

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

試験番号：0669

CAS No. 122-39-4

2008年1月18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）

## 試験目的

ジフェニルアミン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、ジフェニルアミンをラットに 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 長野 嘉介  
神奈川県秦野市平沢 2445

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

試験番号：0669

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	17
IV-1	用量-反応関係	17
IV-2	無毒性量 (NOAEL)	18
IV-3	他の文献との比較	19
IV-4	がん原性試験の濃度決定	20

V	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 .....	20
VI	文献 .....	21

## 要約

ジフェニルアミン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、ジフェニルアミンを F344/DuCr1Cr1j ラットに 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、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、256、640、1600、4000 及び 10000 ppm（重量比 w/w）（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。

ジフェニルアミン経口投与の結果、全ての投与群に死亡はみられなかった。一般状態の観察では、雌雄 10000 ppm 群と雌 4000 ppm 群の少数例に尿による外陰部周囲の汚染が認められた。体重は、雌雄とも 10000 ppm 群に全投与期間を通じた低値が、雄の 4000 ppm 群では投与期間の多くの週に、雌の 4000 ppm 群でも統計的に有意でないが、ほぼ全投与期間を通じた低値がみられた。摂餌量は、雌雄の 10000 ppm 群にほぼ全投与期間を通じた低値が認められ、雌雄の 4000 ppm 群と 1600 ppm 群、並びに雄の 640 ppm 群の投与期間中に低値が散見された。血液系への影響として、赤血球数、ヘモグロビン等の低値が雄は 640 ppm 以上の投与群、雌は全投与群に認められ、貧血が示された。メトヘモグロビン濃度の高値が、雄の 640 ppm 以上の群と雌の全投与群にみられ、貧血の原因は被験物質によるメトヘモグロビン生成に起因した赤血球傷害であると考えられた。赤血球傷害に関連した変化として、網赤血球比の高値、血漿中の総ビリルビンの高値、剖検での脾臓の腫大と表面粗、脾臓重量の高値、脾臓のヘモジデリン沈着、赤血球充満、髄外造血亢進及び被膜増生、骨髄の造血亢進、並びに腎臓と肝臓のヘモジデリン沈着が高濃度投与群を中心に認められた。なお、肝細胞傷害及び赤血球傷害の 2 つの要因による変化と考えられる LDH の高値が雌の 4000 ppm 以上の群にみられた。肝臓への影響として、肝重量（実重量と体重比）の高値が雌雄の 1600 ppm 以上の群に、小葉中心性の肝細胞肥大が雌雄とも 4000 ppm 以上の群にみられた。腎臓への影響として、尿素窒素の高値が雌雄とも最高投与濃度の 10000 ppm 群に、腎臓重量の高値が雄の 4000 ppm 以上の群と雌の 640 ppm 以上の群に、近位尿細管の変性が雄の 10000 ppm 群に認められた。

以上の結果より、ジフェニルアミンのがん原性試験の投与濃度は、体重増加の抑制は対照群に対し 10%以内（投与終了時体重は対照群に対し、雄：93%、雌：94%）であり、貧血や肝臓への影響はあるものの、変化の程度はいずれも軽度である 4000 ppm を最高投与濃度とし、以下、1000 及び 250 ppm（公比 2.5）とした。

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

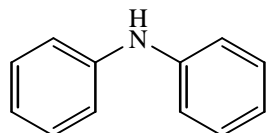
I-1-1 名称等

名 称： ジフェニルアミン (Diphenylamine)

CAS No. : 122-39-4

I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 169.23

I-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°C

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 : 冷蔵暗所

I-2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

グ レ ー ド : 試薬特級

純 度 : 99.6% (和光純薬工業(株) 検査成績書データ)

使用ロット番号 : SDH5697



### 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 (Agilent Technologies 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 (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。

#### 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。

### I-4 試験動物

動物は、ジフェニルアミン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 F344/DuCrIjラット (SPF) の雌雄を使用した。

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：119～134g、雌：96～104g) を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に 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 7 日毎に実施した。

#### II-1-3 投与期間

投与期間は 13 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。

#### II-1-4 投与濃度

投与濃度は、256、640、1600、4000 及び 10000 ppm（重量比 w/w）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に 13 週間とした。

投与濃度は、2 週間試験（試験番号 0651）の結果（文献 4）をもとに設定した。2 週間試験は、F344/DuCr1Crlj ラットの雌雄に、1600、4000、7000、10000 及び 25000 ppm の 5 段階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、25000 ppm 群では、体重増加の著しい抑制が認められ、投与開始後 5 日目に雄 1 匹、投与開始後 6 日目に雌 2 匹の死亡がみられた。10000 ppm 群では、摂餌量の低値がみられ、さらに、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、病理組織学的検査では、血液系、肝臓、腎臓等への影響が認められた。また、雌雄とも体重増加の抑制がみられ、投与終了時では、対照群に比較して雄 88%、雌 94%であった。これらの被験物質投与の影響のうち、血液系（雌雄ともメトヘモグロビン濃度の増加、赤血球数の減少等の貧血を示すパラメータの変動、脾

臓の重量増加、髄外造血亢進、赤血球充満) 及び肝臓(雌雄とも重量増加、雄のみに小葉中心性肝細胞腫大) への影響は、最低投与濃度の 1600 ppm 群まで認められた。

従って、13 週間試験の最高投与濃度は、血液系、肝臓、腎臓等への影響がみられるものの体重増加の抑制が比較的少ない 10000 ppm が適当であると考えた。また、最低濃度の 1600 ppm でも被験物質投与の影響が認められたことから、13 週間試験では 1600 ppm 以下の投与濃度が必要であると考えた。以上より、13 週間試験の投与濃度は、雌雄とも 10000 ppm を最高投与濃度とし、以下、4000、1600、640 及び 256 ppm (公比 2.5) に設定した。

#### 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、256、640、1600 及び 4000 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、投与開始前日より 2 週に 1 回行い、1 週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、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。

#### 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の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、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 99.2~102% 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 1-3、均一性については APPENDIX 1-4 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、試験開始前に、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ラット用餌箱に充填し、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) したのものについて、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(Shimadzu LC-10) を用いて測定し、それぞれの濃度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 (8 日間) では、100 ppm : 93.6%、10000 ppm : 95.9%、冷蔵保管 (8 日間) で 100 ppm : 101%、10000 ppm : 100%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安定であった。

その結果を APPENDIX 1-5 に示した。

## II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂取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 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)
256 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	10 匹 (2101~2110)
640 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	10 匹 (2201~2210)
1600 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	10 匹 (2301~2310)
4000 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	10 匹 (2401~2410)
10000 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 208 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 :  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  < $22.7 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ >

湿度 :  $55 \pm 15\%$  < $54 \pm 2\%$ >

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 (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- $\gamma$ 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、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、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 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

### 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 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、 $\gamma$ -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 13 週目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、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：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、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、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及び餌こぼし量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 body weight per day 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、 $\chi^2$  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  $\chi^2$  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 A 1, 2 に示した。

—雌雄—

雌雄とも全ての群に死亡動物はみられなかった。

#### 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—

10000 ppm 群では尿による外陰部の汚染が 9 週以降に 1 匹、13 週に 2 匹認められた。4000 ppm 以下の投与群では、被験物質投与に関連する一般状態の変化はみられなかった。

—雌—

10000 ppm 群と 4000 ppm 群では尿による外陰部の汚染が 9 週以降に各 1 匹認められた。1600 ppm 以下の投与群では、被験物質投与に関連する一般状態の変化はみられなかった。

#### Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE C 1~4、及び FIGURE 1, 2 に示した。

—雄—

10000 ppm 群では、全投与期間を通して体重の低値が認められた。4000 ppm 群でも投与期間の多くの週で体重の低値が認められた。1600 ppm 以下の投与群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、最終計測日における各投与群の体重は、対照群に対して、256 ppm 群：101%、640 ppm 群：97%、1600 ppm 群：97%、4000 ppm 群：93%、10000 ppm 群：87%であった。

—雌—

10000 ppm 群では、全投与期間を通して体重の低値が認められた。4000 ppm 群では統計的に有意でないが、ほぼ全投与期間を通じた体重の低値が認められた。1600 ppm 以下の投与群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、最終計測日における各投与群の体重は、対照群に対して、256 ppm 群：98%、640 ppm 群：96%、1600 ppm 群：96%、4000 ppm 群：94%、10000 ppm 群：93%であった。

### Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1~4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

—雄—

10000 ppm 群では、ほぼ全投与期間にわたり、摂餌量の低値が認められた。4000、1600 及び 640 ppm 群では投与期間中に摂餌量の低値が散見された。256 ppm 群では対照群とほぼ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：15.1 g（100%）、256 ppm 群：14.9 g（99%）、640 ppm 群：14.2 g（94%）、1600 ppm 群：14.4 g（95%）、4000 ppm 群：14.4 g（95%）、10000 ppm 群：13.1 g（87%）であった。

—雌—

10000 ppm 群では、ほぼ全投与期間にわたり、摂餌量の低値が認められた。4000 ppm 群では投与 1 週目と 2 週目に、1600 ppm 群では投与 1 週目に摂餌量の低値がみられた。640 ppm 群と 256 ppm 群では対照群とほぼ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：10.0 g（100%）、256 ppm 群：10.0 g（100%）、640 ppm 群：9.8 g（98%）、1600 ppm 群：9.9 g（99%）、4000 ppm 群：9.5 g（95%）、10000 ppm 群：8.7 g（87%）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—

各投与群の 1 日当たりの被験物質摂取量 (mg/kg body weight per day) は、256 ppm 群：12~22（平均：15）、640 ppm 群：29~53（平均：37）、1600 ppm 群：72~133（平均：93）、4000 ppm 群：183~324（平均：240）、10000 ppm 群：471~770（平均：593）の範囲にあった。各投与群の平均被験物質摂取量は、ほぼ設定濃度比（公比 2.5）と同様の値を示した。

—雌—

各投与群の 1 日当たりの被験物質摂取量 (mg/kg body weight per day) は、256 ppm 群：14~23（平均：17）、640 ppm 群：35~57（平均：43）、1600 ppm 群：91~137（平均：108）、4000 ppm 群：228~331（平均：268）、10000 ppm 群：537~813（平均：625）の範囲にあった。各投与群の平均被験物質摂取量は、ほぼ設定濃度比（公比 2.5）と同様の値を示した。

### 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—

赤血球数とヘモグロビン濃度の低値、並びに MCV、網赤血球比及びメトヘモグロビン濃度の高値が 640 ppm 以上の群に認められた。また、ヘマトクリット値の低値及び MCH の高値が 1600 ppm 以上の群に、MCHC の低値が 4000 ppm 以上の群に、血小板数の低値が 10000 ppm 群に認められた。その他、白血球数の高値が 1600 ppm 群と 4000 ppm 群に、リンパ球比の高値が 4000 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、網赤血球比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。また、MCHC の低値が 1600 ppm 以上の群に認められた。その他、血小板数の低値が 10000 ppm 群、並びに高値が 256 ppm 群と 1600 ppm 群に、分葉核好中球比の低値とリンパ球比の高値が 256 ppm 群と 1600 ppm 以上の群に認められた。

### 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—

A/G 比の高値が 640 ppm 以上の群に、アルブミン、総ビリルビン及びリン脂質の高値、並びに CK の低値が 1600 ppm 以上の群に、総蛋白と総コレステロールの高値が 4000 ppm 以上の群に、尿素窒素の高値とグルコースの低値が 10000 ppm 群に認められた。その他、ALT の高値が 1600 ppm 群と 4000 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—

アルブミンの高値が全投与群に、総ビリルビンの高値が 256 ppm 群と 1600 ppm 以上の群に、総蛋白と A/G 比の高値が 1600 ppm 以上の群に、総コレステロール、リン脂質及び LDH の高値が 4000 ppm 以上の群に、ALP、尿素窒素及びカリウムの高値が 10000 ppm 群に認められた。

### Ⅲ-8 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

雌雄とも 4000 ppm 以上の投与群では、被験物質もしくはその代謝物によると考えられる尿の着色のため、ケトン体とビリルビンが測定不能となり、データが欠測となった。

—雄—

pHの低下が10000 ppm群に認められた。

—雌—

著変は認められなかった。

### Ⅲ-9 病理学的検査

#### Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見をTABLE I 1, 2に示した。

—雄—

脾臓の腫大と表面粗が4000 ppm以上の投与群に認められた。1600 ppm以下の群では著変は認められなかった。

—雌—

脾臓の腫大と表面粗が10000 ppm群に認められた。4000 ppm以下の群では著変は認められなかった。

#### Ⅲ-9-2 臓器重量

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

—雄—

脾臓と肝臓の実重量と体重比の高値が1600 ppm以上の群に認められた。

腎臓の体重比の高値が4000 ppm以上の群に認められた。

その他、4000 ppm群あるいは10000 ppm群で、副腎、精巣、心臓、肺及び脳の実重量や体重比に変化がみられたが、4000 ppm群と10000 ppm群の搬出時体重は低く、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変化と考えた。

—雌—

脾臓の実重量の高値が1600 ppm以上の群に、体重比の高値が全投与群に認められた。

腎臓の実重量の高値が10000 ppm群に、体重比の高値が640 ppm以上の群に認められた。

肝臓の実重量の高値が1600 ppm以上の群に、体重比の高値が640 ppm以上の群に認められた。

副腎の実重量と体重比の低値が10000 ppm群に認められた。

その他、10000 ppm群で卵巣の実重量に変化がみられたが、10000 ppm群の搬出時体重は低く、この臓器重量の変化は、搬出時体重の低値に関連した変化と考えた。

### 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を TABLE L 1, 2 に示した。

—雄—

#### [10000 ppm 群]

骨髓に造血亢進（軽度 10 匹）が認められた。

脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、髓外造血（軽度 10 匹）、赤血球充満（中等度 10 匹）、被膜増生（軽度 1 匹、中等度 9 匹）が認められた。なお、脾臓の被膜増生では、被膜の線維性の肥厚がほぼ全周性にみられ、さらに、リンパ球を主体とする細胞成分を含む線維性肥厚が散在性にみられた。

肝臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、小葉中心性の肝細胞肥大（軽度 10 匹）が認められた。

腎臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、近位尿細管の変性（軽度 2 匹）が認められた。

ハーダー腺にリンパ球浸潤（軽度 6 匹、中等度 3 匹）が認められた。

#### [4000 ppm 群]

骨髓に造血亢進（軽度 10 匹）が認められた。

脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、髓外造血（軽度 10 匹）、赤血球充満（軽度 10 匹）、被膜増生（軽度 10 匹）が認められた。

肝臓にヘモジデリン沈着（軽度 6 匹）、小葉中心性の肝細胞肥大（軽度 10 匹）が認められた。

腎臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）が認められた。

#### [1600 ppm 群]

骨髓に造血亢進（軽度 6 匹）が認められた。

脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 8 匹）、髓外造血（軽度 10 匹）、赤血球充満（軽度 10 匹）が認められた。

#### [640 ppm 群、256 ppm 群]

被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

—雌—

#### [10000 ppm 群]

骨髓に造血亢進（軽度 10 匹）が認められた。

脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 7 匹）、髓外造血（軽度 10 匹）、赤血球充満（中等度 10 匹）、被膜増生（中等度 10 匹）が認められた。

肝臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、小葉中心性の肝細胞の肥大（軽度 4 匹、中等度 6 匹）が認められた。

腎臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）が認められた。

ハーダー腺のリンパ球浸潤の発生（軽度 4 匹、中等度 3 匹、重度 1 匹）は統計的に有意

ではないが対照群（軽度 2 匹、中等度 1 匹）に比べて多くみられた。

[4000 ppm 群]

骨髄に造血亢進（軽度 10 匹）が認められた。

脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、髄外造血（軽度 10 匹）、赤血球充満（軽度 10 匹）、被膜増生（軽度 10 匹）が認められた。

肝臓にヘモジデリン沈着（軽度 7 匹）、小葉中心性の肝細胞の肥大（軽度 10 匹）が認められた。

腎臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）が認められた。

[1600 ppm 群]

骨髄に造血亢進（軽度 5 匹）が認められた。

脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、髄外造血（軽度 10 匹）、赤血球充満（軽度 10 匹）が認められた。

[640 ppm 群]

脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、赤血球充満（軽度 9 匹）が認められた。

[256 ppm 群]

被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

#### IV 考察及びまとめ

ジフェニルアミンの F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた経口投与による 2 年間 (104 週間) のがん原性試験を実施するにあたり、その投与濃度を決定するために 13 週間試験を実施した。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 10 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 0、256、640、1600、4000 及び 10000 ppm (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。

##### IV-1 用量-反応関係

ジフェニルアミン投与の結果、全ての投与群に死亡はみられなかった。一般状態の観察では、雌雄 10000 ppm 群と雌 4000 ppm 群の少数例に尿による外陰部周囲の汚染が認められた。体重は、雌雄とも 10000 ppm 群に全投与期間を通じた低値が、雄の 4000 ppm 群では投与期間の多くの週に、雌の 4000 ppm 群でも統計的に有意でないが、ほぼ全投与期間を通じた低値がみられた。投与終了時の体重は、対照群に対して、雄は 256 ppm 群：101%、640 ppm 群：97%、1600 ppm 群：97%、4000 ppm 群：93%、10000 ppm 群：87%、雌は 256 ppm 群：98%、640 ppm 群：96%、1600 ppm 群：96%、4000 ppm 群：94%、10000 ppm 群：93%であった。摂餌量は、雌雄の 10000 ppm 群にほぼ全投与期間を通じた低値が認められ、雌雄の 4000 ppm 群と 1600 ppm 群、並びに雄の 640 ppm 群の投与期間中に低値が散見された。

血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度等の低値が雄は 640 ppm 以上の群に、雌は全投与群に認められ貧血が示された。また、これらの変化に伴って MCV 等の値も変化した。なお、貧血に対応した代償性変化として網赤血球比の高値が雄の 640 ppm 以上の群と雌の全投与群に認められた。メトヘモグロビン濃度の高値が、雄の 640 ppm 以上の群と雌の全投与群にみられ、貧血の原因は被験物質によるメトヘモグロビン生成に起因した赤血球傷害であると考えられた (文献 6)。

血液生化学的検査では、総ビリルビンの高値が雄 1600 ppm 以上の群、雌では 640 ppm 群を除く全投与群に、LDH の高値が雌の 4000 ppm 以上の群に、尿素窒素の高値が雌雄とも最高投与濃度の 10000 ppm 群にみられた。その他、雌雄に総蛋白、アルブミン、A/G 比、総コレステロール及びリン脂質等の高値、雄にグルコースと CK の低値、雌に ALP とカリウムの高値が高濃度投与群を中心に認められた。これらのうち、総ビリルビンの高値は赤血球傷害に伴った変化と考えられた (文献 6)。LDH の高値は、肝細胞傷害及び赤血球傷害の 2 つの要因による変化と考えられた (文献 7,8,9)。尿素窒素の高値は腎臓への影響を示唆する変化と考えた。

剖検では、脾臓の腫大と表面粗が雌雄 10000 ppm 群と雄 4000 ppm 群に認められた。この変化は赤血球傷害に対応したものと考えられた。臓器重量では、脾臓重量の高値が雄 1600 ppm 以上の群と雌の全投与群に、肝臓重量（実重量と体重比）の高値が雌雄の 1600 ppm 以上の群に、腎臓重量の高値が雄の 4000 ppm 以上の群と雌の 640 ppm 以上の群に認められた。臓器重量の変化のうち、脾臓重量の高値は赤血球傷害に対応したものと考えられた。肝臓重量の高値は、主に病理組織学的検査で認められた小葉中心性の肝細胞肥大によるものと考えられた。腎臓重量の高値は、被験物質の腎臓への影響を示唆するものと考えられた。

病理組織学的検査において、脾臓ではヘモジデリン沈着と赤血球充満が雄 1600 ppm 以上の群と雌の 640 ppm 以上の群に、髄外造血充進が雌雄とも 1600 ppm 以上の群に、被膜増生（線維性肥厚）が雌雄の 4000 ppm 以上の群に認められた。骨髄では造血充進が雌雄とも 1600 ppm 以上の群に認められた。腎臓ではヘモジデリン沈着が雌雄とも 4000 ppm 以上の群に、近位尿細管の変性が雄の 10000 ppm 群のみに認められた。肝臓では、ヘモジデリン沈着が雌雄とも 4000 ppm 以上の群に、小葉中心性の肝細胞肥大が雌雄とも 4000 ppm 以上の群にみられた。これらの病理組織学的所見のうち、脾臓でのヘモジデリン沈着、赤血球充満、髄外造血充進及び被膜増生、骨髄での造血充進、腎臓と肝臓でのヘモジデリン沈着は、いずれも赤血球傷害に対応した変化であると考えられた。松本らは、ラットへの p-クロロニトロベンゼンの 13 週間経口投与により、メトヘモグロビン生成に起因した赤血球傷害が原因で、脾臓にヘモジデリン沈着、赤血球充満、髄外造血充進及び被膜増生が認められることを報告している（文献 11）。また、p-クロロニトロベンゼンのラットのがん原性試験の報告（文献 12）では、脾臓の被膜増生が脾臓腫瘍の発生増加に関連している可能性を述べている。本試験で認められた脾臓の被膜増生は、松本らの報告（文献 11）よりも程度は低い、長期間の連続投与により、腫瘍に発展する可能性が示唆される。腎臓の近位尿細管の変性は、血液生化学的検査でも尿素窒素の高値が認められており、被験物質による腎臓傷害を示す変化と考えられた。また、肝臓にも投与による直接的な影響を示す小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。なお、副腎重量の低値が雌の 10000 ppm 群のみに認められたが、病理組織学的変化は認められなかった。また、ハーダー腺のリンパ球浸潤の発生及び程度の増強が雌雄の 10000 ppm 群に認められたが、その毒性学的意義は不明であった。

#### IV-2 無毒性量 (NOAEL)

ジフェニルアミンの 13 週間混餌投与により血液系（貧血）、肝臓、腎臓への影響が示唆された。その中で、最も低い用量まで認められた毒性変化は血液系（貧血）への影響であり、雄では赤血球数とヘモグロビン濃度の低値、並びに MCV、網赤血球比及びメトヘモグロビン濃度の高値が 640 ppm 群まで、雌では赤血球数、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、網赤血球比、メトヘモグロビン濃度及び総ビリルビンの高値が最低投与濃度の 256 ppm まで認められた。従って、本試験における無毒性量 (NOAEL) は、血液系 (貧血) への影響をエンドポイントとして、雄は 256 ppm (平均 15 mg/kg body weight per day) であると考えられた。雌は無毒性量 (NOAEL) は求められず、最低毒性量 (LOAEL) が 256 ppm (平均 17 mg/kg body weight per day) であると考えられた。

#### IV-3 他の文献との比較

##### (1) 毒性

短期間の反復経口投与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 (FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues : JMPR) (文献 10) では、Krohmer による SD ラットを用いた 90 日間の混餌試験 (未発表) を引用している。それによると、雌雄とも 0、150、1500、7500、15000 ppm の濃度でジフェニルアミンを混餌投与した結果、1500 ppm 以上の群で貧血及び貧血に関連した変化、並びに、肝臓重量の増加が、また、高濃度群では腎臓への影響も認められており、NOAEL は一般状態、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量及び病理組織学的検査を指標として、150 ppm (12 mg/kg/day) としている。本試験では、血液系 (貧血及び貧血に関連した変化)、肝臓及び腎臓への影響が認められており、毒性のエンドポイントは Krohmer の報告と同様であった。また、本試験で求めた雄の NOAEL は Krohmer の報告の NOAEL と近似した値を示した。

##### (2) 代謝

雌雄の SD ラットに  $^{14}\text{C}$ -ジフェニルアミン (5 及び 750 mg/kg を単回、5 mg/kg/day を 14 日間反復投与) を強制経口投与して、尿、糞、ケージ洗浄液、胴体及び各器官の放射能を測定した研究から、いずれの用量でも 70%以上が消化管から吸収され、主要排泄経路は尿中であり、単回・反復いずれの投与方法、用量の高低いずれでも組織への蓄積 (残留) は少ないことが報告されている (文献 10)。また、同試験では、排泄物中の未変化体、代謝物を測定しており、単回投与、反復投与のいずれでも排泄物中の未変化体は少なく、速やかに代謝されることを示した。また、主な代謝経路は、ジフェニルアミンのフェノール環パラの部位の水酸化、及びそれに続く硫酸抱合やグルクロン酸抱合であり、4-hydroxydiphenylamine、4,4'-dihydroxydiphenylamine などの 12 種類の代謝物が同定された。

#### IV-4 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通り決定した。

ジフェニルアミン 13 週間経口投与の結果、全ての投与群に死亡はみられなかった。10000 ppm 群では、雌雄ともに、体重増加の抑制（最終体重値は対照群に対し、雄 87%、雌 93%）、摂餌量の減少、脾臓、肝臓、腎臓（雌のみ）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変化が認められた。また、病理組織学的検査でも貧血に関連した変化が、雌雄の骨髄、脾臓、腎臓に認められた。これらの臓器の病理組織学的変化のうち、脾臓の赤血球充満と被膜の増生（線維性肥厚）の程度は中等度であった。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、最終体重値は対照群に対し、雄 93%、雌 94%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、病理組織学的変化の程度はいずれも軽度であった。1600 ppm 以下の投与群では、雌雄とも体重増加の抑制は殆どみられず、貧血は投与濃度に対応してさらに減弱し、最低濃度の 256 ppm では、雌のみ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だけであった。

以上の結果から、10000 ppm 群では、雄に顕著な体重増加の抑制があり、雌雄ともに貧血が認められ、病理組織学的にも中等度の変化がみられていることから、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、体重増加の抑制は対照群に対し 10%以内で、貧血や肝臓への影響はあるものの、これらのは変化はいずれも軽度であることから、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。

#### V 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

尿検査においてケトン体及びビリルビンは、被験物質もしくはその代謝物によると考えられる尿の着色のため、雌雄とも 4000 ppm 以上の群で判定が不能となり、データが欠測となった。

## VI 文献

1. 化学工業日報社. 2006. 14906 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 705.
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. 日本バイオアッセイ研究センター. 2007. ジフェニルアミン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. 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. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues. 1998. Diphenylamine (addendum). JMPR Evaluations 1998 Part II Toxicological, Vol 949.  
<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v098pr07.htm>  
[accessed 2 August 2007].

11. Matsumoto M, Aiso S, Umeda Y, Arito H, Nagano K, Yamamoto S. et al. 2006. Thirteen-week oral toxicity of para- and ortho-chloronitrobenzene in rats and mice. J. Toxicol. Sci. 31:9-22.
12. Matsumoto M, Aiso S, Senoh H, Yamazaki K, Arito H, Nagano K et al. 2006. Carcinogenicity and chronic toxicity of *para*-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 25: 571-584.