

ジフェニルアミンのラットを用いた  
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0684

CAS No. 122-39-4

2011年8月25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がん原性試験（混餌試験）

## 試験目的

ジフェニルアミンをラットに 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」に準拠し、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  
東京都千代田区霞が関 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  
所長 福島 昭治  
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  
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0684

本文

## 本文目次

	頁
要約 .....	1
試験材料 .....	4
- 1 被験物質の性状等 .....	4
- 1 - 1 名称等 .....	4
- 1 - 2 構造式及び分子量 .....	4
- 1 - 3 物理化学的性状等 .....	4
- 2 被験物質の使用ロット等 .....	4
- 3 被験物質の特性・同一性、安定性 .....	5
- 3 - 1 特性・同一性 .....	5
- 3 - 2 安定性 .....	5
- 4 試験動物 .....	5
試験方法 .....	6
- 1 投与 .....	6
- 1 - 1 投与経路 .....	6
- 1 - 2 被験物質の投与方法 .....	6
- 1 - 3 投与期間 .....	6
- 1 - 4 投与濃度 .....	6
- 1 - 5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由 .....	6
- 1 - 6 被験物質混合飼料の調製方法 .....	7
- 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 ..	7
- 1 - 8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性 .....	8
- 1 - 9 被験物質の摂取量 .....	8
- 2 動物管理 .....	8
- 2 - 1 各群の使用動物数 .....	8
- 2 - 2 群分け及び個体識別方法 .....	8
- 2 - 3 飼育条件 .....	9
(1) 飼育環境 .....	9
(2) 飼料 .....	9
(3) 飲水 .....	10

- 3	観察・検査項目及び方法	10
- 3 - 1	動物の生死及び一般状態の観察	10
- 3 - 2	体重測定	10
- 3 - 3	摂餌量測定	10
- 3 - 4	血液学的検査	10
- 3 - 5	血液生化学的検査	11
- 3 - 6	尿検査	11
- 3 - 7	病理学的検査	11
(1)	剖検	11
(2)	臓器重量	11
(3)	病理組織学的検査	11
- 4	数値処理と統計方法	12
- 4 - 1	数値の取り扱いと表示	12
- 4 - 2	統計処理	12
	試験成績	14
- 1	生死状況	14
- 2	一般状態	14
- 3	体重	14
- 4	摂餌量	15
- 5	被験物質摂取量	15
- 6	血液学的検査	16
- 7	血液生化学的検査	16
- 8	尿検査	17
- 9	病理学的検査	17
- 9 - 1	剖検	17
- 9 - 2	臓器重量	18
- 9 - 3	病理組織学的検査	18
- 9 - 4	死因	21

考察及びまとめ	22
- 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、被験物質摂取量	22
- 2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	22
- 3 その他の影響	23
- 4 無毒性量 (NOAEL) / 最低毒性量 (LOAEL)	24
- 5 他文献との比較等	24
結論	26
文献	27
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	29

## 要約

ジフェニルアミンのがん原性を検索する目的でF344/DuCr1Cr1j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、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(対照群)、250、1000及び4000 ppm(重量比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。

試験の結果、雌雄とも投与群の生存率は対照群と同様であった。一般状態の観察では、被験物質の代謝物によると考えられる褐色尿が雌雄の4000 ppm群に、尿による外陰部周囲の被毛の着色が雄の4000 ppm群と雌の全投与群に認められた。体重の低値が、雄の4000 ppm群と雌の全投与群に投与期間を通して、また、雄の1000 ppm群の投与初期のみに認められた。摂餌量の低値が、雄の1000 ppm群の投与初期と4000 ppm群のほぼ全投与期間を通して、雌の1000 ppm群と4000 ppm群の投与開始から78週にかけて認められた。

腫瘍性病変を付表1, 2に示す。雄では脾臓に血管肉腫、並びに血管腫と血管肉腫を合わせた発生の増加傾向(Peto検定とCochran-Armitage検定)が認められた。また、雄では皮下組織と脾臓を含む全臓器に血管肉腫の発生の増加傾向(Peto検定とCochran-Armitage検定)がみられ、血管腫と血管肉腫を合わせた発生は、4000 ppm群で増加(Fisher検定)した。雌では子宮の腺癌、並びに腺腫と腺癌を合わせた発生の増加傾向(Peto検定とCochran-Armitage検定)が認められた。

腫瘍以外の影響として、血液/造血系では、血液学的検査でメトヘモグロビンの高値が、雄の1000 ppm以上の群と雌の全投与群に認められた。メトヘモグロビンの増加によると考えられる貧血が、雄は4000 ppm群に、雌は1000 ppm以上の群に認められた。また、血液学的検査及び血液生化学的検査で貧血に関連した種々の変化が投与群に認められた。なお、脾臓には、重量の高値、赤血球充満、髄外造血(雄のみ)、ヘモジデリン沈着(雄のみ)、被膜の繊維性組織の増生、血管拡張及び巣状の線維化(雌のみ)が認められた。その他、肝臓への影響として、肝臓の重量の高値が雌雄の1000 ppm以上の群に、肝細胞の中心性肥大が雌雄の4000 ppm群に、肝臓の逸脱系酵素の高値が雌雄とも投与群にみられた。腎臓への影響として、腎臓重量の高値が雄の1000 ppm以上の群に、慢性腎症の程度の増強が雄4000 ppm群に、近位尿細管の褐色色素沈着が雌雄4000 ppm群に、腎盂の鉍質沈着が雄4000 ppm群と雌1000 ppm以上の群に、また、血漿中の尿素窒素の高値が雌雄とも4000 ppm群に認められた。

2年間の混餌経口投与における無毒性量(NOEL)は、雄では血液/造血系及び肝臓への影響、雌では血液/造血系への影響をエンドポイントとして、雄は250 ppm(12mg/kg 体

重/日)であり、雌ではNOAELは求められず、最低毒性量(LOAEL)が250 ppm(15 mg/kg体重/日)であると考えられた。

以上のように、F344/DuCrI CrIj ラットを用いて、ジフェニルアミンの2年間(104週間)にわたる混餌経口投与によるがん原性試験を行った結果、雄では脾臓の血管系腫瘍の発生の増加傾向、並びに脾臓と皮下組織を含む全臓器の血管系腫瘍の発生増加、雌では子宮に腺癌の発生の増加傾向が認められた。これらの結果から、ジフェニルアミンのラットに対するがん原性が示された。



付表 1 ジフェニルアミン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	250	1000	4000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	皮膚 / 付属器官 皮下組織	角化棘細胞腫	3	3	5	2		
		線維腫	2	11 **	3	2		
		血管腫	0	0	0	1		
	脾臓	島細胞腺腫	6	3	2	0 *		
	脾臓	血管腫	0	1	0	0		
	下垂体	腺腫	17	19	11	8 *		
	甲状腺	C-細胞腺腫	11	10	12	13		
	副腎	褐色細胞腫	4	8	4	4		
	精巣	間細胞腫	37	40	46 *	46 *		
悪性 腫瘍	皮下組織	線維肉腫	0	2	0	1		
		血管肉腫	0	0	0	1		
	脾臓	血管肉腫	0	0	0	3		
		単核球性白血病	5	3	2	1		
脾臓	血管腫 + 血管肉腫	0	1	0	3			
皮下組織	線維腫 + 線維肉腫	2	13 **	3	3			
全臓器 <sup>a)</sup>		血管腫	0	1	0	1		
		血管肉腫	0	0	0	4		
		血管腫 + 血管肉腫 <sup>b)</sup>	0	1	0	5 *		

a : 皮下組織と脾臓を合わせた部位を全臓器と表現した。

b : 全臓器に対する血管腫 + 血管肉腫の Peto 検定と Cochran Armitage 検定は行っていない。

付表 2 ジフェニルアミン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	250	1000	4000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	下垂体	腺腫	11	13	12	16		
	甲状腺	C-細胞腺腫	7	9	7	5		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	5	2	6	7		
		腺腫	0	1	0	0		
	乳腺	線維腺腫	8	11	7	2 *		
悪性 腫瘍	脾臓	血管肉腫	0	0	0	1		
		単核球性白血病	3	2	0	5		
	下垂体	腺癌	2	1	4	0		
	子宮	腺癌	1	0	0	4		
子宮	腺腫 + 腺癌	1	1	0	4			

\* : p 0.05 で有意

\*\* : p 0.01 で有意

( Fisher 検定 )

: p 0.05 で有意増加

: p 0.01 で有意増加

( Peto, Cochran-Armitage 検定 )

: p 0.05 で有意減少

: p 0.01 で有意減少

( Cochran-Armitage 検定 )

試験材料

- 1 被験物質の性状等

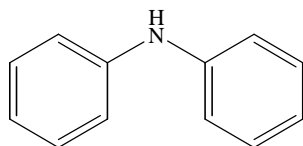
- 1 - 1 名称等

名 称： ジフェニルアミン (Diphenylamine)

CAS No. : 122-39-4

- 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 169.23

- 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

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 : 冷蔵で暗所に保管

- 2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : LTF7564

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

グ レ ー ド : 試薬特級

純 度 : 100.5% (和光純薬工業(株) 検査成績書データ)

### - 3 被験物質の特性・同一性、安定性

#### - 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（アジレントテクノロジーズ 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（（株）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。

#### - 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（（株）島津製作所 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。

### - 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/DuCrIcrlj 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（群構成時体重範囲、雄：111～134g、雌：93～107g）を選別し、試験に用いた。

なお、F344/DuCrIcrlj 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。

## 試験方法

### - 1 投与

#### - 1 - 1 投与経路

投与経路は経口投与とした。

#### - 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。

#### - 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前日まで連続投与した。

#### - 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、250、1000 及び 4000 ppm (重量比 w/w) の 3 段階 (公比 4) 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。

#### - 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。

投与濃度は、13 週間毒性試験 (試験番号 0669) の結果 (文献 6) をもとに設定した。13 週間試験は、F344/DuCrI CrIj ラットの雌雄に、0 (対照群)、256、640、1600、4000 及び 10000 ppm(w/w) (公比 2.5) 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、全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、脾臓の赤血球充満と被膜の線維

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、貧血及び貧血に関連した変化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が、軽度な変化であった。

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、貧血や貧血に関連した変化、並びに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。

#### - 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、4000、1000 及び 250 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、投与開始日前日(2007年7月9日)より実施し、翌週からは2週に1回調製した。1回の調製量は2週間分とし、1週間分をラット用餌箱に充填して翌日より動物に投与した。残りの1週間分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。

#### - 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、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93.3~106%の範囲にあった。また、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。

#### - 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、13 週間毒性試験(試験番号 0669)において、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(株)島津製作所 LC-10)を用いて測定した。調製時と保管期間後の被験物質濃度を比較した結果、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。

#### - 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 (mg/kg 体重/日) を算出した。

### - 2 動物管理

#### - 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。

群名称	動物数(動物番号)	
	雄	雌
対照群	50 匹 (1001 ~ 1050)	50 匹 (2001 ~ 2050)
250 ppm 群	50 匹 (1101 ~ 1150)	50 匹 (2101 ~ 2150)
1000 ppm 群	50 匹 (1201 ~ 1250)	50 匹 (2201 ~ 2250)
4000 ppm 群	50 匹 (1301 ~ 1350)	50 匹 (2301 ~ 2350)

#### - 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い動物から体重の中央値に近い雌雄各 200 匹を選別し、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。

### - 2 - 3 飼育条件

#### (1) 飼育環境

動物は、全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:22.8±0.3、205室:22.7±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-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)あるいはユーロフィンズサイエンティフィック社(東京都世田谷区下馬4-16-21)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。

#### - 3 観察・検査項目及び方法

##### - 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。

##### - 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。

##### - 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。

##### - 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



### - 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

### - 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（マルティステックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

### - 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、精嚢、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

#### - 4 数値処理と統計方法

##### - 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 mg/kg 体重/日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 に示した単位と桁数により表示した。

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

##### - 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、<sup>2</sup> 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 <sup>2</sup> 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、各群ごとの担腫瘍動物数について、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。

各群雌雄ごとに検査数が 2 以下の項目については、検定より除外した。

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 だと思いが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍

4：死亡/瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

## 試験成績

### - 1 生死状況

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

#### - 雄 -

投与群に生存率の低下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：37 匹（74%）、250 ppm 群：40 匹（80%）、1000 ppm 群：43 匹（86%）、4000 ppm 群：41 匹（82%）であった。

#### - 雌 -

投与群に生存率の低下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：40 匹（80%）、250 ppm 群：43 匹（86%）、1000 ppm 群：45 匹（90%）、4000 ppm 群：43 匹（86%）であった。

### - 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示した。

#### - 雄 -

4000 ppm 群では、被験物質の代謝物によると考えられる褐色尿が投与開始後 22 週目以降殆どの動物に、尿による外陰部周囲の被毛の着色が投与初期から投与期間を通して多くの動物に認められた。

#### - 雌 -

4000 ppm 群では、被験物質の代謝物によると考えられる褐色尿が投与開始後 22 週目以降、殆どの動物に、尿による外陰部周囲の被毛の着色が投与初期から投与期間を通して多くの動物に認められた。尿による外陰部周囲の被毛の着色は、1000 ppm 群の投与初期から投与期間を通して多くの動物に、250 ppm 群の 18 週から投与期間を通して少数の動物に認められた。

### - 3 体重

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

#### - 雄 -

4000 ppm 群では、全投与期間を通して体重の低値が認められた。1000 ppm 群では、投与 2 週目から 11 週目にかけて体重の低値が認められた。250 ppm 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（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、250 ppm 群：104%、

1000 ppm 群：103%、4000 ppm 群：92%であった。

- 雌 -

投与群では、ほぼ全投与期間を通して体重の低値が認められた。

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、250 ppm 群：97%、1000 ppm 群：91%、4000 ppm 群：83%であった。

#### - 4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1～4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

- 雄 -

4000 ppm 群では、ほぼ全投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。1000 ppm 群では、投与初期（2～4 週）に摂餌量の低値が認められた。250 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：15.8g、250 ppm 群：15.7g（99%）、1000 ppm 群：15.6g（99%）、4000 ppm 群：15.1g（96%）であった。

- 雌 -

4000 ppm 群では、投与開始から 78 週にかけて摂餌量の低値が認められた。1000 ppm 群でも投与開始から 78 週にかけて多くの週で摂餌量の低値が認められた。250 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：12.4g、250 ppm 群：12.1g（98%）、1000 ppm 群：11.8g（95%）、4000 ppm 群：11.4g（92%）であった。

#### - 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 -

各投与群の被験物質摂取量（mg/kg 体重/日）は、250 ppm 群：9～22、1000 ppm 群：35～87、4000 ppm 群：148～336 の範囲にあった。また、各投与群における全投与期間を通しての平均被験物質摂取量（mg/kg 体重/日）は、250 ppm 群：12、1000 ppm 群：47、4000 ppm 群：195 であった。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率は、250 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1000 ppm 群で 3.9 倍、4000 ppm 群で 16.3 倍であり、投与群の被験物質摂取量は設定用量比（公比 4）に近い値を示した。

- 雌 -

各投与群の被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、250 ppm 群 : 12 ~ 23、1000 ppm 群 : 47 ~ 89、4000 ppm 群 : 219 ~ 342 の範囲にあった。また、各投与群における全投与期間を通しての平均被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、250 ppm 群 : 15、1000 ppm 群 : 60、4000 ppm 群 : 247 であった。全投与期間にわたって平均した各投与群の平均被験物質摂取量の比率は、250 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1000 ppm 群で 4.0 倍、4000 ppm 群で 16.5 倍であり、投与群の被験物質摂取量は設定用量比 (公比 4) に近い値を示した。

#### - 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 -

メトヘモグロビン濃度の高値が 1000 ppm 以上の群に認められた。また、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び血小板数の低値、並びに網赤血球比の高値が 4000 ppm 群に認められた。

その他、MCV の低値が 1000 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 -

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、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び MCHC の低値、ならびに MCV、MCH 及び網赤血球比の高値が 1000 ppm 以上の群に認められた。なお、血小板数については、高値が 1000 ppm 群に、低値が 4000 ppm 群に認められた。

その他、白血球分類で好中球比、リンパ球比、単球比、その他 (other) に分類した細胞 (好中球、好酸球、好塩基球、単球及びリンパ球に分類できない細胞) の値は、統計学的に有意な差がみられたが、対照群とほぼ同様の値であり、大きな変化ではなかった。

#### - 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 -

AST、ALT、LDH 及び ALP の高値が 1000 ppm 以上の群に、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、トリグリセライド及び尿素窒素の高値、並びに総コレステロールの低値が 4000 ppm 群に認められた。なお、1000 ppm 群の AST、並びに 4000 ppm 群の LDH 及び総ビリルビンは統計学的には有意な高値であるが、平均値は対照群より低い値を示した。この原因は、AST、LDH 及び総ビリルビン検査では、対照群に 1 匹 (動物番号 1009)、非常に高値を示す動物が含まれていたためであった。

その他、 $\gamma$ -GTP の高値が 1000 ppm 群に認められたが、僅かな変化であった。

- 雌 -

総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、ALP 及び尿素窒素の高値、並びに総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の低値が 4000 ppm 群に認められた。

その他、ALT の高値が 250 ppm 群と 1000 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。

#### - 8 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

尿蛋白の陽性度の低下が 4000 ppm 群に認められた。

なお、ケトン体とビリルビンの検査において、雌雄とも 4000 ppm 群では全匹、被験物質の代謝物と考えられる尿の着色（褐色）のため、尿試験紙による判定ができなかった。従って、雌雄 4000 ppm 群のケトン体とビリルビンは評価ができなかった。

#### - 9 病理学的検査

##### - 9 - 1 剖検

剖検所見を TABLE I 1 ~ 6 に示した。

- 雄 -

脾臓表面が顆粒状を呈する動物が 4000 ppm 群に多数認められた（対照群 0 匹、250 ppm 群 0 匹、1000 ppm 群 0 匹、4000 ppm 群 41 匹）。

精巣の結節が投与濃度に対応して多く認められた（対照群 28 匹、250 ppm 群 33 匹、1000 ppm 群 39 匹、4000 ppm 群 41 匹）。

- 雌 -

脾臓表面が顆粒状を呈する動物が 4000 ppm 群に多数認められた（対照群 0 匹、250 ppm 群 0 匹、1000 ppm 群 0 匹、4000 ppm 群 42 匹）。

子宮の結節が 1000 ppm 以上の群に多く認められた（対照群 2 匹、250 ppm 群 1 匹、1000 ppm 群 8 匹、4000 ppm 群 8 匹）。

## - 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 -

肝臓の実重量と体重比の高値が 1000 ppm 以上の群に認められた。

腎臓の実重量の高値が 1000 ppm 以上の群に、体重比の高値が 4000 ppm 群に認められた。

精巣及び脾臓の実重量と体重比の高値が 4000 ppm 群に認められた。

その他、4000 ppm 群で、副腎、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 群の搬出時体重は対照群と比較して低値であり、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ものと考えられた。

- 雌 -

脾臓及び肝臓の実重量の高値が 4000 ppm 群に、体重比の高値が 1000 ppm 以上の群に認められた。

その他、腎臓、副腎、卵巣、心臓、肺及び脳の実重量や体重比に変化がみられたが、投与群の搬出時体重は対照群と比較して低値であり、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ものと考えられた。

## - 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

#### < 脾臓 >

脾臓の血管肉腫の発生 (対照群: 0 匹, 0%、250 ppm 群: 0 匹, 0%、1000 ppm 群: 0 匹, 0%、4000 ppm 群: 3 匹, 6%) は、Peto 検定 (死亡率法、死亡率 + 有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。脾臓の血管肉腫の 4000 ppm 群の発生率 6% (3/50 匹) 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 4%、平均 0.3%) を超えた。また、脾臓には血管腫が 250 ppm 群に 1 匹認められており、脾臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生 (対照群: 0 匹, 0%、250 ppm 群: 1 匹, 2%、1000 ppm 群: 0 匹, 0%、4000 ppm 群: 3 匹, 6%) も、Peto 検定 (死亡率法、死亡率 + 有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。



脾臓の血管肉腫は、強い細胞異型と多層化を特徴とし、自然発生の血管肉腫では認められないほどの著しい多層化した増殖を示す例もみられた。脾臓の血管腫及び血管肉腫の診断では、Pathology of the Fischer Rat(文献9)やToxicologic Pathology, Histopathology of the Spleen(文献10)を参考にした。

#### <皮下組織>

皮下組織の線維腫の発生(対照群: 2匹, 4%、250 ppm 群: 11匹, 22%、1000 ppm 群: 3匹, 6%、4000 ppm 群: 2匹, 4%)は、Fisher 検定で 250 ppm 群に有意な増加を示した。なお、皮下組織の線維肉腫の発生は 250 ppm 群に 2匹、4000 ppm 群に 1匹認められており、皮下組織の線維腫と線維肉腫を合わせた発生(対照群: 2匹, 4%、250 ppm 群: 13匹, 26%、1000 ppm 群: 3匹, 6%、4000 ppm 群: 3匹, 6%)も、Fisher 検定で 250 ppm 群に有意な増加を示した。しかし、皮下線維腫の発生増加は、最低投与濃度の 250 ppm 群だけであるため被験物質投与によるものではないと考えた。

皮下組織の血管腫と血管肉腫が 4000 ppm 群に各 1匹認められた。

#### <全臓器>

血管系腫瘍の発生について、全臓器での発生を集計して解析をおこなった。

脾臓と皮下組織を含む全臓器での血管肉腫の発生(対照群: 0匹, 0%、250 ppm 群: 0匹, 0%、1000 ppm 群: 0匹, 0%、4000 ppm 群: 4匹, 8%)は、Peto 検定(死亡率法、有病率法、死亡率+有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、4000 ppm 群の発生率 8%(4/50匹)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 4%、平均 0.3%)を超えていた。また、全臓器の血管腫の発生は 250 ppm 群と 4000 ppm 群に各 1匹認められており、全臓器での血管腫と血管肉腫を合わせた発生(対照群: 0匹, 0%、250 ppm 群: 1匹, 2%、1000 ppm 群: 0匹, 0%、4000 ppm 群: 5匹, 10%)も、Fisher 検定で 4000 ppm 群に有意な増加を示した。4000 ppm 群における全臓器の血管腫と血管肉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 4%、平均 0.7%)を超えていた。なお、全臓器に対する血管腫と血管肉腫合わせた Peto 検定と Cochran Armitage 検定は実施していない。

#### <精巣>

精巣の間細胞腫の発生(対照群: 37匹, 74%、250 ppm 群: 40匹, 80%、1000 ppm 群: 46匹, 92%、4000 ppm 群: 46匹, 92%)は、Fisher 検定で 1000 ppm 群と 4000 ppm 群に有意な増加を示し、Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示したが、精巣の間細胞腫の発生は、雄ラットにおける通常に加齢性変化であり、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 56%~最大 98%、平均 83.1%)内にあった。従って、精巣の間細胞腫の発生増加は被験物質投与によるものではないと判断した。

その他、膵臓の島細胞腺腫と下垂体の腺腫の発生は、Fisher 検定で 4000 ppm 群に有意な減少を示し、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

## 2) 非腫瘍性病変

## &lt; 脾臓 &gt;

被膜の繊維性組織の増生の発生が 4000 ppm 群で増加した。被膜の繊維性組織の増生は、剖検では脾臓表面の顆粒状として認められた。また、血管拡張、赤血球充満、髄外造血及びヘモジデリン沈着の発生が 4000 ppm 群で増加した。

## &lt; 腎臓 &gt;

慢性腎症の病変の程度が 4000 ppm 群で増強した。また、色素沈着の発生が 4000 ppm 群で増加した。沈着した色素は近位尿細管に認められ褐色を呈していたが、ベルリンブルー染色で陰性であることから、ヘモジデリン色素ではないと判断した。さらに、腎盂の鉍質沈着の発生が 4000 ppm 群で増加し、鉍質沈着の周囲の腎盂上皮が過形成を示した例(4000 ppm 群:3 匹)もみられた。

## &lt; 肝臓 &gt;

肝細胞の中心性肥大の発生が 4000 ppm 群で増加した。

## &lt; 鼻腔 &gt;

嗅上皮のエオジン好性変化の程度が 4000 ppm 群で増強した。なお、250 ppm 群と 1000 ppm でこの病変の発生率が減少した。

その他、肝臓の肉芽の発生減少が全投与群に、胆管増生の発生減少が 4000 ppm 群にみられた。また、眼の網膜の萎縮が全投与群で減少した。なお、鼻腔の腺の呼吸上皮化生が 250 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。

- 雌 -

## 1) 腫瘍性病変

## &lt; 子宮 &gt;

子宮の腺癌の発生(対照群:1 匹,2%、250 ppm 群:0 匹,0%、1000 ppm 群:0 匹,0%、4000 ppm 群:4 匹,8%)は、Peto 検定(有病率法、死亡率+有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。子宮の腺癌の 4000 ppm 群の発生は、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 4%、平均 0.6%)を超えた。なお、子宮の腺腫が 250 ppm 群に 1 匹認められており、子宮の腺腫と腺癌を合わせた発生(対照群:1 匹,2%、250 ppm 群:1 匹,2%、1000 ppm 群:0 匹,0%、4000 ppm 群:4 匹,8%)も、Peto 検定(死亡率+有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。

## &lt; 脾臓 &gt;

脾臓の単核球性白血病の発生(対照群:3 匹,6%、250 ppm 群:2 匹,4%、1000 ppm 群:0 匹,0%、4000 ppm 群:5 匹,10%)は Peto 検定(有病率法)で増加傾向を示したが、各投与群における発生は、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 2%~

最大 26% 平均 12.3%) 内であることから、単核球性白血病の発生増加は被験物質投与によるものではないと判断した。

その他、乳腺の線維腺腫の発生は、Fisher 検定で 4000 ppm 群に有意な減少を示し、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

## 2) 非腫瘍性病変

### < 脾臓 >

被膜の増生の発生が 4000 ppm 群で増加した。被膜の増生は、雄と同様に脾臓の線維性被膜が厚くなった変化で、剖検では脾臓表面の顆粒状として認められた。また、血管拡張、赤血球充満及び巣状の線維化の発生が 4000 ppm 群で増加した。

### < 腎臓 >

腎盂の鉍質沈着の発生が 1000 ppm 以上の群で増加した。また、色素沈着の発生が 4000 ppm 群で増加した。沈着した色素は近位尿管管に認められ褐色を呈していたが、ベルリンブルー染色で陰性であることから、ヘモジデリン色素ではないと判断した。

### < 肝臓 >

肝細胞の中心性肥大の発生が 4000 ppm 群で増加した。

その他、肝臓の好塩基性小増殖巣と炎症性細胞集簇巣の発生減少が 4000 ppm 群にみられた。なお、脾臓のヘモジデリン沈着は 1000 ppm 群で程度が増強し、眼の網膜の萎縮が 250 ppm 群と 1000 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。

## - 9 - 4 死因

病理学的にみた死亡 / 瀕死の原因を TABLE R 1, 2 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。

## 考察及びまとめ

ジフェニルアミンのラットを用いた 2 年間の混餌投与による経口試験（投与濃度：250、1000 及び 4000 ppm）によって、下記の結果を得た。

### - 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、被験物質摂取量

雌雄とも投与群の生存率は対照群と同様であった。一般状態の観察では、被験物質の代謝物によると考えられる褐色尿が雌雄の 4000 ppm 群に、尿による外陰部周囲の被毛の着色が雄の 4000 ppm 群と雌の全投与群に認められた。体重の低値が、雄の 4000 ppm 群と雌の全投与群に投与期間を通して、また、雄の 1000 ppm 群の投与初期のみに認められた。雄 4000 ppm 群、雌全投与群の 104 週目の体重は対照群に対し、雄 4000 ppm 群で 92%、雌は 250 ppm 群で 97%、1000 ppm 群で 91%、4000 ppm 群で 83%であった。摂餌量の低値が、雄の 1000 ppm 群の投与初期と 4000 ppm 群のほぼ全投与期間を通して、雌の 1000 ppm 群と 4000 ppm 群の投与開始から 78 週にかけて認められた。なお、雌雄とも投与群の被験物質摂取量の比率は、混餌中の被験物質濃度比と同様の値を示した。

### - 2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

本がん原性試験では、雌雄ともに、ジフェニルアミンの混餌経口投与による腫瘍の発生増加が認められた。

#### < 血管系腫瘍 >

雄では脾臓の血管肉腫の発生は Peto 検定（死亡率法、死亡率 + 有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。雄 4000 ppm 群の脾臓の血管肉腫の発生率 6%（3/50 匹）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 4%、平均 0.3%）を超えていた。また、脾臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生も、Peto 検定（死亡率法、死亡率 + 有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。

皮下組織と脾臓を含む全臓器での血管肉腫の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法、死亡率 + 有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。雄 4000 ppm 群の全臓器での血管肉腫の発生率 8%（4/50 匹）も、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 0.3%）を超えていた。また、全臓器での血管腫と血管肉腫を合わせた 4000 ppm 群の発生率 10%（5/50 匹）も、Fisher 検定で 4000 ppm 群に有意な増加を示し、4000 ppm 群における全臓器の血管腫と血管肉腫を合わせた発生率 10%（5/50 匹）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 4%、平均 0.7%）を超えていた。

従って、脾臓の血管系腫瘍の発生の増加傾向、並びに脾臓と皮下組織を含む全臓器の血管系腫瘍の発生増加は、被験物質投与によるものと考えられた。

### <子宮>

雌では子宮の腺癌の発生は、Peto 検定（有病率法、死亡率 + 有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。雌 4000 ppm 群の子宮腺癌の発生率 8% (4/50 匹) 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 4%, 平均 0.6%）を超えていた。また、子宮の腺腫と腺癌を合わせた発生も、Peto 検定（死亡率 + 有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。雌 4000 ppm 群の子宮の腺腫と腺癌を合わせた発生率 8% (4/50 匹) 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 4%, 平均 0.9%）を超えていた。従って、子宮の腺癌、並びに腺腫と腺癌を合わせた発生増加は、被験物質投与によるものと考えられた。

### - 3 その他の影響

ジフェニルアミンの混餌経口投与により、雌雄とも血液 / 造血系、脾臓、肝臓及び腎臓への影響が認められた。

血液 / 造血系への影響として、貧血を示す赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度の低値のいずれかが、雄は 4000 ppm 群に、雌は 1000 ppm 以上の群に認められた。貧血の原因は、メトヘモグロビンの高値が雄は 1000 ppm 以上の群に、雌は全投与群にみられることから、メトヘモグロビンによる赤血球傷害であると考えられた(文献 11)。なお、貧血に関連した変化として、血小板数の低値が雄の 4000 ppm 群に、網赤血球比の高値が雄の 4000 ppm 群と雌の 1000 ppm 以上の群に、総ビリルビンの高値が雌雄の 4000 ppm 群に、脾臓重量の高値が雄の 1000 ppm 以上の群と雌の 4000 ppm 群に認められた。さらに病理組織学的検査において、脾臓では、赤血球充満が雌雄 4000 ppm 群に、また、髄外造血及びヘモジデリン沈着が雄 4000 ppm 群に、被膜の繊維性組織の増生と血管拡張が雌雄の 4000 ppm 群にみられた。これらの変化は、血液中の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た。本試験の予備試験として行った 13 週間試験（文献 6）でも、血液 / 造血系への影響として、雄 640 ppm 群と雌全投与群（最低投与濃度 256 ppm）でメトヘモグロビンに起因すると考えられる貧血が示された。

脾臓への影響として、巣状の線維化が雌の 4000 ppm 群に認められた。また、肉眼所見で認められた脾臓表面の顆粒状は、脾臓の被膜の増生に対応した変化であった。

肝臓への影響として、肝臓重量の高値が雌雄の 1000 ppm 以上の群に、肝細胞の中心性肥大が雌雄 4000 ppm 群にみられた。血液生化学的検査では肝臓に対する傷害を示す AST、ALT 及び ALP の高値が雄の 1000 ppm 以上の群に、雌では ALP の高値が 4000 ppm 群にみられた。なお、肝細胞傷害と赤血球傷害の 2 つの要因による変化と考えられる LDH の高値が雄の 1000 ppm 以上の群にみられた（文献 12,13,14）。本試験の予備試験として行った 13 週間試験でも、肝臓の肝細胞の中心性肥大は、雌雄とも 104 週間投与の本試験と同じ投与濃度の 4000 ppm 群にみられた。

腎臓への影響として、腎臓重量の高値が雄 1000 ppm 以上の群に、慢性腎症の程度の増強が雄 4000 ppm 群に、近位尿細管の褐色色素沈着が雌雄 4000 ppm 群に、腎盂の鉍質沈着が雄 4000 ppm 群と雌 1000 ppm 以上の群にみられた。また、血液生化学的検査では、血漿中の尿素窒素の高値が雌雄とも 4000 ppm 群に認められた。本試験の予備試験として行った 13 週間試験で雄の 10000 ppm 群に腎臓の近位尿細管の変性が認められており、投与期間が 104 週間に延長された本試験では、腎臓への影響が 13 週間試験より低い投与濃度で認められた。

その他、鼻腔への影響として、嗅上皮でのエオジン好性変化の程度が雄 4000 ppm 群で増強し、250 ppm 群と 1000 ppm でこの病変の発生率が減少したが、毒性学的意義は不明であった。

#### - 4 無毒性量 (NOAEL) / 最低毒性量 (LOAEL)

ジフェニルアミンの 2 年間の混餌経口投与により、雌雄とも血液 / 造血系、脾臓、肝臓及び腎臓に対する影響が認められた。その中で、最も低い用量まで認められた毒性変化は、雄では血液 / 造血系への影響として、メトヘモグロビンの高値と脾臓重量の高値が、肝臓への影響として、肝臓重量の高値と AST、LDH 等の酵素活性の高値が 1000 ppm 群まで認められた。雌ではメトヘモグロビンの高値が最低投与濃度の 250 ppm 群まで認められた。従って、本試験における無毒性量 (NOAEL) は、雄では 250 ppm (12 mg/kg 体重/日) であり、雌では NOAEL は求められず、最低毒性量 (LOAEL) が 250 ppm (15 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

#### - 5 他文献との比較等

##### (1) 発がん性

ラットを用いた発がん性試験として以下の報告がある。

SD ラット (各群 50 匹) に、雄は 0、200、750、3750、7500 ppm、雌は 0、150、500、2500、5000 ppm の濃度でジフェニルアミンを (純度 : 99% 以上) を 2 年間 (102 週間) 混餌投与した試験で、雄の対照群、200、7500 ppm 群で死亡率がそれぞれ 78、78、45% に上昇し、雌の死亡率も同様の傾向がみられた。そのため、投与開始後 102 週目で試験を中止した。この条件下ではいずれの用量でもジフェニルアミン投与による腫瘍発生はみられなかった (文献 15)。この試験では、対照群、最低用量群に多数の死亡があることから、がん原性は評価できないと考えられる。

Thomas らは、ジフェニルアミンを 0、1、100、1000、5000 及び 10000 ppm の濃度で雌雄の Slonaker-Addis ラット雌雄各群 20 匹に 2 年間混餌投与した。僅かな貧血が 5000 ppm 群と 10000 ppm 群にみられ、また、尿路系には病理組織学的な変化として、5000 ppm

と 10000 ppm 群を中心に、間質性炎症を伴った腎尿細管の嚢胞状拡張がみられた。また、尿管には、蛋白液や血液由来の色素が認められた。ジフェニルアミン投与による腫瘍の発生増加はないと報告している（文献 16）。

*N*-エチル-*N*-ヒドロキシエチルニトロサミンをイニシエーターとしたジフェニルアミンの混餌投与による二段階発癌性試験が報告されている（文献 17）。1 群当たり 18 匹のラットにイニシエーターとして *N*-エチル-*N*-ヒドロキシエチルニトロサミンを混餌投与し、その後ジフェニルアミンを混餌投与した群、イニシエーターのみの群、ジフェニルアミンのみの投与群を設けて 22 週間飼育し、その後全ての群には基礎飼料のみで 32 週目まで飼育した。イニシエーター投与後にジフェニルアミンを投与した群では、腎臓腫瘍が 13/18 匹にみられたが、イニシエーターのみの投与群では 9/18 匹、ジフェニルアミンのみの投与群では腎臓腫瘍は発生しなかった。以上から、*N*-エチル-*N*-ヒドロキシエチルニトロサミンによる腎臓腫瘍発生に対して、ジフェニルアミンはプロモーション作用を示すと報告されている。

上記のいずれの試験でも、本試験で認められた脾臓や全臓器の血管系腫瘍、子宮腫瘍の発生増加は報告されていない。

## （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 を単回投与、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、全身及び各器官の放射能を測定したところ、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 18）。また、同試験では、排泄物中の未変化体と代謝物を測定しており、単回・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、排泄物中の代謝は、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及びグルクロン酸抱合であり、4-hydroxydiphenylamine、*O,N*-diglucuronide などの 12 種類の代謝物が同定された。

## （3）変異原性

ネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA97、TA98 を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化の有無にかかわらず陰性との報告がある（文献 19）。

日本バイオアッセイ研究センターで実施したチャイニーズハムスター肺線維芽細胞（CHL/IU 細胞）を用いた染色体異常試験では、代謝活性化の有無にかかわらず陽性（ $\text{D}_{20}$  値：0.042 mg/mL）との報告がある（文献 20）。

## 結論

F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、ジフェニルアミンの2年間（104週間）にわたる混餌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。

雄では脾臓の血管系腫瘍の発生の増加傾向、並びに脾臓と皮下組織を含む全臓器の血管系腫瘍の発生増加、雌では子宮に腺癌の発生の増加傾向が認められた。これらの結果から、ジフェニルアミンのラットに対するがん原性が示された。



## 文献

1. 化学工業日報社. 2011. 1911 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 715.
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. 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. 2008. 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. 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. Steven AS, Michel R, Paul CS. 1990. 22. Spleen, lymph nodes, and thymus. In: Pathology of the Fischer Rat (Gary AB, Scot LE, Michael RE, Chrles AM Jr, William FM, eds). San Diego, CA: Academic Press, 369-393.
10. Andrew WS. 2006. Histopathology of the spleen. Toxicologic Pathology. 34: 466-503.
11. 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.

- 12 . 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.
- 13 . 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.
- 14 . 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.
- 15 . Botta JA. 1994. 24 month combined oncogenicity/toxicity evaluation of diphenylamine in rats. Unpublished study No. 426D-102-048-91 from TPS, Inc., Mt Vernon, Indiana, USA. Submitted to WHO.(JMPR, 1998 から引用)
- 16 . Thomas JO, Ribelin WE, Wilson RH, Keppler DC, DeEds F. 1967. Chronic toxicity of DPA to albino rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 11: 184-194.
- 17 . Hiasa Y, Oshima M, Kitahori Y. 1982. Promoters in experimental carcinogenesis. Saishin Igaku. 37: 1771-1775.
- 18 . FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues. 1998. Diphenylamine (addendum). JMPR Evaluations 1998 Part Toxicological, Vol 949. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v098pr07.htm> [accessed 2 August 2007].
- 19 . NTP データベース  
[http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp\\_tox/index.cfm?fuseaction=salmonella.salmonellaData&endpointlist=SA&study%5Fno=127784&cas%5Fno=122%2D39%2D4&activetab=detail](http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm?fuseaction=salmonella.salmonellaData&endpointlist=SA&study%5Fno=127784&cas%5Fno=122%2D39%2D4&activetab=detail) [accessed 2 August 2011].
- 20 . 日本化学物質安全・情報センター編. 2005. 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 3 版 . 249-250.

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 群で判定が不能となつた。従つて、雌雄とも 4000 ppm 群のケトン体とビリルビンは評価ができなかつた。