

二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験報告書

試験番号：0904

CAS No. 10102-44-0

2019年8月2日

独立行政法人 労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター

目次

標題	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
拡散防止措置及び動物福祉	i
厚生労働省担当課	ii
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	A~Q	2
FIGURES	1~6	
PHOTOGRAPHS	1~3	
APPENDICES	1-1~3	

標題

二酸化窒素の p53 KO マウスを用いた吸入による中期がん原性試験

試験目的

二酸化窒素を遺伝子改変マウス (p53KO マウス) に 26 週間全身暴露 (経気道投与) し、そのがん原性を検索した。

試験法

本試験は「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」(平成 28 年度第 3 回発がん性評価ワーキンググループ: 2017 年 3 月 1 日厚生労働省) に準拠して実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づき試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP)」(昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正平成 28 年 4 月 18 日厚生労働省告示第 208 号) に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択) を参考にして実施した。

拡散防止措置及び動物福祉

本試験は、「日本バイオアッセイ研究センターにおける遺伝子組換え生物使用実験安全管理規程」(平成 26 年 9 月 3 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日) 及び「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、最終改正平成 27 年 2 月 20 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」(平成 24 年 4 月 25 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日) を遵守して行った。

また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの遺伝子組換え生物使用実験安全委員会 (承認番号 2017-09) 及び日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査された (承認番号 0202)。

厚生労働省担当課

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

独立行政法人労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター
所長 菅野 純
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日	2018年 2月 6日
動物導入日	2018年 2月 14日
群分け日	2018年 2月 26日
被験物質投与開始日	2018年 2月 27日
被験物質投与終了日	2018年 8月 27日
定期解剖日	2018年 8月 28,29,30,31日
試験終了日	2019年 8月 2日

二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験報告書

試験番号：0904

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 化学式及び分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質等	3
I-2-1 使用被験物質	3
I-2-2 被験物質の製造量等	3
I-2-3 被験物質の主な用途	3
I-2-4 許容濃度等	4
I-3 被験物質の特性	4
I-3-1 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 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整	6
II-1-7 被験物質濃度の測定	6
II-2 動物管理	6
II-2-1 群の構成及び各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け方法	7
II-2-3 動物の個体識別	7

II-2-4	動物飼育室、ならびに他試験及び異種動物との区別	7
II-2-5	飼育条件	7
(1)	飼育環境	7
(2)	飼料	8
(3)	飲水	8
II-3	観察・検査項目及び方法	8
II-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	8
II-3-2	体重測定	8
II-3-3	摂餌量測定	9
II-3-4	尿検査	9
II-3-5	血液学的検査	9
II-3-6	血液生化学的検査	9
II-3-7	病理学的検査	9
(1)	肉眼的観察	9
(2)	臓器重量	9
(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	10
III	試験成績	12
III-1	生死状況	12
III-2	一般状態	12
III-3	体重	12
III-4	摂餌量	13
III-5	尿検査	13
III-6	血液学的検査	13
III-7	血液生化学的検査	13
III-8	病理学的検査	14
III-8-1	肉眼的観察	14
III-8-2	臓器重量	14
III-8-3	病理組織学的検査	14
III-8-4	死因	16

IV 考察及びまとめ	17
IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量	17
IV-2 腫瘍性病変及び腫瘍関連病変	17
IV-3 その他の影響	18
V 結論	19
VI 文献	20
VII 予見することのできなかつ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つたこと	22

要約

二酸化窒素のがん原性を検索するために、二酸化窒素を遺伝子改変マウス (p53KO マウス) に 26 週間全身暴露 (経気道投与) して、その生態影響を検索した。

本試験は、投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群 (各群雌雄とも 25 匹) を設け、二酸化窒素の投与 (暴露) 濃度は、0 (対照群)、10、20 及び 40 ppm とした。投与期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日間の全身暴露による経気道投与で 26 週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、解剖時の肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

26 週間の試験の結果、生存率、一般状態に、雌雄ともには暴露の影響はみられなかった。体重は、雄の 40 ppm 群で投与期間を通して体重増加の抑制がみられた。

臓器重量測定では、雌雄の 20 ppm 以上の群で肺重量が増加した。

腫瘍の発生は、雄で 40 ppm 群の 2 匹に細気管支-肺胞上皮腺腫が発生し、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向を示した。雌では、投与に起因する腫瘍性病変の増加は認められなかった。

非腫瘍性病変は、雌雄の 20 ppm 以上の群で暴露の影響がみられた。鼻腔では、嗅上皮のエオジン好性変化及び呼吸上皮のエオジン好性変化が濃度依存的な増加を示し、移行上皮の炎症、嗅上皮の萎縮及び嗅部の滲出液の増加などが認められた。鼻咽頭では、呼吸上皮のエオジン好性変化の増加が認められた。肺では、巣状の炎症性細胞浸潤の増加が認められた。

以上の結果、遺伝子改変マウス (p53KO マウス) を用いて、二酸化窒素の 26 週間の吸入による中期がん原性試験を行った結果、1) 雄 p53KO マウスに対するがん原性を示す不確実な証拠が得られた (equivocal evidence of carcinogenic activity)、2) 雌 p53KO マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と結論された。

二酸化窒素の中期がん原性試験における主な腫瘍発生 (p53KO マウス 雄)

投与濃度 (ppm)		0	10	20	40	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺 胃 (前胃)	細気管支-肺胞上皮腺腫	0	0	0	2	↑	↑
	扁平上皮乳頭腫	0	0	0	1		

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加 (Peto, Cochran-Armitage 検定)

二酸化窒素の中期がん原性試験における主な腫瘍発生 (p53KO マウス 雌)

投与濃度 (ppm)		0	10	20	40	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	0	0	1		
皮下組織	血管腫	0	0	1	0		
肝臓	組織球性肉腫 [#]	0	1	0	0		
脾臓	血管腫	0	0	1	0		

[#] : 悪性腫瘍

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : 二酸化窒素 (Nitrogen dioxide)
別 名 : 過酸化窒素 (Nitrogen peroxide)
CAS No. : 10102-44-0
被験物質番号 : 1288

I-1-2 化学式及び分子量 (文献 1)

化 学 式 : NO_2
分 子 量 : 46.0

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 刺激臭のある帯赤褐色気体または茶色もしくは黄色の液体
相対蒸気密度 : 1.58 (空気=1)
沸 点 : 21.2 °C
蒸 気 圧 : 96 kPa (20°C)
溶 解 性 : 水と反応して硝酸と一酸化窒素を生じる
保 管 条 件 : 室温、暗所

I-2 被験物質等

I-2-1 使用被験物質

製 造 元 : 住友精化株式会社
純 度 : 99.5% 以上 (住友精化株式会社 検査成績書データ)
ロット番号 : JTB 1748040

I-2-2 被験物質の製造量等

経済産業省一般化学物質等の製造・輸入数量 (平成 29 年度実績) においては酸化窒素として合計で 1,000~2,000 トン未満とされている (文献 2)。

I-2-3 被験物質の主な用途

合成ゴム原料 (文献 3)

I-2-4 許容濃度等

管理濃度：未設定

日本産業衛生学会：未設定

米国産業衛生専門家会議 (ACGIH)：0.2ppm (TLV-TWA)、A4 (ヒトに対して発がん性物質として分類できない物質) (文献 4)

国際がん研究機関 (IARC)：未設定

I-3 被験物質の特性

I-3-1 同一性

被験物質の同一性は、被験物質のマスペクトルを質量分析計 (アジレントテクノロジー株 5973N) にて測定し、この測定値を文献値と比較することにより確認した (文献 5)。

その結果、被験物質のマスペクトルは文献値と同じ分子イオンピーク及びフラグメントピークを示し、被験物質は二酸化窒素であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示す。

I-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、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 ((株)島津製作所 IRAffinity-1) 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ることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示す。

I-4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株) (筑波 SAS センター) の B6.129S2-Trp53 tm1Tyj/J (p53 ヘテロ欠損マウス、p53 KO マウス) マウス (SPF) の雌雄を使用した。

雄 134 匹、雌 108 匹を 6 週齢で導入し、検疫を 7 日間、馴化を 6 日間実施した後、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 100 匹 (群分け時体重範囲、雄：22.4~27.0g、雌：16.5~23.6 g) を試験に用いた。

なお、中期がん原性試験に p53 ヘテロ欠損マウスを選択した理由は、中期発がん性検索のための有用性が検証されていることによる (文献 6)。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

II-1-2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

II-1-3 投与期間

全動物において、投与期間は1日6時間、1週5日の暴露（原則として土、日曜日は暴露しない）で、2018年2月27日～2018年8月27日までの26週間とした。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、10、20及び40 ppm（体積比 v/v）の3段階に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は、「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」（文献7）に準拠して26週間とした。

投与時間はOECD化学品テストガイドライン451（文献8）を参考に1日6時間とした。

投与濃度は、雌雄のC57BL/6Jマウス（8週齢）を用いた4週間の予備試験（試験番号0893）結果をもとに決定した。0（対照群）、5、10、20及び40 ppmの濃度で暴露した結果、動物の死亡は認められなかった。一般状態、体重及び摂餌量は40 ppm群で影響がみられた。一般状態の観察では、暴露開始日と2日目の暴露後の観察で雌雄全匹に自発運動量の減少と不整呼吸がみられた。体重は1週目と4週目に雄で低値がみられ、摂餌量は雄では1週目と4週目に、雌では1週目に低値がみられた。臓器重量では、肺重量の高値が雌の20 ppm以上の群と雄の40 ppm群にみられた。病理組織学的検査では、鼻腔と肺に影響がみられた。鼻腔では、滲出液の貯留が40 ppmの雌雄にみられ、また、呼吸上皮のエオジン好性変化と、鼻腺の呼吸上皮化生が全ての投与群の雌雄にみられた。肺では、炎症性細胞浸潤が40 ppm群の雌雄にみられた。なお、病理組織学的検査でみられた所見の程度はすべてが軽度であった。

以上のように、二酸化窒素の4週間吸入暴露の結果、雌雄のマウスの一般状態、体重（雄のみ）、摂餌量、肺重量及び病理組織学的検査結果に影響が認められた。しかし、毒性の程度はいずれも重篤なものではなく、40 ppmの濃度で26週間に亘って動物に暴露しても、毒性兆候は示されるものの死亡を増加させることはないと考えられた。したがって、本試験の投与濃度は4週間の予備試験と同じく、40 ppmを最高濃度とし、以下20 ppm及び10 ppmを設定した。

II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の入った液化ボンベより得た被験物質蒸気と清浄空気を被験物質供給装置(柴田科学(株)特注)内で希釈混合し、必要な量の混合ガスを流量計及び流量調節バルブを用いて各吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は二酸化窒素測定装置((株)島津製作所 NOx-O2 測定装置 NOA-7100)で監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように被験物質混合ガスの吸入チャンバーへの供給量を調節した。

II-1-7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付二酸化窒素測定装置により、暴露開始前から暴露終了後まで20分毎に測定した。

濃度測定結果をTABLE Aに示す。各投与群の被験物質濃度は、その平均値と設定濃度の差（（平均値 - 設定濃度）／設定濃度×100）が3%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100）が2%以内であり、チャンバー内濃度は良好に管理された。

II-2 動物管理

II-2-1 群の構成及び各群の使用動物数

投与群3群及び対照群1群の計4群を設け、1群当たり雌雄各25匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群名称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
対照群	25匹 (1001~1025)	25匹 (2001~2025)
10 ppm群	25匹 (1101~1125)	25匹 (2101~2125)
20 ppm群	25匹 (1201~1225)	25匹 (2201~2225)
40 ppm群	25匹 (1301~1325)	25匹 (2301~2325)

II-2-2 群分け方法

群分けは、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で、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 9）。

群分けにより除外された動物は、投与開始が確認されるまで飼育し、試験に使用する必要のなくなったことを確認後、本試験系より外し、他の実験に使用した。

II-2-3 動物の個体識別

動物は、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をすることで、それ以降は、群分け時に耳パンチをすることで個体識別した。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

II-2-4 動物飼育室、ならびに他試験及び異種動物との区別

動物はバリア区域内の独立した室（検疫 517、518 室、馴化・投与 516 室）に収容し、室の扉に試験番号、試験動物、飼育期間及び遺伝子改変動物飼育中を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

II-2-5 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（517、518 室）、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（516 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を < > 内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 に示す。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、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： 検 疫 室； $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 517 室： $23.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ >

$23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 518 室： $22.6 \pm 0.0^{\circ}\text{C}$ >

吸 入 試 験 室； $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 516 室： $22.1 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ >

吸入チャンバー内； $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$

湿度： 検 疫 室； $55 \pm 15\%$ < 517 室： $52 \pm 1\%$ >

$55 \pm 15\%$ < 518 室： $52 \pm 1\%$ >

吸入チャンバー内； $30 \sim 70\%$ （ただし、被験物質の湿度センサーへの付着により、正常な測定ができないため、投与群の湿度は暴露中及び暴露終了後 1 時間まで測定しなかった。）

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： 検 疫 室；15～17 回／時

吸入試験室；7～9回／時
 吸入チャンバー内；12±1回／時
 圧力：吸入チャンバー内；0～-15×10Pa
 ケージへの動物の収容方法：個別飼育
 ケージの材質・形状・寸法等：

- 検疫期間；ステンレス製2連網ケージ（112(W)×212(D)×120(H) mm/匹）
- 馴化期間；ステンレス製6連網ケージ（95(W)×116(D)×120(H) mm/匹）
- 投与期間；ステンレス製5連網ケージ（100(W)×116(D)×120(H) mm/匹）

 飼育機材（ラック、ケージ、餌箱、給水ノズル、作業台車等）の滅菌：オートクレーブ
 滅菌（約120℃、15分以上）

(2) 飼料

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造のCRF-1固型（30kGy- γ 線照射滅菌飼料）を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、暴露中及び定期解剖前日の夕方からは絶食させた。

試験に使用する飼料中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株)から分析データ入手し、確認した。

(3) 飲水

飲水は、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、自動給水ノズルから自由摂取させた。ただし、暴露中は絶水させた。

飲水の水質は、動物試験施設として定期的（年2回）に実施している水道水の検査において、水道法に定められている水質基準に適合していることを確認した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

全動物について、週1回、吸入暴露前の一般状態を詳細に観察した。その他の日は、暴露日は吸入暴露前後に、非暴露日は1日1回、生死及び一般状態を観察した。瀕死状態の動物は、速やかに安楽死させた。

II-3-2 体重測定

全動物について、投与開始後は週1回投与前に体重測定を行った。また、定期解剖日には絶食後の体重（搬出時体重）を測定した。

死亡動物は、飼育室からの搬出時に体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

全動物について、投与開始後週 1 回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 尿検査

投与期間終期まで生存している採尿可能な動物から、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・ダイアグノスティクス社）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

II-3-5 血液学的検査

定期解剖時に生存している採血可能な動物について、イソフルラン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 に示す。

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-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時に生存している採血可能な動物について、イソフルラン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 に示す。

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-3-7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

全動物について肉眼的に病変の観察を行った。なお、定期解剖動物はイソフルラン麻酔下で採血後、腹大動脈を切断、放血することで安楽死させた。定期解剖は解剖を行う日ごとに、雌雄各群ほぼ同数となるよう動物番号の若い順より割り当てて実施した。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存している動物について、下記に示す臓器の湿重量（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：胸腺、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、下記の器官、組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査した。

皮膚、鼻腔（3箇所を横断）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺及び気管支、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、鼠径等）、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、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、陰、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、胸骨）、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。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として、小数点以下第 2 位まで測定し、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。

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。

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。

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 10）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。

各検定は 5%の有意水準で、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。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

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

—雄—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 26 週における生存動物数（生存率）は、対照群：25 匹（100%）、10 ppm 群：25 匹（100%）、20 ppm 群：25 匹（100%）、40 ppm 群：24 匹（96%）であった。

—雌—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 26 週における生存動物数（生存率）は、対照群：24 匹（96%）、10 ppm 群：24 匹（96%）、20 ppm 群：25 匹（100%）、40 ppm 群：25 匹（100%）であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示した。

—雌雄—

被験物質投与の影響と思われる所見はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

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

—雄—

40 ppm 群で投与期間を通して、体重増加の抑制がみられた。

最終計測日（26 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 10 ppm 群：99%、20 ppm 群：96%、40 ppm 群：92%であった。

—雌—

投与群と対照群に差はみられなかった。

最終計測日（26 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 10 ppm 群：99%、20 ppm 群：101%、40 ppm 群：100%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

—雄—

40 ppm 群では投与 1 週目に低値、2 週目には高値がみられたが、各群とも投与期間を通しての平均摂餌量に顕著な差はみられなかった。

投与期間を通しての 1 匹当たりの平均摂餌量は、対照群：4.1 g、10 ppm 群：4.1 g、20 ppm 群：4.1 g、40 ppm 群：4.0 g であった。

—雌—

40 ppm 群では投与 1 週目に低値、2 週目には高値がみられたが、各群とも投与期間を通しての平均摂餌量に顕著な差はみられなかった。

投与期間を通しての 1 匹当たりの平均摂餌量は、対照群：3.8 g、10 ppm 群：3.7 g、20 ppm 群：3.8 g、40 ppm 群：3.7 g であった。

Ⅲ-5 尿検査

尿検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

—雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

—雌—

蛋白の陽性度の増加が 10 ppm 群と 40 ppm 群でみられた。しかし、病理組織学的検査では、それらの群に関連病変はみられなかった。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

—雄—

トリグリセライドの低値が 20 ppm 以上の群でみられた。

—雌—

グルコースの高値が 40 ppm 群でみられた。

Ⅲ-8 病理学的検査

Ⅲ-8-1 肉眼的観察

解剖時の肉眼的観察結果を TABLE I 1, 2 に示す。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

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 TABLE J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示す。

—雄—

20 ppm 以上の群で、肺の実重量と体重比の高値が認められた。

その他、40 ppm 群で肝臓の実重量の低値と脳の体重比の高値が認められたが、解剖時体重の低値による影響と判断した。

—雌—

20 ppm 以上の群で、肺の実重量と体重比の高値が認められた。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

腫瘍性病変は、腫瘍の種類別の発生数を TABLE L 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE M に、坦腫瘍動物数を TABLE N 1, 2 示す。また、転移性病変は TABLE O に、非腫瘍性病変は TABLE P 1, 2 に示す。さらに、病理組織所見の代表例を PHOTOGRAPH 1~3 に示す。

1) 腫瘍性病変

—雄—

<肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫の発生は、対照群 0 匹 (0%)、10 ppm 群 0 匹 (0%)、20 ppm 群 0 匹 (0%)、40 ppm 群 2 匹 (8%) に認められ、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。

—雌—

全ての臓器において、被験物質による腫瘍の発生増加は認められなかった。

2) 非腫瘍性病変

—雄—

<鼻腔>

嗅上皮では、エオジン好性変化及び萎縮の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。

移行上皮では、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

嗅部では、滲出液の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

<鼻咽頭>

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

<肺>

巣状の炎症性細胞浸潤の発生匹数の増加が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度から中等度、40 ppm 群が軽度であった。

<肝臓>

脂肪変性の発生匹数の減少が 40 ppm 群で認められた。雄では体重増加の抑制及び血液生化学的検査でトリグリセライドの低値も認められている事から、暴露との関連が考えられたが、これらは減少を示す変化であることから、毒性所見とは判断しなかった。

—雌—

<鼻腔>

嗅上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。また、萎縮の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。

移行上皮では、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

嗅部では滲出液の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

< 鼻咽頭 >

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

< 肺 >

巣状の炎症性細胞浸潤の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

Ⅲ-8-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE Q 1, 2 に示す。

—雌雄—

投与群に特異的な病変あるいは腫瘍による死亡の増加は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

二酸化窒素のがん原性を検索するために、二酸化窒素を遺伝子改変マウス (p53KO マウス) に 26 週間全身暴露 (経気道投与) して、その生態影響を検索した。

本試験は、投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群 (各群雌雄とも 25 匹) を設け、二酸化窒素の投与 (暴露) 濃度は、0 (対照群)、10, 20 及び 40 ppm とした。投与期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日間の全身暴露による経気道投与で 26 週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、解剖時の肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

26 週間の試験の結果、生存率、一般状態に、雌雄ともに暴露の影響はみられなかった。体重は、雄の 40 ppm 群で暴露期間を通して増加抑制がみられた。

摂餌量は、雌雄とも暴露 1 週目に摂餌量の低値がみられ、2 週目には高値がみられたが、各群とも投与期間を通しての平均摂餌量に顕著な差はみられなかった。

IV-2 腫瘍性病変及び腫瘍関連病変

雄では、細気管支-肺胞上皮腺腫の発生が、対照群、10ppm 群及び 20 ppm 群で 0 匹 (0%) に対し、40 ppm 群で 2 匹 (8%) にみられ、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。

雄の細気管支 - 肺胞上皮腺腫の発生は、文献によるヒストリカルコントロールデータ (文献 11) では発生が認められず (0/433 匹、0%)、本試験の 40 ppm 群の発生率 (2/25 匹、8%) はこの値を超えていた。しかしながら、対照群との 2 群間検定 (Fisher 検定) では有意な増加は示されず、細気管支 - 肺胞上皮過形成等の腫瘍に関連する非腫瘍性病変の発生も認められていないことから、がん原性を示唆する証拠 (some evidence of carcinogenic activity) と判断するには不十分と考えられた。従って、細気管支 - 肺胞上皮腺腫の発生は、がん原性を示す不確実な証拠 (equivocal evidence of carcinogenic activity) と判断した。

雌では、全臓器において、暴露に起因して発生増加を示す腫瘍性病変は認められなかった。従って、雌ではがん原性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と判断した。

なお、本試験の被験物質のがん原性の評価には、National Toxicology Program の Definition of Carcinogenicity Results (文献 12) を参考にした。また、当センターで p53KO マウスを用いた 26 週間試験の初報告のため、腫瘍の発生率の評価には他施設のヒストリカルコントロー

ルデータ（文献 11）を参考にした。

IV-3 その他の影響

雌雄の鼻腔では、嗅上皮のエオジン好性変化及び呼吸上皮のエオジン好性変化が濃度依存的な増加を示し、移行上皮の炎症、嗅上皮の萎縮及び嗅部の滲出液等の増加が暴露群に認められた。鼻腔に対する影響は、雌雄共に 20 ppm 以上の群に認められた。

雌雄の鼻咽頭では、呼吸上皮のエオジン好性変化の増加が認められた。鼻咽頭に対する影響は、雌雄共に 40 ppm 群に認められた。

雌雄の肺では、巣状の炎症性細胞浸潤の増加が認められ、肺重量も増加した。肺に対する影響は、雌雄共に 20 ppm 以上の群に認められた。

V 結論

遺伝子改変マウス (p53KO マウス) を用いて、二酸化窒素の 26 週間の吸入による中期がん原性試験を行った結果、二酸化窒素の発がん性について、

1. 雄 p53KO マウスに対するがん原性を示す不確実な証拠が得られた (equivocal evidence of carcinogenic activity) と結論された。
2. 雌 p53KO マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と結論された。

VI 文献

- 1) International Programme on Chemical Safety. 2013. ICSC: 0930. NITROGEN DIOXIDE. International Chemical Safety Cards . Available: <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0930.htm> [accessed 2019/07/10]
- 2) 経済産業省、一般化学物質等の製造・輸入数量（平成 29 年度実績）、Available: https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/volume/general/volume_general_h29.pdf [accessed 2019/7/10]
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構、NITE 化学物質総合情報提供システム (NITE-CHRIP). Available : https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/systemTop [accessed 2019/7/10]
- 4) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2012. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Nitrogen dioxide.
- 5) McLafferty F.W, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
- 6) Robinson DE, MacDonald JS. 2001. Background and framework for ILSI's collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment. Toxicol Pathol 29 (Suppl.), 13-19.
- 7) 「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」 2017. 平成 28 年度第 3 回発がん性評価グループ（平成 29 年 3 月 1 日）資料.
- 8) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2009. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies".Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 9) 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適正層別方式の確立. 薬理と治療 14: 7285-7302.

- 10) 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
- 11) Storer RD, French JE, Haseman J, Hajian G, LeGrand EK, Long GG, Mixson LA, Ochoa R, Sagartz JE, Soper KA. 2001. P53^{+/-} hemizygous knockout mouse: overview of available data. Toxicol Pathol.;29 Suppl:30-50. Review.
- 12) National Toxicology Program (NTP). Definition of Carcinogenicity Results, Available: <https://ntp.niehs.nih.gov/go/baresults>, [accessed 2019/7/16].

VII 予見することのできなかつ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つたこと

予見することのできなかつ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つたことはなかつた。