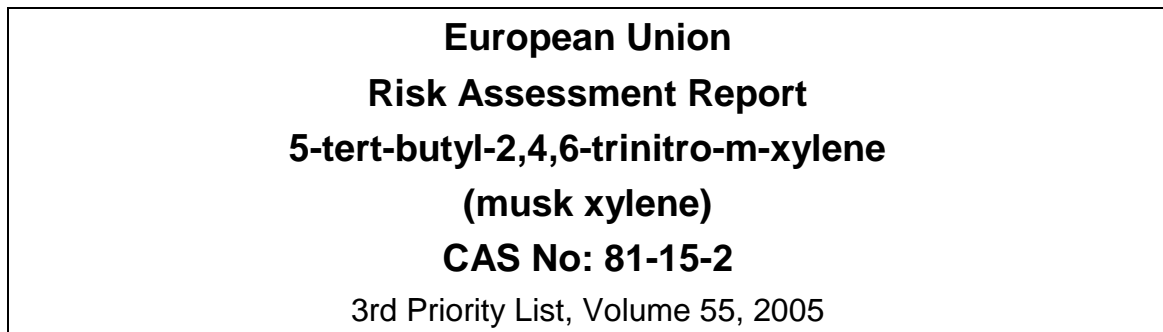


部分翻訳



欧州連合

リスク評価書 (Volume 55, 2005)

5-tert-ブチル-2,4,6-トリニトロ-m-キシレン  
(ムスクキシレン)



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、5-tert-butyl-2,4,6-trinitro-m-xylene (musk xylene) (CAS No: 81-15-2)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/REPO\\_RT/muskxylenereport322.pdf](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPO_RT/muskxylenereport322.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 動物における試験

###### 経口

雄ラット（Wistar、6週齢）3匹に、5-tert-ブチル-<sup>3</sup>H-ムスクキシレンをオリーブ油を溶媒として70 mg/kgの用量で単回経口投与した。尿および糞を7日目まで採取し、投与7日後に血液を採取した。その後、動物を安楽死させ、一部の器官・組織を採取して分析した。また、別の雄ラット4匹に胆管カニューレを装着し、ムスクキシレンをオリーブ油を溶媒として50 mg/匹の用量で単回経口投与して、48時間胆汁を採取した。

###### 結果

投与量の約50%が24時間以内に尿および糞中に排泄され、7日目までに約86%が回収された。尿および糞中への排泄は、それぞれ約10.3%および約75.5%であった。7日後の屠体における残留は約2%であった。ムスクキシレンは主に胆汁を介して糞中に排泄されたと述べられているが、数値データは示されていない。脂肪組織および肝臓中の濃度は、血中濃度のそれぞれ3.8倍および2.9倍であり、腎臓および肺臓中の濃度も、血中濃度よりやや高かった。その他の組織・器官中の濃度は、血中濃度と同程度か、それより低かった（濃度や測定値の記載なし）（Minegishi et al., 1991）。

雄ラット（Wistar、6週齢）6匹に、ムスクキシレンをオリーブ油（0.5 mL）を溶媒として200 mg/kgの用量で2週間（週5日）経口投与し、尿および糞を採取して代謝物を同定した。また、胆管カニューレ装着ラット4匹から採取した胆汁（上記試験参照）についても、

代謝物を分析した。種々の代謝物の相対的な重要性を示す数値データは記載されていないが、著者ら (Minegishi et al., 1991) は、3 経路すべてにおける主要排泄物 (以下ではこれを “[M]” で示す) が何であったかは述べている。試験の結果、ムスクキシレン自体 [M]、2-アセチルアミノ-5-tert-ブチル-1-メチル-3-ヒドロキシメチル-4,6-ジニトロベンゼン [M]、2-アミノ-5-tert-ブチル-1-メチル-3-ヒドロキシメチル-4,6-ジニトロベンゼン [M] および 2-アミノ-5-tert-ブチル-4,6-ジニトロ-*m*-キシレン [M] が糞、胆汁および尿中に認められ、4-アミノ-5-tert-ブチル-4,6-ジニトロ-*m*-キシレンおよび未同定の代謝物 1 種類が糞および尿中に、2-アミノ-5-tert-ヒドロキシブチル-4,6-ジニトロ-*m*-キシレンが胆汁および尿中に、そして 4-アミノ-5-tert-ブチル-1-メチル-3-ヒドロキシメチル-2,6-ジニトロベンゼンが尿中に認められた。さらに、5-tert-ヒドロキシブチル-1,3-ジメチル-2,4,6-トリニトロベンゼンまたは 1-メチル-3-ヒドロキシメチル-5-tert-ブチル-2,4,6-トリニトロベンゼンと同定されたもう 1 種類の代謝物が、未特定の抱合体として胆汁中に排泄された。他の代謝物の抱合体は観察されなかった (Minegishi et al., 1991)。

注：最後に述べられている代謝物 (1-メチル-3-ヒドロキシメチル-5-tert-ブチル-2,4,6-トリニトロトルエン) はヒドロキシメチルムスクキシレンであり、Hawkins ら (1984) ならびに Hawkins および Ford (1999) により、ラットの胆汁中代謝物として暫定的に同定されていた。

成熟および発生・成長中 Long-Evans ラットを用いて、血液および組織における生体内蓄積を GC-ECD 法により測定した。試験では、雌雄のラットに、ムスクキシレンを飼料 1 kg 当たり 1、10、33 または 100 mg の含量で、交配前 10 週間混餌投与した。投与は、妊娠および授乳期間中も継続し、出生仔を生後 1 日または 14 日に安楽死させた。その結果、出生仔では、用量依存性のあるムスクキシレンの蓄積が認められ、その濃度は、100 mg/kg を混餌投与された成熟雌における体脂肪中濃度の 1/2~3/4、また同成熟雄の値の 3~4 倍であった。乳汁中のムスクキシレン濃度は、成熟雌の脂肪組織中濃度と同程度であった。ムスクキシレンを成獣期に混餌投与されたラットでは、脂肪組織中濃度が最も高かったが、他の器官 (卵巣、副腎) にもかなりの量が認められた。雌の組織中濃度は雄の 3.7~6.8 倍であった。この性差の理由は説明されていないが、著者らによれば、体脂肪量とは無関係で、排泄速度の差とも関連していないようであった。出生仔では性差は認められなかった (Suter-Eichenberger et al., 1998)。各組織試料中のムスクキシレン濃度を、Table 4.7 に示す。

**Table 4.7** Musk xylene levels in tissues and milk of adult male and female Long Evans rats and in offspring.

	Musk xylene level <sup>1</sup> (mg/kg tissue)					Musk xylene level <sup>1</sup> (mg/kg lipid)	
	CNS <sup>2</sup>	Kidney	Liver	Ovary / Testes	Adrenal	Fat	Milk
adult rats fed dietary musk xylene at 100 mg/kg feed for 10 weeks (pre-mating)							
males (n=4)	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.3	4.3 ± 2.8	36.9 ± 9.6	
females (n=4)	2.4 ± 0.3	3.8 ± 1.7	4.4 ± 0.5	17.4 ± 3.9	23.1 ± 3.8	162.0 ± 24.2	
one day old pups of dams fed dietary musk xylene at 100 mg/kg feed for 10 weeks pre-mating + gestation							
(n=4)							218.9 ± 52.3
14 day old pups of dams fed dietary musk xylene at 100 mg/kg feed for 10 weeks pre-mating + gestation and lactation							
males (n=8)						120.5 ± 39.4	
females (n=8)						115.3 ± 29.7	

1 Data are rounded means ± standard deviation.

2 CNS : central nervous system.

## 経皮

Sprague-Dawley CD ラット 16 匹および Long-Evans ラット 5 匹の背部を剃毛し、環標識 <sup>14</sup>C-ムスクキシレンを 0.5 mg/kg の用量で経皮投与したときの、放射能の吸収、分布および排泄が調べられている。試験では、<sup>14</sup>C-ムスクキシレンをフェニルエチルアルコールとエタノールの混合液に溶解して調製し、面積 9 cm<sup>2</sup> の区画に 0.01 mg/cm<sup>2</sup> の容量で均一に塗布し、塗布部位を閉塞包帯で覆った。6 時間適用後、包帯を除去し、1%フェニルエチルアルコール・エタノール液を含ませた脱脂綿で塗布区画の皮膚を拭った。また、投与直前に雄ラット 2 匹（CD 1 匹、Long-Evans 1 匹）の胆管に、カニューレを迅速に装着した。投与 6 時間後以降に安楽死させたラットから、尿、糞および呼気を採取した。CD ラット 2 匹ずつを投与開始 1、3、6、8、24、48、96、120 時間後に、Long-Evans ラットを投与開始 6、24、48、96、120 時間後に安楽死させた。安楽死前に採血し、分析した。また、組織中の放射能を測定した。

結果：塗布量の約 8%が 6 時間以内に剃毛した背部から吸収されたが、約 14%は洗浄後も皮膚に残留し、吸収され続けた。48 時間では合計して塗布量の約 20%が吸収され、2%が皮膚に残留していた。結果は両系統のラットとも同様であった。

CD ラットにおける 120 時間後までの尿および糞中への排泄量は、平均して塗布量のそれぞれ 3.9 および 15.2%であり、屠体には約 0.2%が残留しているのみであった。Long-Evans ラットにおける排泄率もほぼ同様で、5 日間に塗布量のそれぞれ 4.0 および 14.0%が、尿および糞中に排泄された。大部分の放射能は、投与開始後最初の 48 時間で排泄され、48~120

時間における尿および糞中への排泄量は、それぞれ投与量の 0.5%未満および 3%未満であった。呼気中には放射能は検出されなかった。24 時間後に安楽死させた動物では、ほぼ全組織に放射能が検出された。濃度は投与開始約 8 時間後が最高で、その後一貫して低下した。CD ラットにおいて 8 時間後に最も高濃度であったのは、消化管 (0.868  $\mu\text{g/g}$ )、脂肪組織 (0.159  $\mu\text{g/g}$ )、肝臓 (0.062  $\mu\text{g/g}$ )、脾臓 (0.0425  $\mu\text{g/g}$ ) および腎臓 (0.0265  $\mu\text{g/g}$ ) であり、これらの組織の放射能濃度は試験期間を通じて高値を示した。副腎 (8 時間後で 0.0685  $\mu\text{g/kg}$ ) および甲状腺 (0.0696  $\mu\text{g/kg}$ ) の放射能濃度も 24 時間後までは高値を示したが、その後急速に低下した。Long-Evans ラットにおける分布も眼球を除いてほぼ同様であった。眼球の放射能濃度は、アルビノの CD ラットでは 24 時間後に最高値の 0.0044  $\mu\text{g/kg}$  に達した後、減少し、48 時間後には検出限界以下になったのに対し、有色の Long-Evans ラットでは、5 日間を通じて次第に増加し、6 時間後の 0.0041  $\mu\text{g/kg}$  から 120 時間後には 0.0064  $\mu\text{g/kg}$  となった。胆管カニューレ装着ラットでは、CD ラットおよび Long-Evans ラットとも、一定の速度 (1 時間当たり投与量の約 1.4%) で放射能が胆汁中に排泄された。胆管カニューレ装着ラットの尿中放射能濃度は 24 時間で投与量の 0.21%に過ぎず、挿管した Long-Evans ラットにおける 48 時間の尿中排泄量は合計しても投与量の 0.3%であって、腸肝循環の介在を示唆していた。胆汁中放射能の 50%超は 1 種類の代謝物 (グルクロン酸抱合体、おそらくはヒドロキシメチルムスクキシレンの抱合体) が占めており、これが消化管で脱抱合され、さらに代謝されて、少なくとも 4 種類のクロマトグラフ的により極性の高い化合物になると考えられた。これらの成分の中には少なくとも部分的に再吸収されるものがあり、複雑な尿中代謝物プロファイルの原因となっていた (Hawkins et al., 1984; Hawkins and Ford, 1999)。

雄の Sprague-Dawley CD ラット 10 匹の背部 (面積約 9  $\text{cm}^2$ ) を剃毛し、環標識  $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレン (溶媒: フェニルエチルアルコールおよびエタノール) を 0.5  $\text{mg/kg}$  の用量で毎日 24 時間、14 日間にわたって閉塞適用した。適用ごとの皮膚の洗浄は行なわなかった。2 匹 (初回投与の 24 時間後に 1 匹、14 回目の投与の 24 時間後に 1 匹) については、安楽死させた後、全身オートラジオグラフィを行なった。残りの 8 匹からは数時点で尿および糞を採取し、また安楽死させた際に血液、投与部皮膚、脳、腎臓、肝臓、甲状腺および脂肪を採取した。

全身オートラジオグラフィの結果、初回投与の 24 時間後には、放射能は全身に広く分布していないことが明らかになった。比較的高濃度に認められたのは、適用部位と、小腸内容物、大腸内容物および胆管であった。また、低濃度の分布が鼻甲介に認められた。14 回目の投与の 24 時間後に安楽死させたラットの組織では、全般的にわずかながら多くの放射能が認められたが、依然として適用部位と消化管が高濃度で、肝臓、甲状腺および鼻甲介に低濃度の分布が認められた。すなわち、投与放射能の多くは適用部位に残存しており、

放射能の吸収は不完全であった。

1 回目の投与の 24 時間後における尿および糞中への排泄量は、ムスクキシレン相当でそれぞれ平均 1.42 および 2.42  $\mu\text{g}$  であった。放射能の尿中への平均排泄速度は、10 回目と 14 回目の投与 24 時間後が最高（約 2.65  $\mu\text{g}/\text{日}$ ）であったが、尿中排泄は初回投与の約 7 日後には定常状態になっていたことがデータからは示唆される。一方、放射能の糞中への排泄速度は次第に増加し、12 回目と 14 回目の投与後の採取では約 11~12  $\mu\text{g}/\text{日}$  であったが、定常状態には達していないと思われた。

安楽死させた際、投与部皮膚の放射能濃度は高かったが、血液その他一部の組織における総放射能は、14 回の総投与量のごく一部に過ぎなかった（脂肪で 0.19~0.44%、肝臓、血液、腎臓、脳および甲状腺ではそれよりさらに少なかった）（Hawkins et al., 1989; Hawkins and Ford, 1999）。

胆管カニューレ装着ラット 1 匹の背部皮膚を剃毛し、環標識  $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレン（溶媒：フェニルエチルアルコールおよびエタノール）を 5.87 mg/kg の用量で単回投与した。胆汁を採取し、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理を行なった後、酢酸エチルで抽出した。その結果、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理したラット胆汁には 1 種類の主要代謝物が認められ、ヒドロキシメチルムスクキシレンと同定された（Hawkins et al., 1989）。

## 吸入

入手データなし。

## 静脈内

雄の Sprague-Dawley CD ラット 4 匹に、環標識  $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレン（0.5 mg/kg、溶媒：ポリエチレングリコール、塩化ナトリウム水溶液およびエタノール）を単回静脈内投与し、投与 5、30、90 分後および 3、6、24、48、72、96、120、168、240 時間後に血液サンプルを採取した。その結果、投与 5 分後の平均血漿中放射能濃度は、ムスクキシレン相当で 0.398  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。各ラットの平均血漿中放射能濃度はその後減少した後、再び増加し、投与 6 時間後に 2 回目のピーク（0.101  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が認められた。その後、放射能濃度は一見して多指数関数的に減少し、160~240 時間後には検出限界以下になった。平均半減期は 42.6 時間、平均曲線下面積は 3.22  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  であった（Hawkins et al., 1989）。

## 特殊な試験

妊娠した Charles River CD ラット（各群 15 匹）に、ムスクキシレンをコーン油溶液として 2.5 および 25 mg/kg の用量で妊娠 14 日から分娩後 21 日まで毎日強制経口投与した。分娩後 7 日と 14 日の投与 1、2、4、8、24 時間後に、各時点各用量につき母動物 3 匹から（オキシトシン投与後）用手法で乳汁試料約 0.5 mL を採取した。その結果、ムスクキシレンの平均濃度は 8 時間後の試料が最高で、投与 24 時間後には 1/7 以下に低下した。ただし、ムスクキシレンは投与 24 時間後の時点でも全動物で定量可能であった（Table 4.8 参照）。したがって、F1 仔動物は検査した授乳期間を通じて乳汁中のムスクキシレンに持続的に曝露されることが示唆される。また、7 日と 14 日における全身曝露の速度および程度は、ほぼ用量に比例して増加した（Brooker et al., 1998）。

**Table 4.8** Mean (n=3) concentrations in milk (in µg/ml).

Sample time (h)	Day 7 – Dose level (mg/kg bw)		Day 14 – Dose level (mg/kg bw)	
	2.5	25	2.5	25
1	0.80	26.12	0.89	34.15
2	1.46	22.40	2.17	47.47
4	2.32	42.87	2.10	77.87
8	8.12	84.94	6.44	80.93
24	0.67	2.48	0.96	1.60
<b>AUC24 (µg.h/ml)</b>	<b>97</b>	<b>1,059</b>	<b>83</b>	<b>1,162</b>

### *In vitro*

雄の F344 ラットから採取した新鮮な円形（径 1.7 cm）の背部全層皮膚を、*in vitro* 皮膚吸収モデルのフロースルー型拡散セルに入れ、水循環装置で皮膚表面温度を 32°C に保ちながら、皮膚下面に 50% (v/v) エタノール溶液からなるレセプター液を 1.5 mL/h の速度で流した。この皮膚表面に、エタノール：ジエチルフタレート（75：25）を溶媒とする <sup>14</sup>C-ムスクキシレン（標識部位不明）の 0.1 および 0.5% 投与液（それぞれ 15 および 78 µg/cm<sup>2</sup>）を適用し、テフロンキャップで閉塞するか、開放のまま（非閉塞）とした。レセプター液は 2 時間間隔で 72 時間後まで採取した。実験終了時に皮膚表面を洗浄し、拭き取った後、水酸化ナトリウムのメタノール溶液で皮膚を溶解した。こうして得られたレセプター液、皮膚洗浄液および皮膚試料の放射能を、液体シンチレーションスペクトロメトリーを用いて測定した。

試験の結果、放射能の総回収率は80%よりは高かったものの、低値を示した。24時間後の非閉塞皮膚からのムスクキシレンの吸収はわずかで、レセプター液中の値は平均  $0.61 \pm 0.16\%$  であった。皮膚を閉塞しても、24時間後におけるこの吸収率にあまり影響はみられなかった（平均  $1.84 \pm 1.15\%$ ）。一方、皮膚内からはかなりの量の放射能が回収された（24時間後に非閉塞皮膚で43%、閉塞皮膚で30%）。ムスクキシレンは48時間にわたってレセプター液中に吸収され続け、48時間後の総吸収量は閉塞によって増加した（Ashcroft and Hotchkiss, 1996）。

注：いずれの用量の投与液の結果かは不明。また、48～72時間のデータは記載なし。

経皮吸収を調べた別の *in vitro* 試験では、 $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレン（約  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）を薄膜としてヘアレスモルモットまたはヒトの皮膚に閉塞適用した。溶媒としては、メタノール溶媒と、水中油型乳剤の溶媒の2種類を同時に評価した。その結果、ヘアレスモルモット皮膚における24時間後のムスクキシレンの総吸収率（皮膚およびレセプター液）は、乳剤溶媒で55%、メタノール溶媒で45%であった。ヒト皮膚におけるムスクキシレンの透過率は、両溶媒とも適用量の22%であった。皮膚表面洗浄後さらに6日間ヒトの試験を続けたところ、皮膚への残留は適用量の6%に過ぎなかった。また、ヘアレスモルモット皮膚におけるミリスチン酸イソプロピルの透過率から求めたムスクキシレンの透過定数は、定常状態で  $6.86 \times 10^{-5} \text{ cm/h}$  であった（Hood et al., 1996）。

皮膚への浸透率と透過率を調べるため、エタノール：アセトン（1：1）を溶媒とする  $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレンの3および10%溶液（180および600  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  投与に相当）ならびに安息香酸ベンジルエステルを溶媒とする同10%溶液（600  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  投与に相当）を、組織片培養したミニブタの無処置皮膚および角質層を除去した皮膚（面積  $5 \text{ cm}^2$ ）に適用した。適用時間は、無処置皮膚では最長16時間、角質層を除去した皮膚では最長6時間とした。その結果、角質層の総吸収量と生きている皮膚層（表皮、真皮、皮下組織）の総吸収量を分けて算出した、無処置皮膚における曝露後の総吸収率は、いずれの試験溶液でも非常に低かった。このうち、生きている皮膚層への浸透は、接触時間や溶媒の種類よりも、用量に依存しているようであった（Table 4.9 参照）。角質層は透過制限膜として非常に有効で、曝露前にこれを除去すると、曝露中に角質層が存在していた皮膚の約5倍ものムスクキシレンが、生きている皮膚層に認められた（Table 4.10 参照）（Klecak, 1982）。



**Table 4.9** Penetration rate into layers of intact explanted mini pig skin.

Contact time	30 mg/ml in ethanol / acetone (1/1, v/v)		100 mg/ml in ethanol / acetone (1/1, v/v)		100 mg/ml in benzoic acid benzyl ester	
	Stratum corneum	Living skin layers	Stratum corneum	Living skin layers	Stratum corneum	Living skin layers
1 hour	5.4%	1.3%	2.6%	1.0%	1.9%	0.3%
6 hours	7.2%	1.9%	2.9%	1.1%	3.4%	0.4%
16 hours	8.7%	2.8%	3.1%	1.3%	4.1%	0.5%

Percentages in this table refer to the applied dose.

**Table 4.10** Penetration rate into explanted mini pig skin layers with or without stratum corneum.

	30 mg/ml in ethanol / acetone (1/1, v/v)		100 mg/ml in ethanol / acetone (1/1, v/v)	
	Intact skin exposed *	Living skin layers exposed	Intact skin exposed*	Living skin layers exposed
stratum corneum (6 h)	7.2%	-	2.9%	-
living skin layers (6 h)	1.9%	9.0%	1.1%	5.1%

\* Values taken from Table 4.9; percentages in this table refer to the applied dose.

#### 4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

##### 経口

男性志願者 3 人に  $^{15}\text{N}$  標識ムスクキシレン (0.05~0.14 mg/kg、30%エタノールに溶解) を単回経口投与し、その動態を調べたところ、血漿中消失半減期はそれぞれ 60、67 および 94 日間であった。この値は被験者の体脂肪率に比例しており、生物学的半減期が 60 日の場合の体脂肪率は 15%、67 日で 21%、94 日 (107 日とも報告されている) で 25%であった。また、ヒトの血中における分布パターンは、細胞 10%、VLDL およびカイロミクロン 8%、LDL 13%、HDL 10%、および残りの血漿成分 (蛋白と結合している可能性大) が 59%であった (Kokot-Helbling et al., 1995a/b)。

志願者 6 人 (男性 3 人、女性 3 人) に、 $^{15}\text{N}$ -標識ムスクキシレン ( $^{15}\text{N}$ : > 99%) を 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与した。曝露後 96 時間にわたって尿を採取し、また投与 140 日後までの各時点で血液サンプルを採取した。これらについて、尿中代謝物 1-tert-ブチル-3,5-ジメチル- $^{15}\text{N}$ -4-アミノ-2,6-ジニトロベンゼン (「 $^{15}\text{N}$ -p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレン」) および血漿中の  $^{15}\text{N}$ -ムスクキシレンをガスクロマトグラフィー/電子捕獲質量分析法を用いて定量した。

その結果、 $^{15}\text{N}$ -ムスクキシレンの血漿中濃度は、投与 6 時間後に最高に達し、その値は 36 ~ 262 ng/mL であった。これらの最高血漿中濃度および体重の約 5%とされる推定総血漿量

から、経口投与後の吸収率は投与量の 0.6～3.8%と推定された。

血漿中からの  $^{15}\text{N}$ -ムスクキシレンの排出は 2-コンパートメントモデルで表わすことができ、初期（最初の 30 時間）には血漿中半減期約 11 時間で急速に減少したが、終末相の血漿中半減期は 70 日間に延長した。回収された尿中の  $^{15}\text{N}$ - $p$ - $\text{NH}_2$ -ムスクキシレン量は、経口投与した  $^{15}\text{N}$ -ムスクキシレン量の 0.1～0.5%であった。尿中の  $^{15}\text{N}$ - $p$ - $\text{NH}_2$ -ムスクキシレン濃度は、短時間の漸増期間を経て、投与 18～24 時間後に最高に達した。代謝物の排出は、平均消失半減期 11.8 時間の一次反応速度式に従っていた。

報告された尿中代謝物は  $p$ - $\text{NH}_2$ -ムスクキシレンのみであり、ラットでの代謝物  $N$ -アセチルムスクキシレンは観察されなかった。その他のラットでの代謝物（水酸化物）については調べなかった。

$^{15}\text{N}$ -ムスクキシレンの単回経口投与後、ヘモグロビン中に  $^{15}\text{N}$ - $p$ - $\text{NH}_2$ -ムスクキシレンは検出されなかった。しかし、ヘモグロビン試料には非標識の  $p$ - $\text{NH}_2$ -ムスクキシレン（11.4～18.9 fmol/mg Hb）が含まれており、長期の環境曝露によるものと考えられた（Riedel and Dekant, 1999）。

注：経口による推定取り込み率は、最高血漿中濃度と体内の推定総血漿量に基づいているが、ムスクキシレンのような脂溶性物質の場合、分布容積は血漿画分の容積より大きい可能性が高いため、これでは小さすぎるかもしれない。

## 経皮

健康な成人男性被験者 2 人の上胸部皮膚（面積 100  $\text{cm}^2$ ）を剃毛せずに、環標識  $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレン（ $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレンを 1 mg/mL の濃度でエタノールとフェニルエチルアルコールの混合液に溶解したもの）1 mg を 6 時間適用した。適用後、試験区画から包帯をはずして投与部皮膚を拭った。尿および便を投与 120 時間後まで採取し、血液試料を投与前と、投与後の 120 時間に 16 回採取した。120 時間後に投与区画の皮膚を粘着テープで剥離し、皮膚片を分析した。

その結果、 $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレンの皮膚からの吸収は非常にわずかで、6 時間後には適用量の 90%が適用部位から回収された。120 時間後までの尿および便中への排泄量は、平均して投与量のそれぞれ 0.26%および 0.1%未満に過ぎなかった。血漿試料、全血試料または皮膚片のいずれにも放射能は検出されなかった（Hawkins et al., 1984; Hawkins et al., 2002）。

上記試験の志願者の 1 人について尿試料を酢酸エチルで抽出したところ、放射能の回収率は低かった（約 15%）。これに対し、尿試料を $\beta$ -グルクロニダーゼで処理後、酢酸エチルで抽出したところ、回収率は 88%であり、ヒト尿中のムスクキシレン代謝物は大部分がグルクロン酸抱合体として存在していることが明らかになった。 $\beta$ -グルクロニダーゼで処理したヒト尿の抽出物には単一の主要代謝物（未同定）が含まれていたが、これはラットの胆汁抽出物には存在していないものであった（Hawkins et al., 1989; Hawkins et al., 2002）。

Riedel および Dekant (1999) は、ヒトの志願者に  $^{15}\text{N}$  標識ムスクキシレン ( $^{15}\text{N} : > 99\%$ ) を 0.3 mg/kg の用量で単回経皮投与したときの動態試験結果も報告している。試験は、対応する経口試験で用いたものと同じプロトコールに従って行なわれた（「経口」の項参照）。

試験の結果、 $^{15}\text{N}$ -ムスクキシレンの血漿中濃度は投与 6 時間後に最高に達し、その値は 1.6 ~ 5.5 ng/mL であった。これらの最高血漿中濃度および体重の約 5%とされる推定総血漿量から、経皮投与後の吸収率は投与量の 0.03~0.06%と推定された。

血漿中からの  $^{15}\text{N}$ -ムスクキシレンの排出は 2 コンパートメントモデルで表わすことができ、初期（最初の 30 時間）には血漿中半減期約 11 時間で急速に減少したが、終末相の血漿中半減期は 70 日間に延長した。回収された尿中の  $^{15}\text{N}$ -p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレン量は、経皮投与量の 0.02~0.16%であった。尿中の  $^{15}\text{N}$ -p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレン濃度は、短時間の漸増期間を経て、投与 18~24 時間後に最高に達した。代謝物の排出は、平均消失半減期 11.8 時間の一次反応速度式に従っていた。

報告された尿中代謝物は p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンのみであり、ラットでの代謝物 N-アセチルムスクキシレンは観察されなかった。その他のラットでの代謝物（水酸化物）については調べなかった。なお、経皮および経口投与後ともに p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンが認められた（「経口」の項に記載）ことから、著者らは、ヒトにおいてこれらの代謝物の産生に関与したのは腸内細菌叢より肝臓のニトロ還元酵素であるかもしれないという仮説を立てた（げっ歯類での状況参照）。ただし、腸内細菌叢によるニトロ還元がいくらか寄与している可能性も完全には否定しなかった。

$^{15}\text{N}$ -ムスクキシレンの単回経皮投与後、ヘモグロビン中に  $^{15}\text{N}$ -p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンは検出されなかった。しかし、ヘモグロビン試料には非標識の p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレン (11.4~18.9 fmol/mg Hb) が含まれており、長期の環境曝露によるものと考えられた（Riedel and Dekant, 1999）。

注：経皮による推定取り込み率は、最高血漿中濃度と体内の推定総血漿量に基づいている

が、ムスクキシレンのような脂溶性物質の場合、分布容積は血漿画分の容積より大きい可能性が高いため、これでは小さすぎるかもしれない。

## 吸入

入手データなし。

## 特殊な試験

いくつかの試験において、ヒトの乳汁および脂肪組織中におけるムスクキシレンの存在が確認されている（詳細は 4.1.1.4 項参照）。ヒト乳汁中の合成ムスク香料に関しては、最近 Sönnichsen ら（1999）の試験結果が得られており、その試験では 108 人の女性から乳汁試料を採取し、複数の多環ムスクとニトロムスクについて分析を行なったところ、乳汁中のムスクキシレン濃度は、乳脂肪 1 kg 当たり平均 7.43 µg、最高 68.3 µg であった。それ以前（90 年代初期～中期）の試験では値はやや高く、平均および最高濃度は、最も高い例でそれぞれ乳脂肪 1 kg 当たりムスクキシレン 100 µg および 1,220 µg であった。

ヒトの脂肪組織では、Rimkus ら（1994）が脂肪 1 kg 当たり 0.02 mg から 0.22 mg まで様々な濃度のムスクキシレン検出結果を示した。また、Müller ら（1996）によれば、ヒト脂肪 1 kg 中のムスクキシレン濃度は 6.7～69 µg であった（ただし、106 および 288 µg の外れ値が 2 例あり）。

Riedel ら（1999）は、ムスクキシレンに「故意に」（おそらく「職業的に」の意）曝露されていないヒト志願者 10 人から採取したヘモグロビン試料について、ムスクキシレン由来の物質を検査した。その結果、代謝物 p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンがヘモグロビンに共有結合しているようであり、その濃度は 13.3～45.9 fmol/mg Hb であった。

### **4.1.2.1.3 トキシコキネティクス、代謝、分布の要約**

吸入曝露後のムスクキシレンのトキシコキネティクスについては、入手データがない。

ラットに <sup>3</sup>H-ムスクキシレンを経口投与すると、主に胆汁を介して糞中に排泄された。7 日目までの尿および糞中への排泄量は、それぞれ約 10.3% および約 75.5% であり、屠体における残留は約 2% であった。ヒトに単回経口投与したときの生物学的利用率は、最高血漿中濃度から、0.6～3.8% と推定された。

現在あるデータからラットおよびヒトでの経口による取り込み率を正確に推定することは困難である。ヒトについて言えば、算出された値は、血漿中濃度と、血漿容積に等しいと仮定した分布容積とに基づいているため、おそらく総吸収量よりも低く推定されている。ムスクキシレンは脂肪画分に分布しやすいため、この分布容積は小さすぎる。一方、ラットについて言えば、尿中の排泄量および屠体中の量から、経口による生物学的利用率は最低でも 12% であると算出されるが、胆汁排泄が考慮されていないため、この割合も実際の腸管からの取り込み量より低く推定されている。しかし、胆汁排泄の関与が経口曝露後と経皮曝露後で等しいと仮定するならば（実際、ムスクキシレンの血漿中半減期はラットで 40 時間、ヒトで 60～94 日間と長いことを考慮すれば、この仮定は妥当と考えられるのであるが）、2 試験（Minegishi et al., 1991, Hawkins et al., 1984）の実験データを併せることで、経皮曝露後の尿中／糞中排泄量の比（4%/15%）を用いて経口曝露後の総取り込み率を推定することができる。その結果、経口投与後の推定総取り込み率は、 $10\% + (15/4) \times 10\% =$  約 50% となる。したがって、ラットおよびヒトともに、経口曝露後の取り込み率を 50% としてリスク判定を行なうこととする。

$^{14}\text{C}$  標識ムスクキシレンをラットに 6 時間経皮適用（閉塞適用）すると、48 時間で適用量の約 20% が吸収され、2% が皮膚に残留した。6～48 時間の間は皮膚が貯蔵庫として働き、ムスクキシレンはそこから吸収され続けた。尿および（主に胆汁を介した）糞中への排泄は事実上 48 時間以内に完了し、48～120 時間にさらに排泄されたのは非常に少量であった。120 時間後までの尿中への排泄量は適用量の約 4%、糞中への排泄量は 14～15.2% であり、屠体には 0.2% が残留しているのみであった。放射能はほぼ全組織で検出され、最高濃度は 8 時間後の消化管で、次いで脂肪組織、肝臓、副腎、甲状腺、膵臓および腎臓で認められた。

ヒトでは経皮適用後の皮膚からの  $^{14}\text{C}$ -ムスクキシレンの吸収は非常にわずかであり、120 時間以内における尿および便中への排泄量はそれぞれ適用量の 0.26% および 0.1% 未満に過ぎず、約 90% が適用部位から回収された。ヒトに単回経皮投与したときの生物学的利用率は、最高血漿中濃度から、0.03～0.06% と推定された。ただし、これらの値は、血漿中濃度と、血漿容積に等しいと仮定した分布容積とに基づいているため、おそらく総吸収量よりも低く推定されている。ムスクキシレンは脂肪画分に分布しやすいため、この分布容積は低すぎる。

ムスクキシレンは閉塞皮膚からも非閉塞皮膚からも経皮吸収されにくいこと、また被験物質除去後も皮膚は貯蔵庫として働き、ムスクキシレンはそこから全身へと放出され続けることは、ラットやヒトの皮膚を用いた *in vitro* 試験でも示されている。ラットおよびヒトにおけるムスクキシレンの経皮吸収率については、それぞれ 20% および 10% としてリスク判定を行なうこととする。

ラットにおけるムスクキシレンの代謝は、ニトロ基のアミンへの還元と、メチル基の水酸化の両方を含み、胆汁中の主要代謝物はヒドロキシメチルムスクキシレンである。一方、ヒトの尿には、クロマトグラフ上でムスクキシレンともヒドロキシメチルムスクキシレンとも異なる単一の代謝物が含まれていた。別の試験では、ヒトの尿中に p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンが認められたが、N-アセチルムスクキシレンは認められなかった。

ラットおよびヒトにムスクキシレンをそれぞれ静脈内または経口投与した試験から、ラットにおけるムスクキシレンの血漿中半減期は約 40 時間であるのに対し、ヒトにおける血漿中半減期は 60～94 日間であると結論される。

ラットにムスクキシレンを交配 10 週間前から授乳期間を通じて経口投与すると、成獣におけるムスクキシレン濃度は、脂肪組織（雌では雄の 3.7～6.8 倍）および乳汁中が最も高かった。また、出生仔の体脂肪中にはムスクキシレンの蓄積が認められ、ムスクキシレンは胎盤を通過することが確認された。ムスクキシレンはヒトの乳脂肪および脂肪組織中にも認められている。

#### 4.1.2.2 急性毒性

##### 4.1.2.2.1 動物における試験

###### 経口

ある急性毒性試験では、1 群雌雄各 5 匹のマウスに、0.25%アラビアゴム溶液に懸濁したムスクキシレンを、125、250、500、1,000、2,000 または 4,000 mg/kg の用量で単回強制経口投与した。動物は 14 日間観察した。その結果、4,000 mg/kg 群の雌雄で投与 3～18 時間後に振戦が認められたが、他の群ではいずれも異常な症状はみられなかった。4,000 mg/kg 群では雌 1 匹が死亡した。試験終了時の肉眼的検査では、いずれのマウスにも明らかな毒性病変はみられなかった。以上より、ムスクキシレンのマウスにおける急性経口 LD<sub>50</sub> は、4,000 mg/kg 超であった (Maekawa et al., 1990)。

1 群 6 匹の雄ラット（系統の記載なし）よりなる 3 群に、ムスクキシレンをコーン油を溶媒として 2,500、5,000 または 10,000 mg/kg の用量で経口投与した。その結果、10,000 mg/kg 群では 3 匹が、5,000 mg/kg 群では 1 匹が死亡したが、2,500 mg/kg 群では投与 7 日後まで死亡はみられなかった。抑うつ（詳細なし）が認められたが、いずれの用量かも特定されていなかった (Bukva et al., 1970)。

## 経皮

限定的な報告しかないある試験では、1群3匹のアルビノウサギの無処置皮膚に、マゾラ油に懸濁したムスクキシレンを、10,000または15,000 mg/kgの用量で24時間閉塞適用した。その結果、動物の死亡はなく、刺激性の徴候もみられなかった。また、投与5日後の血液学および臨床生化学的検査項目にも異常はなかった (Fogleman and Margolin, 1970)。

## 吸入

入手データなし。

### **4.1.2.2 ヒトにおける試験**

入手データなし。

### **4.1.2.3 急性毒性の要約**

マウスおよびラットにおける急性経口LD<sub>50</sub>は、2,000 mg/kg超であることが示された。また、限定的な経皮投与試験で、1群3匹のウサギに10,000または15,000 mg/kgの用量で適用しても、死亡はみられなかった。この経皮試験は現在の基準に従って行なわれたものではないが、急性経皮毒性は2,000 mg/kg超と推定される。したがって、ECの基準によれば、急性経口毒性および急性経皮毒性に関してムスクキシレンを分類する必要はない。

急性吸入毒性のデータは入手できなかった。

### **4.1.2.3 刺激性／腐食性**

#### **4.1.2.3.1 動物における試験**

## 皮膚

ある経皮LD<sub>50</sub>試験では、ムスクキシレンをマゾラ油に懸濁してウサギの皮膚に10,000または15,000 mg/kgの用量で24時間閉塞適用したが、刺激性はみられなかった (Fogleman and Margolin, 1970)。

## 眼

OECD ガイドライン 405 に従って行なわれた試験において、NZW ウサギ 6 羽の右眼の結膜嚢にムスクキシレン 0.075 g (0.1 mL 相当) を投与した。滴下 30 秒後に 3 羽のウサギの両眼を生理食塩水で洗眼した。残りの 3 羽の眼は洗眼しなかった。各動物の対側の眼を対照とし、投与側および対照側の眼について、刺激性の徴候の有無を投与後 14 日間観察した。

その結果、非洗眼群では、ムスクキシレンによる虹彩炎 (スコア 1) が 3 匹すべてで 1 および 24 時間後に認められた。この虹彩の刺激は 48 時間後の評価時まで完全に消失した。スコア 1 の結膜炎 (発赤、腫脹および分泌物) も 3 匹すべてで認められたが、この刺激はいずれの個体でも試験 10 日までに完全に消失した。洗眼群では、虹彩炎 (スコア 1) が 3 匹中 1 匹の投与側の眼で 1、24 および 48 時間後の評価時に認められた。また、結膜炎 (発赤、腫脹または分泌物) が 3 匹すべての投与側の眼で 1 時間後の評価時のみ認められた。この結膜刺激はいずれの個体でも試験 14 日までに完全に消失した。以上より、軽度な刺激がいくらか認められるものの、ムスクキシレンは眼刺激性物質ではないと考えられる (Merriman, 1997)。

## 気道

入手データなし。

### 4.1.2.3.2 ヒトにおける試験

Kligman (1966) のマキシマイゼーション法 (Maximisation test) による感作性試験の予備試験として、ワセリンを溶媒とする 5%ムスクキシレンについて検討したところ、軽度な刺激性が認められた。この皮膚刺激性試験に関する詳細は入手し得なかった (Kligman, 1970)。

パッチテストでは、0.1 および 1%の濃度により、試験した皮膚科患者のそれぞれ 1 および 1.6%で接触 2 日後に刺激性反応が認められた (Frosch et al., 1995)。本試験の詳細は 4.1.2.4 項に記載されている。

### 4.1.2.3.3 刺激性／腐食性の要約

適切な皮膚刺激性試験が行なわれていないため、皮膚刺激性の検討に必要な基本的要件が満たされていない。しかし、現在ある限定的なデータによれば、ムスクキシレンはウサギ



の無処置皮膚に非常に高い用量で 24 時間閉塞適用しても、刺激性を示さなかった。また、モルモットを用いた 2 件の感作性試験では、10%の濃度まで適用しても皮膚刺激性を示す所見は得られなかった。さらに、90 日間経皮毒性試験においても、ムスクキシレンは 240 mg/kg までの用量で皮膚刺激性を示さないことが明らかになった (4.1.2.5 項参照)。一方、ヒトの志願者では、ワセリンを溶媒とする 5%ムスクキシレンで軽度な刺激性が報告され、パッチテストでは、0.1 および 1%の濃度により、試験した皮膚科患者のそれぞれ 1 および 1.6%で接触 2 日後に刺激性反応が認められた (4.1.2.4 項参照)。したがって、ムスクキシレンはヒトにおいて (非常に) 軽度ながら皮膚刺激性を生じさせるようである。一次刺激性スコアや試験のその他の詳細は得られておらず、刺激性に関してムスクキシレンを分類することはできない。しかし、現在ある動物の情報から、ウサギで非常に高濃度の、またラットで長期の経皮曝露を行なっても顕著な皮膚反応はみられなかったことから、現在のガイドラインに従って追加試験を要求することは適切でないと考えられる。

適切に行なわれた眼刺激性試験から、ムスクキシレンには眼刺激性がないと結論できる。したがって、EC 規制によれば、眼刺激性に関してムスクキシレンを分類する必要はない。

気道刺激性に関してはデータが得られていない。

#### 4.1.2.4 感作性および光アレルギー

##### 4.1.2.4.1 動物における試験

Klecak (1979) は、1 群 6~8 匹のモルモットを用いて行なった、非閉塞皮膚試験 (open epicutaneous test) の結果を報告している。試験では動物を 5% (著者によれば本動物種で刺激性を示さない最高濃度) までのムスクキシレンに曝露したが、感作性の徴候は認められなかった。ただし、この Klecak の試験の記載は不十分で、その結果を厳密に評価することはできない。

ムスクアンブレットが光アレルギー反応を誘発することが知られている濃度 (10% (w/v)、溶媒: アセトン) において、ムスクキシレンが光毒性、光アレルギー、または接触過敏反応を誘発するか否かを調べるため、1 群 10 匹のモルモットに対し、アセトンを溶媒とする 10% (w/v) のムスクキシレンを、閉塞パッチを用いて 1 日 4 時間、週 3 回、3 週間連続投与して感作した。パッチは刈毛・脱毛した背部正中部分 (両肩の間) に貼付した。一部の投与群については、各投与時のパッチ除去後、回転式照明器具を用いて 12 個のブラックライトランプ (UVA、320~400 nm) で投与部位を 2 時間照射した。脱毛、テープ除去および照射の組合せによって生じる皮膚の損傷を防ぐため、パッチは特殊なものを用いた。最

終感作投与の 10~14 日後、アセトンを溶媒とする 10%ムスクキシレンを、あらかじめ脱毛しておいた試験群および無処置対照群の無処置部位に、閉塞パッチを用いて 4 時間単回適用し、惹起を行なった。一部の投与群については、パッチ除去後、回転式照明器具を用いて 12 個のブラックライトランプで投与部位を 2 時間照射した。光曝露の 18~20 時間後に、評価のため再び惹起部位を脱毛した。惹起 24 および 48 時間後に、すべての惹起部位について反応の程度をスコア化した。結果を **Table. 4.11** に示す。試験群 2 および 4 における陽性結果は、ムスクキシレンが遅延型接触過敏性に関して弱いアレルギー作用しか持たないことを示唆しており、その反応は UVA 曝露によって増悪しなかった（試験群 1、3）。したがって、ムスクキシレンは、ムスクアンブレットとは異なり、光アレルギー誘発性を有していない（Parker et al., 1986）。

**Table 4.11** Results of photoallergy testing musk xylene.

Test regimen	Induction conditions	Challenge conditions	Incidence
1	MX+UVA*	MX+UVA	0/10
2	MX+UVA	MX	2/10
3	MX	MX+UVA	0/10
4	MX	MX	1/10
5	Naïve	MX+UVA	0/10
6	Naïve	MX	0/10

\* MX=musk xylene, UVA= 2 h UVA exposure

注：アジュバントを用いない本試験は、被験動物数が少なすぎる（ガイドラインでは最低 20 匹を要求している）。このため、感作および惹起後の 1/10 例の反応の解釈が難しい（ガイドラインによれば、アジュバントを用いない試験では 15%（3/20）に反応があれば陽性と考えべきとしている）。また、感作に用いた濃度では一次刺激性は報告されなかったため、ムスクキシレンは軽度の刺激（10%より高濃度で生じた可能性あり）を生じさせる濃度では試験されなかったとみなす必要がある。アジュバントを用いた試験の方がより適切であったであろう。

1 群 12 匹の雌 Dunkin-Hartley モルモットの肩甲骨間の皮膚を刈毛・剃毛し、光アレルギー試験に用いた。試験では、ジメチルアセトアミド/アセトン/エタノール（4：3：3）を溶媒とする 10%ムスクキシレン 0.1 mL を、4×0.1 mL の FCA 投与で区画された 900 mm<sup>2</sup> の領域に 25 分間適用して感作を行なった。25 分後に過剰な被験物質を除去した後、モルモ

ットに 100 kJ/m<sup>2</sup> の UV を照射した。この手順（アジュバント投与を除く）を 24 時間後に繰り返した。感作の 10～14 日後、刈毛・剃毛した腰部皮膚に 0.1、1 または 10% のムスクキシレンを投与して惹起を行ない、30 分後、動物に 100 kJ/m<sup>2</sup> の UV を照射した。照射後、皮膚の別の部位に被験物質を適用し、接触過敏性を調べた。皮膚反応は 72 時間まで観察した。また、確認のため、1 週間後に 2 回目の惹起を行なった。さらに、3 回目の惹起時に、既知の光アレルゲンであるムスクアンブレットとの光交差反応性を、各物質 1% の濃度で検討した。

その結果、1 回目および 2 回目の惹起後、1% 群の 1 匹および 10% 群の 1 匹で陽性反応が認められた。0.1% 群では反応はみられなかった。接触過敏性は認められず、ムスクキシレンはムスクアンブレットと弱い光交差反応しか示さなかった (Lovell and Sanders, 1988)。

注：予備的な光刺激性試験から、光刺激性が認められない最高濃度が感作濃度および最高惹起濃度として設定された。ムスクキシレンは、試験した（独自裁量で決められた上限である 10% までの）濃度において（光）刺激性を示さなかったため、感作濃度および最高惹起濃度は 10% となった。これは、軽度の刺激（10% より高濃度で生じた可能性あり）を生じさせる濃度では試験が行なわれなかったことを意味している。また、接触過敏性は観察されなかったと述べられているが、感作時には、ムスクキシレンの曝露後、常に UV 照射が行なわれていたことに留意する必要がある。

#### 4.1.2.4.2 ヒトにおける試験

ムスクキシレンの接触感作性を調べるため、健康な成人男性 25 人に対し、ワセリンを溶媒とする 5% ムスクキシレンを 1 日おきに 5 回、48 時間ずつ、皮膚に閉塞適用した。試験溶液は軽度な刺激性を呈したため、ラウリル硫酸ナトリウムによる前処置は行なわなかった。10 日間の休薬期間後、皮膚の別の部位に惹起用のパッチを 48 時間閉塞適用し、48 および 72 時間後に評価した。その結果、反応は認められなかった (Kligman, 1970)。

Cronin (1984) は、ムスクアンブレットに対する光アレルギーの患者において、ムスクキシレンとの交差反応を示す若干の証拠を認めた。すなわち、患者 19 例中 3 例で交差反応の所見がみられ、この 3 例のうち 1 例では弱い反応が観察された。

一般に用いられている一連の香料（特にムスクキシレン）に対する反応性の頻度を調べる試験が、皮膚科患者において行なわれた。11 医療機関の患者合計 1,069 例における予備試験では、各香料について適切な試験濃度と溶媒が調べられた。本試験では、各医療機関において、パッチテスト外来を訪れた患者、最低連続 100 例について、5～10 種類の香料の

各 2 濃度を 1 セットとしてパッチテストを行なった。ムスクキシレンに関しては、試験医療機関 Menné (Copenhagen) において、ワセリン中 0.1 および 1% の濃度について、192 例 (女性 116 例、男性 76 例) の患者でパッチテストを行なった。パッチは背部に適用し、2 日間そのままにした。その結果、ムスクキシレン濃度 0.1 および 1% でそれぞれ 2 および 3 例の反応 (「刺激性」または「擬陽性」) が認められたが、アレルギー反応はみられなかった (Frosch et al., 1995)。

Bruze ら (1985) は、スカンジナビア光線皮膚炎研究班 (Scandinavian Photodermatitis Research Group; Jansén et al., 1982) が作成したプロトコールに従い、ムスクキシレンの感作性を、光パッチテストを用いて検討した。試験では、光アレルギー性接触皮膚炎が疑われる患者 13 例を問診票と臨床検査で選び出し、UV 光に対する皮膚過敏性を調べた後、閉塞パッチを用いてニトロムスク類 (量および溶媒の記載なし) を皮膚に適用した (1 物質当たり 2 か所)。接触 24 時間後に薄暗い場所でパッチを除去し、接触皮膚炎の徴候について皮膚を観察した。その後、接触部位の半分を再び覆い、残りの半分には UV 光を照射した。その結果、試験を行なった患者はすべてムスクアンブレットに対して光アレルギー反応を示した。1 例ではムスクキシレンに対する光アレルギー反応も観察された。非照射部位では反応はみられなかった。この患者がムスクアンブレットとムスクキシレンの交差光アレルギーを示しているのか、2 種類のニトロムスク類に対する別々の光アレルギーを同時に示しているのかについては、この試験では明らかにされていない。また、試験時の状況での有病率も、この試験では不明である。

#### 4.1.2.4.3 感作性および光アレルギーの要約

上記のモルモットを用いた試験にはいくつかの不備な点があるため、動物におけるムスクキシレンの皮膚感作性に関しては結論が得られない。しかし、ヒトの志願者の試験から、ムスクキシレンについては、刺激性を示す濃度で試験を行なっても皮膚感作性はないと結論できる。また、皮膚科患者にムスクキシレンのパッチテストを行なった場合でも、アレルギー反応はみられなかった。したがって、ムスクキシレンはヒトにおける皮膚感作性物質ではなく、この項目に関して分類する必要はないと結論される。

気道感作性や職業的な喘息に関しては、データが得られていない。

#### 4.1.2.5 反復投与毒性

##### 4.1.2.5.1 動物における試験

## 経口

17 週間試験の予備試験において、1 群雌雄各 8 匹の B6C3F1 マウスに、ムスクキシレンを 0、0.3、0.6、1.25、2.5 または 5% の濃度（0、429、857、1,786、3,571 または 7,143 mg/kg/日に相当）で 14 日間混餌投与した。試験では、一般状態および生死を毎日記録し、試験終了時に全生存動物を安楽死させて肉眼的に検査した。その結果、0.6% 以上の群では、0.6% 群の雌 1 匹を除くすべてのマウスが投与 2~4 日後に死亡した。0.3% 群ではすべてのマウスが試験終了時まで生存した。高用量群のマウスでは振戦が顕著であった。試験中に死亡したマウスでは、肉眼的検査において、胃および小腸の出血が認められた。試験中に死亡したマウスの一部について組織学的検査を行なったところ、腺胃に出血性びらんが認められたが、脳、脊髄その他の器官には、ムスクキシレンに関連する可能性のある毒性病変は観察されなかった（Maekawa et al., 1990）。

注：より詳細なデータは得られていない。

発がん性試験の予備試験において、1 群雌雄各 10 匹のマウス（B6C3F1）に、ムスクキシレンを 0、0.0375、0.075、0.15、0.3 または 0.6% の濃度（0、54、107、214、429 または 857 mg/kg/日に相当）で 17 週間混餌投与した。試験では動物を毎日観察し、試験終了時に全生存動物を安楽死させて、主要器官・組織を肉眼的および組織学的検査に供した。その結果、ムスクキシレン 0.6% 群のすべてのマウスおよび 0.3% 群の雄 8 匹、雌すべてが試験中に死亡した。その他の群ではいずれも死亡はなかった。体重および摂餌量には、試験期間を通じて、ムスクキシレン 0.15% 以下の投与群では雌雄とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、器官重量に関しても、投与群（ムスクキシレン 0.15% 以下）と対照群との間に有意差はなかった。なお、肝臓の絶対および相対重量が 0.075% 群の雄を除く全投与群で軽度が増加したが、この増加には用量との関連性がなかった。組織学的には、0.15% 群の雌雄で肝細胞の腫大および配列不整が認められたが、投与群のその他の器官には、いずれも明らかな、または用量に関連した毒性病変はみられなかった。これらの結果から、ムスクキシレンを長期間混餌投与したときの最大耐量は、雌雄とも 0.15% と結論された。また、これより、発がん性試験における適切な用量として、0.15 および 0.075% が設定された（Maekawa et al., 1990）。

注：この試験は予備試験であるため、簡単な記載しかなく、試験デザインも限定的である（生化学的および血液学的検査項目が調べられていないなど）。詳細が不明であるため、NOAEL は得られなかった。

Maekawa ら（1990）の発がん性試験では、B6C3F1 マウスに、ムスクキシレンを 0、0.075

または0.15%の濃度で80週間混餌投与し、全組織／器官の組織学的検査を行なったところ、曝露に関連した非腫瘍性病変（肝臓に対する影響を含む）は認められなかった。0.15%群の雄では、4～80週に体重減少が認められた。しかし、10週間の回復期間後の試験終了時点では、群間に体重の差はみられなかった。この試験の詳細については、4.1.2.7項を参照のこと。

## 経皮

1群雌雄各15匹のSprague-Dawleyラットに、ムスクキシレン（溶媒：フェニルエチルアルコール）を7.5、24、75または240 mg/kg/日の用量で90日間経皮投与した。試験では、連続注射器を用いて体表面積の約25%にわたり、被験物質を適用した。適用はラット背部の刈毛した表面に非閉塞条件下で行ない、経口摂取を避けるため、ラットの首にカラーを装着した。体表面積の10%ではなく約25%を用いた点、および閉塞貼付としなかった点で、試験デザインはOECDガイドライン411とやや異なっていた。また、この試験では、比較のため（注参照）、陽性対照群2群を設け、ムスクアンブレット（溶媒：フェニルエチルアルコール）を240 mg/kg/日の用量で投与した。このうち、1群にはカラーを装着し、1群には装着しなかった。溶媒対照群（雌雄各30匹）には、フェニルエチルアルコールのみを投与した。OECDガイドライン411に従って観察を行ない、さらに皮膚刺激性および生殖器官の観察も実施した。また、投与期間終了時に神経病理学的評価を行なった。神経病理学的評価では、各用量群雌雄それぞれ3匹以上から、神経系の以下の部分を選び、標本作製して組織学的検査を行なった。中枢神経系：腰部脊髓、中位胸髄、頸部脊髓、延髄、小脳虫部、外側膝状体、大脳皮質、視神経。末梢神経系：坐骨神経（大腿中央部および坐骨切痕部）、腰部後根および後根神経節、腰部前根、頸部神経根、ふくらはぎおよび腓腹筋を支配する脛骨神経枝。

試験の結果、240 mg/kg/日群の雄1匹が死亡した。剖検所見では腎疾患（おそらく尿毒症）が認められたが、尿結石の転帰と判断され、したがって投与とは無関係の可能性が高かった。一般状態、体重、ならびに血液学的および臨床化学的検査項目には、投与に関連した影響はみられなかった。また、種々の程度の落屑および散発的な皮膚の弛緩<sup>12</sup>を除いては、投与に関連した明らかな皮膚の変化も認められなかったと述べられている。一方、肝臓の絶対重量は240 mg/kg/日群の雌雄ともに16%、75 mg/kg/日群の雌で15%増加した。また、肝臓の相対重量が240 mg/kg/日群の雄および雌でそれぞれ13および18%、75 mg/kg/日群の雌で12%増加した。肉眼的または組織学的変化は、生殖器官、肝臓および皮膚を含め、検査したいずれの器官・組織にも認められなかった。また、神経病理学的検査項目にも影

---

<sup>12</sup> 報告書からは、どの物質（ムスクキシレン、ムスクアンブレット、もしくはそれらの両方）でこれらの影響が認められたかは不明である。

響はなかった (Ford et al., 1990)。以上より、本試験のNOELは 24 mg/kg/日と判定された。

注：この試験では、構造的な関連物質であるムスクアンブレットを陽性対照として選択した。これは、高用量のムスクアンブレットの混餌または経皮投与によって、ラットにおいて神経毒性と精巣萎縮が生じることが知られているためである。実際、今回の試験においてムスクアンブレットは、ラットにおいてカラー装着の有無に関わらず、明らかな神経毒性を示し、精巣萎縮を引き起こした。

## 吸入

入手データなし。

### **4.1.2.5.2 ヒトにおける試験**

入手データなし。

### **4.1.2.5.3 反復投与毒性の要約**

マウスを用いた発がん性試験の予備試験では、429 および 857 mg/kg/日相当の用量の 17 週間経口投与で死亡が認められ、214 mg/kg/日相当以上の用量では体重（増加量）および摂餌量が有意に減少した。これらの用量では、肝臓の絶対および相対重量の増加ならびに肝細胞の腫大および配列不整も認められた。この試験は用量設定試験に過ぎず、試験デザインが非常に限定されていたため、いずれの NOAEL も求めることはできなかった。また、80 週間の発がん性試験では、肝臓に対する影響は確認できず、唯一の非腫瘍性の影響（体重減少）についても、試験終了時の回復期間中に可逆性が認められた。

適切に行われたラットにおける 90 日間経皮投与試験では、試験した高用量群 2 群（75 および 240 mg/kg/日群）で肝臓の絶対および相対重量が約 13～18%増加したが、病理学的所見は伴っていなかった。また、この試験では神経病理学的影響や生殖器官に対する影響も認められなかった。24 mg/kg/日群では影響はみられず、この用量が本試験の NOEL と判定された。一つ高い用量群においても肝臓重量の変化は軽微で、生物学的意義は疑問であるものの、この NOEL は NOAEL と考えることができる。したがって、以下のリスク判定には、24 mg/kg/日を用いることとする。

ムスクキシレンの反復吸入毒性試験データは、入手できなかった。

#### 4.1.2.6 遺伝毒性

現段階で入手できた *in vitro* および *in vivo* 試験データを、**Table 4.12** にまとめた。試験はすべて現在のガイドラインに従って、またはそれに非常に近い形で行なわれた。

**Table 4.12** Genotoxicity studies with musk xylene.

Assay	Species	Protocol	Result	Reference
<i>In vitro</i>				
Bacterial gene mutation test	<i>S.typhimurium</i> (TA 98, 100, 1535, 1537, 1538)	Other; Ames et al., 1975	negative (-/+ S9)	Schüpbach, 1981
Bacterial gene mutation test	<i>S.typhimurium</i> (TA 98, 100)	Other; Ames et al., 1975	negative (-/+ S9)	Nair et al., 1986
Bacterial gene mutation test	<i>S.typhimurium</i> (TA 97, 98, 100, 102)	Other; OECD-like	negative (-/+ S9)	Mersch-Sundermann et al., 1996a; Emig et al., 1996
SOS chromotest	<i>E.coli</i> PQ37 <i>sfIA::lacZ</i>	Other	negative (-/+ S9)	Mersch-Sundermann et al., 1996a; Emig et al., 1996
SOS chromotest	<i>E.coli</i> PQ37 <i>sfIA::lacZ</i>	Other	negative (-/+ S9)	Kevekordes et al., 1996
Gene mutation test	mouse lymphoma L5178Y TK+/- cells	OECD 476	negative (-/+ S9)	Bigger and Clarke, 1992; Api et al., 1995
SCE test	human lymphocytes	OECD-like	negative (-/+ S9)	Kevekordes et al., 1996
Chromosome aberration test	CHO-cells	OECD 473	negative (-/+ S9)	Putman and Morris, 1992; Api et al., 1995
Micronucleus test	human lymphocytes; human hepatoma cell line Hep G2	Other	negative; negative	Kevekordes et al., 1997
Unscheduled DNA synthesis test	rat hepatocytes	OECD 482	negative	San and Raabe, 1992; Api et al., 1995
<i>In vivo</i>				
Unscheduled DNA synthesis test	rat liver	OECD 486	negative	San and Raabe, 1994; Api et al., 1995

##### 4.1.2.6.1 *In vitro* 試験

ムスクキシレンの変異原性を、ネズミチフス菌を用いた Ames 試験で検討した。その結果、代謝活性化系の存在下でも非存在下でも、細胞毒性を示さなかった 200 µg/plate までの濃度において、陽性反応はみられなかった (Schüpbach, 1981)。また、別の Ames 試験では、ネズミチフス菌 TA100 および TA98 株を用いて 500 µg/plate (水性培地での溶解性が低いため、同濃度が試験した最高濃度) までムスクキシレンの試験を行なったが、代謝活性化系の存在下および非存在下とも、結果は陰性であった (Nair et al., 1986)。

Mersch-Sundermann ら (1996a) および Emig ら (1996) は、ムスクキシレン (溶媒 :



DMSO) について、ネズミチフス菌 4 株を用いた試験、および大腸菌 PQ37 *sfiA::LacZ* を用いた SOS クロモテストを行なった。その結果、いずれの試験も、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった。このうち、Mersch-Sundermann ら (1996a) の報告では、ネズミチフス菌を用いた試験の用量は最高 5 mg/plate、SOS クロモテストの用量は最高 1.6 mg/assay であった。一方、Emig ら (1996) の報告における用量はやや異なり、ネズミチフス菌を用いた変異原性試験では溶解限界まで、SOS クロモテストでは最高 100 µg/assay であった。

大腸菌 PQ37 株を用いた SOS クロモテストは、Kevekordes ら (1996) によっても行なわれた。試験では、代謝活性化系の存在下および非存在下で、細胞を 0.033% (v/v) の濃度のムスクキシレンに曝露したが、レポーター遺伝子の発現増強はみられなかった (Kevekordes et al., 1996)。

L5178Y TK+/-マウスリンフォーマ試験では、代謝活性化系非存在下で 20~400 µg/mL、代謝活性化系存在下で 10~125 µg/mL の用量を適用したところ、処置した培養細胞のいずれにも陽性結果は認められなかった (Bigger and Clarke, 1992; Api et al., 1995)。また、ムスクキシレンについて、CHO 細胞を用いた染色体異常試験も行なわれた。予備的な細胞毒性試験の結果から、クローニング効率を 50%以上低下させる用量を本試験の高用量として設定した。これに基づいて、代謝活性化系存在下では 2.5~40 µg/mL、代謝活性化系非存在下では 1.9~30 µg/mL の用量で試験を行なった。その結果、有糸分裂阻害で示される毒性が、各最高濃度 2 において 4 および 48 時間後の細胞回収時に観察されたが、染色体異常の増加は認められなかった (Putman and Morris, 1992; Api et al., 1995)。

ラットの初代培養肝細胞を用いた UDS 試験では、ムスクキシレンを 1~150 µg/mL の 8 用量において検討した。その結果、30 µg/mL より高い用量では毒性が強すぎたため、評価できなかった。その他の用量では陰性結果しか得られなかった (San and Raabe, 1992; Api et al., 1995)。

ムスクキシレンの姉妹染色体交換 (SCE) 誘発能も、ヒトリンパ球を用いて代謝活性化系の存在下および非存在下で検討されている。試験は 0.068~135 µM (細胞毒性あり) の用量で行なわれ、陽性および陰性対照群も含まれていた。試験の結果、ムスクキシレンによる SCE の誘発を示す所見は得られなかった (Kevekordes et al., 1996)。

*In vitro* 小核試験では、ムスクキシレン (溶媒 : DMSO) による小核の発現頻度 (2 個の核の大きさがほぼ等しい二核細胞 1,000 個について計数) の増加は、ヒトリンパ球で 135 µM まで、ヒトヘパトーマ細胞株 Hep G2 で 350 µM まで認められなかった。試験は細胞毒性を

生じる用量（それぞれ 270 および 500  $\mu\text{M}$ ）まで行なわれた（Kevekordes et al., 1997）。

#### 4.1.2.6.2 *In vivo* 試験

*In vivo* 不定期 DNA 合成（UDS）試験では、1 群 5 匹の雄ラット（Fischer 344）に、ムスクキシレンをコーン油を溶媒として、500、1,500 または 5,000 mg/kg の 3 用量で強制経口投与した。投与 2~4 および 12~18 時間後に肝細胞を回収し、 $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みにより、DNA の修復を測定した。その結果、分離肝細胞における正味の核内粒子数の平均値には、有意な増加は認められなかった（San and Raabe, 1994; Api et al., 1995）。

#### 4.1.2.6.3 共遺伝毒性活性（cogenotoxic activity）

雄の Wistar ラットにムスクキシレンを 0.1 mmol/kg/日の用量で投与（腹腔内、5 日間）し、その肝ミクロソームを用いて前駆型変異原ベンゾ [a] ピレンおよび Glu-P-1 を活性化後、ネズミチフス菌を用いた *umu* 試験を行なって近接遺伝毒性物質の形成を調べた。その結果、ムスクキシレンの投与により、Glu-P-1 の生体内活性化は増強されたが、ベンゾ [a] ピレンの活性化は増強されなかった。一方、陽性対照物質である 3-メチルコラントレン（0.1 mmol/kg/日、投与方法は同じ）およびイソサフロール（1 mmol/kg/日、投与方法は同じ）を投与した動物の肝ミクロソームでは、双方の前駆型変異原の生体内活性化が刺激された（Iwata et al., 1993b）。

ムスクキシレンの毒性化酵素誘導能を *in vivo/in vitro* 誘導試験で検討した。試験の *in vivo* 部分では、雄の Sprague-Dawley ラットに、ムスクキシレンをコーン油を溶媒として 10、20 または 40 mg/日の用量で 5 日間腹腔内投与した。初回投与の 6 日後に動物を安楽死させて肝臓を摘出し、ホモジナイズおよび遠心後、肝臓の S9 分画を用いて大腸菌 PQ37 *sfhA::lacZ* による *in vitro* SOS クロモテストを行なった。この試験において、ムスクキシレンはラットの肝臓における酵素誘導作用を示し、前駆型遺伝毒性物質 2-アミノアントラセンおよびアフラトキシン B<sub>1</sub> の毒性化を増強させたが、前駆型変異原ベンゾ [a] ピレンの毒性化は増強させなかった（Mersch-Sundermann et al., 1996a/b）。

#### 4.1.2.6.4 遺伝毒性の要約

ムスクキシレンは、いくつかの *in vitro* 試験（細菌を用いた遺伝子突然変異試験、SOS クロモテスト、哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験、哺乳類細胞を用いた染色体異常および SCE 試験、哺乳類細胞を用いた小核試験、ならびに UDS 試験）において陰性であった。ラット肝細胞を用いた *in vivo-in vitro* の UDS 試験においても陰性結果が得られた。

したがって、ムスクキシレンは非遺伝毒性物質と結論できる。ただし、ムスクキシレンは酵素誘導能を有することから、共遺伝毒性活性を示し得る。

#### 4.1.2.7 発がん性

##### 4.1.2.7.1 動物における試験

###### 経口

1 群雌雄各 50 匹のマウス (B6C3F1) からなる 3 群に、ムスクキシレンを 0、0.075 または 0.15% (すなわち 0、750 または 1,500 mg/kg 飼料) の濃度で 80 週間混餌投与した。ムスクキシレンの摂取量は、雄では低および高用量群でそれぞれ 70~125 および 141~228 mg/kg/日、雌ではそれぞれ 80~143 および 166~259 mg/kg/日であった。80 週後にムスクキシレンの投与を中止し、90 週までマウスをムスクキシレンが含まれていない基礎飼料で飼育した後、全生存動物を安楽死させた。組織学的検査は、生殖器官を含む全組織について実施した。試験の結果、0.15%群の雄で 4~80 週に体重減少が認められたが、試験終了時には群間の差はみられなかった。平均生存時間には、対照群と投与群との間に有意差はなかった。対照群を含むすべての群の雌雄でいくつかの器官および組織に腫瘍が発現したが、ムスクキシレン投与群では、試験した両用量において、肝腺腫の発生頻度が雌雄ともに、肝臓がんの発生頻度が雄で統計学的に有意に増加した。雄マウスでは、ハーダー腺腺腫の発生頻度も両投与群で統計学的に有意に増加した。また、雌雄の肺腫瘍 (腺腫) ならびに雌のハーダー腺腫瘍 (腺腫) およびリンパ腫の発生頻度には増加傾向 (統計学的に有意でない) が認められた。上記腫瘍の発生頻度を **Table 4.13** に示す。同表からもわかるように、これらの腫瘍は対照群にも認められた。その他の腫瘍に関しては、投与動物と対照動物の間に発生頻度の差はみられなかった。試験した最低用量 (0.075%、雄マウスで 70~125 mg/kg/日、雌マウスで 80~143 mg/kg/日に相当) が影響量であった。なお、この試験では生殖器官に対する作用はみられなかった (Maekawa et al., 1990)。

**Table 4.13** Tumour incidences in mice treated orally with musk xylene for 80 weeks.

Site and type of tumour	No. of mice with tumours					
	Males			Females		
Concentration in diet (mg/kg)	0	750	1,500	0	750	1,500
Effective no. of mice	49	50	47	46	50	49
Liver						
- adenoma	9	19*	20**	1	14***	13***
- carcinoma	2	8*	13**	0	1	2
- adenoma/carcinoma	11	27**	33***	1	15***	15***
- haemangioma	0	0	0	2	0	0
- haemangioendothelioma	2	0	0	0	0	0
Lung						
- adenoma	3	5	6	0	2	2
- carcinoma	0	0	0	0	1	0
Haematopoietic organs						
- lymphomas (lymphocytic)	4	4	2	3	5	6
Harderian gland						
- adenoma	2	9*	10*	3	3	5
- carcinoma	1	1	0	0	0	0

\* P<0.05;  
 \*\* P<0.01;  
 \*\*\* P< 0.001

### 経皮/吸入

入手データなし。

### 酵素誘導に関する特殊な試験

ラットにムスクキシレンを 50、100 または 200 mg/kg の用量で 5 日間連続して腹腔内投与した。その結果、ラット肝ミクロソームの総チトクロム P450 量およびチトクロム b5 量が共に増加した。SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）後、免疫化学的定量を行なったところ、チトクロム P450 1A2 の高度な誘導およびチトクロム P450 1A1 の軽度な誘導が認められた（Iwata et al., 1992）。

第 I 相および第 II 相薬物代謝酵素に対する誘導作用を調べるため、雄の Wistar ラット (1 群 4 匹) に、ムスクキシレンを 50、100 または 200 mg/kg の用量で 5 日間連続して腹腔内投与した。

その結果、ムスクキシレンの投与により、肝臓の相対重量およびマイクロソーム蛋白量が増加した。また、50 mg/kg 以上の群で、ベンゾ [a] ピレン水酸化および 7-エトキシマリリン脱エチル化について、用量相関性のある増加が認められた。7-ペントキシレゾルフィン脱ペンチル化も全用量群で対照群に比較して増加したが、高用量群では増加が軽減する傾向にあった。その他の活性 (アニリン水酸化酵素、アミノピリン脱メチル化酵素、ベンズフェタミン脱メチル化酵素、エリスロマイシン脱メチル化酵素) は影響を受けなかった。50 mg/kg 以上の群における用量に相関した増加は、グルタチオン S-転移酵素 (GST、2 種)、DT ジアホラーゼ (2 種) および UDP-グルクロン酸転移酵素でも認められたが、N-アセチル転移酵素では認められなかった。また、Ya 型の GST および両型の DT ジアホラーゼの増加に対応して、サイトゾル蛋白含量も増加した。上に述べた酵素のうちその他のものについては、免疫化学的方法による定量を行なわなかった (Iwata et al., 1993a)。

雄の Wistar ラット (5 週齢、1 群 4 匹) に、ムスクキシレンを 0.1 mmol (30 mg) /kg、もしくは 3-メチルコラントレン (3MC) または 2,3-tert-ブチルヒドロキシアニソール (BHA) を等モル量、あるいはイソサフロールを 0.1 または 0.93 mmol/kg の用量で腹腔内投与し、投与 5 日後に肝臓を摘出して、第 I 相および第 II 相生体内変換酵素の誘導を検討した。投与群の結果は溶媒対照群の結果と比較した。

その結果、上記の用量では 3MC のみで総チトクロム P450 量の顕著な増加が認められた。ウェスタンブロットによる解析では、ムスクキシレン、イソサフロールおよび BHA はマイクロソームのチトクロム P450 1A2 (CYP1A2) を CYP1A1 より強く誘導したが、3MC は CYP1A2 よりも CYP1A1 を誘導した。また、ムスクキシレンはエトキシレゾルフィン O-脱エチル化酵素 (EROD、誘導の強さは低用量のイソサフロールと同程度)、エリスロマイシン N-脱メチル化 (ERD) およびアニリン水酸化を誘導したが、ベンズフェタミン脱メチル化には影響を及ぼさなかった。なお、EROD は、3MC および高用量のイソサフロールによってはるかに強く誘導された。これら 2 剤の投与では、ペントキシレゾルフィン O-脱ペンチル化酵素 (PROD) 活性も増強されたが、ベンズフェタミン脱メチル化は抑制された。一方、この用量のムスクキシレン投与では、第 II 相酵素 (DT-ジアホラーゼ、グルタチオン S-転移酵素、UDP-グルクロン酸転移酵素) 活性に影響はみられなかったが、これらの酵素は 3MC では強く誘導され、高用量のイソサフロールでもやや程度は低いながら誘導された。著者らによれば、これらの用量ではムスクキシレンは 3MC よりも特異的な CYP1A2

の誘導剤であった (Iwata et al., 1993b)

注：著者らは PROD 活性については測定したが、CYP2B 蛋白に対する影響は直接には調べなかった。

1 群雄 10 匹の B6C3F1 マウスに、トリオクタノインに溶解したムスクキシレンを、0、50、100 または 200 mg/kg の用量で 1 日 1 回、7 日間腹腔内投与し、8 日目に安楽死させた。肝臓の切片を組織学的検査に供し、また蛋白および酵素活性を測定した。その結果、腹腔内投与後、総ミクロソーム蛋白量ならびに EROD およびメトキシレゾルフィン O-脱メチル化酵素 (MROD) 活性が、対照群と比較して全投与群で用量に関連して増加した。PROD および ERD 活性には変化はみられなかった。肝臓の電子顕微鏡検査では、ムスクキシレン 50 mg/kg 群において、滑面小胞体および特に粗面小胞体の増殖ならびにミトコンドリアの損傷の徴候が認められた。これらの顕微鏡的变化は、高用量群でより顕著となった。

また、別の 1 群雄 20 匹のマウス (同系統) に、ムスクキシレンを 0、0.015、0.045 または 0.15% の濃度 (21.4、64.3、214.3 mg/kg に相当) で 4 週間混餌投与した。その後、各群 10 匹のマウスを安楽死させ、腎臓および脳を摘出して秤量した。また、肝臓について組織学的検査を行ない、ミクロソーム蛋白量および酵素活性を測定した。各群残りの 10 匹については、ムスクキシレンの混餌投与を 14 日間中止した後安楽死させ、上記と同様に肝臓の検査を行なった。

その結果、28 日間の混餌投与後には、肝臓の相対重量、総ミクロソーム蛋白量、ならびに EROD および MROD 活性が、0.045 および 0.15% 群で用量に関連して有意に増加した。このうち活性は、ミクロソーム蛋白 1 mg 当たり 1 分間の活性でも、基質代謝回転量 (P450 1 nmole 当たり 1 分間の基質量 nmole) でも増加した。一方、PROD にはそのような増加はみられなかった。免疫ブロット法では、ムスクキシレンによるチトクロム P450 1A2 酵素の誘導が認められたが、チトクロム P450 1A1 の増加ははるかに少なかった。14 日間の回復期間後、すべての増加は可逆性を示し、対照群と比べて有意差は認められなかった (Caldwell and Thatcher, 1994)。

雄の B6C3F1 マウスに、コーン油に溶解したムスクキシレンを 10 および 200 mg/kg の用量で 7 日間経口投与した。その結果、高用量群で増加が認められたのは、肝臓の相対重量 (38%)、ミクロソーム蛋白量 (125%)、総 P450 含量 (62%) およびチトクロム P450 2B (CYP2B) 蛋白量 (約 20 倍) であった。10 mg/kg 群では、チトクロム P450 の誘導と整合した一般的な肝臓への影響はみられなかった。なお、ムスクキシレンは CYP2B 蛋白量を増加させたが、CYP2B 酵素活性 (PROD 活性として測定) は増加させなかった。ムスクキ

シレンを 1~200 mg/kg の用量で 7 日間連続投与すると、免疫学的反応を示す CYP2B の蛋白量が用量に関連して増加した（最高用量では対照群の約 20 倍）が、CYP2B の酵素活性にはいずれの用量でも対照群の値と比較して差は認められなかった (Stuard et al., 1996)。

マウスの肝ミクロソーム酵素活性に対する影響を調べるため、1 群雄 5 匹の B6C3F1 マウスに、ムスクキシレンを 0 または 200 mg/kg の用量で 7 日間強制経口投与した後、ミクロソームを調製した。一連の酵素分析法を用いて、総チトクロム P450 量、NADPH チトクロム P450 還元酵素、ならびにチトクロム P450 1A1、1A2 および 2B の活性を測定した。また、免疫ブロット法を用いて、CYP1A1、1A2 および 2B の蛋白量の変化も調べた。試験の結果、肝臓重量が 40% 増加し、組織学的には、この増加に対応して、小葉中心性肝細胞肥大が認められた。投与によってミクロソームの総チトクロム P450 量は対照群の値の約 2 倍に、NADPH チトクロム c 還元酵素は約 4 倍に増加した。また、CYP1A1 および 1A2 蛋白は、それぞれ 2.50 倍および 2 倍に誘導された。これらの結果は、免疫ブロット法で認められた 1A1 および 1A2 蛋白量の増加と一致していた (Lehman-McKeeman et al., 1995)。

Lehman-McKeeman ら (1995) の追加試験として、用量-反応試験が行なわれた。試験では、1 群雄 5 匹の B6C3F1 マウスに、ムスクキシレンを 1、5、10、20、50、100 または 200 mg/kg の用量で 7 日間強制経口投与した。その結果、ムスクキシレンの投与によって、肝臓の絶対重量が 20 mg/kg 以上の群で、相対重量が 50 mg/kg 以上の群で、用量に関連して増加した。また、総ミクロソーム蛋白量が 50 mg/kg 以上の群で、総チトクロム P450 量が 20 mg/kg 以上の群で、用量に関連して増加した。

100 および 200 mg/kg 群では、チトクロム P450 1A2 蛋白 (約 3 倍) および 3A 蛋白の誘導が認められ、チトクロム P450 1A1 も軽度に誘導された (定量なし)。また、蛋白量の増加に対応する活性の増加が、200 mg/kg 群の EROD (4 倍) および MROD (2 倍) ならびに 50~200 mg/kg 群の ERD (2.5~4 倍) に認められた。20 mg/kg 以上の群では、チトクロム P450 2B 蛋白も増加し、200 mg/kg 群では 25 倍に達したが、これに対応する PROD 活性の増加はみられなかった。なお、チトクロム P450 2B の増加は、200 mg/kg 群で投与 4 時間以内に P450 2B の mRNA が 10 倍に増加したことからも確認された。以上より、本試験での肝酵素誘導に対する影響についての NOEL は、10 mg/kg/日 (7 日間投与) であった (Lehman-McKeeman et al., 1997a)。

さらに別の試験では、雄の B6C3F1 マウス (1 群 5 匹) に、代表的な CYP2B 誘導剤であるフェノバルビタール (PB) を 5 日間投与 (500 mg/L の濃度で飲水投与) した後、コーン油またはコーン油を溶媒とするムスクキシレン 200 mg/kg を単回経口投与し、2 または 18 時間後に剖検した。その結果、免疫ブロット法では、PB 投与動物にコーン油を投与し

た場合とムスクキシレンを投与した場合とで、CYP2B 蛋白量に差はみられなかった。一方、PB/コーン油投与マウスにおける CYP2B 酵素活性は 1,200~1,300 pmol/分/mg 蛋白であり、未誘導の状態に比べて約 20 倍の誘導を示した。また、ムスクキシレン投与の 2 時間後に動物を剖検した場合も、CYP2B 酵素活性は PB/コーン油投与マウスと同様であった (1,221 ± 76 pmol/分/mg 蛋白)。しかし、投与 18 時間後に剖検した場合、ムスクキシレン投与マウスにおける CYP2B 酵素活性は、PB/コーン油投与マウスに比べて 90% 低下 (99 ± 12 pmol/分/mg 蛋白) した。著者らは、この結果はムスクキシレンが CYP2B 酵素の強力な阻害剤であることを示しているが、阻害作用が投与 18 時間後にしか認められなかったことから、*in vivo* における CYP2B 酵素阻害にはムスクキシレンの代謝が必要であることが示唆される、と述べている (Lehman-McKeeman et al., 1997a)。

ムスクキシレンの腸内細菌叢による生体内変化が酵素阻害に関与しているか否かを調べるため、8 匹の雄の B6C3F1 マウスに PB を投与 (500 mg/L の濃度で 5 日間飲水投与) して CYP2B 酵素を誘導した。このうち 4 匹のマウスからなる 1 群には、PB 投与期間中、ネオマイシン (400 mg/kg/日)、テトラサイクリン (200 mg/kg/日) およびバシトラシン (200 mg/kg/日) も組み合わせて投与 (強制経口投与) し、腸内細菌叢を減弱させた。対照群の動物には毎日生理食塩水を投与した。PB および抗生物質を 5 日間投与後、すべてのマウスにムスクキシレンを投与 (200 mg/kg の用量で強制経口投与) し、その 18 時間後にマイクロソームを調製した。その結果、CYP2B 蛋白量は、PB/生理食塩水/ムスクキシレン群と PB/抗生物質/ムスクキシレン群で同様であったが、抗生物質を投与した群では、生理食塩水を投与したマウスに比べて、ムスクキシレンによる CYP2B 酵素活性阻害が抑制された。これらの結果は、ムスクキシレンを投与したときにみられる CYP2B 酵素の抑制に腸内細菌叢によるムスクキシレンの生体内変化が関係していることを示している (Lehman-McKeeman et al., 1997a)。

阻害メカニズムを検討するため、無処置および PB 投与マウスに、[メチル-<sup>14</sup>C] -ムスクキシレンを 200 mg/kg (150 μCi) の用量で経口投与し、マイクロソーム蛋白に対する共有結合を調べた。その結果、無処置マウスでは、マイクロソーム分画の <sup>14</sup>C-ムスクキシレン相当量の約 3% が蛋白と共有結合していた。一方、PB 投与マウスでは、共有結合量が 7 倍に増加し、PB の誘導による酵素活性 (PROD) はムスクキシレンによって 90% 抑制された。また、抗生物質で腸内細菌叢を除去したマウスにムスクキシレンを投与すると、無処置マウス、PB 誘導マウスのいずれにも、マイクロソームにおける共有結合は検出されなかったことから、共有結合はムスクキシレンのアミン代謝物によるものであることが示唆された。そこで、ムスクキシレンの 2 種類のアミン代謝物、すなわち p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンと o-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンを合成して酵素阻害を調べた。その結果、ムスクキシレンとこれらのアミン類は CYP2B の混合阻害剤であり、K<sub>i</sub> 値は親化合物のムスクキシレンとその代謝物でそれぞれ



れ  $10^{-7}\text{M}$  および  $10^{-8}\text{M}$  であった。ムスクキシレンと *o*-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンは酵素を不活性化しなかったが、*p*-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンは CYP2B 酵素 (PROD) 活性を時間および NADPH 依存的に抑制し、添加 5 分後の抑制率は 85% であった。不活性化速度定数 ( $k_{\text{inact}}$ ) が最大値の 1/2 になる濃度  $K_i$  は  $10.5 \mu\text{M}$  であった。また、 $k_{\text{inact}}$  は  $1.2 \text{ min}^{-1}$  で、最大不活性化速度に対応し、残存酵素活性の半減期は約 35 秒であった。PB 処置マウスに *p*-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレン ( $154 \text{ mg/kg}$ ) を投与すると、投与後 2 時間以内にマイクロソームの PROD 活性は完全に消失したが、等モルのムスクキシレンの投与では投与 18 時間後にのみ PROD 活性が影響を受け、2 時間後では影響は認められなかった。マイクロソームの CYP2B 蛋白量は、*p*-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンによってもムスクキシレンによっても影響されなかった (Lehman-McKeeman et al., 1996; Lehman-McKeeman et al., 1997b)。

マウスの肝臓で CYP2B の誘導を引き起こす物質を同定するため、雄の B6C3F1 マウス (1 群 5 匹) に、コーン油に溶解したムスクキシレン、*o*-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレン、または *p*-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンを  $0.67 \text{ mmol/kg}$  (ムスクキシレンは  $200 \text{ mg/kg}$ 、両アミノ誘導体は  $180 \text{ mg/kg}$ ) の用量で強制経口投与した。対照群の動物にはコーン油のみを与えた。投与 4、8、16、24、もしくは 48 時間後に肝臓を摘出し、CYP2B および CYP1A2 mRNA、チトクロム P450 酵素 (PROD、EROD、MROD) 活性、CYP2B 蛋白量、その他いくつかの一般的な異物代謝誘導項目 (肝臓重量、マイクロソーム蛋白量、総チトクロム P450 量、チトクロム c 還元酵素) について調べた。また、別の試験において、広域抗生物質の前処置がチトクロム P450 の誘導に及ぼす影響も検討した。これらの試験では、ムスクキシレンおよびその代謝物による誘導パターンを、PB による誘導パターンと比較した。

試験の結果、PB ならびにムスクキシレンおよび *o*-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンは、CYP2B mRNA を対照群の値の 5 倍誘導し、最大の反応は投与 6~18 時間後に認められた。*p*-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンも mRNA の発現を 5 倍に誘導したが、その増加は投与 48 時間後まで持続した。PB 同様、ムスクキシレンおよびその代謝物によって CYP1A2 の mRNA も誘導されたが、その程度は対照群の値の 1.5 倍に過ぎなかった。

動物を広域抗生物質で前処置して腸内細菌叢による代謝を排除しておく、ムスクキシレンを投与してもマイクロソーム酵素の誘導を示す所見は得られなかった。さらに、ムスクキシレンの単独投与では CYP2B および CYP1A 蛋白が誘導されたのに対し、抗生物質投与後に与えた場合にはこれらの変化はみられなかった。したがって、マイクロソーム生体内変換酵素の誘導は、腸管内におけるムスクキシレンのニトロ還元産物によるものであると結論された (Lehman-McKeeman et al., 1997c)。

雄の F344 ラット (1 群 6 匹) に、ムスクキシレンをコーン油に溶解して、0、10、50 また

は 200 mg/kg の用量で 7 日間経口投与した。動物を安楽死させた後、肝臓について CYP1A1/2、CYP2B1/2 および CYP3A の酵素活性の測定ならびに CYP2B1/2 の蛋白量および mRNA 発現量の測定を行ない、ミクロソーム酵素の誘導を調べた。

試験の結果、200 mg/kg 群まで毒性徴候はみられなかった。一方、ミクロソーム酵素の誘導を示す変化として、肝臓の絶対重量が用量に関連して増加し（200 mg/kg 群で統計学的に有意）、ミクロソームの総チトクロム P450 量、チトクロム b5 量および NADPH チトクロム P450 還元酵素も用量に関連して増加し、その増加は 50 および 200 mg/kg 群で統計学的に有意であった。

PROD 測定値としての CYP2B 活性は、全用量群で有意に増加し、最高は 200 mg/kg 群の 3 倍であった。ただし、対応する CYP2B 酵素濃度はこの用量で約 50 倍に増加しており、定常状態の CYP2B mRNA 量も 10 倍に増加していた。

ムスクキシレンへの曝露により、CYP1A1/2 および CYP3A1 の酵素活性も増加した。すなわち、用量に関連した増加が、EROD および MROD 活性（全用量群で統計学的に有意）ならびにテストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素活性（50 および 200 mg/kg 群で統計学的に有意）で認められた。この生体内変換酵素の誘導プロファイルは、PB を 500 mg/L の濃度で 7 日間飲水投与したときに認められるものと同様であった。この試験結果から、ラットにムスクキシレンを 7 日間投与したときの肝臓のミクロソーム酵素誘導に関する LOEL として、10 mg/kg という値が導かれた（Lehman-McKeeman et al., 1999）。

雌雄の Long-Evans ラット（5～6 週齢）に、ムスクキシレンを飼料 1 kg 当たり 0、10、100 または 1,000 mg の濃度（0、0.7～0.8、7～8 または 70～80 mg/kg/日に相当）で混餌投与した。これら 4 群は、それぞれ 6～8 匹（雌雄半数ずつ）よりなっていた。10～11 週間後、動物の体重を測定し、安楽死させ、肝臓を採取・秤量して、PROD、MROD および EROD 活性を分析した。また、ミクロソーム蛋白をゲル電気泳動に供し、その後 CYP1A、2B および 3A 蛋白の免疫プロットを行ない、デンストメトリーにより定量した。

その結果、肝臓の絶対および相対重量ならびに粗ミクロソーム蛋白量には、投与に関連した影響はみられなかった。中間用量群では、MROD および EROD 活性が雌雄とも 2.5～4 倍に増加したが、PROD 活性は 1.7 倍に増加したのみであった。免疫プロットのデンストメトリーでは、CYP1A 蛋白が 10 および 100 mg/kg 飼料群でそれぞれ 2 および 4 倍に増加したのに対し、1,000 mg/kg 飼料群では対照群の 7 倍という高値を示した。また、曝露群において CYP3A は 1.1～1.6 倍に誘導されたのみであったが、CYP2B は 10 および 100 mg/kg 飼料群でそれぞれ約 10 および 6 倍に増加し、1,000 mg/kg 飼料群では約 180 倍に増加した。

なお、統計学的に有意な蛋白量の増加が認められたのは、100 および 1,000 mg/kg 飼料群の CYP1A ならびに 1,000 mg/kg 飼料群の CYP2B のみであった (Suter-Eichenberger et al., 2000)。

雌雄の Long-Evans ラット (5~6 週齢) を、飼料 1 kg 当たり 0 または 100 mg (7~8 mg/kg/日に相当) のムスクキシレン濃度で 18 週間混餌投与飼育、100 mg の濃度で 16 週間混餌投与飼育しさらに対照飼料で 2 週間飼育、もしくは 100 mg の濃度で 10 週間混餌投与飼育しさらに対照飼料で 8 週間飼育した。これら 4 群は、それぞれ 2~4 匹よりなっていた。

試験の結果、ELISA 法で求めた肝ミクロソームのチトクロム P450 1A1 および 1A2 蛋白量は、雄で 1.5~2 倍、雌で約 2 倍に増加した。EROD および PROD により反映される酵素活性は、雌雄とも約 3 倍に増加した。ムスクキシレンを 16 または 10 週間混餌投与後、対照飼料で 2 または 8 週間飼育した群では、18 週間の対照群と比較して明らかな差は認められなかった。なお、その他のチトクロム P450 分子種については分析しなかった (Suter-Eichenberger et al., 2000)。

#### 4.1.2.7.2 ヒトにおける試験

入手データなし。

#### 4.1.2.7.3 発がん性の要約

ムスクキシレンの発がん性は、マウスを用いたある 80 週間の混餌投与試験で調べられている。その結果、試験した両用量 (0.075 および 0.15%) 群において、雌雄の肝細胞腺腫および雄の肝細胞がんの発生頻度が統計学的に有意に増加した。また、ハーダー腺腺腫の発生頻度も、両用量群の雄で統計学的に有意に増加した。雌雄の肺腺腫ならびに雌のリンパ腫およびハーダー腺腺腫など、その他の一部の腫瘍も投与群でより多く認められたが、対照群の発生頻度との差は統計学的に有意ではなかった。したがって、試験した最低用量の 0.075% (雄マウスで 70~125 mg/kg/日、雌マウスで 80~143 mg/kg/日) が影響量である。なお、この試験では生殖器官に対する影響はみられなかった。

マウスの肝腫瘍の背景にあるメカニズムについての特殊な試験では、ムスクキシレンの投与によって、チトクロム P450 1A1、1A2 および 2B、ならびにチトクロム b5 を含む肝臓の酵素が非常に顕著に誘導されることが明らかになった。肝臓中の CYP2B 蛋白量は、代表的な CYP2B 誘導剤である PB でみられるものと同程度の高い値を示すが、代謝物の p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレンは、該酵素 CYP2B を選択的に不活性化する。この誘導/阻害現象の毒性学

の意味は不明である。マウスにおける 7 日間の試験では、肝臓の酵素への影響についての NOEL は 10 mg/kg/日であった。同様の誘導現象がラットの肝臓でも認められているが、ラットでは 7 日間投与での LOEL が 10 mg/kg/日と考えられた。CYP2B 蛋白に対する軽度な誘導作用は、飼料 1 kg 当たり 10 mg という低濃度 (0.7~0.8 mg/kg/日に相当) の混餌投与でも約 75 日後に認められたが、CYP1A および 3A についての LOEL は 10 倍高くなるようであった。これらの誘導現象は可逆的で、肝臓重量の変化を伴っていなかった。肝毒性を示すその他の所見がないことから、生体内変換酵素活性の軽度な変化は、有害作用というより、適応性を示すものと考えられる。したがって、このような影響およびそれに関する NOEL/LOEL は、これ以降のリスク判定には用いないこととする。

ムスクキシレンの発がん性の背景にあるメカニズムは完全には解明されていない。悪性腫瘍の発生頻度の統計学的に有意な増加は、雄の B6C3F1 マウスの肝臓にのみ認められたが、これは特に肝腫瘍を好発する系統である。その他、自然発生する腫瘍がハーダー腺 (腺腫)、肺 (腺腫) および造血器系 (リンパ腫) に認められ、投与群ではこれらの腫瘍がやや多かった (雄のハーダー腺腺腫を除き、対照群との間に統計学的有意差なし)。ムスクキシレンの発がん性は、ラットなどの第二の動物種では調べられていない。

ムスクキシレンに遺伝毒性がないことは明らかにされている。また、マウスの肝臓でみられた本物質の発がん性は、フェノバルビタール投与後にみられる誘導パターンと非常に類似したパターンを示す点において、肝臓のミクロソーム酵素、すなわちチトクロム P450 1A1 および 1A2、とりわけチトクロム P450 2B の誘導に関連しているようである。これらの酵素誘導はラットおよびマウスの双方で認められるが、両動物種とも、誘導された CYP2B は p-NH<sub>2</sub>-ムスクキシレン (おそらくムスクキシレンが腸内細菌によってニトロ還元されて生じたもの) で速やかに不活性化される。これに対し、誘導された CYP1A1 および 1A2 は代謝活性を有しており、実際、ムスクキシレンの曝露によっていくつかの前駆型変異原の生体内活性化が増強されることが示されている。しかし、肝臓におけるミクロソーム酵素の誘導は閾値現象で、ムスクキシレンではマウスの NOEL が 10 mg/kg/日、ラットの LOEL が 10 mg/kg/日であることから、ある閾値以下では前駆型変異原の生体内活性化および発がん性のリスクは無視できるものと考えられる。

ハーダー腺腫瘍に関して言えば、発現したのは良性腫瘍のみであった。ハーダー腺や同種の組織はヒトでは存在せず、したがって、これらの良性腫瘍のヒトへの関連性を解釈することは困難である。また、B6C3F1 マウスでは、肝臓およびハーダー腺の腫瘍と同様、肺および造血器系に自然発生する腫瘍も認められたが、それらの投与群の動物での発生頻度はわずかに高いものにすぎなかった。

## 結論

現在入手できるデータからヒトにおけるムスクキシレンの発がん性のリスクを推定することは困難である。これは以下の理由による。

- ・ 1 動物種、すなわち B6C3F1 マウスでしか試験が行なわれていない。
- ・ この系統のマウスはある種の腫瘍、特に肝腫瘍を好発する。
- ・ ムスクキシレンには遺伝毒性はないこと、また、認められた肝腫瘍の発生には酵素誘導が重要な役割を果たしていることは明らかであるものの、腫瘍発生の背景にあるメカニズムは完全には解明されていない。

ムスクキシレンの発がん性はラットでは調べられていないが、ムスクキシレンがマウスとラットで同じような酵素誘導作用を示すことを考えると、ラットでも発がん性が認められる懸念がある。しかし、例えばラットやマウスにおける試験をさらに行なってメカニズムをより明らかにしようとしても、ヒトにおけるムスクキシレンの発がん性のリスク評価にあまり役立つとは考えられない。なぜなら、ムスクキシレンがマウスにおける発がん性物質であること、本物質は遺伝毒性によらない作用様式で働くこと、さらに、発生頻度が統計学的に有意に増加した最も重要な種類の腫瘍（すなわち雄マウスにおける肝臓がん）の発生メカニズムがミクロソーム酵素の誘導に関連していることは、現在あるデータから十分に結論できるためである。したがって、ムスクキシレンが遺伝毒性を持たないこと、および酵素誘導が閾値現象であることを考慮すると、リスク判定には閾値法が妥当な手法であると考えられる。腫瘍発生（特に肝腫瘍）の経口 LOAEL である 70 mg/kg/日をリスク判定の基礎とし、酵素誘導に関するマウスの NOEL を考慮に入れて安全域（MOS）を解釈するならば、B6C3F1 マウスが特に肝腫瘍を好発することが明らかなため、それだけでかなり慎重といえる手法になるであろう。

分類に関して言えば、IARC は 1996 年に、ムスクキシレンの動物に対する発がん性については限定的な証拠があるが、ヒトに対する発がん性については分類できない（グループ 3）と結論した（IARC, 1996）。しかし、ムスクキシレン投与でみられる肝臓への影響は、ラットやマウスにフェノバルビタール（PB）を投与したときにみられるものと類似している。PB はげっ歯類における明らかな（肝）発がん物質であり、遺伝毒性物質を用いた前処置に起因する腫瘍の発達を促進するためにしばしば用いられる。PB がヒトに対して発がん性有りとするに対する妥当性は疑問である（Williams and Whysner, 1996; IARC, 2001 など）が、それにもかかわらず、IARC（2001）はごく最近になって、PB をグループ 2B の物質（「ヒトに対して発がん性があるかもしれない」）に分類した。したがって、PB との類似性を考慮し、境界例ではあるものの、ここでは非遺伝毒性物質ムスクキシレンを発がん性区分 3（R40）に分類すると結論する。2002 年 5 月の CMR 作業部会は、発がん性区分 3

(R40) に分類することに賛成し、これを 2002 年 9 月の会議で確認した。

#### 4.1.2.8 生殖毒性

##### 4.1.2.8.1 受胎能に対する影響

#### 動物における試験

多世代生殖毒性試験データは入手できなかったが、ラットを用いた 90 日間経皮毒性試験およびマウスを用いた経口発がん性試験のいずれでも、ムスクキシレンは生殖器官に対して影響を及ぼさなかった。これは、90 日間経皮毒性試験で陽性対照物質として使用された構造的な関連物質のムスクアンブレットとは対照的であった。ムスクアンブレットは精巣萎縮を引き起こすことが知られており、実際、90 日間経皮毒性試験ではその影響が認められた。また、周産期／出生後毒性試験 (4.1.2.8.2 項参照) では、仔動物をムスクキシレンに子宮内および授乳期曝露し、その後交配させたが、生殖能に対する影響はみられなかった。

#### ヒトにおける試験

入手試験データなし。

1994～1996 年に婦人科の問題でハイデルベルク (ドイツ) の病院に来院した女性 152 人 (年齢  $35 \pm 7$  歳) について、血中の合成香料 (ムスクキシレンを含む) の有無を調べた。また、下垂体、副腎および卵巣の各種ホルモンの測定、産科学的検査、ならびに化粧品と洗剤の使用、および摂取した魚の種類と頻度に関する広範囲にわたる履歴の調査を行なった。152 人の女性のうち、106 人は受胎能の問題を有し、残り 46 人のうち 28 人は性周期障害、7 人は脱毛症および多毛症、11 人は子宮、卵管または卵巣の疾患であった。試験の結果、ムスクキシレンは 152 例中 144 例の血液サンプル中に検出され (検出限界 20 ng/L)、中央値、平均および最高濃度は、それぞれ 65.5、114.6 および 1,183 ng/L であった。著者らは、血中のムスクキシレン濃度と年齢、肥満度指数 (BMI)、職業、国籍、魚の摂取、洗剤の使用、ならびに卵胞および黄体期ホルモンとの間に有意な相関性はなかったと報告している (ただし、黄体期ホルモンについては傾向が認められた)。一方、血中のムスクキシレン濃度と化粧品 (特に香水) の使用頻度、アンドロスタンジオールグルクロニド濃度 (他の副腎ホルモンは該当せず)、および産科歴 (妊娠・出産歴がある場合と原発性不妊症の場合の比較、1 回以上の出産歴がある場合と未産の場合の比較、流産の経験がない場合と 1 回以上の流産歴がある場合の比較) との間には有意な関連性が報告された。また、一部の障害 (無排卵、黄体機能不全) でも顕著な (ただし有意ではない) 関連性が認められた (Eisenhardt et al.,

2001)。

注：適切な対照群（すなわち産科学的問題を有していない女性）が用いられておらず、交絡因子が調べられていないため、この試験から血中ムスクキシレン濃度と生殖または内分泌に対する影響との因果関係を明らかにすることはできない。

#### 4.1.2.8.2 発生毒性

##### 動物における試験

###### 経口

ある用量設定試験において、1群8匹の妊娠 Sprague-Dawley ラットに、ムスクキシレンを0、60、200、600または2,000 mg/kg/日の用量で、妊娠7～17日に強制経口投与した。ムスクキシレンの投与にはコーン油を溶媒として用いた。妊娠20日に、動物を安楽死させた。振戦が全投与群で、尿による腹部被毛の汚れが60、600および2,000 mg/kg群で認められた。また、口周囲部の赤色物（乾燥したものを含む）が200 mg/kg群で、紅涙、口周囲部の赤色物（乾燥したものを含む）および前肢の赤色物が600および2,000 mg/kg群で認められた。さらに、200、600および2,000 mg/kg群のラットでは、体重増加量および摂餌量が用量に関連して減少した。一方、帝王切開時の検査項目および各腹（リッター）に関する項目には、2,000 mg/kgまで投与しても影響はみられなかった。また、肉眼的には胎仔の外観の変化、奇形または変異は観察されなかった (Parker, 1997)。

ある経口発生毒性試験では、1群25匹の Sprague-Dawley ラットに、ムスクキシレンを0、20、60または200 mg/kg/日の用量で、妊娠7～17日に強制経口投与した。ムスクキシレンの投与にはコーン油を溶媒として用いた。妊娠20日に、動物を安楽死させた。振戦、紅涙および尿による腹部被毛の汚れが、200 mg/kg群ではかなり多く（12～25匹）の、60 mg/kg群では少数（1～3匹）の動物で認められた。これらの症状は初回投与後に最初に認められ、4回目の投与以降はみられなかった。体重増加量は、60および200 mg/kg群の動物で、投与期間中有意かつ用量に関連して減少し、絶対および相対摂餌量も、60および200 mg/kg群で、全投与期間を通じて有意に減少した。生殖関連項目および各腹（リッター）に関する項目には、ムスクキシレン投与による影響はみられなかったが、過剰胸部肋骨ならびに舌骨部および前肢指骨の過剰骨化が200 mg/kg群で認められた（ともに有意）。以上より、本試験における母動物毒性のNOAELは20 mg/kg/日、発生毒性のNOAELは60 mg/kg/日と判定された (Christian et al., 1997; Christian et al., 1999)。

雌雄の Long-Evans ラット (5~6 週齢) に、ムスクキシレンを飼料 1 kg 当たり 0、1、10、33、100 または 1,000 mg の濃度 (0、0.07~0.08、0.7~0.8、2~3、7~8 または 70~80 mg/kg/日に相当) で妊娠前少なくとも 10 週間混餌投与した。その後、雌を、同濃度のムスクキシレン混合飼料を与えた雄と交配した。仔動物を、出生 1 日前 (GD22)、生後 1 日 (12 時間以内、PN1) および生後 14 日 (PN14) に検査した。GD22 および PN1 の仔動物については、雌雄の肝臓サンプルを 1 腹ごとにまとめた。ムスクキシレン投与は、妊娠期間を通じて、さらに (該当する場合には) 生後 14 日まで継続した。F1 出生仔について、肝臓重量、肝臓の粗ミクロソーム蛋白量、MROD および EROD 活性、ならびに肝ミクロソーム中の CYP1A、2B および 3A 蛋白量に対する影響を検討した。

PN14 の出生仔では、ムスクキシレンに曝露された母動物からの出生仔の肝臓重量の方が、対照群の出生仔の肝臓重量よりも低い傾向にあったが、その変化には性および用量との関連性がなく、統計学的にも有意ではなかった。また、肝臓の粗ミクロソーム蛋白量には影響はみられなかった。一方、PN14 の出生仔における EROD および MROD 活性は、母動物の曝露濃度が 33 mg/kg 飼料の群でそれぞれ 1.6 および 1.8 倍に、100 mg/kg 飼料の群でそれぞれ 3 および 3.7 倍に増加した (1,000 mg/kg 飼料群については検査せず)。10 mg/kg 飼料群では EROD の誘導はみられなかった (MROD は検査せず)。また、性による感受性の差はなかった。免疫ブロット法およびデンストメトリーにより、100 および 1,000 mg/kg 飼料群における CYP1A、CYP2B および CYP3A 蛋白の誘導が確認された。

妊娠前および妊娠中に 100 mg/kg 飼料のムスクキシレンに曝露された母動物からの PN1 出生仔では、対照群の母動物からの PN1 出生仔に比べて、EROD 活性が 3~7 倍に増加し、MROD 活性も増加した。一方、100 mg/kg 飼料に曝露された母動物からの GD22 仔動物については、EROD も MROD も検出できなかったと述べられているが、これらの仔動物および対応する対照動物におけるデータは記載されていなかった (Suter-Eichenberger et al., 2000)。

#### 交差哺育試験

雌雄の Long-Evans ラット (5~6 週齢) に、ムスクキシレンを飼料 1 kg 当たり 0 または 100 mg の濃度 (0 または 7~8 mg/kg/日に相当) で少なくとも 10 週間混餌投与し、その後、雌を、同濃度のムスクキシレン混合飼料を与えた雄と交配した。生後 12 時間以内に、以下の試験デザインになるように両群の母動物間で出生仔を交換した。



	Pre-natally control	Pre-natally exposed
Post-natally control	group 1	group 3
Post-natally exposed	group 2	group 4

F1 出生仔について、PN14 時に MROD および EROD 活性に対する影響を検討した。その結果、第 1 群の出生児に比べ、第 2 および 4 群の仔動物では、ともに酵素活性が同程度（MROD は約 2.5 倍、EROD は約 2 倍）に増加した。第 3 群ではこのような変化はみられなかった。GD22 の仔動物では EROD および MROD 活性を検出できなかったことと合わせて考えると、この交差哺育試験の結果は、酵素活性にみられた差が主に出生後の曝露によるものであることを示していた (Suter-Eichenberger et al., 2000)。

#### 周産期／出生後毒性試験

特定の日に交配させた 1 群 28 匹の Charles River CD ラットに、ムスクキシレン（コーン油に溶解）を 0、2.5、7.5 または 25 mg/kg/日の用量で、妊娠 14 日（器官形成期の終わり）から分娩後 21 日の離乳まで強制経口投与した (Brooker et al., 1998)。雌には出産後、離乳まで仔動物を哺育させた。試験では、全出生仔について、平面立ち直り反射、驚愕反射、空中立ち直り反射、および瞳孔反射を調べ、特定の発生段階に達した日齢を求めた。また、これらの出生仔の一部（1 群雌雄各 24 匹）を成熟するまで飼育し、行動（運動協調性および平衡、活動性、忌避）の変化ならびに生殖能（雄と雌を 1 対 1 で交配させ、妊娠、出産および仔動物が成長して離乳するまで）を調べた。F<sub>1</sub> 世代の被験物質に対する曝露は、周産期の子宮内曝露と、授乳中の母動物の乳汁への移行によるもののみであった。また、毒物動態学的試料を得るために、別の 1 群 15 匹の妊娠動物にムスクキシレンを 0、2.5 または 25 mg/kg/日の用量で投与し、乳汁中のムスクキシレン濃度を分析した (4.1.2.1.1 項の「特殊な試験」参照)。

試験の結果、25 mg/kg 群の母動物では、投与最初の数日に軽度（統計学的に有意でない）かつ一時的な体重増加抑制が認められた。また、同群では授乳期間中にも体重増加抑制がみられた（授乳期間の中期は統計学的に有意）。授乳期間中は摂餌量も 25 mg/kg 群で軽度に減少した（対照群の 95%、統計学的に有意でない）。同群における仔動物の平均体重は、4 日から離乳時までわずかに低かった（4.4~7.6%、統計学的に有意でない）。この低体重に関連して、これらの仔動物では空中立ち直り反射の獲得が対照群よりもやや遅延した。性成熟および生殖能には影響はみられなかった。25 mg/kg 群の F<sub>0</sub> 母動物から生まれた F<sub>1</sub> の雄では、交配前および交配期間中に体重増加抑制傾向が認められた（6%、統計学的に有意でない）。

F<sub>1</sub>仔は母乳中のムスクキシレンに最高 84,940 µg/L の濃度で曝露されていた（4.1.2.1.1 項の「特殊な試験」参照）が、特定の行動試験における成績や成熟時の生殖能にはこれらの曝露による直接的な影響はなかった。

分娩後 15 日または 22 日に安楽死させた F<sub>1</sub>仔（生後 15 日は追加群、22 日は主群の余剰動物）の脂肪組織中のムスクキシレン濃度を測定したところ（Table 4.14 参照）、性差が認められ、雌の仔動物の脂肪中濃度は雄の仔動物よりも高かった。また、脂肪中濃度はほぼ用量に比例して増加した。生後 15 日の脂肪中濃度は、生後 22 日の値よりも高かった（Brooker et al., 1998）。

Table 4.14 Concentrations in fat (in µg/ml).

Dose level (mg/kg bw)	Day 15 (mean of n=14-15)		Day 22 (mean of n= 26-28)	
	Male	Female	Male	Female
2.5	1.02	1.10	0.39	0.42
7.5	-	-	1.15	1.28
25	8.92	9.44	4.36	5.75

この試験における母動物毒性および周産期／出生後毒性の NOAEL は、7.5 mg/kg/日と判定された。25 mg/kg 群で認められた影響は、母動物、仔動物ともごく軽度であり、概して統計学的に有意ではなかった。しかし、仔動物でみられた影響は、関連物質のムスクケトンでみられたものと同じであったため、これらが生物学的に意味のある変化であって、F<sub>0</sub> 母動物へのムスクキシレン投与に関連したものであることは否定できない。したがって、NOAEL は（慎重を期して）7.5 mg/kg/日とした。

#### 経皮／吸入

入手データなし。

#### ヒトにおける試験

入手データなし。

#### 4.1.2.8.3 内分泌相互作用

### 受容体との結合

Chou および Dietrich (1999) は、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) およびアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を用いて、ムスクキシレンとその代謝物の、エストロゲン受容体 (ER) に対する競合的結合能を検討した。その結果、親化合物ムスクキシレンでは結合はみられなかったが、2-アミノムスクキシレンおよび 4-アミノムスクキシレンでは両動物種ともに ER に対する結合が認められた (ニジマスおよびアフリカツメガエルにおける 2-アミノムスクキシレンの IC50 はそれぞれ  $1.3 \pm 1.1$  mM および  $12.9 \pm 10.3$   $\mu$ M、4-アミノムスクキシレンの IC50 はそれぞれ 1 mM 超および  $30.8 \pm 28.5$   $\mu$ M)。

### E-スクリーン

ある非 GLP 試験では、Soto ら (1995) の E-スクリーン法に基づき、ムスクキシレン (純度 99.5%)、4-アミノムスクキシレン (純度 99.9%超) および  $\sigma$ アミノムスクキシレン (純度 95%) を、エタノールを溶媒としてエストロゲン受容体陽性のヒト乳がん細胞 (MCF-7) に添加し、6 日間培養した。試験は、最高 5  $\mu$ mol/L (4-アミノムスクキシレン) または 10  $\mu$ mol/L (他の 2 物質) までの 5 濃度で行ない、溶媒の最高濃度は 0.1%とした。細胞を固定後、総蛋白量を測光分析によって測定して細胞増殖率を求め、これをホルモン非添加の対照試料の値と比較した。また、相対増殖率 (対照群に対する被験物質投与群の値) を 17 $\beta$ -エストラジオールと比較した。その結果、ムスクキシレンおよび 4-アミノムスクキシレンでは、ホルモン非添加の対照と比較して増殖率が軽度増加したが、 $\sigma$ アミノムスクキシレンでは増加はみられなかった。ムスクキシレンおよび 4-アミノムスクキシレンの効力は、17 $\beta$ -エストラジオールの 1/10<sup>5</sup>未満であった (Bitsch et al., 2002)。なお、上記の結果は統計学的に有意であったが、値のばらつきが大きかった点、および対照試料 (0.1%エタノール) の値が示されていない点に留意する必要がある。

#### 4.1.2.8.4 生殖毒性の要約

受胎能に関しては、いずれの経路についても多世代生殖毒性試験データは得られなかったが、ラットにおける 90 日間経皮毒性試験およびマウスにおける経口発がん性試験のいずれでも、ムスクキシレンは生殖器官に対して影響を及ぼさなかった。一方、構造的な関連物質のムスクアンブレットは、90 日間経皮毒性試験で精巣萎縮を引き起こした。周産期/出生後毒性試験では、ムスクキシレンに子宮内および授乳期曝露された仔動物において、性成熟および生殖能に対する影響は報告されなかった。

ラットにおける経口発生毒性試験では、中間および高用量群である 60 および 200 mg/kg/日群で、体重増加抑制と摂餌量の減少として表出した母動物毒性が認められた。また、胚毒性（過剰肋骨および過剰骨化）が、試験した最高用量群で認められた。したがって、本試験における母動物毒性の NOAEL は 20 mg/kg/日、発生毒性の NOAEL は 60 mg/kg/日と判定された。催奇形性を示す所見はなかった。

出生仔におけるチトクロム P450 酵素の誘導に主眼を置いた限定的な一世代試験では、ムスクキシレンを 2~3 mg/kg/日以上用量で交配前少なくとも 10 週間ならびに妊娠および授乳期間を通じて投与された母動物から生まれた仔動物で、14 日齢において CYP1A および 2B 蛋白ならびに CYP1A 関連酵素活性の増加が認められた。この影響についての NOEL は 0.7~0.8 mg/kg/日であった。また、交差哺育試験によれば、仔動物におけるこのチトクロム P450 酵素の誘導はすべて、出生後の乳汁を介した曝露によるものようであった。ただし、肝毒性を示すその他の所見がないことから、生体内変換酵素活性の軽度な変化は、有害作用というより、適応を示すものと考えられる。

経口投与による周産期/出生後毒性試験では、F<sub>1</sub> 世代を子宮内で、および授乳中の母動物の乳汁への移行を介して、ムスクキシレンに曝露した。その結果、最高用量の 25 mg/kg/日群では非常に軽度な母動物毒性（体重増加抑制および摂餌量の減少）が認められたのみであった。また、最高用量群では軽度な仔動物毒性（空中立ち直り反射の獲得日齢のわずかな遅延および軽度な体重増加抑制）も認められたが、行動の変化や生殖能の低下はこの用量までみられなかった。25 mg/kg/日群で認められた影響は、母動物、仔動物ともごく軽度であり、概して統計学的に有意ではなかったが、母動物毒性および周産期/出生後毒性の NOAEL は、ともに本試験での中間用量である 7.5 mg/kg/日と考えられた。これは慎重な考え方に基づくものであるため、安全域の解釈の際には、その上の用量でみられた影響が非常に小さいこと、また仔動物における影響の生物学的意義が不明であることを考慮する必要がある。

周産期/出生後毒性試験から得られたデータは、ムスクキシレンを生殖毒性に関して分類する必要がないことを示している。この試験で出生仔にみられた影響の軽微さと、これらの影響の生物学的意義は不明であるという事実を考慮すると、ムスクキシレンに対して R64（「母乳哺育児に害を及ぼすことがある」）のラベルを付す必要もない。このことは、2002 年 5 月の CMR 作業部会の会議で確認された。

E-スクリーン試験において、ムスクキシレンと 4-アミノムスクキシレンは非常に弱いアゴニストであるが、2-アミノムスクキシレンはそうでないことが示された。また、ニジマスおよびアフリカツメガエルのエストロゲン受容体への結合については、2-アミノムスクキシレ

ンと 4-アミノムスクキシレンで結合が認められたが、ムスクキシレン自体では認められなかった。

これらの結果は互いに矛盾している。また、これらの弱いエストロゲン作用は *in vitro* で示されたのみであり、90 日間反復経皮投与試験における生殖器官への、周産期／出生後毒性試験における子宮内曝露された出生仔の生殖能への影響は、みとめられなかった。