

4 - ニトロトルエンの有害性評価

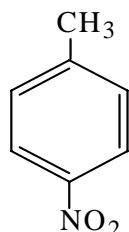
[4-Nitrotoluene, CAS No. 99-99-0]

名 称： 4-ニトロトルエン
 別 名： *p*-ニトロトルエン、*p*-メチルニトロベンゼン、
 1-メチル-4-ニトロベンゼン、4-NT

分 子 式： C₇H₇O₂N

分 子 量： 137.14

構 造 式：



外 観： 無色あるいは黄色の結晶¹⁾

融 点： 53-54¹⁾

沸 点： 238.3 (1.013 × 10⁵ Pa)¹⁾

比 重： $d_4^{75} = 1.1038$ ¹⁾

蒸 気 圧： 13.3 Pa (20)¹⁾

分 配 係 数： Log Pow = 2.37 (実測値)¹⁾

分 解 性： 加水分解性：報告なし

生分解性：難分解 (BOD=0.8%, 14 日間)²⁾

溶 解 性： 水 442 mg/L (30)¹⁾

有機溶媒 アルコール、エーテル、ベンゼン、クロロホルム、アセトン等に可溶¹⁾

製 造 量 等： 平成 13 年度 (非公表)

用 途： 染料、顔料、医薬、農薬の基幹原料である *p*-トルイジン、スチルベン、ジニトロトルエン、*p*-ニトロベンズアルデヒド、*p*-ニトロ安息香酸等の合成中間体¹⁾。

適 用 法 令： 労働安全衛生法、海洋汚染防止法

¹⁾ HSDB, 2001; ²⁾ 通商産業公報, 1976

1. 有害性調査結果

1) ヒトの健康に関する情報

4-ニトロトルエン (4-NT) によるヒト健康影響に関する報告は得られていない。4-NT に必ずしも該当しない可能性があるが、ニトロトルエンの一般的な急性影響としてはメトヘモグロビン血症が生じ、それによる頭痛、チアノーゼ、衰弱化、めまい、運動失調、呼吸障害、頻脈、嘔吐などがみられている (HSDB, 2001; Mackinson et al., 1981)。

2) 内分泌系及び生殖系への影響

(1) レセプター結合に関する *in vitro* 試験結果 (付表-1)

ヒトのエストロゲン受容体に対する結合試験で 4-NT は 10^{-4} M の濃度までエストロゲン受容体への結合性はみられていない (CERI, 2001a)。ヒトあるいはラットエストロゲン受容体発現遺伝子及びエストロゲン受容体応答配列を組み込んだ HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイでも 4-NT は 10^{-11} – 10^{-5} M の濃度範囲で遺伝子の転写活性化は認められていない (CERI, 2001a)。また酵母ツーハイブリッドアッセイでも 4-NT は 10^{-3} M の濃度まで遺伝子の転写活性化は認められていない (Nishihara et al., 2000)。

ヒトアンドロゲン受容体に対する結合試験で、4-NT は 10^{-4} M の濃度までアンドロゲン受容体への結合性はみられていない (CERI, 2003)。ヒトアンドロゲン受容体のレポーター遺伝子アッセイの一過性発現系においても、4-NT は 10^{-11} – 10^{-5} M の濃度範囲で遺伝子の転写活性化は認められていない (CERI, 2003)。さらに、ヒトアンドロゲン受容体のレポーター遺伝子アッセイの安定形質転換株でのアゴニスト検出系及びアンタゴニスト検出系のいずれにおいても、4-NT は遺伝子の転写活性化は認められていない (CERI, 2003)。

(2) ほ乳動物の内分泌系及び生殖系に及ぼす影響 (付表-2)

エストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用を検出するスクリーニング手法である子宮増殖アッセイ (OECD ガイドライン案に準拠) において、エストロゲン作用を検出するため、雌の幼若 SD ラット (20 日齢) に 4-NT 0、50、100、250 mg/kg/day を 3 日間皮下投与した実験で、いずれの群でも子宮重量に影響は認められていない。さらに抗エストロゲン作用を検出するため、雌の幼若 SD ラット (20 日齢) に 4-NT 0、50、100、250 mg/kg/day を 17 β -エチニルエストラジオール 0.6 μ g/kg/day と同時に 3 日間皮下投与した実験で、いずれの群でも子宮重量に影響は認められていない (CERI, 2001b)。

アンドロゲン作用あるいは抗アンドロゲン作用を検出するスクリーニング手法であるハーシュバガーアッセイ (OECD ガイドライン案に準拠) において、アンドロゲン作用を検出するため、雄の去勢 SD ラット (7 週齢) に 4-NT 0、30、100、300 mg/kg/day を 10 日間経口投与した実験で、雄性副生殖器官重量に変化は認められていない。さらに抗アンドロゲン作用を検出するため、雄の去勢 SD ラット (7 週齢) に 4-NT 0、30、

100、300 mg/kg/day を 10 日間経口投与し、同時にプロピオン酸テストステロン 0.4 mg/kg/day を 10 日間皮下投与した実験で、雄性副生殖器官重量に変化は認められていない (CERI, 2001b)。

雌雄の B6C3F₁ マウス (6 週齢) に 4-NT 0、625、1,250、2,500、5,000、10,000 ppm (雄 0、131、212、439、813、1491 mg/kg/day、雌 0、164、320、625、1,075、1,634 mg/kg/day 相当) を 13 週間混餌投与した実験では、4-NT による生殖系へ及ぼす影響はみられていない (US.NTP, 1992; Dunnick et al., 1994)。

雌雄のマウス (系統、週齢記載なし) に 4-NT 0、40、80、160 mg/kg/day を 13 週間強制経口投与した実験でも 4-NT による生殖系へ及ぼす影響はみられていない (Morrissey et al., 1988)。

雌雄の F344 ラット (6 週齢) に 4-NT 0、625、1,250、2,500、5,000、10,000 ppm (雄 0、42、82、165、342、723 mg/kg/day、雌 0、44、82、164、335、680 mg/kg/day 相当) を 13 週間混餌投与した実験で、最高用量群で雄に精巣の精細管の変性を含む組織変化、精子数の減少、精子の運動性低下がみられ、雌では性周期の延長及び消失がみられている (US.NTP, 1992)。

雌雄の F344 ラット (週齢記載なし) に 4-NT 0、90、180、360 mg/kg/day を 13 週間強制経口投与した実験で、影響のみられた用量についての記載はないが雄に体重減少、精巣、精巣上体の重量減少がみられている (Morrissey et al., 1988)。

雌雄の Wistar ラット (週齢記載なし) に 4-NT 0、400 mg/kg/day で 5 日/週 × 3 ヶ月強制経口投与した後に交配し、さらに 3 ヶ月間投与した実験では、F₀ の雄で脾臓の腫大と精細管の壊死をともなう精巣の萎縮がみられたが、生殖能力及び胎仔に対する影響はみられていない (Ciss et al., 1980)。

雌雄の SD ラット (F₀ 親動物、5 週齢; F₁ 親動物、3 週齢) に 4-NT 0、40、80、160 mg/kg/day を 2 世代にわたって強制経口投与した実験で、親動物に対する影響として、40 mg/kg 以上で肝臓及び腎臓重量の増加、80 mg/kg 以上で体重の低値及び摂餌効率の低下、160 mg/kg で一般状態の悪化及び死亡がみられている。生殖能力に関する検査では、F₁ 世代雌の 160 mg/kg/day で仔動物の発育遅延に起因したと考えられる膣開口率の低下がみられたが、膣開口の遅延に関連した生殖能力への影響はみられていない。仔動物に対しては、80 mg/kg/day 以上で哺育期間中の体重増加抑制、160 mg/kg/day で哺育期間中の生存率低下及び雄の肛門生殖突起間距離の高値がみられた。この試験においては、F₁ 世代の妊娠動物数が若干少なかったが、以上のように内分泌系への有害性影響、生殖毒性のいずれも認められなかった。この試験における親動物に対する影響に関しての無影響量 (NOEL) 及び無毒性量 (NOAEL) は 40 mg/kg/day 未満、親動物の生殖能力について 160 mg/kg/day 以下では影響はない。仔動物の発生・発育に関する NOEL 及び NOAEL は 40 mg/kg/day と結論されている (経済産業省, 2003)。

3) 一般毒性に関する情報

(1) 急性毒性 (表-1) (German Chemical Society, 1989)

マウス、ラット及びウサギにおける各投与経路での LD₅₀ 及び LC₅₀ 値を表-1 に記載する。

ラットに 1,000 ~ 9,000 mg/kg の 4-NT を経口投与した実験で、興奮、呼吸数増加、痙攣、衰弱、弛緩がみられている。また、ラットに 280 ~ 2,110 mg/kg の 4-NT を腹腔内投与した実験で、投与 3 時間後の血中メトヘモグロビン濃度の増加 (6.5 ~ 27.1%)、高用量での死亡がみられている (German Chemical Society, 1989)。

表-1 急性毒性試験結果

	マウス	ラット	ウサギ
経口 LD ₅₀	1,230 - 1,280 mg/kg	1,960 - 4,700 mg/kg*	1,750 mg/kg
吸入 LC ₅₀	>4167 mg/m ³ (1h)	>4167 mg/m ³ (1h)	-
経皮 LD ₅₀	-	16,000 mg/kg	-
腹腔内 LD ₅₀	-	940 mg/kg	-

* : 報告により幅がある。

(2) 反復投与毒性 (附表-3)

雌の B6C3F₁ マウス (6-8 週齢) に 4-NT 0、200、400、600 mg/kg/day を 14 日間強制経口投与した実験で、200 mg/kg/day 以上の群で脾臓重量の増加傾向、600 mg/kg/day 群で肝臓重量増加がみられ、400 mg/kg/day 以上の群で肝臓の小葉中心性肝細胞の腫大がみられている (Burns et al., 1994)。

また、雌雄の B6C3F₁ マウス (6-7 週齢) に 4-NT 0、675、1,250、2,500、5,000、10,000 ppm (雄 0、202、397、588、920、1,548 mg/kg/day、雌 0、388、647、755、1,262、2,010 mg/kg/day 相当) を 14 日間混餌投与した実験で、675 ppm 以上の群の雄で用量相関性のある肝臓重量の増加、10,000 ppm の雌雄で体重増加抑制がみられている (US.NTP, 1992)。

同様に雌雄の B6C3F₁ マウス (6 週齢) に 4-NT 0、625、1,250、2,500、5,000、10,000 ppm (雄 0、131、212、439、813、1,491 mg/kg/day、雌 0、164、320、625、1,075、1,634 mg/kg/day 相当) を 13 週間混餌投与した実験でも、625 ppm 以上の群の雌雄で肝臓重量の増加がみられているが、肝臓の組織学的変化はみられていない。なお、5,000 ppm 以上の群の雌雄で体重増加抑制、摂餌量の減少がみられている (US.NTP, 1992; Dunnick et al., 1994)。

雌雄の F344 ラット (6 週齢) に 4-NT 0、1,250、2,500、5,000、10,000、20,000 ppm (雄 0、106、211、446、723、869 mg/kg/day、雌 0、105、203、404、610、611 mg/kg/day 相当) を 14 日間混餌投与した実験で、5,000 ppm 以上の群の雄、10,000 ppm 以上の群の雌で体重増加抑制、雌雄とも 20,000 ppm で体重減少がみられ、5,000 ppm 以上の群の雄及び 10,000 ppm 以上の群の雌で脾臓のうっ血、髄外造血亢進がみられている (US.NTP, 1992)。

雌雄の F344 ラット (6 週齢) に 4-NT 0、625、1,250、2,500、5,000、10,000 ppm (雄 0、42、82、165、342、723 mg/kg/day、雌 0、44、82、164、335、680 mg/kg/day 相当) を 13 週間混餌投与した実験で、625 ppm 以上の群の雌雄で脾臓の髄外造血亢進、ヘモジデリン色素沈着、うっ血、雄で腎臓の硝子滴増加、ネフローゼ、 α_2 -グロブリンの増加、雌で腎臓の尿細管上皮細胞の核大型化、色素沈着、1250 ppm 以上の群の雄で腎臓の尿細管上皮細胞の核大型化、総蛋白の減少、2500 ppm 以上の群の雌雄で貧血・メトヘモグロビン血症と関連した血液学的パラメータの変動、5000 ppm 以上の群の雌雄で体重増加抑制、雌で総蛋白の減少、雄で腎臓・肝臓の相対重量増加、10000 ppm 群の雌雄で摂餌量の減少、雄で腎臓の色素沈着、胆汁酸、尿素窒素、クレアチニンの増加、雌で ALT の増加、腎臓・肝臓の相対重量増加がみられている (US.NTP, 1992; Dunnick et al., 1994)。

雌雄の Wistar ラット (週齢記載なし) に 4-NT 0、400 mg/kg/day を 6 カ月間強制経口投与した実験で、メトヘモグロビンの形成及び血清コリンエステラーゼ活性の上昇が、さらに病理組織学的には、脾臓のヘモジデリン沈着、赤芽球の増殖がみられている (German Chemical Society, 1989)。

4) 変異原性・遺伝毒性及び発がん性に関する情報

(1) 変異原性・遺伝毒性 (表-2)

in vitro では、ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験の TA100 株、枯草菌を用いた DNA 修復試験、CHO 細胞を用いた染色体異常試験及び姉妹染色分体交換試験、マウスリンパ腫細胞試験において陽性の結果が報告され、ネズミチフス菌 TA1535/pSK1002 を用いた *umu* テスト、CHL 細胞を用いた染色体異常試験、酵母を用いた遺伝子変換試験においては陰性と報告されている。

in vivo では、マウスに腹腔内投与した小核試験及びラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験の結果は陰性となっている。

表-2 変異原性・遺伝毒性試験結果

試験方法	試験条件	結果*	文献
<i>in vitro</i> 復帰突然変異試験	ネズミチフス菌 TA100 13,715 μ g/plate S9(+/-) (但し、TA92、TA94、TA98、TA1535、 TA1537、TA1538では陰性)	+	Shimizu & Yano, 1986
	ネズミチフス菌 TA92、TA94、TA100、 TA1535 500 μ g/mL TA98、TA1537 150 μ g/mL S9(+/-)	-	Miyata, et al., 1981
	ネズミチフス菌 TA100 10-5,000 μ g/mL S9(+/-) (但し、TA1535、TA1537、TA1538、TA98 では陰性)	+	Spanggord et al., 1982
	ネズミチフス菌 TA98、TA100 0.01, 1 mM S9(+/-)	-	Kubo et al., 2002

試験方法	試験条件	結果*	文献
DNA 修復試験	枯草菌 5,000 µg/disc S9(-)	+	Shimizu & Yano, 1986
<i>umu</i> テスト	ネズミチフス菌TA1535/pSK1002 S9(+/-)	-	Degirmenci et al., 2000
染色体異常試験	CHO細胞 550 µg/mL S9(+) S9(-)では陰性	+ w	Galloway et al., 1987
	CHL細胞 250 µg/mL S9(-)	-	Ishidate et al., 1988
姉妹染色分体交換試験	CHO細胞 200 µg/mL S9(+/-)	+	Galloway et al., 1987
遺伝子変換試験	酵母 100 µg/mL S9(-)	-	Marquardt et al., 1970
マウスリンパ腫細胞試験	マウスリンパ腫 L5178Y TK ^{+/+} 細胞 75 µg/mL S9(+)	+	US.NTP, 1992
不定期 DNA 合成試験	ラット初代培養肝細胞 S9(-) 13.7 µg/mL	-	Doolittle et al., 1983
	ラット精原細胞S9(-) 13.7 µg/mL	-	Working & Butterworth, 1984
<i>in vivo</i> 小核試験	マウス腹腔内投与 (投与量の記載なし)	-	Ouchida et al., 1989
<i>in vivo</i> 不定期 DNA 合成試験	ラット肝細胞 1,000 mg/kg 単回経口投与	-	Mirsalis et al., 1989

* - : 陰性 + : 陽性 + w : 弱い陽性

(2) 発がん性 (表-3)

雌雄の B6C3F₁ マウスの (5-6 週齢) に 4-NT 0、1,250、2,500 及び 5,000 ppm を 2 年間混餌投与した試験で、雄の 5,000 ppm 群で肺胞 / 細気管支の腺腫又は癌の有意な発生率の増加がみられている (対照群 8/50 例; 1,250、2,500、5,000 ppm で各 14/50、12/50、19/50 例)。肺胞上皮の過形成、腺腫、癌はマウスの肺で形態学的・生物学的に一連の変化と考えられ、肺胞上皮の過形成の発生率も統計的に有意ではないが、用量依存的な増加がみられている。一方、雌のマウスには肺に腫瘍性変化は認められていない。この他、雌雄いずれにも肺胞上皮の細気管支上皮化がみられ、組織学的には終末気管支から肺胞、肺胞の管に向けて立方上皮の広範囲な配列を呈していた。この変化は雌雄各群に認められ、前癌病変より化生性変化と考えられている。ただし、この変化はウイルスにより誘発されたとする報告はあるが、化学物質による誘発の報告例がこれまでない。US.NTP は結論として、雄での肺及び気管支の腫瘍発生率の増加をもとに、4-NT は雄のマウスには確実な発がん性の証拠がない (equivocal evidence of carcinogenic activity)、雌のマウスには発がん性の証拠はない (no evidence of carcinogenic activity) との見解を示している (US.NTP, 2002)。

雌雄の F344/N ラット (5-6 週齢) に 4-NT 0、1,250、2,500 及び 5,000 ppm を 2 年間混餌投与した試験で、雄の 2,500 ppm 群で皮下線維腫ないし線維肉腫の有意な増加を認め

たが、各群に 4-NT 投与に関連した腫瘍の発生はみられていない。一方、雌では 2,500 ppm 群において、陰核腺の腺腫又は癌の有意な発生率の増加 (対照群 8/50 例 ; 1,250、2,500、5,000 ppm で各 12/50、20/50、8/49 例) が認められている。5,000 ppm 群における発生率は対照群と差がなく、用量相関性はないが、5,000 ppm 群は体重増加抑制がみられる用量で全身的影響が強い用量であること、また、4-NT の主代謝物である 4-ニトロ安息香酸でも雌の陰核腺に腫瘍を発生させることが知られていることから、US.NTP は 4-NT 投与による影響と判断している。すなわち、US.NTP では 4-NT は雄ラットに対して確実な発がん性の証拠がない (equivocal evidence of carcinogenic activity)、また、雌ラットに対しては陰核腺の腫瘍発生率の増加をもとに、ある程度の発がん性の証拠がある (some evidence of carcinogenic activity) との見解を示している (US.NTP, 2002)。

一方、4-NT の異性体である 2-ニトロトルエン (2-NT) の発がん性試験については、マウスの実験では雌雄ともに血管肉腫、大腸(盲腸)癌、肝細胞腫瘍 (雌のみ) が、ラットの実験では雌雄のいずれにも皮下の腫瘍、乳腺の線維腺腫、肝臓腫瘍、悪性中皮腫 (雄のみ) がそれぞれ認められており、2-NT はマウス、ラットの雌雄いずれに対しても、明らかに発がん性のある物質 (clear evidence of carcinogenic activity) と結論されている (US.NTP, 2001b)。

ヒトでの発がん性については報告がない。

表-3 国際機関等での発がん性評価

機 関	分 類	分 類 基 準	出 典
US.EPA	-	発がん性について評価されていない。	IRIS, 2002
EU	-	発がん性について評価されていない。	ECB, 2000
US.NTP	-	発がん性について評価されていない*。	US.NTP, 2000
IARC(1996)	グループ 3**	ヒトに対する発がん性については分類できない物質。	IARC, 2001
ACGIH	-	発がん性について評価されていない。	ACGIH, 2001
日本産業衛生学会	-	発がん性について評価されていない。	日本産業衛生学会, 2001

*: US.NTP は雄のマウス及びラットでは確実な発がん性の証拠がない (equivocal evidence of carcinogenic activity)、雌のマウスには発がん性の証拠はない (no evidence of carcinogenic activity)、雌のラットには、ある程度の発がん性の証拠がある (some evidence of carcinogenic activity)、との見解を示している (US.NTP, 2002)が、2005 年 2 月現在発がん性評価はされていない (US.NTP, 2004)。

** : ニトロトルエン類として、グループ 3 に分類している。

5) 免疫系への影響

雌の B6C3F₁ マウスに 4-NT 0、200、400、600 mg/kg/day を 14 日間強制経口投与した実験で、脾臓で用量依存的に CD4⁺ T 細胞の減少がみられ、この変化はヒツジ赤血球に対する (IgM 抗体産生細胞) プラーク形成反応の低下と相互に関連している。この実験から 4-NT の免疫系に対する影響は T 細胞がもっとも感受性が高く、免疫機能の低下は

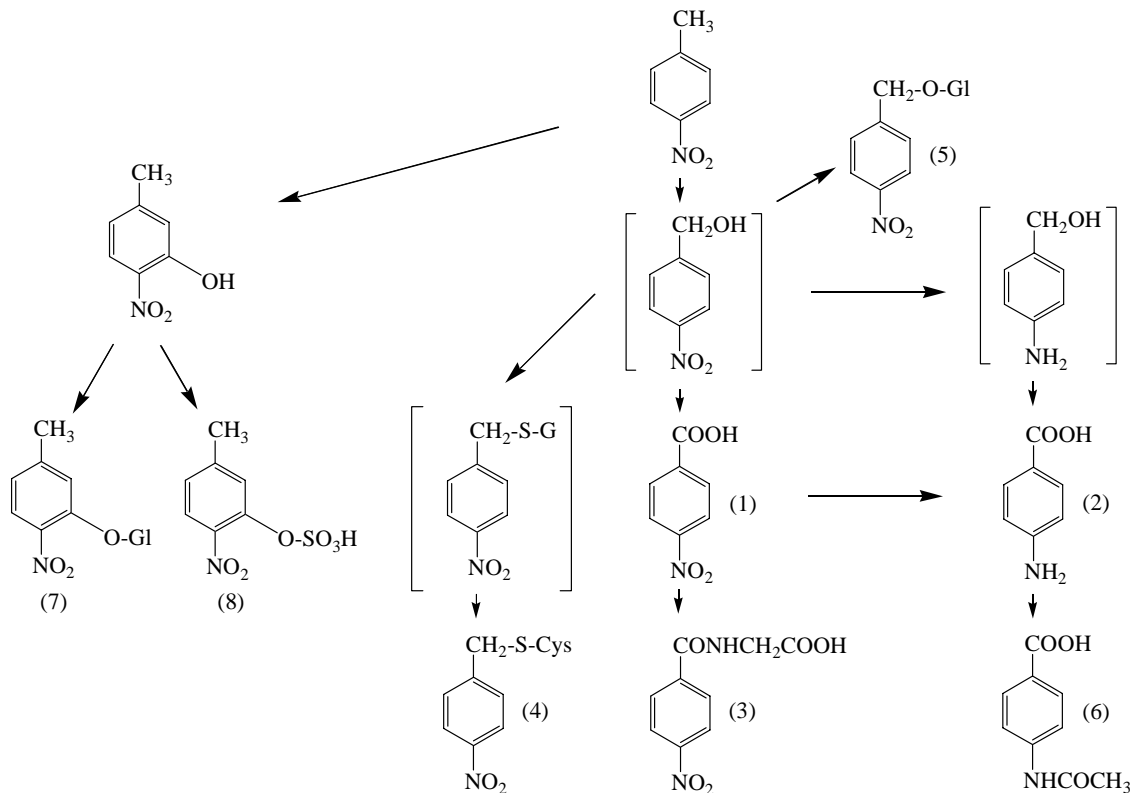
ヘルパーT細胞の減少に起因すると考えられている (Burns et al., 1994)。

6) 生体内運命

ニトロトルエン類は消化管、肺及び皮膚から吸収される (German Chemical Society, 1989)。ラットに 4-NT を 200 mg/kg 単回経口投与した実験では、雄では投与した 4-NT の 9.8%、雌では 1.3% が胆汁中に排泄されており、主要代謝物は 4-ニトロ安息香酸である (German Chemical Society, 1989; IARC, 1996)。

4-NT を投与した 3 匹のラット (投与経路不明) では尿中代謝物として 4-ニトロ安息香酸、4-アセトアミノ安息香酸、4-ニトロ馬尿酸、*S*-(4-ニトロベンジル)-*N*-アセチルシステイン、4-ニトロベンジルグルクロニド、4-アミノ安息香酸、4-メチル-2-ニトロフェニルグルクロニド、5-メチル-2-ニトロフェニル硫酸が確認され、投与 72 時間後の投与量に対する割合はそれぞれ 28.0、27.1、13.0、3.7、1.4、0.8、0.3、0.2% である (図 1) (German Chemical Society, 1989; IARC, 1996)。

雄の F344 ラットに ring-¹⁴C 標識したニトロトルエン類を経口投与した実験では、肝臓中の総放射活性は投与後 3-12 時間に、また、肝臓の生体高分子との結合は投与 12 時間後に最高に達しているが、単離した DNA との結合は認められていない (HSDB, 2001)。



- (1) 4-ニトロ安息香酸
 (2) 4-アミノ安息香酸
 (3) 4-ニトロ馬尿酸
 (4) S-(4-ニトロベンジル)-N-アセチルシステイン
 (5) 4-ニトロベンジルグルクロニド
 (6) 4-アセトアミノ安息香酸
 (7) 4-メチル-2-ニトロフェニルグルクロニド
 (8) 5-メチル-2-ニトロフェニル硫酸

Gl: グルクロン酸, G: グルタチオン, Cys: システイン

図1 4-ニトロトルエンの代謝経路

2. 現時点での有害性評価

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための *in vitro* 実験において、エストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体に対する結合性はみられず、酵母ツーハイブリッドアッセイでもエストロゲン様活性は認められていない。レポーター遺伝子アッセイにおいても、エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性はみられていない。また、*in vivo* 試験の子宮増殖アッセイ及びハーシュバークアッセイにおいても、エス

トロゲン作用、アンドロゲン作用は認められていない。従って、本物質がこれらの性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いものと考えられる。

一方、生殖器系への影響として、マウスでは影響はみられていないが、ラットに 723 mg/kg の高用量で 13 週間混餌投与した試験において、雄では精巣の精細管の変性を含む組織変化、精子数の減少、精子運動性の低下が、雌では子宮重量の増加、性周期の延長及び消失が、ラットを用いた 1 世代生殖毒性試験では、400 mg/kg/day の高用量で F₀ の雄で精巣への影響が報告されている。生殖・発生毒性に関しては、ラットを用いた 1 世代生殖毒性試験で生殖能力及び胎仔に対する影響はみられていない。また、2 世代生殖毒性試験においては、親動物では最低用量である 40 mg/kg/day 以上で肝臓及び腎臓重量増加、160 mg/kg/day で死亡、仔動物では 80 mg/kg/day 以上で体重増加抑制、160 mg/kg/day で生存率の低下といった一般毒性としての影響はみられたが、160 mg/kg/day の用量においても生殖能力や内分泌系に対する影響はみられていない。

なお、本物質の有害性に関連する情報として、ヒトでは、急性影響としてメトヘモグロビン血症がみられている。実験動物においても、内分泌系への影響が発現する用量又はそれ以下の用量で、メトヘモグロビン血症が発生し、さらに肝臓、腎臓、脾臓への影響が認められている。変異原性・遺伝毒性では *in vitro* 試験のいくつかで陽性の結果が示されているが、*in vivo* の試験では陽性の報告はない。ヒトでの発がん性については報告がなく、実験動物では NTP テクニカルレポートで、雌ラットで発がん性の証拠が示されたが、雄ラット及び雌雄マウスでは発がん性の確実な証拠はないと報告されている。

3. リスク評価等今後必要な対応

本物質については、性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられる。また、多世代にわたる生殖能力及び仔の発達に影響を及ぼす可能性も低いことから、現時点で、新たな調査に着手する必要性は低いと考えられる。

なお、環境省では平成 15 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会において、「げっ歯類を用いた 1 世代試験」および「試験管内 (*in vitro*) 試験」結果等を取りまとめており、哺乳類を用いた人健康への内分泌攪乱作用に関する試験結果としては既報告で影響が報告されている最高用量 (100 mg/kg/day) においてのみ一般毒性が認められたが、低用量 (文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的 low 用量) では明らかな内分泌かく乱作用は認められなかったとしている。ただし、現時点では内分泌かく乱作用との関連は明らかではないものの低用量で有意差のある変化が認められており、今後健康リスク初期評価を行なう際に活用する予定であるとしている。

参考文献 (文献検索時期：2003年2月¹⁾)

- ACGIH (2001) American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Seventh Edition, Cincinnati, Ohio, 200.
- Burns, L.A., Bradley, S.G., White, K.L. Jr., McCay, J.A., Fuchs, B.A., Stern, M., Brown, R.D., Musgrove, D.L., Holsapple, M.P. and Luster, M.I. (1994) Immunotoxicity of mono-nitrotoluenes in female B6C3F1 mice: I. para-nitrotoluene. *Drug Chem. Toxicol.*, 17, 317 - 358.
- Ciss, M., Huyen, N., Dutertre, H., Phu-Lich, N. and Truhault, R. (1980) Toxicological study of nitrotoluenes: long-term toxicity. *Dakar med.*, 25, 293 - 302 (in French, cited in IARC, 1996).
- Degirmenci, E., Ono, Y., Kawara, O. and Utsumi, H. (2000) Genotoxicity analysis and hazardousness prioritization of a group of chemicals. *Water Sci. Technol.*, 42, 125-131.
- Doolittle, D.J., Sherrill, J.M. and Butterworth, B.E. (1983) Influence of intestinal bacteria, sex of the animal, and position of the nitro group on the hepatic genotoxicity of nitrotoluene isomers in vivo. *Cancer Res.*, 43, 2836 - 2842.
- Dunnick, J.K., Elwell, M.R. and Bucher, J.R. (1994) Comparative toxicities of o-, m-, p-nitrotoluene in 13-week feed studies in F344 rats and B6C3F1 mice. *Fund. Appl. Toxicol.*, 22, 411 - 421.
- ECB (2000) Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labeling of dangerous substances : ANNEX I (<http://ecb.jrc.it/>).
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B.H., Resnick, M.A., Anderson, B. and Zeiger, E. (1987) Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 10 (Supp. 10), 1 - 175.
- German Chemical Society (1989) Nitrotoluenes. BUA report No. 41.
- HSDB (2001) Hazardous Substance Data Bank, U.S. National Library of Medicine, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.
- IARC (1996) 2-Nitrotoluene, 3-nitrotoluene, 4-nitrotoluene. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum., 65, 409 - 435.
- IARC (2001) IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. ホームページ上 (<http://www.iarc.fr>) の最新リスト
- IRIS (2002) Integrated Risk Information System, National Library of Medicine, (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?IRIS>).

¹⁾ データベースの検索を 2003 年 2 月に実施した。新たなデータを入手した際には文献を更新した。

- Ishidate, M., Harnois, M.C. and Sofuni, T. (1988) A comparative analysis of data on clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutat. Res.*, 195, 151 - 213.
- Kubo, T., Urano, K. and Utsumi, H. (2002) Mutagenicity characteristics of 255 environmental chemicals. *J. Health Sci.*, **48**, 545-554.
- Mackinson, F.W., Sticoff, R.S. and Partridge, L.J., Jr. (1981) NIOSH/OSHA Occupational Health Guidelines for Chemical Hazards. DHHS (NIOSH) Publication No. 81 - 123 (3 Vols.), Washington, D.C.
- Marquardt, H., Zimmermann, F.K., Dannenberg, H., Neumann, H.G., Bodenberger, A. and Metzler, M. (1970) Genetic activity of aromatic amines and their derivatives: induction of mitotic conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Krebsforsch.*, 74, 412 - 433.
- Mirsalis, J.C., Tyson, C.K., Steinmetz, K.L., Loh, E.K., Hamilton, C.M., Bakke, J.P. and Spalding, J.W. (1989) Measurement of unscheduled DNA synthesis and S-phase synthesis in rodent hepatocytes following *in vivo* treatment: testing of 24 compounds. *Environ. Mol. Mutagen.*, 14, 155 - 164.
- Miyata, R., Nohmi, T., Yoshikawa, K. and Ishidate, M., Jr. (1981) Metabolic activation of p-nitrotoluene and trichloroethylene by rat-liver S9 or mouse-liver S9 fractions in *Salmonella typhimurium* strains. *Eisei Shikenjo Houkoku*, 99, 60 - 65.
- Morrissey, R.E., Schwetz, B.A., Lamb, J.C., IV, Ross, M.D., Teague, J.L. and Morris, R.W. (1988) Evaluation of rodent sperm, vaginal cytology, and reproductive organ weight data from National Toxicology Program 13-week Studies. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 11, 343 - 358.
- Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S. and Utsumi, H. (2000) Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, 46, 282 - 298.
- Ohuchida, A., Furukawa, A. and Yoshida, R. (1989) Micronucleus test of polyploidy inducers. *Mutat. Res.*, 216, 371 - 372.
- Rickert, D.E., Long, R.M., Dyroff, M.C. and Kedderis, G.L. (1984) Hepatic macromolecular covalent binding of mononitrotoluenes in Fisher-344 rats. *Chem. Biol. Interact.*, 52, 131 - 139.
- Shimizu, M. and Yano, E. (1986) Mutagenicity of mono-nitrobenzene derivatives in the Ames test and rec-assay. *Mutat. Res.*, 170, 11 - 22.
- Spanggord, R.J., Mortelmans, K.E., Griffin, A.F. and Simmon, V.F. (1982) Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and structure-activity relationships of waste water components emanating from the manufacture of trinitrotoluene. *Environ. Mutagen.*, 4, 163 - 179.
- US.NTP (1992) NTP Technical Report on toxicity studies of o-, m-, p-nitrotoluenes administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F₁ mice. (Toxicity Report Series No. 23), Research Triangle Park, NC, USA.
- US.NTP (2001b) Draft technical report No. 504 (TR-504) on the toxicology and carcinogenesis

- studies of *o*-nitrotoluene (CAS No. 88-72-2) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (Feed Studies).
- US.NTP (2002) NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of *p*-nitrotoluene (CAS No. 99-99-0) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (feed studies). NTP TR 498.
- US.NTP (2000) U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, 9th Report on Carcinogens.
- US.NTP (2004) U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, 11th Report on Carcinogens.
- Working, P.K. and Butterworth, B.E. (1984) An assay to detect chemically induced DNA repair in rat spermatocytes. *Environ. Mutagen.*, 6, 273 - 286.
- CERI (化学物質評価研究機構) (2001a) 平成 12 年度経済産業省環境対応技術開発等委託調査研究、環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書。
- CERI (化学物質評価研究機構) (2001b) 平成 11 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託業務化学物質の内分泌かく乱効果に関する評価及び試験法の開発報告書。
- CERI (化学物質評価研究機構) (2003) 平成 14 年度経済産業省環境対応技術開発等委託調査研究、環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書
- 経済産業省 (2003) 「二世世代繁殖毒性試験報告書」。
- 通商産業公報 (1976).
- 経済産業省 (2003) 平成 13 年度既存化学物質の製造・輸入量に関する実態調査。
- 日本産業衛生学会 (2001) 許容濃度等の勧告, *産業衛生学雑誌*, 43, 95-119.

付表-1 レセプター結合に関する *in vitro* 試験結果

項目	試験方法及び条件	結果	結論	文献
ER に対する結合試験	方法：ヒトERに対する結合試験（組換えER リガンドドメイン）	IC50値： $>10^{-4}$ M (E2： 1.1×10^{-9} M)	ER結合性を示さない	CERI, 2001a
AR に対する結合試験	方法：ヒト ARに対する結合試験（組換えヒトARリガンドドメイン）	RBA：-	AR結合性を示さない	CERI, 2003
酵母ツーハイブリッドアッセイ	細胞：Gal4 DNA結合ドメイン/ラットERリガンド結合ドメイン遺伝子、Gal4活性化ドメイン/コアクチベーターTIF2遺伝子及び β -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子を導入した酵母	REC10値： $>10^{-3}$ M (E2： 3×10^{-10} M)	ERを介する転写活性化を示さない	Nishihara et al., 2000
組換え培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ	細胞：ヒトER発現遺伝子及びER応答配列を導入したHeLa細胞 暴露濃度： 10^{-11} - 10^{-5} M (4-NT)	10^{-11} - 10^{-5} Mの範囲で陰性 (E2：PC50： $<10^{-11}$ M)	ERを介する転写活性化を示さない	CERI, 2001a
	一過性発現系 (アゴニスト活性) 細胞：ヒトAR発現遺伝子及びAR応答配列を導入したCV-1細胞 暴露濃度： 10^{-11} - 10^{-5} M	10^{-11} - 10^{-5} Mの範囲で陰性	ARを介する転写活性化を示さない	CERI, 2003
	安定形質転換株 (アゴニスト活性、アンタゴニスト活性) 細胞：ヒトAR発現遺伝子及びAR応答配列を導入したCHO-K1細胞 暴露濃度： 10^{-11} - 10^{-6} M (4-NT) 5×10^{-10} M (DHT)	アゴニスト作用： 10^{-11} - 10^{-6} Mの範囲で陰性 アンタゴニスト作用： 10^{-11} - 10^{-6} Mの範囲で 5×10^{-10} M のDHTのアゴニスト作用を抑制しない	ARを介する転写活性化を示さない	CERI, 2003

ER: エストロゲン受容体; E2: 17 β -エストラジオール; REC10: 10^{-7} M E2 による活性値の 10% に相当する濃度; PC50: E2 による最大活性値の 50% に相当する濃度; IC50: E2 による 50% 阻害に相当する濃度; AR: アンドロゲン受容体; DHT: ジヒドロテストステロン

付表-2 ほ乳動物の内分泌系及び生殖系に関する試験結果

動物種	投与方法	投与期間	投与量	結果	文献
ラット (SD、雌) 20日齢 6匹/群	皮下 (子宮増殖 アッセイ)	3日間投与 後、24時間後 に子宮を摘 出し、重量を 測定	0、50、100、250 mg/kg/day	子宮重量に影響なし	CERI, 2001b
			0、50、100、250 mg/kg/day +17-エチニル エストラジオ ール 0.6 µg/kg/day 皮下投与	子宮重量に影響なし	
ラット (SD、雄) 6週齢で去 勢 7週齢	強制経口 (ハーシュ パーガー アッセイ)	10日間投与 後、約24時間 後に解剖	0、30、100、300 mg/kg/day	副生殖器官の重量に影響なし	CERI, 2001b
			0、30、100、300 mg/kg/day +プロピオン 酸テストステ ロン 0.4 mg/kg/day 皮下投与	副生殖器官の重量に影響なし	
マウス (B6C3F ₁ 、 雌雄) 6週齢	混餌	13週間	0、625、1,250、 2,500、5,000、 10,000 ppm (雄 0、131、 212、439、813、 1,491 mg/kg/day 相当; 雌 0、164、320、 625、1,075、 1,634 mg/kg/day 相当)	全群で、異常所見なし	US.NTP, 1992; Dunnick, et al., 1994
マウス (雌雄) 系統、週齢 記載なし	強制経口	13週間	0、40、80、160 mg/kg/day	全群で、異常所見なし	Morrissey et al., 1988
ラット (F344、 雌雄) 6週齢	混餌	13週間	0、625、1,250、 2,500、5,000、 10,000 ppm (雄 0、42、82、 165、342、723 mg/kg/day 相当; 雌 0、44、82、 164、335、680 mg/kg/day 相当)	10,000 ppm 群で、 雄：精巣精細管の変性を含む 組織変化、精子数減少、精子 運動性低下 雌：子宮重量の増加、性周期 延長及び消失	US.NTP, 1992; Dunnick et al., 1994
ラット (F344、 雌雄) 週齢記載 なし	強制経口	13週間	0、90、180、360 mg/kg/day	体重減少、精巣、精巣上体の 重量減少(影響がみられた用 量に関する記載なし)	Morrissey et al., 1988
ラット (Wistar、 雌雄) 週齢記載 なし	強制経口	5日/週×3カ 月間強制経 口投与した 後に交配 さらに3カ 月間投与	0、400 mg/kg/day	雄：脾臓腫大、精細管の壊死 を伴う精巣の萎縮 生殖に対する障害なし 胎仔に対する影響なし	Ciss et al., 1980
ラット	強制経口	2世代生殖毒	0、40、80、160	親動物	経済産業省、

動物種	投与方法	投与期間	投与量	結果	文献
(SD、雌雄) (F0: 雌雄 とも5週 齢、F1は雌 雄とも3週 齢) 24匹/性/群		性試験 F ₀ 雌雄は交配 前10週間、交 配期間(交配 は最大2週間)、F ₀ 雌は妊 娠、出産、哺 乳期を通じ て投与、F ₁ の 離乳後剖検、 F ₀ 雄はF ₁ の出 産後剖検、 F ₁ はF ₀ 世代 と同様の暴 露であるが、 それに加え て母動物の 経胎盤、経乳 汁からの間 接暴露の可 能性がある	mg/kg/day	F ₀ 及びF ₁ 雌雄： 40 mg/kg 以上で肝臓及び腎 臓重量の増加 80 mg/kg 以上で体重の低値 及び摂餌効率の低下 160 mg/kg で一般状態の悪化 及び死亡がみられ、 F ₁ 雌： 160 mg/kg/day で膣開口率の 低下 仔動物 F ₁ 、F ₂ 雌雄： 80 mg/kg/day 以上で哺育期間 中の体重増加抑制 160 mg/kg/day で哺育期間中 の生存率低下 F ₁ 、F ₂ 雄： 160 mg/kg/day で肛門生殖突 起間距離の高値 親動物の全身影響での NOAELは40 mg/kg/day未満 親動物の生殖能に関する NOAELは概ね160 mg/kg/day 仔動物毒性の NOAEL は 40 mg/kg/day	2003

付表-3 反復投与毒性試験結果

動物種	投与方法	投与期間	投与量	結果	文献
マウス (B6C3F ₁ 、 雌) 6-8 週齢	強制経口	14 日間	0、200、400、600 mg/kg/day	200 mg/kg/day 以上で脾臓重量の増加傾向、400 mg/kg/day 以上で肝臓の小葉中心性肝細胞腫大 600 mg/kg/day で肝臓重量の増加	Burns et al., 1994
マウス (B6C3F ₁ 、 雌雄) 6-7 週齢	混餌	14 日間	0、675、1,250、2,500、5,000、10,000 ppm (雄 0、202、397、588、920、1548 mg/kg/day 相当; 雌 0、388、647、755、1,262、2,010 mg/kg/day 相当)	675 ppm 以上の雄で肝臓重量の増加、10,000 ppm の雌雄で体重増加抑制	US.NTP, 1992
マウス (B6C3F ₁ 、 雌雄) 6 週齢	混餌	13 週間	0、625、1,250、2,500、5,000、10,000 ppm (雄 0、131、212、439、813、1,491 mg/kg/day 相当; 雌 0、164、320、625、1,075、1,634 mg/kg/day 相当)	625 ppm 以上で肝臓の重量増加、5,000 ppm 以上で体重増加抑制、摂餌量の減少	US.NTP, 1992; Dunnick et al., 1994
ラット (F344、 雌雄) 6 週齢	混餌	14 日間	0、1,250、2,500、5,000、10,000、20,000 ppm (雄 0、106、211、446、723、869 mg/kg/day 相当; 雌 0、105、203、404、610、611 mg/kg/day 相当)	5,000 ppm 以上の雌雄で体重増加抑制、雄で脾臓のうっ血、髄外造血亢進、10,000 ppm 以上の雌で脾臓のうっ血、髄外造血亢進、20,000 ppm 雌雄で体重減少	US.NTP, 1992
ラット (F344、 雌雄) 6 週齢	混餌	13 週間	0、625、1,250、2,500、5,000、10,000 ppm (雄 0、42、82、165、342、723 mg/kg/day 相当; 雌 0、44、82、164、335、680 mg/kg/day 相当)	625 ppm 以上で脾臓の髄外造血亢進、ヘモジデリン色素沈着、うっ血(雌雄)、腎臓の硝子滴増加、ネフローゼ、2 μ -グロブリンの増加(雄)、腎臓の尿細管上皮細胞の核大型化・色素沈着(雌)、 1,250 ppm 以上で腎臓の尿細管上皮細胞の核大型化、総蛋白の減少(雄) 2,500 ppm 以上で貧血・メトヘモグロビン血症と関連した血液学的パラメータの変動* (雌雄) 5,000 ppm 以上で体重増加抑制(雌雄)、総蛋白の減少(雌)、腎臓・肝臓の相対重量増加(雄) 10,000 ppm で摂餌量の減少(雌雄)、腎臓の色素沈着(雄)、胆汁酸、尿素窒素、クレアチニンの増加(雄)、ALT の増加、腎臓・肝臓の相対重量増加(雌) *変動として赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、平均赤血球ヘモ	US.NTP, 1992; Dunnick et al., 1994

動物種	投与方法	投与期間	投与量	結果	文献
				グロビン濃度の減少、平均赤血球容積、網状赤血球数、有核赤血球数の増加、メトヘモグロビン濃度の増加	
ラット (Wistar、 雌雄)	強制経口	6 カ月間	0、400 mg/kg/day	メトヘモグロビンの形成及び血清コリンエステラーゼ活性の上昇 病理組織学的には、脾臓のヘモジデリン沈着、赤芽球の増殖	German Chemical Society, 1989