

ジフェニルアミンのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0685

CAS No. 122-39-4

2011年8月25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

ジフェニルアミン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

ジフェニルアミンをマウスに 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」に準拠し、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
東京都千代田区霞が関 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 福島 昭治
神奈川県秦野市平沢 2445

ジフェニルアミンのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0685

本文

要約

ジフェニルアミンのがん原性を検索する目的で B6D2F1/Crlj 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、ジフェニルアミン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 0 (対照群)、250、1000 及び 4000 ppm (重量比 w/w) 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。

試験の結果、雄では 4000 ppm 群に尿閉による顕著な生存率低下がみられた。雌では 4000 ppm 群の生存率は投与終了時には対照群を上回った。一般状態の観察では、被験物質の代謝物によると考えられる褐色尿が雌雄の 4000 ppm 群に認められた。体重の低値が、雄の 4000 ppm 群で全投与期間を通して、雌では 4000 ppm 群で投与開始後 18 週以降に認められた。雌雄とも投与群の摂餌量は対照群と同様の推移を示した。なお、雄の 4000 ppm 群では、尿閉による顕著な生存率低下がみられること及び顕著な体重増加抑制がみられることから、雄の投与濃度 4000 ppm は最大耐量 (MTD) を超えていると考えられた。

腫瘍性病変を付表 1, 2 に示す。雄では脾臓に血管腫と血管肉腫を合わせた発生増加 (Fisher 検定) が 1000 ppm 群に認められた。雄の皮下組織、骨髄、脾臓、肝臓及び心臓を含む全臓器における血管腫の発生は、増加傾向 (Peto 検定) が認められ、血管腫、並びに血管腫と血管肉腫を合わせた発生は 1000 ppm 群で増加 (Fisher 検定) した。雌では腫瘍の発生増加は認められなかった。

腫瘍以外の影響として、血液 / 造血系では、血液学的検査でメトヘモグロビンの高値が雌雄の全投与群に認められた。メトヘモグロビンの増加によると考えられる貧血が、雌雄とも全投与群に認められた。また、血液学的検査及び血液生化学的検査で貧血に関連した種々の変化が投与群に認められた。なお、骨髄には造血亢進が認められた。脾臓には重量の高値、ヘモジデリン沈着、髄外造血、赤血球充満が認められた。ヘモジデリン沈着は肝臓と腎臓にも認められた。その他、肝臓への影響として、肝細胞の中心性肥大が雌雄の 4000 ppm 群で増加した。泌尿器系への影響として、雄の 4000 ppm 群に尿閉が観察され、血漿中の尿素窒素の高値が雌の 4000 ppm 群に、腎臓重量の増加が雌の 1000 ppm 以上の群に、腎盂腎炎が雄の 4000 ppm 群に認められた。病理組織学的検査では膀胱の拡張と硝子滴変性、尿道の炎症が認められた。肺では、尿毒症性肺炎が雄 4000 ppm 群に、肺静脈の変性が雌雄 4000 ppm 群にみられた。

2 年間の混餌経口投与により、雌雄とも最低投与濃度の 250 ppm 群で血液 / 造血系への影響がみられた。従って、最低毒性量 (LOAEL) は 250 ppm (雄 : 29 mg/kg 体重/日、雌 : 36 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

以上のように、B6D2F1/Crlj マウスを用いて、ジフェニルアミンの 2 年間 (104 週間) に

わたる混餌経口投与によるがん原性試験を行った結果、雄では脾臓、並びに脾臓及び肝臓等を含む全臓器に血管系腫瘍の発生増加が認められ、雄マウスに対するがん原性が示された。雌マウスでは腫瘍の発生増加は認められず、がん原性は示されなかった。

付表 1 ジフェニルアミン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	250	1000	4000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50 a)	50	50	50		
良性腫瘍	皮下組織	血管腫	0	0	1	0		
	肺	細気管支 - 肺胞上皮腺腫	5	4	7	4		
	骨髄	血管腫	0	0	0	1		
	脾臓	血管腫	1	0	6	2		
	肝臓	血管腫	2	2	5	3		
		肝細胞腺腫	9	14	10	2 *		
	ハーダー - 腺	腺腫	4	2	1	1		
悪性腫瘍	肺	細気管支 - 肺胞上皮癌	5	6	8	1		
	リンパ節	悪性リンパ腫	6	4	3	2		
	脾臓	血管肉腫	0	0	3	1		
	心臓	血管肉腫	0	1	0	0		
	肝臓	組織球性肉腫	5	1	1	1		
		肝細胞癌	7	15 *	5	2		
	精巣上体	血管肉腫	0	1	2	1		
	脾臓	血管腫 + 血管肉腫	1	0	9 **	3		
	肝臓	血管腫 + 血管肉腫	2	3	7	4		
	全臓器 b)	血管腫	3	2	10 *	6		
		血管肉腫	0	1	4	1		
		血管腫 + 血管肉腫 c)	3	3	14 **	6		

a : 対照群のハーダー腺の検査動物数は 49

b : 脾臓、肝臓、皮下組織、骨髄及び心臓を合わせた部位を全臓器と表現した。

c : 全臓器に対する血管腫 + 血管肉腫の Peto 検定と Cochran Armitage 検定は行っていない。

付表 2 ジフェニルアミン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	250	1000	4000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	肺	細気管支 - 肺胞上皮腺腫	1	3	1	2		
	肝臓	肝細胞腺腫	4	4	3	0		
	下垂体	腺腫	2	0	5	4		
	ハーダー - 腺	腺腫	0	3	1	2		
悪性腫瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	18	20	17	15		
	脾臓	悪性リンパ腫	0	3	1	0		
	肝臓	組織球性肉腫	4	0	1	1		
	子宮	血管肉腫	1	1	2	3		
		組織球性肉腫	8	7	17 *	12		

*: p 0.05 で有意

**: p 0.01 で有意

(Fisher 検定)

*: p 0.05 で有意増加

*: p 0.01 で有意増加

(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)

試験材料

- 1 被験物質の性状等

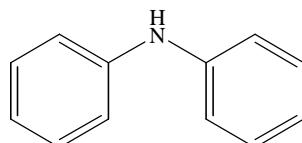
- 1 - 1 名称等

名 称： ジフェニルアミン (Diphenylamine)

CAS No. : 122-39-4

- 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 169.23

- 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色あるいは灰色結晶で芳香がある

比 重 : 1.159

融 点 : 52.85

溶 解 性 : 水にやや溶け、アルコール、エーテルに可溶

保管条件 : 冷蔵で暗所に保管

- 2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : LTF7564

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

グ レ ー ド : 試薬特級

純 度 : 100.5% (和光純薬工業(株) 検査成績書データ)

- 3 被験物質の特性・同一性、安定性

- 3 - 1 特性・同一性

被験物質の同一性は、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 5973N)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、被験物質はジフェニルアミンであることを確認した。

それらの結果はAPPENDIX 1-1に示した。

- 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に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、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、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ったことを確認した。

それらの結果はAPPENDIX 1-2に示した。

- 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(群構成時体重範囲、雄：21.2～25.4g、雌：17.3～20.6g)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。

試験方法

- 1 投与

- 1 - 1 投与経路

投与経路は経口投与とした。

- 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 7 日毎に実施した。

- 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前日まで連続投与した。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、250、1000 及び 4000 ppm (重量比 w/w) の 3 段階 (公比 4) 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。

- 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。

投与濃度は、13 週間毒性試験 (試験番号 0670) の結果 (文献 6) をもとに設定した。13 週間試験は、B6D2F1/Crlj マウスの雌雄に、0 (対照群)、256、640、1600、4000 及び 10000 ppm (w/w) (公比 2.5) の濃度の被験物質混合飼料を自由摂取させることによって行った。その結果、全ての投与群で死亡はみられなかった。10000 ppm 群では、雄で体重増加の抑制 (最終体重値は対照群に対し、79%)、雌雄に脾臓及び肝臓重量の高値がみられた。血液学的検査では、雌雄ともにメトヘモグロビンの増加及び貧血を示すパラメータの顕著な変化がみられた。また、病理組織学的検査でも貧血に関連した変化が、雌雄の骨髓、脾臓、腎臓に認められた。その他、肝臓には雌雄ともに小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。

4000 ppm 群では、雄の最終体重値は対照群に対し 88% であった。また、雌雄ともに 10000 ppm 群と同様な変化が認められたが、変化の程度は 10000 ppm 群よりも減弱した。1600 ppm 以下の投与群では、体重増加の抑制は雄の 1600 ppm 群（最終体重値は対照群に対し 91%）にみられたのみで、雌雄とも貧血に関連した変化は投与濃度に対応してさらに減弱し、最低投与濃度の 256 ppm 群では、雌雄に貧血を示す血液学的検査値の変化と脾臓重量の高値がみられたが、軽度な変化であった。

以上の結果から、10000 ppm 群では、雄に顕著な体重増加抑制（最終体重値は対照群に対し 79%）がみられ、雌雄ともに顕著な貧血が認められることから、がん原性試験の最高濃度としては高すぎると考えられた。一方、4000 ppm の濃度では、雄の最終体重値は対照群に対し 88% であるが、雌雄とも貧血の程度は 10000 ppm 群より減弱していることから、がん原性試験の最高濃度として適切であると考えた。

従って、がん原性試験の投与濃度は、4000 ppm を最高濃度とし、以下 1000 及び 250 ppm（公比 4）と決定した。

- 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）で攪拌混合し、10000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 10000 ppm 被験物質混合飼料を更に粉末飼料と攪拌混合し、4000、1000 及び 250 ppm の被験物質混合飼料を調製した。試験における濃度の表示は ppm (w/w) とした。また、被験物質混合飼料の調製は、投与開始日前日（2007 年 7 月 30 日）より 2 週に 1 回調製した。1 回の調製量は 2 週間分とし、1 週間分をマウス用餌箱に充填して翌日より動物に投与した。残りの 1 週間分は各濃度毎にビニール袋に小分け密封し、使用時まで冷蔵で保管した。

- 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の被験物質の濃度は、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、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 90.5 ~ 105% の範囲にあった。また、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 1-3、均一性については APPENDIX 1-4 に示した。

- 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、13週間毒性試験(試験番号 0670)において、100 ppm と 10000 ppm の被験物質混合飼料で確認した。100 ppm と 10000 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(8日間)したものと、ビニール袋詰めにして密封し、冷蔵保管(8日間)したものについて、調製時と保管期間後の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ((株)島津製作所 LC-10)を用いて測定した。調製時と保管期間後の被験物質濃度を比較した結果、被験物質混合飼料中の被験物質は安定であった。

その結果を APPENDIX 1-5 に示した。

- 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 (mg/kg 体重/日) を算出した。

- 2 動物管理

- 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。

群 名 称	動物数 (動物番号)	
	雄	雌
対 照 群	50 匹 (1001~1050)	50 匹 (2001~2050)
250 ppm 群	50 匹 (1101~1150)	50 匹 (2101~2150)
1000 ppm 群	50 匹 (1201~1250)	50 匹 (2201~2250)
4000 ppm 群	50 匹 (1301~1350)	50 匹 (2301~2350)

- 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い動物から体重の中央値に近い雌雄各 200 匹を選別し、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。

- 2 - 3 飼育条件

(1) 飼育環境

動物は、全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 ± 2 <202室 : 22.7 ± 0.3 、 204室 : 22.7 ± 0.4 >

湿度 : $55 \pm 15\%$ <202室 : $55 \pm 2\%$ 、 204室 : $55 \pm 2\%$ >

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-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52-1）あるいはユーロフィンズサイエンティフィック社（東京都世田谷区下馬4-16-21）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。

- 3 観察・検査項目及び方法

- 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。

- 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。

- 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。

- 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及びヘパリンリチウム入り採血管(下記 印検査項目)に採血した。EDTA-2 カリウム入り採血管の血液は全血を用いて、ヘパリンリチウム入り採血管の血液は遠心分離して得られた赤血球を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 2 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、メトヘモグロビン濃度、白血球数、白血球分類

- 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 2 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

- 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、シーメンスヘルスケア・ダイアグノстиクス社）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

- 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、脊髓、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

- 4 数値処理と統計方法

- 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 mg/kg 体重/日を単位として小数点以下第 1 位を四捨五入し、整数値の 1 の位までを表示した。

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 2 に示した単位と桁数により表示した。

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。

- 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、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、各群ごとの担腫瘍動物数について、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。

各群雌雄ごとに検査数が 2 以下の項目については、検定より除外した。

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 / 濕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 / 濕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

試験成績

- 1 生死状況

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

- 雄 -

4000 ppm 群では、対照群に比べ投与中期以降に生存率の低値がみられた。250 ppm 群と 1000 ppm 群の生存率は対照群と同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：31 匹（62%）、250 ppm 群：29 匹（58%）、1000 ppm 群：29 匹（58%）、4000 ppm 群：16 匹（32%）であった。

- 雌 -

4000 ppm 群では、対照群に比べ投与終期に生存率の高値がみられた。250 ppm 群と 1000 ppm 群の生存率は対照群と同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：23 匹（46%）、250 ppm 群：25 匹（50%）、1000 ppm 群：25 匹（50%）、4000 ppm 群：35 匹（70%）であった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示した。

- 雄 -

4000 ppm 群では、被験物質の代謝物によると考えられる褐色尿が投与開始後 19 週目から投与期間を通して多くの動物に認められた。250 ppm 群と 1000 ppm 群では、被験物質投与と関連があると考えられる所見は認められなかった。

- 雌 -

4000 ppm 群では、被験物質の代謝物によると考えられる褐色尿が投与開始後 19 週目から投与期間を通して多くの動物に認められた。250 ppm 群と 1000 ppm 群では、被験物質投与と関連があると考えられる所見は認められなかった。

- 3 体重

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

- 雄 -

4000 ppm 群では、全投与期間を通して体重の低値が認められた。250 ppm 群では、投与開始後 26 週目から 58 週目にかけて体重の高値が認められた。1000 ppm 群では、対照群とほぼ同様の体重推移を示した。

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、250 ppm 群：98%、1000 ppm 群：96%、4000 ppm 群：77% であった。

- 雌 -

4000 ppm 群では、投与開始後 18 週以降に体重の低値が認められた。250 ppm 群と 1000 ppm 群では、対照群とほぼ同様の体重推移を示した。

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、250 ppm 群 : 98%、1000 ppm 群 : 98%、4000 ppm 群 : 85% であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1 ~ 4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

- 雄 -

全投与群の摂餌量は、全投与期間を通して対照群と同様の推移を示した。

全投与期間における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、250 ppm 群 : 4.4g (100%)、1000 ppm 群 : 4.4g (100%)、4000 ppm 群 : 4.3g (98%) であった。

- 雌 -

全投与群の摂餌量は、全投与期間を通して対照群と同様の推移を示した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量 (対照群に対する相対比) は、対照群 : 4.0g、250 ppm 群 : 4.1g (103%)、1000 ppm 群 : 4.1g (103%)、4000 ppm 群 : 4.0g (100%) であった。

- 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 -

各投与群の被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、250 ppm 群 : 22 ~ 42、1000 ppm 群 : 88 ~ 167、4000 ppm 群 : 435 ~ 662 の範囲にあった。また、各投与群における全投与期間を通しての平均被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、250 ppm 群 : 29、1000 ppm 群 : 117、4000 ppm 群 : 535 であった。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率は、250 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1000 ppm 群で 4.0 倍、4000 ppm 群で 18.4 倍であり、投与群の被験物質摂取量は設定用量比 (公比 4) に近い値を示した。

- 雌 -

各投与群の被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、250 ppm 群 : 29 ~ 48、1000 ppm 群 : 119 ~ 190、4000 ppm 群 : 537 ~ 753 の範囲にあった。また、各投与群における全投与期間を通しての平均被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、250 ppm 群 : 36、1000 ppm 群 : 147、4000 ppm 群 : 616 であった。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率は、250 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1000 ppm 群で 4.1 倍、4000 ppm 群で 17.1 倍であり、投与群の被験物質摂取量は設定用量比 (公比 4) に近い値を示した。

- 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 -

ヘマトクリット値の低値、並びに MCH とメトヘモグロビン濃度の高値が全投与群に、赤血球数とヘモグロビン濃度の低値、並びに MCHC の高値が 1000 ppm 以上の群に、MCV の高値が 4000 ppm 群に認められた。また、網赤血球比の高値が 250 ppm 群と 1000 ppm 群に認められた。

- 雌 -

赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値、並びに MCV、MCH 及びメトヘモグロビン濃度の高値が全投与群に認められた。MCHC の高値が 1000 ppm 以上の群に、好酸球比の低値と単球比の高値が 4000 ppm 群に認められた。また、網赤血球比の高値が 250 ppm 群と 1000 ppm 群に認められた。

- 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 -

総ビリルビンの高値が全投与群に、LDH の高値が 4000 ppm 群に認められた。

- 雌 -

総ビリルビンと無機リンの高値が 1000 ppm 以上の群に、総蛋白、アルブミン、リン脂質、LDH、尿素窒素、ナトリウム及びカルシウムの高値が 4000 ppm 群に認められた。

その他、ALP の低値が 1000 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。

- 8 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雄 -

被験物質投与による変化は認められなかった。

なお、ケトン体の検査において、被験物質の代謝物と考えられる尿の着色(褐色)のため、尿試験紙による判定ができなかった動物がみられた。判定ができなかった動物数は、1000 ppm 群で 2 匹、4000 ppm 群で 14 匹であった。4000 ppm 群のケトン体は、統計学的に評価ができなかった。

- 雌 -

蛋白の陽性度の減少が 4000 ppm 群に、潜血の陽性例の減少が 250 ppm 群と 4000 ppm 群に認められた。

なお、ケトン体の検査において、被験物質の代謝物と考えられる尿の着色(褐色)のため、尿試験紙による判定ができなかった動物がみられた。判定ができなかった動物数は、1000 ppm 群で 2 匹、4000 ppm 群で 26 匹であった。

- 9 病理学的検査

- 9 - 1 剖検

剖検所見を TABLE I 1 ~ 6 に示した。

- 雄 -

脾臓の腫大が 4000 ppm 群に多数認められた(対照群 3 匹、250 ppm 群 0 匹、1000 ppm 群 6 匹、4000 ppm 群 17 匹)。

肝臓の暗色が 4000 ppm 群に認められた(対照群 0 匹、250 ppm 群 0 匹、1000 ppm 群 0 匹、4000 ppm 群 8 匹)。

腎臓の変形が 4000 ppm 群に認められた(対照群 0 匹、250 ppm 群 0 匹、1000 ppm 群 0 匹、4000 ppm 群 3 匹)。

膀胱では尿多量貯留の発生が 4000 ppm 群に認められた(対照群 5 匹、250 ppm 群 7 匹、1000 ppm 群 10 匹、4000 ppm 群 25 匹)。なお、試験途中で死亡あるいは瀕死状態にあって解剖された動物でも、膀胱の尿多量貯留の発生は、4000 ppm 群に認められた(対照群 3 匹、250 ppm 群 6 匹、1000 ppm 群 10 匹、4000 ppm 群 22 匹)。この所見は尿閉、すなわち膀胱内に貯留した尿が排出できない症状により認められる。

- 雌 -

肝臓の結節が 1000 ppm 以上の群に多数認められた(対照群 6 匹、250 ppm 群 7 匹、1000 ppm 群 10 匹、4000 ppm 群 11 匹)。

腎臓の変形が 4000 ppm 群に認められた(対照群 1 匹、250 ppm 群 0 匹、1000 ppm 群 0 匹、4000 ppm 群 5 匹)。

子宮の結節が 1000 ppm 以上の群に多数認められた(対照群 8 匹、250 ppm 群 8 匹、1000 ppm 群 15 匹、4000 ppm 群 13 匹)。

- 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 -

脾臓の実重量と体重比の高値が 1000 ppm 以上の群に、心臓の実重量と体重比の高値が 4000 ppm 群に認められた。

その他、4000 ppm 群で、副腎、精巣、肺、腎臓、肝臓及び脳の体重比に変化がみられたが、4000 ppm 群の搬出時体重は対照群と比較して低値であり、これらの臓器重量の変化は搬出時体重の低値に関連したものと考えられた。なお、250 ppm 群で、脳の実重量は統計学的に有意な低値を示したが、僅かな変化であることと、この群のみの変化であることから、被験物質投与に関連のある変化であるかは不明であった。

- 雌 -

脾臓の実重量と体重比の高値が全投与群に認められた。

心臓及び腎臓の実重量と体重比の高値が 1000 ppm 以上の群に認められた。

肺と肝臓では、実重量の高値が 1000 ppm 以上の群に、体重比の高値が 4000 ppm 群に認められた。

その他、脳の体重比の高値が 4000 ppm 群に認められたが、4000 ppm 群の搬出時体重は対照群と比較して低値であり、これらの臓器重量の変化は搬出時体重の低値に関連したものと考えられた。

- 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

<脾臓>

脾臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生 (対照群: 1 匹, 2%、250 ppm 群: 0 匹, 0%、1000 ppm 群: 9 匹, 18%、4000 ppm 群: 3 匹, 6%) は、Fisher 検定で 1000 ppm 群に有意な増加を示した。1000 ppm 群における脾臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生率 18% (9/50 匹) 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 (最小 0% ~ 最大 14%, 平均 4.8%) を超えていた。なお、脾臓の血管腫の発生 (対照群: 1 匹, 2%、250 ppm 群: 0 匹, 0%、

1000 ppm 群: 6 匹, 12%、4000 ppm 群: 2 匹, 4%) 脾臓の血管肉腫の発生(対照群: 0 匹, 0%、250 ppm 群: 0 匹, 0%、1000 ppm 群: 3 匹, 6%、4000 ppm 群: 1 匹, 2%) が認められた。血管腫は、比較的分化の程度が良い腫瘍性血管内皮細胞が血管腔を作りながら一層性に増殖した腫瘍であり、多層化はみられなかった。血管肉腫は、円形から卵円形、もしくは多角形の核を持った腫瘍細胞が密集して血液腔に沿って増殖した腫瘍であり、細胞異型が強く、一部に多層化が認められた。脾臓の血管腫及び血管肉腫の診断では、International Classification of Rodent Tumors(文献 9)や Pathology of Tumours in Laboratory Animals (文献 10) を参考にした。

< 肝臓 >

肝臓の血管腫の発生(対照群: 2 匹, 4%、250 ppm 群: 2 匹, 4%、1000 ppm 群: 5 匹, 10%、4000 ppm 群: 3 匹, 6%) は、Peto 検定(有病率法) で増加傾向を示した。しかし、肝臓の血管腫の発生は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲(最小 0% ~ 最大 14%, 平均 3.1%) 内にあった。また、肝臓の血管肉腫の発生(対照群: 0 匹, 0%、250 ppm 群: 1 匹, 2%、1000 ppm 群: 2 匹, 4%、4000 ppm 群: 1 匹, 2%) が認められ、血管腫と血管肉腫を合わせた発生(対照群: 2 匹, 4%、250 ppm 群: 3 匹, 6%、1000 ppm 群: 7 匹, 14%、4000 ppm 群: 4 匹, 8%) は Peto 検定(有病率法) で増加傾向を示した。しかし、血管腫と血管肉腫を合わせた発生は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲(最小 0% ~ 最大 16%, 平均 7.4%) 内にあった。従って、肝臓の血管腫、並びに血管腫と血管肉腫を合わせた発生増加は、被験物質投与によるものとは断定できなかった。

< 全臓器 >

血管系腫瘍の発生について、全臓器での発生を集計して解析を行った。少数例ではあるが、上述した脾臓、肝臓以外の組織 / 臓器に血管系腫瘍の発生が認められた。すなわち、血管腫が、皮下組織(対照群: 0 匹, 0%、250 ppm 群: 0 匹, 0%、1000 ppm 群: 1 匹, 2%、4000 ppm 群: 0 匹, 0%) 、骨髓(対照群: 0 匹, 0%、250 ppm 群: 0 匹, 0%、1000 ppm 群: 0 匹, 0%、4000 ppm 群: 1 匹, 2%) に認められ、また、血管肉腫が心臓(対照群: 0 匹, 0%、250 ppm 群: 1 匹, 2%、1000 ppm 群: 0 匹, 0%、4000 ppm 群: 0 匹, 0%) に認められた。

皮下組織、骨髓、脾臓、肝臓及び心臓を含む全臓器の血管腫の発生(対照群: 3 匹, 6%、250 ppm 群: 2 匹, 4%、1000 ppm 群: 10 匹, 20%、4000 ppm 群: 6 匹, 12%) は、Fisher 検定で 1000 ppm 群に有意な増加を示し、Peto 検定(有病率法) で増加傾向を示した。1000 ppm 群における全臓器の血管腫の発生率 20% (10/50 匹) 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(最小 0% ~ 最大 18%, 平均 6.5%) を超えていた。なお、全臓器の血管肉腫の発生(対照群: 0 匹, 0%、250 ppm 群: 1 匹, 2%、1000 ppm 群: 4 匹, 8%、4000 ppm 群: 1 匹, 2%) が認められ、全臓器の血管腫と血管肉腫を合わせた発生(対照群: 3 匹, 6%、250 ppm 群: 3 匹, 6%、1000 ppm 群: 14 匹, 28%、4000 ppm 群: 6 匹, 12%) は、Fisher 検定で 1000 ppm 群に有意な増加を示した。1000 ppm 群における全臓器の血管腫と血管肉腫を合わせた発生率 28% (14/50 匹) 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（最小 0% ~ 最大 22%, 平均 12.4%）を超えていた。なお、全臓器に対する血管腫と血管肉腫合わせた Peto 検定と Cochran Armitage 検定は実施していない。

その他、肝細胞腺腫の発生は、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 4000 ppm 群に有意な減少を示した。肝細胞癌の発生は、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 250 ppm 群に有意な増加を示したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

2) 非腫瘍性病変

< 脾臓 >

ヘモジデリン沈着の発生が全投与群で増加した。また、髄外造血の発生の増加と程度の増強が 1000 ppm 以上の群に認められた。なお、赤血球充満が 4000 ppm 群にみられた。

< 肝臓 >

ヘモジデリン沈着の発生が 1000 ppm 以上の群で増加した。また、肝細胞の中心性肥大の発生が 4000 ppm 群で増加した。

< 腎臓 >

ヘモジデリン沈着の発生が 4000 ppm 群で増加した。また、腎盂腎炎や瘢痕が 4000 ppm 群にみられた。腎盂腎炎は剖検では膀胱に尿多量貯留（尿閉）のみられた動物に観察され、瘢痕は剖検で腎臓の変形として認められた。

< 骨髄 >

造血亢進の発生が 4000 ppm 群で増加した。

< 膀胱 >

膀胱の拡張の発生が 4000 ppm 群で増加した。膀胱の拡張は剖検では尿多量貯留として認められた。また、膀胱の内腔面を被覆する移行上皮表層細胞に、好酸性滴状物が観察される硝子滴変性が認められた。この硝子滴変性は 4000 ppm 群で増加した。

< 尿道 >

炎症の発生が 4000 ppm 群で増加した。炎症は主に炎症細胞浸潤が認められ、尿道腔内に蛋白様物質や精子及び尿路上皮を含んでいた。尿道の炎症は尿閉がみられた動物に観察された。

< 肺 >

尿毒症性肺炎の発生が 4000 ppm 群で増加した。尿毒症性肺炎は尿毒症に伴った肺の炎症性病変である。本試験では炎症性細胞浸潤を主体とした肺の病変が、尿閉や腎盂腎炎のみられた動物にのみ観察された。また、少数例ではあるが血管の変性が 4000 ppm 群に認められた。この血管の変性は、肺静脈の心筋層と内皮の間に HE 染色で淡紫赤色に染まる物質の沈着がみられる変化で、特殊染色を試みたが沈着物質の特定はできなかった。特殊染色の結果は、PAS 染色で淡赤色、マッソントリクローム染色で淡青色、コンゴーレッド染色

で淡橙色、PTAH 染色で陰性であった。

その他、鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化と呼吸上皮化生の発生減少が 4000 ppm 群にみられた。なお、鼻腔の呼吸上皮のエオジン好性変化が 250 ppm 群で増加したが、投与濃度投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 雌 -

1) 腫瘍性病変

<子宮>

子宮の組織球性肉腫の発生(対照群: 8 匹, 16%、250 ppm 群: 7 匹, 14%、1000 ppm 群: 17 匹, 34%、4000 ppm 群: 12 匹, 24%)が Fisher 検定で 1000 ppm 群に増加が示されたが、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 34%, 平均 20.7%)内にあることから、この腫瘍の 1000 ppm 群での増加は被験物質投与によるものではないと判断した。

その他、肝細胞腺腫の発生は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

2) 非腫瘍性病変

<脾臓>

ヘモジデリン沈着の発生が全投与群で発生増加と程度の増強が認められた。また、4000 ppm 群で髄外造血と赤血球充满の発生が増加した。

<肝臓>

ヘモジデリン沈着の発生が 1000 ppm 以上の群で増加した。また、肝細胞の中心性肥大の発生が 4000 ppm 群で増加した。

<腎臓>

ヘモジデリン沈着の発生が 4000 ppm 群で増加した。また、少数例ではあるが瘢痕がみられ、この変化は剖検で腎臓の変形として認められた。

<骨髄>

造血亢進の発生が 4000 ppm 群で増加した。

<膀胱>

移行上皮表層細胞の硝子滴変性の発生が 4000 ppm 群で増加した。

<肺>

血管の変性の発生が 4000 ppm 群で増加した。

- 9 - 4 死因

病理学的にみた死亡 / 濕死の原因を TABLE R 1, 2 に示した。

- 雄 -

4000 ppm 群では尿閉による死亡 / 濕死が多くみられた。(対照群 2 匹に対し、4000 ppm 群 21 匹)。

- 雌 -

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つた。

考察及びまとめ

ジフェニルアミンのマウスを用いた 2 年間の混餌投与による経口試験（投与濃度：250、1000 及び 4000 ppm）によって、下記の結果を得た。

- 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、被験物質摂取量

雄では 4000 ppm 群に尿閉による顕著な生存率の低下がみられた。雌では 4000 ppm 群の生存率は投与終了時には対照群を上回った。一般状態の観察では、被験物質の代謝物によると考えられる褐色尿が雌雄の 4000 ppm 群に認められた。体重の低値が、雄では 4000 ppm 群で全投与期間を通して、雌では 4000 ppm 群で投与開始後 18 週以降に認められ、104 週目の体重は対照群に対し、雄で 77%、雌で 85% であった。雌雄とも投与群の摂餌量は対照群と同様の推移を示した。なお、雌雄とも投与群の被験物質摂取量の比率は、混餌中の被験物質濃度比と同様の値を示した。

- 2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

本がん原性試験では、雄にジフェニルアミンの混餌経口投与による腫瘍の発生増加が認められた。

雄の脾臓に血管腫と血管肉腫を合わせた発生率の増加が Fisher 検定で 1000 ppm 群に示された。雄 1000 ppm 群の血管腫と血管肉腫を合わせた発生率 18% (9/50 匹) 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（最小 0% ~ 最大 14%, 平均 4.8%）を超えていた。従って、脾臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生増加は、被験物質投与によるものと考えた。雄の皮下組織、骨髄、脾臓、肝臓及び心臓を含む全臓器における血管腫の発生は、Fisher 検定で 1000 ppm 群に有意な増加を示し、Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。雄 1000 ppm 群の血管腫の発生率 20% (10/50 匹) 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（最小 0% ~ 最大 18%, 平均 6.5%）を超えていた。また、雄の全臓器の血管腫と血管肉腫を合わせた発生は、Fisher 検定で 1000 ppm 群に有意な増加が示された。雄 1000 ppm 群の全臓器の血管腫と血管肉腫を合わせた発生率 28% (14/50 匹) 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（最小 0% ~ 最大 22%, 平均 12.4%）を超えていた。従って、雄の全臓器の血管腫、並びに血管腫と血管肉腫を合わせた発生増加は、被験物質投与によるものと考えられた。

なお、雄の最高濃度である 4000 ppm 群では非腫瘍性病変（尿閉）による生存率の低下があったため、腫瘍の発生増加はなかったと考えた。従って、腫瘍の発生増加を示したものは、雄の 1000 ppm 群のみであった。

雌では、腫瘍の発生増加は認められなかった。

- 3 その他の影響

ジフェニルアミンの混餌経口投与により、雌雄とも血液／造血系、肝臓、泌尿器系及び肺への影響が認められた。

血液／造血系への影響として、貧血を示す赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度の低値のいずれかが、雌雄とも全投与群に認められた。貧血の原因は、メトヘモグロビンの高値が雌雄の全投与群にみられることから、メトヘモグロビンによる赤血球傷害であると考えられた（文献 11）。なお、貧血に関連した変化として、網赤血球比の高値が雌雄とも 250 ppm 群と 1000 ppm 群に、総ビリルビンの高値が雄の全投与群と雌の 1000 ppm 以上の群に、脾臓重量の高値が雄の 1000 ppm 以上の群と雌の全投与群に認められた。さらに、病理組織学的検査において、脾臓では、ヘモジデリン沈着が雌雄の全投与群で増加し、髄外造血の発生増加と程度の増強が雄の 1000 ppm 以上の群と雌の 4000 ppm 群で認められた。また、脾臓には赤血球充満が雌では 4000 ppm 群で増加し、雄でも少数例に認められた。ヘモジデリン沈着は肝臓（雌雄 1000 ppm 以上の群）や腎臓（雌雄 4000 ppm 群）にも増加が認められ、骨髄では造血亢進が雌雄の 4000 ppm 群で増加した。これらの変化は、血液中のメトヘモグロビンの増加による赤血球の破壊の亢進に起因した変化と考えられた。また、本試験の予備試験として行った 13 週間混餌経口投与試験（文献 6）でも、メトヘモグロビンの増加とその二次的変化が認められていた。13 週間試験では、脾臓への影響は最低濃度である 256 ppm まで認められ、肝臓のヘモジデリン沈着は 1600 ppm まで、腎臓のヘモジデリン沈着と骨髄の造血亢進は 4000 ppm 群まで認められた。これらの変化は、本試験とほぼ同じ濃度まで認められた。従って、血液／造血系への影響は、投与期間が延長しても、より低濃度までみられることはなかった。

肝臓への影響として、肝細胞の中心性肥大が雌雄の 4000 ppm 群で増加した。肝細胞の中心性肥大も 13 週間混餌経口投与試験（文献 6）で 4000 ppm 群まで認められ、本試験と同じ濃度で認められた。従って、肝臓への影響は、投与期間が延長しても、より低濃度までみられることはなかった。なお、肝細胞傷害と赤血球傷害の 2 つの要因による変化と考えられる LDH の高値が雌雄の 4000 ppm 群にみられた（文献 12,13,14）。

泌尿器系への影響として、雄の 4000 ppm 群において、剖検時には膀胱の尿多量貯留が観察され、病理組織学的検査では膀胱の拡張、尿道腔内に蛋白様物質や精子、炎症性細胞や尿路上皮の落屑が認められた。これらの変化から、尿路を閉塞された可能性が疑われ、膀胱内に尿が多量に貯留したと考えられた。雄マウスでは多くの系統で加齢により尿路系の閉塞が起り、しばしば死亡の原因となることが報告されている（文献 15）。本試験では尿閉が 4000 ppm 群で顕著に増加したことから、ジフェニルアミンの投与により、尿閉が増強されたと考えられ、雄の生存率の低下は尿閉によるものと推察された。ラットを使用した実験ではあるがジフェニルアミンは代謝されそのほとんどが尿中に排出されることが報告（文献 16）されている。また、マウスにジフェニルアミンを投与した結果、剥離した尿

細管上皮細胞が閉塞を引き起こし、腎臓に囊胞を形成することが報告されている(文献 17)。本試験では、腎臓の尿細管上皮に毒性影響はみられなかつたが、一般状態の観察では褐色尿が観察された。ジフェニルアミンの投与により尿成分に変化が生じた可能性が示唆されたが、どのような機序で尿閉塞を増強したかは不明であった。なお、雄の 4000 ppm 群では尿閉の二次的変化として、腎盂腎炎や尿毒症性肺炎が認められた。一方、雌では、血漿中の尿素窒素の高値が 4000 ppm 群に、腎臓重量の増加が 1000 ppm 以上の群に認められたが、これらに対応した病理組織学的变化は認められなかつた。尿閉は雌には観察されなかつた。その他、尿路系の変化として、雌雄の膀胱の内腔を被覆する移行上皮の表層細胞に硝子滴変性が 4000 ppm 群で認められた。

肺では、肺静脈壁に HE 染色で淡紫赤色に染まる物質の沈着した変性が雌の 4000 ppm 群と雄の 4000 ppm 群の少数例にみられた。この沈着物質について特殊染色を試みたが、特定はできなかつた。

その他、心臓重量の高値が雌雄にみられたが、病理組織学的検査ではこれに対応した変化はみられなかつた。

- 4 無毒性量 (NOAEL) / 最低毒性量 (LOAEL)

ジフェニルアミンの 2 年間の混餌経口投与により、雌雄とも血液 / 造血系、肝臓、泌尿器系及び肺への影響が認められた。その中で、最も低い用量まで認められた毒性変化は、血液 / 造血系への影響であり、雄ではヘマトクリット値の低値、総ビリルビンの高値、並びに、脾臓のヘモジデリン沈着の発生増加が最低投与濃度の 250 ppm 群まで、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低値、脾臓の重量増加、並びに脾臓のヘモジデリン沈着の発生増加が最低投与濃度の 250 ppm 群まで認められた。従って、本試験における無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも求められず、最低毒性量 (LOAEL) は 250 ppm (雄 : 29 mg/kg 体重/日、雌 : 36 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

- 5 投与濃度設定の評価

がん原性試験の最高用量は、米国国立がん研究所 (NCI)(文献 18)、OECD 化学品テストガイドライン (文献 5) 及び国際がん研究機関 (IARC)(文献 19) のがん原性試験のガイドラインでは、腫瘍以外の原因で動物の死亡率の上昇を引き起こさず、対照群と比較して 10%程度の体重増加の抑制を引き起こす用量、即ち、最大耐量 (Maximum Tolerated Dose, MTD) を選択することを定めている。

本試験の投与濃度は、予備試験である 13 週間試験 (文献 6) の結果をもとに設定した。しかし、雄の 4000 ppm 群では、体重増加の抑制 (投与終了時、対照群の 77%) が認められ、多くの動物が死亡し、顕著な生存率の低下がみられた。その死因の多くは非腫瘍性病変である尿閉であった。以上のことから、雄の投与濃度 4000 ppm は最大耐量 (MTD) を超

えていると考えられた。雄の 1000 ppm 群では、投与最終週における体重抑制は 10%以下であり、生存率も対照群とほぼ等しいことから、雄の投与濃度 1000 ppm は MTD の基準(文献 5,18,19)を満たしていると考えられた。

雌では、最高濃度の 4000 ppm 群は、血液系への影響(貧血及びそれに伴なう病理組織学的变化)が認められたが、生存率の低下は認められなかった。また、4000 ppm 群の体重增加抑制は、104 週目では 15%でありやや高かったが、対照群と比較して 10%以上の体重增加の抑制がみられたのは、投与開始後 30 週以降であり、MTD 基準を満たしていると判断した。

- 6 他文献との比較等

(1) 発がん性

マウスを用いた発がん性試験として以下の報告がある。

FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議 (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues : JMPR)(文献 20)では、Botta による ICR マウスを用い 18 ヶ月間の混餌試験(未発表)を引用している。雌雄の ICR マウスに 0、520、2600、5200 ppm の濃度でジフェニルアミン(純度:99%以上)を 18 ヶ月間混餌投与(摂取量:雄は 0、73、370、760 mg/kg 体重/日相当、雌は 0、90、460、940 mg/kg 体重/日相当)した試験で、いずれの用量でも、ジフェニルアミン投与による腫瘍の発生はみられなかったと報告している。

EU のリスクアセスメントレポート(2008)では、Holmberg ら 18 ヶ月間の強制経口投与試験の文献(文献 21)を引用している。NMRI マウスにジフェニルアミン 0、300 mg/kg 体重/週を 18 ヶ月間強制経口投与した(全 78 回)試験で、腫瘍の発生はみられなかったと報告している。

本試験では、雄に血管系腫瘍(血管腫や血管肉腫)が脾臓や全臓器に認められており、上記 2 つの報告内容とは異っていた。発がん性に関する結果の違いは、動物系統と投与期間(本試験で使用した動物は B6D2F1/Crlj マウスであること、本試験の投与期間は 24 ヶ月であること)、また、Holmberg らの試験とは投与形態が異なること等によるものと推察される。

(2) 代謝

マウスを用いたジフェニルアミンの代謝に関する報告はない。

(3) 変異原性

ネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA97、TA98 を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化の有無にかかわらず陰性との報告がある(文献 22)。

日本バイオアッセイ研究センターで実施したチャイニーズハムスター肺線維芽細胞

(CHL/IU 細胞) を用いた染色体異常試験では、代謝活性化の有無にかかわらず陽性 (D_{20} 値 : 0.042 mg/mL) との報告がある (文献 23)

結論

B6D2F1/Crlj マウスを用いて、ジフェニルアミンの 2 年間（104 週間）にわたる混餌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。

雄では脾臓、並びに脾臓及び肝臓等を含む全臓器に血管系腫瘍の発生増加が認められ、雄マウスに対するがん原性が示された。雌マウスでは腫瘍の発生増加は認められず、がん原性は示されなかった。

文献

1. 化学工業日報社. 2011. 15911 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 715.
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : John Wiley and Sons.
3. 和光純薬工業(株). 2006. ジフェニルアミン, 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. 2008. ジフェニルアミン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. 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. Ernst H, Carlton WW, Courtney C, Rinke M, Greaves P, Isaacs KR, et al. 2001. Soft tissue and skeletal muscle. In: International Classification of Rodent Tumors, The Mouse (Mohr U, ed). Berlin: Springer-Verlag, 361-388.
10. Heider K, Eustis SL. 1994. Tumours of the soft tissues. In: Pathology of Tumours in Laboratory Animals, , Vol -Tumours of the Mouse, 2nd ed (Turusov V, Mohr U, eds). IARC Scientific Publications, No 111. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 611-649.

11. 石津澄子. 1994. 芳香族ニトロ・アミノ化合物による中毒. 現代労働衛生ハンドブック. (増補改定第2版・本編). 神奈川: 労働科学研究所出版部, 855-860.
12. 金井泉. 1993. 乳酸脱水素酵素(LDH)およびLDHアイソエンザイム. 臨床検査法提要. (改定第30版) 東京: 金原出版, 662-670.
13. Suber RL. 1989. Lactate dehydrogenase (LDH). In: Principles and methods of toxicology. Chapter 16 Clinical pathology for toxicologists. (Hayes AW. ed.). New York: Raven Press, 511-512.
14. Plaa GL, Hewit WR. 1989. Other enzymes. In: Principles and methods of toxicology. Chapter 20 Detection and evaluation of chemically induced liver injury. (Hayes AW. ed.). New York: Raven Press, 605-606.
15. Gaillard ET. 1999. Ureter, urinary bladder, and urethra. In: Pathology of the Mouse. (Maronpot RR, Boorman GA, Gaul BW eds.). Vienna, IL: Cache River Press: 235-258.
16. FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues. 1998. Diphenylamine (addendum). JMPR Evaluations 1998 Part Toxicological, Vol 949. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v098pr07.htm> [accessed 2 August 2007].
17. 伊東信行編著. 1994. 標的器官の毒性病理(2), 泌尿器系 C. 腎臓. 最新毒性病理学. 東京: 中山書店, 193-209.
18. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U. 1976. Guidelines for carcinogen bioassay in small rodents. Bethesda, MD: National Cancer Institute. NCI Carcinogenesis Technical Report Series No.1: 13-15.
19. Bannasch P, Griesemer RA, Anders F, Becker R, Cabral JR, Della Porta G et al. 1986. Long-term assays for carcinogenicity in animals. In: Long-term and Short-term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. (Montesano R, Bartsch H, Vainio H, Wilbourn J, Yamasaki H. eds.). Lyon: IARC, IARC Scientific Publications No. 83: 34-36.

20. Botta J.A., Jr. (1994) 18 Month oncogenicity evaluation of diphenylamine in the mouse. Unpublished report No. 426H-002-646-91 from T.P.S., Inc., Mt Vernon, Indiana, USA. Submitted to WHO A. (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residue, 1998 から引用)
21. Holmberg B, Kronebi T, Ackevi T, Ekner A. (1983) Carcinogenicity testing of diphenylamine and gamma-butyrolactone by oral administration to male mice. Arbete Och Health, 34, 1-35. (in Swedish) (European union risk assessment report 2008 から引用)
22. NTP データベース
http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm?fuseaction=salmonella.salmonellaData&endpointlist=SA&study%5Fno=127784&cas%5Fno=122%2D39%2D4&activetab=detail [accessed 2 August 2011].
23. 日本化学物質安全・情報センター編. 2005. 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 3 版 . 249-250.

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

尿検査においてケトン体は、被験物質の代謝物と考えられる尿の着色のため、尿試験紙による判定ができなかった動物がみられた。判定ができなかった動物数は、1000 ppm 群で雌雄各 2 匹、4000 ppm 群で雄 14 匹、雌 26 匹であった。このうち、雄 4000 ppm 群では、ケトン体の検査可能動物数が 2 匹と少なかったことから、ケトン体の統計学的な評価はできなかった。