高用量群の雌における脾臓うっ血の程度と発生頻度が増加したと報告されている（試験報告書には概要データなし）。その他の非腫瘍性病変を **Table 4.17** に示す。

用量に関連した脾臓腫瘍の増加は、それ以前に行われたアニリン塩酸塩を用いた 103 週間試験でも観察された（NCI, 1978）。試験では、F344 ラット各群 50 匹に、アニリン塩酸塩を 0.3 および 0.6% の濃度で混餌投与した。対照群は雌雄各 25 匹とした（**Table 4.17** も参照のこと）。用量はアニリンにして雄で 174.4 mg/kg/日、雌で 360.5 mg/kg/日に相当した。試験の結果、アニリン塩酸塩の混餌投与濃度と死亡率の間には雌雄どちらも有意な正の相関はなかったが、投与群の雄ラットでは数種の間葉系腫瘍（血管肉腫、線維肉腫、線維種および肉腫）の発生頻度が増加した（**Table 4.17**）。

脾臓腫瘍のうちで最も頻度が高かった血管肉腫は、低用量群の雄 19/50 例（38%）、高用量群の雄 20/46 例（43%）に認められた。脾臓の線維肉腫は浸潤性で、腹腔内に広範囲に広がっていた。投与群の雌の脾臓には少数の腫瘍しか認められなかった（低用量群の雌 1 匹および高用量群の雌 2 匹に血管肉腫、高用量群の雌 3 匹に肉腫）。加えて、投与群の雄および高用量群の雌では間葉系腫瘍が胸腔および腹腔の複数器官でより高頻度に観察された（**Table 4.17**）。また、雄では褐色細胞腫が用量依存性に増加した（対照群の雄 8% に対し、低および高用量群では 12 および 27%（いずれも有意差なし））。雌では同腫瘍は対照群の 4%、高用量群の 8% に認められた。NCI の報告書によると、雄における脾臓の血管肉腫の発生頻度、および脾臓の線維肉腫と起源非特定肉腫（肉腫 NOS）を合わせた発生頻度は、それぞれ統計学的に有意に増加した。また、複数器官の線維肉腫と肉腫 NOS を合わせた発生頻度も雄で有意に増加した。雌では、脾臓のみ、または体腔の複数器官に線維肉腫または肉腫 NOS を有するラット数が、アニリン塩酸塩の飼料中濃度の増加と有意に関連していた（コクラン・アーミテージ検定による）。この結果はフィッシャーの直接確率検定では裏付けられなかったが、これらの腫瘍はまれであることから、低および高用量群でみられた発生頻度は化合物による発がん性を示すものと考えられた。以上の結果から、米国国立がん研究所（NCI）では、アニリン塩酸塩は雌雄の F344 ラットに対して発がん性を有すると結論した。

追加情報

Weinberger と共同研究者ら（1985）が NCI 試験（1978）の脾臓切片を再検査した結果、

低および高用量群の雄で脾臓腫瘍の発生頻度に統計学的に有意な増加が認められた（それぞれ 27 および 60%）。また、低用量群の雌では合計 2 例（4%）の、高用量群の雌では合計 5 例（10%）の脾臓腫瘍が認められた。対照群の動物では脾臓腫瘍はみられなかった。各投与群の雌雄では、脾臓の線維化、被膜過形成、出血などの非腫瘍性病変が有意に高い頻度で認められた。雄では脂肪変性の発生頻度も有意に増加した。脾臓の線維化と脂肪変性は、腫瘍発生頻度と統計学的に高い相関を示していた。

マウス

マウスでは、アニリン塩酸塩の混餌投与と関連した腫瘍性病変の発生はなかった（NCI, 1978）。試験では、B6C3F1 マウス各群 50 匹にアニリン塩酸塩を 0、0.6 および 1.2% の濃度で含む飼料を 103 週間与え、その後 4 週間の観察期間を設けた。検査項目は、体重、摂餌量、生死の観察、組織腫瘍や病変の有無の観察、剖検および 32 種類以上の器官／組織の病理組織学的検査であった。被験物質濃度は、雄マウスで 737 および 1510 mg/kg/日、雌マウスで 733 および 1560 mg/kg/日に相当した。試験の結果、平均体重が試験期間中および投与終了時に減少した（減少が有意であったか否かについてはデータなし）。投与群と対照群との比較では投与による生存率への影響はみられず、生存率は高用量群の雄および雌で 82 および 84%、低用量群の雄および雌で 86 および 74%、対照群の雄および雌で 66 および 60%であった。腫瘍は対照群と投与群でほぼ同数発生しており、被験物質によるものとは考えられなかった。

ラットにおける標的器官であった脾臓に関しては、高用量群の雄で血管腫が 1 匹（1/49 = 2%）、低用量群の雄で血管肉腫が 1 匹（1/49 = 2%）、対照群の雄で悪性リンパ腫が 1 匹（1/38 = 3%）に認められた。雌の脾臓については、対照群の 1 匹で血管肉腫が、低用量群の 3 匹（3/48 = 6%）で悪性リンパ腫が認められた。

Table 4.16 Incidence of primary spleen tumors and other spleen findings in a 104-week study in F344-rats treated with aniline hydrochloride (CIIT, 1982)

	Males					Females						
		10	30	100	0	10	30	100	0	10	30	100
Dose group (mg/kg) §	0	10	30	100	0	10	30	100	0	10	30	100
No. of animals examined#	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130
No. of spleen examined	123	129	128	130	129	128	130	129	129	129	130	130
Premature deaths (total No.)	16	14	15	26	14	15	26	20	21	14	14	13
Tumor type*												
Fibrosarcoma	0	0	0	3 (1*)	0	0	0	0	0	0	0	0
Stromal sarcoma	0	0	1	21 (1*)	0	0	0	0	0	0	0	0
Capsular sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Haemangiosarcoma	0	0	0	6 (4*)	0	0	0	0	0	0	0	1
Osteogenic sarcoma	0	0	0	3 (3*)	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphoreticular neoplasm	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Other findings at week 104 (90 animals/sex/group)**												
Stromal hyperplasia	1	0	0	31	0	0	0	0	0	0	0	9
Chronic capsulitis	1	1	2	62	0	2	0	0	4	4	4	70
Fatty metamorphosis	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0

§ Equivalent to aniline doses of 0, 7, 22, and 72 mg/kg bw/d

* In parentheses: tumors in premature deaths

** Treatment-related non neoplastic findings of the spleen were also observed at week 26, 52, and 78, but were not reported here.

No. of animals including interim sacrifices at weeks 26 (10/sex/group), 52 (10/sex/group), and 78 (20/sex/group).

Table 4.17 Incidence of mesenchymal tumors in the spleen and body cavities/other organs of rats of a 103-week study with aniline hydrochloride (NCI, 1978)

Dose groups	Males				Females			
	control	0.3%	0.6%	control	0.3%	0.6%	control	0.6%
	Tumors in spleen and capsule							
No. of animals with tissue examined	25	50	46	23	50	50	50	50
Sarcoma NOS	0	4	2	0	0	0	0	3
Fibroma	0	7	6	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma	0	3	7	0	0	0	0	0
Haemangiosarcoma	0	19	20	0	1	1	2	2
Lipoma	0	0	0	0	0	0	1	1
Haemangioma	0	0	0	0	0	0	1	1
Tumors in body cavity/multiple organs								
No. of animals with tissue examined	25	50	43	24	50	50	50	50
Fibrosarcoma	0	2	8	0	1	1	3	3
Leiomyosarcoma	0	0	2	1	0	0	0	0
Haemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Sarcoma NOS	0	0	1	0	0	0	1	1

発がん性に関するその他の試験

In vitro 試験：細胞形質転換試験

アニリンについて一連の形質転換試験が行われた。その結果、シリアンハムスター胎仔の初代培養細胞 (SHE 細胞、0.01~10.0 µg/mL、S9 mix なし) およびマウス由来 C3H/10T1/2 細胞 (0.8~100 µg/mL、S9 mix なし) では結果は陰性であった (Pienta and Kawalek, 1981; Dunkel et al., 1988)。マウス Balb/3T3 細胞 (0.8~100 µg/mL、S9 mix なし) では用量反応関係のない陽性反応が報告された (Dunkel et al., 1981)。

実験動物

アニリンの発がん性については、上記以外にも妥当性がやや乏しい試験が行われている。これらは、被験物質の純度に関するデータがなかったり、試験方法や結果の記載内容が、現在の規制目的のプロトコルに従った試験で求められるものに合致していなかったりした。しかし、観察された影響のあるものは少なくとも部分的にはより最近の試験結果と一致していた。そこで、データベースを完全なものにするため、これらの試験について以下に記載した。

アニリンの発がん性の標的器官である脾臓については、やや不完全な試験についても更に記載する必要がある。Osborne-mendel ラット雌雄 43 匹を用いて行われた初期の試験 (White et al., 1948) では、アニリン塩酸塩を 0.033% の濃度で 420~1032 日間 (平均 654 日間) 混餌投与したところ、肝臓において肝硬変 (18 匹) および肝細胞腫瘍 (ヘパトーマ) (4 匹) が、脾臓において出血 (23 匹)、線維化 (14 匹) および肉腫 (3 匹) が認められた。被験物質の純度、不純物、病変の分布における性差については記載がなかった。

これに対し、Druckrey (1950) が初期に行った別の試験では、腫瘍反応はみられなかった。本試験ではラットにアニリン塩酸塩 22 mg/日 (著者の計算によれば 120~220 mg/kg/日) を最長 750 日間飲水投与した。投与 425 日には、供試動物 50 匹中 25 匹が生存していた。

また、これらより信頼性の乏しい試験が幾つか、主に膀胱に焦点を絞って行われた。

Hagiwara ら (1980) の試験では、雄 Wistar ラット (各群 28 匹) にアニリンを 0.03、0.06 および 0.12% の濃度で 80 週間飲水投与し、特定の血液学および臨床生化学的項目の検査ならびに腎臓、肝臓および膨張させた膀胱の病理組織学的検査を行った。その結果、膀胱その他の器官に増殖性変化の増加はみられなかった。投与終了時には、平均赤血球数とへ

モグロビン濃度が用量に関連して減少した。また、対照群に比べ、胆管増殖の総発生頻度が用量に従って増加した。腎臓には、投与による影響は観察されなかった。

ラット 11 匹に 1 匹当たりアニリン 5~7.5 mg を含む飼料を 144~256 日間与えたところ、いずれの動物にも膀胱上皮の増殖性変化はみられなかった (Ekman and Strömbeck, 1949)。ただし、一部の動物では膀胱の充血と出血が認められた。

シリアンハムスターに油を溶媒としてアニリンを 1.9 mmol/kg/週の用量で 52 回皮下投与し、87 週後に実験を終了したが、膀胱の増殖性病変の誘発はみられなかった (Hecht et al., 1983)。

Perlmann と Staehler (1932) は、アニリン 1 mg/日 (6 mg/週) をウサギ 10 羽に、10 mg/日 (60 mg/週) をウサギ 20 羽に皮下投与した。その結果、投与 4 週後に死亡した低用量群のウサギに膀胱腫瘍が 1 例認められた。

また、別のウサギの試験で、2.5%アニリン溶液 15 mL を 12 羽に週 1 回腹腔内投与したところ、動物は 6 ヶ月以上生存したが、増殖性病変は観察されなかった (Berenblum and Bonser, 1937)。

動物における試験のまとめ

アニリン塩酸塩を投与した長期試験により、アニリンはラットにおいて発がん性を有し、脾臓肉腫を誘発させることが明らかになった。腫瘍発生頻度の増加は雄において顕著であり、雌では少数に脾臓肉腫が認められたのみであった。

マウスでは発がん性は認められなかった。

4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

疫学データ

膀胱腫瘍については、18 世紀末ないし 19 世紀初頭から、アニリンへの職業的曝露との関連性が多くの報告において論じられてきた。しかし、アニリン曝露に関するデータが不十分と考えられたため、これらの初期の報告は考慮に入れなかった。

1990 年に米国労働安全衛生研究所 (NIOSH) は、1957 年以降 o-トルイジン、アニリン、

ヒドロキノンなどの化学物質を使用してきたある工場における、膀胱がんの発生頻度を調査した (NIOSH Alert, 1990; Ruder et al., 1992; Ward et al., 1991)。NIOSH の測定による *o*-トルイジンとアニリンの空气中濃度は 1 ppm 未満であり、1975 年以降の記録がある会社のデータと一致していた。なお、労働者は *o*-トルイジンやアニリンなどの液体状の加工用化学物質と皮膚接触する場合もあった。

この工場では何らかの化学物質に曝露された 1749 人のうち、膀胱がんは 13 例認められた。これに対し、ニューヨーク州の発生率に基づく予測値は 3.61 例であった。*o*-トルイジンとアニリンへの曝露が明らかと考えられる労働者 708 人では、膀胱がんは 7 例認められ、予測値は 1.08 例であった。曝露の可能性のある労働者 288 人では、膀胱がんは 4 例認められ、予測値は 1.09 例であった。おそらく曝露されていないと考えられる労働者 753 人では、発生頻度に有意差はなかった。

o-トルイジンとアニリンへの職業的曝露がない場合、喫煙による膀胱がんの増加は 2 倍未満であった。これに対し、*o*-トルイジンとアニリンへの曝露が明らかな (喫煙) 労働者では、膀胱がんの増加は 6 倍を超えた。また、膀胱がんのリスクはその区域での労働時間に伴って増加した。曝露された労働者におけるアニリン (および *o*-トルイジン) の勤務交代前後の平均濃度は、曝露されていない労働者よりも有意に高かった。

以上の結果、*o*-トルイジンとアニリンの職業的曝露は、労働者における膀胱がんのリスク増加と関連があると結論された。ただし、労働者は *o*-トルイジンとアニリンの両方に曝露されていたため、これらの化学物質の影響を疫学的に区別することはできなかった。

Freudenthal と Andersen (1994) は、この *o*-トルイジンやアニリンと膀胱がんとの関連性について疑問を呈した。彼らの主張によれば、調査された労働者は膀胱に対して発がん性を有する可能性のある他の物質にも曝露されていたが、Ward ら (1991) の研究ではそれらは考慮されていなかった。

1940 年から 1975 年にかけて、2 ヶ所の芳香族アミン系染料製造区域 (インディゴとフェニルグリシンカリウム、またはアセトアニリドを製造) で原料としてアニリン (および他の加工用化学物質) を使用していた労働者 139 人と 48 人について行われた死亡率調査では、作業区域での死亡率の増加や、作業区域内での曝露期間の長さによる死亡率の増加はみられなかった。また、膀胱がんによる死亡はなかった (Ott and Langner, 1983)。

ヒトにおける試験のまとめ

アニリンおよび他の化学物質に曝露された労働者で、膀胱がんの発生頻度が増加したというデータが存在している。アニリンによるがんの誘発が疑われるが、アニリンをその原因物質として特定することはできなかった。

4.1.2.8.3 構造的類似物質から得られるその他の情報

脾臓における悪性腫瘍の発生は、アニリンによるものに限ったものではなかった。脾臓を発がん性の標的器官とし、赤血球毒性と遺伝毒性に関しても類似データがある他の構造的関連化学物質を検索すると、アニリンとの比較に適切と考えられる芳香族アミン類（アゾベンゼンおよび *o*-トルイジン）がみつかった。構造活性相関を有するその他の物質については、発がん性や毒性に関するデータがなかったり、アニリンと腫瘍の種類が異なっていたりしたため、比較には含めなかった。アゾベンゼンと *o*-トルイジンは、長期曝露によって線維化、間葉系の異常増殖、および肉腫など、アニリン様の影響を引き起こした。アゾベンゼンのデータの概要を **Table 4.18** に示すが、このアゾベンゼンのデータから、赤血球毒性とメトヘモグロビン血症も同時に生じることがわかる。また、アニリンと同様に、脾臓腫瘍の発生頻度は、雄ラットの方が雌ラットよりも高かった。さらに、アニリンの発がん性試験と同じく、アゾベンゼンはラットの脾臓に様々な態様の線維肉腫、骨肉腫および血管肉腫を誘発し、未分化/多分化能間葉系細胞が標的細胞であることが示唆された。

アゾベンゼンは、アニリンと同様に、マウスの発がん性試験では陰性であったが、骨髄で小核を誘発した（ラット>マウス）。

o-トルイジンについては、構造および腫瘍データにおける違いから、アニリンとの類似性がやや低かった。*o*-トルイジンはアニリンとは異なり、マウスにおいても発がん性を示すが（NTP, 1979a, TR 153）、*o*-トルイジンを投与したマウスで認められたのは、多様な肉腫ではなく、ほとんどが脾臓および肝臓における血管肉腫であった。ラットでは、脾臓の肉腫に加えて他の数器官により多くの種類の腫瘍が誘発された。*o*-トルイジンの多臓器における発がん性がアニリンのデータとの比較の上でどのような意味を有するかは明らかでない。したがって、*o*-トルイジンのデータは、アニリンの毒性に関してはあまり参考にならないと考えられた。

p-アミノフェノール（アニリン代謝物）については発がん性のデータが得られていない。*p*-アミノフェノールは、ラットおよびヒトで腎毒性を示すという点で、毒性もアニリンとは異なる（BG Chemie 27b, 1995 に総説）。

Table 4.18 Data from azobenzene

Haemotoxicity	Genotoxicity	Tumor response	Other morphologic lesions (non-tumor)	Reference
Rat: erythrotoxic, methaemoglobinemia	rat: bone marrow micronucleus positive in single + multiple dose studies	rat: variety of sarcomas in spleen in m > f, malign. haemangiopericytomas in spleen + other abdom. organs of f	rat: mesenchym.proliferations in spleen in m and f, chronic spleen capsulitis, haemosiderosis in spleen, liver and kidney ²⁾	¹⁾ George et al.(1990b) ²⁾ NTP (1979a)
Mouse: erythrotoxic, methaemoglobinemia ¹⁾	mouse:bone marrow micronucleus marginal positive at high dosages in single dose studies, no multiple dose study ¹	mouse: no tumor response ²⁾		

結論として、アゾベンゼンのデータは、雌雄のラットがアニリンの発がん性に感受性があることを裏付けており、雄は雌よりも感受性が高い。また、アゾベンゼンの腫瘍および遺伝毒性データはアニリンの影響を裏付けている。両物質ともマウスでは腫瘍を誘発しなかった。

4.1.2.8.4 発がん性に関する考察

種間比較：メトヘモグロビン血症

ヒトは、げっ歯類よりアニリンの毒性に対する感受性が高いと考えられる。

メトヘモグロビン形成に関するラットの感受性は、ヒトに比べて低いことが報告されている。Jenkins ら (1972) の試験では、志願者にアニリンを 3 日間またはそれよりやや長く連続経口投与したところ、25 mg 以上の用量でメトヘモグロビン血症が誘発された。平均体重を 70 kg として計算すると、ヒトの LOAEL は 0.36 mg/kg/日となる。一方、アニリンを経口投与したラットでは、40 mg/kg 以上の用量でメトヘモグロビン濃度が増加し、投与後 1~4 時間以内に最高値に達した（無処置動物 2.4% に対し、16.6%）。この試験における NOAEL は 20 mg/kg/日と考えられた。ヒトで感受性が高い理由は、メトヘモグロビンをヘモグロビンに還元するメトヘモグロビン還元酵素活性の種差によるものと考察されている。ラット赤血球およびマウス赤血球における本酵素活性は、ヒト赤血球よりそれぞれ 5 および 10 倍高い (Smith, 1986)。

その他の試験におけるメトヘモグロビン濃度の種間比較は、方法論的な問題のため制約がある。ほとんどのアニリンの反復曝露試験には、いつメトヘモグロビン分析を行ったかの情報がなかった。また、Khan ら (1993; 1995b) の試験では採血の 24 時間後に分析を行っているため、メトヘモグロビン濃度の結果が偽陰性または不正確である可能性が排除でき

なかった。メトヘモグロビン濃度は低温でも血液保存中に急速に低下するため、採取直後の血液でないと意味のある結果は得られない (Beulter et al., 1995)。

アニリンに反復曝露したマウスでのメトヘモグロビン濃度の測定は行われていないため、アニリン投与後のラットのメトヘモグロビン濃度とマウスのメトヘモグロビン濃度との比較はできない。アゾベンゼンの単回投与試験ではマウスでも確かにメトヘモグロビン血症がみられるが、複数回投与後の変化はマウスでは調べられていない (George et al., 1990b)。なお、初期の試験によれば、マウスでもアニリンの単回投与後にメトヘモグロビン形成がみられ、0.1~5 mmol/kg 投与後 10~20 分で 5~15.4%の最大増加を示したが、最高用量では 60 分後に突然死亡した (Smith et al., 1967)。

メトヘモグロビン形成は実験動物において、赤血球毒性のひとつの指標とはなり得るが、最適な指標ではないと考えられた。しかし、ヒトではより顕著なメトヘモグロビン濃度の増加がみられることから、ラットにおけるよりも有用なバイオマーカーと考えて良いかもしれない。

種間比較：赤血球毒性

アニリンに関するマウスのデータベースは未だ非常に不完全であるが、現在ある少数のデータからは、ラットにおけるようなアニリンによる脾臓腫瘍の誘発は認められなかった。しかし、血液毒性に関しては、マウスでもアニリンの血液毒性が生じる可能性を示すデータがいくらか存在する。

アニリン塩酸塩濃度 0.3%以上の混餌投与による（ラットおよび）マウスでの用量設定試験において、脾臓が黒色化し、腫大し、粟粒性を示した例が認められたが、これは赤血球または非特定の脾臓細胞に対する有害な影響を示している可能性がある。ただし、これらの試験は不完全なため、さらなる解明が必要である。一方、マウスの長期投与試験では、赤血球毒性を示すような脾臓その他の器官における二次的な形態変化は認められなかった (NCI, 1978)。アニリン塩酸塩を 0.6%の濃度で混餌投与したマウス（アニリン約 735 mg/kg/日）では胆管の炎症性変化がみられたが、ラットではみられなかった (NCI, 1978)。このような毒性の差はラットの感受性が量的に高いことを示しているものと考えられ、代謝経路の違いで説明できるかもしれない。すなわち、マウスではアニリンは主に N-アセチル化によって代謝され、これはラットの N-水酸化経路とは異なり飽和しない。また、マウスではグルクロン酸抱合が主な排泄経路である (Kao et al., 1978; McCarthy et al., 1985)。解毒速度は、マウスの方がラットよりも早い。

しかし、アニリンがマウスでも血液毒性を有するかもしれないという仮説は、アゾベンゼンのマウスへの単回投与で末梢赤血球数が減少する (George et al., 1990b) ことから裏付けられる。加えて、マウスではアニリン/アニリン代謝物の赤血球との結合性が異なっている可能性があり、障害を受けた赤血球の脾臓における分解がラットとは量的ないしは質的に相異なる。実際、¹⁴C-アニリンがマウス赤血球に特異的に保持される所見は認められず、マウス脾臓への放射能の蓄積もなかった (Robertson et al., 1983)。

適切なマウスの試験が更に行われれば、この点は明らかになるかもしれない。しかし、不十分なマウスのデータからは、赤血球毒性およびメトヘモグロビン血症がラットに種特異的なものかどうかは不明である。

赤血球に対する毒性はラットのみならずヒトでもみられる。ヒトでも、他の哺乳動物と同様、障害を受けた赤血球の排除は脾臓で行われる。アニリンに反復曝露されたヒトにおける脾臓毒性に関するデータはないが、脾臓はラットおよびヒトにおける標的器官と考えられる。

腫瘍生物学

ラットの脾臓にみられた腫瘍の大多数は線維肉腫ないし血管肉腫であった (CIIT, 1982)。血管肉腫と(線維)肉腫は、NCI 試験 (1978) の報告書原本にも記載されていた。Weinbergerら (1985) がこの NCI 試験を再確認したところ、1 例の血管肉腫を除き、悪性腫瘍はすべて線維肉腫またはその亜型と分類された。これらの腫瘍の発生は、多能性の間葉系幹細胞が、両種の腫瘍の組織発生における共通の細胞成分をなすとすれば説明がつく。なお、鑑別診断における主な診断学的特徴は、隆起した内皮細胞を有する血管の分布の有無と考えられる (Mohr, 1992) が、脾臓の赤脾髄自体、血管構造が比較的豊富であるため、光学顕微鏡のみで形態学的な鑑別を行うことは悪性度が高く、分化度が低い腫瘍の場合には困難かもしれない。この理由から、アニリンの発がん性試験における脾臓肉腫は、少なくとも大きな領域では線維、血管、更には骨への分化を示すかもしれないが、すべて共通の種類に属するものと解釈された。

被膜/脾柱の平滑筋や線維組織に由来する自然発生性の肉腫および線維肉腫は、ラットではまれである。脾臓の原発性血管種または血管肉腫の発生頻度は、4 系統のラットにおいて雄で 0~1.5%、雌で 0~0.5% とされ、原発性線維種または線維肉腫は報告がなかった (Losco, 1992)。また、ヒトでも生体異物に対する曝露歴がない場合、脾臓の原発性腫瘍はまれである。最も普通にみられる良性腫瘍のひとつは血管種であり、線維種など、その他の良性腫瘍は非常に珍しい。また、血管肉腫などの原発性悪性腫瘍もまれである (Bonner, 1988)。

いずれかの部位に肉腫を有する男性 11166 人、女性 8518 人のうち、脾臓の線維肉腫を有していたものはいなかった。血管肉腫はこれらの集団のうち男性 4 人、女性 4 人に認められた (Mack, 1995)。

長期試験では数種の器官に腫瘍が認められたが、アニリンは種々の原発性腫瘍を誘発する多臓器発がん物質であるとは考えられていない。体腔およびその他の器官に認められた肉腫は、脾臓の被膜を通して浸潤し、腹腔内臓器と隣接器官を直接巻き込んだものか、または血行性転移によるものであろう (NCI, 1978)。Weinberger ら (1985) は再評価において、低分化型の線維肉腫は主に被膜表面または脾臓外に位置していたこと、広範囲な転移が認められたこと、さらに転移部位は膵臓、消化管、肝臓、腎臓、副腎、腹腔内脂肪、および精巣と精巣上体の表面にわたっていたことを記載している。

脾臓の線維化と被膜過形成は誘発された脾臓肉腫と形態的に類似していることから、これらの病変は前腫瘍性であることが示唆された。被膜過形成では異型細胞が認められた (Weinberger et al., 1985)。また、線維化部分からの線維肉腫の発生が認められる場合があるとの記載があり、さらに、よく分化した線維芽細胞からなる領域が腫瘍細胞からなるより未分化な領域に隣接して認められた (Ward et al., 1980)。このことは、最初に存在していた線維化部分から肉腫が発生することを示すものと解釈された (Popp, 1990)。

脾臓は障害を受けた赤血球除去の中心的な器官であり、脾臓に対するアニリンの毒性は明らかに赤血球の障害に関連していることが、反復投与試験から示された。脾臓の赤血球除去活性は、動脈と静脈またはリンパ管との間に存在する、マクロファージによって強化された濾過床の構造に一部依存している。線維芽細胞性間質の障壁細胞として機能している筋線維芽細胞は、この脾臓の濾過床の構成成分のひとつである (Weiss, 1991)。仮説としては、障害を受けた赤血球の分解過程で活性化されたこの筋線維芽細胞が標的細胞である可能性も考えられる。しかし、特異的な手法による腫瘍細胞の特徴付けは行われておらず、この仮説は証明されていない。

雄ラットにおける脾臓腫瘍の発生頻度の明らかな増加 (CIIT, 1982; NCI, 1978) は、雄の性特異的反応と解釈することもできる。しかし、雌でも脾臓腫瘍の軽度な増加と、前腫瘍性病変と考えられる脾臓病変の高頻度の発生がみられることから、雌ラットも感受性を有することは確かである (CIIT, 1982; NCI, 1978)。雌ラットは雄ラットより感受性が低いが、これは Sprague-Dawley ラットで確認されているように、水酸化の割合が雌に比べて雄で高いことで説明できるものと考えられる (Pence and Schnell, 1979)。

腫瘍発生メカニズム

脾臓腫瘍

ラットにおける脾臓肉腫の発生と骨髄での小核の形成は、腫瘍反応がアニリンと脾臓細胞の DNA との直接作用によるものである可能性を示唆している。すなわち、アニリンの *in vivo* 遺伝毒性と腫瘍形成は密接に関連しているものと解釈できる。

脾臓細胞での DNA 付加体の形成は、脾臓細胞に対するアニリンの直接作用を強く裏付けている (McCarthy et al., 1985)。脾臓細胞における結合指数の絶対値は腎臓の値に比べて比較的低かったが、DNA 付加体形成はすべての (不特定の) 脾臓細胞を対象として測定されることから、絶対値が低いのは、アニリンの発がん性の標的細胞と考えられる間葉系細胞成分が他の有核細胞に比べて少ないためである可能性がある。動物の週齢にもよるが、他の有核細胞画分に含まれるのは、大半がリンパ球、有核赤血球および顆粒球である。マウスでは、これらの細胞は有核細胞総数の 85%以上を占めることがわかっており (Green et al., 1981)、ラットでも同様の値が予想された。これらの細胞で DNA 付加体が形成されないと仮定すると、間葉系細胞画分の DNA 付加体形成はより高くなる。これを明らかにするには、更なる試験で DNA 付加体を有する細胞の同定と、脾臓の間葉系細胞における DNA 付加体形成の定量を行う必要がある。

また、腫瘍発生には他のメカニズムも関与している可能性が考えられる。

脾臓毒性の重篤度が赤血球の障害の程度と期間に相関しているようにみえる一方で、腫瘍発生がある程度の赤血球毒性と関連しているかどうかは不明である。ラットにおいて低用量のアニリン塩酸塩 (10 mg/kg/日、アニリン約 7 mg/kg/日に相当) は明らかな赤血球毒性を示した (CIIT, 1982) が、脾臓腫瘍数は増加しなかった。このことは、腫瘍発生がある程度の赤血球毒性と関連しているという仮説を裏付けるものとも考えられる。したがって、赤血球に対して明らかに毒性がない用量に基づいて発がん性を示さない用量を求めることは可能かもしれない。

しかし、この仮説に対しては反論もある。赤血球毒性に対する雌ラットの感受性は雄ラットと同様である (CIIT, 1982) が、低および中間用量では腫瘍発生率の増加はなかった。したがって、血液毒性自体が腫瘍発生における重要なステップであるとは断定できない。さもなければ、溶血性貧血を引き起こす生体異物についてすべて脾臓腫瘍の誘発を疑わなければならない。これに関し、アゾベンゼンのデータによれば、マウスは貧血を示し、メトヘモグロビンを形成したが、発がん性試験ではアニリンの試験同様、腫瘍は誘発されな

った。

ヘモジデリン沈着は、脾臓腫瘍の発生において必須のステップではない。NCI 試験の再評価 (Weinberger et al., 1985) では、脾臓内のヘモジデリン沈着の頻度と腫瘍発生との間に明確な関連性は認められなかった。彼らは初期変化として急性うっ血の存在を考慮しており、血管外に出た血液が線維組織の高度の活性化と増殖を刺激したのかもしれない。また、アニリンの長期曝露に伴い、線維組織では細胞の形質転換と多能性間葉系細胞への脱分化が起きることが示唆された。

しかし、生体異物によらないその他の脾臓うっ血では脾臓肉腫の誘発は知られていない。うっ血は本来即時相反応と考えられ、28 日試験では投与 1 日目に顕著であったが、7 日目には消退した (Khan et al., 1995b)。また、NCI 試験の投与群ラットではうっ血は再確認できなかった (Weinberger et al., 1985)。

鉄の過剰蓄積と腫瘍発生との関連性が論じられている。ヘモグロビン合成時に再利用するための鉄の貯蔵は、健康な脾臓の正常機能である。アニリンを反復投与すると、脾臓の鉄含有量は 7 日まで増加したが、それ以上は投与 28 日まで増加しなかった (Khan et al., 1995b)。これは、脾臓が曝露 7 日後には細胞崩壊物を取り込むマクロファージ数の増加によって赤血球除去の必要性の増大に適応したことを示している可能性がある。また、長期試験終了時、ヘモジデリン沈着の発生頻度 (動物数) と重症度スコアの平均は、投与期間とも用量とも相関していなかった (Weinberger et al., 1985)。鉄を含む赤血球崩壊物の蓄積は、鉄に触媒されるフリーラジカルの生成がおそらく種々の組織障害反応を生じさせることで、組織への損傷に介在するものと考察されている (Khan et al., 1993)。事実、この試験において、脂質および蛋白の過酸化は、アニリンに曝露されたラットの脾臓ホモジネートにおいてより高度であった。一方、Khan ら (1993) とは逆に、鉄の過負荷をもたらすヘモジデリンの形成は、細胞防御メカニズムと考えるべきであると結論した研究者もいた (O'Connell et al., 1986)。実際、生理的条件下では、ヘモジデリンの形をとる鉄は、フェリチンに結合した鉄より脂質過酸化をはるかに促進しにくい。

一般に、他の物質については、溶血性貧血が腫瘍発生と何らかの関連性を有しているという根拠は得られていない。

現在までのところ、メトヘモグロビン血症が腫瘍発生に必然的に関連しているという証拠はない。ラットでは投与期間が長期化するとメトヘモグロビン濃度は増加したが、投与期間に伴って増加し続けることはなく、投与期間の後期であってもメトヘモグロビンの相対的な濃度は低めであった (Khan et al., 1995b)。

アゾベンゼンを単回投与したマウスでは、赤血球毒性とメトヘモグロビン血症が認められた (George et al., 1990b)。アニリンもアゾベンゼンと同様にマウスでメトヘモグロビンを形成させるとすれば、マウスで発がん性試験が陰性であったことは、腫瘍発生におけるメトヘモグロビン形成の関与を否定する根拠になるであろう。

脾臓以外の部位

主要な役割を果たす脾臓に加えて他の組織もまた、障害を受けた赤血球を除去することができるし、もしくはその分解過程に関わっている。腎臓と肝臓のヘモジデリン沈着は、このことを示している (NCI, 1978)。しかし、脾臓以外の赤血球除去部位では腫瘍発生頻度の増加は認められなかった。White ら (1948) の初期の試験では、肝硬変と肝細胞腫瘍 (ヘパトーマ) の発生頻度の増加が認められたが、他の試験では確認されなかった。また、McCarthy ら (1985) はラットの腎臓においてかなりの DNA 付加体形成を報告しており、脾臓以外の部位における赤血球の分解過程と DNA 結合が、腫瘍を成長させるのに十分な前提条件でないことは明らかであった。

結局、障害された赤血球の、アニリンまたはその代謝物の担体としての役割、および脾臓腫瘍の萌芽と成長に対する関与については不明である。

4.1.2.8.5 発がん性の結論

F344 ラットを用いた 2 件の発がん性試験では、アニリン投与によって雄で脾臓肉腫の発生頻度が用量依存性に増加した。雌で認められた少数の脾臓腫瘍もアニリン投与によるものと考えられた。アニリンはラットおよびマウスの *in vivo* で遺伝毒性を示すことから、遺伝毒性が腫瘍化と腫瘍の成長をもたらしたと推測することは可能であるが、発がんの背景にあるメカニズムが遺伝毒性作用に基づくものであることを示す科学的に蓋然性のある証拠は必ずしもなかった。腫瘍発生における他のメカニズムの関連性も論議されているが、現在のところ、閾値を有するメカニズムの存在を示す、蓋然性のある作用様式は明らかになっていない。

更なる試験が必要であり、技術会議 (Technical Meeting) II/2000 では、ラットにおける脾臓腫瘍についてより蓋然性のあるメカニズムを解明するための新規研究プログラムを開始した。

知られている限り、アニリンは、ラットとヒトで同じように代謝される。したがって、あ

らゆる曝露シナリオにおいて、ヒトでのある程度の発がんリスクを除外することはできない。現在入手可能なヒトのデータからは、ヒトに対する発がんリスクは裏付けられていないが、これはそこに記載された状況下にしか当てはまらない。限定的なヒトのデータベースからヒトにおける発がんリスクの最終評価を行うことは不可能である。

以上より、発がん性物質の分類と表示に関する EU 判定基準に従って、アニリンの分類は発がん性の区分 3、表示は R40「発がん性の影響に関する限定的な証拠がある」となる。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物における試験

受胎能の障害

アニリンについての多世代試験または受胎能試験のデータは得られていない。

Fischer 344 アルビノラットにおける 104 週間混餌投与慢性毒性試験 (CIIT, 1982 ; 4.1.2.6 項参照) から、精巣上体を含む精巣および卵巣の器官重量データならびに高用量群雌雄の生殖器官の肉眼病理学および病理組織学的検査の情報を得ることができる。この試験では、各群雌雄各 130 匹にアニリン塩酸塩を約 7、22 および 72 mg/kg/日 (アニリン相当) の用量で投与した。投与 26 および 52 週時に各群雌雄各 10 匹を、投与 78 週時に各群雌雄各 20 匹を殺処分し、残りの動物を総投与期間 104 週間の試験終了時に殺処分した。その結果、いずれの中間殺処分時または最終殺処分時にも、精巣重量および精巣の病理組織検査では、対照群に比して、雄の生殖器系に対する、投与に関連した明らかな影響は観察されなかった。雌では卵巣の絶対および相対重量が投与動物において投与 26、52 および 78 週後に軽度が増加したが、対照群の値に比して統計学的有意差はなかった。一方、104 週後の最終殺処分時には、卵巣の絶対および相対重量が、対照群 (0.190 g、0.71%) に比して高用量群 (0.095 g、0.36%) で統計学的に有意に減少した。病理組織学的検査では、子宮内膜ポリープの発生頻度の増加が雌のアニリン投与動物において投与 78 週後にのみ認められた。同病変は対照群では 1 例しか観察されなかったのに対し、高用量群 6 例、中間用量群 3 例、低用量群 2 例で認められた。しかし、投与 26 および 52 週後または試験終了時 (104 週) の検査ではこのような影響はみられなかった。子宮内膜ポリープは本系統のラットで普通にみられる所見であることから、曝露 78 週時にのみ単発的に認められた子宮内膜ポリープの発生頻度の投与に関連した増加は、偶発所見と考えられる。結局、本試験の総合的な評価では、被験物質による子宮内膜ポリープの明らかな誘発は確認できなかった。なお、上記試験に加えて、アニリン塩酸塩は B6C3F1 マウスおよび F344 ラットにおける別の 103

週間混餌投与試験（アニリン塩酸塩の発がん性に関するバイオアッセイ）でも用いられていた（NCI, 1978 ; 4.1.2.6 項参照）。この試験では、2 用量を動物に投与した。マウス各群 50 匹には、飼料中濃度として低用量 0.6%（アニリン約 737 mg/kg/日に相当）、高用量 1.2%（アニリン約 1510 mg/kg/日に相当）を投与した。ラット各群 50 匹には、飼料中濃度として低用量 0.3%（アニリン約 174.4 mg/kg/日に相当）、高用量 0.6%（アニリン約 350.5 mg/kg/日に相当）を投与した。試験において生殖器重量を測定したという報告はないが、生殖器系の器官については病理組織学的検査を行って非腫瘍性および腫瘍性病変の有無が調べられていた。その結果、マウスでは、アニリン用量約 1510 mg/kg/日まで、雌雄ともいずれの生殖器系の器官にも投与に関連した影響はなかった。また、雄ラットについても、アニリン用量約 350.5 mg/kg/日まで、いずれの生殖器系の器官にも投与による影響はなかった。一方、雌ラットでは、投与 103 週後に子宮内膜ポリープの発生頻度の増加が認められた。同病変の発生頻度は、対照群 2/24（8%）に対し、低用量群（アニリン約 174.4 mg/kg/日）で 15/48（31%）、高用量群（アニリン約 350.5 mg/kg/日）で 7/50（14%）であった。本系統ラットの無処置動物および投与動物における内膜ポリープの発生については、先に引用した CIIT 試験（1982）にも記載されていた。

発がん性検出用の「迅速試験」として提案されている *in vivo* モデルを用いた試験からも、更に情報が得られている。この試験では、アニリン塩酸塩は特定の近交系マウスにおいて精子頭部異常を誘発しなかった（Topham, 1980a, 1980b ; 4.1.2.7 項参照）。

発生毒性

F344 ラットを用いた経口投与試験において、アニリン塩酸塩の催奇形性および出生後の影響が評価された（Price et al., 1985）。本試験の 1 セクションでは、妊娠雌動物各群 21～24 匹にアニリン塩酸塩 10、30 および 100 mg/kg/日（純度および安定性については記載なし）を 2 mL/kg の容量で妊娠 7～20 日に強制経口投与した。もうひとつのセクションでは、別の妊娠雌動物各群 12～15 匹に妊娠 7 日から分娩（生後 0 日）まで投与して出生後の発生を評価した。溶媒対照（蒸留水）とともに、催奇形性の陽性対照としてヒドロキシ尿素（200 mg/kg/日）を用いた。母動物について体重測定および症状観察を殺処分時まで毎日実施した。妊娠 20 日に母動物を殺処分し、各投与群とも 20 匹以上の妊娠ラットについて、体重、肝臓および脾臓重量、妊娠子宮重量、黄体数、着床数、早期および後期吸収数、ならびに生存および死亡胎仔数を記録した。胎仔については性別を調べ、体重および頭腎長、肉眼的な形態異常、内臓・骨格異常、ならびに脾臓および肝臓重量を評価した。さらに、高用量群（100 mg/kg/日）および溶媒対照群の母動物と胎仔について、血液学的検査項目を評価した。

試験のうち出生前の影響を調べるセクションでは、すべての母動物が妊娠 20 日の殺処分時まで生存したが、母動物毒性の徴候が観察された。すなわち、平均絶対体重増加量（妊娠 0 日から 20 日までの間の体重増加量 - 妊娠子宮重量）が用量に関連して低値を示し、対照群 26.7 ± 1.5 g に対し、高用量群（100 mg/kg/日）では 19.4 ± 1.5 g で、統計学的に有意に低値であった。また、脾臓の平均相対重量（全体重における割合）は対照群で値 19.2% であったのに対し、10、30 および 100 mg/kg/日群では 24.3、25.5 および 36.7% であり、用量依存性の統計学的に有意な増加が認められた。さらに、高用量群（100 mg/kg/日）の母動物では、アニリンの毒性に特徴的な徴候（メトヘモグロビン濃度増加（2~3 倍）、赤血球数減少、網赤血球数増加）が認められた。しかし、妊娠率、母動物当たりの黄体数および母動物当たりの着床数には、溶媒対照群とアニリン投与群との間に差はみられなかった。また、1 腹当たりの生存胎仔数、平均胎仔体重、平均頭臀長および胎仔の平均脾臓相対重量にも差はなかった。胎仔検査では、肝臓相対重量が対照群の体重比 $7.7 \pm 0.12\%$ に対し、100 mg/kg/日群で $8.0 \pm 0.15\%$ と軽度ながら統計学的に有意に増加したが、10 および 30 mg/kg/日群ではそのような変化はみられなかった。各群で低頻度の奇形が認められ、その頻度は溶媒対照群で 3/178 (1.7%)、10、30 および 100 mg/kg/日群でそれぞれ 0/181 (0%)、7/120 (3.3%) および 4/190 (2.1%) であった。1 匹以上の奇形胎仔を含む腹の割合および 1 腹当たりの奇形胎児の割合には、溶媒投与群とアニリン投与群との間に統計学的有意差はなかった。高用量群の胎仔についての血液学的検査項目の評価では、溶媒対照群と比較して、網赤血球数 (%)、白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値、血小板数およびメトヘモグロビン濃度に影響はみられなかった。ただし、赤血球分布幅は対照群 15.64 ± 0.14 に対して 14.83 ± 0.16 と、軽度ながら統計学的に有意に減少し、赤血球の大きさ (MCV) は対照群 $158.8 \pm 1.15 \mu\text{m}^3$ に対して $162.6 \pm 0.55 \mu\text{m}^3$ と増加した。

試験のうち出生後の影響を調べるセクションでは、分娩後 30 日に殺処分した母動物において、脾臓相対重量の有意な増加、メトヘモグロビン濃度の増加および MCV の増加が高用量群で認められた。10 および 30 mg/kg/日群では、脾臓相対重量の増加はなかった。アニリン投与群の仔動物の生後 0 日における生存同腹仔数、1 腹当たりの死亡仔の頻度、1 腹当たりの雄の割合、腹ごとの仔動物の平均（雌雄合算）体重および平均（雌雄合算）体長、ならびに脾臓および肝臓の平均相対重量には、溶媒対照と比較して差はなかった。しかし、100 mg/kg/日群の仔動物の赤血球の大きさ (MCV) は、対照群 $133.4 \pm 0.72 \mu\text{m}^3$ に対して $141.3 \pm 1.7 \mu\text{m}^3$ で統計学的に有意な増加を示した。生後 0 日における他の血液学的検査項目には対照群とアニリン投与群との間に統計学的有意差は報告されなかった。また、生後 10、25 および 50 日にはいずれの血液学的検査項目にも統計学的有意差はなかった（データの記載なし）。生後 0 日に間引きし、残りの仔動物を生後 60 日まで飼育したところ、この期間中に対照群に比して偶発的で一時的な低体重ならびに偶発的で一時的な脾臓相対重量および肝臓相対重量の増加が認められた。すなわち、100 mg/kg/日群の雄仔動物は、生

後 0、2 および 10 日に対照群より低体重であったが、生後 25、50 および 60 日にはそのような変化はなかった。100 mg/kg/日群の雌仔動物は、生後 2 日に対照群より低体重であったが、生後 0、10、25、50 および 60 日にはそのような変化はなかった。同様に、アニリン投与に伴う有意な用量 - 反応傾向のある仔動物の脾臓相対重量の増加が生後 25 日に認められたが、生後 10、50 および 60 日には認められなかった。また、対照群に比して統計学的有意差はあるが、用量との関連性のない仔動物の肝臓相対重量の増加が生後 25 日に 10 および 30 mg/kg/日群で、生後 50 日に 50 mg/kg/日群で認められたが、生後 10 および 60 日には認められなかった。生後 60 日の殺処分時には、雄仔動物の精巣相対重量に、アニリン投与群と溶媒対照群との間の差はみられなかった。なお、投与群の母動物から生まれた仔動物は対照群と比較して離乳前の死亡率がやや高い傾向にあった。すなわち、投与群では総死亡数がより多く（対照群 3 匹に対し、10、30 および 100 mg/kg/日投与群では 6、15 および 13 匹、ただし、同腹仔数および総仔動物数は記載なし）、また出生後の死亡が 1 匹以上みられた腹数も軽度な増加を示した（対照群 2/15 に対し、10、30 および 100 mg/kg/日投与群では 3/16、4/15 および 5/16）。ただし、出生後の死亡（大部分は生後 6 日より前で、離乳後はなし）が 1 匹以上みられた腹数の増加については、アニリン投与群と対照群との間に統計学的有意差はなかった。また、離乳から生後 60 日までは死亡は認められなかった。身体的発達の指標（耳介展開、毛生、下顎切歯萌出、眼瞼開裂、膺開口、精巣下降）が認められた日齢、初期行動発達（平面立ち直り反応、断崖回避反応、聴覚驚愕反射、針金保持反応、空中立ち直り反応）およびオープンフィールドにおける仔動物の行動（生後 30 日）は、アニリン投与の影響を受けなかった。

要約すれば、アニリン塩酸塩 100 mg/kg/日では、母動物において、一般毒性（体重増加抑制）と被験物質に特異的な血液毒性（赤血球数減少、網赤血球数増加、メトヘモグロビン濃度増加、脾臓相対重量増加）の徴候が認められた。また、分娩後 30 日の殺処分時にもアニリン特異的な毒性（メトヘモグロビン濃度増加、脾臓相対重量増加、MCV 増加）が認められたことから示されるように、母動物におけるこれらの毒性は投与終了後も少なくとも哺育期間中は持続した。造血機能の活性化を示す脾臓相対重量の増加は、アニリンによる血液毒性を反映していると考えられるため、妊娠期間中の母動物における脾臓相対重量の統計学的に有意で用量と関連性のある増加に基づくと、本試験では母動物毒性の NOAEL を決定できない。一方、母動物毒性の LOAEL は、本試験における妊娠期間中の統計学的に有意な脾臓相対重量の増加から、アニリン塩酸塩 10 mg/kg/日（アニリン 7 mg/kg/日に相当）となる。妊娠中の母動物に対するアニリン塩酸塩の投与では、明らかなアニリン特異的な血液毒性および母動物毒性の徴候を引き起こす用量においても胎仔の発生に対する障害を示す所見は得られず、胚の生存率や出生前／周産期の胎仔／新生仔の生存率に対する影響を示す所見もなかった。これは、試験の両セクションにおける良好な妊娠成績と胎仔／新生仔の成長関連項目の正常さから明らかであった。また、本試験では被験物質に特異的

な構造異常の誘発を示す変化もみられなかった。妊娠 20 日に検査した高用量群の胎仔では肝臓相対重量が軽度増加したが、出生時に検査した新生仔ではそのような増加は認められなかった。しかしながら、妊娠 20 日に検査した高用量群の胎仔では、一部の血液学的検査項目の変化を示す軽微な所見がみられ、同様の所見が新生仔でも認められた。両所見は、100 mg/kg/日という用量で、おそらく出生前の胎仔または新生仔の造血器系にも何らかの障害が生じることを示すものと解釈することができる。出生後の観察期間中、投与群の出生仔では対照群の出生仔と比較して生存率、成長および発達に大きな差はなく、造血活性の亢進を示す所見もなかった。したがって、出生前および出生後の発生・発達に対する顕著な障害は、アニリン塩酸塩 100 mg/kg/日まで認められなかった。しかし、アニリンの血液毒性に関連した特異的影響を示す軽微な所見が出生前の胎仔および新生仔においても認められたこと、また出生後の生存率に対する影響についても幾つかの所見が得られたことから、本試験結果を総合的に判断すると、発生毒性についてはより慎重を期した NOAEL、すなわちアニリン塩酸塩 30 mg/kg/日（アニリン 21 mg/kg/日に相当）とすることがむしろ妥当であると考えられる。

総数 60 種類の化学物質について行われたスクリーニング試験において、CD-1 アルビノマウス 50 匹からなる群に、アニリン 560 mg/kg/日をコーン油を溶媒として 5 mL/kg の容量で、妊娠 6～13 日に強制経口投与した (Piccirillo et al., 1983; Hardin et al., 1987)。この用量は先に行われた用量設定試験から予測された LD₁₀ に相当していたが、実際、明らかな母動物毒性の徴候が現われて、50 匹中 6 匹が死亡し、平均体重変化量が有意に減少した。本試験では、母動物毒性のある用量のアニリンを単回投与しても、生存腹数および 1 腹当たりの生存仔動物数に明らかな影響はみられなかった。しかし、アニリン投与群の出生仔では対照群と比較して、出生時体重の統計学的に有意な減少（対照群 1.6 ± 0.2 g に対し、 1.5 ± 0.1 g）および出生仔体重増加量の統計学的に有意な減少（対照群 1.1 ± 0.4 g に対し、 0.9 ± 0.2 g）、ならびに生後最初の 3 日間における出生仔生存率の統計学的には有意でない低下（対照群 $99.3 \pm 2.6\%$ に対し、 $94.1 \pm 16.5\%$ ）が認められた。

4.1.2.9.2 ヒトにおける試験

アニリン曝露によるヒトの生殖および発生に対する影響については、1 件の疫学研究から得られた情報があるのみである。他の化学物質とともにアニリンに職業的に曝露されたロシア人女性に関するこの研究では、月経障害、卵巣機能障害および自然流産の増加が報告されたが、その記載は不完全であった (Podluzhnyi, 1979)。方法論的な不備と曝露データの欠落のため、本研究を評価目的に利用するには、その価値は不十分であると考えられた。

4.1.2.9.3 生殖毒性に関する結論

アニリンについての受胎能に関する試験データは入手できていないが、動物を用いた生涯にわたる反復曝露試験のデータでは、雌雄の生殖器系の器官において、被験物質による、あるいは重大な障害は認められなかった。ラットの試験で報告された雌の生殖器における所見（卵巣重量減少、子宮内膜ポリープ）は、雌の生殖能に関して意味のあるものとは考えられない。これらの影響はたとえ認められても生殖期の後期またはそれ以降のみであったため、生殖に関わる健康状態に関して生物学的意味を有するというより、一般的な健康状態の障害の可能性を示すものと考えられる。加えて、52 週間までに渡るアニリンの混餌曝露では、子宮内膜の健全性に障害を与えないことは明らかであった。また、現在入手可能な発生学的試験データからは、先に母動物においてアニリン特異的な血液毒性を引き起こした用量においても、アニリンが出生前または出生後の発生・発達を特異的に障害する可能性は認められなかった。したがって、現在入手可能な動物試験のデータからは、アニリンは生殖毒性物質ではないと評価される。

アニリンの生殖毒性に関するリスクアセスメントのための、吸入または経皮投与による試験データは入手できていない。

7、22 および 72 mg/kg/日の用量における反復経口投与試験（CIIT, 1982）では、雌雄について、生殖にとって重要な時期に、臓器重量測定および病理組織学的評価が行われた。その結果、精巣の重量および組織像は試験中影響を受けなかった。同様に、雌も 52 週齢以上までアニリンに連続曝露されても生殖器官に影響を受けなかった。本試験では、最高用量において、重篤な慢性毒性および発がん性が認められている。したがって、生殖器系の器官に関する上記の結果は、毒性および発がん性を引き起こす用量に至るまで受胎能の障害を示す所見がみられなかったものと解釈される。これより、生殖器毒性に関する NOAEL は 72 mg/kg/日と決定された。また、Price ら（1985）の試験では、母動物に対する 100 mg/kg/日の投与に関連して周産期の胎仔で造血器系の障害を示す幾つかの所見がみられたこと、さらに出生後の生存率に対する影響についても幾つかの所見が得られたことから、発生毒性に関する NOAEL は、アニリン塩酸塩 30 mg/kg/日（アニリン 21 mg/kg/日に相当）とされた。一方、母動物ではアニリンによる血液毒性を示す所見が認められたことから母動物毒性の NOAEL は得られなかったが、同じ試験から母動物毒性の LOAEL は、アニリン塩酸塩 10 mg/kg/日（アニリン 7 mg/kg/日に相当）とされた。母動物毒性に関するこの LOAEL は、質的にも量的にも反復投与毒性に関する LOAEL/NOAEL についての考察とよく一致しており、妊娠動物のアニリンへの感受性は、非妊娠動物のアニリンへの感受性と比較して大きな差はないことを示している。

Appendix E Hepatic metabolism of aniline

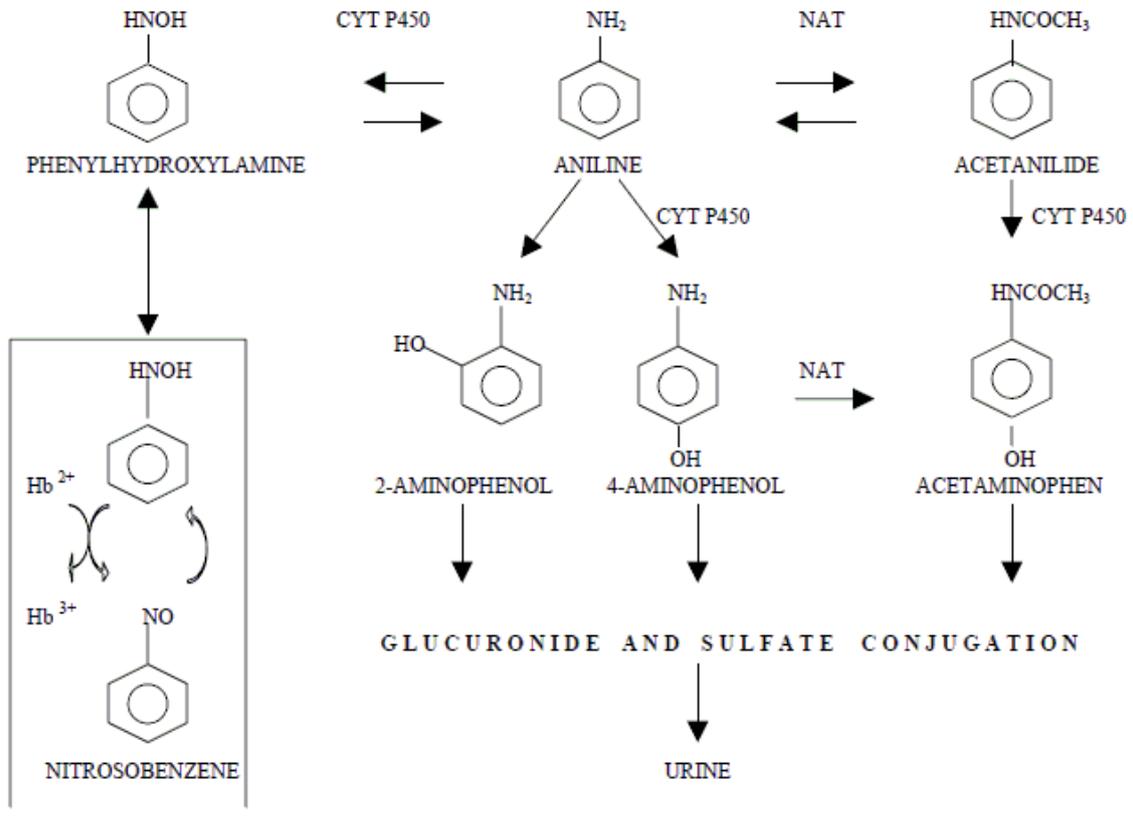


Fig. 1 Hepatic metabolism of aniline (from Harrison and Jollow, 1987)

P450, cytochrome P450 ; NAT, N-acetyltransferase ;
 Hb^{2+} , haemoglobin; Hb^{3+} , methaemoglobin

Appendix F Schematic representation of main toxic effects related to aniline erythrotoxicity

