

p-ニトロアニソールのラットを用いた経口投与による
2 週 間 毒 性 試 験 (混 餌 試 験) 報 告 書

試験番号：0360

CAS No. 100-17-4

2000年7月27日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

p-ニトロアニソールのラットを用いた経口投与による
2 週 間 毒 性 試 験 (混 餌 試 験) 報 告 書

試験番号：0360

本 文

本文目次

	頁
要 約	1
I 試験材料	3
I－1 被験物質の性状等	3
I－1－1 名称等	3
I－1－2 構造式、分子量	3
I－1－3 物理化学的性状等	3
I－2 被験物質のロット等	3
I－3 被験物質の特性・同一性・安定性	4
I－3－1 特性・同一性	4
I－3－2 安定性	4
I－4 試験動物	4
II 試験方法	5
II－1 投与	5
II－1－1 投与経路、投与方法及び投与期間	5
II－1－2 投与濃度	5
II－1－3 被験物質混合飼料の調製方法	5
II－1－4 被験物質混合飼料中の被験物質の濃度測定	5
II－1－5 被験物質混合飼料の安定性	5
II－1－6 被験物質の摂取量	6
II－2 動物管理	6
II－2－1 各群の使用動物数	6
II－2－2 群分け及び個体識別方法	6
II－2－3 飼育条件	7

II-3	観察・検査項目及び方法	7
II-3-1	動物の一般状態の観察	7
II-3-2	体重測定	8
II-3-3	摂餌量測定	8
II-3-4	血液学的検査	8
II-3-5	血液生化学的検査	8
II-3-6	病理学的検査	8
II-4	数値処理と統計処理	9
II-4-1	数値の取り扱いと表示	9
II-4-2	母数の取り扱い	10
II-4-3	統計処理	10
II-5	試資料の保管	10
III	試験成績	11
III-1	動物の状態観察	11
III-1	生死状況	11
III-2	一般状態	11
III-3	体重	11
III-4	摂餌量	11
III-5	被験物質摂取量	12
III-6	血液学的検査	12
III-7	血液生化学的検査	13
III-8	病理学的検査	14
III-8-1	剖検	14
III-8-2	臓器重量	15
III-8-3	病理組織学的検査	16
IV	考察及びまとめ	18
VI	文献	22

TABLES

TABLE 1	EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 2	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 3	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 4	FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 5	FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE

FIGURES

- FIGURE 1 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
- FIGURE 2 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
- FIGURE 3 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
- FIGURE 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE

APPENDIXES

APPENDIX A 1	CLINICAL OBSERVATION: SUMMARY, RAT : MALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX A 2	CLINICAL OBSERVATION: SUMMARY, RAT : FEMALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX B 1	BODY WEIGHT CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX B 2	BODY WEIGHT CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX C 1	FOOD CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX C 2	FOOD CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX D 1	CHEMICAL INTAKE CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX D 2	CHEMICAL INTAKE CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX E 1	HEMATOLOGY: SUMMARY, RAT: MALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX E 2	HEMATOLOGY: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX F 1	BIOCHEMISTRY: SUMMARY, RAT: MALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX F 2	BIOCHEMISTRY: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX G 1	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-WEEK STUDY)
APPENDIX G 2	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (2-WEEK STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX G 3	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-WEEK STUDY)
APPENDIX G 4	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE: SACRIFICED ANIMALS(2-WEEK STUDY)
APPENDIX G 5	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE: SACRIFICED ANIMALS (2-WEEK STUDY)
APPENDIX H 1	ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE: SUMMARY, RAT: MALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX H 2	ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX I 1	ORGAN WEIGHT: RELATIVE: SUMMARY, RAT: MALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX I 2	ORGAN WEIGHT: RELATIVE: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-WEEK STUDY)
APPENDIX J 1	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-WEEK STUDY)
APPENDIX J 2	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (2-WEEK STUDY)
APPENDIX J 3	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-WEEK STUDY)
APPENDIX J 4	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: MALE: SACRIFICED ANIMALS (2-WEEK STUDY)
APPENDIX J 5	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: SACRIFICED ANIMALS (2-WEEK STUDY)
APPENDIX K 1	IDENTITY AND IMPURITY OF p-NITROANISOLE IN THE 2-WEEK FEED STUDY

APPENDIXES (CONTINUED)

- | | |
|--------------|---|
| APPENDIX K 2 | STABILITY OF p-NITROANISOLE IN FEEDING OF RATS IN THE 2-WEEK FEED STUDY |
| APPENDIX K 3 | CONCENTRATION OF p-NITROANISOLE IN FORMULATED DIETS IN THE 2-WEEK FEED STUDY |
| APPENDIX K 4 | STABILITY OF p-NITROANISOLE IN FORMULATED DIETS IN THE 2-WEEK FEED STUDY |
| APPENDIX L 1 | METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE |
| APPENDIX M1 | UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRYIN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE |

要約

p-ニトロアニソールの経口投与によるがん原性試験の投与濃度決定試験（13週間試験）の予備試験として、p-ニトロアニソールをラットに2週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

試験にはF344/DuCrj(Fischer)ラットを用いた。被験物質投与群5群と対照群1群の計6群の構成で、雌雄各群とも5匹とし、合計60匹のラットを用いた。被験物質の投与は、p-ニトロアニソールを混合調製した粉末飼料を動物に2週間自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも1250ppm、2500ppm、5000ppm、10000ppm、20000ppm（公比2.0）とした。観察、検査項目は、一般状態の観察、体重の測定、摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

2週間の投与の結果、雌の20000ppm群の全動物が定期解剖までに死亡した。投与群の体重は、20000ppm群の雄では定期解剖日まで、雌では死亡するまで投与期間を通して減少し続けた。10000ppm群では雌雄共に定期解剖日まで体重増加の抑制が認められた。摂餌量は雄の2500ppm以上と雌の5000ppm以上群で低値が示された。一般状態観察では、被毛の着色がすべての投与群で、黄色尿が雄の2500ppm群以上と雌の全投与群に認められた。血液学的検査では雌雄ともに2500ppm以上の群で貧血傾向を示す赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値及び網状赤血球比の増加等が認められた。血液生化学的検査では、雌雄ともに5000ppm以上の群で総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質、GOT、GPT、 γ -GTP、尿素窒素等に変化がみられた。臓器重量は、5000ppm以上の群で肝臓、腎臓、脾臓の重量に変化がみられた。病理組織学的検査では、骨髓、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体及びハーダー腺に変化がみられ、特に雄の20000ppm群に肝細胞の巣状壊死、雌の20000ppm群に腎臓の尿細管壊死等が認められた。

以上のように20000ppm群では雌の全例が死亡し、雄においても著しい体重増加の抑制が認められ、病理組織学的検査では肝臓の巣状壊死、血液学的検査においては貧血が認められ、貧血を補う造血亢進を確認する所見も認められなかった。これに対し、10000ppm以下の群においても投与によるものと思われる変化がみられたが、これらの所見は薬物投与に対する適応的变化の範囲であると思われ、直ちに致命的となる毒性兆候とは考えられなかった。

これらの結果から13週間試験の投与濃度は10000ppmを最高投与濃度とし、以下5000ppm、2500ppm及び1250ppmの4段階（公比:2.0）の濃度を設

定した。さらに、13 週間の投与により、10000ppm 群でさらに体重増加の抑制が強まることも予想されるため、8000ppm を加えた合計 5 段階の投与濃度が適当であると考えた。

I 試験材料

I - 1 被験物質の性状等

I - 1 - 1 名称等

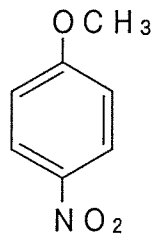
名 称 : P-ニトロアニソール(p-nitroanisol)

別 称 : 4-ニトロアニソール

1-メトキシ-4-ニトロベンゼン

CAS.No. : 100-17-4

I - 1 - 2 構造式、分子量 (文献 1)

 $C_7H_7NO_3$

分子量 : 153.14

I - 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色の粉末または板状結晶

融 点 : 54℃

沸 点 : 274℃

比 重 : 1.233 (20℃)

溶解性 : 水に不溶、エタノール、エーテルに可溶

保存条件 : 火気のない冷暗所に保存

I - 2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : 704S4061

製 造 元 : 関東化学株式会社

グ レード : 関東化学特級

純 度 : 99.7%(実測値)

I - 3 被験物質の特性・同一性・安定性

I - 3 - 1 特性・同一性

被験物質の同一性の確認は被験物質のマススペクトル及び赤外吸収スペクトルを測定し、p-ニトロアニソールの文献値と比較することにより行った。その結果、マススペクトルでは文献（文献 2）と同じ分子イオン及びフラグメントピークが確認された。また、赤外吸収スペクトルでは文献（文献 3）と同じ波長にピークが認められ、p-ニトロアニソールであることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX K 1 に示した。

I - 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は投与開始前及びその投与終了後に、ガスクロマトグラフによる分析を実施し、それぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、それぞれの測定結果に差はみられず、投与期間中の p-ニトロアニソールは安定であった。

それらの結果については、APPENDIX K 2 に示した。

I - 4 試験動物

動物は日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター（所在地：神奈川県厚木市下古沢 795 番地）より導入した F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。

ラット雌雄各 37 匹を生後 4 週齢で導入し、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 30 匹(群構成時体重範囲、雄:122～135g、雌:93～103g)を選別し、試験に供した。

II 試験方法

試験計画、材料及び方法等の概要を TABLE 1 に示した。

II - 1 投与

II - 1 - 1 投与経路、投与方法及び投与期間

経口投与とした。すなわち、p-ニトロアニソールを混合した粉末飼料の自由摂取により、2週間定期解剖日まで連続投与した。なお、対照群の動物には粉末飼料のみを与えた。

II - 1 - 2 投与濃度

雌雄とも 1250ppm、2500ppm、5000ppm、10000ppm、20000ppm (公比 2.0) とした。

II - 1 - 3 被験物質混合飼料の調製方法

被験物質を粉末飼料(オリエンタル酵母製 CRF-1)に混合し、40000ppm の混合飼料を作った。この混合飼料を更に粉末飼料と混合することによって各設定濃度の被験物質混合飼料を調製した。また、被験物質混合飼料の調製は投与開始前日に行った。調製した被験物質飼料は、半量を投与開始 1 週目用とし室温で保管した。残りの半量は 2 週目用とし冷蔵保存した。

なお、各試験における濃度の表示は、ppm (重量対重量比) とした。

II - 1 - 4 被験物質混合飼料中の被験物質濃度測定

各投与濃度に調製された被験物質混合飼料の濃度は、ガスクロマトグラフを用いて分析した。それらの結果を APPENDIX K 3 に示した。

各群の調製濃度は設定濃度に対し、97.5~102.0%であった。

II - 1 - 5 被験物質混合飼料中の被験物質安定性

調製した被験物質混合飼料について冷蔵及び室温で 8 日間の安定性を

それぞれ確認した。すなわち、20000ppm と 1250ppm に調製混合した被験物質混合飼料を調製直後と室温（動物飼育室）及び 5℃（冷蔵庫）でそれぞれ 8 日間保管した後に被験物質混合飼料中の被験物質濃度をガスクロマトグラフによって分析した。その結果、各保管期間において被験物質混合飼料中の被験物質濃度に変化は認められず被験物質混合飼料中の被験物質は安定であった。

それらの結果について、APPENDIX K 4 に示した。

II - 1 - 6 被験物質の摂取量

各計測週における摂餌量と設定濃度より体重当たりの被験物質の摂取量(g/kg/day) を算出した。

II - 2 動物管理

II - 2 - 1 各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 5 匹の動物を用いた。

群 番号	群 名 称	雄 使用動物数 (動物番号)	雌 使用動物数 (動物番号)
0	対 照 群	5 匹 (1001～1005)	5 匹 (2001～2005)
1	1250ppm 群	5 匹 (1101～1105)	5 匹 (2101～2105)
2	2500ppm 群	5 匹 (1201～1205)	5 匹 (2201～2205)
3	5000ppm 群	5 匹 (1301～1305)	5 匹 (2301～2305)
4	10000ppm 群	5 匹 (1401～1405)	5 匹 (2401～2405)
5	20000ppm 群	5 匹 (1501～1505)	5 匹 (2501～2505)

II - 2 - 2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより群間の体重の偏りを小さ

くする群分け方法(適正層別方式)により実施した(文献 4)。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布した。投与期間においては耳パンチにより識別した。なお、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

動物はバリア区域(AC-1 エリア)内の独立した室(101 室)に収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

II - 2 - 3 飼育条件

動物は、各試験ともに、全飼育期間を通して、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (実測値: $22.5 \sim 24.9^{\circ}\text{C}$ 、平均: $22.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 10\%$ (実測値: $50 \sim 58\%$ 、平均 $55 \pm 1\%$)、明暗サイクル: 12 時間点灯(8:00~20:00)/12 時間消灯(20:00~8:00)、換気回数 15~17 回/時に設定した環境下で飼育した。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連網ケージ: $170\text{W} \times 294\text{D} \times 176\text{H mm}$)に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)(工場所在地: 千葉県千葉市美浜区新港 8-2)の CRF-1 を使用し、検疫期間は CRF-1 固型飼料(30KGy- γ 線照射滅菌飼料)を固型飼料給餌器により、また馴化期間及び投与期間は CRF-1 粉末飼料(30KGy- γ 線照射滅菌飼料)を粉末飼料給餌器により自由摂取させた。

飲水は、全飼育期間を通して、フィルターろ過した市水(秦野市水道局供給)に紫外線を照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)、夾雑物については(財)日本食品分析センターの分析データを使用ロットごとに入手し、飲料水については(財)食品薬品安全センターに分析を委託し、それぞれ異常のないことを確認した。

II - 3 観察・検査項目及び方法

II - 3 - 1 動物の一般状態の観察

1 日 1 回、動物の生死を確認し、一般状態の詳細な観察を投与開始直前(群構成時)、投与開始後 1、3、7、10 及び 14 日目に生存するすべての動物について行った。

II - 3 - 2 体重測定

投与開始直前（群構成時）、投与開始後 1、3、7、10 及び 14 日目に生存するすべての動物について行った。なお、動物の死亡発見時にも体重を測定した。

II - 3 - 3 摂餌量測定

体重の計測に合わせて、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌期間で除した値を 1 日当たりの摂餌量とした。

II - 3 - 4 血液学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2K 入り採血管に採血した血液を用いて血液学的検査を行い、クエン酸ナトリウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いてプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の測定を行った。さらに、ヘパリンリチウム採血管に採血した血液を用いてメトヘモグロビン濃度の測定を行った。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX R 1 に示した。

II - 3 - 5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX L 1 に示した。

II - 3 - 6 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について剖検を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について TABLE 1 に示した臓器の実重量

を測定した。また、実重量の体重比、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

(3) 病理組織学的検査

全動物の臓器を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、TABLE 1 に示した臓器及び肉眼的に変化のみられた組織を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。

II - 4 数値処理と統計処理

II - 4 - 1 数値の取り扱いと表示

体重については g を単位とし、小数点以下第 1 位を四捨五入して整数値で表示した。

摂餌量については g を単位とし、計測期間を通しての摂餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

p - ニトロアニソールの体重当りの摂取量は摂餌量に p - ニトロアニソールの設定濃度を乗じ体重で除した値を g/kg(body weight)/day を単位として小数点以下第 4 位を四捨五入して小数点以下第 3 位まで表示した。

臓器実重量については g を単位とし、小数点以下第 3 位まで計測し、表示した。臓器重量体重比については臓器実重量値を解剖時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査については APPENDIX M 1 に示した精度により表示した。A/G 比はアルブミン/(総蛋白 - アルブミン)による計算で求め、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

なお、各数値データにおいての平均値及び標準偏差は上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

II - 4 - 2 母数の取り扱い

体重及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、その中から欠測となったデータを除外して母数とした。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象とし、その中から欠測となったデータを除外して母数とした。

剖検と病理組織学的検査データは、各群の有効動物数(供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数)を母数とした。

II - 4 - 3 統計処理

本試験で得られた測定値は対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。

また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett(型)の多重比較を行った。

予備検定については5%の有意水準で両側検定を行い、最終検定では5%及び1%で両側検定を行った。

II - 5 試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、被験物質、その他本試験に係る資料は試資料保管施設に保管する。保管期間は最終報告書提出後10年間とする。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ－１ 生死状況

生死状況を TABLE 2,3 に示した。

雌の 20000ppm 群で投与開始後 9～14 日までにすべての動物が死亡した。他の群には雌雄とも動物の死亡例は認められなかった。

Ⅲ－２ 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1,2 に示した。

雄では 20000ppm 群で動物の消耗を示す所見として、立毛、尿による外陰部周囲の汚染が認められた。黄色尿が 2500ppm 群以上のすべての動物で認められ、被毛の着色が 5000ppm 以上の群で認められた。

雌では 20000ppm 群で動物の消耗を示す所見として、立毛、尿による外陰部周囲の汚染、円背位、瘦削等が認められた。また、雌の投与群すべての動物に黄色尿が認められ、被毛の着色が 1250ppm 群の 1 匹を除いて投与群すべての動物に認められた。

Ⅲ－３ 体重

体重の推移を TABLE 2,3、FIGURE 1,2 及び APPENDIX B 1,2 に示した。

雄では 20000ppm 群で投与最終日まで減少し続け、10000ppm 群では投与最終日、5000ppm 群では投与 3 日目まで体重増加の抑制が認められた。なお、投与最終日の体重は対照群に対して、20000ppm 群で 45%、10000ppm 群で 82%、5000ppm 群で 96%、2500ppm 群で 99%、1250ppm 群で 99% であり、20000 及び 10000ppm 群は対照群と比較して有意な低値であった。

雌では、20000ppm 群で死亡するまで減少し、10000ppm 群では投与最終日、5000ppm 群では投与翌日まで体重増加の抑制が認められた。なお、投与最終日の体重は対照群に対して、10000ppm 群で 85%、5000ppm 群で 94%、2500ppm 群で 95%、1250ppm 群で 98% であり、10000ppm 群は対照群と比較して有意な低値であった。

Ⅲ－４ 摂餌量

摂餌量を TABLE 4,5、FIGURE 3,4 及び APPENDIX C 1,2 に示した。

雄では投与開始より、2500ppm 以上の群で摂餌量の低値が認められ、2500ppm 及び 5000ppm 群では投与開始 7 日目、10000ppm 群では投与開始 10 日目、20000ppm 群では投与最終日まで有意な低値が認められた。

雌では投与期間中に 5000ppm 以上の群で摂餌量の低値が認められ、5000ppm 群では投与開始 3 日目、10000ppm 群では投与最終日まで有意な低値が認められた。

Ⅲ－５ 被験物質摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より算出した被験物質摂取量を APPENDIX D 1,2 に示した。

被験物質の 1 日当たりの摂取量は、雄で 20000ppm 群：1.245～1.838g/kg、10000ppm 群：0.715～0.729g/kg、5000ppm 群：0.393～0.383g/kg、2500ppm 群：0.204～0.186g/kg、1250ppm 群：0.105～0.093g/kg、雌では 20000ppm 群：1.782g/kg、10000ppm 群：0.709～0.731g/kg、5000ppm 群：0.415～0.392g/kg、2500ppm 群：0.209～0.197g/kg、1250ppm 群：0.108～0.098g/kg であった。

Ⅲ－６ 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX E 1,2 に示し、統計学的に差を認めた所見を表 1 に抜粋した。

雄では、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、MCH の増加、網状赤血球比の増加ないし増加傾向が 5000ppm 以上の群で認められ、メトヘモグロビン濃度の増加傾向が 10000ppm 以上の群にみられた。また、プロトロンビン時間の延長、分葉核好中球比の増加及びリンパ球比の減少が 20000ppm 群で認められた。さらに、特異な変化として、血小板数が 2500ppm 群から 10000ppm 群までは増加し、20000ppm 群で減少、MCHC も 5000ppm 群と 10000ppm 群では増加し、20000ppm 群で減少した。その他、10000ppm 群でMCV 及び白血球数の増加、APTT の短縮がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

雌では、赤血球数、ヘモグロビン濃度の減少が 2500ppm 群から 10000ppm 群、ヘマトクリット値、MCHC の減少及び網赤血球比の増加、メトヘモグロビンの増加傾向が 5000ppm 群と 10000ppm 群で認められ、10000ppm 群ではMCV、MCH、血小板数の増加も認められた。その他、5000ppm 群でプロトロンビン時間の短縮がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

表1 血液学的検査

群(ppm)	対照群	1250	2500	5000	10000	20000
雄	動物数	5	5	5	4	5
赤血球数($10^6/\mu\text{L}$)	7.82 ± 0.14	7.88 ± 0.28	7.45 ± 0.28	6.32 ± 0.25**	5.79 ± 0.26**	5.66 ± 0.33**
ヘモグロビン濃度(g/dL)	14.4 ± 0.2	14.3 ± 0.4	13.6 ± 0.4	12.1 ± 0.5**	11.6 ± 0.5**	11.3 ± 0.7**
ヘマトクリット値(%)	43.6 ± 0.9	43.5 ± 1.6	41.7 ± 1.5	38.2 ± 1.2**	36.3 ± 1.0**	31.8 ± 2.7**
MCV(fL)	55.8 ± 0.4	55.2 ± 0.2	56 ± 0.3	60.5 ± 1.0	62.8 ± 1.3*	56.0 ± 1.5
MCH(pg)	18.4 ± 0.2	18.1 ± 0.2	18.3 ± 0.2	19.2 ± 0.4**	20.0 ± 0.5**	20.0 ± 0.3**
MCHC(pg)	33.0 ± 0.2	32.8 ± 0.5	32.6 ± 0.3	31.6 ± 0.8**	31.9 ± 0.4*	35.8 ± 0.8**
血小板数($10^3/\mu\text{L}$)	875 ± 32	866 ± 73	986 ± 25**	1098 ± 43**	1056 ± 55**	619 ± 33**
網状赤血球比(%)	26 ± 6	31 ± 6	38 ± 5	107 ± 12	194 ± 25**	238 ± 92**
メトヘモグロビン濃度(%)	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.5	0.7 ± 0.5	1.4 ± 1
プロトロンビン時間(sec)	14.0 ± 0.2	14.1 ± 0.2	14.1 ± 0.5	13.5 ± 0.2	14.1 ± 0.3	16.0 ± 0.5**
A P T T(sec)	18.4 ± 2.8	15.9 ± 2.9	16.8 ± 2.4	14.3 ± 2.7	11.9 ± 1.1*	21.9 ± 5.8
白血球数($10^3/\mu\text{L}$)	3.01 ± 0.52	3.47 ± 1.31	4.47 ± 0.97	4.23 ± 0.38	5.96 ± 1.90*	2.92 ± 0.59
分葉核好中球(%)	10 ± 4	13 ± 1	11 ± 3	16 ± 4	21 ± 7	40 ± 18**
リンパ球(%)	87 ± 4	85 ± 1	87 ± 4	81 ± 3	75 ± 9	57 ± 18**
雌	動物数	5	5	5	5	0
赤血球数($10^6/\mu\text{L}$)	8.21 ± 0.26	8.02 ± 0.11	7.52 ± 0.29**	6.15 ± 0.23**	5.75 ± 0.28**	-
ヘモグロビン濃度(g/dL)	15.2 ± 0.5	14.8 ± 0.3	13.6 ± 0.7**	11.5 ± 0.5**	11.1 ± 0.7**	-
ヘマトクリット値(%)	44.4 ± 1.2	43.3 ± 0.4	40.6 ± 1.6	36.0 ± 1.4**	34.9 ± 2.6**	-
MCV(fL)	54.1 ± 0.4	53.9 ± 0.3	53.9 ± 0.4	58.6 ± 0.4	60.6 ± 1.6*	-
MCH(pg)	18.5 ± 0.2	18.5 ± 0.2	18.1 ± 0.2	18.8 ± 0.2	19.3 ± 0.3**	-
MCHC(pg)	34.2 ± 0.3	34.3 ± 0.4	33.6 ± 0.4	32.0 ± 0.6**	31.8 ± 0.6**	-
血小板数($10^3/\mu\text{L}$)	871 ± 49	815 ± 75	852 ± 63	894 ± 48	971 ± 56*	-
網状赤血球比(%)	22 ± 9	22 ± 7	32 ± 13	111 ± 18*	199 ± 41**	-
メトヘモグロビン濃度(%)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.4	-
プロトロンビン時間(sec)	15.1 ± 0.2	14.7 ± 0.1	14.7 ± 0.4	14.4 ± 0.5*	15.2 ± 0.2	-

有意差 *; $p \leq 0.05$ **; $p \leq 0.01$ ダンネット検定

III - 7 血液生化学的検査

雄では、総蛋白、アルブミン及び総ビリルビンの増加が 5000ppm 以上の群、総コレステロール、リン脂質、カリウムの増加及び γ -G T P 活性の上昇傾向が 10000ppm 以上の群、A / G 比、G P T 活性、尿素窒素、ナトリウムの増加、L D H 活性の上昇傾向、並びにグルコースの減少、C P K 活性の低下が 20000ppm 群で認められた。また、G O T 活性は 10000ppm 群までは投与濃度に対応した変化ではなかったが、20000ppm 群では増加傾向を示した。その他、5000ppm 群、10000ppm 群でクロールの減少、カルシウムの増加、5000ppm 群で無機リン増加がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

雌では、総蛋白、総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質及びカルシウムの増加が 5000ppm 群と 10000ppm 群で認められ、アルブミン、カリウムの増加、 γ -G T P 活性の上昇、L D H 活性の上昇傾向、グルコースの減少が 10000ppm 群で認められた。

表2 血液生化学的検査

群(ppm)	対照群	1250	2500	5000	10000	20000
雄	動物数	5	5	5	4	5
総蛋白(g/dL)	5.6 ± 0.1	5.6 ± 0.2	5.9 ± 0.1	6.3 ± 0.3**	6.6 ± 0.4**	6.8 ± 0.2**
アルブミン(g/dL)	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.2*	4.2 ± 0.3*	4.6 ± 0.2**
A/G比	1.9 ± 0.0	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1**
総ビリルビン(mg/dL)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.02*	0.22 ± 0.02**	0.24 ± 0.02**
グルコース(mg/dL)	178 ± 11	202 ± 16	183 ± 12	179 ± 10	152 ± 2	97 ± 22*
総コレステロール(mg/dL)	64 ± 3	63 ± 4	74 ± 3	98 ± 8	141 ± 13**	143 ± 23**
リン脂質(mg/dL)	123 ± 5	120 ± 6	142 ± 5	180 ± 14	255 ± 24**	249 ± 43**
GOT活性(IU/L)	55 ± 2	57 ± 3	52 ± 3	51 ± 1	43 ± 3*	90 ± 56
GPT活性(IU/L)	29 ± 1	28 ± 2	29 ± 2	29 ± 2	28 ± 5	104 ± 79*
γ-GTP(IU/L)	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	7 ± 1	53 ± 28
CPK(IU/L)	176 ± 59	190 ± 87	160 ± 41	128 ± 14	123 ± 11	112 ± 55*
尿素窒素(mg/dL)	14.8 ± 1.7	16.5 ± 1.9	15.6 ± 2.4	16.5 ± 2.2	17.9 ± 1.0	37.2 ± 9.2**
ナトリウム(mEq/L)	140 ± 1	140 ± 1	139 ± 1	140 ± 1	138 ± 2	143 ± 1**
カリウム(mEq/L)	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2	5.3 ± 0.3**	4.8 ± 0.7*
クロール(mEq/L)	105 ± 1	104 ± 1	104 ± 0	102 ± 1*	101 ± 1**	105 ± 2
カルシウム(mg/dL)	10.9 ± 0.1	10.9 ± 0.2	11 ± 0.1	11.3 ± 0.1*	11.4 ± 0.2**	10.8 ± 0.3
無機リン(mg/dL)	7.7 ± 1.2	7.8 ± 1.2	8.6 ± 1.2	9.7 ± 1.6*	9.5 ± 0.8	6.8 ± 0.5

雌	動物数	5	5	5	5	5	0
総蛋白(g/dL)	5.4 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.1	5.8 ± 0.2**	6.4 ± 0.1**	-	-
アルブミン(g/dL)	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.8 ± 0.2	4.2 ± 0.1**	-	-
総ビリルビン(mg/dL)	0.12 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.02**	0.22 ± 0.04**	-	-
グルコース(mg/dL)	173 ± 12	177 ± 14	174 ± 12	160 ± 13	145 ± 4**	-	-
総コレステロール(mg/dL)	69 ± 2	68 ± 4	73 ± 6	105 ± 7**	141 ± 2**	-	-
リン脂質(mg/dL)	125 ± 6	124 ± 10	133 ± 11	177 ± 8**	235 ± 6**	-	-
LDH(IU/L)	246 ± 54	358 ± 198	346 ± 94	333 ± 141	498 ± 230	-	-
γ-GTP(IU/L)	2 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	13 ± 1**	-	-
カリウム(mEq/L)	4.1 ± 0.4	4.3 ± 0.6	4 ± 0.4	4.7 ± 0.4	5.1 ± 0.7*	-	-
カルシウム(mg/dL)	10.5 ± 0.1	10.5 ± 0.1	10.4 ± 0.1	10.8 ± 0.2*	11.0 ± 0.1**	-	-

有意差 *: p ≤ 0.05 **: p ≤ 0.01 ダンネット検定

有意差

*: p ≤ 0.05

**: p ≤ 0.01

ダンネット検定

III - 8 病理学的検査

III - 8 - 1 剖検

解剖時に観察された剖検所見のまとめを APPENDIX G 1~2 に示した。
また、死亡・瀕死動物の解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX G 3 に
示し、定期解剖例の解剖時に観察された所見を APPENDIX G 4~5 に示した。

<投与期間中死亡例>

雄では、死亡例は認められなかった。雌では 20000ppm 群に胸腺の萎縮
(5/5 例)が認められた。

<定期解剖例>

雄では 20000ppm 群で胸腺の萎縮(5/5 例)、脾臓の暗色(5/5 例)、肝臓の
暗色(5/5 例)が認められ、10000ppm 群では脾臓の暗色(4/5 例)、5000ppm 群
でも脾臓の暗色(5/5 例)が認められた。

雌では 10000ppm 群で脾臓の暗色(4/5 例)、5000ppm 群でも脾臓の暗色(5/5

例)が認められた。

Ⅲ－８－２ 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を APPENDIX H 1,2、I 1,2 に示し、統計学的に差を認めた臓器の実重量及び体重比を表 3 に抜粋した。

表3 臓器重量

群(ppm)		对照群	1250	2500	5000	10000	20000
雄	動物数	5	5	5	5	5	5
解剖日体重(g)		192 ± 4	190 ± 5	190 ± 6	184 ± 5	157 ± 3**	87 ± 10**
実重量(g)							
胸腺	0.361 ± 0.019	0.354 ± 0.031	0.360 ± 0.030	0.349 ± 0.032	0.282 ± 0.018**	0.039 ± 0.016**	
副腎	0.045 ± 0.003	0.044 ± 0.004	0.043 ± 0.004	0.046 ± 0.004	0.046 ± 0.004	0.043 ± 0.003	
精巣	2.469 ± 0.110	2.465 ± 0.078	2.482 ± 0.124	2.567 ± 0.134	2.472 ± 0.111	1.545 ± 0.387	
心臓	0.662 ± 0.046	0.692 ± 0.028	0.697 ± 0.042	0.691 ± 0.062	0.562 ± 0.020**	0.369 ± 0.049**	
肺	0.839 ± 0.020	0.818 ± 0.046	0.825 ± 0.033	0.819 ± 0.023	0.767 ± 0.098	0.540 ± 0.031**	
腎臓	1.473 ± 0.059	1.459 ± 0.025	1.575 ± 0.102	1.725 ± 0.079**	1.577 ± 0.105	1.204 ± 0.106**	
脾臓	0.483 ± 0.028	0.472 ± 0.018	0.539 ± 0.040	0.820 ± 0.065**	0.858 ± 0.078**	0.381 ± 0.041*	
肝臓	7.582 ± 0.408	7.648 ± 0.380	8.612 ± 0.378	9.830 ± 0.353*	10.952 ± 1.061**	6.960 ± 1.232	
脳	1.716 ± 0.042	1.726 ± 0.029	1.759 ± 0.062	1.752 ± 0.061	1.678 ± 0.054	1.616 ± 0.022*	
体重比(%)							
胸腺	0.188 ± 0.007	0.186 ± 0.011	0.189 ± 0.015	0.190 ± 0.017	0.179 ± 0.014	0.043 ± 0.013**	
副腎	0.023 ± 0.002	0.023 ± 0.001	0.023 ± 0.003	0.025 ± 0.002	0.029 ± 0.002	0.050 ± 0.008**	
精巣	1.287 ± 0.032	1.296 ± 0.029	1.304 ± 0.054	1.369 ± 0.059	1.572 ± 0.051*	1.755 ± 0.298*	
心臓	0.345 ± 0.019	0.364 ± 0.007	0.366 ± 0.016	0.376 ± 0.025	0.358 ± 0.019	0.422 ± 0.024**	
肺	0.438 ± 0.015	0.430 ± 0.016	0.433 ± 0.007	0.446 ± 0.009	0.487 ± 0.055	0.624 ± 0.059*	
腎臓	0.769 ± 0.034	0.767 ± 0.017	0.827 ± 0.035	0.938 ± 0.030**	1.003 ± 0.052**	1.385 ± 0.057**	
脾臓	0.252 ± 0.015	0.248 ± 0.011	0.283 ± 0.015	0.446 ± 0.029**	0.545 ± 0.040**	0.438 ± 0.040**	
肝臓	3.954 ± 0.207	4.021 ± 0.158	4.524 ± 0.171	5.350 ± 0.210	6.963 ± 0.607**	7.943 ± 0.613**	
脳	0.895 ± 0.029	0.908 ± 0.024	0.924 ± 0.025	0.953 ± 0.033	1.067 ± 0.024*	1.869 ± 0.186**	
雌	動物数	5	5	5	5	5	0
解剖日体重(g)		126 ± 6	123 ± 7	120 ± 8	118 ± 5	107 ± 6**	-
実重量(g)							
胸腺	0.286 ± 0.020	0.293 ± 0.014	0.280 ± 0.026	0.271 ± 0.022	0.248 ± 0.021*	-	
卵巣	0.105 ± 0.015	0.098 ± 0.007	0.097 ± 0.015	0.095 ± 0.020	0.064 ± 0.009**	-	
心臓	0.499 ± 0.020	0.484 ± 0.030	0.480 ± 0.046	0.491 ± 0.027	0.424 ± 0.026**	-	
肺	0.646 ± 0.046	0.647 ± 0.036	0.615 ± 0.031	0.628 ± 0.043	0.573 ± 0.022*	-	
腎臓	1.006 ± 0.040	1.021 ± 0.079	1.026 ± 0.059	1.076 ± 0.089	1.045 ± 0.066	-	
脾臓	0.330 ± 0.026	0.340 ± 0.024	0.354 ± 0.027	0.606 ± 0.054**	0.580 ± 0.028**	-	
肝臓	4.462 ± 0.381	4.485 ± 0.233	4.767 ± 0.496	6.022 ± 0.363**	7.019 ± 0.509**	-	
脳	1.611 ± 0.039	1.619 ± 0.024	1.637 ± 0.024	1.618 ± 0.070	1.606 ± 0.025	-	
体重比(%)							
胸腺	0.226 ± 0.013	0.238 ± 0.019	0.234 ± 0.015	0.230 ± 0.011	0.232 ± 0.011	-	
卵巣	0.083 ± 0.014	0.079 ± 0.007	0.081 ± 0.008	0.080 ± 0.014	0.060 ± 0.006**	-	
心臓	0.396 ± 0.021	0.393 ± 0.025	0.400 ± 0.017	0.416 ± 0.017	0.398 ± 0.022	-	
肺	0.512 ± 0.019	0.525 ± 0.017	0.514 ± 0.024	0.532 ± 0.021	0.538 ± 0.020	-	
腎臓	0.798 ± 0.030	0.828 ± 0.031	0.857 ± 0.025*	0.911 ± 0.047**	0.979 ± 0.032**	-	
脾臓	0.262 ± 0.016	0.276 ± 0.010	0.296 ± 0.020	0.514 ± 0.046**	0.543 ± 0.026**	-	
肝臓	3.532 ± 0.177	3.644 ± 0.160	3.973 ± 0.194**	5.103 ± 0.189**	6.568 ± 0.190**	-	
脳	1.278 ± 0.051	1.317 ± 0.057	1.372 ± 0.097	1.372 ± 0.046	1.506 ± 0.058**	-	

有意差 *; $p \leq 0.05$ **; $p \leq 0.01$ ダンネット検定

雄では、胸腺の実重量と体重比の低値が 20000ppm 群に認められた。また、肝臓と脾臓の実重量と体重比の高値、腎臓の体重比の高値が 10000ppm 以上の群に認められ、腎臓と脾臓の実重量と体重比の高値と肝臓の実重量の高値が 5000ppm 群で認められた。

雌では、10000ppm 群に肝臓と脾臓の実重量と体重比の高値、卵巣の実重量と体重比の低値及び胸腺の実重量の低値が認められ、5000ppm 群では肝臓と脾臓の実重量と体重比の高値と腎臓の体重比の高値、2500ppm 群では腎臓と肝臓の体重比の高値が認められた。

その他、雄の 10000ppm 以上の群、雌の 10000ppm 群にストレスや解剖時体重の低値に伴ったと思われる実重量の低値と体重比の高値が多く臓器に認められた。

III - 8 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果のまとめを APPENDIX J1,J2 に示し、死亡・瀕死(雌の 20000ppm 群に 5/5 例)例に観察された所見を APPENDIX J3 に示し、定期解剖例に観察された所見を APPENDIX J4,J5 に示した。

また、投与の影響があったと思われる所見については表 4 に抜粋した。

表4 病理組織学的検査

表4 病態組織学的検査																									
群(ppm)		対照群				1250				2500				5000				10000				20000			
動物数		5				5				5				5				5				5			
グレード		<1>	<2>	<3>	<4>	<1>	<2>	<3>	<4>	<1>	<2>	<3>	<4>	<1>	<2>	<3>	<4>	<1>	<2>	<3>	<4>				
雄																									
[骨髓]																									
	鬱血	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
[胸腺]																									
	萎縮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
[脾臓]																									
	ヘモジリン沈着	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0			
	髄外造血	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0			
	赤血球充満	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0			
[肝臓]																									
	壊死：巣状	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	肝細胞の肥大：中心性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	5	0	0	0	0			
[腎臓]																									
	好酸体	4	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	2	3	0	0	2	3	0	0			
[精巣]																									
	精原細胞壊死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
[精巣上体]																									
	精上皮系細胞残屑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
[ハーダー腺]																									
	変性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	4	1	0	0	0			
	リンパ球浸潤	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			

雌																									
[骨髓]																									
	鬱血	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
[胸腺]																									
	萎縮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
[脾臓]																									
	萎縮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	ヘモジリン沈着	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	髄外造血	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0			
	赤血球充満	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0			
[肝臓]																									
	肝細胞の肥大：中心性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	0			
[腎臓]																									
	尿細管壊死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
[ハーダー腺]																									
	変性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0			
	リンパ球浸潤	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	5	0	0	0	0			

<投与期間中死亡例>

雄では、死亡例は認められなかった。雌では、20000ppm 群の死亡 5 例に骨髓の鬱血(5/5 例)、胸腺の萎縮(5/5 例)、脾臓の萎縮(5/5 例)、ヘモジデリン沈着(2/5 例)、赤血球充満(3/5 例)、腎臓の尿細管壊死(4/5 例)、及びハーダー腺の変性(3/5 例)が認められた。

<定期解剖例>

雄では、20000ppm 群で骨髓の鬱血(3/5 例)、胸腺の萎縮(5/5 例)、脾臓のヘモジデリン沈着(5/5 例)、赤血球充満(5/5 例)、肝臓の巣状壊死(3/5 例)、精巣の精原細胞壊死(2/5 例)、精巣上体の精上皮系細胞残屑(3/5 例)及びハーダー腺の変性(5/5 例)が認められた。10000ppm 群では脾臓の赤血球充満(5/5 例)、髓外造血(5/5 例)、ヘモジデリン沈着(2/5 例)、肝臓の肝細胞の中心性肥大(5/5 例)、ハーダー腺の変性(5/5 例)とリンパ球浸潤(1/5 例)が認められ、腎臓の好酸体は程度の増強を示した。5000ppm 群では脾臓の赤血球充満(5/5 例)、髓外造血(5/5 例)、肝臓の肝細胞の中心性肥大(3/5 例)、ハーダー腺の変性(5/5 例)とリンパ球浸潤(1/5 例)が認められ、腎臓の好酸体が程度の増強を示した。2500ppm 群では脾臓の赤血球充満(4/5 例)と髓外造血(4/5 例)が認められ、腎臓の好酸体が程度の増強を示した。

雌では、10000ppm 群で脾臓の赤血球充満(5/5 例)、髓外造血(5/5 例)、肝臓の肝細胞の中心性肥大(4/5 例)、ハーダー腺の変性(2/5 例)、リンパ球浸潤(5/5 例)が認められた。5000ppm 群では脾臓の赤血球充満(5/5 例)、髓外造血(5/5 例)、肝臓の肝細胞の中心性肥大(2/5 例)、ハーダー腺の変性(1/5 例)、リンパ球浸潤(4/5 例)が認められた。2500ppm 群では脾臓の赤血球充満(5/5 例)と髓外造血(1/5 例)が認められた。

その他、鼻腔に鼻腺の呼吸上皮化生(雌雄)、肝臓にヘルニア(雌雄)、腎臓に好塩基性変化(雌雄)、皮髓境界部の鉍質沈着(雌雄)、乳頭の鉍質沈着(雌のみ)及び皮質の鉍質沈着(雌のみ)、下垂体にラトケ囊(雌雄)、甲状腺に外側甲状腺遺残(雌のみ)が認められたが、これらは通常この週齢に認められる変化であり、投与濃度に対応した発生を示していないことから投与の影響とは考えなかった。

IV 考察及びまとめ

<雄>

p-ニトロアニソールの投与により、20000ppm 群では死亡は認められなかった。一般状態の観察では投与開始 3 日目より p-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる黄色尿が確認された。体重は定期解剖日まで減少し続け、定期解剖時の体重は対照群の 45%であり、群構成時の 67%であった。これは、飼料摂取量の不足に起因するもので、摂餌量は投与期間を通じて対照群のほぼ 50%であり、投与開始翌日より糞少量が認められた。動物の消耗を示す一般状態所見として、立毛、尿による外陰部周囲の汚染、病理組織学的所見として胸腺の萎縮、骨髓の鬱血などが認められた。さらに、血液生化学的検査においてはグルコースの低下が認められ、低栄養状態であったことが示唆された。血液学的検査において認められた貧血は、病理組織学的検査において脾臓にヘモジデリンの沈着及び赤血球充満が認められていることから、p-ニトロアニソールの投与により赤血球が障害を受け、脾臓において赤血球が崩壊したことによる溶血性の貧血と思われる。また、血液生化学的検査において認められた総ビリルビンの増加は、崩壊した赤血球から溶出したヘモグロビンが代謝されることにより、ビリルビンの生成が増加したためと思われる。血液生化学的検査において、グルコースが低下し、低栄養状態が示唆されたにも係らず、総コレステロール、リン脂質が増加していることより、脂質の代謝異常または尿素窒素も増加していることから肝臓や腎臓の障害が疑われた。また、病理組織学的検査において肝臓の壊死が認められており、血液生化学的検査においても GOT および GPT が増加しており、p-ニトロアニソールの投与による肝臓の障害が疑われた。その他、精巣、精巣上体及びハーダー腺の変性が認められた。なお、血液学的検査で血小板数および MCHC の変化に用量依存性が認められなかったが、これは 20000ppm 群において全身的な消耗が著しく、造血機能が低下したためと思われる。

10000ppm 群では、一般状態観察で投与開始 10 日目より p-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる黄色尿及び被毛の着色が確認された。摂餌量は投与期間前半では対照群の 46~69%であったため、投与開始翌日より 7 日まで糞少量が認められた。体重は投与開始 3 日まで減少し、その後定期解剖までは増加したが定期解剖時の体重は対照群の 82%であり体重増加の抑制が認められた。血液学的検査において、貧血が認められたが 20000ppm 群の雄と同様、溶血性の貧血と思われる。ただし、20000ppm 群では認められなかった脾臓の髄外造血が認められ、血液学検査においても網状赤血球の増加していることより、p-ニトロアニソールの投与による

貧血を補う生体機構が働いていたものと考えられる。また、肝臓において中心性の肝細胞の肥大が認められ、臓器重量も増加しているが、20000ppm群のように病理組織学的検査における壊死像及び血液生化学的検査における肝機能障害を疑わせる所見は認められず、p-ニトロアニソールの代謝等に係る適応的变化であったと考えられた。また、ハーダー腺の変性も20000ppm群同様に認められた。

5000ppm群では、一般状態観察で投与開始10日目よりp-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる黄色尿及び被毛の着色が確認された。体重は対照群と比較して大きな差は無かった。血液学的検査において、貧血が認められたが20000ppm群の雄と同様、溶血性の貧血と思われた。ただし、10000ppm群同様、貧血を補う脾臓の髄外造血及び網状赤血球の増加を確認した。また、肝臓において中心性の肝細胞肥大及び臓器重量の増加も10000ppm群同様認められた。ハーダー腺の変性も10000ppm群同様に認められた。

2500ppm群の雄では、一般状態の観察で投与開始14日目にp-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる黄色尿が確認された。体重は対照群と比較して大きな差は無かった。血液学的検査において、5000ppm以上の群で認められた貧血は認められなかったが、5000ppm群同様、脾臓の髄外造血及び赤血球充満が認められているため赤血球の障害は続いているが造血との均衡が保たれている状態と思われた。

1250ppm群では、対照群と比較して大きな変化は認められなかった。

<雌>

20000ppm群では定期解剖までにすべての動物が死亡した。一般状態観察で投与開始3日目よりp-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる黄色尿が確認された。体重は死亡するまで減少し続け、投与開始翌日より、糞少量が認められた。動物の消耗を示す一般状態所見として、立毛、円背位、瘦削、尿による外陰部周囲の汚染、病理組織学的所見として、胸腺の萎縮、脾臓の萎縮、骨髓の鬱血などが認められた。さらに、病理組織学的検査においては腎臓の尿細管壊死が認められており、p-ニトロアニソールの投与による腎障害が示唆された。その他、ハーダー腺の変性が認められた。

10000ppm群では、一般状態の観察で投与開始3日目よりp-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる被毛の着色が確認され10日目より黄色尿が確認された。体重は投与開始3日まで減少し、その後定期解剖までは増加したが定期解剖時の体重は対照群の85%であり体重増加の抑

制が認められた。これは、飼料摂取量の不足に起因するもので、摂餌量は投与期間中対照群の 64～88%であり、投与開始翌日より 7 日まで糞少量が認められた。血液学的検査において、貧血が認められたが雄と同様、溶血性の貧血と思われた。ただし、病理組織学的検査において脾臓の髄外造血が認められ、血液学検査においても網状赤血球の増加が確認されており、p-ニトロアニソールの投与による貧血を補う生体機構が働いていた。また、肝臓において中心性の肝細胞の肥大が認められ、臓器重量も増加しているが、病理組織学的検査及び血液生化学的検査において肝機能障害を疑わせる所見は認められず、p-ニトロアニソールの代謝等に係る適応的变化であったと考えられた。また、ハーダー腺の変性も 20000ppm 群同様に認められた。

5000ppm 群では、一般状態の観察で投与開始 10 日目より p-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる黄色尿及び被毛の着色が確認された。体重は対照群と比較して大きな差は認められなかった。血液学的検査において、貧血が認められたが 20000ppm 群の雄と同様、溶血性の貧血と思われた。ただし、10000ppm 群同様、貧血を補う脾臓の髄外造血及び網状赤血球の増加を確認した。また、肝臓において中心性の肝細胞肥大及び臓器重量の増加も 10000ppm 群同様認められた。ハーダー腺の変性も 10000ppm 群同様に認められた。

2500ppm 群では、一般状態の観察で投与開始 10 日目から p-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる黄色尿及び被毛の着色が確認された。体重は対照群と比較して大きな差は無かった。血液学的検査において、貧血が認められなかったが、5000ppm 群同様、脾臓の髄外造血及び赤血球充満が認められていることより赤血球の障害は続いているが造血との均衡が保たれている状態と思われた。

1250ppm 群では、対照群と比較して大きな変化は認められなかった。

以上より、p-ニトロアニソールの投与により雌雄ともに溶血性の貧血及び体重増加の抑制、標的臓器として腎臓、肝臓、脾臓及びハーダー腺が考えられ、これらを考慮して 13 週間試験の用量を決定した。すなわち、本試験の最高投与群の 20000ppm 群では雌の全例が死亡し、雄においても著しい体重増加の抑制（対照群の 45%）が認められ、病理組織学的検査では肝臓の巣状壊死、血液学的検査においては貧血が認められ、かつ、貧血を補う髄外造血も認められなかった。その下の用量である 10000ppm 群では、雌雄とも体重増加の抑制（対照群に対して、雄：18%、雌：15%）が認められたが、その他の検査において認められた所見は p-ニトロアニソ

ールの投与対する適応的变化の範囲と考えられた。

従って、13 週間試験の投与濃度は雌雄ともに 10000ppm を最高投与濃度とし、以下 5000ppm、2500ppm 及び 1250ppm の 4 段階(公比:2.0)の濃度を設定し、さらに、13 週間の投与により、10000ppm 群で体重増加の抑制が強まることも予想されるため、8000ppm を加えた合計 5 段階の投与濃度が適当であると考えた。

文献

- 1) 化学大事典 (1989)
東京化学同人 東京
- 2) Fred W. McLafferty (1994) Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition. John Wiley and Sons, Inc. (U.S.), Entry Number 38330.
- 3) William W. Simons (1978) The Sadtler Handbook of Infrared Spectra. Sadtler Research Laboratories, Inc. (U.K.), pp.443
- 4) 阿部正信 (1968)
長期毒性試験に用いるラット、マウス体重変化の解析による群分けの
適正層別方式の確立
薬理と治療、14、7285-7302