

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

試験番号：0579

CAS No. 95-85-2

2008年9月30日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

標題

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

試験目的

2-アミノ-4-クロロフェノールをラットに104週間経口(混餌)投与し、がん原性を検索した。

試験法

本試験は、平成9年3月11日付け、基発第144号「がん原性試験による調査の基準」及びOECD化学品テストガイドライン451(発癌性試験 1981年5月12日採択)に準じて実施した。

GLP対応

本試験は、昭和63年9月1日付け、労働省告示第76号「試験施設等が具備すべき基準(安衛法GLP)」(一部改正。平成12年3月29日付け、労働省告示第13号)に準拠し、OECD GLP(1997年11月26日採択)に準じて実施した。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課
東京都千代田区霞ヶ関1-2-2

試験施設及び運営管理者

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
副所長 長野 嘉介
神奈川県秦野市平沢2445

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

試験番号：0579

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	3
I-1 被験物質の性状等	3
I-1-1 名称等	3
I-1-2 構造式及び分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質の使用ロット等	3
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	4
I-3-1 特性・同一性	4
I-3-2 安定性	4
I-4 試験動物	4
II 試験方法	5
II-1 投与	5
II-1-1 投与経路	5
II-1-2 被験物質の投与方法	5
II-1-3 投与期間	5
II-1-4 投与濃度	5
II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法	6
II-1-7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性 ..	6
II-1-8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性	7
II-1-9 被験物質の摂取量	7

Ⅱ-2	動物管理	7
Ⅱ-2-1	各群の使用動物数	7
Ⅱ-2-2	群分け及び個体識別方法	7
Ⅱ-2-3	飼育条件	8
(1)	飼育環境	8
(2)	飼料	8
(3)	飲水	8
Ⅱ-3	観察・検査項目及び方法	9
Ⅱ-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	9
Ⅱ-3-2	体重測定	9
Ⅱ-3-3	摂餌量測定	9
Ⅱ-3-4	血液学的検査	9
Ⅱ-3-5	血液生化学的検査	9
Ⅱ-3-6	尿検査	10
Ⅱ-3-7	病理学的検査	10
(1)	剖検	10
(2)	臓器重量	10
(3)	病理組織学的検査	10
Ⅱ-4	数値処理と統計方法	10
Ⅱ-4-1	数値の取り扱いと表示	10
Ⅱ-4-2	統計処理	11
Ⅲ	試験成績	13
Ⅲ-1	生死状況	13
Ⅲ-2	一般状態	13
Ⅲ-3	体重	13
Ⅲ-4	摂餌量	14
Ⅲ-5	被験物質摂取量	14
Ⅲ-6	血液学的検査	15
Ⅲ-7	血液生化学的検査	15
Ⅲ-8	尿検査	15

III-9 病理学的検査	15
III-9-1 剖検	15
III-9-2 臓器重量	16
III-9-3 病理組織学的検査	17
III-9-4 死因	19
IV 考察及びまとめ	21
IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量	21
IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	21
IV-3 その他の影響	22
IV-4 量-反応関係	23
IV-5 投与濃度設定の評価	23
IV-6 他文献との比較等	23
V 結論	24
VI 文献	25
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	27

要約

2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j (旧 F344/DuCrj) ラットを用いた混餌経口投与による 2 年間 (104 週間) の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、雌雄各群とも 50 匹とし、合計 400 匹を用いた。被験物質の投与は、2-アミノ-4-クロロフェノールを混合した粉末飼料を動物に自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも 1280、3200 及び 8000 ppm (重量比 w/w) の 3 段階 (公比 2.5) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

雌雄とも被験物質の投与による生存率の低下は認められなかった。体重は、投与群に低値が散見され、104 週目の雌雄 8000 ppm 群の体重抑制率は、対照群と比較して、雄が 5%、雌が 13%であった。摂餌量は、雌の 8000 ppm 群で僅かな低値が認められた。一般状態の観察では、雌雄とも投与群に被毛の着色が観察された。

腫瘍の発生増加は、雄では前胃 (扁平上皮癌及び扁平上皮乳頭腫) と膀胱 (移行上皮癌) にみられ、雌では前胃 (扁平上皮乳頭腫) にみられた。これらの腫瘍の発生増加が認められた濃度は、前胃腫瘍が雄の 1280 ppm 以上、雌の 8000 ppm、膀胱腫瘍が雄の 8000 ppm であった。また、前胃腫瘍の過形成が雄の 3200 ppm 以上と雌の 8000 ppm でみられた。

腫瘍以外には、血液系に対する影響として雌で貧血傾向 (赤血球数の低値など) が 3200 ppm 以上の群で認められ、脾臓のヘモジデリンの沈着と脾臓重量が 8000 ppm 群で増加した。

以上のように、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた 2-アミノ-4-クロロフェノールの 2 年間 (104 週間) にわたる経口投与によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雄に前胃の扁平上皮癌と扁平上皮乳頭腫及び膀胱の移行上皮癌の発生増加が認められ、雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠である。雌には前胃の扁平上皮乳頭腫の発生増加が認められ、雌ラットに対するがん原性を示す証拠である。

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

		投与濃度 (ppm)	0	1280	3200	8000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		検査動物数	50	50	50	50		
良性 腫瘍	皮下組織	線維腫	9	6	7	3		
	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	3	0	1		
	前胃	扁平上皮乳頭腫	0	2	11 **	39 **	↑↑	↑↑
	肝臓	肝細胞腺腫	1	4	1	3		
	膵臓	島細胞腺腫	2	4	6	3		
	膀胱	移行上皮乳頭腫	0	0	1	0		
	下垂体	腺腫	13	10	12	6		
	甲状腺	C-細胞腺腫	8	7	3	2 *		↓
	副腎	褐色細胞腫	1	8 *	5	4		
	精巣	間細胞腫	30	38	35	35		
	乳腺	線維腺腫	2	0	1	3		
	包皮腺	腺腫	0	4	1	3		
	悪性 腫瘍	脾臓	単核球性白血病	9	3	0 **	1 **	
前胃		扁平上皮癌	0	0	0	12 **	↑↑	↑↑
膀胱		移行上皮癌	0	0	0	7 **	↑↑	↑↑
甲状腺		C-細胞癌	1	3	2	4		
腹膜		中皮腫	1	2	3	4		
	前胃	扁平上皮乳頭腫+ 扁平上皮癌	0	2	11 **	43 **	↑↑	↑↑
	膀胱	移行上皮乳頭腫+ 移行上皮癌	0	0	1	7 **	↑↑	↑↑

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

		投与濃度 (ppm)	0	1280	3200	8000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		検査動物数	50	50	50	50		
良性 腫瘍	前胃	扁平上皮乳頭腫	1	1	1	25 **	↑↑	↑↑
	下垂体	腺腫	9	7	10	10		
	甲状腺	C-細胞腺腫	1	5	2	4		
	子宮	内膜間質性ポリープ	7	6	3	4		
	乳腺	線維腺腫	7	6	7	3		
悪性 腫瘍	脾臓	単核球性白血病	6	2	0 *	1		↓
	前胃	扁平上皮癌	0	0	0	2		
	前胃	扁平上皮乳頭腫+ 扁平上皮癌	1	1	1	25 **	↑↑	↑↑

* : $p \leq 0.05$ で有意** : $p \leq 0.01$ で有意

(Fisher 検定)

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加↑↑ : $p \leq 0.01$ で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓ : $p \leq 0.05$ で有意減少↓↓ : $p \leq 0.01$ で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

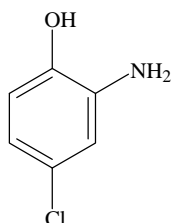
I-1-1 名称等

名 称： 2-アミノ-4-クロロフェノール (2-Amino-4-chlorophenol)

CAS No. : 95-85-2

I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 143.57

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 灰色または茶色の結晶性粉末

比 重 : 0.88

融 点 : 137°C

溶 解 性 : アルコールに易溶、水に難溶(3g/L 25°C)

保 管 条 件 : 冷暗所

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : CEQ0194 (2005/3/28~2005/9/20)

SDM0599 (2005/9/19~2006/7/25)

LTM0601 (2006/7/24~2007/4/1)

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

純 度 : 99.1~100.6% (和光純薬工業(株) 検査成績書データ)

I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性は、ロットごとにマススペクトルを質量分析計（アジレントテクノロジー 5989B）を用いて測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（株式会社島津製作所 FTIR-8200PC）を用いて測定し、それぞれの文献値と比較することにより確認した。

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

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

I-3-2 安定性

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

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

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示した。

I-4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の F344/DuCrIj (旧 F344/DuCrj) ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 227 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 200 匹（投与開始時体重範囲、雄：118～140g、雌：93～106g）を選別し、試験に用いた。

なお、F344/DuCrIj ラット (SPF) を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることによる。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

投与経路は経口投与とした。

II-1-2 被験物質の投与方法

投与は、被験物質を粉末飼料に添加し、設定濃度に調製した被験物質混合飼料を粉末飼料用給餌器に充填し、動物に自由摂取させた。なお、被験物質混合飼料の交換は週に 2 回実施した。

II-1-3 投与期間

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

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、雌雄ともに 1280、3200 及び 8000 ppm（実重量比 w/w）の 3 段階（公比 2.5）に設定した。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は、常温で固体であり、かつ、水に難溶であるため、混餌による経口投与とした。

投与期間は、がん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献 4）及び OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験）（文献 5）に従い、2 年間（104 週間）とした。

各群の投与濃度は 13 週間混餌経口投与試験（試験番号 0549）の結果（文献 6）をもとに設定した。

試験には F344/DuCrIj ラット(SPF)を用いた。被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群の構成で、雌雄各群とも 10 匹とし、合計 120 匹のラットを用いた。被験物質の投与は、2-アミノ-4-クロロフェノールを混合調製した粉末飼料を動物に 13 週間自由摂取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) の 5 段階を設定した。観察、検査として、一般状態の観察、体重・摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

13 週間試験の結果、全ての投与群で死亡はみられなかった。20000 ppm 群では、雄の体重増加の抑制が 14%であり、この濃度は雄ラットに対しての最大耐用量 (MTD: Maximum Tolerated Dose) を越えているものと考えられた。20000 ppm 群の雌では、体重抑制の程度は 7%であったが、血液学的検査でメトヘモグロビン濃度の増加を伴う貧血がみられ、病理組織学的検査では、前胃に重度の過形成が全ての動物にみられた。このため、2 年間の連続投与により、ラット雌雄の寿命に関わる毒性が出現する可能性が危惧され、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、雄でのみ 5%の僅かな体重増加の抑制がみられ、雌雄ともに血液学的検査でメトヘモグロビン濃度の上昇や貧血を示すパラメーターの変化がみられた。また、病理組織学的検査では、雌雄ともに脾臓、胃及び腎臓に変化が認められた。しかし、8000 ppm 群でみられた血液学的検査及び病理組織学的検査所見は、動物の寿命に影響を与える程の変化とは考えられなかった。

従って、2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 8000 ppm を最高投与濃度とし、以下 3200 及び 1280 ppm(公比 2.5)の合計 3 段階の濃度を設定した。

II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

粉末飼料(オリエンタル酵母工業(株)製 CRF-1)と被験物質をスパイラルミキサー (関東混合機工業(株) SS-251) で攪拌混合し、1280、3200 及び 8000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。また、被験物質混合飼料の調製は、投与開始前日(2005 年 3 月 28 日)より原則として、2 週に 1 回調製し、1 回分をラット用餌箱に充填して翌日より動物に与えた。残余は、1 回の餌箱交換に必要な量を濃度ごとにビニール袋に小分け密閉し、使用時まで冷蔵で保管した。なお、試験における濃度の表示は ppm (w/w) とした。

II-1-7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性

被験物質混合飼料中における被験物質の濃度は、初回調製時及び 3 ヶ月ごとに、各投与濃度ごとに調製容器内の被験物質混合飼料を 3 点サンプリングし、クロマトグラムを高速液体クロマトグラフ(株島津製作所 LC-10)を用いて測定し、確認した。なお、初回調製時のサンプリングは各濃度につき 7 点とし、均一性の確認を合わせて行った。

その結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対して 93.4~106%の範囲にあった。均一性は、各群ともばらつきが少なかった。従って、被験物質混合飼料中の被験物質は、設定濃度に対してほぼ正確に調製されたことを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 2-1、均一性については APPENDIX 2-2 に示した。

II-1-8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性

被験物質混合飼料中の被験物質の安定性は、2-アミノ-4-クロロフェノールのマウスを用いるがん原性試験(試験番号：0580)と合わせて行った。投与開始前に最高投与濃度の 8000 ppm とマウスの試験の最低投与濃度である 512 ppm の被験物質混合飼料をラット用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管(4日間)したものと、ビニール袋に密閉し、11日間冷蔵保管したものを高速液体クロマトグラフ(株島津製作所 LC-10)を用いて測定した。

その結果、調製時の濃度を 100%とした場合に、室温保管(4日間)では、512 ppm : 90.5%、8000 ppm : 95.8%、11日間の冷蔵保管で 512 ppm : 95.7%、8000 ppm : 97.4%であり、給餌期間中及び冷蔵保管中における被験物質混合飼料中の被験物質はほぼ安定であった。

その結果を APPENDIX 2-3 に示した。

II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より、被験物質の体重 kg 当たりの 1 日摂取量 (g/kg body weight per day) を算出した。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群名称	動物数 (動物番号)	群名称	動物数 (動物番号)
対照群	50 匹 (1001~1050)	対照群	50 匹 (2001~2050)
1280 ppm 群	50 匹 (1101~1150)	1280 ppm 群	50 匹 (2101~2150)
3200 ppm 群	50 匹 (1201~1250)	3200 ppm 群	50 匹 (2201~2250)
8000 ppm 群	50 匹 (1301~1350)	8000 ppm 群	50 匹 (2301~2350)

II-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、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 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：203室、雌：205室）に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

II-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

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

温度：23±2℃ <203室；22.9±0.3℃、205室；22.8±0.3℃>

湿度：55±15% <203室；56±2%、205室；56±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(170(W)×294(D)×176(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、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)行った。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重(搬出時体重)を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

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

II-3-4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりEDTA-2カリウム入り採血管に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法はAPPENDIX 3に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法はAPPENDIX 3に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、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

II-3-6 尿検査

投与 104 週の検査時まで生存した動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス、シーメンスメディカルソリューションズ・ダイアグノスティックス）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、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、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

体重は g を単位とし、整数値の 1 の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値か

ら残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

被験物質の体重 kg 当たりの1日摂取量は、摂餌量に被験物質の設定濃度を乗じ、体重で除した値を、g/kg body weight per day を単位として小数点以下第4位を四捨五入し、小数点以下第3位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第3位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第4位を四捨五入し、小数点以下第3位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と精度により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

II-4-2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。

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

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1~4 に分け、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との χ^2 検定を行った。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担腫瘍臓器数について、Peto 検定（文献 8）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法（コンテックス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法+有病率法（コンテックス 0~4 の総計で検定）を行った。

各検定は 5%の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5%及び 1%の有意水準の表示を行った。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖動物にみつかった腫瘍

- 1：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍
- 2：多分 1 だと思うが、確かでない腫瘍
- 3：多分 4 だと思うが、確かでない腫瘍
- 4：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係っていた腫瘍

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

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

—雄—

投与群の生存率に投与による影響は認められなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：33 匹（66%）、1280 ppm 群：38 匹（76%）、3200 ppm 群：39 匹（78%）、8000 ppm 群：39 匹（78%）であった。

—雌—

投与群の生存率に投与による影響は認められなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：42 匹（84%）、1280 ppm 群：45 匹（90%）、3200 ppm 群：46 匹（92%）、8000 ppm 群：40 匹（80%）であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示した。

—雄—

主に投与期間の初期から中期にかけて被毛の着色が 8000 ppm 群で 14 匹、3200 ppm で 1 匹の動物に認められた。また、投与期間の後期には白内障が増加傾向を示した（対照群 4 匹、1280 ppm 群 4 匹、及び 3200 ppm 群 3 匹、8000 ppm 群 13 匹）。

—雌—

主に投与期間の初期から中期にかけて被毛の着色が 8000 ppm 群で 40 匹、3200 ppm で 14 匹、1280 ppm で 5 匹の動物に認められた。その他に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。

Ⅲ-3 体重

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

—雄—

8000 ppm 群（投与開始後：1~90 週）と 1280 ppm（投与開始後：4~62 及び 70 週）では対照群と比較して体重の低値がみられた。

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、1280 ppm 群：101%、3200 ppm 群：103%、8000 ppm 群：95%であった。

—雌—

8000 ppm 群（投与開始後：1~104 週）と 3200 ppm（投与開始後：50 及び 74~104 週）

では対照群と比較して体重の低値がみられた。

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、1280 ppm 群：100%、3200 ppm 群：93%、8000 ppm 群：87%であった。

III-4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1~4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

—雄—

主に投与期間初期に全ての投与群に対照群と比較して摂餌量の低値が散見された。

投与期間中の各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：15.7g、1280 ppm 群：15.3g（97%）、3200 ppm 群：15.2g（97%）、8000 ppm 群：15.1g（96%）であった。

—雌—

8000 ppm 群では主に投与期間中期から終期にかけて、摂餌量の低値がみられた。また、3200 ppm 群では主に投与期間終期に対照群と比較して摂餌量の低値が散見された。

投与期間中の各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：11.3g、1280 ppm 群：11.6g（103%）、3200 ppm 群：11.0g（97%）、8000 ppm 群：10.6g（94%）であった。

III-5 被験物質摂取量

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

—雄—

各投与群における週毎の被験物質摂取量（g/kg body weight per day）の平均値は、1280 ppm 群：0.044~0.113（全投与期間の平均値：0.059）、3200 ppm 群：0.104~0.282（全投与期間の平均値：0.144）、8000 ppm 群：0.285~0.706（全投与期間の平均値：0.373）の範囲にあった。

全投与期間にわたって平均した各投与群の被験物質摂取量の比は、ほぼ設定用量比（公比 2.5）と一致した。

—雌—

各投与群における週毎の被験物質摂取量（g/kg body weight per day）の平均値は、1280 ppm 群：0.059~0.118（全投与期間の平均値：0.075）、3200 ppm 群：0.148~0.291（全投与期間の平均値：0.184）、8000 ppm 群：0.383~0.742（全投与期間の平均値：0.469）の範囲にあった。

全投与期間にわたって平均した各投与群の被験物質摂取量の比は、ほぼ設定用量比（公比 2.5）と一致した。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

—雄—

白血球数の高値が 8000 ppm 群で認められた。その他、赤血球数の高値と網赤血球比の低値が 1280 及び 3200 ppm 群で認められ、また、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び単球比の高値が 3200 ppm 群で認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

なお、8000 ppm 群の白血球数の平均値は対照群の値より低値であったが、対照群には極めて高値を示す動物がおり、統計学的には 8000 ppm 群の白血球数は有意な高値であった。

—雌—

赤血球数と MCHC の低値、MCV、血小板数及び網赤血球比の高値が 3200 ppm 以上の群で認められ、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の低値及び MCH とリンパ球比の高値が 8000 ppm 群で認められた。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

—雄—

γ -GTP、尿素窒素、カリウム及び無機リンの高値が 8000 ppm 群で認められた。

—雌—

アルブミン、A/G 比及び γ -GTP の高値が 8000 ppm 群で認められた。

Ⅲ-8 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

—雄—

pH の上昇が 3200 ppm 群に認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

pH の上昇が 3200 ppm 群、低下が 1280 ppm 群に認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-9 病理学的検査

Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を TABLE I 1~6 に示した。

—雄—

前胃の結節、精巢の結節、眼球の白色、腹膜の結節及び腹水が投与群で多く認められた。前胃の結節の発生数は対照群:0 匹、1280 ppm 群: 3 匹、3200 ppm 群:9 匹、8000 ppm 群:41 匹であった。また、皮下組織の腫瘤と脾臓の腫大の発生数は投与群の方が少なかった。

—雌—

前胃の結節が投与群で多く認められた。前胃の結節の発生数は対照群:1 匹、1280 ppm 群: 1 匹、3200 ppm 群:5 匹、8000 ppm 群:32 匹であった。また、皮下組織の腫瘤の発生数は投与群の方が少なかった。

III-9-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示した。

—雄—

腎臓の実重量の高値が 3200 ppm 以上の群、体重比の高値が 8000 ppm 群で認められた。その他、脳の体重比の高値が 8000 ppm 群でみられたが、脳の変化は搬出時体重の低値に起因する変化と考えられた。また、副腎の実重量の低値が 8000 ppm 群でみられたが、副腎の体重比に差を認めないことから、実重量の変化は投与による影響とは考えなかった。3200 ppm 群では肺と脾臓の体重値の低値が認められたが、これらは投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

脾臓の実重量と体重比の高値が 8000 ppm 群で認められた。その他、心臓、肺の体重比の高値が 8000 ppm 群で、腎臓、脳の体重比の高値が 3200 ppm 以上の群でみられ、これらの変化は 3200 ppm 以上の群の搬出時体重の低値に起因する変化と考えられた。また、3200 ppm 以上の群で副腎の実重量の低値が認められたが、これらの群の副腎の体重比に差を認めないことから、実重量の変化は投与による影響とは考えなかった。一方、肝臓では、体重比の高値が 8000 ppm 群で、実重量の低値が 3200 ppm 群でみられた。肝臓の 8000 ppm 群の体重比の高値は、この群の実重量に差を認めないことから、搬出時体重の低値に起因する変化と考えられた。肝臓の 3200 ppm 群の実重量の低値は、この群の体重比に変化がないことから投与による影響かは不明であった。

なお、3200 ppm 群の副腎の実重量の平均値は対照群よりも高値であったが、これは 3200 ppm 群に悪性褐色細胞腫により副腎重量の極端な高値を示す動物が 1 匹いたためであり、統計学的には有意な低値であった。

Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

検査結果のうち非腫瘍性病変を TABLE L 1~6 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を TABLE M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を TABLE N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE O 1, 2 に、転移性病変を TABLE P 1, 2 に示した。また、本試験でみられた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ (試験毎の発生率 (最小%~最大%) と平均発生率(%), 発生匹数/総匹数) を TABLE Q 1,2 に示した。

— 雄 —

1) 腫瘍性病変

< 胃 >

前胃の扁平上皮癌 (対照群:0 匹,0%、1280 ppm 群: 0 匹,0%、3200 ppm 群: 0 匹,0%、8000 ppm 群:12 匹,24%) の発生は、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 8000 ppm 群に増加がみられた。扁平上皮癌の 8000 ppm 群における発生は、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 2%、平均発生率 0.2%) を超えており、被験物質の投与によるものと考えられた。また、扁平上皮乳頭腫の発生 (対照群:0 匹,0%、1280 ppm 群: 2 匹,4%、3200 ppm 群: 11 匹,22%、8000 ppm 群:39 匹,78%) が Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3200 及び 8000 ppm 群で増加がみられた。すべての投与群における扁平上皮乳頭腫の発生は、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 2%、平均発生率 0.2%) を超えていた。さらに、扁平上皮癌と扁平上皮乳頭腫を合わせた発生 (対照群:0 匹,0%、1280 ppm 群: 2 匹,4%、3200 ppm 群: 11 匹,22%、8000 ppm 群:43 匹,86%) も Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3200 及び 8000 ppm 群で増加がみられた。すべての投与群における扁平上皮癌と扁平上皮乳頭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 2%、平均発生率 0.4%) を超えていた。従って、扁平上皮癌と扁平上皮乳頭腫の発生は被験物質の投与によるものと考えられた。

なお、扁平上皮腫瘍及び過形成は International Classification of Rodent Tumours. (文献 9) の診断基準に基づいて診断した。扁平上皮乳頭腫は、内腔に有茎性に突出する腫瘍であり、角化を示す扁平上皮の形態を示す腫瘍細胞が樹枝状に分岐した間質を伴って増殖していた。扁平上皮癌は角化傾向を示す高分化型であった。粘膜固有層や粘膜下織への腫瘍組織の浸潤が認められたため悪性と診断した。また、多くの例で潰瘍を伴っていた。

< 膀胱 >

移行上皮癌の発生 (対照群:0 匹,0%、1280 ppm 群: 0 匹,0%、3200 ppm 群: 0 匹,0%、8000 ppm 群:7 匹,14%) は、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示

し、Fisher 検定で 8000 ppm 群に増加がみられた。移行上皮癌は当センターのヒストリカルコントロールデータではこれまで観察されていない稀な腫瘍である。従って、この膀胱腫瘍の増加は、被験物質の投与によるものと考えられた。また、3200 ppm には移行上皮乳頭腫が 1 匹に認められたが、統計的に有意差はなく、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 4%、平均発生率 0.5%）内にあった。

なお、移行上皮腫瘍は Guides for Toxicologic Pathology. (文献 10) の診断基準に基づいて診断した。移行上皮癌は膀胱内腔に乳頭状に突出した移行上皮により構成される腫瘍であり、不規則な多層化を示す事から悪性と診断した。

その他、投与群では脾臓の単核球性白血病と甲状腺の C-細胞腺腫の発生減少がみられた。

なお、副腎の褐色細胞腫の発生（対照群:1 匹,2%、1280 ppm 群: 8 匹,16%、3200 ppm 群: 5 匹,10%、8000 ppm 群:4 匹,8%）は、Fisher 検定で 1280 ppm 群で増加がみられた。しかし、有意な発生増加は低濃度群のみであり、また、そ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内（最小 0%～最大 40%、平均発生率 11.5%）であることから、1280 ppm 群での褐色細胞腫の発生増加は投与の影響ではないと考えられた。剖検で観察数に変化がみられた精巣の結節、腹膜の結節及び皮下の腫瘤などと関連があると思われる特定の腫瘍性病変の増減はみられなかった。

2) 非腫瘍性病変

<胃>

前胃の過形成の発生が 3200 及び 8000 ppm 群で増加した。過形成は扁平上皮細胞の増殖による上皮層の肥厚であり、瀰漫性または限局性にみられた。特に、増殖の強いものでは、基底細胞の増生を伴っており、上皮が乳頭状に突出して増殖するものもみられた。扁平上皮乳頭腫とは樹枝状に分岐した間質を伴っていない点で鑑別した。

その他、網膜萎縮の発生減少が全ての投与群に認められた。また、肝臓の胆管増生の程度が 8000 ppm 群で減少した。

なお、前胃の潰瘍と腺胃の糜爛が 1280 ppm 群で減少したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。また、剖検で投与群に眼球の白色が多くみられたが、病理組織学検査では、白内障の発生には差は認められなかった。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<胃>

前胃の扁平上皮乳頭腫(対照群:1匹,2%、1280 ppm 群: 1匹,2%、3200 ppm 群: 1匹,2%、8000 ppm 群:25匹,50%)の発生は、Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 8000 ppm 群に増加がみられた。8000 ppm 群における扁平上皮乳頭腫の発生は、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2%、平均発生率0.2%)を超えていた。従って、扁平上皮乳頭腫の発生増加は被験物質の投与によるものと考えられた。上記腫瘍に加えて、8000 ppm 群では扁平上皮乳癌の発生が2匹認められている。この悪性腫瘍は当センターのヒストリカルコントロールデータではこれまで観察されていない稀な腫瘍である。従って、8000 ppm 群における扁平上皮癌の発生は投与の影響によるものと考えられた。さらに、扁平上皮癌と扁平上皮乳頭腫を合わせた発生も Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 8000 ppm 群に増加がみられた。従って、扁平上皮癌と扁平上皮乳頭腫の発生は被験物質の投与によるものと考えられた。扁平上皮癌と扁平上皮乳頭腫の組織像は雄と同様であった。

その他、脾臓の単核球性白血病の発生減少がみられた。なお、剖検で観察数に変化がみられた皮下の腫瘍と関連があると思われる特定の腫瘍性病変の増減はみられなかった。

2) 非腫瘍性病変

<胃>

前胃の過形成の発生が 8000 ppm 群で増加した。扁平上皮過形成の組織像は雄と同様であった。

<脾臓>

ヘモジデリンの沈着が 8000 ppm 群で増加した。

その他、肝臓の胆管増生、骨の骨硬化症及び鼻腔の嗅上皮と呼吸上皮のエオジン好性変化の発生が 8000 ppm 群で減少または程度が減弱した。

なお、眼球の網膜萎縮は 1280 及び 3200 ppm 群で減少したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

III-9-4 死因

病理学的にみた死亡/瀕死の原因を TABLE R に示した。

—雌雄—

投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

IV 考察及びまとめ

2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いた 2 年間の混餌投与による経口試験（投与濃度：1280、3200 及び 8000 ppm）によって、下記の結果を得た。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

生存率に 2-アミノ-4-クロロフェノールの投与による影響はみられなかった。

一般状態の観察では、被毛の着色が雄の 3200 ppm 以上の群、雌の全ての投与群で投与期間中頃まで認められた。また、雄の 8000 ppm 群では白内障が他の群より多くみられたが、病理組織学的検査では発生数に差は認められなかった。

体重は、投与群に低値が散見され、104 週目の雌雄 8000 ppm 群の体重抑制率は、対照群と比較して、雄が 5%、雌が 13%であった。

摂餌量は、雄には投与の影響が認められなかった。雌では 8000 ppm 群に僅かな低値が認められた。

なお、体重及び摂餌量から算出した各投与群の被験物質摂取量の平均値の比は、設定した用量比（2.5）にほぼ一致した。

IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雌雄の前胃と雄の膀胱に腫瘍の発生増加がみられた。

<前胃腫瘍>

雄では前胃の扁平上皮癌と扁平上皮乳頭腫の発生増加が認められた。両腫瘍の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えていた。また、扁平上皮癌は扁平上皮由来の悪性腫瘍である。従って、前胃の腫瘍の発生増加は雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。前胃腫瘍が発生増加した濃度は 1280 ppm 以上であった。雌では扁平上皮乳頭腫の発生増加が認められた。この腫瘍は扁平上皮由来の良性腫瘍であり、その発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えていた。なお、悪性腫瘍である扁平上皮癌も雌の 8000 ppm で 2 匹に認められた。この悪性腫瘍は当センターのヒストリカルコントロールデータではこれまで観察されていない稀な腫瘍であり、投与による影響と考えられた。しかし、この腫瘍の発生は統計学的には有意でなかった。従って、前胃の腫瘍の発生増加は雌ラットに対するがん原性を示す証拠と考えられた。前胃腫瘍が発生増加した濃度は 8000 ppm であった。

前胃の過形成の発生増加が雄の 3200 ppm 以上の群、雌の 8000 ppm に認められた。また、本試験の予備試験として実施したラットの 13 週間混餌経口投与試験では雌雄とも 8000 ppm の濃度で前胃の過形成がみられ、2-アミノ-4-クロロフェノールによる直接刺激によるものと考

えられた(文献 6、11)。前胃の過形成は可逆性の病変であり、被験物質投与の中断によって腫瘍に進展しない場合もあると報告されている(文献 12)。一方、前胃における発がん過程の一連の経時的な組織変化として過形成から扁平上皮乳頭腫を経て扁平上皮癌が発生すると一般的に考えられている(文献 11,12)。本試験では、扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌とともに投与濃度に対応した過形成の発生が観察されており、2-アミノ-4-クロロフェノールによる前胃腫瘍における一連の変化と推察される。また、2-アミノ-4-クロロフェノールの 13 週間混餌経口投与試験(文献 6)において前胃の過形成が認められており、比較的早期に発生した前胃の過形成は、2 年間の連続投与によって扁平上皮乳頭腫とさらに扁平上皮癌に進展したものと考えられる。

<膀胱腫瘍>

雄に膀胱の移行上皮癌の発生増加が認められた。この腫瘍は移行上皮由来の悪性腫瘍であり、当センターのヒストリカルコントロールデータにおいてはその発生が稀である。従って、膀胱の腫瘍の発生増加は雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。膀胱腫瘍が発生増加した濃度は、8000 ppm であった。

当センターで実施したラットの 13 週間混餌経口投与試験では、20000 ppm の濃度で雌雄に移行上皮の腫脹、雄に移行上皮過形成がみられた(文献 6)。しかし、本試験では最高投与群の 8000 ppm でもこれらの所見は認められなかった。一方、投与期間の延長により移行上皮癌が雄に発生した。膀胱の移行上皮の過形成は移行上皮の損傷部における再生像であり可逆的な変化である場合もあるが、膀胱発がん物質の投与によって発現する乳頭状及び結節状過形成は腫瘍へと進展する前癌病変とみなされている(文献 13,14)。13 週間混餌経口投与では 20000 ppm の濃度に乳頭状及び結節状の増生形態を含む移行上皮過形成が観察されたが、膀胱腫瘍の発生がみられた 8000 ppm の濃度では 13 週間混餌経口投与試験及び本試験とも移行上皮過形成の発生増加が認められず、13 週間混餌経口投与で観察された移行上皮過形成と腫瘍発生の関連性が示唆されるものの必ずしも明らかではなかった。

IV-3 その他の影響

雌でのみ血液系に対する影響がみられた。3200 ppm 以上の群に血液学的検査で貧血傾向が認められ、8000 ppm 群では脾臓重量の増加や脾臓のヘモジデリン沈着の増加がみられた。しかし、血液/造血系臓器に腫瘍の発生増加はみられなかった。これらの変化は当センターで実施したラットの 13 週間混餌経口投与試験(文献 6)より、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る。13 週間試験では、本試験の最低投与濃度である 1280 ppm 群でも貧血を示唆する血液学的検査のパラメーターの変化が認められた。3200 ppm 以上の群では脾臓でヘモジデリン沈着に加えて赤血球充満もみられた。脾臓重量の増加は本試験と同じ 8000 ppm 以上の群でみられたが、同じく 8000 ppm 以上の群では、脾臓の髄外造血や腎臓のヘモジデリン沈着もみられた。従って、2-アミノ-4-クロロフェノールの血液/造血系

への影響は投与期間の延長によって増強せず、むしろ軽減したと考えられる。なお、雄では、13週間試験では、血液/造血系への影響がほぼ雌と同様に認められたが、本試験においては、関連する検査項目に変化はみられなかった。

IV-4 量-反応関係

本試験で腫瘍発生がみられた濃度は、前胃腫瘍が雄で 1280 ppm 以上、雌で 8000 ppm、膀胱腫瘍が雄で 8000 ppm であった。また、腫瘍以外の影響として、血液系への影響が雌の 3200 ppm 以上の濃度でみられた。

IV-5 投与濃度設定の評価

本試験の投与濃度は 13 週間試験（文献 6）の結果をもとに設定した。その結果、雄の最高投与濃度である 8000 ppm では、投与最終週における体重抑制率は対照群と比較して 5%であり、生存率も対照群と比較して低下していないことから MTD 基準（文献 15,16,17）を満たしていた。雌の最高投与濃度である 8000 ppm では、投与最終週における体重抑制率は 13%であったが、抑制率が 10%を超えたのは 74 週以降であり、生存率も低下していないことから、MTD の基準を満たしていると考えられた。

IV-6 他文献との比較等

- ① がん原性：2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いたがん原性試験、または長期試験の報告はみつからなかった。また、IARC では 2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性について評価を行っていない。
- ② 変異原性：2-アミノ-4-クロロフェノールはネズミチフス菌 (TA100、TA1537 及び TA1535) を用いた変異原性試験で代謝活性化の存在下で陽性を示している（文献 18,19）。培養細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験では、構造異常（+S9 処理、-S9 処理、24 時間処理、48 時間処理）及び数的異常（+S9 処理）が認められている（文献 20）。
- ③ 代謝：2-アミノ-4-クロロフェノールの代謝に関する報告はなかった。

V 結論

F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、2-アミノ-4-クロロフェノールの2年間（104週間）にわたる経口投与によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雄に前胃の扁平上皮癌と扁平上皮乳頭腫及び膀胱の移行上皮癌の発生増加が認められ、雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠である。雌には前胃の扁平上皮乳頭腫の発生増加が認められ、雌ラットに対するがん原性を示す証拠である。

VI 文献

1. 化学工業日報社. 2008. 15308 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 660.
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
3. 和光純薬工業(株). 2004. 2-アミノ-4-クロロフェノール, 赤外吸収スペクトル.
4. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発 第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日.
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies", Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. 日本バイオアッセイ研究センター. 2006. 2-アミノ-4-クロロフェノールの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. Mohr U, editor-in-chief. 1997. International Classification of Rodent Tumours. Part I: The Rat. 10. Digestive System. IARC Scientific Publications, No 122. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
10. Frith CH, Eighmy JJ, Fukushima S, Cohen SM, Squire RA, Chandra M. 1995. Proliferative lesions of the lower urinary tract in rats. In: Guides for Toxicologic Pathology. Washington, DC: STP/ARP/AFIP, 1-13.
11. 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.
12. Frantz JD, Betton G, Cartwright ME, Crissman JW, Macklin AW, Maronpot RR. 1991. Proliferative lesions of the non-glandular and glandular stomach in rats, GI-3. In: Guides for Toxicologic Pathology. Washington, DC:STP/ARP/AFIP, 1-20.
 13. Frith CH, Eighmy JJ, Fukushima S, Cohen SM, Squire RA, Chandra M. 1995. Proliferative lesions of the lower urinary tract in rats. In: Guides for Toxicologic Pathology. Washington, DC:STP/ARP/AFIP, 1-13.
 14. 福島昭治. 2000. 各論 9 章, 膀胱/尿管/尿道, 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，267-282.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Haseman JK. 1985. Issues in carcinogenicity testing: dose selection. *Fundam Appl Toxicol* 5: 66-78.
 18. 日本化学物質安全・情報センター編. 1997. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 東京：日本化学物質安全・情報センター, 補遺版, 57,98-100.
 19. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. 1988. Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. vol. 11. Supplement 12:1-158
 20. 日本化学物質安全・情報センター編. 2008. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 東京：日本化学物質安全・情報センター, 補遺 4 版, 54,178-179.

VII 予見することのできなか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

本試験において血液学的検査の一項目であつたメトヘモグロビン濃度測定が検査項目の事前確認の一部不徹底のために実施されなかつた。ただし、その他の血液学的検査項目及び貧血に関連する検査項目はすべて測定した。メトヘモグロビン濃度の測定は、本試験の濃度設定のための13週間混餌経口投与試験において貧血を示唆する幾つかのパラメーターに変化が認められたことから本試験の検査項目に加えた。しかし、本試験では雌の3200 ppm以上の群で弱い貧血の兆候がみられたのみであり、その他の貧血関連検査項目に有意な変化は認められなかつた。本試験においてメトヘモグロビン濃度の増加が関与したと思われる腫瘍性病変の増加も認められなかつた。また、13週間試験においてもメトヘモグロビン生成に関連する前腫瘍性病変はいずれの臓器にも認められなかつたことを付言する。従つて、本試験においてメトヘモグロビン濃度測定を実施しなかつたことは、がん原性試験における2-アミノ-4-クロロフェノールの発がん性評価に影響を及ぼさなかつたと判断した。

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