

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

試験番号：0550

CAS No. 95-85-2

2006年3月31日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

標題

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)

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として、2-アミノ-4-クロロフェノールをマウスに 13 週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 408（げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験 1998 年 9 月 21 日採択）を参考にして実施した。

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 山本 静護
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 13 週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0550

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 構造式及び分子量	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
(1)	飼育環境	7
(2)	飼料	7
(3)	飲水	7
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	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
(1)	剖検	9
(2)	臓器重量	9
(3)	病理組織学的検査	9
II-4	数値処理と統計方法	9
II-4-1	数値の取り扱いと表示	9
II-4-2	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	18
(1) 用量-反応関係	18
(2) 無毒性量 (NOAEL)	19
(3) がん原性試験の濃度決定	20
Ⅴ 文献	21

要約

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を決定することを目的として、2-アミノ-4-クロロフェノールを B6D2F1/Crlj (旧 Crj:BDF1) マウスに 13 週間経口 (混餌) 投与して、その生体影響を検索した。

本試験は、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、3200、8000 及び 20000 ppm (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。

13 週間試験の結果、一般状態 (生死)、体重、血液、胃、膀胱及び肝臓に投与の影響が認められた。

被験物質投与による死亡が 20000 ppm 群の雄に 1 匹、雌に 3 匹認められた。

体重増加の抑制が雄 20000 ppm 群のみに認められ、最終体重は対照群の 85%であった。

血液への影響として、雌雄とも 8000 ppm 以上の群で貧血を示す赤血球数及びヘマトクリット値の減少、また、貧血に対する反応性変化と考えられる網赤血球比の増加が認められた。貧血に係わる病理組織学的所見として、脾臓にはヘモジデリンの沈着と貧血に対する代償性変化である髄外造血が認められた。脾臓のヘモジデリンの沈着は雌の 1280 ppm 以上の群と雄の 3200 ppm 以上の群で認められ、髄外造血は雌雄ともに 1280 ppm 以上の群に認められた。ヘモジデリンの沈着は雌雄の 20000 ppm 群の肝臓にも認められた。また、脾臓重量の増加が雌雄とも 8000 ppm 以上の群で認められ、崩壊した赤血球のヘモグロビンに由来すると考えられる血漿中の総ビリルビンの増加が雌雄の 20000 ppm 群で認められた。

前胃には、扁平上皮の過形成が雌雄とも 1280 ppm 以上の群で認められ、20000 ppm 群の生存動物ではすべてが重度であった。

膀胱には、移行上皮細胞の腫脹が雌雄とも 1280 ppm 以上の群に認められた。また、20000 ppm 群の雌雄では移行上皮細胞の腫脹に加えて過形成も認められ、さらに雌では移行上皮の壊死と炎症性細胞の浸潤もみられた。

肝臓では、小葉中心性の肝細胞の腫脹が雄 8000 ppm 以上の群にみられた。また、肝臓重量の増加が雌雄とも 8000 ppm 以上の群に認められた。

以上の結果から、2-アミノ-4-クロロフェノールのマウスに対する 13 週間の経口投与による無毒性量 (NOAEL) は、血液への影響、胃及び膀胱への影響をエンドポイントとして 512 ppm (雄 : 70 mg / kg body weight per day、雌 : 87 mg / kg body weight per day) であると考えた。また、経口 (混餌) 投与による 2 年間のがん原性試験の最大耐量は 3200 ppm であると推定し、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 3 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

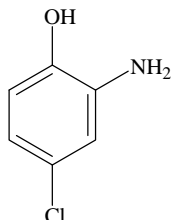
I-1-1 名称等

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 : CEQ 0194

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

純 度 : 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、マススペクトルを質量分析計 (Hewlett Packard 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 (Shimadzu 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 A 1 に示した。

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ガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 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、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 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：神奈川県厚木市下古沢 795) の B6D2F1/Crlj (旧 Crj:BDF1) (SPF) の雌雄を使用した。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原因から、B6D2F1/Crlj マウスと決定している。

マウス雌雄各 75 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 60 匹 (投与開始時体重範囲、雄：22.0～25.7g、雌：17.2～19.9g) を選別し、試験に用いた。

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3日または4日毎に実施した。

II-1-3 投与期間

投与期間は13週間とし、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、512、1280、3200、8000及び20000 ppmの5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、がん原性試験の投与濃度を決定するため13週間とした。

各群の投与濃度は2週間の予備試験（試験番号0483）の結果（文献4）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5匹とし、合計60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2週間自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも1280、3200、8000、20000及び50000 ppmの5段階（公比2.5）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。

2週間試験の結果、50000 ppm群では雌雄すべての動物が死亡し、動物の消耗状態を示

す変化として胸腺の萎縮がみられた。雄の 20000 ppm 群でのみ体重増加の抑制(対照群比、92%)がみられた。血液学的検査では、雌雄ともに赤血球数とヘモグロビン濃度等が減少し、貧血が示された。病理組織学的検査では、前胃に潰瘍と上皮の過形成、肝臓に中心性の腫脹及び膀胱に変性がみられた。なお、赤血球数とヘモグロビン濃度の減少、前胃の潰瘍と上皮の過形成、肝臓の中心性の腫脹及び膀胱の変性がみられ、これらは用量依存性が認められた。

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、大きな全身性の消耗性変化がみられず、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。

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 あるいは HP20M)で攪拌混合し、各設定濃度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 2 週間に 1 回行い、調製した被験物質混合飼料は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 (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及び均一性は、初回調製時に各投与濃度毎に調製容器内の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、設定濃度に対して 96.1~102%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 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、投与開始前に最低投与濃度の 512 ppm と最高投与濃度の 20000 ppm の被験物質混合飼料を調製し、マウス用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管(5 日間)したものと、ビニール袋に密閉し 2 週間冷蔵保管したものについて、被験物質混合飼料調製時の被験物質濃度と各保管期間後の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ(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%とした場合に、室温保管 (5 日間) では、512 ppm:90.1%、20000 ppm : 98.5%、2 週間の冷蔵保管で 512 ppm : 98.6%、20000 ppm : 97.5%であり、給餌期間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 A 5 に示した。

II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂取量 (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 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 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 10 匹の動物を用いた。

群名称	動物数 (動物番号)	
	雄	雌
対照群	10 匹 (1001~1010)	10 匹 (2001~2010)
512 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	10 匹 (2101~2110)
1280 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	10 匹 (2201~2210)
3200 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	10 匹 (2301~2310)
8000 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	10 匹 (2401~2410)
20000 ppm 群	10 匹 (1501~1510)	10 匹 (2501~2510)

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とにより、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 5)。

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 (雌雄とも 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。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。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 : $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < $23.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ >

湿度 : $55 \pm 15\%$ < $55 \pm 2\%$ >

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 (30K Gy- 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った。

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) 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

体重測定は毎週1回行った。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

摂餌量は毎週1回、給餌量、残餌量及び餌こぼし量を測定し、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 M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 M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 13 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、バイエル社製）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、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：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、骨髄（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、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髓、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

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、残餌量及び餌こぼし量を小数点以下第 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 M 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。

各検定は 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—

20000、1280 及び 512 ppm 群で各 1 匹の死亡がみられた。

—雌—

20000 ppm 群で 3 匹の死亡がみられた。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX B 1, 2 に示した。

—雌雄—

死亡動物において、衰弱に伴う症状が散見されたが、その他に被験物質の投与と直接関連する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 1, 2、FIGURE 1, 2 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

—雄—

20000 ppm 群で体重増加の抑制がみられ、全投与期間にわたり、対照群と比較して 8～21%の体重の低値がみられた。他の群では対照群との間に大きな差はみられなかった。最終計測日における各群の体重は、対照群に対して、512 ppm 群：101 %、1280 ppm 群：98 %、3200 ppm 群：96 %、8000 ppm 群：94 %、20000 ppm 群：85 %であった。

—雌—

20000 ppm 群で、投与 1, 3 及び 10 週目に対照群と比較して 7～10%の体重の低値がみられた。他の群では対照群との間に大きな差はみられなかった。最終計測日における各群の体重は、対照群に対して、512 ppm 群：100 %、1280 ppm 群：101 %、3200 ppm 群：102 %、8000 ppm 群：95 %、20000 ppm 群：97 %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。

—雄—

20000 ppm 群で投与 7 週に、対照群対して 23 %の摂餌量の低値がみられた。他の群では対照群との間に大きな差はみられなかった。

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：3.8 g（100%）、512 ppm 群：4.0 g（105 %）、1280 ppm 群：3.9 g（103 %）、3200 ppm 群：4.0 g（105 %）、8000 ppm 群：4.0 g（105 %）、20000 ppm 群：3.8 g（100%）であった。

—雌—

すべての投与群で対照群との間に大きな差はみられなかった。

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：3.7 g（100%）、512 ppm 群：3.8 g（103 %）、1280 ppm 群：3.5 g（95 %）、3200 ppm 群：3.6 g（97 %）、8000 ppm 群：3.5 g（95%）、20000 ppm 群：3.5 g（95%）であった。

Ⅲ-5 被験物質摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より算出した被験物質摂取量を APPENDIX E 1, 2 に示した。

—雄—

全投与期間における 1 日当たりの被験物質摂取量（g/kg body weight per day）は、512 ppm 群：0.063～0.079（平均：0.070）、1280 ppm 群：0.154～0.203（平均：0.174）、3200 ppm 群：0.383～0.511（平均：0.452）、8000 ppm 群：0.981～1.320（平均：1.136）、20000 ppm 群：2.535～3.485（平均：2.978）の範囲にあった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、設定用量比（公比 2.5）にほぼ対応した値を示した。

—雌—

全投与期間における 1 日当たりの被験物質摂取量（g/kg body weight per day）は、512 ppm 群：0.081～0.094（平均：0.087）、1280 ppm 群：0.192～0.218（平均：0.205）、3200 ppm 群：0.491～0.558（平均：0.522）、8000 ppm 群：1.209～1.420（平均：1.296）、20000 ppm 群：2.942～3.925（平均：3.348）の範囲にあった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、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、ヘマトクリット値及び好酸球比の減少、MCH、MCHC 及び網赤血球比の増加が 8000 ppm 以上の群で認められた。また、ヘモグロビン濃度の減少が 8000 ppm 群で見られた。

その他、3200 ppm 群で血小板数に変化がみられたが、用量に対応した変化ではなかった。

—雌—

赤血球数、ヘマトクリット値及び単球比の減少、網赤血球比の増加が 8000 ppm 以上の群で認められた。また、MCH と MCHC が 20000 ppm 群で増加し、ヘモグロビン濃度の減少が 8000 ppm 群で減少した。

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—

20000 ppm 群で総ビリルビンが増加した。

—雌—

20000 ppm 群で総コレステロール、グルコース、リン脂質及び尿素窒素が増加した。なお、統計学的に差はみられなかったが、20000 ppm 群で総ビリルビンが増加した。

Ⅲ-8 尿検査

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

—雄—

蛋白とケトン体の陽性度の減少が 8000 ppm 以上の群で認められた。20000 ppm 群では pH の低下もみられた。

—雌—

対照群と比較して、差はみられなかった。

Ⅲ-9 病理学的検査

Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX I 1~4 に示した。

—雄—

<死亡動物>

20000 ppm 群の死亡動物（1 匹）には、胸腺の萎縮、脾臓の暗色化及び腺胃の潰瘍がみられた。1280 ppm 群の死亡動物（1 匹）には、胸水、胸腺の萎縮及び腎臓の腫大と白色斑がみられた。512 ppm 群の死亡動物（1 匹）には、水腎症がみられた。

<定期解剖動物>

20000 ppm 群の定期解剖動物（9 匹）には、脾臓の暗色化がすべての動物にみられ、また、脾臓の腫大が 8 匹の動物、前胃の肥厚が 5 匹の動物にみられた。8000 ppm 以下の群では投与と関係があると思われる所見はみられなかった。

—雌—

<死亡動物>

20000 ppm 群の死亡動物（3 匹）には、胸腺の萎縮がみられ、このうちの 2 匹には脾臓の暗色化及び前胃の肥厚がみられた。

<定期解剖動物>

20000 ppm 群の定期解剖動物（7 匹）には、前胃の肥厚及び脾臓の暗色化と腫大がすべての動物にみられた。8000 ppm 群の定期解剖動物（10 匹）には、2 匹の動物に前胃の肥厚がみられた。3200 ppm 以下の群では投与と関係があると思われる所見はみられなかった。

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 10, 11 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増加が 8000 ppm 以上の群でみられた。腎臓の実重量と体重比の増加が 20000 ppm 群で、肝臓の実重量の増加が 20000 ppm 群で、体重比の増加が 8000 ppm 以上の群でみられた。その他、肺及び脳の体重比の値に対照群と比較して差がみられたが、これらは体重増加の抑制に伴う変化と考えられた。

—雌—

脾臓の実重量と体重比の増加が 8000 ppm 以上の群でみられた。腎臓と肝臓の実重量と体重比の増加が 20000 ppm 群でみられた。

Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

非腫瘍性病変及びそれらの発生数は TABLE 12~15 と APPENDIX L 1~4 に示した。

—雄—

<死亡動物>

[20000 ppm 群：1 匹]

脾臓、胃（前胃）、胸腺及び腎臓に変化が認められた。

脾臓には重度の髄外造血とヘモジデリンの沈着が認められた。ヘモジデリンの沈着は赤血球の崩壊を示し、髄外造血は脾臓での造血の亢進を示す所見である

胸腺には重度の萎縮が認められた。胸腺の萎縮は皮質におけるリンパ球の細胞密度が低下した状態を示す所見である。

前胃には過形成（扁平上皮の細胞層の多層化）が認められ、その程度は中等度であった。

腎臓には軽度の水腎症が認められた。水腎症は、先天的に発生する病変で、腎盂が拡張して腎実質が圧迫された状態を示す所見である。

[1280 ppm 群：1 匹]

胸腺に重度の萎縮、心臓に中等度の心筋線維の壊死、腎臓に重度の水腎症と皮質の鉍質沈着が認められた。

当該動物の死因は、水腎症と推測された。

[512 ppm 群：1 匹]

胸腺に軽度の萎縮、心臓に中等度の心筋炎（心筋繊維内に炎症性細胞が浸潤した状態）、腎臓に重度の水腎症が認められた。

当該動物の死因は、水腎症と推測された。

<定期解剖動物>

[20000 ppm 群：9 匹]

脾臓、胃（前胃）、肝臓及び膀胱に変化が認められた。

脾臓には中等度のヘモジデリンの沈着と重度の髄外造血が、すべての動物で認められた。

前胃には扁平上皮に重度の過形成がすべての動物に認められ、これらの動物の一部には糜爛（軽度：2 匹）や潰瘍（軽度：3 匹）も認められた。

肝臓には軽度のヘモジデリンの沈着がすべての動物で認められ、また、肝細胞の軽度の中心性の腫脹が 7 匹の動物に認められた。

膀胱には移行上皮の腫脹がすべての動物（中等度：8 匹、軽度：1 匹）に認められ、また、軽度の移行上皮の過形成が 8 匹の動物に認められた。移行上皮の腫脹は上皮の細胞質の膨化を示す所見である。

[8000 ppm 群：10 匹]

脾臓、胃（前胃）、肝臓及び膀胱に変化が認められた。

脾臓には軽度のヘモジデリンの沈着がすべての動物に認められ、中等度の髄外造血が 8

匹、軽度の髄外造血が 2 匹の動物に認められた。

前胃には扁平上皮に中等度の過形成が 4 匹、軽度の過形成が 4 匹の動物に認められた。

肝臓には軽度の肝細胞の中心性腫脹が 6 匹の動物に認められた。

膀胱には移行上皮に軽度の過形成が 4 匹の動物に認められ、移行上皮に中等度の腫脹が 4 匹、軽度の腫脹が 5 匹の動物に認められた。

[3200 ppm 群：10 匹]

脾臓、胃（前胃）及び膀胱に変化が認められた。

脾臓には軽度のヘモジデリンの沈着と髄外造血がすべての動物に認められた。

前胃には扁平上皮に中等度の過形成が 1 匹、軽度の過形成 7 匹の動物に認められ、軽度の潰瘍が 1 匹の動物に認められた。

膀胱には移行上皮に軽度の過形成が 1 匹の動物に認められ、移行上皮に軽度の腫脹が 5 匹の動物に認められた。

[1280 ppm 群：9 匹]

脾臓、胃（前胃）及び膀胱に変化が認められた。

脾臓には軽度の髄外造血が 5 匹の動物に認められた。

前胃には軽度の過形成が 1 匹の動物に認められた。

膀胱には移行上皮に軽度の過形成が 1 匹、軽度の腫脹が 1 匹の動物に認められた。

[512 ppm 群：9 匹]

被験物質の影響と思われる所見は認められなかった。

本試験に用いた動物には、水腎症が対照群を含めて 8 匹の動物に認められ、一部に炎症性ポリープも認められた。しかし、その発生数と投与濃度には用量に依存した傾向は認められず、これらはすべて先天的なものであり、投与には関連がないものと考えられた。

—雌—

<死亡動物>

[20000 ppm 群：3 匹]

脾臓、胸腺、胃（前胃）、膀胱及び舌に変化が認められた。

脾臓には髄外造血（重度：1 匹、中等度：2 匹）とヘモジデリンの沈着（中等度：3 匹）がすべての動物に認められた。

胸腺には重度の萎縮がすべての動物に認められた。

前胃には重度の過形成がすべての動物に認められ、軽度の糜爛が 2 匹、軽度の潰瘍が 2 匹の動物に認められた。

膀胱の移行上皮には中等度の壊死が 2 匹の動物に認められた。

舌には軽度の炎症が 1 匹の動物に認められた。

<定期解剖動物>

[20000 ppm 群 : 7 匹]

脾臓、胃（前胃）、肝臓及び膀胱に変化が認められた。

脾臓には中等度のヘモジデリンの沈着と重度の髄外造血が、すべての動物に認められた。

前胃には扁平上皮に重度の過形成がすべての動物に認められた。このうち中等度の潰瘍が 1 匹、軽度の潰瘍が 3 匹、軽度の糜爛が 1 匹の動物に認められた。

肝臓には軽度のヘモジデリンの沈着がすべての動物で認められた。

膀胱には移行上皮に中等度の腫脹がすべての動物に認められた。また、軽度の過形成が 4 匹の動物、中等度の壊死が 1 匹の動物に認められた。

[8000 ppm 群 : 10 匹]

脾臓、胃（前胃）及び膀胱に変化が認められた。

脾臓にはすべての動物にヘモジデリンの沈着と髄外造血が認められた。ヘモジデリンの沈着の程度は中等度が 7 匹、軽度が 3 匹で、髄外造血の程度は重度が 1 匹、中等度が 5 匹、軽度が 4 匹であった。

前胃には扁平上皮に過形成がすべての動物に認められ、その程度は重度が 2 匹、中等度が 3 匹、軽度が 5 匹であった。このうち、1 匹には糜爛が認められた。

膀胱には移行上皮に軽度の腫脹がすべての動物に認められた。

[3200 ppm 群 : 10 匹]

脾臓、胃（前胃）及び膀胱に変化が認められた。

脾臓にはヘモジデリンの沈着と髄外造血がすべての動物に認められた。ヘモジデリンの沈着の程度は軽度が 10 匹で、髄外造血の程度は中等度が 2 匹、軽度が 8 匹であった。

前胃には扁平上皮に過形成が 6 匹の動物に認められ、その程度は中等度が 3 匹、軽度が 3 匹であった。このうち、1 匹の動物には中等度の糜爛が認められた。

膀胱には移行上皮に軽度の腫脹が 7 匹の動物に認められた。

[1280 ppm 群 : 10 匹]

脾臓、胃（前胃）及び膀胱に変化が認められた。

脾臓には軽度のヘモジデリンの沈着が 5 匹の動物に認められ、軽度の髄外造血が 9 匹の動物に認められた。

前胃には扁平上皮に軽度の過形成が 2 匹の動物に認められた。

膀胱には移行上皮に軽度の腫脹が 2 匹の動物に認められ、軽度の過形成が 1 匹の動物に認められた。

[512 ppm 群 : 10 匹]

被験物質の影響と思われる所見は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

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を決定することを目的として、2-アミノ-4-クロロフェノールを B6D2F1/Crlj マウスに 13 週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

本試験は、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、3200、8000 及び 20000 ppm（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。

(1) 用量－反応関係

2-アミノ-4-クロロフェノールの投与の結果、一般状態（生死）、体重、血液、胃、膀胱及び肝臓に投与の影響が認められた。

動物の死亡が雄では 20000、1280 及び 512 ppm 群で各 1 匹、雌では 20000 ppm 群に 3 匹みられた。死亡動物のうち、雄の 1280 ppm と 512 ppm 群の動物の死因は自然発生病変の水腎症であり、被験物質の投与との関係は無いものと考えられ、投与に起因すると考えられる死亡は 20000 ppm 群の雄の 1 匹と雌の 3 匹であった。

体重増加の抑制が雄の 20000 ppm 群にのみ認められ、体重値は対照群の 79～92 %で推移し、最終体重は対照群の 85%であった。その他の群は、対照群と比較して大きな差は認められなかった。

血液への影響として、雌雄とも 20000 ppm 群で貧血を示す赤血球数及びヘマトクリット値の減少がみられた。赤血球数等の変化により、MCH 及び MCHC の値が変化した。また、貧血に対する反応性変化と考えられる網赤血球比の増加も認められた。これらの貧血に関連した血液学的検査項目の変化は、雌雄とも 8000 ppm 群でも認められた。この貧血は、ラットにおける 13 週間混餌経口投与試験（文献 6）でメトヘモグロビン濃度が増加していることから、被験物質の投与によりメトヘモグロビンが増加し、脾臓で細網細胞により赤血球の破壊が亢進したことに起因すると考えられた。貧血に係る所見は病理組織学検査でも認められた。すなわち、崩壊した赤血球のヘモグロビンに由来するヘモジデリンの沈着が、脾臓では雄の 3200 ppm 以上、雌は 1280 ppm 以上の群にみられ、肝臓では雌雄の 20000 ppm 群の定期解剖動物に認められた。貧血に対する代償性変化である脾臓での髓外造血の増加は雌雄とも 1280 ppm 以上の群で認められ、脾臓重量は雌雄とも 8000 ppm 以上の群で増加した。また、20000 ppm 群の雌雄に認められた血液生化学的検査の総ビリルビンの増加も、崩壊した赤血球のヘモグロビンに由来するものと考えられた。なお、本試験で認められた貧血に関連した変化を本試験の予備試験として行った 2 週間試験（投与濃度は雌雄ともに

1280、3200、8000、20000、50000 ppm) (文献 4) の結果と比較すると、貧血を示す血液学的検査項目の変化は 2 週間試験及び本試験とも 8000 ppm 以上の群で認められたが、貧血に関連した脾臓の髄外造血等の変化が本試験では 1280 ppm 群まで認められていることから、投与期間の延長により低濃度においても血液への影響があったことが示唆された。

胃(前胃)には、重度の扁平上皮の過形成が雌雄の 20000 ppm 群のすべての生存動物に認められた。雌の 8000 ppm 群でもすべての動物に過形成が認められ、そのうちの 2 匹は重度であった。扁平上皮の過形成は、雌雄とも 1280 ppm 群まで認められた。前胃の扁平上皮の過形成は、被験物質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 7)。

膀胱には、雌雄とも 1280 ppm 以上の群に移行上皮細胞の腫脹と過形成が認められた。さらに、雌の 20000 ppm 群では、移行上皮の壊死と炎症性細胞の浸潤もみられた。膀胱の腫脹は予備試験の 2 週間試験(文献 4)でも雌雄の 8000ppm 以上の群に認められた。本試験では、1280 ppm 群まで膀胱の変化が認められることから投与期間の延長により低濃度においても膀胱への影響が起きていることが示唆された。なお、腎臓重量は雌雄とも 20000 ppm 群で増加した。

肝臓では、小葉中心性の肝細胞の腫脹が雄の 8000 ppm 以上の群にみられた。また、肝臓重量の増加が雌雄とも 20000 ppm に認められた。

(2) 無毒性量 (NOAEL)

2-アミノ-4-クロロフェノール 13 週間混餌投与による影響の中で最も低い用量まで認められた変化は血液、胃及び膀胱への影響であり、これらの変化は雌雄ともに 1280 ppm 群(脾臓のヘモジデリン沈着(雌のみ)と髄外造血、前胃の過形成、膀胱の移行上皮の過形成と腫脹)まで認められた。なお、512 ppm 群でも雌雄各 2 匹に髄外造血が認められたが、対照群でも雌雄各 1 匹に髄外造血が認められているため、512 ppm 群の髄外造血は投与に関連した明らかな影響とは考えられなかった。従って、本試験における 13 週間の経口投与による無毒性量 (NOAEL) は、血液、胃及び膀胱への影響をエンドポイントとして 512 ppm (雄: 70 mg / kg body weight per day、雌: 87 mg / kg body weight per day) であると考えた。

(3) がん原性試験の濃度決定

本試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように決定した。濃度設定は主に本試験でみられた所見の中で 2 年間の投与期間における動物の生存率に影響を及ぼす可能性があると考えられる所見、すなわち、一般状態(生死)、体重、貧血及び前胃や尿路系の病変と各所見の程度を考慮して行った。

雄では、20000 ppm 群で被験物質の投与による死亡が 1 匹認められたことから、この濃度でのがん原性試験の実施は不相当と考えられた。8000 ppm 群では死亡動物は認められず、体重増加の抑制も認められなかった。所見としては貧血、前胃の過形成、膀胱の腫脹並びに過形成等が認められたが、何れも重篤と呼べるものはなかった。しかし、膀胱の移行上皮の

過形成と腫脹は長期投与において膀胱の移行上皮とほぼ同じ組織構造を持つ尿管や尿道に同様の病変が発生する可能性も否定できない。このため、8000 ppm の濃度は2年間の長期投与を実施した場合、尿路系に大きな負担がかかり、動物の生存率に影響を与える可能性が考えられ、がん原性試験の実施用量としては不適切であると考えられた。3200 ppm 群では、死亡動物はみとめられず、貧血に関連する血液検査の項目にも変化は認められなかった。病理組織学的検査では前胃の過形成、膀胱の腫脹等が認められたが、ほとんどが軽度であった。以上のことから、3200 ppm 以下の濃度でのがん原性試験を実施した場合、寿命に影響を与えるような重篤な毒性は出現しないものと考えられ、雄の2年間の経口（混餌）投与によるがん原性試験の最大耐量は3200 ppm と推察された。

雌では、20000 ppm 群で被験物質の投与による死亡が3匹認められたことから、この濃度でのがん原性試験の実施は不適当と考えられた。8000 ppm 群では死亡動物は認められず、体重増加の抑制も認められなかった。しかし、軽度の貧血、前胃の過形成、脾臓の髄外造血、膀胱の腫脹並びに過形成等が認められ、前胃の過形成と脾臓の髄外造血については程度が重度であった動物が複数匹認められた。このため8000 ppm の濃度でがん原性試験の実施した場合、生存率に影響を与えると考えられ、実施用量としては不適切であると考えられた。3200 ppm 群では、死亡動物はみとめられず、貧血に関連する血液検査の項目にも変化は認められなかった。病理組織学的検査では前胃の過形成、膀胱の腫脹等が認められたが、重篤なものはなかった。以上のことから、3200 ppm 以下の濃度でのがん原性試験を実施した場合寿命に影響を与えるような重篤な毒性は出現しないものと考えられ、雌の2年間の経口（混餌）投与によるがん原性試験の最大耐量は3200 ppm と推察された。

従って、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。

V 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. 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. 日本バイオアッセイ研究センター. 2004. 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 2 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.
5. 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.
6. 日本バイオアッセイ研究センター. 2005. 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 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. 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.