

Table 2 Hematological parameters in the young rat study of 2,4,6-trinitrophenol

Dose (mg/kg per day)	Dose-finding study†				Main study‡			
	0	20	100	0	4	20	100	
<b>Males</b>								
No. animals	3	3	3	6	6	6	6	
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	117 $\pm$ 26	94 $\pm$ 20	108 $\pm$ 21	93 $\pm$ 14	98 $\pm$ 14	112 $\pm$ 22	146 $\pm$ 38**	
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	682 $\pm$ 13	651 $\pm$ 24	646 $\pm$ 32	720 $\pm$ 32	720 $\pm$ 13	739 $\pm$ 34	661 $\pm$ 52*	
Hb (g/dL)	14.0 $\pm$ 0.6	13.8 $\pm$ 0.2	13.8 $\pm$ 0.6	14.3 $\pm$ 0.3	14.6 $\pm$ 0.5	14.8 $\pm$ 0.7	13.4 $\pm$ 0.7*	
Ht (%)	40.9 $\pm$ 1.4	41.3 $\pm$ 1.5	40.9 $\pm$ 2.7	40.9 $\pm$ 1.0	41.5 $\pm$ 1.8	42.6 $\pm$ 1.4	39.1 $\pm$ 2.2	
MCV (fL)	60.0 $\pm$ 3.1	63.4 $\pm$ 1.1	63.3 $\pm$ 1.7	56.8 $\pm$ 1.6	57.7 $\pm$ 2.3	57.8 $\pm$ 2.3	59.3 $\pm$ 2.7	
MCHC (%)	34.2 $\pm$ 0.3	33.5 $\pm$ 1.0	33.7 $\pm$ 0.9	35.0 $\pm$ 0.7	35.2 $\pm$ 0.6	34.8 $\pm$ 0.6	34.1 $\pm$ 0.5	
Ret (‰)	59.8 $\pm$ 5.6	61.1 $\pm$ 3.7	72.6 $\pm$ 8.2	31.4 $\pm$ 1.4	29.8 $\pm$ 4.1	31.6 $\pm$ 3.8	54.7 $\pm$ 7.6**	
<b>Females</b>								
No. animals	3	3	3	6	6	6	6	
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	82 $\pm$ 7	70 $\pm$ 12	98 $\pm$ 31	67 $\pm$ 18	79 $\pm$ 27	73 $\pm$ 15	123 $\pm$ 33**	
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	711 $\pm$ 6	690 $\pm$ 31	639 $\pm$ 47	706 $\pm$ 30	711 $\pm$ 47	713 $\pm$ 41	608 $\pm$ 19**	
Hb (g/dL)	14.6 $\pm$ 0.1	14.5 $\pm$ 0.3	13.5 $\pm$ 0.7*	14.2 $\pm$ 0.5	14.3 $\pm$ 0.5	14.3 $\pm$ 0.6	12.6 $\pm$ 0.3**	
Ht (%)	42.4 $\pm$ 0.3	41.4 $\pm$ 0.6	38.5 $\pm$ 1.7**	39.3 $\pm$ 1.2	40.3 $\pm$ 1.9	40.3 $\pm$ 1.8	37.3 $\pm$ 0.9	
MCV (fL)	59.6 $\pm$ 0.8	60.0 $\pm$ 3.6	60.3 $\pm$ 1.8	55.8 $\pm$ 0.9	56.9 $\pm$ 3.4	56.6 $\pm$ 1.7	61.4 $\pm$ 2.4**	
MCHC (%)	34.5 $\pm$ 0.4	35.2 $\pm$ 0.3	35.0 $\pm$ 0.3	36.2 $\pm$ 0.9	35.6 $\pm$ 0.6	35.6 $\pm$ 0.7	33.9 $\pm$ 0.3**	
Ret (‰)	37.6 $\pm$ 1.5	39.6 $\pm$ 6.9	56.3 $\pm$ 3.6**	25.5 $\pm$ 4.6	25.2 $\pm$ 1.0	24.1 $\pm$ 3.3	65.5 $\pm$ 5.9*	

†Rats were killed at 7 weeks of age; ‡rats were killed at 9 weeks of age. Values are given as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  indicate significantly different from control group. Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, red blood cell count; Ret, reticulocyte ratio; WBC, white blood cell count.

Table 3 Organ weights in the young rat study of 2,4,6-trinitrophenol

Dose (mg/kg per day)	Dose-finding study†			Main study‡			Main study (at the end of recovery period)§			
	0	20	100	0	4	20	100	0	6	100
<b>Males</b>										
No. animals	3	3	3	6	6	6	6	6	6	6
Body weight¶ (g)	267 ± 15	257 ± 7	276 ± 9	374 ± 12	380 ± 31	384 ± 35	367 ± 27	449 ± 20	529 ± 43	529 ± 43
Liver (g)	10.8 ± 0.4	10.9 ± 0.7	12.2 ± 0.2*	14.2 ± 1.3	14.0 ± 0.9	14.4 ± 1.8	15.6 ± 1.1	15.5 ± 1.1	14.8 ± 2.2	14.8 ± 2.2
(g/100 g BW)	(4.04 ± 0.12)	(4.26 ± 0.39)	(4.43 ± 0.17)	(3.79 ± 0.31)	(3.69 ± 0.19)	(3.73 ± 0.23)	(4.24 ± 0.24)*	(3.46 ± 0.22)	(3.45 ± 0.20)	(3.45 ± 0.20)
Spleen (g)	0.77 ± 0.10	0.75 ± 0.03	0.91 ± 0.07	0.82 ± 0.08	0.76 ± 0.08	0.89 ± 0.19	1.18 ± 0.16**	0.86 ± 0.09	0.84 ± 0.07	0.84 ± 0.07
(g/100 g BW)	(0.29 ± 0.03)	(0.29 ± 0.02)	(0.33 ± 0.02)*	(0.22 ± 0.02)	(0.20 ± 0.02)	(0.23 ± 0.03)	(0.32 ± 0.03)**	(0.19 ± 0.02)	(0.20 ± 0.01)	(0.20 ± 0.01)
Kidneys (g)	2.29 ± 0.25	2.12 ± 0.16	2.39 ± 0.12	2.62 ± 0.13	2.57 ± 0.13	2.81 ± 0.33	2.72 ± 0.13	2.85 ± 0.23	2.92 ± 0.31	2.92 ± 0.31
(g/100 g BW)	(0.86 ± 0.06)	(0.83 ± 0.04)	(0.87 ± 0.02)	(0.70 ± 0.03)	(0.68 ± 0.05)	(0.73 ± 0.06)	(0.74 ± 0.03)	(0.64 ± 0.05)	(0.68 ± 0.04)	(0.68 ± 0.04)
Testes (g)	-	-	-	3.08 ± 0.32	3.09 ± 0.19	3.13 ± 0.25	3.29 ± 0.35	3.30 ± 0.09	2.64 ± 1.07	2.64 ± 1.07
(g/100 g BW)	-	-	-	(0.82 ± 0.09)	(0.82 ± 0.06)	(0.82 ± 0.05)	(0.90 ± 0.05)	(0.74 ± 0.03)	(0.61 ± 0.22)	(0.61 ± 0.22)
Epididymides (g)	-	-	-	0.82 ± 0.06	0.78 ± 0.06	0.78 ± 0.07	0.63 ± 0.10**	1.10 ± 0.07	0.82 ± 0.11**	0.82 ± 0.11**
(g/100 g BW)	-	-	-	(0.22 ± 0.02)	(0.21 ± 0.02)	(0.20 ± 0.01)	(0.17 ± 0.03)**	(0.24 ± 0.01)	(0.20 ± 0.03)**	(0.20 ± 0.03)**
<b>Female</b>										
No. animals	3	3	3	6	6	6	6	6	6	6
Body weight¶ (g)	165 ± 9	172 ± 4	175 ± 8	242 ± 19	241 ± 17	237 ± 29	233 ± 14	283 ± 18	270 ± 19	270 ± 19
Liver (g)	6.4 ± 0.8	6.7 ± 0.1	8.0 ± 0.6*	8.2 ± 0.7	8.0 ± 0.8	8.2 ± 1.5	9.7 ± 1.2	9.3 ± 0.7	9.3 ± 1.1	9.3 ± 1.1
(g/100 g BW)	(3.85 ± 0.28)	(3.90 ± 0.07)	(4.54 ± 0.23)*	(3.38 ± 0.11)	(3.32 ± 0.15)	(3.45 ± 0.19)	(4.16 ± 0.27)**	(3.27 ± 0.15)	(3.43 ± 0.27)	(3.43 ± 0.27)
Spleen (g)	0.49 ± 0.13	0.45 ± 0.13	0.56 ± 0.05	0.51 ± 0.08	0.58 ± 0.05	0.54 ± 0.08	0.98 ± 0.12**	0.60 ± 0.10	0.63 ± 0.09	0.63 ± 0.09
(g/100 g BW)	(0.30 ± 0.06)	(0.26 ± 0.08)	(0.32 ± 0.01)	(0.21 ± 0.04)	(0.24 ± 0.02)	(0.23 ± 0.20)	(0.42 ± 0.05)**	(0.21 ± 0.02)	(0.23 ± 0.02)	(0.23 ± 0.02)
Kidneys (g)	1.40 ± 0.03	1.45 ± 0.13	1.52 ± 0.17	1.77 ± 0.16	1.73 ± 0.20	1.67 ± 0.20	1.86 ± 0.17	1.82 ± 0.12	1.86 ± 0.10	1.86 ± 0.10
(g/100 g BW)	(0.85 ± 0.03)	(0.84 ± 0.07)	(0.87 ± 0.11)	(0.74 ± 0.07)	(0.71 ± 0.04)	(0.71 ± 0.05)	(0.80 ± 0.06)	(0.65 ± 0.06)	(0.69 ± 0.06)	(0.69 ± 0.06)

†Rats were killed at 7 weeks of age; ‡rats were killed at 9 weeks of age; §rats were killed at 11 weeks of age; ¶body weight (BW) after overnight starvation following the last dosing. Values are given as the mean ± SD. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  indicate significantly different from control group. -, no data.

noted at the end of the recovery period. At this dose in females, significantly higher values of relative liver weight (23% increased) and relative spleen weight (100% increased) were noted. No other changes related to the administration of TNP were found.

At the end of the dosing period, enlargement of the spleen and erosion or ulcers in the cecum were observed in males and females at 100 mg/kg per day. Small testes were found at 100 mg/kg per day at the end of the recovery period.

The histopathological findings are summarized in Table 4. Significant changes were noted at 100 mg/kg per day. Spleens with the development of a germinal center and extramedullary hematopoiesis were observed in males and females at 100 mg/kg per day at the end of the dosing period. Hemosiderin deposition in the spleen was found in males and females at 100 mg/kg per day at the end of the dosing and recovery periods. Centrilobular hypertrophy of hepatocytes in the liver and ulcers in the cecum were observed in males and females at 100 mg/kg per day at the end of the dosing period. Testes with diffuse atrophy of seminiferous tubules were noted at 100 mg/kg per day at the end of the dosing period, and severe atrophy was observed at the end of the recovery period. A decreased number of sperm and lumen with cell debris were observed in the epididymides at 100 mg/kg per day at the end of the dosing and recovery periods.

There were no consistent changes related to the administration of TNP in biochemical parameters for blood or urine.

## DISCUSSION

In the present study, we re-evaluated the toxicity of TNP in young rats in terms of the NOAEL and toxicity profile, and determined the toxicity of this chemical in newborn rats, then compared the toxicity in newborn and young rats. We showed here that TNP had a markedly different toxicity profile between newborn and young rats.

As for the yellowish fur in all newborn and young rats treated with TNP, their hair roots and skin showed no anomalies therefore it does not seem to be an adverse effect of TNP.

In the newborn rat study, the major toxicity was death and low BW without any other toxicologically significant changes at 81.4 mg/kg per day in the dose-finding study. Deaths occurred in days 3–7 after dosing onset. At the lower dose, 65.1 mg/kg per day in the main study, a slightly low BW in males was observed only at 4 and 8 days after dosing onset. This slight and transient loss of BW might be accepted as having no toxicological significance in general, but we considered it to be closely related to the death that occurred at the higher dose, 81.4 mg/kg per day, because death and low BW were observed on the same days after dosing onset (late in the first week). Slight changes in relative liver and

kidney weights were observed but not considered toxicologically significant because there were no changes in biochemical and urinary parameters, or histopathological findings. Based on low BW at 65.1 mg/kg per day in males, the NOAEL for newborn rats was considered 16.3 mg/kg per day.

In the MHLW (2001) report, the NOEL was concluded 4 mg/kg per day based on yellowish fur and decreased level of urine potassium in young rats. The major adverse effects of TNP were hemolytic anemia and testicular toxicity without death or changes of BW at 100 mg/kg per day in the main study with young rats. No toxic effects were detected at 20 mg/kg per day or less after administration of TNP in the dose-finding or main study with young rats. Based on these findings, we re-evaluated that the NOAEL for young rats was considered 20 mg/kg per day.

TNP, at 81.4 mg/kg per day or more, caused behavioral changes in the newborn rat study but not in the young rat study at 100 mg/kg per day. The immature blood-brain barrier in newborn rats may explain these phenomena. The diffusional resistance is primarily the result of tight junctions between endothelial cells, the absence of pores within the cells and a thicker, more developed basement membrane surrounding each cell (Reese & Karnovsky 1967; Scheuplein *et al.* 2002). In rats, capillary diffusion decreases during postnatal weeks 3–4 (Bär & Wolff 1972).

Histopathological and hematological examinations revealed hemolytic anemia as evidenced by reductions of RBC and Hb and hemosiderin deposition and extramedullary hematopoiesis in spleen at 100 mg/kg per day in the young rat study, but not in the newborn rat study at 81.4 mg/kg per day. Hemolytic anemia can be induced by various kinds of medicines and chemicals including some aromatic amines due to oxidation (Bloom & Brandt 2001). TNP may not be the causal substance because it occurred in young rats but not in newborn rats whose metabolic capacity is immature, such as lower total cytochrome P-450 levels (Imaoka *et al.* 1991). Thus, TNP metabolites might be the cause. As for absorption and excretion of TNP in rats, Wyman *et al.* (1992) reported that fasted rats would absorb about 60% of orally treated TNP in 24 h and the main metabolite was picramic acid following oral dosing in rats. Picramic acid, a type of aromatic amine, would be the most likely candidate, although there is no evidence of hemolytic anemia caused by picramic acid. The information together suggests that the absence of hemolytic anemia in newborn rats may be due to insufficient amounts of picramic acid produced as a metabolite of TNP.

As for the testicular toxicity, degenerating primary spermatocytes and alterations in Sertoli cells were caused by di(2-ethylhexyl) phthalate in 5-week-old, but not 3-week-old, rats (Sjöberg *et al.* 1985). TNP also had toxic effects on the testes and epididymides in young rats, but not in

**Table 4** Histopathological findings at the end of dosing and recovery periods in the young rat main study of 2,4,6-trinitrophenol

Dose (mg/kg per day)	Dosing period†				Recovery period‡	
	0	4	20	100	0	100
<b>Males</b>						
No. animals examined	6	6	6	6	6	6
<b>Spleen</b>						
Development, germinal center	+	0	0	5	*	0
Extramedullary hematopoiesis, erythrocyte	+	0	0	6	**	0
Hemosiderin deposition	Total	0	0	4		0
	+	0	0	3		6
	++	0	0	1		0
						**
<b>Cecum</b>						
Ulcer	Total	0	0	4		0
	+	0	0	1		0
	++	0	0	2		0
	+++	0	0	1		0
<b>Liver</b>						
Hypertrophy, hepatocytes, centrilobular	+	0	0	4		0
<b>Testis</b>						
Atrophy, seminiferous tubules, diffuse	Total	0	0	6		0
	+	0	0	6	**	5
	++	0	0	0		2
						*
<b>Epididymis</b>						
Cell debris, lumen	Total	0	0	4		0
	+	0	0	3		1
	++	0	0	1		0
Decrease in sperm	Total	0	0	6		0
	+	0	0	5	**	3
	++	0	0	1		0
	+++	0	0	0		1
						2
<b>Females</b>						
No. animals examined	6	6	6	6	6	6
<b>Spleen</b>						
Development, germinal center	+	0	0	5	*	0
Extramedullary hematopoiesis, erythrocyte	+	0	0	6	**	0
Hemosiderin deposition	Total	0	0	6		0
	+	0	0	3	**	6
	++	0	0	3		0
						**
<b>Cecum</b>						
Ulcer	++	0	0	3		0
<b>Liver</b>						
Hypertrophy, hepatocytes, centrilobular	+	0	0	3		0

Grade sign: +, mild; ++, moderate; +++, marked. †Rats were killed at 7 weeks of age; ‡rats were killed at 9 weeks of age. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  indicate significantly different from control group.

newborn rats. The Sertoli cells play an important role in the establishment and maintenance of the specific microenvironment of the adluminal compartment of the seminiferous epithelium and this is a prerequisite for normal spermatogenesis (Sjöberg *et al.* 1986). In rats, Sertoli cells proliferate rapidly from day 19 of gestation to PND 15, then slow down and cease multiplying on approximately PND 20 (Orth 1982, Orth 1984; Toppari *et al.* 1996). The dosing periods were PND 4–21 and postnatal weeks 5–8 in the newborn and young rat studies, respectively. Therefore, TNP seems unlikely to affect the differentiation and proliferation of Sertoli cells, and seems likely to affect the maturation of spermatids, although it remains to be elucidated whether this is a direct effect of TNP or some kind of TNP metabolite.

In conclusion, in the newborn rat study, the NOAEL for TNP were 16.3 mg/kg per day, low BW at 65.1 mg/kg per day or more, and death at 81.4 mg/kg per day were observed. In the young rat study, the NOAEL for TNP were 20 mg/kg per day and hemolytic anemia and testicular toxicity were found at 100 mg/kg per day.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Office of Chemical Safety, Pharmaceutical and Medical Safety Bureau, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

### REFERENCES

- Bär TH, Wolff JR (1972) The formation of the capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. *Z Zellforsch* **133**: 231–248.
- Bloom JC, Brandt JT (2001) Toxic responses of the blood. In: Klaassen CD (ed.) *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 6th edn. McGraw-Hill, New York, p397.
- Fomon SJ, Haschke F, Ziegler EE, Nelson SE (1982) Body composition of reference children from birth to age 10 years. *Am J Clin Nutr* **35**: 1169–1175.
- Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M *et al.* (2004) Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. *Toxicol Lett* **150**: 145–155.
- Health Council of the Netherlands (2002) *Health-based Reassessment of Administrative Occupational Exposure Limits – Picric Acid*. Committee on Updating of Occupational Exposure Limits, a committee of the Health Council of the Netherlands. Health Council of the Netherlands, the Netherlands.
- Imaoka S, Fujita S, Funae Y (1991) Age-dependent expression of cytochrome P-450s in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1097**: 187–192.
- Kearns GL, Reed MD (1989) Clinical pharmacokinetics in infants and children: A reappraisal. *Clin Pharmacokinet* **17**: 29–67.
- Koizumi M, Nishimura N, Enami T *et al.* (2002) Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. *J Toxicol Sci* **27**: 411–421.
- Koizumi M, Noda A, Ito Y *et al.* (2003) Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. *J Toxicol Sci* **28**: 59–70.
- Koizumi M, Yamamoto Y, Ito Y *et al.* (2001) Comparative study of toxicity of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats. *J Toxicol Sci* **26** (5): 299–311.
- Ministry of Health and Welfare Japan (1988) *Standard Concerning Testing Facility Provided in Article 4 of Order Prescribing Test Items Relating to New Chemical Substances and Toxicity Research of Designated Chemical Substances*. Planning and Coordination Bureau, Environment Agency, No. 39, Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare, No. 229. Basic Industries Bureau, Ministry of International Trade and Industry, No. 85, March 31, 1984, and amendments, November 18, 1988. MHW, Japan.
- Ministry of Health, Labour, Welfare Japan (2001) 2,4,6-trinitrophenol (88–89–1). *Toxicity Testing Reports Environmental Chemicals*. MHLW, Japan, 8: 238–243.
- National Research Council USA (1993) *Pesticides in the Diets of Infants and Children*. NRC, USA. National Academy Press, Washington DC.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (1981) *OECD Principles of Good Laboratory Practice*. OECD, Paris.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) *OECD Principles of Good Laboratory Practice* (as revised in 1997). OECD, Paris.
- Orth JM (1982) Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* **203**: 485–492.
- Orth JM (1984) The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* **115**: 1248–1255.
- Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood–brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* **34**: 207–217.
- Scheuplein R, Charnley G, Dourson M (2002) Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* **35**: 429–447.
- Schwenk M, Gundert-Remy U, Heinemeyer G *et al.* (2002) Children as a sensitive subgroup and their role in regulatory toxicology: DGPT workshop report. *Arch Toxicol* **77**: 2–6.
- Sjöberg POJ, Bondesson UG, Sedin EG, Gustafsson JP (1985) Exposure of newborn infants to plasticizers: Plasma levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-

- (2-ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion. *Transfusion* **25**: 424-428.
- Sjöberg P, Lindqvist NG, Plöen L (1986) Age-dependent response of the rat testes to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* **65**: 237-242.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P et al. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* **104** (Suppl. 4): 741-803.
- US Environmental Protection Agency (1998) *The EPA Children's Environmental Health Yearbook*. US EPA, Washington DC.
- World Health Organization (1986) *Principles for Evaluating Risks from Chemicals during Infancy and Early Childhood: The Need for a Special Approach*. WHO, Geneva.
- Wyman JF, Serve MP, Hobson DW, Lee LH, Uddin DE (1992) Acute toxicity, distribution, and metabolism of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health* **37**: 313-327.

REVISION AND ESTABLISHMENT OF JAPANESE DRINKING WATER  
QUALITY GUIDELINES FOR DI(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE,  
TOLUENE AND VINYL CHLORIDE  
– DIFFERENCES FROM THE LATEST WHO GUIDELINE DRAFTS –

Akihiko HIROSE<sup>1</sup>, Ryuichi HASEGAWA<sup>2</sup>, Akiyoshi NISHIKAWA<sup>3</sup>,  
Mika TAKAHASHI<sup>1</sup> and Makoto EMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Division of Risk Assessment,*

<sup>2</sup>*Division of Medicinal Safety Science and <sup>3</sup>Division of Pathology,*

*National Institute of Health Sciences,*

*1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

(Received June 23, 2004; Accepted October 7, 2004)

**ABSTRACT** — The revision of the Japanese drinking water quality guidelines was established in May 2003. The WHO drinking water quality guidelines for the 3<sup>rd</sup> edition were also revised and the draft has been open to the public since last year. Most guideline values of each chemical in both Japan and WHO were quite similar; however, there are different overt values for three chemicals. In this short communication, we describe them and discuss the reason for taking the different toxicity endpoints and derivation method for these three chemicals, di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride.

**KEY WORDS:** Drinking water quality guidelines, Di(2-ethylhexyl) phthalate, Toluene, Vinyl chloride

## INTRODUCTION

The revision of the Japanese drinking water quality guideline was established in May 2003 and implemented on May 2004. In this revising, regulated chemical lists were modified because of the past detection trend or exposure prospect. The chemicals already listed in the previous version were reevaluated and chemicals newly listed in this revision were assessed with the latest toxicity information. The Japanese guidelines derivation has referred to the concurrent WHO revision, and both of the general principles for the guidelines (GD) derivation are almost the same. Although most guideline values of chemicals in Japan were similar to those of WHO, some minor differences between WHO and Japan exist because of different default body weight application for the guideline calculation (50 kg/Japan vs. 60 kg/WHO). Furthermore, in some cases, different drinking water contribution ratios (allocation) to total exposure media were used for the guideline values calculation from tolerable daily intake

(TDI) on account of the regional chemical exposure assessment. These differences were not owing to the difference of health risk assessment per se. However, the different guideline values for di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), toluene and vinyl chloride between the Japanese guidelines revision (2003) and the latest rolling revision of WHO drinking water quality guideline were mainly caused by the health risk assessment variation. In this short communication, we describe the reason for taking the different toxicity endpoints or derivation method of the guidelines. Table 1 shows the guideline values for three chemicals of the WHO 2<sup>nd</sup> edition (WHO, 1996) established in 1994 and rolling revision in 2003, and previous and present Japanese versions.

## DERIVATION OF GUIDELINE VALUES

### Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)

As the guideline value of DEHP by the WHO 2<sup>nd</sup> edition, 0.008 mg/L was derived from a no observed

adverse effect level (NOAEL) of 2.5 mg/kg/day in a rat feeding study (Morton, 1979) for 7 days according to no induction of hepatic peroxisome proliferation. The hepatic tumors were considered to be the most critical endpoint and hepatic peroxisome proliferation to be closely related to the carcinogenic mechanism. An uncertainty factor of 100 was applied only because of the animal most sensitive to peroxisome proliferation, and the allocation of 1% that was used as DEHP is generally not contained in food (WHO, 1996). For the latest WHO assessment, the guideline value of DEHP was not changed from the 2<sup>nd</sup> edition, because it was not listed for the detailed reevaluation.

In 1994, the Japanese government decided to use the same data and derivation method for domestic drinking water guidelines except for 10% allocation and 50 kg instead of 60 kg for human body weight. The guideline value was 0.06 mg/L.

However, the Japanese government established a TDI for DEHP in 2001 when high contamination was found in some specific foods and the health risk was deeply concerned (Koizumi *et al.*, 2001). In this assessment, TDI ranging from 40 to 140 µg/kg/day was established from a NOAEL of 3.7 mg/kg/day for testicular toxicity in a rat study (Poon *et al.*, 1997) and 14 mg/kg/day for reproductive toxicity in a mouse study (Lamb *et al.*, 1987), respectively, applying an uncertainty factor of 100 for intra- and interspecies differences. As for hepatic peroxisome proliferation, it was taken out for extrapolation to humans because IARC (2000) concluded that the hepatic tumor due to DEHP in rodents (in association with peroxisome proliferation) is not relevant to other animal species including humans (Group 3). Although it is clearly shown that there are strong species differences in testicular toxicity such as severely toxic in rats and guinea pigs, weakly in mice but not in hamsters, marmosets and cynomolgus monkeys, the potential of testicular toxicity in humans cannot be excluded at this moment. Therefore, the guideline of 0.1 mg/L was derived from

40 µg/kg/day of TDI using 10% of allocation, and 2 L of daily water intake for 50 kg body weight of the Japanese population.

#### Toluene

In 1994, WHO tried to re-assess the toxicity data of toluene and made the same conclusion as the previous value, 0.7 mg/L. A TDI of 0.223 mg/kg/day was derived using the lowest observed adverse effect level (LOAEL) for marginal hepatotoxicity in mice of 312 mg/kg/day (equivalent to 223 mg/kg/day, as there were 5 days per week) (NTP, 1990) and applying an uncertainty factor of 1,000 (100 for inter- and intra-species variation and 10 for the short duration of the study and use of a LOAEL instead of a NOAEL). This TDI yields a guideline value of 0.7 mg/L (rounded figure), allocating 10% of the TDI to drinking-water (WHO, 1996).

The Japanese government used the same data and derivation method for the domestic drinking water guideline except for 50 kg instead of 60 kg for human body weight. The guideline value was established as 0.6 mg/L in 1994.

For the new revision, the Japanese Government used a different toxicity endpoint, neurotoxicity, which is the most typical toxicity for toluene. In the case of neurotoxicity with histopathological changes as well as carcinogenicity and developmental toxicity without maternal toxicity, some additional uncertainty factors should be considered to derive a TDI. Toluene showed neuropathological effects in the brain consisting of neuronal cell necrosis in the dentate gyrus and Ammon's horn of the hippocampus at 1250 and 2500 mg/kg/day. NOAEL for neurotoxicity was 625 mg/kg/day (equivalent to 446 mg/kg/day, as there were 5 days per week) and a TDI of 0.0892 mg/kg/day was derived by application of an uncertainty factor of 5,000 including additional uncertainty factors of 5 for short exposure duration and 10 for neuropathological changes. This TDI yields a guideline value of 0.2 mg/L (rounded figure), allocating 10% of the TDI to drinking-water.

**Table 1.** Comparison of three guideline values (mg/L) between WHO and Japanese drinking water.

	WHO Guideline		Japanese Guideline	
	1994 (2 <sup>nd</sup> ed.)	Revising 2003 (3 <sup>rd</sup> ed.)	1994	2003
DEHP	0.008	0.008*	0.06	0.1
Toluene	0.7	0.7	0.6	0.2
Vinyl chloride	0.005	0.0003	No setting	0.002

\*: No detailed reevaluation draft.



### Vinyl chloride

It has been generally accepted that a mathematical model such as a linearized multistage is appropriate to estimate a low-dose cancer risk of a genotoxic carcinogen. There is sufficient evidence showing that vinyl chloride is a multiple site carcinogen and its metabolites are genotoxicants. Table 2 shows the incidences of hepatic tumor-related lesions in studies reported by Feron *et al.* (1981) and Til *et al.* (1991).

In the WHO 2<sup>nd</sup> edition, a linearized multistage model was applied to the incidence of angiosarcomas in female rats which was reported by Feron *et al.* (1981) only because of a good relationship with the human incidence at that time. An excess cancer risk at 10<sup>-5</sup> was 0.010 mg/L. The guideline value was 0.005 mg/L, applying an uncertainty factor of 2 for double risk by exposure from birth (WHO, 1996).

On the other hand, in the WHO rolling revision, total liver tumors (angiosarcomas, hepatocellular carcinomas and neoplastic nodules) from the same study are incorporated to derive the guideline value including conversion to human equivalent doses (using the physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model of U.S. EPA, 2000, Clewell *et al.*, 2001). A linear low-

dose extrapolation was conducted by drawing a straight line between 10% of the low estimate dose (Benchmark dose approach) and the origin (zero dose). The results were nearly identical with those derived using the linearized multistage model. The concentrations in drinking-water of 0.0005 mg/L were calculated as being associated with excess risks of liver tumors of 10<sup>-5</sup> for lifetime exposure beginning at adulthood. Exposure from birth would double this risk (U.S. EPA, 2000). This would result in a rounded guideline value of 0.0003 mg/L for a theoretical risk of 10<sup>-5</sup>.

The guideline for vinyl chloride was not set in the previous Japanese guideline.

As described in Table 2, Feron *et al.* (1981) obtained clear evidence of carcinogenicity in rat liver in a three-dose setting study but the low dose of 1.7 mg/kg/day was still carcinogenic in female rats. The same group (Til *et al.*, 1991) conducted a further study up to 0.014 mg/kg/day and showed that the middle dose of 0.13 mg/kg/day was a non-carcinogenic dose. As both studies had been conducted under mostly the same experimental conditions, these data would be considered from a single study with doses ranging 1,000 times. For derivation of the newly established

**Table 2.** Summary incidence of hepatic tumor-related lesions for two rat carcinogenicity studies conducted by the same group.

mg/kg/day	Til <i>et al.</i> , 1991				Feron <i>et al.</i> , 1981			
	0	0.014	0.13	1.3	0	1.7	5.0	14.1
<b>Male</b>								
Neoplastic	0/99 <sup>a</sup>	0/99	0/99	1/49	0/55	1/58	7*/56	23*/59
nodules	(0) <sup>b</sup>	(0)	(0)	(2.0)	(0)	(1.7)	(12.5)	(39.0)
Hepatocellular	0/99	0/99	0/99	3*/49	0/55	1/58	7*/56	23*/59
carcinoma	(0)	(0)	(0)	(6.1)	(0)	(1.7)	(12.5)	(39.0)
Angiosarcomas	0/99	0/99	0/99	1/49	0/55	1/58	2/56	8*/59
	(0)	(0)	(0)	(2.0)	(0)	(1.7)	(3.6)	(13.6)
<b>Female</b>								
Neoplastic	0/98	0/100	1/96	9*/49	2/57	26**/58	39*/59	44*/57
nodules	(0)	(0)	(1.0)	(18.4)	(8.8)	(44.8)	(66.1)	(77.2)
Hepatocellular	1/98	0/100	1/96	3/49	0/57	4*/58	19*/59	29*/57
carcinoma	(1.0)	(0)	(1.0)	(6.1)	(0)	(6.9)	(33.2)	(50.9)
Angiosarcomas	0/98	0/100	0/96	2/49	0/57	0/58	2/59	9*/57
	(0)	(0)	(0)	(4.1)	(0)	(0)	(3.4)	(15.8)
Total liver					2/57	28/58	49/59	56/57
tumors <sup>c</sup>					(8.8)	(48.2)	(83.1)	(98.2)

<sup>a</sup>: Number of lesion-bearing animals / number of analyzed animals.

<sup>b</sup>: Percentages of incidences.

<sup>c</sup>: The total number of animals with tumors derived from US IRIS(2000) / number of analyzed animals.

Statistically significant compared to the controls with \*p<0.05 or \*\*p<0.01 was reported in the original articles.

Japanese guideline value, the neoplastic nodules were not taken into account for the following reasons. As there was no diagnosis of nodular hyperplasia in those reports, there is a possibility that the neoplastic nodules may include not only hepatocellular adenoma but also nodular hyperplasia, which is not considered to be a neoplastic lesion. The high incidence of neoplastic nodules at 1.7 mg/kg/day in females quickly dropped to less than half at 1.3 mg/kg/day and virtually no incidence at 0.13 mg/kg/day. This dose-response may not be appropriate for extrapolation to low doses. The incidence slope of total liver tumors mostly reflected the high incidence of neoplastic nodules rather than the real cancer incidence. In addition, because hepatocellular carcinomas and angiosarcomas originate from different cells, liver and vascular cells respectively, the evaluation of combined incidences may draw a conflicting conclusion. Therefore, the dose-response incidences of hepatocellular carcinoma in female rats were considered to be most appropriate for application to dose-response analysis, in view of data from the two reports. After dose conversion based on the PBPK model, an excess risk of  $10^{-5}$  by the multistage model was calculated to be 0.0875 mg/kg/day as a virtual

safety dose (VSD). The guideline of 0.002 mg/L was derived using 2 L of daily water intake for 50 kg body weight of the Japanese population. The allocation factor was not applied for the mathematical model approach because of large uncertainty caused by highly lower dose extrapolation.

## DISCUSSION

Table 3 summarizes the derivation processes of all three chemicals. Although the detailed reevaluation draft for DEHP has not been published in the 3<sup>rd</sup> WHO water quality guideline, it was presumed that the derivation process would be same as the 2<sup>nd</sup> edition because were no changed guideline values. The general principle for the derivation of TDI and VSD is the same between Japan and WHO; however, the difference in the choice of critical endpoints leads to varied guideline values. In the Japanese assessment, testicular toxicity of DEHP and neurotoxicity of toluene were used to derive a TDI instead of their hepatotoxicity adopted by WHO. In the case of vinyl chloride, the same critical study was used for the guideline derivation, but the adopted neoplastic endpoints were differ-

Table 3. Summary of guideline value derivation in WHO (3<sup>rd</sup> ed.) and Japan (2003).

endpoint	NOAEL (mg/kg/day)	uncertainty factor					TDI or VSD* (mg/kg/day)	allocation (%)	body weight (kg)	water consump. (L)	guideline value (mg/L)
		inter- species	intra- species	use of LOAEL	study period	nature of toxicity					
DEHP(WHO) <sup>‡</sup>											
hepatic peroxisome proliferation	2.5	10	10				0.025	1	60	2	0.008
DEHP(Japan)											
testicular toxicity	3.7	10	10				0.04	10	50	2	0.1
Toluene(WHO)											
hepatotoxicity	223	10	10	10			0.223	10	60	2	0.7
Toluene(Japan)											
neurotoxicity	446	10	10		5	10	0.0892	10	50	2	0.2
Vinyl chloride(WHO)											
total liver tumors (angiosarcoma, hepatocellular carcinoma and neoplastic nodules)											0.0003 <sup>§</sup>
Vinyl chloride(Japan)											
hepatocellular carcinoma							0.0875*		50	2	0.002

<sup>‡</sup>: Derived from the 2<sup>nd</sup> edition.

<sup>§</sup>: At the initial calculation from experimental animal data, the guideline concentration of 0.0005 mg/L was derived as  $10^{-5}$  excess risk concentration during adulthood. Then the concentration was decreased to half because of doubled risk for exposure from birth.

\*: Virtual safety dose corresponding to an excess cancer risk of  $10^{-5}$ .

## Revision of the Japanese drinking water quality guidelines.

ent from each other because of the different interpretation on the cancer risk assessment. The adverse effects in experimental animals for the human health assessment are chosen by consideration of appropriate extrapolation to humans, which is expected from the nature of the toxicity, toxicity mechanism, etc. With regard to taking appropriate toxicity endpoints for derivation, the latest Japanese decision is considered to be more suitable on the basis of recent scientific consideration as described before. Because the revisions for the 3<sup>rd</sup> edition of water quality guidelines in the WHO are still ongoing, the assessment and the guideline value may be changed until the fixed version is published.

As for the derivation of the guideline value from the TDI, the estimation of the exposure contribution ratio (the allocation) is another important issue. In the case of DEHP, both levels of TDIs or NOAELs estimated in Japan and WHO are similar, although the critical endpoints are different. The guideline values were different at one order of degree from each other, because the allocation factor for drinking water of the TDI estimated in WHO was one-tenth of that in Japan. The allocation depends on environmental circumstances as well as chemical physical properties, and local exposure assessment is necessary for the estimation of the allocation factor of the respective chemical. Although the DEHP exposure contribution for drinking water in the WHO 2<sup>nd</sup> edition was estimated to be considerably lower, the allocation of 10% was applied in Japan as the default value when the exposure assessment was not elucidated.

Given the risk management of drinking water supplied by the Waterworks, the derivation of the guideline values of chemicals may be a regional issue. However, a large amount of drinking water bottled as mineral water has been circulating worldwide and the regulated values of chemicals will also be based on the drinking water guideline. Therefore the need for the international harmonization of chemical risk assessment will be required even more in the future.

## REFERENCES

- Clewell, H.J., Gentry, P.R., Gearhart, J.M., Allen, B.C. and Andersen, M.E. (2001): Comparison of cancer risk estimates for vinyl chloride using animal and human data with a PBPK model. *Sci. Total. Environ.*, **274**, 37-66.
- Feron, V.J., Hendriksen, C.F.M., Speck, A.J., Til, H.P. and Spit, B.J. (1981): Lifespan oral toxicity study of vinyl chloride in rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, **19**, 317-333.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2000): Some industrial chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 77, Lyon, 41-148.
- Koizumi, M., Ema, M., Hirose, A., Kurokawa, Y. and Hasegawa, R. (2001): No observed adverse effect levels of phthalate esters on reproductive and developmental toxicity, the differences with age and species in testicular toxicity, and tolerable daily intake of DEHP. *Jpn. J. Food Chem.*, **8**, 1-10 (Japanese).
- Lamb, J. C.IV, Chapin, R.E., Teague, J., Lawton, A.D. and Reel, J. (1987): Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 255-269.
- Morton, S.J. (1979): The hepatic effects of dietary di-2-ethylhexyl phthalate. Ann Arbor, MI, Johns Hopkins University, 1979 (dissertation; abstract in *Dissertation abstracts international*, 1979, **B 40**, 4236).
- National Toxicology Program (NTP) (1990): Toxicology and carcinogenesis studies of toluene (CAS no. 108-88-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). NTP Technical Report Series No. 371, US Department of Health and Human Services (NIH Publication No. 90-2826).
- Poon, R., Lecavalier, P., Mueller, R., Valli, V.E., Procter, B. G. and Chu, I. (1997): Subchronic oral toxicity of di-*n*-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 2225-2239.
- Til, H.P., Feron, V.J. and Immel, H.R. (1991): Lifetime (149-week) oral carcinogenicity study of vinyl chloride in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **29**, 713-718.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (2000): Vinyl chloride (CASRN 75-01-4) on Integrated Risk Information System (IRIS). <http://www.epa.gov/iris/> (available only on line)
- World Health Organization (WHO) (1996): Guidelines for drinking-water quality, Volume 2, Health criteria and other supporting information. Second ed., World Health Organization, Geneva.

## OECD 化学物質対策の動向 (第 5 報)

## 第 12 回及び第 13 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2001 年)

高橋美加・平田睦子・松本真理子・広瀬明彦・鎌田栄一・長谷川隆一・江馬 眞\*

## Progress on OECD Chemicals Programme

Mika Takahashi, Mutsuko Hirata, Mariko Matsumoto, Akihiko Hirose, Eiichi Kamata,  
Ryuichi Hasegawa and Makoto Ema\*

The twelfth SIDS, the Screening Information Data Set, Initial Assessment Meeting (SIAM 12) was held at the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) headquarters in Paris, France and SIAM 13 was held in Bern, Switzerland, hosted by the European Commission. Two substances at SIAM 12 (CAS No:91-15-6, 123-77-3) and 4 substances at SIAM 13 (CAS No:91-76-9, 112-85-6, 868-77-9, 1477-55-0) were submitted by the Japanese Government and/or International Council of Chemical Associations (ICCA). These substances were agreed at the meetings. In this report, the human health effects of 6 substances above-mentioned are introduced.

Keywords: OECD, HPV program, SIAM, SIDS Initial Assessment Meeting

## はじめに

経済協力開発機構 (Organization for Economic Cooperation and Development: OECD) 加盟各国における高生産量化学物質 (High Production Volume Chemical: HPV) の安全性は、1992 年に始まった OECD 高生産量化学物質点検プログラム (HPV program) によって評価されている<sup>1)</sup>。加盟各国での生産量・既存の毒性データ量に基づいて OECD HPV Chemicals List の作成及び評価の優先順位付けが行われた<sup>2)</sup>。現在は、加盟各国と企業が、生産した化学物質に関する情報収集や試験を行って評価文書を完成させ、順次、それらの文書が初期評価会議 (SIAM: SIDS, Screening Information Data Set, Initial Assessment Meeting) で討議されている。日本政府は初回より評価文書を提出しており、第 6 回までに 27 物質の評価文書について合意を得た。第 7 回から第 11 回の SIAM において日本政府が担当し、結論及び勧告が合意された化学物質の初期評価文書の健康影響部分については既に紹介された<sup>3)</sup>。

SIAM で評価された物質数は 2000 年までは年間 20 程度 (最多 31, 最少 8) であったが、SIAM 11 (2001 年) から始まった ICCA (International Council of Chemical Associations, 国際化学工業協会協議会) による評価文書の提出に伴い、2001 年には年間 79 (SIAM 11-13) と飛躍的に評価物質が増加した。

本稿では、SIAM 12 及び 13 で合意に至った化学物質名と日本担当物質の初期評価要旨の健康影響部分について紹介

する。

SIAM における合意は FW または LP として示される (FW = The substance is a candidate for further work. LP = The substance is currently of low priority for further work.)。FW は「今後も追加の調査研究作業が必要である」ということを意味する。LP は「現状の使用状況においては追加作業の必要はない」ということを意味し、状況によっては追加作業が必要となる可能性を含む。現在、SIAM で FW とされたのは約 100 物質、LP は約 300 物質である。

## SIAM 12 及び 13 で合意された化学物質名と日本担当物質の初期評価内容

SIAM 12 は 2001 年 6 月にフランス (パリ) で開催され、化学物質の初期評価文書が検討され、表 1 に示す 14 物質の初期評価結果及び勧告が合意された。SIAM 13 は 2001 年 11 月にスイス (ベルン) で開催され、化学物質の初期評価文書が検討され、表 2 に示す 36 物質の初期評価結果及び勧告が合意された。日本政府が担当した化学物質の初期評価報告書のヒトへの健康影響について、概要を以下に示す。

\* To whom correspondence should be addressed: Makoto Ema; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.570; FAX: 03-3700-1408; E-mail: ema@nihs.go.jp

Table 1. Chemical substances discussed at SIAM12 and their outcomes

CAS No.	Name of substance	Sponsor country	Outcome
75-68-3	1-Chloro-1,1-difluoroethane	FR/ICCA	LP
79-06-1	Acrylamide	UK/eu	FW
84-74-2	Dibutyl phthalate	NL/eu	FW
81-15-6	<i>o</i> -Phthalodinitrile	JP+DE/ICCA	LP
100-21-0	Terephthalic acid	US+IT	LP
105-60-2	Epsilon-Caprolactam	DE/ICCA	LP
123-77-3	Asodicarboxamide	DE+JP	LP
126-73-8	Tributyl phosphate	US	LP
141-97-9	Ethyl acetate	DE/eu	LP
822-06-0	1,8-Hexamethylene diisocyanate	DE/ICCA	FW
1717-00-6	1,1-Dichloro-1-fluoroethane	US/ICCA	LP
25164-52-3	Nonyl phenol	UK/eu	FW
34690-94-8	Dipropylene glycol methyl ether	US/ICCA	LP
84852-15-3	Phenol, 4-nonyl, branched	UK/eu	FW

Note. Abbreviations show DE: Germany, FR: France, IT: Italy, JP: Japan, NL: Netherlands, UK: United Kingdom, and US: United States of America. "eu" indicates the document was based on the risk assessment in European Communities.

Table 2. Chemical substances discussed at SIAM13 and their outcomes

CAS No.	Name of substance	Sponsor country	Outcome
68-55-9	Theophylline	DE/ICCA	LP
85-85-0	Benzole acid	NL/ICCA	LP
68-12-2	N,N-Dimethylformamide	DE/ICCA	FW
71-36-3	<i>n</i> -Butyl alcohol	US/ICCA	LP
74-83-9	Methyl bromide	US/ICCA	LP
78-01-4	Vinyl chloride	US/ICCA	LP
76-38-7	Vinylidene fluoride	US/ICCA	LP
75-58-9	Methyl oxirane	UK/eu	FW
79-10-7	Acrylic acid	DE/eu	FW
79-20-9	Methyl acetate	DE/eu	FW
88-73-3	1-Chloro-2-nitrobenzene	DE/ICCA	FW
88-74-4	2-Nitroaniline	FR/ICCA	LP
91-76-9	2,4-Diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine	JP/ICCA	LP
95-50-1	1,2-Dichlorobenzene	Aus	FW
100-51-6	Benzyl alcohol	NL/ICCA	LP
103-84-4	Acetanilide	KO	LP
107-15-3	Ethylenediamine	US/ICCA	LP
107-41-5	Hexylene glycol	UK/ICCA	LP
108-77-0	Cyanuric chloride	CH/ICCA	LP
109-66-0	<i>n</i> -Pentane	NO/eu	LP
112-57-2	Tetraethylenepentamine	US/ICCA	LP
112-85-6	Docosanoic acid	JP/ICCA	LP
123-54-6	2,4-Pentanedione	DE/ICCA	FW
133-88-4	<i>n</i> -Butyl acetate	US/ICCA	LP
127-19-5	N,N-Dimethylacetamide	IT	LP
532-32-1	Sodium benzoate	NL/ICCA	LP
582-25-2	Potassium benzoate	NL/ICCA	LP
816-38-6	Dimethyl carbonate	IT/ICCA	Not finalized
969-77-9	2-Hydroxyethyl methacrylate	JP/ICCA	LP
1310-58-3	Potassium hydroxide	BE/ICCA	LP
1477-55-0	1,3-Bis(aminomethyl)benzene	JP/ICCA	LP
5392-40-5	Citral	JP	LP
3986-38-5	Metilox	CH	LP
6864-37-5	2,2'-Dimethyl-4,4'-methylenebis(cyclohexylamine)	DE/ICCA	LP
7447-40-7	Potassium chloride	NO/ICCA	LP
7681-67-4	Disodium disulphite	KO/ICCA	LP
16470-24-9	Fluorescent Brightener 220	DE/ICCA	FW

Note. Additional abbreviations to table 1, Aus: Australia, CH: Switzerland, NO: Norway, KO: Korea, and BE: Belgium. Health effects of citral have already described in SIAM11.

*o*-Phthalodinitrile (91-15-6) (ICCA 日本及びドイツ企業作成) (SIAM 12)

本化学物質はフタロシアニン系染料, 顔料の原料として用いられている。

単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) では, ラットの雌雄ともに 60 mg/kg 以上の投与で死亡, 痙攣, 口周囲の汚れがみられ, 240 mg/kg 以上の投与で自発運動低下, 腹臥位, チアノーゼ等が観察された。経口LD<sub>50</sub>は85 mg/kgであった。

吸入毒性試験では, 20℃で8時間の飽和蒸気圧に暴露さ

せたラットの死亡はみられなかった。

皮膚及び眼に対する刺激性はみられなかった。皮膚感作性に関する情報はなかった。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では, 0, 1, 6, 30 mg/kg/day を雌雄のラットに少なくとも42日間強制経口投与した。30 mg/kg/day の雌雄で体重増加抑制及び摂餌量の減少, 雄では総コレステロール及び総蛋白の増加, 血清尿酸素の減少, 肝臓, 腎臓及び精巣重量の増加, 精巣上体重量の減少, 雌では全例が妊娠末期に痙攣を伴い死亡した。また, 30 mg/kg/day の雄において肝臓の小葉中心性肝細胞肥大, 腎臓の近位尿細管上皮における硝子滴沈着, 精細管萎縮及び精巣上体の管腔内の細胞残屑出現と精子数の減少が観察された。6 mg/kg/day 投与では雌雄とも毒性所見はみられなかったため, この試験における反復投与毒性の無毒性量 (NOAEL) は6 mg/kg/day であった。

90日間反復経口投与毒性試験 (OECD TG 408) 及び米国EPA神経毒性試験ガイドラインに従い, 雄ラットに0, 3, 8, 25 mg/kg/day, 雌ラットに0, 3, 10, 30 mg/kg/day の用量を13週間混餌投与したところ, 自発運動量の増加がみられたが, 中核及び末梢神経毒性に関連した症状及び神経病理学的変化は観察されなかった。雄は25 mg/kg/day, 雌は10 mg/kg/day で体重減少がみられたことから, この試験における反復経口投与のNOAELは雄ラットでは8 mg/kg/day, 雌ラットでは3 mg/kg/day であった。

これらの結果から, 反復経口投与毒性のNOAELは3 mg/kg/day と考えられた。

上述の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験において, 雄ラットには交配前後の14日間ずつを含む少なくとも42日間, 雌ラットには交配前14日間から哺育3日まで, 0, 1, 6, 30 mg/kg/day を強制経口投与した。30 mg/kg/day において雄で精巣毒性がみられ, さらに, すべての妊娠ラットが死亡したため分娩のデータは得られなかった。6 mg/kg/day 以下の用量では生殖発生に対する影響がみられなかったことから, 生殖発生毒性のNOAELは6 mg/kg/day と考えられた。

細菌を用いた復帰突然変異試験の結果はS9mix存在下及び非存在下のいずれでも陰性であった。チャイニーズ・ハリスター培養細胞を用いた染色体異常試験では, いずれの連続処理でも染色体の構造異常は認められなかったが, 中濃度 (0.40 mg/mL) 及び高濃度において倍数体が誘発された。また, S9mix存在下及び非存在下のいずれの短時間処理でも染色体の構造異常は認められなかったが, S9mix存在下及び非存在下のいずれの短時間処理でも倍数体が誘発され, これらの結果より陽性と判断された。しかしながら, *in vivo* のマウスの小核試験で投与可能な最高投与量20 mg/kgの結果が陰性であったことから, 本化学物質は*in vivo* では遺伝毒性を発現しないと考えられた。

発がん性に関する有効な情報はなかった。

**Azodicarboxamide (123-77-3) (ドイツ政府及び日本政府作成) (SIAM 12)**

本化学物質は、プラスチックやゴム製品の発泡剤、米国の食品添加物(膨張剤)として用いられている。

雄ラットへの吸入暴露で本化学物質の約34%が、経口投与で10-33%が吸収されるが、本化学物質のかなりの量は胃腸管で吸収されず、糞とともに排泄される。本化学物質は吸収後速やかに biurea (CAS 110-21-4) に代謝物され、72時間以内に主に尿中に排泄される。

急性経口毒性は弱く、雄ラットでの2つの試験では、2,500 mg/kg で毒性発現はみられず、別の試験では LD<sub>50</sub> は 4,000 mg/kg 以上(雌雄 Alderly Park ラット)、5,000 mg/kg 以上(雄 Wistar ラット)であった。

雌雄ラット(1群5匹)を用いた急性吸入毒性試験では、LC<sub>50</sub> は 6,100 mg/m<sup>3</sup> 以上(4時間暴露、粒子サイズ 5.8 μm)であった。4時間暴露後、6,100 mg/m<sup>3</sup> で10例中8例が呼吸困難を示したが、死亡はみられなかった。暴露後14日での病理組織検査では影響はみられなかった。

モルモットでの吸入刺激試験では、肺機能に影響はみられず、97 mg/m<sup>3</sup> (1時間)までの濃度において吸入刺激は極軽微であった。

急性皮膚毒性試験が5匹の雄ラットに500 mg/kg を塗布して行われ、毒性徴候や死亡はみられなかった。

1匹の雌ウサギに2,000 mg/kg を塗布したスクリーニング試験でも毒性徴候はみられなかった。

ウサギの皮膚への刺激性はみられず、眼に対しては可逆的な角膜の発赤や腫脹がみられた。ヒトの皮膚を用いたパッチテストが陽性であったことから、皮膚感作性の可能性が示された。

ラットに100, 500, 2,500 mg/kg/day (雄)、200, 1,000, 5,000 mg/kg/day (雌)を強制経口投与した90日間反復経口投与毒性試験では、雄の2,500 mg/kg/day と雌の5,000 mg/kg/day (雌)で死亡がみられたが、一般毒性の徴候はみられず、病理組織学的検査で腎盂腎炎等がみられた。NOAEL は 500 mg/kg/day (雄)、1,000 mg/kg/day (雌)であった。

また、マウスに0, 78, 156, 312, 625, 1,250 mg/kg/day (雄)、0, 156, 312, 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day (雌)を強制経口投与した90日間反復経口投与毒性試験では、最高用量でも投与に関連した影響はみられなかった。

一代生殖毒性試験(OECD TG 415)では、ラットに0, 100, 300, 1,000 mg/kg/day の用量で強制経口投与した。雄親ラットには最高用量でも影響はみられなかったが、雌親ラットでは1,000 mg/kg/day で腎盂の拡張、間質のリンパ球浸潤等の腎臓への影響がみられた。NOAEL は 300 mg/kg/day であった。

これらの試験の結果から、反復経口投与のNOAEL は 500 mg/kg/day (雄)、300 mg/kg/day (雌)とされた。

13週間吸入試験において、ラット及びマウスに0, 50, 10,

200 mg/m<sup>3</sup> の濃度を1日6時間(週5日)で暴露させたところ、最高濃度の200 mg/m<sup>3</sup> でも有意な毒性影響はみられなかった。13週間暴露試験に基づき、吸入反復暴露のNOAEL は 200 mg/m<sup>3</sup> (ラット、マウス)であった。

上述の一代生殖毒性試験では、雄ラットには98日間、雌ラットには交配前14日間から哺育20日まで、それぞれ0, 100, 300, 1,000 mg/kg/day を強制経口投与した。最高投与量の1,000 mg/kg/day でも生殖発生への毒性影響はみられず、生殖発生毒性のNOAEL は 1,000 mg/kg/day と考えられた。ラットとマウスを200 mg/m<sup>3</sup> の濃度まで暴露した上述の13週間吸入試験においても生殖器系や精子の形態、発情周期に影響は認められなかった。

細菌を用いた復帰突然変異試験の結果はS9mix 存在下及び非存在下のいずれでも陰性であった。チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験では、いずれの連続処理及びS9mix 存在下及び非存在下のいずれの短時間処理でも染色体の構造異常及び倍数体の誘発は観察されなかったことから、染色体異常試験は陰性と判断された。

発がん性に関する有効な情報はなかった。

**Docosanoic acid (112-85-6) (ICCA 日本企業作成) (SIAM 13)**

本化学物質は近年化粧品原料として用いられている。

トキシコキネティクスに関する情報はなかった。

単回経口投与毒性試験(OECD TG 401)では、最高投与量の2,000 mg/kg でもラットの死亡はみられず、また、一般状態、投与後の体重の推移及び剖検所見のいずれにも投与に起因すると考えられる変化は観察されず、経口LD<sub>50</sub> は 2000 mg/kg 以上であった。

皮膚及び眼に対する刺激性、皮膚感作性に関する情報はなかった。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(OECD TG 422)では、雄ラットには42日間、雌ラットには交配前14日間から哺育3日まで、それぞれ0, 100, 300, 1,000 mg/kg/day を強制経口投与した。雄ではいずれの投与群においても死亡及び一般状態の異常は観察されなかった。また、42日間反復投与後の剖検、病理組織学的検査、血液学検査及び血液生化学検査でも、投与の影響を示唆する所見または異常値は認められなかった。雌でもいずれの投与群においても死亡及び一般状態の異常は観察されなかった。分娩後4日の剖検及び病理組織学的検査においても投与の影響を示唆する所見は認められなかった。反復経口投与のNOAEL は 1,000 mg/kg/day と考えられた。

上述の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験において、最高投与量の1,000 mg/kg/day でも交尾能及び受胎率に影響はみられなかった。また、母動物の妊娠期間、出産率、分娩状態及び哺育状態に投与の影響を示唆する変化は認められなかった。出生児の性比、体重及び生存率に、投与の影響を示唆する変化は認められなかった。また、出生児の形態異常は

いずれの投与群にも観察されなかった。生殖発生毒性のNOAELは1,000 mg/kg/dayと考えられた。

細菌を用いた復帰突然変異試験の結果はS9mix存在下及び非存在下のいずれでも陰性であった。チャイニース・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験では、いずれの連続処理及びS9mix存在下及び非存在下のいずれの短時間処理でも染色体の構造異常及び倍数体の誘発傾向は観察されなかったため、染色体異常試験は陰性と判断された。

発がん性に関する情報はなかった。

#### 2.4-Diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine (91-76-9) (ICCA 日本企業作成) (SIAM 13)

本化学物質はベンゾグアナミン-ホルムアルデヒドの間体として使用される。

トキシコキネティクスに関する情報はなかった。

単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) では0, 250, 500, 1,000, 2,000 mg/kgを投与したところ、雌雄とも1,000 mg/kg以上の投与で死亡がみられた。死亡例では、前胃で肉眼的に粘膜の肥厚、病理組織学的に粘膜下組織の浮腫がみられ、脾臓及び胸腺では肉眼的及び病理組織学的に萎縮がみられた。また、膀胱では濃緑色尿の貯留がみられた。生存例では、前胃に肉眼的に粘膜の白色点がみられ、病理組織学的には粘膜に扁平上皮の過形成がみられた。これらより、ラットでの経口LD<sub>50</sub>は雄で933 mg/kg、雌で1,231 mg/kgであった。

吸入毒性試験 (OECD TG 403) では、ラットでの吸入LC<sub>50</sub>は2.932mg/L (4時間)であった。

ウサギにおいて、皮膚への刺激性はなく、眼への刺激性は軽度であった。皮膚感作性に関する情報はなかった。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、雌雄ラットに少なくとも39日間、それぞれ0, 4, 20, 100 mg/kg/dayを強制経口投与した。雌雄の100 mg/kg/dayで1例ずつの死亡がみられた。雄の血液学検査では、100 mg/kg/dayの赤血球数及びヘマトクリット値の減少及び網状赤血球率の増加が認められた。雄の血液生化学検査では、100 mg/kg/dayでアルブミン、A/G比、GOT、GPT、総コレステロール、リン脂質及び総ビリルビンの増加ならびにトリグリセライド、ナトリウム及びカリウムの減少が認められた。100 mg/kg/dayの雄で肝臓重量の増加がみられ、病理組織学的には雌雄で小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、死亡例では、100 mg/kg/dayの雄1例で回腸の粘膜固有層から漿膜にかけて好中球性の細胞浸潤及び肉芽形成がみられたほか、腺胃のびらん、肺の水腫、脾臓の萎縮、胸腺の萎縮及び出血がみられ、同群の雌1例で腺胃のびらん、肺の水腫、脾臓の萎縮及び副腎の壊死が認められた。これらに結果から、ラットにおける反復経口投与のNOAELは20 mg/kg/dayと考えられた。

90日間反復経口投与毒性試験 (OECD TG 408) に従い、雄ラットに90日間0, 1.9, 19.0, 173.0 mg/kg/dayを混餌投

与した反復投与毒性試験では、死亡はみられず、173.0 mg/kg/dayにおいて、雌雄ラットで弓なり姿勢、立毛、体重増加量の減少、摂餌量の減少がみられた。血液化学では、雌雄ラットでGPT及びビリルビンが増加し、雌の肝臓重量が増加した。病理組織学的検査では、小葉中心性肝細胞肥大、脾臓外造血の亢進、副腎球状帯細胞の異常発達及び空胞形成、炎症細胞の湿潤を伴う脾臓外分泌細胞の退化が観察された。また、ヘモジリン色素沈着の増加が雌雄ラットの腎臓及び脾臓で観察された。19 mg/kg/dayの雄では脾臓のヘモジリン色素沈着の増加が投与に関連した唯一の病理組織学的変化として認められたが、この変化は穏やかであり、他の影響は観察されなかった。これらの結果にもとづき、混餌による反復経口投与のNOAELは19 mg/kg/dayと考えられた。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、雄ラットには交配の14日前から49日間、雌ラットには交配前14日間から哺育3日まで、それぞれ0, 4, 20, 100 mg/kg/dayを強制経口投与した。親動物の生殖機能に関しては、性周期、黄体数、交尾率、着床痕数、授(受)胎率及び交尾所要日数に投与の影響は認められなかった。分娩時の検査では、100 mg/kg/dayの2例で分娩直後の児の回集及び保温の不良などが認められた。さらに、100 mg/kg/dayで死産率の増加及びそれに伴う出生率の減少、雌雄新生児体重の減少が認められた。各群とも妊娠期間、出産児数、出産率、新生児数及び新生児の性比では投与の影響はみられず、新生児の外表検査においても、異常は認められなかった。哺育期の検査では、20 mg/kg/dayの2例及び100 mg/kg/dayの7例で児の回集、授乳、保温などの哺育行動の不良がみられ、これらの母動物では全児が死亡した。また、20 mg/kg/day以上では母動物の哺育行動の不良に起因した新生児の4日の生存率の減少が認められた。さらに、100 mg/kg/dayでは新生児の哺育4日の体重に低値が認められた。これらより、雄では100 mg/kg/dayで影響がみられず、雌では20 mg/kg/dayで哺育行動の異常がみられた。最高用量でも児に形態異常はみられなかった。これらの結果から、生殖毒性のNOAELは100 mg/kg/day (雄)、4 mg/kg/day (雌)であった。また、100 mg/kg/dayで児の体重減少がみられたため、発生毒性のNOAELは20 mg/kg/dayであった。

細菌を用いた復帰突然変異試験の結果はS9mix存在下及び非存在下のいずれでも陰性であった。チャイニース・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験では、連続処理法の48時間処理及びS9mix存在下の短時間処理で染色体構造異常の誘発作用が認められた。また、連続処理法の48時間処理による試験では、倍数体の誘発作用が認められた。連続処理法の24時間処理による試験では、用量に依存した染色体構造異常の誘発作用が認められた。ヒト・リンパ培養細胞を用いた染色体異常試験では、S9mix存在下及び非存在下のいずれでも本化学物質の溶解限度内では染色体構造異常の誘発作用は認められず、S9mix非存在下で溶解限度を超え

ると染色体構造異常の誘発作用が認められた。マウス・リンフォーマ培養細胞を用いた遺伝毒性試験では、結果は陰性であったが、S9mix 存在下で溶解限度を超えると遺伝毒性の誘発作用が認められた。In vivo でのマウスの小核試験で投与可能な最高投与量での結果が陰性であったことから、本化学物質は in vivo では遺伝毒性を発現しないと考えられた。発がん性に関する有効な情報はなかった。

#### 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) (868-77-9) (ICCA 日本企業作成) (SIAM 13)

本化学物質は塗料、接着剤、コーティング剤、歯科用接着剤等に含まれる合成ポリマーのモノマーとして使用される。In vitro では1日で80%以上が加水分解される。In vivo でのトキシコキネティクスに関する情報は無い。

急性毒性は弱く、急性毒性試験では、経口 LD<sub>50</sub> は 4,000 mg/kg 以上、経皮 LD<sub>50</sub> は 3,000 mg/kg 以上であった。

ウサギの皮膚に対して弱い刺激性がみられた。ウサギの眼に対して中程度の刺激性がみられ、モルモットの皮膚に対して弱い感作性を示したが、フロント・アジュバントの注入でのみ陽性を示し、本化学物質の単独塗布では感作性は認められなかった。ヒトの皮膚でのパッチテストで感作性が示され、他のアクリル酸塩との交差反応の可能性が考えられた。

本化学物質はメタクリル酸とエチレングリコールに加水分解される。他のアクリル酸塩及びメタクリル酸塩では、methacrylic acid (MAA) (SIAM 11 で議論) へ加水分解された後、吸入による鼻腔の損傷が報告されている、この影響は HEMA については調べられていない。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、雄ラットには交配の14日前から49日間、雌ラットには交配前14日間から哺育3日まで、それぞれ0, 30, 100, 300, 1,000 mg/kg/day を強制経口投与した。雄では1,000 mg/kg/day で流涎がみられ、1/12が死亡した。1,000 mg/kg/day で体重増加抑制、摂餌量減少がみられた。すべての投与群で血液学検査の各検査項目に投与による影響はみられなかった。血液生化学検査では30 mg/kg/day 以上で尿素窒素の高値あるいはその傾向、1,000 mg/kg/day でカリウム、塩素及び無機リンの高値及びトリグリセライドの低値がみられた。剖検では各投与群とも投与による影響はみられなかった。死亡例では胸腺及び肺の暗赤色化、副腎の肥大がみられた。100 mg/kg/day 以上で腎臓の相対重量の高値、1,000 mg/kg/day で肝臓の相対重量の高値がみられた。病理組織学的検査では、1,000 mg/kg/day で腎臓に尿細管拡張及び集合管拡張がみられた。雌では1,000 mg/kg/day で流涎、自発運動の低下、腹臥位、流涎、被毛の汚れ、表皮温下降及び呼吸緩徐がみられ、6/12が死亡した。1,000 mg/kg/day で交配前投与期間の体重増加抑制及び摂餌量減少がみられた。剖検所見では1,000 mg/kg/day で胸腺の萎縮及び副腎の肥大がみられた。100 mg/kg/day 以上で腎臓の絶対重量の高値あるいはその傾

向、1,000 mg/kg/day で腎臓の絶対・相対重量の高値がみられた。病理組織学的検査では1,000 mg/kg/day で腎臓の髄質及び乳頭部への好中球浸潤、延髄の広範な軟化がみられた。雄での100 mg/kg/day における腎臓の相対重量の増加、雌での100 mg/kg/day における腎臓の絶対重量の増加を根拠に、ラットにおける反復経口投与のNOAELは30 mg/kg/day と考えられた。

上述の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験においては生殖発生毒性に関するいずれの指標にも本化学物質投与の影響は認められなかったことから、ラットにおける生殖発生毒性のNOAELは1,000 mg/kg/day と判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験の結果はS9mix 存在下及び非存在下のいずれでも陰性であった。チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験は代謝活性の存在下及び非存在下で陽性であった。In vivo でのラットの小核試験で投与可能な最高投与量での結果が陰性であったことから、本化学物質は in vivo では遺伝毒性を発現しないと考えられた。

発がん性に関する情報はなかった。

#### 1,3-Bis (aminomethyl) benzene (1477-55-0) (ICCA 日本企業作成) (SIAM 13)

本化学物質は主に、エポキシ樹脂硬化剤、ポリウレタン、有機合成などに使用される。

トキシコキネティクスに関する情報はなかった。溶液はアルカリ性で、腐食性がある。

単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) では、ラットでの経口 LD<sub>50</sub> は 1,090 mg/kg (雄)、980 mg/kg (雌)、マウスでの経口 LD<sub>50</sub> は 1,180 mg/kg であった。ラットでの急性吸入毒性の LC<sub>50</sub> (4 h) は 1.42 mg/L 以上 (雄)、0.8 mg/L (雌) であった。毒性は接触部位における腐食性によるもので、経口/吸入毒性では消化管/呼吸器系障害であった。

皮膚腐食性 (ラットとマウス) 及び感作性 (モルモット) が認められた。

28日間反復経口投与毒性試験 (OECD TG 407) に準拠した化審法ガイドラインの28日間反復経口投与毒性試験に従い、雌雄ラットに28日間、それぞれ0, 10, 40, 150, 600 mg/kg/day の用量を強制経口投与した。動物数は1群雌雄各6匹とし、7群を設け、5群は投与終了後屠殺群、2群は対照及び600 mg/kg/day の14日間回復群とした。10, 40, 150 mg/kg/day では被検物質の投与に起因する変化は認められなかった。600 mg/kg/day では、流涎、自発運動の低下、立毛、腹部膨満などの症状が雌雄に、摂餌量の減少及び体重増加の抑制が雄に認められ、雄の1例及び雌の4例が死亡した。さらに、胃の前胃粘膜に潰瘍及び角化亢進を伴う上皮の過形成、骨髓に顆粒球系造血細胞の増加、副腎に皮質細胞の肥大・空胞化、盲腸の拡張が雌雄に、白血球好中球比、尿酸ンパク及び血清無機リンの増加、血色素量及びヘマトクリット



値の減少、プロトロンビン時間の延長、活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が雄に、トリグリセライドの増加が雌に認められた。回復期間後には、前胃部粘膜の変化は回復傾向を示し、その他の変化はいずれも回復した。この28日間投与試験からはNOAELは150 mg/kg/dayと考えられた。

雌雄ラットに少なくとも41日間、それぞれ0, 50, 150, 450 mg/kg/dayの用量を強制経口投与した簡易生殖毒性試験(OECD TG 421)によると、150 mg/kg/dayの雄1例及び450 mg/kg/dayの雄3例、雌1例が死亡した。被検物質投与による症状として、150 mg/kg/dayの雄及び450 mg/kg/dayの雌雄で流涎、鼻音、不整呼吸、腹部膨満及び鼻分泌物が認められた。また、450 mg/kg/dayの雌雄で体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。病理組織学的検査では投与の直接作用によると考えられる前胃の潰瘍、角化亢進を伴った扁平上皮増生等が450 mg/kg/dayの雌雄に認められた。なお、生殖系には投与に起因する所見は観察されなかった。

経口投与簡易生殖毒性試験(OECD TG 421)によるNOAELのほうが低いことから、ラットにおける反復経口投与のNOAELは50 mg/kg/dayとされた。

上述の経口投与簡易生殖毒性試験では、生殖発生毒性に関するいずれの指標にも本化学物質投与の影響は認められなかったことから、ラットにおける生殖発生毒性のNOAELは450 mg/kg/dayと考えられた。

細菌を用いた復帰突然変異試験の結果はS9mix存在下及び非存在下のいずれでも陰性であった。チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験では、いずれの連続処理及びS9mix存在下及び非存在下のいずれの短時間処理

でも染色体の構造異常及び倍数体の誘発は観察されなかった。染色体異常試験は陰性と判断された。

発がん性に関する情報はなかった。

製造工場の労働者における臨床観察の結果、この物質は胃腸への刺激性を持ち、また、0.1 mg/m<sup>3</sup>(米国の職業閾値限界)以下の濃度で労働者に接触感作反応を引き起こすことが示されている。

#### おわりに

本稿では、第12回及び第13回初期評価会議で合意された日本担当の6物質についての、ヒトへの健康影響部分を紹介した。SIAMで合意された物質については、初期評価文書が出版されたのち、インターネットのOECD webサイト(<http://cs3-hq.oecd.org/scripts/hpvi/>)で報告書の入手が可能である。

#### 引用文献

- 1) Hasegawa, R., Nakadate, M. and Kurokawa, Y.: *J. Toxicol. Sci.*, 24, app.11-19 (1999)
- 2) Hasegawa, R., Kamata, E., Hirose, A., Kanno S., Hukuma, K., Takatsuki, M., Nakadate, M. and Kurokawa, Y.: *J. Toxicol. Sci.*, 24, app.85-92 (1999)
- 3) Hasegawa, R., Koizumi, M., Kamata, E., Hirose, A., Kanno S., Takatsuki, M., and Kurokawa, Y.: *J. Toxicol. Sci.*, 25, app.83-96 (2000)
- 4) Hasegawa, R., Koizumi, M., Hirose, A., Sugawara N., and Kurokawa, Y.: *J. Toxicol. Sci.*, 26, app.35-41 (2001)

## 生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容1日摂取量 (TDI) 算定の考え方について

総合評価研究室 広瀬明彦, 江馬 眞

The recent TDI derivation of the dioxin based on the reproductive and developmental toxicity.

Akihiko Hirose and Makoto Erma  
Division of Risk Assessment

### SUMMARY

In 1998, WHO-IPCS re-assessed the TDI of dioxin, which was derived from the body burdens of TCDD exposed to the experimental animals. Then, the international assessment agencies and governmental assessment agencies have conducted the dioxin fs health assessment using the similar method to the WHO-IPCS approach. The key endpoints were reproductive and developmental toxicity caused by *in utero* and lactational exposure. Each assessment agencies used the similar data set of the toxicity studies, however, there are some differences about the TDI derivation method and the selection of adverse endpoints. This report reviewed the recent reproductive and developmental toxicity studies of the dioxins and summarized the health assessment in the international or governmental agencies, and discussed the appropriate TDI derivation.

Key Word: dioxin, tolerable daily intake, reproductive and developmental toxicity

### はじめに

1998年にWHO-IPCSが、ダイオキシンの体内蓄積性を考慮して体内負荷量という概念を用いて、耐容1日摂取量(TDI)の再評価を行った<sup>1)</sup>。我が国でも1999年に、体内負荷量を基にしてTDIの設定を行っている<sup>2)</sup>。これ以前は、発がん性を感受性の高いエンドポイントとしてTDIを設定していたが、この体内負荷量という物差しを用いることにより、胎児期及び授乳暴露による次世代への影響がより感受性の高い毒性指標となることが明らかになった。その結果、これ以降はヨーロッパ各国やJECFAなどの評価機関では、この評価法に従い耐用摂取量評価を算定してきている。本研究では、この評価法の重要なエンドポイントであるダイオキシン類による生殖発生毒性に関して、1998年以降の新しい知見と、各国および国際評価機関でのTDI算定経過をまとめると共に、現時点での適切なTDIのあり方について考察した。

### 体内負荷量とTDI

まず、体内負荷量を用いたTDIの算定法について概略を示す。一般に化学物質の耐用摂取量は、最も感受性の高い毒性学的エンドポイントを基に算定される。ヒトを対象とした定量的で信頼性の高い疫学研究などの知見がある場合はそれを用いるが、通常は疫学上の交絡因子を完全に排除することは難しく、動物実験における化学物質の投与用量を基に、ヒトにおける耐用摂取量を算出している。1990年代の前半頃まではダイオキシンに関して最も感受性の高い毒性は、げっ

歯類に対する発がん性であると考えられており、評価機関の多くは、ラットを用いた2年間の長期投与試験における無毒性量(NOEL):1ng/kg/dayを基に、不確実係数(多くは100)を適用して耐容1日摂取量を設定していた。しかし、1998年のWHO-IPCS<sup>1)</sup>での評価以後は、ダイオキシン類のように脂溶性が高く、排泄が遅い物質は、長い時間をかけて徐々に体内に化学物質が蓄積していくことや、ヒトとラットでは数百倍も排泄速度が異なることから、投与量と蓄積濃度(=体内負荷量)と関係はヒトとラットで著しく異なることになり、投与量をベースにして毒性発現を比較するのは適当ではないと判断された。また、ダイオキシン類による毒性発現は蓄積量である体内負荷量に依存して発現していることが示され、近年は、この体内負荷量を基に定量的な毒性評価を行うようになった。この体内負荷量という物差しを用いることにより、従来の発がん性よりも、胎児期及び授乳期暴露による次世代への影響がより感受性の高い毒性指標となることが明らかになった。この際、摂取量と体内負荷量との換算は、1コンパートメントモデルの定状態における、以下の近似式で示すことができる。

$$\text{摂取量(ng/kg/day)} = [\text{体内負荷量(ng/kg)} \times \ln(2)] / [\text{半減期(day)} \times \text{吸収率}]$$

また、ヒトや実験動物に関する様々な知見より、ヒトと実

験動物では同じ体内負荷量で毒性が発現すると判断されている。したがって、TDIを求めるには、まず動物実験において最も低い体内負荷量で発現するエンドポイントを選定し、その体内負荷量においてはヒトでも同様の影響が現れると仮定する。その後、上記の式からその体内負荷用に相当するヒトにおける1日摂取量を算出し、この値に対して不確実係数を適用して、TDIを算定するという手順を踏むことになる。

#### ダイオキシン類による生殖発生毒性

1998年以降に公表された2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)の生殖発生毒性に関する論文の内容について検討した(Table 1)。

SDラットの妊娠15日に200または1000 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与したところ<sup>9)</sup>、両TCDD投与群で母体体重が低下し、1000 ng/kg投与群では出生児数の減少がみられたが、雄児の成長にはTCDD投与の影響は観察されなかった。雄児の生後30日において1000 ng/kg投与群で17-ヒドロキシラーゼ活性及び精巣上体重量の低下、生後45日に精巣の3β-及び17β-ヒドロキステロイドデヒドロゲナーゼ、5α-リダクターゼ活性上昇及び血清中アンドロゲン濃度の低下が認められた。

Holtzmanラットの妊娠15日に250 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与した<sup>10)</sup> ときには、TCDD投与の雄児に精巣上体精子数の減少、前立腺重量の低下が観察されたが、肛門生殖突起間距離(AGD)、性成熟、精巣の1日精子産生、精巣重量及び前立腺を除く副生殖器官重量にTCDD投与の影響は認められなかった。

Holtzmanラットの妊娠15日に1000 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与した<sup>11)</sup> ところ、投与後4日の雌胎児でミューラー管尾部の間充織の肥厚、ミューラー管癒合の阻害、ウラルフ管退行の阻害が観察され、これらが永久的なvaginal thread(膣糸)の原因であることが示唆された。

Long Evansラットの妊娠15日に1000 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与し<sup>12)</sup>、雄児の精囊について調べた。雄児体重及び精囊重量には生後32日までTCDD投与群と対照群との間に差はみられなかったが、49日以降ではTCDD投与群において低下が認められた。TCDD投与群では精囊上皮の分岐及び分化を低下させることによって、精囊の発生を傷害することが示唆された。

Syrianハムスターの妊娠11.5日に2000 ng/kgのTCDDを強制経口投与した<sup>13)</sup> ところ、母体の生存率及び体重、児数にTCDD投与の影響はみられなかったが、TCDD投与群のF1児の体重増加抑制、膣開口遅延、膣性周期の変化が認められた。雌F1では陰核の完全分裂が観察されたが、vaginal threadは観察されなかった。雌F1を無処置の雄と交配させたところ、TCDD投与群で妊娠率低下し、妊娠ハムスターの死亡率上昇、分娩生存児数減少、離乳率低下が観察された。これ

らの結果から、妊娠母体に有害な作用を示さない投与量のTCDDが雄児の成長、繁殖機能、生殖器の形態に悪影響を及ぼすことが明らかになった。

雌Wistarラットに25、60または300 ng/kgのTCDDを交配前2週に皮下投与し、交配前、交配中、妊娠中及び授乳中を通じて、5、12または60 ng/kgのTCDDを週1回皮下投与した<sup>14)</sup>。300/60 ng/kg投与群で母ラットの妊娠率が低下し、雄児の血清中テストステロン濃度の低下が認められた。全TCDD投与群の雄児で精巣上体の精子数、精巣の1日精子産生及び精子通過率の低下、異常精子割合の上昇、性行動の異常が観察されたが、1日精子産生以外のエンドポイントに明らかな用量-反応関係はみられなかった。最小毒性量は25/5 ng/kg (0.8 ng/kg/dayに相当)であった。

Holtzmanラットの妊娠15日に12.5、50、200または800 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与したときの児に対する影響の検討が国立環境研究所で行われた。50 ng/kgで生後63及び120日における雄児のAGDが短縮し、12.5 ng/kgで生後120日の腹側前立腺重量が減少した<sup>15)</sup>。生後2、49または63日に雄児を検査したところ、800 ng/kgでAGDの短縮がみられたが、1日精子産生及び精巣上体尾部の精子保有に差は認められなかった<sup>16)</sup>。生後49または120日の検査結果では、200 ng/kg以上で腹側前立腺重量の低下が観察され、50 ng/kg以上で生後120日において雄児のAGDが短縮したが、精巣の重量及び組織病理学的検査、1日精子産生、精巣上体重量、精巣上体尾部の精子保有、血清ホルモンレベルにTCDD投与の影響は認められなかった<sup>17)</sup>。また、生後49日の雄児の腹側前立腺において200 ng/kg以上で5α-reductase type 2 mRNAレベルの上昇、50 ng/kg以上でandrogen receptor mRNAレベルの低下が観察された<sup>11)</sup>。生後5日の雄児の胸腺のCYP11A1 mRNA inductionが200 ng/kg以上でみられている(1群3例の実験であり統計処理については不明)が、胸腺の重量及び細胞数には800 ng/kgでもTCDDの影響は観察されなかった<sup>12)</sup>。

Long Evansラットの妊娠15日に800 ng/kgのTCDDを投与したとき、雄児の交尾行動の変化が示されている<sup>13)</sup>。また、妊娠15日のLong Evansラットに100、300または1000 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与し、F4の離乳まで観察したところ、F1において1000 ng/kgで雄児の前立腺重量の低下及びテストステロンレベルの低下、雌児の子宮及び卵巣重量の低下がみられたが、AGD、精子指標、雌性成熟、繁殖指標にはTCDDの影響は認められず、F2以降に生殖に対する影響は観察されなかった<sup>14)</sup>。

妊娠18日に20、60または180 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与したHoltzmanラットの雌児における回転かごでの行動変化が180 ng/kgで認められている<sup>15)</sup>。

Table 1. Summary of the reproductive and developmental effects by TCDD (published after 1988)

Sex and Species	Exposure method	Dose (ng/kg)	Reproductive and developmental effects or offspring sex ratios
rod (B6C)	single gavage on day 15 of pregnancy	200, 1000	decreased number of pups delivered and decreased epididymal weight in 1000 ng/kg
rod (Holtzman)	single gavage on day 15 of pregnancy	100	decreased sperm number and prostate weight (no effects at 100 mg/kg of TCDD), altered spermatogenesis, daily sperm production, a right of other accessory reproductive organs
rod (Holtzman)	single gavage on day 15 of pregnancy	10	altered vaginal development
rod (Long Evans)	single gavage on day 15 of pregnancy	1000	decreased seminal vesicle weight, decreased umbilical vesicle epididymal branching and adhesion
hamster (Syrian)	single gavage on day 15 of pregnancy	2000	delayed vaginal opening, altered uterus (type 2) in the pregnant F1 female neonates, decreased number of corpora and F2 pups born live
rod (F344)	single oral exposure at 2 weeks prior to mating (postnatal 0, 1, 2, 10, 100, 1000 ng/kg)	25, 10, 100, 1000	decreased daily sperm production in 10 days, decreased sperm number, altered rate of the sperm past through the caudal epididymus, increased abnormal sperm, abnormal sexual behavior (no other effects)
rod (Holtzman)	single gavage on day 15 of pregnancy	11.1, 10, 100, 1000	decreased ACDI area (no effect at 10 ng/kg), decreased rate of pupal weight until 200 mg/kg, too effects in daily sperm production, epididymal weight, sperm number
rod (Long Evans)	single gavage on day 15 of pregnancy	200	abnormal sexual behavior in male
rod (Long Evans)	single gavage on day 15 of pregnancy	100, 1000, 10000	decreased prostate, thymus and ovary weights in F1 at 1000 ng/kg (no effects in ACDI, sperm analysis, uterine involution in F1, no effects in all reproductive endpoints in F2 to F4)
rod (Holtzman)	single gavage on day 15 of pregnancy	10, 100, 1000	altered spermatid suspending for male (reproductive) at 100 mg/kg

## 1998年以降の国際機関および各国のダイオキシン評価

1998年WHO-IPCSで行われたダイオキシン類のTDI再評価以後、我が国を始め各国政府及び国際機関でダイオキシン類の健康影響評価と耐容摂取量の勧告状況について以下にまとめた(Table 2)。

1998年のWHO-IPCS 専門家会合では、上述したようにTCDDの半減期がヒトとげっ歯類では著しく異なることから、体内負荷量という概念を用いてヒトへの換算を行い、ヒトの体内負荷量から1日摂取量を逆算した後、TDIとして1~4 pg TEQ/kg/dayを勧告した。このとき、算出の基となった最も低い体内負荷量で現れる毒性としては、サルにおける子宮内胎症及び神経行動学的発達への影響とげっ歯類の経胎盤/経母乳暴露による次世代の生殖器官発生異常・免疫抑制であり、最低毒性発現体内負荷量としては28~73 ng/kgと見積もられた。WHO-IPCSではこれらの毒性のうちどれかをTDI算定の根拠とするわけではなく、レンジとして捉え幅のあるTDIを勧告することになった<sup>1)</sup>。

我が国では1999年、厚生省と環境庁の合同専門家会合(中央環境審議会環境保健部会、生活環境審議会、食品衛生調査会)において、WHO-IPCS1)の考え方を基本とし、TCDDによる各種毒性影響を体内負荷量の基準とし、結果として数編の経胎盤/経母乳暴露による次世代の生殖器官発生異常・免疫抑制に関する報告をTDIの算定根拠として選択した。その際、最も低い体内負荷量を示したのはFaqiら<sup>9)</sup>の報告で27 ng/kg、次にOhsakoら<sup>10)</sup>ら(当時は学会発表時のデータを引用した)の43 ng/kgであったが、それらの単報での値を採用するのではなく、実験の信頼と再現性を考慮し、その他の同様の毒性を比較すると、概ね86 ng/kg以上で影響が現れるとすることが妥当であると判断した。また、このときサルの子宮内胎症と神経行動学的発達への影響の実験は、その実験方法に信頼性が担保できないので定量的評価には用いないこととした。その結果、体内負荷量86 ng/kgを

TDI算定の出発点とし、不確実係数10を用いて、TDIを4 pgTEQ/kg/dayとした<sup>2)</sup>。

米国EPAの2000年の再評価ドラフトでは、ダイオキシン類の最適な毒性指標は発がん性にあるとし、動物実験及びヒトの疫学情報から導き出された体内負荷量をもとに発がん性のリスクを計算した。その結果、1 pgTEQ/kg/dayあたりの発がんリスクは1000分の1であるとし、現在のバックグラウンドレベルの暴露におけるリスクは100~1000分の1の間にあると算出した。また、本来なら計算されるであろう耐容摂取量に相当するReference doseについては、ヒトのバックグラウンドレベルを大きく下回ることから算出せず、WHO-IPCSで評価した1~4 pgTEQ/kg/dayというTDIはリスクマネージメントの目的としては妥当であるとしている<sup>16)</sup>。

ECのScientific Committee on Food (SCF)が2000年11月に行ったダイオキシン類評価では、WHO-IPCS<sup>1)</sup>での評価と同様に、体内負荷量の概念を用い、最低体内負荷量のエンドポイントとして、サルにおける子宮内胎症及び神経行動学的発達への影響とげっ歯類の経胎盤/経母乳暴露による次世代の生殖器官発生異常・免疫抑制を取りあげた。このときの体内負荷量は25~60 ng/kg (WHO-IPCS<sup>1)</sup>)と同じデータセットを用いているが、主に体内吸収率を60%と少し低めに設定していることや、単回投与の実験結果を亜慢性試験の実験で得られる結果と比較できるように補正しているため異なった値となっている)と見積り、不確実係数9.6からTDIとしては1~3 pgTEQ/kgと計算した。SCFではこのレンジで与えられたTDIの中から単一の値を採用する科学的根拠に乏しいことから、暫定的なTDIとしては、1 pgTEQ/kgにすべきであるとの結論になった。しかし、ダイオキシン類の長い体内残留性を考慮して、1週間単位の耐容摂取量として7 pgTEQ/kg/week (t-TWI: temporary tolerable weekly intake)を勧告することになった<sup>17)</sup>。しかし、2001年5月には、新たに公表された報告も加え、暫定値の見直しを行った。新たに、Faqiら<sup>9)</sup>とOhsakoら<sup>10)</sup>のデータを追加し、最低毒性発現体内負荷量として40~100 ng/kg、無毒性体内負荷量として20 ng/kgをそれぞれ算出した。無毒性体内負荷量からTDIを算出すると、3 pgTEQ/kg/dayとなるが、Faqiら<sup>9)</sup>のWistarラットを用いた方が、感受性が高いと考えられ、40 ng/kgからTDIを算出すると2 pgTEQ/kg/dayとなった。前回の評価ではサルの試験も感受性の高いエンドポイントとして取りあげられていたが、試験の信頼問題が解決できなかったため、今回は考慮しなかった。さらに、最終的には、前回と同様、長い体内消失半減期を考慮し、1週間耐容摂取量として14 pgTEQ/kg/weekを勧告した<sup>18)</sup>。

2001年6月に行われたFAOとWHOの合同食品添加物専門家会議では、EC-SCF<sup>16)</sup>での再評価と同様のデータセットを用いて、評価を行ったが、耐容摂取量としては体内中の長い半減期を理由に、ECの評価より長い耐容1ヶ月許容量