

p-ニトロアニソールのラットを用いた
経口投与によるがん原性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0401

CAS No. 100-17-4

2004年3月31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

標 題

p-ニトロアニソールのラットを用いた経口投与によるがん原性試験(混餌試験)

試験目的

p-ニトロアニソールをラットに 104 週間経口（混餌）投与し、がん原性を検索した。

試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準について」及び OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 1981 年 5 月 12 日採択）に準じて実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設が具備すべき基準」（一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課
東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

試験施設及び運営管理者

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
所長 松島 泰次郎
神奈川県秦野市平沢 2445 番地

p-ニトロアニソールのラットを用いた
経口投与によるがん原性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0401

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	
I-1-1 名称等	3
I-1-2 構造式、分子式、分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質の使用ロット等	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	5
II-1-2 被験物質の投与方法	5
II-1-3 投与期間	5
II-1-4 投与濃度	5
II-1-5 投与の方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法	6
II-1-7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性	6
II-1-8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性	7
II-1-9 被験物質の摂取量	7

Ⅱ－2	動物管理	8
Ⅱ－2－1	各群の使用動物数	8
Ⅱ－2－2	群分け及び個体識別方法	8
Ⅱ－2－3	飼育条件	8
Ⅱ－3	観察・検査項目及び方法	9
Ⅱ－3－1	動物の一般状態の観察	9
Ⅱ－3－2	体重測定	9
Ⅱ－3－3	摂餌量測定	9
Ⅱ－3－4	血液学的検査	10
Ⅱ－3－5	血液生化学的検査	10
Ⅱ－3－6	尿検査	10
Ⅱ－3－7	病理学的検査	10
Ⅱ－4	数値処理と統計処理	
Ⅱ－4－1	数値の取り扱いと表示	11
Ⅱ－4－2	母数の取り扱い	11
Ⅱ－4－3	統計処理	12
Ⅲ	試験成績	13
Ⅲ－1	生死状況	13
Ⅲ－2	一般状態	13
Ⅲ－3	体重	13
Ⅲ－4	摂餌量	14
Ⅲ－5	被験物質摂取量	14
Ⅲ－6	血液学的検査	15
Ⅲ－7	血液生化学的検査	15
Ⅲ－8	尿検査	16
Ⅲ－9	病理学的検査	16
Ⅲ－9－1	剖検	16
Ⅲ－9－2	臓器重量	16
Ⅲ－9－3	病理組織学的検査	17
Ⅲ－9－4	死因	20

IV 考察及びまとめ	21
IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変	22
IV-2 その他の影響	23
IV-4 他文献との比較等	24
V 結論	25
VI 文献	26

要約

p-ニトロアニソールのがん原性を検索する目的でF344/DuCrj(Fischer)ラットを用いた混餌経口投与による2年間(104週間)の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群3群と対照群1群の計4群の構成で、雌雄各群とも50匹とし、合計400匹を用いた。被験物質の投与は、*p*-ニトロアニソールを混合した粉末飼料を動物に自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも2000、4000及び8000 ppm(公比2)とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

雄の生存率は、8000 ppm群で慢性腎症により多くの動物が死亡(50匹中45匹)し、対照群に比べて著しく低下した。雌の生存率は、8000 ppm群では主に慢性腎症により低下した。また、雌の投与群は子宮の腫瘍(子宮腺癌)による死亡が対照群と比べ多かった。一般状態の観察では、雌雄ともに投与群の全ての動物に黄色尿と被毛の着色が認められた。体重は、雄の8000 ppm群では投与期間を通して、4000 ppm群では投与後半に、対照群と比較して低値を示した。雌では投与期間を通して全投与群で体重増加の抑制が認められた。摂餌量は雄では8000 ppm群で対照群と比較して主に投与後半に低値を示した。雌では、各投与群とも投与期間を通して対照群と比較して摂餌量の低値が認められた。血液学的検査では、雌雄とも赤血球数やヘモグロビン濃度が減少し、貧血を示した。血液生化学的検査では尿素窒素の増加や電解質のパラメーターに変化がみられ、腎障害が示唆された。

病理組織学的検査では、腫瘍性病変として、雄に肝細胞腺腫の発生増加が認められ、肝臓に前腫瘍性病変である好塩基性小増殖巣と海綿状変性の増加が4000 ppm群と8000 ppm群でみられた。雌には子宮腺癌の発生増加が認められ、投与群の子宮腺癌は他臓器への転移もみられた。なお、雌にも肝細胞腺腫の発生増加が8000 ppm群でみられた。慢性腎症は、雄ではすべての投与群で程度の増強がみられ、雌では4000 ppm群と8000 ppm群で発生匹数の増加と程度の増強が認められた。

F344/DuCrj(Fisher)ラットを用いて*p*-ニトロアニソールの2年間(104週間)にわたる混餌投与によるがん原性試験を行った結果より以下の結論を得た。雄ラットに肝細胞腺腫の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールの雄ラットに対するがん原性を示す証拠と考えられた。雌ラットには子宮腺癌の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールの雌ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。

p-ニトロアニソールのがん原性試験における主な腫瘍発生（ラット 雄）

	投 与 濃 度 (ppm)		0	2000	4000	8000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	皮下組織	線維腫	2	2	4	0	↑ ↑	↑ ↑
	胃	扁平上皮乳頭腫	1	3	0	0		
	肝臓	肝細胞腺腫	0	1	13**	11**		
	下垂体	腺腫	14	11	9	9		
	甲状腺	C-細胞腺腫	7	11	10	2		
	副腎	褐色細胞腫	4	3	1	2	↑ ↑	↑ ↑
	精巣	間細胞腫	34	45**	48**	48**		
	乳腺	線維腺腫	0	2	3	0		
悪性腫瘍	脾臓	単核球性白血病	8	5	3	0**		↓ ↓
	甲状腺	C-細胞癌	3	2	1	0		
	副腎	褐色細胞腫：悪性	0	1	3	0		

p-ニトロアニソールのがん原性試験における主な腫瘍発生（ラット 雌）

	投 与 濃 度 (ppm)		0	2000	4000	8000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	49		
良性腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	0	0	0	5*	↑ ↑	↑ ↑
	下垂体	腺腫	14	15	15	7		
	甲状腺	C-細胞腺腫	5	3	8	6		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	8	14	3	1*		↓ ↓
	乳腺	線維腺腫	4	5	4	1		
悪性腫瘍	脾臓	単核球性白血病	8	7	1*	1*	↑ ↑	↓ ↓
	子宮	腺癌	1	4	8*	8*		

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

* : $p \leq 0.05$ で有意

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加

↓ : $p \leq 0.05$ で有意減少

** : $p \leq 0.01$ で有意

↑ ↑ : $p \leq 0.01$ で有意増加

↓ ↓ : $p \leq 0.01$ で有意減少

(Fisher 検定)

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

(Cochran-Armitage 検定)

I 試験材料

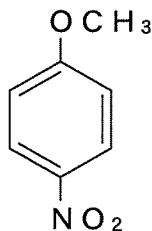
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : *p*-ニトロアニソール (*p*-Nitroanisole)
 IUPAC 名 : 1-メトキシ-4-ニトロベンゼン (1-Methoxy-4-nitrobenzene)
 CAS.No. : 100-17-4

I-1-2 構造式、分子式、分子量 (文献 1)

構造式 :



分子式 : $C_7H_7NO_3$

分子量 : 153.14

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1、2)

外 観 : 結晶
 沸 点 : 274℃
 融 点 : 54℃
 溶 解 性 : 水に不溶、エタノール、エーテルに可溶
 保存条件 : 室温で暗所に保存

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : KSJ0005
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 純 度 : 99.6% (和光純薬工業(株)検査成績書データ)

I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性は、使用した *p*-ニトロアニソールについて、マススペクトルを質量分析計(Hewlett Packard 5989B)により測定し、また赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計(株島津製作所 FTIR-8200PC)により測定した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値(文献 3)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も文献値(文献 4)と同じ波数にピークを示し、被験物質は *p*-ニトロアニソールであることを確認した。

また、試験に使用した *p*-ニトロアニソール中には、不純物として *m*-クロロニトロベンゼンが確認された。*p*-ニトロアニソール中の不純物含有量は 0.28%であった。

それらの結果については、APPENDIX P 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性の確認は、使用した *p*-ニトロアニソールについて、使用開始前及び使用終了後に、ガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)を用いてクロマトグラムを測定し、使用開始前と使用終了後のデータを比較することにより行った。

その結果、使用開始前と使用終了後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 P 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：神奈川県厚木市下古沢 795 番地)の F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。

雌雄各 248 匹を 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い動物から、体重の中央値に近い雌雄各 200 匹(投与開始時体重範囲、雄：111~131g、雌：89~104g)を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)を選択した理由は、遺伝的に安定していること、腫瘍の自然発生率が低いこと、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることによる。

Ⅱ 試験方法

Ⅱ-1 投与

Ⅱ-1-1 投与経路

経口投与

Ⅱ-1-2 被験物質の投与方法

被験物質を粉末飼料に添加し、設定濃度に調製した被験物質混合飼料を粉末飼料用給餌器に充填し、動物に自由摂取させた。

Ⅱ-1-3 投与期間

投与期間は104週間とし、定期解剖日の前日まで連続投与した(1999年11月11日～2001年11月8～14日)。なお、被験物質混合飼料の交換は7日毎に実施した。

Ⅱ-1-4 投与濃度

雌雄とも最高投与濃度を8000 ppmに設定し、以下、4000 ppm及び2000 ppm(公比2)とした。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

Ⅱ-1-5 投与の方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は常温で固体であり、かつ、水に難溶であるため混餌による経口投与とした。

投与期間は、OECDがん原性試験ガイドライン(文献5)に従い、2年間(104週間)とした。

各群の投与濃度は13週間試験(文献6)の結果をもとに設定した。

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10匹とし、合計120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13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1250、2500、5000及び10000 ppm(公比2)に8000 ppmを加えた5段階を設定した。観察、検査として、一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

雄の10000 ppm群では、顕著な体重増加の抑制が認められ、摂餌量も特に投与開始初期

に低い値を示し、がん原性試験の長期間の投与には、最大耐量の体重減少率である 10%を大きく超過すると考えられた。8000 ppm 群では、体重増加の抑制及び摂餌量の投与開始初期における低値は認められたものの、投与終了時における摂餌量に对照群との差は認められず、体重においても对照群の 88%であり、体重を指標としてがん原性試験の最高投与濃度を決定すると 8000 ppm が適当と思われた。したがって、雄のがん原性試験の投与濃度は最高投与濃度を 8000 ppm とし、以下、4000、2000 ppm の 3 段階（公比 2）を設定した。

雌では、体重増加の抑制はすべての投与群で認められた。特に、5000 ppm 以上の群で顕著であり、投与終了時における体重値は对照群と比較して 82～84%であった。また、各種検査で認められたほとんどの所見については 5000 ppm 以上の投与群で大きな差はなかった。雄と同様に体重を指標としてがん原性試験の最高投与濃度を決めると、2500 ppm 以下となるが、2500 ppm 群で認められた各種検査の所見は軽度の貧血が認められるのみである。したがって、雌のがん原性試験の投与濃度は、がん原性試験結果の性差を比較することも考慮して雄と同じく最高投与濃度を 8000 ppm とし、以下 4000、2000 ppm の 3 段階（公比 2）を設定した。

II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

あらかじめ、粉碎機（IKA LABOTECHNIC 製 IKA 20M）で粉碎した被験物質と粉末飼料（オリエンタル酵母工業（株）製 CRF-1）を、粉末飼料混合機（関東混合機工業（株）製、スパイラルミキサーSS-251）を用いて混合し、20000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この混合飼料をさら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。なお、被験物質混合飼料の調製は試験期間中 5 週間を越えない間隔で行い、調製した被験物質混合飼料は、各濃度毎に 1 週間分ずつ小分けにして使用時まで冷蔵で保管した。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-1-7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性

被験物質混合飼料中における被験物質の濃度は、初回調製時及び 3 ヶ月毎に、各投与濃度に調製された混合容器内の被験物質混合飼料を 3 点サンプリングし、クロマトグラムを高速液体クロマトグラフ（Hewlett Packard 1090）を用いて測定し、確認した。なお、初回調製時のサンプリングは各濃度につき 7 点とし、均一性の確認をおこなった。

その結果、各群の平均調製濃度は設定濃度に対し、95.5～107%の範囲にあった。また、均一性に関しては、各濃度群内の濃度のばらつきも少なく良好であった。

その結果を濃度については APPENDIX P 3、均一性については APPENDIX P 5 に示した。

Ⅱ－１－８ 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性

被験物質混合飼料中の被験物質について、室温で 8 日間または冷蔵（7℃）で 5 週間の安定性を確認した。すなわち、試験開始に先立って実施した 13 週間試験（文献 6）において被験物質混合飼料（40000 ppm 及び 300 ppm）を調製し、室温（動物飼育室）で 8 日間、7℃で 5 週間（冷蔵室）それぞれ保管し、被験物質混合飼料調製時の被験物質濃度と各保管期間後の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ（Hewlett Packard 1090）による分析を実施し、それぞれの測定結果を比較することにより確認した。

その結果、調製時を 100%とした場合、調製後 8 日目の室温（動物飼育室）では 40000 ppm：92.3%、300 ppm：81.8%、5 週間の冷蔵保管では 40000 ppm：97.3%、300 ppm：96.8%であり、室温（動物飼育室）及び冷蔵保管の被験物質混合飼料中の被験物質はほぼ安定であった。

その結果を APPENDIX P 4 に示した。

Ⅱ－１－９ 被験物質の摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より被験物質の体重 kg 当たりの一日摂取量（g/kg body weight per 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 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、雌雄各群 50 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群 名 称	使用動物数 (動物番号)	群 名 称	使用動物数 (動物番号)
対 照 群	50 匹 (1001~1050)	対 照 群	50 匹 (2001~2050)
2000 ppm	50 匹 (1101~1150)	2000 ppm	50 匹 (2101~2150)
4000 ppm	50 匹 (1201~1250)	4000 ppm	50 匹 (2201~2250)
8000 ppm	50 匹 (1301~1350)	8000 ppm	50 匹 (2301~2350)

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、発育順調で、異常を認めない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(層別体重平均法：適正層別方式)により実施した(文献 7)。

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

なお、動物は検疫期間を含む全飼育期間、バリア区域 (AC-2 空調エリア) 内の独立した室 (雄：203 室、雌：205 室) にそれぞれ収容し、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、飼育期間を通して、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (実測値 平均 \pm S.D. 203 室： $22.1 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、205 室： $22.9 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 15\%$ (実測値 平均 \pm S.D. 203 室： $55 \pm 3\%$ 、205 室： $56 \pm 3\%$)、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/時の環境下で飼育した。動物の健康状態に影響を与えるような大きな環境変化は認められなかった。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連型網ケージ：170(W)×294(D)×176 (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) 千葉工場 (千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1

(30KGy- γ 線照射滅菌飼料) 固型または粉末飼料を使用した。検疫期間については CRF-1 固型飼料を固型飼料給餌器により自由摂取させた。馴化期間については CRF-1 粉末飼料を粉末飼料給餌器により自由摂取させた。投与期間は、各投与群には所定の濃度に CRF-1 粉末飼料を用いて調製した被験物質混合飼料を、対照群には CRF-1 粉末飼料のみを粉末飼料給餌器より自由摂取させた。ただし、定期解剖日前日の夕方からは絶食(18 時間以上)させた。

飲水は、全飼育期間を通して市水(秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置で自由摂取させた。

なお、試験に使用した飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)から分析データを使用ロット毎に入手し、保存した。飼料中の夾雑物については(財)日本食品分析センター(東京都渋谷区元代々木町 52 番 1 号)の分析データを使用ロット毎に入手し、また、飲水については(財)食品薬品安全センター秦野研究所(神奈川県秦野市落合 729-5)に 3 ヶ月毎に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、その記録を保存した。

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

全動物について、毎日 1 回生死及び瀕死の確認を行い、一般状態の詳細な観察は毎週 1 回実施した。

II-3-2 体重測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回(但し、104 週にも測定)、体重を測定した。なお、動物の死亡発見時と切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回(但し、104 週にも測定)、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除した値を 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採血可能な全動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血し、血液学的検査を行った。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、血小板数、白血球数、白血球分類

Ⅱ-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した採血可能な全動物について、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、遠心分離して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：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

Ⅱ-3-6 尿検査

投与最終週まで生存した動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティ スティックス、バイエル社製）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

Ⅱ-3-7 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した全動物について、以下に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、湿重量の体重比（臓器重量体重比）、すなわち、定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(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、以下に示した臓器を、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。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、リンパ節、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨、その他肉眼的に変化のみられた器官・組織

Ⅱ-4 数値処理と統計処理

Ⅱ-4-1 数値の取り扱いと表示

数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

体重についてはgを単位とし、整数値の1の位まで計測し、表示した。

摂餌量については、gを単位とし、給餌量、残餌量を小数点以下第1位まで計測し、給餌量から残餌量を減じて摂餌量とした。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kg当りの1日摂取量は、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 per 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 Q 2に示した精度により表示した。

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、欠測となったデータを除外して母数とした。

尿検査は、最終週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

剖検データは、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。病理組織学的検査データは、臓器別に、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

II-4-3 統計処理

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、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。なお、母数が死亡等により 2 以下になった場合は検定の対象から除外した。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲等を基準として 1～4 にグレード分けし、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との χ^2 検定を行った。

なお、予備検定は 5% の有意水準で両側検定を行った。最終検定では 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% 及び 1% の有意水準の表示を行った。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定（文献 8）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また、Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス（注）を用いて、死亡率法（コンテックス 3、4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0、1、2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法＋有病率法（コンテックス 0～4 の総計で検定）を行った。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

- 0：定期解剖例にみつかった腫瘍
- 1：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍
- 2：多分 1 だと思うが、確かでない腫瘍
- 3：多分 4 だと思うが、確かでない腫瘍
- 4：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関わっていた腫瘍

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE 1、2 及び FIGURE 1、2 に示した。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、雄では、対照群：37 匹(74%)、2000 ppm 群：39 匹(78%)、4000 ppm 群：32 匹(64%)、8000 ppm 群：2 匹(4%)、雌では、対照群：45 匹(90%)、2000 ppm 群：38 匹(76%)、4000 ppm 群：35 匹(70%)、8000 ppm 群：31 匹(63%)であった。

なお、雌の 8000 ppm 群の 1 匹は、投与 12 週に自動給水装置の事故により死亡したため試験に使用することができなくなり、試験対象動物より除外した。従って、この群の有効動物数は 49 匹となった。

雌雄ともに、8000 ppm 群に *p*-ニトロアニソール投与による生存率の低下が認められ、特に、雄に顕著であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1、2 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を TABLE 5、6 に示した。

雌雄ともに投与群の全ての動物に黄色尿と被毛の着色が認められた。雄の 4000 ppm 群で外部腫瘍の発生が対照群と比較して多くみられたが、病理組織学検査の結果特定の腫瘍との関連は認められなかった。内部腫瘍の発生数は、対照群と比べて、雌雄ともに、ほぼ同じであった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE 1、2、FIGURE 3、4 及び APPENDIX B 1、2 に示した。

雄の 8000 ppm 群では、投与前半は対照群と比較して 10%前後の体重増加の抑制がみられ、投与後半は死亡動物の増加に伴って、対照群と比較して 20~40%低値であった。4000 ppm 群では投与 1 週目と投与後半に対照群と比較して 10%前後の低値を示したが、投与期間中盤においては対照群と比較してやや高値を示した。2000 ppm 群では体重の低値は投与期間を通してみられず、投与期間中盤において対照群と比較してやや高値を示した。

雌では投与期間を通して全投与群で体重増加の抑制が認められ、その程度は 2000 ppm 群では 10%前後、4000 ppm 群で 10~20%、8000 ppm 群で対照群と比較して約 10~30%であった。

なお、最終計測時（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、雄では 2000 ppm 群：99%、4000 ppm 群：86%、8000 ppm 群：60%であり、雌では 2000 ppm 群：87%、4000 ppm 群：81%、8000 ppm 群：69%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 3、4 と FIGURE 5、6 及び APPENDIX C 1、2 に示した。

雄の 8000 ppm 群では、投与初期と後期には対照群と比較して 5～25%の摂餌量の低値がみられた。4000 ppm 群では投与 1 週目のみに対照群と比較して 8%の低値を示したが、投与期間中盤においては対照群と比較してやや高値を示した。2000 ppm 群の摂餌量は投与期間を通して、対照群と比較してほぼ同様であった。

雌の 8000 ppm 群と 4000 ppm 群では投与期間を通して対照群と比較して 10～20%程度の摂餌量の低値が認められた。2000 ppm 群でもほぼ投与期間を通して対照群と比較して 10%前後の摂餌量の低値が認められた。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量は、雄では対照群：15.1g(100%)、2000 ppm 群：15.3g(101%)、4000 ppm 群：15.5g(103%)、8000 ppm 群：14.5g(96%)であり、雌では、対照群：11.2g(100%)、2000 ppm 群：10.3g(92%)、4000 ppm 群：9.4g(84%)、8000 ppm 群：9.4g(84%)であった。

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。

全投与期間における 1 日当たりの被験物質摂取量(g/kg body weight per day) は、雄で 2000 ppm 群：0.073～0.160（平均：0.092）、4000 ppm 群：0.154～0.310（平均：0.191）、8000 ppm 群：0.332～0.589（平均：0.413）、雌では 2000 ppm 群：0.105～0.168（平均：0.119）、4000 ppm 群：0.207～0.325（平均：0.229）、8000 ppm 群：0.422～0.700(平均：0.475)の範囲にあった。

全投与期間にわたって平均した各投与群間の被験物質摂取量の比は、1.9～2.2 倍であり、設定用量比（公比 2）とほぼ一致した値を示した。

Ⅲ－6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 7、8 と APPENDIX E 1、2 に示した。なお、雄の 8000 ppm 群は定期解剖まで生存した動物は 2 匹のみであったため、検定の対象から除外した。

雄では、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び MCHC が 2000 ppm 群と 4000 ppm 群の両群で減少し、赤血球数と MCH 並びに好酸球比とリンパ球比が 4000 ppm 群で減少した。血小板数並びに分葉核好中球比及びその他の異常白血球の比率が 4000 ppm 群で増加した。なお、8000 ppm 群の 2 匹について得られた各検査パラメーターの値は 4000 ppm 群とほぼ同じ傾向を示した。

雌では、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群の両群で減少し、MCV、血小板数、白血球数並びに分葉核好中球比が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群で増加した。MCHC は全ての投与群で減少した。MCH、白血球分類中の好酸球比とリンパ球比が 8000 ppm 群で減少した。その他、4000 ppm 群で杆状核好中球比と単球比に変化がみられたが、ごく僅かな変化であった。

Ⅲ－7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 9、10 と APPENDIX F 1、2 に示した。なお、雄の 8000 ppm 群は定期解剖まで生存した動物は 2 匹のみであったため、検定の対象から除外した。

雄では、尿素窒素が 2000 ppm 群と 4000 ppm 群で、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、クレアチニン、カリウム、カルシウム及び無機リンが 4000 ppm 群で増加した。 γ -GTP が 2000 ppm 群と 4000 ppm 群で上昇した。アルブミン及び A/G 比が 2000 ppm 群と 4000 ppm 群で、グルコースとクロールは 4000 ppm 群で減少した。その他、2000 ppm で GPT に変化がみられたが、大きな変化ではなかった。なお、8000 ppm 群の 2 匹について得られた各検査パラメーターの値はトリグリセライドを除いて 4000 ppm 群とほぼ同じ傾向を示した。

雌では、尿素窒素が全ての投与群で増加した。総コレステロール、リン脂質、カルシウム及び無機リンが 4000 ppm 群と 8000 ppm 群で、クレアチニン及びカリウムが 8000 ppm 群で増加した。 γ -GTP が 8000 ppm 群で上昇した。A/G 比及びクロールの減少と LDH の低下が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群で、アルブミンとナトリウムの減少が 8000 ppm 群でみられた。その他、4000 ppm 群で総蛋白、GOT、GPT、ALP に変化がみられたが、投与量に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－8 尿検査

尿検査の結果を TABLE 11、12 と APPENDIX G 1、2 に示した。

雄では、8000 ppm 群で pH とグルコースに統計学的に変化がみられたが、検査動物数が少なくかつ大きな変化ではなかった。

雌では、蛋白の陽性度の増加が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群で、潜血の陽性度及び陽性例の増加が 8000 ppm 群で認められた。なお、潜血については統計学的には差は認められなかったが、2000 ppm と 4000 ppm 群で陽性度の増加がみられた。

Ⅲ－9 病理学的検査

Ⅲ－9－1 剖検

剖検所見を APPENDIX H 1～6 に示した。

雄では、肝臓の結節（対照群:1 匹、2000 ppm 群:2 匹、4000 ppm 群:14 匹、8000 ppm 群:14 匹）と白色斑（対照群:1 匹、2000 ppm 群:2 匹、4000 ppm 群:9 匹、8000 ppm 群:24 匹）、腎臓の顆粒状変化（対照群:6 匹、2000 ppm 群:18 匹、4000 ppm 群:43 匹、8000 ppm 群:48 匹）、精巣の結節（対照群:33 匹、2000 ppm 群:43 匹、4000 ppm 群:47 匹、8000 ppm 群:46 匹）が投与濃度に対応して増加した。

雌では、肺の白色斑（対照群:0 匹、8000 ppm 群:13 匹）と肝臓の結節（対照群:1 匹、8000 ppm 群:6 匹）が 8000 ppm 群で対照群と比較して増加した。また、肝臓の白色斑（対照群:1 匹、2000 ppm 群:5 匹、4000 ppm 群:5 匹、8000 ppm 群:7 匹）と腎臓の顆粒状変化（対照群:1 匹、2000 ppm 群:0 匹、4000 ppm 群:6 匹、8000 ppm 群:32 匹）が投与濃度に対応して増加した。

Ⅲ－9－2 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 TABLE 13、14 と APPENDIX I 1、2、APPENDIX J 1、2 に示した。

雄では、肝臓、腎臓及び肺の実重量と体重比の高値が 2000 ppm 群と 4000 ppm 群で認められた。また、脾臓及び脳の実重量と体重比の高値が 4000 ppm 群で認められ、副腎、精巣及び心臓の体重比の高値が 4000 ppm 群で認められた。なお、8000 ppm 群は定期解剖まで生存した動物は 2 匹のみであったため、検定の対象から除外した。

雌では、肝臓の実重量と体重比の高値は 4000 ppm 群と 8000 ppm 群で認められた。また、腎臓の体重比の高値が全ての投与群で認められ、実重量の高値は 4000 ppm 群と 8000 ppm

群で認められた。脾臓の実重量と体重比の高値が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群で認められたが、4000 ppm 群と 8000 ppm 群の実重量の値はばらつきが多く、かつ大きな変化ではなかった。脳の実重量と体重比の高値が全ての投与群で認められた。その他、副腎、卵巣、心臓及び肺に実重量の低値または体重比の高値がみられたが、これらは定期解剖時の体重の低値に起因するものと思われた。

Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

主な腫瘍性病変とそれらの発生数は TABLE 15、16 に示した。また、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を APPENDIX L 1、2 に、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX M 1、2 に、統計解析（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定）の結果を APPENDIX N 1、2 に、転移性病変を APPENDIX O 1～6 に示した。非腫瘍性病変の結果を TABLE 17、18 と APPENDIX K 1～6 に示した。さらに、観察された所見の代表例を PHOTOGRAPH 1～5 に示した。

—腫瘍性病変—

日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ（試験毎の発生率（最小%～最大%）と平均発生率（%）、発生例数/総数）を雌雄別にそれぞれ TABLE 20、21 に示した。本試験でみられた腫瘍について、それぞれの投与濃度における腫瘍発生率をヒストリカルコントロールデータの試験毎の最大発生率と比較した。

<肝臓>

雄の肝細胞腺腫の発生（対照群:0%、2000 ppm 群:2%、4000 ppm 群:26%、8000 ppm 群:22%）は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 4000 ppm 群と 8000 ppm 群に増加がみられた。肝細胞腺腫の 4000 ppm 群と 8000 ppm 群における発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を上回った。

雌の肝細胞腺腫の発生（対照群:0%、2000 ppm 群:0%、4000 ppm 群:0%、8000 ppm 群:10%）は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 8000 ppm 群に増加がみられた。肝細胞腺腫の 8000 ppm 群における発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を上回った。

<子宮>

子宮腺癌の発生（対照群：1%、2000 ppm 群 8%、4000 ppm 群 16%、8000 ppm 群：16%）は、Peto 検定（有病率法、死亡率法及び有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 4000 ppm 群と 8000 ppm 群に増加がみられた。全投与群の子宮腺癌の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を上回った。また、子宮腺癌の転移巣が肺、リンパ節、胃、肝臓、腎臓、卵巣、腹膜及び後腹膜にみられ、転移がみられた動物は、2000 ppm 群では 4 匹中 4 匹、4000 ppm では 8 匹中 7 匹、8000 ppm では 8 匹中 5 匹であり、対照群にみられた子宮腺癌には転移は認められなかった。子宮腺癌は立方状あるいは円柱状の腫瘍細胞が腺管を形成し、子宮内膜に結節性または瀰漫性に増殖する所見であり、内腔に向かって乳頭状に増生する像や漿膜側に浸潤性に増殖する像もみられた。また、子宮の内膜間質性ポリープの発生が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 8000 ppm 群に減少がみられたが、これは対照群と比較して投与群では多くの動物が試験途中で死亡し、動物の寿命が短縮されたことによるものと考えられた。

<精巣>

精巣の間細胞腫の発生（対照群：68%、2000 ppm 群：90%、4000 ppm 群：96%、8000 ppm 群：96%）は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で全ての投与群に増加がみられた。全投与群の間細胞腫の発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内であった。

<脾臓>

単核球性白血病の雄の発生（対照群：16%、2000 ppm 群：10%、4000 ppm 群：6%、8000 ppm 群：0%）と雌の発生（対照群：16%、2000 ppm 群：14%、4000 ppm 群：2%、8000 ppm 群：2%）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。これは雌雄とも 8000 ppm 群の多くの動物が試験途中で死亡し、動物の寿命が短縮されたことによるものと考えられた。

－非腫瘍性病変－

<肺>

尿毒症性肺炎の発生増加が雌雄の 8000 ppm 群と雄の 4000 ppm 群でみられた。尿毒症性肺炎は、肺の全域に出血または水腫が認められ、肺胞腔には線維素を多く含む滲出液が目立ち、時に肺胞壁の肥厚すなわち間質性肺炎の状態をみることもある所見である。なお、雄の全ての投与群では、細気管支肺胞上皮過形成の発生が低下した。

<脾臓>

雄では、ヘモジデリン沈着の程度の増強が 2000 ppm 群と 4000 ppm 群でみられた。

雌では、ヘモジデリン沈着の程度の増強が 4000 ppm 群にみられた。

<心臓>

雄では、鈣質沈着の発生増加が 8000 ppm 群でみられた。

雌では、心筋線維症の発生増加が 8000 ppm 群でみられた。

<動脈/大動脈>

雄では、鉍質沈着の発生が 8000 ppm 群で増加した。

<舌>

雌雄の 8000 ppm 群では浮腫の発生増加がみられ、雄の 4000 ppm 群と 8000 ppm 群では鉍質沈着の発生が増加した。

<胃>

雌雄の 8000 ppm 群と雄の 4000 ppm 群では鉍質沈着の発生増加がみられた。

<肝臓>

雄では、好塩基性小増殖巣と海綿状変性の発生増加が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群でみられた。なお、雌雄の 8000 ppm 群で肉芽形成の発生が減少した。

<腎臓>

雄では、慢性腎症の程度の増強が、対照群と比較して全ての投与群でみられた。4000 ppm 群と 8000 ppm 群では乳頭部の鉍質沈着と腎盂の尿路上皮過形成の発生が増加した。8000 ppm 群では嚢胞の発生が増加した。

雌では、4000 ppm 群と 8000 ppm 群で慢性腎症の発生匹数の増加と程度の増強がみられた。乳頭部の鉍質沈着の発生増加は全ての投与群でみられた。腎盂の尿路上皮過形成の発生増加が 8000 ppm 群でみられた。皮髄境界部の鉍質沈着は 8000 ppm 群では発生が減少した。

<上皮小体>

雄では、過形成の発生増加が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群でみられた。

<副腎>

雄では、出血と皮質の壊死の発生増加が 8000 ppm 群でみられた。

雌では、出血の発生増加が 8000 ppm 群でみられ、4000 ppm 群と 8000 ppm 群で紫斑症様変化の発生が減少した。

<筋肉>

雄では、鉍質沈着の発生増加が 8000 ppm 群でみられた。

<その他>

雄 8000 ppm 群では嗅上皮のエオジン好性変化、脾臓の萎縮及び前立腺の過形成の発生が減少した。雌 8000 ppm 群では鼻腔の鉍質沈着と嗅上皮のエオジン好性変化の発生に程度の減弱がみられた。

Ⅲ－9－4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 19 に示した。

雄では、8000 ppm 群の死亡／瀕死動物 48 匹のうち、45 匹の死因が慢性腎症によるものであった。4000 ppm 群でも死亡／瀕死動物 18 匹のうち、4 匹の死因が慢性腎症であった。

雌では、8000 ppm 群の死亡／瀕死動物 18 匹のうち、12 匹の死因が慢性腎症であり、対照群と比較して多かった。子宮腺癌による死亡は、対照群が 1 匹であったに対して、2000 ppm 群では 5 匹、4000 ppm 群では 7 匹、8000 ppm 群では 3 匹であり、投与群には子宮腺癌による死亡が多くみられた。

IV 考察及びまとめ

p-ニトロアニソールのラットを用いた2年間の混餌経口投与（投与濃度：2000、4000、8000 ppm）によって腫瘍性病変、腫瘍関連病変と非腫瘍性病変及びこれらの病変を反映する諸々の指標の変化が認められた。雌雄の8000 ppm 群では慢性腎症により多くの動物が死亡し、特に、雄の8000 ppm 群の生存率は対照群に比べて著しく低下した。慢性腎症以外では子宮の腫瘍が雌の生存率に影響を与えた。

投与終了時の体重は、対照群と比べて、2000 ppm 群で雄：99%、雌：87%、4000 ppm 群で雄：86%、雌：81%、8000 ppm 群で雄：60%、雌：69%であり、雄では4000 ppm 群と8000 ppm 群、雌では全ての投与群で低値を示した。摂餌量は、雄の8000 ppm 群と雌の投与群全てで、ほぼ投与期間を通して低値を示した。

OECD 発がん性試験ガイドライン（文献 5）によれば、がん原性試験における最高投与濃度は、腫瘍以外の影響により正常な寿命の長さを変えないで、最小の毒性兆候を誘発させる濃度であり、血清酵素濃度を変化させるかまたは僅少な体重抑制（対照群と比較して10%以下の抑制）を引き起こす濃度であると定義される。IARC（文献 9）は、最高投与濃度を新生物形成の結果以外で動物の寿命の長さを短縮させず、また、対照群と比較して10%以下の体重抑制を引き起こす毒性兆候を惹起させる濃度と定義したが、同時に、体重減少率を10%以下とする勧告は経験的なものであり、結果として超過した場合でも試験を無効にするものではないとも述べている。米国国立がん研究所（NCI）小動物発がん性試験ガイドライン（文献 10）では、小動物を用いるがん原性試験の最高投与濃度は、対照群と比較して10%以下の体重減少を引き起こす濃度で、かつ新生物反応に関係する反応以外に、毒性的兆候、病理学的傷害による死亡率の上昇を引き起こさない最高濃度、即ち、最大耐量(Maximum Tolerated Dose (MTD))を最高投与濃度として用いると定義した。本がん原性試験の投与濃度は、II-1-5 項に示したように、13 週間試験（文献 6）の結果に基づいて8000 ppm を最高濃度として設定し、この濃度が MTD であると推定した。推定根拠として、8000 ppm 13 週間投与のラットでは、対照群と比較して、体重減少は、雄で 88%、雌で 84%であり、MTD の決定における体重減少率 10%の条件をほぼ満たしており、かつ、2 年間生存率の低下をもたらすと推定される重篤な病理変化は認められなかった。しかしながら、2 年間のがん原性試験の結果、8000 ppm 投与群において、雌雄ともに、非腫瘍性病変（慢性腎症）による生存率の大幅な低下がみられ、104 週における体重も対照群の 60%（雄）と 69%（雌）に減少し、MTD の要件である体重減少率 10%を大幅に超えた。従って、本がん原性試験で設定した最高投与濃度 8000 ppm は MTD を超過していると判断した。一方、4000 ppm 群における投与終了時の体重減少率は雌雄ともに 10%（雄 14%、雌 19%）を超過した。しかし、雄の体重減少率が 10%を超過した時点は投与終了日に近い 102 週以降であり、生存率は対照群とほぼ同じ推移を示した。雌の 4000 ppm 群では、生存率の低下は子宮腺癌による途中死亡が 7 匹にみられたためであり、腫瘍の発生による生存率の低下であるため MTD を超過した

ことにはならない。また、投与終了時の体重減少率は19%であるが、投与濃度の選択の根拠となる13週目の体重減少率は9%であり、MTDの定義にあてはまると考える。従って、4000 ppm 投与濃度は雌雄ともにMTDであると判断した。8000 ppm 群の腫瘍性病変については、参考データとして考察に用いた。

使用した被験物質には0.28%の *m*-クロロニトロベンゼンが不純物として認められた。*m*-クロロニトロベンゼンの動物を用いた癌原性試験は報告されていない(文献11)。また、変異原性については陰性の報告しかなく(文献11)、かつ、動物の摂取濃度は最高投与濃度の8000 ppm で22 ppm 程度であり、試験成績に影響を及ぼしたとは考えられなかった。

IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変

—雄—

<肝臓腫瘍>

雄の肝細胞腺腫は、4000 ppm で増加した。また、4000 ppm における肝細胞腺腫の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を上回った。以上の結果から、肝腫瘍は、*p*-ニトロアニソールの投与によるものと考えられる。また、本試験では、肝臓腫瘍の前腫瘍性病変(文献12)であるとされる好塩基性小増殖巣と海綿状変性が、4000 ppm 群で増加した。なお、8000 ppm 群においても前腫瘍性病変も含めて同様の傾向を示した。

肝細胞腺腫は、良性腫瘍に分類される腫瘍(文献13)であり、この結果は *p*-ニトロアニソールのラット雄に対するがん原性を示す証拠と考えられた。

<精巣>

精巣の間細胞腫は、2000 ppm 群と4000 ppm 群で増加がみられた。間細胞腫の発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内であり、また、間細胞腫は本系統の雄ラットに高率に発生する腫瘍(文献14)であることから、間細胞腫の発生増加は *p*-ニトロアニソールの投与によるものとは断定できなかった。

—雌—

<子宮腫瘍>

子宮腺癌の発生数は、4000 ppm 群で増加した。また、2000 ppm 群と4000 ppm 群の腺癌の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を上回った。以上の結果から、子宮の腺癌の発生は、*p*-ニトロアニソールの投与によるものと考えられた。また、投与群で発生した子宮腺癌は他臓器への転移がみられた。

子宮腺癌は悪性腫瘍に分類される腫瘍(文献15)であり、投与群に発生した子宮腺癌は他臓器への転移もみられることから、この結果は *p*-ニトロアニソールのラット雌に対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。なお、8000 ppm 群で発生した子宮の腺癌においても発生率、転移等は4000 ppm 群と同様の傾向を示した。

＜肝臓腫瘍＞

雌の肝細胞腺腫は、8000 ppm 群でのみ増加した。また、8000 ppm 群における肝細胞腺腫の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を上回っていた。しかし、MTD と考えられる 4000 ppm 群にはこの肝細胞腺腫の発生増加が認められず、また、雄と異なり、前腫瘍性病変である好塩基性小増殖巣や海綿状変性の増加はみられなかったことより、肝腫瘍の発生増加は、*p*-ニトロアニソールのがん原性を示す証拠とは断定できなかった。

以上より、雄ラットに良性腫瘍である肝細胞腺腫の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールの雄ラットに対するがん原性を示す証拠と考えられた。

雌ラットには悪性腫瘍である子宮腺癌の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールの雌ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。また、雌ラットに肝細胞腺腫の発生増加も認められたが、発生増加がみられた 8000 ppm 群は MTD を越えているために、がん原性を示す証拠とは断定できなかった。

IV-2 その他の影響

雄では慢性腎症の程度の増強がすべての投与群で用量依存的にみられ、雌では 4000 ppm 群と 8000 ppm 群で程度の増強と発生例数の増加がみられ、これらの群では慢性腎症の程度が重度な動物が多かった。雌雄の腎障害を示す血液生化学的パラメーターは、アルブミン濃度及び A/G 比の減少、総コレステロールの増加、尿素窒素の増加やクレアチニンやカルシウムを始めとする電解質濃度に変化がみられた。これらの総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン等の血液生化学的検査のパラメーターは慢性腎症が高度に進行して、はじめて高値を示す（文献 16）とされ、病理組織学検査の結果と対応していた。また、尿検査において雌では、蛋白の陽性度の増加と潜血の陽性度及び陽性例の増加が認められた。尿毒性肺炎、舌の浮腫、上皮小体の過形成、カルシウムを主体と考えられる鉱質沈着の増加（心臓、動脈、舌、胃、腎臓、筋肉）等の病理組織学的所見は、慢性腎症の程度の増強に伴う変化（文献 17）と思われた。慢性腎症はラット特有の加齢性病変で、特に雄ラットに高率で発生すると報告されている（文献 16、18）。

血液系への影響として、雄ではヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の減少が 2000 ppm 群と 4000 ppm、赤血球数の減少が 4000 ppm 群で認められた。雌でも、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が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群の両群で認められ、貧血を示した。

その他、脾臓のヘモジデリン沈着は程度の増強がみられ、副腎の出血と皮質の壊死が増加した。

IV-3 他文献との比較等

- ① 変異原性： *p*-ニトロアニソールの変異原性は、ネズミチフス菌 (TA100) の代謝活性化による場合とよらない場合にいずれでも復帰変異コロニー数の上昇がみられ、陽性である (文献 19)。またチャイニーズハムスター株細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験では、*p*-ニトロアニソールは、代謝活性化による場合に、染色体構造異常が誘発された (文献 20)。
- ② 代謝：*p*-ニトロアニソールは *p*450 により、*p*-ニトロフェノールとホルムアルデヒドに代謝される (文献 21)。また、*p*-ニトロフェノールは *p*-アミノフェノール及び *p*-ニトロカテコールに代謝され、*p*-ニトロフェノール、*p*-アミノフェノール及び *p*-ニトロカテコールはそれぞれグルクロン酸抱合または硫酸抱合を受けて体外に排出される (文献 22)。
- ③ 代謝物のがん原性：*p*-ニトロフェノールのがん原性試験は塗布試験において実施されているが、陰性 (文献 23) であった。また、ホルムアルデヒドのがん原性試験では吸入試験において鼻腔扁平上皮癌の発生が報告された (文献 24) が、経口 (飲水) 試験ではがん原性は報告されていない (文献 25)。
- ④ *o*-ニトロアニソール発がん性との比較：ニトロ基の位置が異なる *o*-ニトロアニソールのラットを用いた混餌投与によるがん原性試験 (投与期間:2 年、投与濃度:0、222、666 及び 2000 ppm) および投与開始から 27 週間のみ投与したがん原性試験 (27 週以降 104 週までは対照群と同じ飼料、投与濃度:6000 及び 18000 ppm) が報告された (文献 26、27)。2 年連続投与試験では単核球性白血病の発生増加が認められただけであったが、18000 ppm を 27 週間投与した試験では、雄または雌に膀胱 (移行上皮乳頭腫と癌、扁平上皮乳頭腫と癌及び肉腫)、大腸 (腺腫様ポリープ及び大腸癌)、腎臓 (移行上皮乳頭腫及び癌) に腫瘍性病変の発生増加が認められた。*p*-ニトロアニソール投与濃度に対応して、雄に肝細胞腺腫と雌に子宮腺癌の発生率の増加がみられた今回のがん原性試験の結果と比較すると、ニトロ基の位置の相違と投与濃度の相違がこのような相違の原因となったと解釈される。
- ⑤ *o*-ニトロアニソールラット慢性腎症の増強：*o*-ニトロアニソールを 666 および 2000 ppm の濃度で混餌投与した雌雄ラットに慢性腎症の程度の増強がみられ、特に、雄ラットに増強の程度が顕著に出現した (文献 26、27)。今回の試験において、*p*-ニトロアニソール投与ラットでも慢性腎症の増強が認められ、同一の性差傾向がみられた。本試験の予備試験である 13 週間試験 (文献 6) では、雄で好酸体の出現頻度の増強がみられており、本試験の慢性腎症の発生には好酸体の関与も考えられるが、本試験では予備試験である 13 週間試験で好酸体の出現頻度の増強がみられていない雌においても発生匹数の増加と程度の増強が認められており、機序については不明である。化学物質の投与によって引き起こされた雄ラットの慢性腎症は、ヒトへの外挿妥当性の問題 (雄ラット

の種特有の反応) から、非発がん性影響に対する無毒性量(NOEL)に使用すべきではないと報告されている (文献 28)。

V 結論

F344/DuCrj(Fisher) ラットを用いて *p*-ニトロアニソールの 2 年間(104 週間)にわたる混餌投与によるがん原性試験を行った結果より以下の結論を得た。雄ラットに肝細胞腺腫の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールの雄ラットに対するがん原性を示す証拠と考えられた。雌ラットには子宮腺癌の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールの雌ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。

なお、雄では肝臓に前腫瘍性病変である好塩基性小増殖巣と海綿状変性の増加が 4000 ppm 群と 8000 ppm 群で認められた。また、雌雄とも慢性腎症の増加が認められた。これらの結果は *p*-ニトロアニソールの投与による影響と考えられた。

VI 文献

1. 化学工業日報社. 2003. 14303 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 717-718.
2. 化学大事典. 1989. 東京: 東京化学同人, 1681.
3. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
4. 和光純薬工業(株). 1999. *p*-ニトロアニソール, 赤外吸収スペクトル.
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity studies", Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. 日本バイオアッセイ研究センター. 2000. *p*-ニトロアニソールのラットを用いた経口投与による 13 週間毒性試験 (混餌試験) 報告書. 神奈川: 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.
7. 阿部 正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの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.
8. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S et al. 1980. Guideline for simple, sensitive significance test for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogenesis: A Critical Appraisal. Lyon: IARC, Monographs, Suppl. 2: 311-426.
9. Griesemer RA, Venitt S. 1986. Long-term and Short-term Assay for Carcinogens: A Critical Appraisal. Lyon: IARC. IARC Scientific Publications No. 83: 34 - 35.
10. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U. 1976. Guidelines for Carcinogen Bioassay in Small Rodents. NCI-CG-TR-1. DHHS Publication (NIH) 76 - 801. National Cancer Institute. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 13 - 15.
11. IARC. 1996. 2-Chloronitrobenzene, 3-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC, Monographs, 65: 311 - 426.

12. Bannasch P, Zerban H. 1994. Preneoplastic and neoplastic lesions of the rat liver.
In : Pathology of Neoplasia and Preneoplasia in Rodents (Bannasch P, Gössner W, eds). Stuttgart : Schattauer, 18 - 63.
13. Mohr U, editor-in-chief. 1997. International Classification of Rodent Tumours. Part I : The Rat. 10. Digestive System. IARC Scientific Publications, No. 122. Lyon : International Agency for Research on Cancer, 71 - 72.
14. Boorman GA, Chapin RE. 1990. Testis and Epididymis. In : Pathology of the Fisher Rat (Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA Jr, MacKenzie WF, eds). San Diego : Academic Press, 405 - 418.
15. Mohr U, editor-in-chief. 1997. International Classification of Rodent Tumours. Part I : The Rat. 9. Female Genital System. IARC Scientific Publications, No. 122. Lyon : International Agency for Research on Cancer, 40 - 41.
16. 日本実験動物学会 長期飼育ワーキンググループ (代表 河合清之) . 1980. ラット長期飼育ワーキンググループ報告. Exp Anim 29 : 181 - 1231.
17. 伊東 信行. 1994. 最新毒性病理学. 東京 : 中山書店.
18. Joseph KH, Elizabeth N, Abraham N, Ghanta NR. 2003. Effect of diet and animal care/housing protocols on body weight, survival, tumor incidences, and nephropathy severity of F344 rats in chronic study. Toxicol Pathol 31 : 674 - 681.
19. 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課. 1996. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集. 東京 : 日本化学物質安全・情報センター.
20. 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課. 1997. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集 補遺版. 東京 : 日本化学物質安全・情報センター.
21. 山本 郁夫. 1995. 薬物代謝学辞典 東京 : 廣川書店.

22. Abu-Qare AW, Brownie CF, Abou-Donia MB. 2000. Placental transfer and pharmacokinetics of a single oral dose of [¹⁴C]*p*-nitrophenol in rats. *Arch Toxicol* 74 : 388 - 396
23. NTP. 1993. Toxicology and Carcinogenesis Studies of *p*-Nitrophenol (CAS No. 100-02-7) in Swiss-Webster Mice. (Dermal Studies). Technical Report 417. Research Triangle Park, NC : National Toxicology Program.
24. Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. 1983. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res* 43 : 4382 - 4392.
25. Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VHM, Falke HE. 1989. Two-year drinking-water study of formaldehyde in rats. *Fd Chem Toxic* 27 : 77 - 87.
26. NTP. 1993. Toxicology and Carcinogenesis Studies of *o*-Nitroanisole (CAS No. 91-23-6) in F344 Rats and B6C3F₁ Mice (Feed Studies). Technical report 416. Research Triangle Park, NC : National Toxicology Program.
27. Irwin RD, Chhabra R, Eustis S, Pinter A, Prejean JD. 1996. Tumors of the bladder, kidney, and intestine of F344 rats and liver of B6C3F₁ mice administered *o*-nitroanisole in feed. *Fundam Appl Toxicol* 30, 1 - 12.
28. US. Environmental Protection Agency. Report of the EPA Peer Review Workshop on Alpha2-microGlobuline : Association with Renal Toxicity and Neoplasia in the Male Rat. 1991. US. EPA, Washington DC.