

2-アミノ-4-クロロフェノールのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0580

CAS No. 95-85-2

2008年9月30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

2-アミノ-4-クロロフェノールのマウス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

2-アミノ-4-クロロフェノールをマウスに 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」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「試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（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対策課
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
副所長 長野 嘉介
神奈川県秦野市平沢 2445

2-アミノ-4-クロロフェノールのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0580

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 構造式及び分子量	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	6
II-1-9 被験物質の摂取量	7

II - 2 動物管理	7
II - 2 - 1 各群の使用動物数	7
II - 2 - 2 群分け及び個体識別方法	7
II - 2 - 3 飼育条件	8
(1) 飼育環境	8
(2) 飼料	8
(3) 飲水	8
II - 3 観察・検査項目及び方法	9
II - 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	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	9
II - 3 - 5 血液生化学的検査	9
II - 3 - 6 尿検査	10
II - 3 - 7 病理学的検査	10
(1) 剖検	10
(2) 臓器重量	10
(3) 病理組織学的検査	10
II - 4 数値処理と統計方法	10
II - 4 - 1 数値の取り扱いと表示	10
II - 4 - 2 統計処理	11
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	14
III - 7 血液生化学的検査	15
III - 8 尿検査	15

III-9 病理学的検査	15
III-9-1 剖検	15
III-9-2 臓器重量	16
III-9-3 病理組織学的検査	16
III-9-4 死因	18
IV 考察及びまとめ	19
IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量	19
IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	19
IV-3 その他の影響	19
IV-4 量-反応関係	20
IV-5 投与濃度設定の評価	20
IV-6 他文献との比較等	20
V 結論	21
VI 文献	22
VII 予見することのできなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと	24

要約

2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性を検索する目的で B6D2F1/Crlj (旧 Crj:BDF1) マウス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、2-アミノ-4-クロロフェノ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 512、1280 及び 3200 ppm (重量比 w/w) の 3 段階 (公比 2.5) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、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。

動物の生存率、一般状態、体重、摂餌量に被験物質の投与による影響は雌雄ともに認められなかった。

腫瘍の発生増加は、雄の前胃 (扁平上皮乳頭腫) にみられた。前胃の腫瘍発生は雄 3200 ppm 群で統計学的に有意な増加を示し、また、全ての投与群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。従って、その腫瘍発生は被験物質の投与の影響と考えられた。雌でも前胃の扁平上皮乳頭腫の発生は Peto 検定で増加傾向を示したが、各投与群の腫瘍発生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。従って、雌の扁平上皮乳頭腫の発生は被験物質の投与と判断しなかった。

以上のように、B6D2F1/Crlj マウスを用いた 2-アミノ-4-クロロフェノールの 2 年間 (104 週間) にわたる経口投与によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雄に前胃の扁平上皮乳頭腫の発生増加が認められ、雄マウスに対するがん原性を示す証拠である。雌では腫瘍の明らかな発生増加は認められなかった。

2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性試験における主な腫瘍発生 (マウス 雄)

	投与濃度 (ppm)		0	512	1280	3200	Peto 検定	Cochran-Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	前胃 肝臓	扁平上皮乳頭腫	0	4	3	6 *	↑	↑
		肝細胞腺腫	14	13	13	19		
		血管腫	1	1	1	0		
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌	20	7 **	7 **	8 **		↓
		肝芽腫	1	1	1	1		
	脾臓	血管肉腫	5	3	0 *	1		
		血管肉腫	4	2	0	1		
	肝臓	血管腫+血管肉腫	6	4	1	1		↓
		肝細胞腺腫+肝細胞癌	28	17 *	18 *	23		
		肝細胞腺腫+肝細胞癌+肝芽腫	29	18 *	18 *	24		
	全臓器	血管肉腫	9	4	0 **	2 *		↓

2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性試験における主な腫瘍発生 (マウス 雌)

	投与濃度 (ppm)		0	512	1280	3200	Peto 検定	Cochran-Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	前胃 肺 下垂体 肝臓	扁平上皮乳頭腫	0	1	1	3	↑	
		細気管支 - 肺胞上皮腺腫	2	1	0	1		
		腺腫	2	7	5	6	↑	
		血管腫	2	1	2	4		
悪性腫瘍	肺 子宮 脾臓 唾液腺 肝臓 卵巢 肝臓	細気管支 - 肺胞上皮癌	2	1	2	4	↑	
		組織球性肉腫	12	7	12	13	↑	
		組織球性肉腫	1	0	0	2		
		組織球性肉腫	0	1	0	0		
		組織球性肉腫	0	1	0	2		
		組織球性肉腫	1	0	0	0		
		血管肉腫	4	3	0	0		↓
		血管腫+血管肉腫	5	8	5	4		
	肝臓	組織球性肉腫	14	9	12	17	↑↑	
	全臓器	血管肉腫	5	3	1	0 *		↓

*: p≤0.05 で有意

**: p≤0.01 で有意

(Fisher 検定)

↑: p≤0.05 で有意增加

↑↑: p≤0.01 で有意增加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓: p≤0.05 で有意減少

↓↓: p≤0.01 で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)

I 試験材料

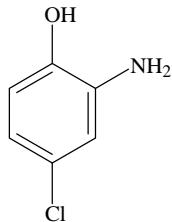
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称： 2-アミノ-4-クロロフェノール (2-Amino-4-chlorophenol)
 CAS No. : 95-85-2

I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量: 143.57

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 灰色または茶色の結晶性粉末
 比 重 : 0.88
 融 点 : 137°C
 溶 解 性 : アルコールに易溶、水に難溶(3g/L 25°C)
 保 管 条 件 : 冷暗所

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : CEQ0194 (2005/4/18~2005/9/20)
 SDM0599 (2005/9/19~2006/7/25)
 LTM0601 (2006/7/24~2007/4/23)
 製 造 元 : 和光純薬工業(株)
 純 度 : 99.1~100.6% (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、ロットごとにマススペクトルを質量分析計（アジレントテクノロジーズ 5989B）を用いて測定し、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）を用いて測定し、それぞれの文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマススペクトルは、文献値（文献 2）と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値（文献 3）と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 2-アミノ-4-クロロフェノールであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

I -3-2 安定性

被験物質の安定性は、ロットごとに使用開始前及び使用終了後にガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（アジレントテクノロジーズ 5890A）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、各ロットとも使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 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）の B6D2F1/Crlj（旧 Crj:BDF1）マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 227 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に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 200 匹（投与開始時体重範囲、雄：22.4～25.6g、雌：17.9～21.2g）を選別し、試験に用いた。

なお、B6D2F1/Crlj マウス（SPF）を選択した理由は、遺伝的に安定していること、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

投与経路は経口投与とした。

II-1-2 被験物質の投与方法

投与は、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。なお、被験物質混合飼料の交換は週に 2 回実施した。

II-1-3 投与期間

投与期間は 104 週間とし、さらに、それぞれの動物の定期解剖日前日まで連続投与した。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、雌雄とも 512、1280 及び 3200 ppm（実重量比 w/w）の 3 段階（公比 2.5）に設定した。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、がん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献 4）及び OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験）（文献 5）に従い、2 年間（104 週間）とした。

各群の投与濃度は 13 週間混餌経口投与試験（試験番号 0550）の結果（文献 6）をもとに設定した。

試験には B6D2F1/Crlj マウス（SPF）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 匹のマウスを用いた。被験物質の投与は、2-アミノ-4-クロロフェノールを混合調製した粉末飼料を動物に 13 週間自由摂取することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 512、1280、3200、8000 及び 20000 ppm（公比 2.5）の 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、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

13週間試験の結果、20000 ppm 群では、雄1匹と雌3匹の死亡がみられたため、この濃度はマウスの雌雄に対しての最大耐用量 (MTD: Maximum Tolerated Dose) を大きく超えていると考えられた。

8000 ppm 群では、死亡はみられなかったが、血液学的検査では貧血が、病理組織学的検査では脾臓、胃及び膀胱に変化が認められた。このため、この濃度で 2 年間の投与した場合、マウスの雌雄の寿命に関わる毒性が出現する可能性が危惧された。

3200 ppm 群では、血液学的検査で変化が認められず、病理組織学的検査で脾臓、胃及び膀胱に変化が認められたものの、その程度は多くの動物が軽度であり、この濃度での 2 年間の投与の実施は動物の寿命に影響を与えるないと判断した。

従って、2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 3200 ppm を最高投与濃度とし、以下 1280 及び 512 ppm(公比 2.5)の合計 3 段階の濃度を設定した。

II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

粉末飼料(オリエンタル酵母工業(株)製 CRF-1)と被験物質をスパイラルミキサー(関東混合機工業(株) SS-251)で攪拌混合し、512、1280 及び 3200 ppm 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(2005年4月18日)より原則として、2週に1回調製し、1回分をマウス用餌箱に充填して翌日より動物に与えた。残余は、1回の餌箱交換に必要な量を濃度ごとにビニール袋に小分け密閉し、使用時まで冷蔵で保管した。なお、試験における濃度の表示は ppm (w/w)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 ヶ月ごとに、各投与濃度ごとに調製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(株島津製作所 LC-10)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、均一性の確認を合わせて行った。

その結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対して 92.4~105% の範囲にあった。均一性は、各群ともばらつきが少なかった。従って、被験物質混合飼料中の被験物質は、設定濃度に対してほぼ正確に調製されたことを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 2-1、均一性については APPENDIX 2-2 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の安定性は、2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用

いるがん原性試験(試験番号：0579)と合わせて行った。投与開始前に最低投与濃度の 512 ppm とラットの試験の最高投与濃度である 8000 ppm の被験物質混合飼料をマウス用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管(4 日間)したものと、ビニール袋に密閉し、11 日間冷蔵保管したものを高速液体クロマトグラフ(株島津製作所 LC-10)を用いて測定し、安定であることを確認した。

その結果、調製時の濃度を 100%とした場合に、室温保管(4 日間)では、512 ppm:90.3%、8000 ppm : 94.2%、11 日間の冷蔵保管で 512 ppm : 95.7%、8000 ppm : 97.4%であり、給餌期間中及び冷蔵保管中における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 2-3 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1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、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群 名 称	動物数 (動物番号)	群 名 称	動物数 (動物番号)
対 照 群	50 匹 (1001～1050)	対 照 群	50 匹 (2001～2050)
512 ppm 群	50 匹 (1101～1150)	512 ppm 群	50 匹 (2101～2150)
1280 ppm 群	50 匹 (1201～1250)	1280 ppm 群	50 匹 (2201～2250)
3200 ppm 群	50 匹 (1301～1350)	3200 ppm 群	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、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった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 7）。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室（雄：202 室、雌：204 室）に収容し、室の扉に試験番号、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

(1) 飼育環境

動物は、飼育期間を通して以下の環境で飼育した。各飼育室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を<>内に記した。各飼育室内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温 度 : $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ <202室 ; $22.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、204室 ; $23.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ >

湿 度 : $55 \pm 15\%$ <202室 ; $54 \pm 2\%$ 、204室 ; $54 \pm 2\%$ >

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

ケージへの動物の収容方法 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

ステンレス製2連網ケージ (112(W)×212(D)×120(H) mm/匹)

(2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、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により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかつた。

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)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。飼料中の夾雜物については(財)日本食品分析センター（東京都渋谷区元代々木町52-1）の分析データを使用ロットごとに入手し、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、保管した。

(3) 飲水

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

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(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）に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を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、保管した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日1回、また、一般状態の詳細な観察は週1回行った。

II-3-2 体重測定

体重測定は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回（104週にも測定）行った。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

摂餌量は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回（104週にも測定）給餌量及び残餌量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂餌量を算出した。

II-3-4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、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た血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法はAPPENDIX 3に示した。

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、網赤血球比、白血球数、白血球分類

II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、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、下記の項目について検査を行った。検査方法はAPPENDIX 3に示した。

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、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、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 104 週の検査時まで生存した動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（ウロラブスティックス、シーメンスメディカルソリューションズ・ダイアグノスティックス）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、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動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：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

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、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、胆嚢、脾臓、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、腎、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

体重は g を単位とし、小数点以下第 1 位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、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。

被験物質の体重 kg 当たりの 1 日摂取量は、摂餌量に被験物質の設定濃度を乗じ、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、小数点以下第 3 位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、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、血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と精度により表示した。

なお、各数値データ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 統計処理

各群の有効動物数は、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とした。

病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

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。

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などを基準にしてグレード 1~4 に分け、 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。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担腫瘍臓器数について、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。

各検定は 5% の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖動物にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死動物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／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

III 試験成績

III-1 生死状況

生死状況を TABLE A 1, 2 及び FIGURE 1, 2 に示した。

－雄－

投与群の生存率に投与による影響は認められなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：33 匹（66%）、512 ppm 群：34 匹（68%）、1280 ppm 群：36 匹（72%）、3200 ppm 群：35 匹（70%）であった。

－雌－

投与群の生存率に投与による影響は認められなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：34 匹（68%）、512 ppm 群：28 匹（56%）、1280 ppm 群：28 匹（56%）、3200 ppm 群：30 匹（60%）であった。

III-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示した。

－雄－

投与の影響と考えられる一般状態所見は、雌雄とも、いずれの投与群にも認められなかつた。

III-3 体重

体重の推移を TABLE C 1～4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

－雄－

投与期間中すべての投与群で体重の低値または高値が散見されたが、投与群の体重に投与による影響は認められなかった。

なお、最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、512 ppm 群：109%、1280 ppm 群：101%、3200 ppm 群：106% であった。

－雌－

投与群の体重に投与による影響は認められなかった。

なお、最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、512 ppm 群：99%、1280 ppm 群：103%、3200 ppm 群：96% であった。

III-4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1~4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

－雄－

投与期間中の全ての投与群の摂餌量は、対照群と比較して差はなかった。

投与期間中の各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：4.4g、512 ppm 群：4.4g（100%）、1280 ppm 群：4.4g（100%）、3200 ppm 群：4.5g（102%）であった。

－雌－

投与期間中の全ての投与群の摂餌量は、対照群と比較して差はなかった。

投与期間中の各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：4.4g、512 ppm 群：4.5g（102%）、1280 ppm 群：4.5g（102%）、3200 ppm 群：4.5g（102%）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 TABLE E 1, 2 に示した。

－雄－

各投与群における週毎の被験物質摂取量（g/kg body weight per day）の平均値は、512 ppm 群：0.045～0.083（全投与期間の平均値：0.057）、1280 ppm 群：0.112～0.204（全投与期間の平均値：0.143）、3200 ppm 群：0.278～0.515（全投与期間の平均値：0.366）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の被験物質摂取量の比は、ほぼ設定用量比（公比 2.5）と一致した。

－雌－

各投与群における週毎の被験物質摂取量（g/kg body weight per day）の平均値は、512 ppm 群：0.060～0.096（全投与期間の平均値：0.075）、1280 ppm 群：0.152～0.238（全投与期間の平均値：0.191）、3200 ppm 群：0.389～0.624（全投与期間の平均値：0.473）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の被験物質摂取量の比は、ほぼ設定用量比（公比 2.5）と一致した。

III-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

－雄－

対照群と比較して著変は認められなかった。

－雌－

MCHC の高値が 1280 ppm 群に認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

III-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

－雄－

尿素窒素の高値が 1280 ppm 群と 3200 ppm 群で認められた。また、AST の減少が 3200 ppm 群、ALT の減少が 512 ppm 群と 3200 ppm 群で認められた。

トリグリセライドの高値が 512 ppm 群に認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

－雌－

リン脂質の高値が 3200 ppm 群で認められた。

III-8 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

－雄－

蛋白の陽性度の減少が 3200 ppm 群に認められた。

－雌－

対照群と比較して著変は認められなかった。

III-9 病理学的検査

III-9-1 剖検

剖検所見を TABLE I 1~6 に示した。

－雄－

前胃の結節が投与群で多く認められた。前胃の結節の発生数は対照群:1 匹、512 ppm 群:4 匹、1280 ppm 群:5 匹、3200 ppm 群:5 匹であった。

－雌－

投与による影響は認められなかった。

なお、リンパ節の腫大と脾臓の腫大が 1280 ppm 群で発生数が減少したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

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 J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示した。

－雄－

512 ppm 群で心臓と腎臓の体重比の低値がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

－雌－

対照群と比較して著変は認められなかった。

III-9-3 病理組織学的検査

検査結果のうち非腫瘍性病変を TABLE L 1~6 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を TABLE M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を TABLE N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE O 1, 2 に、転移性病変を TABLE P 1, 2 に示した。また、本試験でみられた腫瘍について、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(%)、発生匹数/総匹数）を TABLE Q 1,2 に示した。

－雄－

1) 腫瘍性病変

<胃>

前胃の扁平上皮乳頭腫の発生（対照群:0 匹,0%、512 ppm 群:4 匹,8%、1280 ppm 群:3 匹,6%、3200 ppm 群:6 匹,12%）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 3200 ppm 群に増加がみられた。また、扁平上皮乳頭腫の発生はいずれの投与群も当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 0%～最大 2%、平均発生率 0.3%）を超えていたことから、扁平上皮乳頭腫の発生増加は被験物質の投与によるものと考えられた。扁平上皮乳頭腫は、International Classification of Rodent Tumors（文献 9）の基準に基づいて診断した。

なお、扁平上皮乳頭腫は、内腔に有茎性に突出する腫瘍であり、角化を示す扁平上皮が樹枝状に分岐する間質を伴って増殖していた。過形成とは樹枝状に分岐した間質を伴っている点で鑑別し、扁平上皮癌とは浸潤性増殖を示さないことにより鑑別した。

その他、肝臓の肝細胞癌の発生が全ての投与群で減少した。

なお、肝細胞癌と肝細胞腺腫を合わせた検定では 512 ppm 群と 1280 ppm 群に発生の減少が示された。また、肝臓の血管肉腫の発生が 1280 ppm 群で減少し、肝臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生が減少傾向を示した。また、全臓器を合わせた血管肉腫の発生も 1280

ppm 以上の群で減少した。

2) 非腫瘍性病変

<鼻腔>

呼吸上皮のエオジン好性変化の発生減少または程度の減弱が全ての投与群で認められた。なお、腺の呼吸上皮化生が 512 ppm で増加したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

<副腎>

紡錘形細胞増生の発生が、3200 ppm で減少した。

一雌一

1) 腫瘍性病変

<胃>

前胃の扁平上皮乳頭腫の発生（対照群:0 匹,0%、512 ppm 群と 1280 ppm 群:1 匹,2%、3200 ppm 群:3 匹,6%）が Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。各投与群の扁平上皮乳頭腫の発生は、Fisher 検定で有意な増加を示さず、また、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 0%～最大 6%、平均発生率 0.4%）内であった。従って、雌における扁平上皮乳頭腫の発生増加は被験物質の投与の影響であると判断しなかった。

なお、下垂体の腺腫の発生（対照群:2 匹,4%、512 ppm 群:7 匹,14%、1280 ppm 群:5 匹,10%、3200 ppm 群:6 匹,12%）が Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示したが、いずれの投与群の発生も Fisher 検定で有意な増加を示さず、また、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 2%～最大 34%、平均発生率 14.3%）内であり、投与との関係はないと判断した。肺の細気管支一肺胞上皮癌の発生（対照群:2 匹,4%、512 ppm 群:1 匹,2%、1280 ppm 群:2 匹,4%、3200 ppm 群:4 匹,8%）が Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示したが、いずれの投与群の発生も、Fisher 検定で有意な増加を示さず、また、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 0%～最大 8%、平均発生率 2.8%）内であり、投与との関係はないと判断した。子宮の組織球性肉腫の発生（対照群:12 匹,24%、512 ppm 群:7 匹,14%、1280 ppm 群:12 匹,24%、3200 ppm 群:13 匹,26%）が Peto 検定（死亡率法）で増加傾向を示したが、いずれの群の発生も対照群と比較して Fisher 検定で有意な増加を示さず、また、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 10%～最大 32%、平均発生率 20.6%）内にあることから、投与との関係はないと判断した。全臓器の組織球性肉腫の発生（対照群:14 匹,28%、512 ppm 群:9 匹,18%、1280 ppm 群:12 匹,24%、3200 ppm 群:17 匹,34%）が Peto 検定（死亡率法）で増加傾向を示したが、いずれの群の発生も、Fisher 検定で有意な増加を示さず、また、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 12%～最大 36%、平均発生率 23.4%）内であり、投与との関係はないと判断した。肝臓の血管肉腫の発生は、減少傾向を示した。また、これに伴って、全臓器を合わせた血管肉腫の発生も減少傾向を示した。

2) 非腫瘍性病変

<鼻腔>

嗅上皮のエオジン好性変化の発生が 3200 ppm 群で減少した。

なお、呼吸上皮のエオジン好性変化が 512 ppm 群と 3200 ppm 群で減少し、腺胃の過形成が 1280 ppm 群で減少したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

III-9-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE R に示した。

－雄－

投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

－雌－

1280 ppm と 3200 ppm 群では子宮の腫瘍による死亡が多くみられた。子宮腫瘍が死因となつた動物は対照群:5 匹、512 ppm 群: 5 匹、1280 ppm 群:11 匹、3200 ppm 群:10 匹であった。

IV 考察及びまとめ

2-アミノ-4-クロロフェノールのマウスを用いた 2 年間の混餌投与による経口試験（投与濃度：512、1280 及び 3200 ppm）によって、下記の結果を得た。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

生存率、一般状態、体重、摂餌量に 2-アミノ-4-クロロフェノールの投与による影響はみられなかった。なお、体重及び摂餌量から算出した各投与群の被験物質摂取量の平均値の比は、設定した用量比（2.5）にほぼ一致した。

IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雄の前胃に腫瘍の発生増加がみられた。

<前胃腫瘍>

雄では前胃に良性腫瘍である扁平上皮乳頭腫の発生増加が認められた。この腫瘍は Peto 検定で統計学的に有意な增加傾向を示した。また、3200 ppm 群の発生率は、Fisher 検定で有意な増加を示し、当センターのヒストリカルコントロールデータ範囲を超えた。従って、扁平上皮乳頭腫の発生増加は雄マウスに対するがん原性を示す証拠と考えられた。いずれの投与群の発生率も当センターのヒストリカルコントロールデータを超えており、前胃腫瘍が発生増加した濃度は 512 ppm と考えた。

雌でも扁平上皮乳頭腫の発生に Peto 検定で統計学的に有意な増加傾向が認められた。しかし、その発生率は Fisher 検定で有意な増加を示さず、かつ、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。従って、雌の扁平上皮乳頭腫の発生増加は雌マウスに対するがん原性を示す証拠とならないと考えた。

本試験の予備試験として実施したマウスの 13 週間混餌経口投与試験では、前胃の過形成が雌雄とも 1280 ppm 以上の群みられ、2-アミノ-4-クロロフェノールによる前胃上皮への直接刺激によるものと考えられた（文献 6、10）。しかし、本試験では、最高投与群の 3200 ppm でも前胃の過形成の増加は認められなかった。このことから、2-アミノ-4-クロロフェノールの投与によるマウスの前胃の過形成は投与期間の延長により増強することではなく、13 週間投与でみられた過形成と本試験で発生増加した扁平上皮乳頭腫との関連は明らかでないと考える。

IV-3 その他の影響

雌雄のいずれの投与群にも、特記すべき投与の影響はみとめられなかった。

本試験の予備試験として実施したマウスの 13 週間混餌経口投与試験（文献 6）では、貧血を

示す血液パラメータの変化が認められ、脾臓のヘモジデリン沈着が雄の 3200 ppm 以上、雌の 1280 ppm 以上の群にみられた。膀胱には移行上皮の腫脹と過形成が雌雄とも 1280 ppm 以上の群で認められた。また、肝臓に小葉中心性の肝細胞の腫脹が 8000 ppm 以上の群でみられた。本試験ではこれらの変化は認められず、2-アミノ-4-クロロフェノールによる血液／造血器、膀胱及び肝臓への影響は、投与期間の延長による増強や腫瘍への進展はなかった。

IV-4 量－反応関係

本試験で腫瘍発生（前胃腫瘍）がみられた濃度は、雄の 512 ppm であった。雌については、最高投与濃度の 3200 ppm でも投与による明らかな腫瘍の増加は認められなかった。腫瘍以外の影響については、雌雄とも、最高投与濃度の 3200 ppm でも投与による明らかな影響は認められなかった。

IV-5 投与濃度設定の評価

本試験の投与濃度は 13 週間混餌経口投与試験（文献 6）の結果をもとに設定した。試験の結果、最高投与濃度群である 3200 ppm でも雌雄とも体重抑制、生存率の低下はみられなかった。雄では前胃腫瘍の増加が認められたことから、用量設定は適切であったと考える。雌については、腫瘍の発生を含む明らかな生体影響は認められなかった。しかし、13 週間試験の結果では、雌雄とも 20000 ppm の濃度では動物の死亡があり、8000 ppm では血液学的検査で貧血、病理組織学的検査で脾臓、胃及び膀胱に変化があった。また、3200 ppm の濃度でも脾臓、胃及び膀胱に病理組織学的变化が認められていることから、本試験の最高濃度である 3200 ppm は MTD の基準を満たしていると考えられた。

IV-6 他文献との比較等

- ① がん原性：2-アミノ-4-クロロフェノールのマウスを用いたがん原性試験、または長期試験の報告はみつからなかった。また、IARC では 2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性について評価を行っていない。
- ② 変異原性：2-アミノ-4-クロロフェノールはネズミチフス菌 (TA100、TA1537 及び TA1535) を用いた変異原性試験で代謝活性化の存在下で陽性を示している（文献 11,12）。培養細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験では、構造異常 (+S9処理、-S9処理、24 時間処理、48 時間処理) 及び数的異常 (+S9処理) が認められている（文献 13）。
- ③ 代謝：2-アミノ-4-クロロフェノールの代謝に関する報告はなかった。

V 結論

B6D2F1/Crlj マウスを用いて、2-アミノ-4-クロロフェノールの 2 年間（104 週間）にわたる経口投与によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雄に前胃の扁平上皮乳頭腫の発生増加が認められ、雄マウスに対するがん原性を示す証拠である。雌では腫瘍の明らかな発生増加は認められなかった。

VI 文献

1. 化学工業日報社. 2008. 15308 の化学商品. 東京：化学工業日報社, 660.
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: Jone Wiley and Sons.
3. 和光純薬工業(株). 2004. 2-アミノ-4-クロロフェノール, 赤外吸収スペクトル.
4. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発 第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日.
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. 2006. 2-アミノ-4-クロロフェノールのマウス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. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. Lyon: IARC. IARC Monographs Suppl 2:311-426.
9. Betton GR, Whiteley LO, Anver MR, Brown R, Deschl U, Elwell M, et al. 2001. Gastrointestinal tract. In: International Classification of Rodent Tumors, The Mouse (Mohr U, ed). International Agency for Research on Cancer, Berlin: Springer-Verlag, 23-58.
10. 真鍋淳, 松沼尚史, 高橋道人, 立松正衛, 西川秋佳. 2000. 各論 4 章, 消化管, 毒性病理組織学 (日本毒性病理学会編). 名古屋 : 日本毒性病理学会, 153-178.

- 11 日本化学物質安全・情報センター編. 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, 東京: 日本化学物質安全・情報センター, 補遺版, 57:98-100.
12. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. 1988. Salmonella
mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. vol. 11. Supplement
12:1-158
13. 日本化学物質安全・情報センター編. 2008. 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, 補遺 4 版,
54,178-179.

VII 予見することのできなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

本試験において、予見することのできなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

なお、被験物質の同一性の測定に使用した質量分析計（5989B）、安定性の測定に使用したガスクロマトグラフ（5890A）、血液学的検査で使用した総合血液学検査装置（ADVIA 120）及び尿検査で使用した尿試験紙（マルティスティックス）の製造会社の社名が変更されたため、本報告書はそれぞれ、新社名を記載した。