

2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いた経口投与  
による 2 週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号： 0482

CAS No. 95-85-2

2004年5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

2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いた経口投与による2週間毒性試験（混餌試験）

試験目的

2-アミノ-4-クロロフェノールの経口投与によるがん原性試験の投与濃度決定試験（13週間試験）の予備試験として、2-アミノ-4-クロロフェノールをラットに2週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

試験委託者

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 山本 静護  
神奈川県秦野市平沢2445番地

2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いた経口投与  
による 2 週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号： 0482

本文

## 本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	2
I-1 被験物質の性状等	2
I-1-1 名称等	2
I-1-2 構造式、分子式、分子量	2
I-1-3 物理化学的性状等	2
I-2 被験物質の使用ロット等	2
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	3
I-3-1 特性・同一性	3
I-3-2 安定性	3
I-4 試験動物	3
II 試験方法	4
II-1 投与	4
II-1-1 投与経路	4
II-1-2 被験物質の投与方法	4
II-1-3 投与期間	4
II-1-4 投与濃度	4
II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	4
II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法	5
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	5
II-1-8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性	5
II-1-9 被験物質の摂取量	6
II-2 動物管理	6
II-2-1 各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け及び個体識別方法	6
II-2-3 飼育条件	7

II-3	観察・検査項目及び方法	7
II-3-1	動物の一般状態の観察	7
II-3-2	体重測定	8
II-3-3	摂餌量測定	8
II-3-4	血液学的検査	8
II-3-5	血液生化学的検査	8
II-3-6	尿検査	9
II-3-7	病理学的検査	9
II-4	数値処理と統計処理	9
II-4-1	数値の取り扱いと表示	9
II-4-2	母数の取り扱い	10
II-4-3	統計処理	10
III	試験成績	11
III-1	生死状況	11
III-2	一般状態	11
III-3	体重	11
III-4	摂餌量	12
III-5	被験物質摂取量	12
III-6	血液学的検査	13
III-7	血液生化学的検査	13
III-8	尿検査	13
III-9	病理学的検査	14
III-9-1	剖検	14
III-9-2	臓器重量	14
III-9-3	病理組織学的検査	15
IV	考察及びまとめ	16
V	文献	20

## 要約

2-アミノ-4-クロロフェノールの F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いた経口投与による2年間(104週間)のがん原性試験のための予備試験である13週間試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するために2週間試験を実施した。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自由摂取させることにより行った。1群当たりの動物数は雌雄各5匹とし、被験物質投与群5群と対照群1群の計6群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも50000、20000、8000、3200及び1280 ppm(公比2.5)とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重と摂餌量の測定並びに尿検査を実施し、投与終了後動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、50000 ppm群では雄の1匹が死亡した。雌雄ともに体重値と摂餌量の低値が50000 ppm群(対照群比、体重：雄59%、雌：69%、摂餌量：雄55~62%、雌：72~80%)と20000 ppm(対照群比、体重：雄84%、雌：90%、摂餌量：雄83~86%、雌：86~89%)でみられ、特に50000 ppm群では顕著であった。血液学的検査では、雌雄共に20000 ppmと50000 ppm群でメトヘモグロビン濃度の上昇がみられ、赤血球数とヘモグロビン濃度は8000 ppm以上の雌雄の群で減少し、貧血が認められた。病理組織学検査では、全身性の消耗性変化として胸腺の萎縮が雌雄の50000 ppm群でみられ、雌雄の8000 ppm以上の群で、メトヘモグロビンの増加に伴う影響と考えられる脾臓の赤血球充満、貧血を補うための機能亢進として髄外造血がみられた。雌雄とも前胃上皮の過形成が3200 ppm群以上の群で、潰瘍が20000 ppmと50000 ppm群でみられた。なお、メトヘモグロビン濃度の上昇、赤血球数とヘモグロビン濃度の減少に用量依存性がみられ、胸腺の萎縮、脾臓の赤血球充満と髄外造血、前胃上皮の過形成と潰瘍の発生率と程度にも用量依存性が認められた。

本試験条件下における2-アミノ-4-クロロフェノールの雌雄のラットに対するNOAELは前胃上皮の過形成をエンドポイントとして1280 ppm(雄：0.099~0.110 g/kg body weight per day、雌：0.105~0.110 g/kg body weight per day)であると考えた。

以上の結果より、2-アミノ-4-クロロフェノールの13週間試験の最高投与濃度は、大幅な体重増加の抑制及び消耗性変化が認められず、動物の生存に影響を与えないと考えられる20000 ppmとし、以下、8000、3200、1280及び512 ppm(公比2.5)の合計5段階の濃度を設定した。

## I 試験材料

### I-1 被験物質の性状等

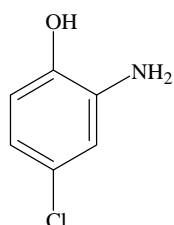
#### I-1-1 名称等

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、分子式、分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 式 :  $C_6H_6ClNO$

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 :  $137^{\circ}C$

溶 解 性 : アルコールに易溶、水に難溶 (溶解度 0.3g/100g,  $25^{\circ}C$ )

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 : FHM01

製 造 元 : 東京化成工業株式会社

グ レ ー ド : 東京化成 1 級

純 度 : 100.4% (非水滴定法) (東京化成工業 (株) 試験成績書データ)

### 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 2-アミノ-4-クロロフェノールについて、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 (Shimadzu 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 2) と同じ分子イオンピークを示した。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を示し、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。

また、試験に使用した 2-アミノ-4-クロロフェノール中には、不純物として 2-アミノフェノールが確認された。2-アミノ-4-クロロフェノール中の不純物含有量は 0.82%であった。

それらの結果については、APPENDIX A 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 2-アミノ-4-クロロフェノールについて、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 2-アミノ-4-クロロフェノールは安定であった。

それらの結果については、APPENDIX A 2 に示した。

### I-4 試験動物

動物は、2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー (株) (厚木飼育センター：神奈川県厚木市古沢 795 番地) より購入した F344/DuCrj (Fischer) ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 37 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 30 匹 (投与開始時体重範囲、雄：119~134g、雌：94~103g) を選別し、試験に供した。

なお、がん原性試験で使用する動物は、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の等の理由から F344/DuCrj (Fischer) ラットを使用することが決定している。



## 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

2003年5月9日から2003年5月23日までの2週間、定期解剖直前まで連続投与した。なお、被験物質混合飼料の交換頻度は週に1回とした。

#### II-1-4 投与濃度

雌雄とも最高投与濃度を50000 ppmに設定し、以下、20000、8000、3200及び1280 ppm（公比2.5）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、がん原性試験の予備試験である13週間試験に使用する投与濃度を決定するために2週間（14日間）とした。

各群の投与濃度は、当センターで実施した予備試験の結果を参考に決定した。6週齢のF344ラットの雌雄（3用量と対照群、各群2匹）に7200、2400及び800 ppmの2-アミノ-4-クロロフェノール混合飼料を14日間に自由摂取させ、体重（群構成時、3、7、10、14日目）と摂餌量（3、7、10、14日目）を測定した。予備試験の最高投与濃度は、6週齢のF344ラットの標準的な体重及び摂餌量から、2-アミノ-4-クロロフェノールの1日の摂取量が計算上でLD<sub>50</sub>値（文献4）になる濃度とした。

その結果、体重と摂餌量に対照群と投与群の間に差は全く認められなかった。従って、2-アミノ-4-クロロフェノールの毒性を2週間の投与期間で十分に把握するためには、7200

ppm 以上の濃度設定が必要と思われたが、過去に 2-アミノ-4-クロロフェノールの混餌投与による毒性試験の報告は無く、混餌投与による動物を用いた毒性情報が全く得られないため、がん原性試験の各種ガイドライン(文献 5、6)で投与濃度の上限に規定されている 50000 ppm を最高用量とし、以下、20000、8000、3200 及び 1280 ppm (公比 2.5) の 5 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CS-20 及び SS-251)で攪拌混合し、50000 ppm と 20000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 20000 ppm 被験物質混合飼料と粉末飼料を粉末飼料混合機(スパイラルミキサーCS-20 及び HP20M)で攪拌混合することによって 8000、3200 及び 1280 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日前日(2003年5月8日)に1回行った。調製した被験物質混合飼料は、半量を投与1週目用とし、ラット用餌箱に充填して翌日の投与開始まで室温で保管した。残りの半量は投与2週目用とし、ビニール袋詰にして密封し、翌週まで冷蔵保管した。なお、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、各投与濃度毎に調製容器内から被験物質混合飼料を7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(Shimadzu LC-10)を用いて測定し、確認した。

その結果、各群の平均調製濃度は設定濃度に対し、96.9~99.0%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 A 3、均一性については APPENDIX A 4 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、最低投与濃度の 1280 ppm と最高投与濃度の 50000 ppm の被験物質混合飼料について、ラット用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管(9日間)したものと、ビニール袋詰にして密封し、冷蔵保管(9日間)したものについて、クロマトグラムを高速液体クロマトグラフ(Shimadzu LC-10)を用いて測定し、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、調製時の濃度を 100%とした場合、調製後 9 日目には室温保管(動物飼育室)

では 50000 ppm : 94.0%、1280 ppm : 84.6%、冷蔵保管では 50000 ppm : 98.1%、1280 ppm : 95.1%であった。1280 ppm の室温保管では僅かに減衰するものの、許容できる範囲であると判断した。

その結果を APPENDIX A 5 に示した。

## II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂餌量（餌こぼし量で補正）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 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、雌雄各 30 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	5 匹（1001～1005）	対 照 群	5 匹（2001～2005）
1280 ppm 群	5 匹（1101～1105）	1280 ppm 群	5 匹（2101～2105）
3200 ppm 群	5 匹（1201～1205）	3200 ppm 群	5 匹（2201～2205）
8000 ppm 群	5 匹（1301～1305）	8000 ppm 群	5 匹（2301～2305）
20000 ppm 群	5 匹（1401～1405）	20000 ppm 群	5 匹（2401～2405）
50000 ppm 群	5 匹（1501～1505）	50000 ppm 群	5 匹（2501～2505）

### II-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、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（雌雄とも 208 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. :  $23.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$ )、湿度  $55 \pm 15\%$  (実測値 平均 $\pm$ S.D. :  $56 \pm 1\%$ )、明暗サイクル : 12 時間点灯 (8:00~20:00) / 12 時間消灯 (20:00~8:00)、換気回数 15~17 回/時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)  $\times$  294 (D)  $\times$  176 (H) mm) に収容した。

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 (30K Gy- $\gamma$  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。

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 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、その記録を保管した。

### 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、生死及び瀕死の確認を毎日 1 回行い、動物の一般状態の詳細な観察は検疫開始日 (導入時)、馴化開始日、投与開始直前 (群構成時)、投与開始後 4 日目 (1 週 4 日)、7 日目 (1 週 7 日)、11 日目 (2 週 4 日) 及び 14 日目 (2 週 7 日) に実施した。

### II-3-2 体重測定

全動物について、検疫開始日（導入時）、馴化開始日、投与開始直前（群構成時）、投与開始後 4 日目（1 週 4 日）、7 日目（1 週 7 日）、11 日目（2 週 4 日）及び 14 日目（2 週 7 日）に体重を測定した。なお、死亡動物の搬出時にも測定を行った。

### II-3-3 摂餌量測定

全動物について、週に 2 回、給餌量（0、4、7、11 日目）、残餌量及び餌こぼし量（4、7、11、14 日目）を測定し、その差を給餌日数で除し、1 日当りの摂餌量を算出した。

### 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、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、※メトヘモグロビン濃度、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

検査方法は APPENDIX M に示した。

### II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した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、リン脂質、GOT、GPT、LDH、 $\gamma$ -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

検査方法は APPENDIX M に示した。

## II-3-6 尿検査

定期解剖日前日に採尿可能な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尿検査を行った。

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。

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。

脾臓、心臓、食道、胃、肝臓、腎臓、膀胱、副腎、骨髄（大腿骨）、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、残餌量及び餌こぼし量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量から残餌量及び餌こぼし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 日当たりの平均摂取量を算出し、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。

2-アミノ-4-クロロフェノールの体重 kg 当りの 1 日摂取量は、摂餌量に 2-アミノ-4-クロ

ロフェノ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 M** 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、測定した動物数を母数とした。

血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量の測定は、定期解剖時まで生存した動物を対象とし、検査動物数または測定動物数を母数とした。

尿検査は、検査日まで生存した動物を対象にし、検査動物数を母数とした。

剖検は、全動物数を母数とした。

病理組織学的検査は、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、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。

### Ⅲ 試験成績

#### Ⅲ-1 生死状況

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

<雄>

50000 ppm 群で 1 匹、投与 5 日目に死亡がみられた。

<雌>

全ての群で死亡はみられなかった。

#### Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX B 1, 2 に示した。

<雄>

黄色尿が 20000 ppm と 50000 ppm 群の全動物に、投与期間を通して認められた。各測定日において、50000 ppm 群で全身の着色（黄色）が 2～4 匹に認められた。また、糞小粒が 2～4 匹にみられたが、定期解剖直前の観察では認められなかった。立毛が 1 匹（死亡動物）に認められた。8000 ppm 以下の群では、被験物質投与によると考えられる一般状態の変化は認められなかった。

<雌>

黄色尿が 20000 ppm と 50000 ppm 群の全動物に、投与期間を通して認められた。各測定日において、50000 ppm 群で腹部の着色（黄色）が 2～4 匹、糞少量が 2～5 匹、20000 ppm 群で腹部の着色（黄色）が 1～2 匹に認められた。8000 ppm 以下の群では、被験物質投与によると考えられる一般状態の変化は認められなかった。

#### Ⅲ-3 体重

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

雌雄とも 20000 ppm と 50000 ppm 群で、投与期間を通して体重の低値が認められた。8000 ppm 以下の群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、最終計測日（2 週 7 日）の体重は、対照群と比較して、雄では 50000 ppm 群：59%、20000 ppm 群：84%、8000 ppm 群：96%、3200 ppm 群：99%、1280 ppm 群：101%、雌では 50000 ppm 群：69%、20000 ppm 群：90%、8000 ppm 群：98%、3200 ppm 群：99%、1280 ppm 群：100%であった。



### Ⅲ-4 摂餌量

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

なお、4日目の摂餌量は、摂餌量を計測したコンピュータのプログラム不具合により、餌こぼし量の測定値が欠落したため正確な摂餌量を算出することができず、雌雄とも摂餌量を算出しなかった。

<雄>

20000 ppm と 50000 ppm 群で、投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。8000 ppm 以下の群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、50000 ppm 群：55～62%、20000 ppm 群：83～86%、8000 ppm 群：99～102%、3200 ppm 群：96～98%、1280 ppm 群：102～104%の範囲にあった。

<雌>

50000 ppm 群では7日目と14日目に、20000 ppm 群では7日目に摂餌量の低値が認められた。8000 ppm 以下の群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、50000 ppm 群：72～80%、20000 ppm 群：86～89%、8000 ppm 群：92～95%、3200 ppm 群：101～103%、1280 ppm 群：98～103%の範囲にあった。

### 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 E 1, 2 に示した。

全投与期間における各群の1日当たりの被験物質摂取量(g/kg body weight per day)は、雄で50000 ppm 群：3.603～3.943、20000 ppm 群：1.516～1.620、8000 ppm 群：0.629～0.689、3200 ppm 群：0.232～0.262、1280 ppm 群：0.099～0.110、雌で50000 ppm 群：4.211～4.780、20000 ppm 群：1.566～1.707、8000 ppm 群：0.605～0.667、3200 ppm 群：0.261～0.286、1280 ppm 群：0.108～0.110の範囲にあった。

各群の被験物質摂取量の比は、雌雄とも設定用量比（公比 2.5）にほぼ対応した値を示した。

### Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 5, 6 と APPENDIX F 1, 2 に示した。

<雄>

赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値が 8000 ppm 以上の群で減少し、MCH、血小板数、網赤血球比及びメトヘモグロビン濃度の増加と MCHC の減少が 20000 ppm と 50000 ppm 群でみられた。さらに、MCV、分葉核好中球比の増加とリンパ球比の減少が 50000 ppm 群で認められた。

<雌>

血小板数の増加とヘモグロビン濃度の減少が 8000 ppm 以上の群でみられ、MCH、網赤血球比、メトヘモグロビン濃度及び白血球数の増加と MCHC の減少が 20000 ppm と 50000 ppm 群の群でみられた。さらに、MCV、分葉核好中球比の増加と赤血球数、リンパ球比の減少が 50000 ppm 群で認められた。また、ヘマトクリット値の減少が 20000 ppm 群でみられた。

### Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 7, 8 と APPENDIX G 1, 2 に示した。

<雄>

総コレステロール、カリウムの増加とグルコースの減少が 20000 ppm と 50000 ppm 群でみられ、総ビリルビン、リン脂質及び尿素窒素の増加と  $\gamma$ -GTP の上昇が 50000 ppm 群で認められた。また、総蛋白、アルブミンの増加と GPT の上昇が 20000 ppm 群でみられた。

<雌>

$\gamma$ -GTP の上昇が 8000 ppm 以上の群でみられ、総コレステロールとリン脂質の増加が 20000 ppm と 50000 ppm 群でみられた。さらに、総ビリルビン、尿素窒素及びカリウムの増加とグルコースの減少が 50000 ppm 群で認められた。

### Ⅲ-8 尿検査

尿検査の結果を TABLE 9, 10 と APPENDIX H 1, 2 に示した。

<雄>

pH の低下が 50000 ppm 群でみられた。

<雌>

pH の低下と蛋白の陽性度の増加傾向が 50000 ppm 群でみられた。

### Ⅲ-9 病理学的検査

#### Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX I 1~3 に示した。

##### <雄>

死亡動物（50000 ppm 群の 1 匹）では、胸腺の萎縮、腺胃の黒色斑及び膀胱の黒色尿貯留が認められた。

定期解剖動物では、脾臓の腫大（8000 ppm：2 匹、20000 ppm：5 匹、50000 ppm：4 匹）と暗色（8000 ppm：5 匹、20000 ppm：5 匹、50000 ppm：4 匹）が 8000 ppm 以上の群で、前胃の肥厚（20000 ppm：3 匹、50000 ppm：4 匹）が 20000 ppm と 50000 ppm 群で、胸腺の萎縮が 50000 ppm 群で全ての動物に認められた。

##### <雌>

8000 ppm 以上の群で脾臓の暗色（8000 ppm：5 匹、20000 ppm：5 匹、50000 ppm：5 匹）が、脾臓の腫大（20000 ppm：5 匹、50000 ppm：5 匹）と前胃の肥厚（20000 ppm：2 匹、50000 ppm：5 匹）が 20000 ppm と 50000 ppm 群で、胸腺の萎縮が 50000 ppm 群で全ての動物に認められた。

#### 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 11, 12 と APPENDIX J 1, 2、APPENDIX K 1, 2 に示した。

##### <雄>

脾臓の実重量と体重比の高値が 8000 ppm 以上の群で認められた。胸腺の実重量の低値が 20000 ppm と 50000 ppm 群で、胸腺の体重比の低値と精巣の実重量の低値が 50000 ppm 群で認められた。その他、8000 ppm 以上の群で、副腎、心臓、肺、腎臓、肝臓及び脳に実重量の低値や体重比の高値がみられたが、体重増加の抑制にともなった変化と考えられた。

##### <雌>

脾臓の実重量と体重比の高値、卵巣の実重量と体重比の低値が 20000 ppm と 50000 ppm 群で認められた。胸腺の実重量と体重比の低値が 50000 ppm 群で認められた。その他、20000 ppm と 50000 ppm 群で、副腎、心臓、肺、腎臓、肝臓及び脳に実重量の低値や体重比の高値がみられたが、体重増加の抑制にともなった変化と考えられた。なお、1280 ppm 群で胸腺の実重量と体重比が増加したが、大きな変化ではなかった。

### Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE 13, 14、APPENDIX L 1~3 に示した。

#### <雄>

—死亡動物（50000ppm 群の 1 匹）—

骨髄の出血、胸腺の萎縮、前胃上皮の過形成、腺胃の糜爛及び膀胱の好酸性物質貯留が認められた。

精巣の精原細胞壊死とこれにともなう精巣上体の精子数減少と精上皮系細胞の残屑の出現が認められた。

—定期解剖動物—

胸腺の萎縮が 50000 ppm 群でみられた。

脾臓に髄外造血と赤血球充満が 8000 ppm 以上の群でみられ、投与濃度に対応してその程度が増強した。

胃に前胃の潰瘍が 20000 ppm と 50000 ppm 群で、前胃上皮の過形成が 3200 ppm 以上の群でみられ、投与濃度に対応してその発生数と程度が増強した。

食道上皮の過形成が 50000 ppm 群で 2 匹にみられた。

膀胱の変性（移行上皮細胞の腫脹と細胞質内への空胞の出現）が 50000 ppm 群でみられた。

精巣に精原細胞壊死、精巣上体には精子数減少と精上皮系細胞の残屑の出現が 50000 ppm 群でみられた。

腎臓の好塩基性変化が 50000 ppm 群で 1 匹にみられた。

#### <雌>

胸腺の萎縮が 50000 ppm 群でみられた。

脾臓に髄外造血と赤血球充満が 8000 ppm 以上の群でみられ、投与濃度に対応してその程度が増強した。

前胃の潰瘍が 20000 ppm と 50000 ppm 群で、前胃上皮の過形成が 3200 ppm 以上の群でみられ、投与濃度に対応してその発生数と程度が増強した。

食道上皮の過形成が 50000 ppm 群で 1 匹にみられた。

膀胱の変性が（移行上皮細胞の腫脹と細胞質内への空胞の出現）50000 ppm 群でみられた。

#### IV 考察及びまとめ

2-アミノ-4-クロロフェノールの F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いた経口投与による2年間(104週間)のがん原性試験のための予備試験である13週間試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するために2週間試験を実施した。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自由摂取させることにより行った。1群当たりの動物数は雌雄各5匹とし、被験物質投与群5群と対照群1群の計6群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも50000、20000、8000、3200及び1280 ppm(公比2.5)とした。

##### (1) 用量-反応関係

###### <雄>

50000 ppm群では、1匹の動物が投与5日目に死亡した。死亡した動物にみられた所見は、一般状態の観察で黄色尿及び立毛、剖検で胸腺の萎縮、腺胃の黒色斑及び膀胱の黒色尿、病理組織学的検査で骨髄の出血、胸腺の萎縮、前胃上皮の過形成、腺胃の糜爛、膀胱の好酸性物質貯留、精巣の精原細胞壊死、精巣上体の精子の減少と精上皮細胞の残屑の出現であった。定期解剖まで生存した動物では体重増加の抑制と摂餌量の減少が顕著であった。なお、摂餌量の減少は被験物質の毒性影響に動物の摂餌忌避が加わったことによると考えられた。最終計測時の体重は対照群の59%、摂餌量は対照群の61%であった。一般状態の観察では黄色尿及び被毛の着色がみられたのみで、重篤な所見はみられなかった。しかし、胸腺の萎縮と重量(実重量及び体重比)の低下がみられ、全身性の消耗性変化を呈していると思われた。血液学的検査で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値等の減少が認められ、貧血を示した。この貧血は、血液学的検査でメトヘモグロビンが増加していることと血中の総ビリルビンが増加していることより、2-アミノ-4-クロロフェノールの投与により赤血球中のヘモグロビンがメトヘモグロビンとなり、赤血球が脾臓の細網細胞で破壊されたことによる溶血性貧血であると考えられた。また、脾臓では髄外造血と赤血球充満が認められ、血中では網赤血球比が増加し、これらは貧血を補うための二次的な造血亢進を反映するものであると考えられた。その他、胃には剖検時に肥厚がみられ、病理組織学的検査では、前胃に潰瘍と上皮の過形成、食道に上皮の過形成がみられた。膀胱には変性(移行上皮細胞の腫脹と細胞質内への空胞の出現)が認められたが、その機序は不明であった。精巣でみられた精原細胞壊死と精巣上体でみられた精子数減少並びに精上皮細胞系の残屑は、顕著な体重増加抑制による二次的な変化と考えられるが、死亡動物には骨髄の出血がみられており、精巣及び骨髄がともに細胞分裂が活発な臓器であること考慮すると、投与の影響の可能性も考えられた。

血液生化学的検査で総コレステロール、リン脂質、 $\gamma$ -GTP、尿素窒素及びカリウムの値に変化がみられたが、1匹の腎臓に好塩基性変化が認められるのみで、肝臓あるいは腎臓に特徴的な病理組織学的な所見は認められなかった。

以上のように、50000ppm 群では、顕著な摂餌量の減少と体重増加の抑制が認められ、1匹の死亡がみられた。死亡動物、生存動物とも胸腺の萎縮が認められ、この群の動物は全身性の消耗性変化を呈していると考えられた。なお、特徴的な変化として、生存動物に貧血が示され、食道と胃、精巣、並びに膀胱に被験物質投与の影響が示された。

20000 ppm 群では、体重増加の抑制（対照群の 84%）と摂餌量の低値（対照群の 86%）がみられた。一般状態所見では黄色尿、血液学的検査でメトヘモグロビン濃度の増加とそれに伴う貧血、剖検で前胃に肥厚、脾臓に腫大及び暗色認められ、病理組織学的検査では脾臓に髓外造血と赤血球充満、前胃に潰瘍と上皮の過形成がみられた。20000 ppm 群でも血液生化学的検査で幾つかの項目に変化が認められたが、肝臓あるいは腎臓に病理組織学的な所見は認められなかった。

8000 ppm 群では、一般状態、体重値及び摂餌量は対照群と差はなかった。血液学的検査では貧血を示し、剖検で脾臓に腫大と暗色、病理組織学的検査で脾臓に髓外造血と赤血球充満、及び前胃に上皮の過形成がみられた。

3200 ppm 群では、病理組織学的検査で前胃に上皮の過形成がみられたが、他の検査項目では対照群と比較して差を認めなかった。

1280 ppm 群では全ての検査項目で対照群と比較して差を認めなかった。

#### <雌>

50000 ppm 群では死亡はみられなかったが、体重増加の抑制と摂餌量の減少が顕著であった。最終計測時の体重は対照群の 69%、摂餌量は対照群の 72%であった。一般状態の観察で黄色尿及び被毛の着色がみられたのみで、重篤な所見はみられなかった。しかし、胸腺の萎縮と重量（実重量及び体重比）の低下がみられ、全身性の消耗性変化を呈していると思われた。血液学的検査で赤血球数、ヘモグロビン濃度等の減少が認められ、貧血を示した。血中のメトヘモグロビンが増加し、脾臓に赤血球充満がみられていることから、雄と同様にメトヘモグロビン増加に起因する溶血性貧血であると考えられた。また、二次的な造血亢進を反映する変化として、脾臓では髓外造血が認められ、血中では網赤血球比が増加した。病理組織学的検査では、前胃に潰瘍がみられ、前胃と食道に上皮の過形成がみられた。膀胱には変性（移行上皮細胞の腫脹と細胞質内への空胞の出現）が認められ、尿検査では蛋白が増加傾向を示した。血液生化学的検査で総コレステロール、リン脂質、 $\gamma$ -GTP、尿素窒素及びカリウムの値に変化がみられたが、肝臓あるいは腎臓に病理組織学的な所見は認められなかった。

以上のように、50000 ppm 群では死亡はみられなかったが、体重増加の抑制と摂餌量の減少が顕著であった。胸腺の萎縮が認められ、この群の動物は全身性の消耗性変化を呈していると考えられた。なお、雄と同様に貧血が認められ、食道と胃、精巣、並びに膀胱に被験物質投与の影響が示された。

20000 ppm 群では、体重増加の抑制（対照群の 90%）と摂餌量の低値（対照群の 89%）

がみられた。一般状態の観察で黄色尿及び被毛の着色、血液学的検査でメトヘモグロビン濃度の増加とこれに伴う貧血、剖検で前胃の肥厚、脾臓の腫大と暗色、病理組織学的検査で脾臓の髓外造血と赤血球充満、前胃に潰瘍及び上皮の過形成がみられた。この群でも血液生化学的検査で幾つかの項目に変化が認められたが、肝臓あるいは腎臓に病理組織学的な所見は認められなかった。

8000 ppm 群では、一般状態、体重値及び摂餌量は対照群と差はなかった。血液学的検査では貧血、剖検で脾臓の暗色、病理組織学的検査で脾臓に髓外造血と赤血球充満、前胃に上皮の過形成がみられた。

3200 ppm 群では、病理組織学的検査で前胃に上皮の過形成がみられたが、他の検査項目では対照群との違いを認めなかった。

1280 ppm 群では全ての検査項目で対照群と比較して大きな差を認めなかった。

## (2) 無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)

50000、20000、8000、3200 及び 1280 ppm (公比 2.5) の濃度で 2-アミノ-4-クロロフェノールを投与した結果、雌雄とも、50000 ppm 群から 3200 ppm 群まで前胃上皮の過形成が認められた。また、最低投与濃度群の 1280 ppm 群では 2-アミノ-4-クロロフェノールの投与の影響は確認できなかった。従って、本試験条件下における 2-アミノ-4-クロロフェノールの雌雄の F344/DuCrj (Fischer) ラットに対する NOAEL は前胃上皮の過形成をエンドポイントとして 1280 ppm (雄 : 0.099~0.110 g/kg body weight per day、雌 : 0.105~0.110 g/kg body weight per day) と考えられた。

## (3) 他の文献との比較

ラットに対する 2-アミノ-4-クロロフェノールの LD<sub>50</sub> 値は 690 mg/kg (文献 4) であるとされ、本試験の 1 日摂取量で最も近い投与濃度は 8000 ppm であった。Hong ら (文献 8) は、雄 F344 ラットに 2-アミノ-4-クロロフェノールを 0.4、0.8、1.2 mmol/kg (57.4, 114.9, 172.3 mg/kg) の用量で腹腔に単回投与した実験で、1.2 mmol/kg 群では 75 % の動物が死亡し、0.4、0.8 mmol/kg 群では摂餌量及び飲水量の一時的な減少があり、0.8 mmol/kg 群では尿中の蛋白及び糖が増加したと報告した。Hong らは、2-アミノ-4-クロロフェノールを弱い腎毒性物質と評価した。本試験においても、腎毒性を疑わせる所見として、尿検査において pH の低下及び蛋白の増加、血液生化学的検査において尿素窒素の増加が認められた。また、雄の 50000 ppm の 1 匹のみであるが、病理組織学的検査において腎臓に好塩基性変化が認められた。Hong らの試験で腎臓への影響がみられた用量は 0.8 mmol/kg であり、この体重当たりの用量は本試験の 1280 ppm に相当する。本試験では腎臓への影響が 50000 ppm で観察されたが、腎毒性発現濃度の相違は、投与経路の相違によると考えられた。なお、本試験で認められた食道と胃への影響も同様に投与経路の相違によるものと考えられた。

#### (4) 13 週間試験の濃度設定

13 週間試験の投与濃度を以下の通り設定した。

2 週間試験の結果、50000 ppm 群では雄の 1 匹が死亡した。雌雄ともに体重値と摂餌量の低値が 50000 ppm 群（対照群比、体重：雄 59%，雌：69%、摂餌量：雄 55～62%，雌：72～80%）と 20000 ppm（対照群比、体重：雄 84%，雌：90%、摂餌量：雄 83～86%，雌：86～89%）でみられ、特に 50000 ppm 群では顕著であった。血液学的検査では、雌雄共に 20000 ppm と 50000 ppm 群でメトヘモグロビン濃度の上昇がみられ、赤血球数とヘモグロビン濃度は 8000 ppm 以上の雌雄の群で減少し、貧血が認められた。病理組織学検査では、全身性の消耗性変化として胸腺の萎縮が雌雄の 50000 ppm 群でみられ、雌雄の 8000 ppm 以上の群で、メトヘモグロビンの増加に伴う影響と考えられる脾臓の赤血球充満、貧血を補うための機能亢進として髄外造血がみられた。雌雄とも前胃上皮の過形成が 3200 ppm 群以上の群で、潰瘍が 20000 ppm と 50000 ppm 群でみられた。なお、メトヘモグロビン濃度の上昇、赤血球数とヘモグロビン濃度の減少に用量依存性がみられ、胸腺の萎縮、脾臓の赤血球充満と髄外造血、前胃上皮の過形成と潰瘍の発生率と程度にも用量依存性が認められた。

以上より、2-アミノ-4-クロロフェノールの 13 週間試験の最高投与濃度は、大幅な体重増加の抑制及び消耗性変化が認められず、動物の生存に影響を与えないと考えられる 20000 ppm とし、以下、8000、3200、1280 及び 512 ppm(公比 2.5)の合計 5 段階の濃度を設定した。



## VI 文献

1. 化学工業日報社. 2004. 14504 の化学商品. 東京 : 化学工業日報社, 644.
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : Jone Wiley and Sons.
3. 東京化成工業(株). 2003. 2-アミノ-4-クロロフェノール, 赤外吸収スペクトル.
4. NIOSH. 1997. Registry of Toxic Effect of Chemical Substances. Accession number SJ5700000. Cincinnati, OH. : National Institute for Occupational Safety and Health.
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451 : "Carcinogenicity studies", Paris : Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. 厚生省医薬安全局審査管理課. 1999. 医薬品のがん原性試験に関するガイドラインについて. 医薬審 第1607号 平成11年11月1日.
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. Hong SK, Valentovic MA, Anestis DK, Ball JG, Brown PI, Rankin GO. 1996. Nephrotoxicity of 4-amino-2-chlorophenol and 2-amino-4-chlorophenol in the Fischer 344 rat. Toxicol 110 : 47-58.