

**European Union**  
**Risk Assessment Report**  
**3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA)**  
**CAS No: 95-76-1**  
3rd Priority List, Volume: 65, 2006

**EU**  
**リスク評価書 (Volume 65, 2006)**  
**3,4-ジクロロアニリン (3,4-DCA)**

**European Union**  
**Risk Assessment Report**

CAS: 95-76-1 EINECS: 202-448-4

**3,4-dichloroaniline (3,4-DCA)**

**European Chemicals Bureau**  
Institute for Health and Consumer Protection  
Existing Substances

**European Union Risk Assessment Report**  
3,4-dichloroaniline (3,4-DCA)

CAS: 95-76-1  
EC: 202-448-4  
PL-3  
**65**

**3<sup>rd</sup> Priority List**  
Volume: **65**

**EUROPEAN COMMISSION**  
DIRECTORATE-GENERAL  
Joint Research Centre

EUR 22235 EN

Nc1ccc(Cl)c(Cl)c1

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部  
2008年3月

本部分翻訳文書は、3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA, CAS No: 95-76-1)に関する EU Risk Assessment Report (Vol. 65, 2006)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(濃度)- 反応(影響)評価」を翻訳したものである。原文（評価書全文）は、  
[http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK\\_ASSESSMENT/REPORT/34dichloroaniline\\_DCAREport048.pdf](http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/34dichloroaniline_DCAREport048.pdf)  
を参照ください。

#### 4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量(濃度)－反応(影響)評価

##### 4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝および分布

###### 作用機序

3,4-ジクロロアニリン (3,4-DCA) ならびにその2,4-および2,5-異性体（それぞれ2,4-DCA および2,5-DCA）は、メトヘモグロビン生成物質である。メトヘモグロビン生成は、中間体として形成されるヒドロキシル化合物による (Lenk and Sterzl, 1984, McMillan et al., 1991, Singleton and Murphy, 1973)。

*In vitro*では、ラットおよびウシの赤血球において、*N*-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリンのメトヘモグロビン生成作用は高く、6-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリンの作用はそれより低かった。また、こうしたヒドロキシル誘導体は、3,4-DCAの代謝産物であった (Lenk and Sterzl, 1984, McMillan et al., 1990)。

###### 吸収

<sup>14</sup>C-3,4-DCAを用いた排泄試験 (Worobey and Shields, 1991) によると、本物質は消化管で吸収されると考えられる。ラットに経口投与した放射活性（動物当たり5.04 μgの<sup>14</sup>C-3,4-DCA）の約80%が、投与後24時間以内に尿中に排泄された。

3,4-DCAの吸収に関する定量的試験はこれ以外にない。ジクロロアニリン類が皮膚および肺から吸収されることは、ジクロロアニリン類がもつ急性の全身作用、特にメトヘモグロビン生成に関する研究から結論づけられる。

###### 組織内分布

<sup>14</sup>C-3,4-DCAをラットに経口投与（動物当たり5.04 μg、動物体重当たりの投与量不明）後72時間では、肝臓、腎臓、筋肉および血液には投与量の1%以下が、副腎、甲状腺および脾臓には0.1%以下が含まれていた。<sup>14</sup>C含量データから、生体内蓄積はないと考えられる

(Worobey and Shields, 1991)。

ラット、マウス、モルモットの試験から、急性腹腔内投与 (296 mg/kg) 後30～60分で、肝臓および血漿における3,4-DCA濃度は最大となり、このときのメトヘモグロビン生成濃度は、それぞれ75%、55%、32%であった (追加情報なし、Chow and Murphy, 1975)。

### 生体内変換

2,4-、2,5-および3,4-DCAの生体内変換に関する*in vivo*研究は1つしかない。ウサギにジクロロアニリンを給餌摂取させた後、オルトもしくはパラ位に配向したヒドロキシル化合物が尿中に認められた。

2,4-DCAの代謝産物として、6-ヒドロキシ-2,4-ジクロロアニリンが検出されたが、3,4-DCAの代謝産物を2-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリンもしくは6-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリンであるとは断定できなかった。定量データを含む他のデータは、この研究から得られていない (Bray et al., 1957)。

*In vitro*研究において、3,4-DCAの代謝産物として、環上ヒドロキシル体 (2-および6-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリン)、*N*-ヒドロキシル体 (*N*-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリン) ならびに*N*-アシル体(*N*-(3,4-ジクロロフェニル)アセトアミドおよび*N*-(3,4-ジクロロフェニル)ホルムアミド) が検出された (Lenk and Sterzl, 1978 and 1984, McMillan et al., 1990)。

雌ラットに、81 mg (0.5 mmol) /kgの3,4-DCAを経口投与した24時間後に、ヘモグロビン付加体が認められた。そのヘモグロビン結合指数 (mmol/mol Hb/投与量 (mmol/kg)) は9であった (Birner and Neumann, 1988)。アニリン、3-クロロアニリン、4-クロロアニリンのヘモグロビン結合指数は、それぞれ22、12、569であった (Sabbioni and Neumann, 1990, Birner and Neumann, 1987)。2,4-および2,5-異性体に関しては、検討されなかった。

### 排泄

ラットに経口投与された<sup>14</sup>C-3,4-DCA (動物当たり5.04 μg) は、尿中に81%、糞中に26%が排泄された。その大半は投与後24時間以内に排泄され、投与3日後には完全に排泄された (Worobey and Shields, 1991)。

### 参考とした類似構造物質

2,4-もしくは2,5-DCAといった他のジクロロアニリン異性体、および2-、3-もしくは4-クロロアニリンといったモノクロロアニリン化合物を、程度はさまざまであったが、3,4-DCAの有害性評価対象とみなした。

#### 4-クロロアニリン

4-クロロアニリンの主要代謝産物は、4-クロロアセトアニリンおよび2-アミノ-5-クロロフェニル硫酸塩である。<sup>14</sup>Cで標識した4-クロロアニリンの投与1時間後に、血漿中の放射活性は最大となり、24時間以内には赤血球中にもみられた (Ehlhardt and Howbert, 1991)。マウス、ラットおよびサルの尿中には、24時間以内に4-クロロアニリンおよびその代謝産物として、それぞれ放射活性の80、81~87および55%が排泄されたが、糞中にはそれぞれ5.2、8.3、1.2%が4日以内に排泄された。尿中主要代謝産物は2-アミノ-5-クロロフェニル硫酸塩で、その割合は49% (マウス)、54% (ラット)、36% (サル) であった。24時間の尿中総排泄率はマウスで80%、ラットで88%、サルで56%であり、4日後の総排泄率 (尿中および糞中) はそれぞれ91%、101%および82%であった (Ehlhardt and Howbert, 1991)。4-クロロアニリンは、10分以内および3~4時間の2相性の半減期で組織から排泄される (Perry et al., 1981、NTP, 1989)。ヒトでは、4-クロロアニリンは主に尿中に排泄される。また、急性中毒の場合には、抱合型4-クロロアニリンおよび抱合型6-ヒドロキシ-3-クロロアニリン (2-アミノ-5-クロロフェノール) も、尿中主要代謝産物として認められる (Yoshida et al., 1991, 1992a,b)。

4-クロロアニリンは、*in vitro*でラット肝ミクロソームによりN-ヒドロキシル化され、4-クロロフェニルヒドロキシアミンとなり (Ping Pan et al., 1979)、ウサギ肝ミクロソームにより少量が4-アミノフェノールとなる (Daly et al., 1968、Ichikawa et al., 1969)。

フェノバルビタールで誘導したウサギ肝ミクロソームにより、4-クロロアニリンがヒドロキシル化され、4-クロロフェニルヒドロキシアミンおよび2-ヒドロキシ-4-クロロアニリンが生成された (Lenk and Sterzl, 1981, 1984)。

#### 2-クロロアニリン

2-クロロアニリンの経口投与24時間後、雌ウサギの加水分解尿中に認められた代謝産物は、4-ヒドロキシ-2-クロロアニリン (4-アミノ-3-クロロフェノール) および微量の6-ヒドロキシ-2-クロロアニリン (2-アミノ-3-クロロフェノール) であった (追加情報なし、Bray et al., 1956)。したがって、3-クロロアニリンの場合のように、環上ヒドロキシル化がウサギにおいて優性な第一相代謝反応である。

白色ウサギの肝、腎および肺ミクロソームならびにウシの副腎ミクロソームを用いた *in vitro* 研究において、2-クロロアニリンは主に肝ミクロソームでヒドロキシル化され、腎および肺ではその割合が少なく、副腎では起こらないことが示された (Ichikawa et al., 1969)。

#### 3-クロロアニリン

3-クロロアニリンの主要代謝産物は、4-ヒドロキシ-3-クロロアニリン (4-アミノ-2-クロロフェノール) 誘導体、および少量ではあるが2-ヒドロキシ-5-クロロアニリン (2-アミノ-4-

クロロフェノール) 誘導体であった。1-ヒドロキシ-2-クロロアニリン (2-アミノ-6-クロロフェノール) 誘導体は、極微量が認められた。しかし、*N*-ヒドロキシル化合物は認められなかった。加水分解後、3-クロロアニリン投与量の39~50%が、4-ヒドロキシ-3-クロロアニリン (4-アミノ-2-クロロフェノール) として、また16~25%が2-ヒドロキシ-5-クロロアニリン (2-アミノ-4-クロロフェノール) として尿中に認められた (Böhme and Grunow, 1969)。

*In vitro*では、ラット肝細胞の3-クロロアニリンとの2時間培養後に、少量の抱合型3-クロロ-4-ヒドロキシアセトアニリンおよび4-アミノフェニル硫酸エステルが認められた (追加情報なし、Alary et al., 1986)。

*In vivo*では、環上ヒドロキシル誘導体のみが、ジクロロアニリン類の代謝産物として認められている。2-および3-クロロアニリンも同様であるが、4-クロロアニリンでは*N*-アセチル化代謝産物が生成される。3-クロロアニリン、4-クロロアニリンおよび3,4-DCAの排泄率は同程度であり、ラット尿中ではそれぞれ45~75%、88%および81%であった。

#### まとめ

3,4-DCAは消化管から吸収されることを示すデータは入手可能だが、皮膚および肺からの吸収についての動態研究はまだ実施されていない。しかし、観察された毒性作用の観点から、3,4-DCAも皮膚および肺から吸収されていると考えられる。*In vivo*では、3,4-DCAのヒドロキシル化により、オルトおよびパラ位に配向したヒドロキシル化合物が生成され、さらに、*N*-ヒドロキシル化も*in vitro*で認められた。ラットでは、経口投与された3,4-DCAは完全に排泄され、その大半が尿から、少量が糞から排泄された。したがって、生体内蓄積の懸念はない。

#### **4.1.2.2 急性毒性**

##### 動物試験

他のクロロアニリン類と同様、3,4-DCAの主要毒性作用はメトヘモグロビンの生成である。急性中毒症状は、メトヘモグロビン血症 (チアノーゼ)、疲労、呼吸困難および筋力低下である。

ラットへの経口投与により、3,4-DCAには中程度の急性毒性が認められた。経口LD<sub>50</sub>値は、雄ラットで570 mg/kg (Bayer AG, 1981a) および880 mg/kg (Marty and Wepierre, 1979)、雌ラットで530 mg/kg (Marty and Wepierre, 1979) であった。下痢、チアノーゼ、昏睡、反射低下、四肢の麻痺が観察されたが、剖検による肉眼的病変はみられなかった。

経口LD<sub>50</sub>値570 mg/kgは、「純品」の3,4-DCAを用いた雄ラットの試験から算出されたが、本試験はOECDガイドライン401 (媒体にルトロールを用い用量当たり雄10例使用、投与回

数の情報なし) に準じて実施された。結果：300 mg/kgでは、死亡および臨床症状はみられなかった。投与量500～800 mg/kgでの臨床症状は、下痢、後肢の麻痺、臥床、チアノーゼ、昏睡、反射低下、眼および鼻周辺の発赤であった。こうした症状は、本物質投与15分後に現れ、試験終了(14日後)まで継続した。2～3日目で死亡がみられ、剖検による肉眼的病変は記録されていなかった(Bayer AG, 1981a、非公開報告)。

雄ラットの経口LD<sub>50</sub>値880 mg/kgおよび雌ラットの530 mg/kgは、3,4-DCAを用いた試験で得られた(Marty and Wepierre, 1979)。用いられた方法、試験物質の純度および毒性学的所見に関するデータは記載されていない。マウスを用いた同様の試験で、雄マウスで510 mg/kgおよび雌マウスで470 mg/kgというLD<sub>50</sub>値が得られた(追加情報なし、Marty and Wepierre, 1979)。

純度99%以上の「工業用」3,4-DCAを用いた試験で、50および500 mg/kgが6例の雄ラットに投与された(媒体は0.5%メチルセルロース水溶液)。死亡はみられず、臨床症状として嗜眠、運動失調、冷触感、皮膚の淡色化、眼周辺の発赤、正向反射および角膜反射の喪失、浅速呼吸がみられた。剖検による肉眼的病変はみられなかった(Rohm and Haas, 1978、非公開報告)。

ラットに対する3,4-DCAの急性吸入毒性は、中程度であった。

エアロゾル暴露によるLC<sub>50</sub>値は、最高試験濃度の0.631 mg/L/4時間よりも高かった。このエアロゾルは、本試験物質を媒体(エチルアルコール：ポリエチレングリコール=1：1)に溶解させ、本溶液を暴露チャンバー内に噴霧して発生させた(死亡はみられず、運動性低下および徐呼吸といった不特定症状のみがみられ、剖検による肉眼的変化はみられなかった。Bayer AG, 1990a)。ガス/エアロゾル環境(中央粒子径1.89 μm、幾何標準偏差1.52、粒径5 μm以下の質量含有率99%)への暴露により、2.8～4.7 mg/L/4時間の濃度範囲で、死亡率は4/10～10/10例であった。これに対応するLC<sub>50</sub>値は3.3 mg/L/4時間であった(0.047～2.2 mg/Lでは死亡なし)。この試験用空気は、140～205℃に熱した炉の中のチューブに、溶解した3,4-DCAを注入して発生させた。気化した試験物質を、窒素を用いて暴露チャンバー内へ送風した。臨床観察：暴露中もしくは暴露直後に、ほとんどの群のラットで鼻と眼の赤色分泌物がみられ、鼻触毛上に結晶化した試験物質が付着していた。0.84、2.2および2.8(50%が粒子) mg/L群のラットは、嗜眠性および跛行を示し、よろめき歩行をしていた。上から4つの暴露濃度では、死亡例がみられた。すべての死亡例は、暴露中もしくは暴露後1～2日に認められた。メトヘモグロビン分析：メトヘモグロビン値が約28%のラットは生存したが、47～62%では死亡した。暴露終了24時間後においても、メトヘモグロビン値はさらに上昇し続けていた。メトヘモグロビンの平均%は、およそ暴露9日後にベースラインに戻った(Du Pont de Nemours, 1984)。

気化した3,4-DCA(純度98.8%)を用いた別の試験では、およそ30gの3,4-DCAを、フラスコ中で160℃まで熱した。速度を制御しつつ、キャリアガスとして窒素を溶解物質に直接吹

き込み、そのガスを空気で希釈した。チャンバー内の環境は、約20%の酸素濃度を維持した。各群6例のラットに、3,4-DCAを32、39、50、65、70、101および253 mg/m<sup>3</sup>の濃度で4時間暴露した。

2/6例のラットが、0.065 mg/L/4時間の暴露で死亡した。より高濃度の0.070、0.101もしくは0.253 mg/L/4時間では、すべてのラットが5日以内に死亡した。臨床観察：流涎、頻呼吸および浅速呼吸、運動失調、赤色分泌物を伴う水晶体混濁、虚脱、チアノーゼ、音への無反応がみられた。暴露期間全体を通じて、試験物質は遮蔽物および暴露チャンバーの壁面上に昇華していた。本実験条件下では、概略致死濃度（ALC）は0.065 mg/L/4時間であった（Du Pont de Nemours, 1976a）。後に本試験は、試験計画や試験用空気の生成に関し、同じ試験施設から批判された（Du Pont de Nemours, 1976a res. 1983）。このため、試験結果は極めて疑問で、有効な試験とは認められない。

急性経皮毒性は、種差のあることが判明した。ラットでは、1,000 mg/kgの経皮投与による死亡や毒性症状はみられなかった（Rohm and Haas Company, 1978, Bayer AG, 1981b）。雄のウサギでは、300 mg/kg以上で死亡がみられた。体重2～3 kgの雄白色ウサギの胴部を剃毛し、プラスチックの留輪を装着した。アセトンに50%（重量/体積）濃度で溶解させた試験物質を背部に塗布し、エラスティック（伸縮性素材）をガーゼ付絆創膏でラップした。24時間後、ウサギのラップを外し、洗浄後、14日間観察した。投与量は、アセトンを媒体とし130、200、300、450、670、1,000および1,500 mg/kgであった（用量当たり1例使用）。臨床症状：18時間時点で、すべてのウサギがチアノーゼ、流涎、流涙、虚脱を示し、24時間時点では、450 mg/kg以上の動物にチアノーゼおよび運動失調が観察された。塗布24時間後、すべてのウサギの皮膚に軽微な紅斑と腫脹がみられた。2日目以降に臨床症状はみられず、14日目時点では座瘡もなかった。300 mg/kg以上では死亡がみられた。剖検：300 mg/kg以上で腎臓および肝臓障害が、また1,500 mg/kgで肺および肝の鬱血がみられた（Du Pont de Nemours, 1976b）。ウサギの別の試験では、400～2,500 mg/kgが試験され、1,000および2,500 mg/kgで死亡がみられた。このため、本試験条件下における経皮LD<sub>50</sub>は、631～1,000 mg/kgと考えられた（Younger Labs, 1974）。

## ヒト知見

データなし

## メトヘモグロビン生成のメカニズム

ヘモグロビンは鉄を含んだ四量体タンパク質で、グロビン鎖4本と第一鉄を備えた同一のヘム基4つで構成される。各ヘムは、酸素分子と自身が配位する第一鉄とを可逆的に結合可能である。鉄は第一鉄から第二鉄へと酸化され、いわゆるメトヘモグロビンが生成される。その結果として、ヘモグロビンは酸素と可逆的に結合するという性質を失う。

急性毒性の観点から、アリルアミンによる*in vivo*でのメトヘモグロビンは、投与化合物そのものの影響により生成されることはほとんどないが、大半の場合、1種類以上の代謝産物により生成される。さまざまなクロロアニリン化合物が*in vivo*でメトヘモグロビンを生成できるのは、肝ミクロソームのチトクロームP450酵素による代謝活性化が根底にあり、その結果、反応性中間体としてヒドロキシル化合物が生成されるからである (Marquardt and Schäfer, 1994)。

ウサギに2,4-, 2,5-および3,4-DCAを投与すると、オルトもしくはパラ位に配向したヒドロキシル化合物が尿中に認められた。2,4-DCAの代謝産物として、6-ヒドロキシ-2,4-ジクロロアニリンが検出されたが、3,4-DCAの代謝産物を2-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリンもしくは6-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリンであると断定することはできなかった (Bray et al., 1957)。 *In vitro*では、3,4-DCAの代謝産物として、環上ヒドロキシル体 (2-および6-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリン)、*N*-ヒドロキシル体 (*N*-ヒドロキシ-3,4-ジクロロアニリン) ならびに*N*-アシル体(*N*-(3,4-ジクロロフェニル))アセトアミドおよび*N*-(3,4-ジクロロフェニル)ホルムアミド)が検出された (Lenk and Sterzl, 1978, 1984, McMillan et al., 1990)。

種差は、*in vitro*研究を中心に限られた数でしか調べられていない。種差の存在がこうした研究から明らかとなっているが、ヒトと動物種間の明確な比率を算出することは不可能である。これは、異なる物質の*in vivo*におけるメトヘモグロビン生成量は、個々の化学構造に加え、血液中での還元能力や種差といった別の要因 (主にNADH依存性還元酵素) に依存するからである (Blom, 2000)。

たとえば、3,4-DCAおよび4-クロロアニリンはどちらも同じような作用を示すが、メトヘモグロビン生成能だけでなく、初期ヘモグロビン酸化率や作用持続時間という点で明確に異なる。*In vivo*では、3,4-DCAのようにベンゼン環の3位にさらに塩素原子を付加することにより、ラットへの腹腔内投与後のメトヘモグロビン生成能は、4-クロロアニリンより50%以上も減少する (Lenk and Sterzl, 1982)。

赤血球を用いた種々の*in vitro*研究から、メトヘモグロビンの生成は大きく2群に分けられる。ラット/マウス/モルモット/サルは、メトヘモグロビン生成の影響を受けづらく、一般的には誘導されたメトヘモグロビンをヒト/イヌ/ネコよりも効果的に低減させることができる (Blom, 2000)。ネコはメトヘモグロビン生成の影響を最も受けやすく、これはヘモグロビンの種類が異なることが最大の原因である。

## その他の情報

### 免疫毒性

3,4-DCAにはNK (ナチュラルキラー) 細胞の働きに対する毒性作用があり、マウスに対して単回腹腔内投与後、T細胞依存性および非依存性のB細胞免疫応答に関する用量依存性

の免疫調節を誘導した(Barnett et al., 1992)。相対脾臓重量および脾臓細胞充実性が150 mg/kgで増加した。明確なT細胞の機能障害は認められなかった。

## 結論

ヒトに対する3,4-DCA暴露による急性毒性作用のデータはない。動物実験では、本物質の急性毒性はラット（経口および吸入暴露）において中程度であり、ウサギ（経皮暴露）においてはより顕著であった。雄ラットにおける経口LD<sub>50</sub>値570～880 mg/kg (Bayer AG, 1981a, Marty and Wepierre, 1979)、雌ラットにおける経口LD<sub>50</sub>値530 mg/kg (Marty and Wepierre, 1979) および雄ラットにおける吸入LC<sub>50</sub>値(蒸気) 3.3 mg/L/4時間 (du Pont de Nemours, 1984) が得られ、雄ウサギにおける経皮LD<sub>50</sub>値はおよそ300 mg/kg (du Pont de Nemours, 1976a) であった。雄ラットにおける急性経口試験では、下痢、後肢の麻痺、チアノーゼ、昏睡、反射低下といった臨床症状の大半が、本物質の投与当日に現れ、試験終了(14日後)まで続いた (Bayer AG, 1981a)。急性吸入毒性試験におけるメトヘモグロビン分析から、メトヘモグロビン値がおよそ28%のラットは生存したが、47～62%のラットは死亡した。回復(投与終了)の24時間後においても、暴露群のメトヘモグロビン値はさらに上昇し続けていた。メトヘモグロビンの平均頻度は、およそ暴露9日後にベースラインに戻った (du Pont de Nemours, 1984)。

他のクロロアニリン類と同様、3,4-DCAの主要毒性作用はメトヘモグロビンの生成である。ヒトはラットよりもメトヘモグロビン生成物質に対する感受性が強く (Lester, 1943)、ヒトへの毒性レベルを判断するのに適したネコの試験結果が利用できないことを考慮すると、3,4-DCAは「T、有毒」に分類され、「R 23/24/25 吸入、皮膚接触および飲み込むと有毒」というラベルで表示される。

### 4.1.2.3 刺激性

#### 動物試験

3,4-DCAを閉塞塗布すると、ウサギの皮膚に軽微な刺激性を示す。ドレイズ試験では、軽微な可逆性紅斑(グレード1で2日以内の可逆性)がみられたが、浮腫はみられなかった (Hoechst AG, 1986a)。眼の刺激性試験で、結膜および虹彩に中程度の刺激がみられ、これは14日以内に回復した(7日目に2/3例の動物に角膜内血管新生がみられ、14日目時点でも継続中、Rohm and Haas, 1978)。別の眼の刺激性試験では、結膜、虹彩および角膜でみられた影響は軽度であった(観察時間24、48、72時間での平均スコアは、結膜発赤で1.7/2/2、結膜浮腫で0.7/0.7/1.3、虹彩炎で1/0.7/0.3、角膜混濁で1.3/1/0、Hoechst AG, 1986b)。しかし、角膜内血管新生は1/3例の動物で観察され、これは塗布7日目以降に現れ、14日後でも継続していた。

角膜内血管新生は眼に重大な障害を与えられている。これは、「角膜の透明性

は、酸性ムコ多糖環境、血管がない状態、角膜組織の相対的な脱水状態における細胞の特殊な配列ならびにコラーゲンの原繊維に依存しており、こうした要因のいずれかに毒物が介在した場合、角膜汚濁となる可能性がある」からである (Wallace Hayes, 1985)。

3,4-ジクロロアニリンの呼吸器刺激性のデータはない。

#### ヒト知見

これまでに報告された工業用3,4-DCAの暴露後にみられた塩素座瘡の症例は、旧来の工業用3,4-DCA中に不純物として存在していた3,3',4,4'-テトラクロロアゾベンゼンおよび3,3',4,4'-テトラクロロアゾキシベンゼンがもつ角質増殖および座瘡形成作用が原因である。こうした不純物をほとんど含まない3,4-DCAが導入されて以来、ドイツで塩素座瘡の症例は発生していない (Nach. Chem-Tech., 1976、Taylor, 1979、Taylor and Lloyd, 1982、Morse et al., 1979、Poland et al., 1976、Scarbrick and Martin, 1981)。

#### 結論

3,4-DCAによるヒトの局所刺激性/腐食性に関するデータはない。ウサギにおけるドレイズ試験によると、本物質の皮膚への刺激は軽微であるものの (浮腫なし、紅斑はグレード1で2日以内に回復、Hoechst AG, 1986a)、眼には重大な損傷を引き起こす。詳細に記録された眼のドレイズ試験 (Hoechst AG, 1986b) の結果は、動物当たり24/48/72時間後で、結膜発赤1.7/2/2、結膜浮腫0.7/0.7/1.3、虹彩炎1/0.7/0.3、角膜混濁1.3/1/0であった。塗布7日後に角膜内血管新生がみられたが、その可逆性に関するデータは記録されていなかった。同様の角膜内血管新生は別の試験においても2/3例のウサギにみられ、これは14日目時点でも継続していた (Rohm and Haas, 1978)。ウサギにおける眼のドレイズ試験2つで角膜内血管新生がみられ、Hoechst AGが1986年に行った研究のまとめでは、EUリスク警句R41への分類が本試験の観察から妥当であると述べられている。このため、こうしたデータに基づき、3,4-DCAは「Xi、刺激性」に分類され、「R41、眼に重大な損傷のリスク」というラベルで表示される。

#### **4.1.2.4 腐食性**

##### 動物試験

3,4-DCAは、ウサギの皮膚もしくは眼に腐食性を示さない (セクション4.1.2.3を参照)。

##### ヒト知見

データなし

#### 4.1.2.5 感作性

##### 動物試験

モルモットのMaximization試験で、3,4-DCAは皮膚に感作性を示した。Magnusson Kligman試験では、最大75%のモルモットが陽性反応を示した（Bayer AG, 1990b）。20例の試験動物と10例の対照動物を用いた。試験動物には2.5%濃度が皮内投与および50%濃度が局所塗布された。1回目の感作は50%で行ない、2回目は5%および25%で実施した（媒体はプロピレングリコール）。対照動物は皮膚反応を示したが、試験動物でみられた皮膚反応の頻度および強度から感作性が示され、試験動物の75%（15/20例）が陽性反応を示した（Bayer AG, 1990b）。

##### ヒト知見

皮膚もしくは吸入の感作性に関するデータはない。

##### 結論

吸入もしくは皮膚接触による感作性に関するヒトデータはないが、動物データが1つ存在する。Magnusson Kligman試験では、最大75%の試験動物が陽性反応を示した（Bayer AG, 1990）。この結果から、3,4-DCAは「R43、皮膚接触による感作性のおそれあり」というラベルで表示される。

#### 4.1.2.6 反復投与毒性

##### 動物試験

3,4-DCAに関しては、信頼性の低いデータがわずかに報告されているだけである。EU既存化学物質プログラムの最低要件に沿った全暴露経路による反復投与毒性試験が実施されているわけではない。構造的に類似したクロロアニリン化合物の追加データを、規則793/93に従い亜急性毒性の必要データに加えることが調査委員会に承認された。類似の物理化学的性質をもつこうした芳香族アミノ化合物は、3,4-DCAと同様のトキシコキネティクスを示す（セクション4.1.2.1を参照）。こうした化合物を用いた試験の一部は、現行の標準的方法およびガイドラインに準拠していなかったが、結果は同じ主要毒性作用を示した。すなわち、溶血性貧血ならびに骨髄、脾臓、肝臓および腎臓での赤血球生成系における代償性反応を伴ったメトヘモグロビン血症である。当然のことながら、対応する毒性学的データの解釈においては、作用の程度に関し、動物種、使用化学物質および投与量の各特異性を考慮した。

### 3,4-ジクロロアニリン

#### 吸入

3,4-DCA（純度99.35%）を0、10、45もしくは200 mg/m<sup>3</sup>の蒸気および固体粒子含有試験用空気中、Crl:CD BR雄ラットに2週間暴露した（鼻部暴露、6時間/日、5日/週、Kinney, 1986）。群当たり20例のラット中10例を毒性作用の評価に用い、その中の5例を10回目の暴露後に屠殺し、残り5例を暴露後14日間の回復用に割り当てた。測定項目には、暴露9回後の尿検査、投与10日目および回復14日目の血液学的検査および血液生化学的検査、6臓器の重量測定、28臓器/組織の組織病理学的検査を含めた。残りの群当たり10例は、半数ずつ日替わりで、メトヘモグロビン濃度を測定した。これらのラットでは、反復採血による交絡影響の可能性があるため、その他のデータは取られていない。採血直後のメトヘモグロビン分析の測定時点は重要であるが（Beutler et al., 1995）、本試験では報告されていない。

投与終了時、すべての暴露ラットで用量依存的なメトヘモグロビン血症、中および高用量ラットの脾臓における用量依存的なヘモジデリン沈着の発生率増加（高用量ラットで5/5例、中用量で2/4例）、貧血、脾臓重量の有意な増加（絶対重量および体重相対重量）、高用量ラットでの軽度な骨髄外造血がみられた。貧血は、暴露10回後の有意な赤血球数の減少（200 mg/m<sup>3</sup>で-17%）、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリットの減少、血小板数の増加、平均赤血球容積（MCV）、MCH（平均赤血球ヘモグロビン量）、MCHC（平均赤血球ヘモグロビン濃度）の増加から明確であった。平均メトヘモグロビン濃度は、高用量群で12.2%（最低10.0%～最高18.4%、投与のない週末の値は除く）、中用量群で1.6%（最低1.0%～最高2.1%）であった。低用量群では、0.8%（最低0.7%～最高1.1%）という有意なメトヘモグロビン濃度の上昇がみられた。これらは正常値の範囲内であるが、対照（平均メトヘモグロビン濃度0.3%、最低0.2%～最高0.5%）の約2.5倍に相当した。投与期間終了時、10 mg/m<sup>3</sup>（低用量）群では投与に関連したその他の変化はみられなかった。

10もしくは45 mg/m<sup>3</sup>の3,4-DCAを暴露したラットでは、有意な臨床症状もしくは体重変化は観察されなかった。200 mg/m<sup>3</sup>では、1回目および6回目の暴露後に対照と比べて有意な体重減少を示した。暴露期間全体を通じて、200 mg/m<sup>3</sup>群のラットの体重は対照よりも概して軽かった。さまざまな非特異的臨床症状（鼻および眼の乾燥赤色分泌物の発現低下、被毛の茶色化、会陰部の着色、脱毛）が、暴露期間中に観察された（主に投与1週目）。

回復期間中も、200 mg/m<sup>3</sup>群のラットの体重は他群よりも軽かった（有意ではない）。ヘモジデリン沈着症は、回復14日後においても中および高用量群でみられ、10回目の暴露後よりも顕著で頻発していた。すべてのラットが影響を受けており、重篤度は高用量では軽度で、中用量では最小であった。血球パラメータのいくつかは（赤血球数の減少（-9.5%）、MCVの増加）、200 mg/m<sup>3</sup>で変化がみられたままであった。低および中用量群の赤血球数（-7.2%および-7.4%）は、回復後の対照群よりも有意に少なかった。低用量のメトヘモグロビン濃度は、暴露終了3日後に対照群の範囲内に回復したが、中および高用量群のメトヘ

ヘモグロビン濃度は、回復期間中も有意に増加したままであった。組織病理学的検査では、肺、気管および鼻に有害影響はみられなかった。

本試験では、全身作用に対するNOAEC（無毒性濃度）は得られなかったが、気道の局所作用に対するNOAECは200 mg/m<sup>3</sup>であった。投与終了時における全身毒性作用に関し、ヘモグロビン沈着症および正常域より高いメトヘモグロビン濃度を誘発するのに有効な3,4-DCA濃度は45 mg/m<sup>3</sup>であった。しかし、この濃度は、低および中用量群の赤血球数が回復期間中に減少したため、LOAEC（最小毒性濃度）とはみなされていない。これら赤血球数の減少は軽度の貧血を意味するだけであるが、回復期間後の対照群よりも有意に低かった。対照群に比べ低用量群のメトヘモグロビン濃度が有意に増加したこと、増加したメトヘモグロビン濃度が回復期間3日後以降に回復したこと、ならびに回復期間中に赤血球への影響が遅れて発現したことにより、LOAECは10 mg/m<sup>3</sup>とされる。

- 信頼性の低い試験で、3,4-DCAを0.015、0.03および0.08 mg/m<sup>3</sup>の濃度でラット（15～18例/群、性および系統情報なし）に最大100日間反復吸入投与したところ、投与40日後以降に可逆性の神経機能障害（0.03 mg/m<sup>3</sup>以上）、ならびにヘモグロビンの減少（0.08 mg/m<sup>3</sup>、最大減少は暴露55日の-20%）およびスルフヘモグロビン濃度の増加（0.08mg/m<sup>3</sup>）がみられた（Andreeshcheva, 1970、その他の情報なし）。

#### 皮膚

- 雄ウサギ（10例/群）における皮膚吸収の亜急性試験では、背部皮膚に3,4-DCA（99.9%、10%アセトン溶液、1.6 mL）を60 mg/kgの用量で1日6時間10日連続で塗布したところ、貧血とメトヘモグロビン濃度の増加がみられた（Du Pont de Nemours, 1976c）。媒体対照群の動物にはアセトン（100%、5mL）のみを塗布した。各群5例は塗布後1日目に、残りの5例は塗布後13日目に剖検した。試験開始前、塗布後5日目および10日目に各ウサギから採血した。測定項目は、WBC（白血球）数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、メトヘモグロビン、ALAT（アラニンアミノ転移酵素）活性であった。臨床症状および肉眼剖検所見は報告されたが、組織病理学的検査は実施されなかった。

3,4-DCAを投与したウサギの脾臓において、投与後1日目に著しい影響がみられた。3,4-DCA投与群のウサギ5例すべてにおいて、暗褐色の脾臓が観察され、その中の2例の脾臓は大きく腫脹し、重くなっていた。投与されたすべてのウサギに、肥厚、痂皮形成、壊死といった皮膚に対する中程度の影響がみられた。同程度の皮膚への影響が、投与終了時および回復後のアセトン群でみられた。アセトン群では、皮膚に対するこれ以外の影響は観察されなかった。3,4-DCAの投与5日および10日後の平均赤血球数、ヘモグロビンおよびヘマトクリットは、投与前の値より低く、また対照群の値よりも低かった。投与後5日目および10日目には、メトヘモグロビンの増加が観察された。

**Table 4.8** 3,4-dichloroaniline effects after repeated dermal exposure to male rabbits

Parameter	Test compound	Day 0	Day 5	Day 10
Erythrocytes*	Acetone	5.95**	5.84	5.74
	3,4-DCA	5.47	4.46	3.43
Hematocrit (%)	Acetone	39	41	39
	3,4- DCA	38	33	35
Haemoglobin (%)	Acetone	12.4	12.2	12.0
	3,4- DCA	11.6	9.6	9.2
Methaemoglobin (%)	Acetone	0.3	0	1.0
	3,4- DCA	0.9	9.5	5.9

\*  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ,

\*\* mean values of 10 animals, 3,4-DCA 3,4-dichloroaniline

回復後13日目に、3,4-DCAを暴露した回復群のすべてのウサギが皮膚の肥厚を示し、その一部では乾燥皮膚および痂皮形成がみられた。こうした影響は、アセトン投与された回復群と同程度であった。3,4-DCAを投与された回復群でも脾臓が腫脹し、重くなっていたが、これは媒体（アセトン）群ではみられなかった。

#### 4.1.2.6.1 構造的類似物質のデータ

#### 2.5-ジクロロアニリン

Wistarラットに、2,5-DCAの30、150および750 mg/kgを28日間経口投与した結果、150 mg/kg/日以上において、髄内および髄外造血の増加を伴う溶血性貧血ならびにヘモジデリン沈着がみられた (Hoechst AG, 1989)。早い段階での死亡はみられなかった。高用量群では、非特異的臨床症状（自発運動の低下、猫背姿勢、脇腹の陥没）、呼吸困難、非協調運動、振戦および流涎がみられた。本用量では摂水量が雌雄で増加し、雄では成長遅延がみられた。高用量の雌雄で、茶黄色尿がみられた。750 mg/kg群では、血液検査において赤血球数の減少、ヘモグロビン濃度の減少および網赤血球数の増加がみられた。雌の中および高用量群で、平均全ビリルビン濃度が用量に依存して増加した。雌雄の高用量群で、脾臓の相対重量が増加した。中および高用量群で、骨髄の造血が増加し、ヘモジデリン沈着症が脾臓でみられた。さらに高用量群の脾臓で髄外造血がみられた。本試験におけるNOAELは、30 mg/kg/日であった。

メトヘモグロビン生成は、いずれの群でもみられなかった。ただし、本試験におけるすべてのメトヘモグロビン濃度は、全用量群および対照群において、0 g/Lと見積もられていた。無処置動物のメトヘモグロビン濃度は最大1~2%と予想されるため、方法論的な問題に起因する偽陰性が疑われている。このため、本項目は影響評価には加えなかった。

## 2-クロロアニリン

OECDガイドライン412に準拠した4週間吸入試験で、雌雄各10例のWistarラットに、頭部暴露チャンバーで39、217および886 mg/m<sup>3</sup>の2-クロロアニリン蒸気（分析濃度として7、41および169 ppmに相当）を、6時間/日の5日/週で暴露した（Bayer AG, 1992b）。臨床症状は、雌の中および高濃度群でチアノーゼと振戦、雄の高濃度群でチアノーゼであった。高濃度群の雌2例に、虚脱、よろめき歩行ならびに驚愕反射および筋平衡反射の低下がみられた。対照群と比べ、平均体重の増加は高濃度群の雄で低かった。暴露群すべての雌ならびに中および高濃度群の雄で、用量に依存したRBC（赤血球）、ヘモグロビンおよびヘマトクリットの低下ならびに多数のハイツ小体と網赤血球が観察された。高濃度群では、平均赤血球容積が増加し、平均赤血球ヘモグロビン濃度が対照群よりも低かった。雌雄の高濃度群でメトヘモグロビン生成が増加し、雄の中濃度群ならびに雌の中および高濃度群で、最小ながら有意差はないメトヘモグロビン生成の増加がみられた（測定時点の情報なし）。雌雄の中および高濃度群で、全ビリルビンの平均血漿濃度が高かった。暴露群の雌では、マグネシウムの高値、トリグリセリドの低値、血清コリンエステラーゼ活性の低値（高濃度群）および用量依存的なコレステロール値の低下（全濃度群）がみられた。O-デメチラーゼおよびN-デメチラーゼのモノオキシゲナーゼ活性は、対照群と比べて雌の高濃度群で高かった。この群の尿検査では、タンパク質およびビリルビンが多く排泄され、pH値が上昇していた。投与終了後、中および高濃度群の脾臓は赤黒く変色していた。脾臓の相対および絶対重量の用量依存的増加が、すべての雄ならびに中および高濃度群の雌でみられた。肝臓の相対重量は、対照群よりも高濃度群の雌雄で高かった。脾臓における肉眼変化に応じて、雄の中および高濃度群ならびに雌の全濃度群で、ヘモジデリン沈着症の平均重症度が増した。雌雄の中および高濃度群で、脾臓の鬱血がより頻発した。赤血球造血の成熟段階における細胞数の増加（赤芽球、大赤芽球）が、雌雄の全濃度群における骨髓の塗抹標本でみられ、リンパ球数は雌雄の高濃度群で減少した。本試験から全身毒性に関するNOAECは得られなかったが、LOAECは39 mg/m<sup>3</sup>であった。気道の局所作用に対するNOAECは886 mg/m<sup>3</sup>であった。

F344ラットおよびB6C3F1マウス（各群雌雄10例）による13週間の亜慢性投与試験では、2-クロロアニリンを0、10、20、40、80および160 mg/kg/日で投与した（Eastin, 1992）。40 mg/kg以上のラットおよび160 mg/kgのマウスで、投与による一過性チアノーゼ（ラットのみ）および振戦がみられた。投与量に応じたメトヘモグロビン血症が、試験終了時にすべての（ラット）群でみられた（マウスにおけるメトヘモグロビン生成の検討については情報なし）。貧血およびハイツ小体が、高用量群でみられた（ラットおよび/またはマウス?）。ラットおよびマウスにおける80 mg/kg以上の高用量群で、脾臓が暗赤色となり、腫脹した。ラットおよびマウスの40 mg/kg（雄のみ）、80および160 mg/kg群で、対照群よりも脾臓重量が増加した。顕微鏡検査では、脾臓での造血亢進（80 mg/kg以上）、骨髓での赤血球系細胞の過形成（80 mg/kg以上のラット）および腎皮質でのヘモジデリン沈着症（高用量のラット）がみられた。本試験から2-クロロアニリンのNOAELは得られなかったが、ラットのLOAELは10 mg/kg/日であった。マウスに対する有害影響量は、抄録のみのため求められなかった。

### 3-クロロアニリン

3-クロロアニリンの13週間亜慢性経口投与試験(抄録のみ、Eastin, 1993)も、Eastin (1992)による2-クロロアニリンの試験で報告されたものと同様の試験計画および投与量で実施された。80 mg/kg以上のラットおよび高用量群のマウスで、一過性チアノーゼ(ラットのみ)ならびに振戦および運動失調(マウスのみ)がみられた。メトヘモグロビンの用量依存的な増加が、追加のラット(臨床病理用)での3回目の投与後にみられた。ハインツ小体の有意な増加が、40 mg/kg以上のラットおよび80 mg/kg以上のマウスでみられた。また、これらの用量群では、貧血および脾臓の腫脹を示す血液学的変化もみられた。ラットの全投与群およびマウスの40 mg/kg以上の群で、脾臓重量が増加した。顕微鏡検査では、脾臓での造血亢進(雄マウスで20 mg/kg以上、雌マウスおよび雌雄ラットで10 mg/kg)、骨髄での赤血球系細胞の過形成(ラットで40 mg/kg以上)、腎皮質での色素沈着(ヘモジデリン)(ラットで20 mg/kg以上)および肝臓での色素沈着(ラットで40 mg/kg以上)がみられた。NOAELは得られなかったが、ラットおよびマウスのLOAELは10 mg/kg/日であった。

### 4-クロロアニリン塩酸塩

4-クロロアニリン塩酸塩の亜慢性試験(NTP, 1989、Chabra et al., 1986)では、F344ラットに0、5、10、20、40および80 mg/kg/日を経口投与し、B6C3F1マウスには0、7.5、15、30、60および120 mg/kg/日を投与した(5日/週の13週間)(投与量は4-クロロアニリンとして算出)。雌の高用量ラット1例が試験終了前に原因不明で死亡し、早い段階でのマウスの死亡は試験物質と関係がなかった。ラットおよびマウスで、用量に依存した脾臓の腫脹がみられた。雄の高用量ラットの体重増加量は小さく、高用量ラットではチアノーゼがみられた。用量依存的なメトヘモグロビン血症および貧血の重症化が、ラットおよびマウスで観察された。全投与群のラットおよび30 mg/kg以上のマウスで、脾臓、腎臓および肝臓のヘモジデリン沈着が組織学的検査でみられた。全投与群でみられた骨髄での過形成(ラット)ならびに肝臓および脾臓での造血亢進(ラットおよびマウス)は、溶血性貧血およびメトヘモグロビン血症を原因とする酸素運搬能低下への適用応答と解釈された。組織学的検査を媒体対照群および高用量群に対して実施した。

4-クロロアニリン塩酸塩の0、25、50、100、200および400 mg/kg/日の16日間投与量設定試験において、200もしくは400 mg/kg群のラットおよびマウスが6日以内に死亡し、マウスは全投与群で死亡した。試験終了時、100 mg/kg群のラットの平均体重は低かった。化合物関連の臨床症状には、チアノーゼを示す青みがかった眼および四肢、200および400 mg/kgで嗜眠、25もしくは50 mg/kgで努力性呼吸がみられた。脾臓の腫脹は、25、50および100 mg/kgのラットで観察された。脾臓の洞様毛細血管における鬱血および腎臓皮質の上皮細胞におけるヘモジデリン沈着が、100 mg/kg群のラットで観察された。100 mg/kg群のマウスの肝臓では、クッパー細胞のヘモジデリン沈着および脾臓鬱血がみられた。ラットおよびマウスの16日間の両試験において、対照群および100 mg/kg群の雌雄各2例について、組織学的検査

を実施した。

上記結果に基づき、雌雄各50例のラットに、5日/週の103週間、塩酸水溶液に溶解した4-クロロアニリンを2、6もしくは18 mg/kgで経口投与した。雌雄各50匹例のマウスにも、同じスケジュールで3、10もしくは30 mg/kgを投与した。高用量群のラットとマウスにおける体重の増加は、媒体対照群と同程度であった。雄の低および中用量群ラットならびに雌の低および高用量群ラットの生存率は、対照群よりも高く、これは単核細胞白血病の発症率が低いことに起因していた。マウスの生存率は、雄の中用量群で減少した。

6、12、18および24ヶ月の時点で無作為に抽出した雌雄ラット各15匹例について、血液検査およびメトヘモグロビン測定を実施した。全体として、期間に関係なく高用量群では溶血性貧血がみられ、用量に依存してメトヘモグロビンが増加した。試験終了時、雌雄の中および高用量群で、再生性貧血およびメトヘモグロビン血症を示す赤血球パラメータの変化がみられた。

ラットの骨髄、脾臓および肝臓で、化合物に関連した非腫瘍性病変がみられた。この病変には、骨髄での過形成（雄の全投与群、雌の中および高用量群）、肝臓でのヘモジデリン沈着症（雄の高用量群）、脾臓線維症（雄の全投与群、雌の高用量群）および脾臓における脂肪細胞の浸潤（雌雄の高用量群）がみられた。

マウスでの投与に関連した非腫瘍性病変は、肝臓におけるクッパー細胞のヘモジデリン色素沈着（雌雄の高用量群）、肝臓における血液系細胞の増殖（雌の全投与群）、多巢性尿細管のヘモジデリン色素沈着（雌の高用量群）であった。毒性（非腫瘍性）作用に関して、NOAELは得られなかったが、LOAELはラットで2 mg/kg/日、マウスで7.5 mg/kg/日であった。

（血液生化学パラメータは、NTP（国家毒性計画）の試験では調査されなかったが、腫瘍形成はラットの高用量群およびマウスの全投与群でみられた。詳細な腫瘍データは報告されていない。NTP, 1989を参照）

4-クロロアニリンおよび3,4-DCAはともに同じような作用を示すが、メトヘモグロビン生成能という点だけでなく、初期ヘモグロビン酸化率や作用持続時間という点でも明確に異なる。*In vivo*では、3,4-DCAのようにベンゼン環の3位にさらに塩素原子が付加することにより、雌のSprague Dawleyラットへの腹腔内投与後のメトヘモグロビン生成能は、4-クロロアニリンより50%以上も減少する（Lenk and Sterzl, 1982）。

構造的類似物質（2,5-DCA、2-クロロアニリン、3-クロロアニリンおよび4-クロロアニリン（塩酸塩））のデータをまとめると、用量に依存した溶血性貧血および骨髄、脾臓、肝臓および腎臓の赤血球造血系における代償性反応を伴ったメトヘモグロビン血症など、3,4-DCAによる主要な影響と類似している。類似体に関する一部の研究では、現行の手法や

文書作成基準に完全には準拠していなかったが、肝毒性作用は全暴露経路で明白であった。

### In vitro 試験

ラットの肝および腎スライスを用いた*in vitro*試験 (Valentovic et al., 1995) では、3,4-DCA、2,5-DCAおよびその他のジクロロアニリン異性体で、乳酸脱水素酵素漏出が増加し、ピルビン酸による糖新生が減少した。腎スライスは肝スライスよりも感度が高かった。

### ヒト知見

信頼性の低い以下の報告（暴露濃度および期間に関する定量データなし、複数の化学物質による暴露、方法および調査対象母集団に関する詳細データなし）は、ヒトに対する3,4-DCAの反復暴露後に関するわずかな情報である。

農薬工場の労働者の入院率は高く、カーバメイト系殺虫剤のメソミル、および3,4-DCAによる中毒が原因であった（メトヘモグロビン血症、チアノーゼ、眼および皮膚の刺激性）(Morse et al., 1979)。3,4-DCAおよび3,4-ジクロロプロピオンアニリドに暴露した労働者は塩素座瘡を示した。これは、混入物質である3,3',4,4'-テトラクロロアゾベンゼンが原因である。Scarisbrick and Martin (1981)によると、塩素座瘡の有無に関わらず、労働者の肝酵素もしくは脂質への影響は、3,4-ジクロロアニリンとは関連性がなかった。

3,4-DCAに暴露した労働者151人の調査では、メトヘモグロビン濃度およびヘモグロビン濃度への影響は示されなかった (Rohm and Haas, 1982)。英国の報告では、1961～1980年の間にジクロロアニリン暴露によりチアノーゼを示した症例はほとんどなかった (Sekimpi and Jones, 1986)。

### まとめ

ラットおよびウサギの反復投与試験 (Du Pont de Nemours, 1976c, Kinney, 1986) から、3,4-DCAには赤血球に対する毒性があり、メトヘモグロビン濃度の増加、赤血球造血亢進、長期的なヘモジデリン沈着症を引き起こす。こうした影響は、吸入暴露の場合、10 mg/m<sup>3</sup>で10日後、背部皮膚への塗布の場合、60 mg/kgで10日後にみられた。別の吸入試験では、3,4-DCAは神経機能にも影響を与える可能性が示されている (Andreeshcheva, 1970)。*In vitro*では、肝細胞および腎細胞における酵素の活性が変化することで、細胞に有害な影響を与える可能性も示されているが (Valentovic et al., 1995)、実際に*in vivo*試験からの裏づけは得られていない。上述したように、構造的類似物質の試験から、3,4-DCAの場合と一致した影響がみられている。

ヒトでの暴露報告では、3,4-DCAの反復暴露後、メトヘモグロビン血症、チアノーゼ、眼および皮膚の刺激性が指摘されているが、化学物質の複合暴露であるため、本物質が主原

因であるとは断言できない。

#### 4.1.2.7 変異原性

##### 3,4-ジクロロアニリン

###### 細菌の*in vitro*試験

*S. typhimurium* (ネズミチフス菌) のTA97、TA98、TA100、TA1535およびTA1537株を用いた変異原性試験は、最高2,000 µg/plateの用量においてS-9mixの有無に関わらず陰性であった (Bayer AG, 1984、BG Chemie, 1985a、McMillan et al., 1988、Zeiger et al., 1992)。ノルハルマンの存在下におけるAmes試験も陰性であった (Suzuki et al., 1986)。*Aspergillus nidulans* を用いた遺伝子突然変異試験 (S-9 mix非存在下のみ) は、5 µg/mL以上で陽性だった。その影響は用量に依存しており、最高試験濃度の200 µg/mLで、孢子の生存率は32%であった。これが唯一の実験であった (Prasad, 1970)。

###### 哺乳類細胞の*in vitro*試験

CHO (チャイニーズハムスター卵巣由来) 細胞を用いた哺乳類細胞の遺伝子突然変異試験 (HPRT: ヒポキサンチンゲアニンホスホシル転移酵素) の結果は、最高250 µg/mLまでの用量でS-9mixの有無に関わらず陰性であった。S-9 mix非存在下の最高用量で弱い細胞毒性がみられた (McMillan et al., 1988)。

ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験は、最高1 mmol/Lの濃度においてS-9 mixの有無に関わらず陰性であった。最高試験濃度でも細胞毒性はみられなかった (Bauchinger et al., 1989)。

ヒトリンパ球を用いた姉妹染色分体交換試験 (SCE試験) は、S-9 mix存在下の0.125 mmol/L以上で弱い陽性を示した。0.5 mmol/Lおよび1.0 mmol/Lで3倍の増加がみられ、その影響は用量に依存していた。S-9 mix非存在下では1.0 mmol/Lまで陰性であり、細胞毒性はみられなかった (Bauchinger et al., 1989)。

ラット肝細胞を用いた不定期DNA合成試験 (UDS試験) は、10 µg/mLまでの用量で陰性であった。最高試験用量でも細胞毒性はみられなかった (McMillan et al., 1988、Yoshimi et al., 1988)。別のUDS試験 (Andrae, 1986) では、0.16~47.7 µg/mLの範囲で整合性のない所見が得られ、結果も不明確であった (弱い「影響」、用量依存性なし)。

V79細胞を用いた紡錘体損傷試験は、0.25および0.5 mmol/Lでの3時間暴露後に陽性であり (Salassidis and Bauchinger, 1990)、その主な影響は単極性の分裂中期細胞の誘発であった。これらの濃度において、細胞毒性に関する情報は得られなかったが、高濃度ほど強い細胞

毒性を示した。

#### 哺乳類の*in vivo*試験

マウスの骨髄細胞を用いる*in vivo*小核試験では、980 mg/kgの経口投与で陰性であった。致死作用およびPCE/NCE（多染性赤血球/正染性赤血球）比の減少がみられた（BG Chemie, 1985b）。

マウスの骨髄細胞を用いる別の*in vivo*小核試験でも、200 mg/kgまでの腹腔内投与（24時間間隔で2回）で陰性であった。臨床症状および致死作用がみられ、さらにPCE/NCE比が減少した（Du Pont de Nemours, 1989）。

#### 構造的類似化合物のデータ

構造的類似化合物である4-クロロアニリンについて、複数のエンドポイントに関する*in vitro*陽性データが、細菌（Zeiger E., 1990）および哺乳類細胞（Mitchell et al., 1988、Myhr and Caspary, 1988、Wangenheim and Bolcsfoldi, 1988）における遺伝子突然変異、染色体異常（Anderson et al., 1990）、SCE試験（Anderson et al., 1990）ならびにラットの初代培養肝細胞を用いるUDS試験（Williams et al., 1982）で得られている。*In vivo*では、キイロショウジョウバエの体細胞突然変異試験で陽性であった（Graf et al., 1990）。

3-クロロアニリンおよび2-クロロアニリンについては、複数のエンドポイントに関する*in vitro*データがあり、細菌の変異原性試験での陰性（Thompson et al., 1983、Zeiger et al., 1987）、菌類の遺伝子突然変異試験での陽性（Prasad, 1970）、S-9 mix非存在下のみの染色体異常試験（Ishidate M., 1988）ならびにUDS試験（Thompson et al., 1983）での陰性が報告されている。これらの化合物の*in vivo*試験データはない。

ジクロロアニリンと構造的に類似した化合物の中では、4-クロロアニリンのみが哺乳類細胞における変異原性の可能性を示している。しかし、*in vivo*試験は、陽性であったキイロショウジョウバエにおける体細胞突然変異試験のみである。

#### 結論

*In vitro*遺伝毒性試験では、遺伝子および染色体の突然変異において陰性であるものの、*in vitro*のSCE試験で弱い陽性、そして*in vitro*の紡錘体損傷試験で陽性を示しており、変異原性に関する限定的な根拠がある。明確な陰性を示した*in vivo*小核試験から、*in vivo*での変異原性の可能性は低い。

#### 4.1.2.8 発癌性

3,4-DCAに関する動物実験データはない。

##### 4.1.2.8.1 化学的な類似化合物に関するその他の研究結果

#### 4-クロロアニリン（塩酸塩）

4-クロロアニリンおよび4-クロロアニリン塩酸塩には、ラットおよびマウスにおいて発癌性があり（NTP, 1989およびNTP, 1979を参照）、脾臓の肉腫ならびに脾臓および肝臓の血管腫/血管肉腫を主に誘発する。実際に、この分類とラベル表示は、1996年7月10日～12日にイスプラ（イタリア）で開かれた危険物質の分類と表示に関する欧州委員会グループ会合以降、「発癌性、Cat. 2、有毒、T、R45」へと見直された（文書ECB I/12/96）。

IARC（International Agency for Research on Cancer：国際癌研究機関）の分類システム（IARC, 1993）によると、4-クロロアニリンはヒトに対して「発癌の可能性はある」に分類されている（グループ2B）。

その他のクロロアニリン（2,5-DCA、2-および3-クロロアニリン）に関する発癌性のデータはない。

#### ヒト知見

3,4-DCAもしくは構造的に類似したクロロアニリンに関するデータはない。

#### 結論

3,4-DCAの発癌性に関する長期試験データはない。*In vivo*遺伝毒性のデータからは、3,4-DCAそのものの発癌性への関連性は得られなかった。

2,5-DCA、2-クロロアニリンおよび3-クロロアニリンに関する発癌性のデータは得られていないが、4-クロロアニリンはラットおよびマウスにおいて発癌性を示す。4-クロロアニリンの構造的類似性から、3,4-DCAも発癌性を示す可能性がある。しかし、3,4-DCAの*in vivo*脱ハロゲン化に関する代謝データからは、その根拠が認められず、この情報は疑わしく無視できる。これ以上の裏付けデータはなく、3,4-DCAをカテゴリ3の発癌性物質に分類するには、データが不十分である。

#### 4.1.2.9 生殖毒性

##### 動物試験

##### 生殖能障害

生殖能および生殖機能に関する動物試験データがないため、3,4-DCAの生殖能に関連した有害性の特定は不可能である。同様に、生殖毒性のスクリーニングという意味での発生毒性評価を十分に補える適切な90日間の反復投与毒性試験のデータもない。

雄の生殖器官に関するわずかな情報が、ラットにおける3,4-DCAの吸入試験（2週間で暴露10回）（セクション4.1.2.6を参照）から得られる可能性がある。この試験では、精巣の絶対および相対重量あるいは精巣および副睾丸の組織病理学的所見に変化はなかった（Kinney, 1986）。

##### 発生毒性

妊娠ラット（Charles River Crl:CD BR）における催奇形性試験で、3,4-DCAの母体毒性および発生毒性を評価した（Clemens and Hartnagel, 1990）。主要器官形成期（妊娠6～15日）に5、25もしくは125 mg/kg/日の用量を、10 mL/kgの容量で懸濁液として投与した。対照群には、媒体として同容量のカルボキシメチルセルロース/ツイーン80の水溶液を投与した。各群は、妊娠した雌28例で構成された。試験期間中、摂餌量、体重および臨床症状を調査した。チアノーゼはみられなかった。妊娠20日目に評価されたパラメータは、生存胎児を有する母動物数、黄体、着床、吸収胚、同腹胎児数、胎盤重量、着床前および着床後胚損失であった。生存胎児（群当たり348～425例）の体重、性ならびに外表、内臓および骨格の形態を評価した。

本試験条件下では、母体毒性が25および125 mg/kgでみられ、これは摂餌量および平均体重増加量の有意な減少に基づく。発生毒性の境界は、明確な母体毒性を示した高用量群（125 mg/kg/日）でのみ認められ、当該用量では、軽微だが統計学的に有意差のない吸収胚とそれに伴う着床後胚損失の増加がみられた。さらに、2～3の骨格において著しい骨化遅延が観察された。25 mg/kg/日以下では、母体の生殖パラメータや胎児パラメータに有意なあるいは毒性学的に意味のある影響はなかった。催奇形性は認められなかった。

##### 結論

OECDのガイドラインに準拠した3,4-DCAのラット催奇形性試験において、胚/胎児発生に対する有意な悪影響はみられなかった。本試験から、次の値が得られた；

NOAEL（胚/胎児毒性） 25 mg/kg/日

NOAEL (母体毒性) 5 mg/kg/日

#### その他の情報

2-クロロアニリン (28日間、吸入、Bayer AG, 1992b) および2,5-DCA (28日間、経口、Hoechst AG, 1989) といった構造的類似化合物 (セクション4.1.2.6を参照) における短期間の反復投与毒性試験のデータからは、雄の生殖器官における外観変化はみられなかった。さらに、発癌性を検出する「迅速試験」として提案された*in vivo*モデル試験で、2,4-DCAならびに2-および3-クロロアニリンが25、50、250、400もしくは500 mg/kg/日の用量で5日間、各群5例のマウスに腹腔内投与されたが、精子の頭部異常頻度の増加はみられなかった (Topham, 1980)。

3,4-DCAは、除草剤ジウロンの*in vivo*における代謝産物の一つである。0もしくは125 ppmのジウロン混餌飼料によるラット3世代繁殖試験では、処理および未処理動物間に明確な相違はみられなかった (Hodge et al., 1967)。本試験条件下での主要代謝産物は、*N*-(3,4-ジクロロフェニル)尿素であった。少量の3,4-DCAも尿中に認められた (投与量の0.2%未満、0.2% = 0.02 mg/kg/日)。

同じ試験においてHodge et al. (1967)は、最大1,250 mg/kg体重飼料 (62.5 mg/kg/日のジウロンと同等、体重10 kgで摂餌量500 g/日と仮定) を2年間、イヌに投与した。投与後、3,4-DCAが尿中に認められた (全代謝産物の1.2%)。このため、ジウロンを投与された動物は、体内で3,4-DCAの暴露を受けたと仮定できる。最高用量では、有害作用が脾臓 (造血亢進) および骨髄 (赤血球過形成) でみられた。しかし、性腺および子宮における組織病理学的変化はなかった。このジウロン投与は、0.75 mg/kg (1.2%) の3,4-DCAの体内暴露に相当する。

#### ヒト知見

データなし

#### その他の情報

ジウロンは、ヒトではラットやイヌと同じ形で部分的もしくは完全な脱メチル化およびヒドロキシル化により、代謝されると考えられる。主要代謝産物は、*N*-(3,4-ジクロロフェニル)尿素および尿中に微量が認められる3,4-DCAである。代謝産物の定量により、ヒトにおける3,4-DCAの濃度は、主要代謝産物の濃度よりも900倍低いことが明らかとなった (van Boven, 1990)。