

3-アミノ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（混水試験）報告書

試験番号：0711

CAS No. 591-27-5

2012年7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

## 目次

標題	.....	i
試験目的	.....	i
試験法	.....	i
GLP 対応	.....	i
動物福祉	.....	i
試験委託者	.....	i
試験施設及び運営管理者	.....	ii
試験日程	.....	ii
試験関係者一覧	.....	ii
試資料の保管	.....	iv
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	.....	iv
陳述書	.....	v
信頼性保証証明書	.....	vi
本文	.....	vii
TABLES	A 1～S 2	
FIGURES	1～8	
PHOTOGRAPHS	1～8	
APPENDICES	1-1～2	

## 標題

3-アミノ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（混水試験）

## 試験目的

3-アミノフェノールをラットに104週間経口（混水）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。

## 動物福祉

本試験は、平成18年4月28日付け、環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成18年6月1日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び平成18年11月27日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また、本試験計画書は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

## 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

3-アミノ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（混水試験）報告書

試験番号：0711

本文

## 本文目次

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

Ⅱ-3	観察・検査項目及び方法	10
Ⅱ-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	10
Ⅱ-3-2	体重測定	10
Ⅱ-3-3	摂餌量測定	10
Ⅱ-3-4	摂水量測定	10
Ⅱ-3-5	血液学的検査	10
Ⅱ-3-6	血液生化学的検査	11
Ⅱ-3-7	尿検査	11
Ⅱ-3-8	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
Ⅱ-4	数値処理と統計方法	12
Ⅱ-4-1	数値の取り扱いと表示	12
Ⅱ-4-2	統計処理	12
Ⅲ	試験成績	14
Ⅲ-1	生死状況	14
Ⅲ-2	一般状態	14
Ⅲ-3	体重	14
Ⅲ-4	摂餌量	15
Ⅲ-5	摂水量	15
Ⅲ-6	被験物質摂取量	16
Ⅲ-7	血液学的検査	16
Ⅲ-8	血液生化学的検査	17
Ⅲ-9	尿検査	17
Ⅲ-10	病理学的検査	17
	Ⅲ-10-1 剖検	17
	Ⅲ-10-2 臓器重量	17
	Ⅲ-10-3 病理組織学的検査	18
	Ⅲ-10-4 死因	20

IV 考察及びまとめ	21
IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、被験物質摂取量	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 無毒性量 (NOAEL)	23
IV-5 他文献との比較等	24
V 結論	25
VI 文献	26
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	29

## 要約

3-アミノフェノールのがん原性を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた混水経口投与による 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、3-アミノフェノールを混合した飲水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)、625、1250 及び 2500 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、摂餌量及び摂水量の測定、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、生存率の低下が雌の 2500 ppm 群にみられたが、雌雄とも特定の病変による死亡の増加はみられなかった。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 2500 ppm 群に、尿による外陰部周囲の被毛の着色 (褐色) が雌の 2500 ppm 群に認められた。体重の低値が、雌雄の 2500 ppm 群で投与期間を通して、また、雌雄の 1250 ppm 群では投与期間終期に認められた。摂餌量の低値が、雌雄の 2500 ppm 群で投与期間を通して認められた。摂水量では、雌雄の 2500 ppm 群と雌の 1250 ppm 群で投与期間を通して低値が認められた。また、雄の 1250 ppm 群でも投与期間の多くの週で低値がみられた。

主な腫瘍性病変を付表 1, 2 に示す。雄では甲状腺の濾胞状腺癌の発生が、傾向検定 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定) でのみ増加傾向を示したが、その発生は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内であった。また、濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生は、傾向検定でのみ増加傾向を示し、2500 ppm 群の発生は、ヒストリカルコントロールデータの範囲を 1 例超えた。雌では腫瘍の発生増加及び腫瘍関連病変の発生増加は認められなかった。

腫瘍以外の影響として、腎臓では、乳頭壊死と褐色色素沈着の発生増加が雄の 2500 ppm 群と雌の 1250 ppm 以上の群で、慢性腎症の程度の増強が雄の 2500 ppm 群で認められた。その他、血漿中の尿素窒素の高値が雄の 1250 ppm 以上の群と雌の 2500 ppm 群に、尿潜血の陽性例の増加が雌の 2500 ppm 群に認められた。鼻腔で嗅上皮のエオジン好性変化の程度の増強が雌の 2500 ppm 群でみられた。

以上、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、3-アミノフェノールの 2 年間 (104 週間) にわたる混水経口投与によるがん原性試験を行った結果、雄ラットの甲状腺における濾胞状腺癌、及び濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生は増加傾向を示したが、3-アミノフェノールの雄ラットに対するがん原性を示す証拠としては不十分であった。雌ラットでは腫瘍の発生増加は認められず、がん原性は示されなかった。

なお、2 年間の混水経口投与における無毒性量 (NOAEL) は、腎臓への影響をエンドポイントとして雌雄とも 625 ppm (雄: 33 mg/kg 体重/日、雌: 50 mg/kg 体重/日) であると考えられた。



付表 1 3-アミノ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	625	1250	2500	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		検査動物数	50	50	50	50		
良 性 腫 瘍	皮膚	角化棘細胞腫	3	2	4	0		
	皮下組織	線維腫	5	11	4	4		
	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	3	1	1		
	膵臓	島細胞腺腫	2	6	0	5		
	下垂体	腺腫	18	21	19	10		↓
	甲状腺	C-細胞腺腫	10	7	7	8		
	甲状腺	濾胞状腺腫	1	1	2	1		
	副腎	褐色細胞腫	8	4	2 *	1 *		↓↓
	精巣	間細胞腫	34	32	35	35		
	包皮腺	腺腫	4	2	1	0		↓
	耳道腺	耳道腺腫瘍:良性	1	0	0	2		
	悪 性 腫 瘍	脾臓	単核球性白血病	4	4	3	1	
下垂体		腺癌	1	0	0	0		
甲状腺		C-細胞癌	3	1	3	2		
甲状腺		濾胞状腺癌	0	0	1	4	↑↑	↑↑
副腎		褐色細胞腫:悪性	1	2	2	0		
耳道腺		耳道腺腫瘍:悪性	0	0	0	1		
腹膜		中皮腫	1	2	1	4		
	下垂体	腺腫+腺癌	19	21	19	10 *		↓
	甲状腺	濾胞状腺腫+濾胞状腺癌	1	1	3	5	↑	↑
	副腎	褐色細胞腫 +褐色細胞腫:悪性	9	6	4	1 **		↓↓
	耳道腺	耳道腺腫瘍:良性 +耳道腺腫瘍:悪性	1	0	0	3	↑	

\* :  $p \leq 0.05$  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)

付表 2 3-アミノ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	625	1250	2500	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		検査動物数	50	50	50	50 <sup>a)</sup>		
良 性 腫 瘍	皮下組織	線維腫	1	3	1	1		
	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	3	0	1	0		
	膵臓	島細胞腺腫	1	3	1	0		
	下垂体	腺腫	13	11	14	9		
	甲状腺	C-細胞腺腫	2	2	5	4		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	13	4 *	8	9		
	乳腺	線維腺腫	5	8	7	6		
	陰核腺	腺腫	2	3	2	2		
悪 性 腫 瘍	脾臓	単核球性白血病	4	2	4	0		
	子宮	子宮内膜間質性肉腫	1	3	1	0		

a) : 下垂体の検索動物数 49 匹

\* :  $p \leq 0.05$  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

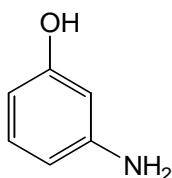
名 称： 3-アミノフェノール (3-Aminophenol)

別 名： *m*-アミノフェノール (*m*-Aminophenol)

CAS No. : 591-27-5

#### I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 109.13

#### I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 白色ないし薄い灰色の結晶

比 重 : 1.265

融 点 : 122°C

溶 解 性 : 2.6 g/100 g 水 (0°C)、アルコール、エーテルに可溶

保 管 条 件 : 室温で暗所に保管

### I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : WKE2284 (2008年 7月 4日~2009年 11月 13日)

CDQ4568 (2009年 11月 13日~2010年 7月 9日)

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

グ レ ー ド : 和光一級

純 度 : WKE2284 : 99.7%

CDQ4568 : 99.8%

(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 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 3-アミノ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 に示す。

#### 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 に示す。

### 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 ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 250 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：116～132g、雌：95～109g）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、被験物質を設定濃度に調製した被験物質混合飲水を、褐色ガラス製給水瓶に充填し、動物に自由摂取させた。なお、給水瓶の交換は週に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直前まで連続投与した。

#### II-1-4 投与濃度

投与濃度は、625、1250及び2500 ppm（重量比 w/w）の3段階（公比2）に設定した。なお、対照群として脱イオン水〔市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過し、紫外線照射、脱イオンしてさらにフィルターろ過したもの〕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、水に可溶で水溶液中で安定であるため、混水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化学剤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0692）の結果（文献6）をもとに設定した。13週間試験は、F344/DuCrIcrlj ラットの雌雄に、0、625、1250、2500、4000及び5000 ppm（w/w）の濃度の被験物質混合飲水を自由摂取させることによって行った。

13週間試験の結果、全ての投与群に死亡はみられなかった。5000 ppm群では、雌雄とも、体重増加の抑制（最終体重値は対照群に対し、雄82%、雌87%）、摂餌量及び摂水量の低値がみられた。血液系への影響として、血液学的検査で、メトヘモグロビン濃度の増加が雌に、貧血を示すパラメータの変化が雌雄に認められた。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脾臓にみられた。腎臓には、腎臓重量体重比の高値と好酸体の程

度の増強が雄に、実重量と体重比の高値が雌に、近位尿細管の褐色色素の沈着が雌雄に認められ、また、血漿尿素窒素の高値が雌雄に、尿蛋白の陽性度の増加が雌にみられ、腎臓への影響が示唆された。4000 ppm 群では、雌雄とも体重増加の抑制（最終体重は対照群に対し、雄 89%、雌 91%）、血液学的検査及び病理組織学的検査で貧血及びそれに関連した変化、腎臓への影響を示唆する変化（雌雄で腎臓重量と尿素窒素の高値、雌で尿蛋白の陽性度の増加）がみられた。2500 ppm 群では、最終体重は対照群に対し、雄 92%、雌 95%であった。雄では腎臓と肝臓重量の体重比の高値がみられたのみであったが、雌では、軽度の貧血と腎臓への影響を示唆する変化（腎臓重量と尿素窒素の高値、尿蛋白の陽性度の増加）が認められた。1250 ppm 以下の群では、雄には変化はみられず、雌では 625 ppm まで軽度の赤血球数の減少がみられた。

以上の結果から、5000 ppm 群と 4000 ppm 群では、雌雄とも体重増加の抑制があり、貧血、腎臓への影響を示唆する変化がみられることから、2年間の長期投与を行った場合、10%を超える体重抑制と生存率の低下が懸念され、がん原性試験の最高濃度としては高いと考えられた。一方、2500 ppm 群では、体重増加の抑制が雌雄とも 10%以内であり、雄では腎臓と肝臓の体重比の高値、雌では貧血と腎臓への影響を示唆する変化がみられたもののその程度は比較的軽度であることから、がん原性試験の最高濃度は 2500 ppm が適切であると考えた。

従って、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 2500 ppm を最高濃度とし、以下 1250 及び 625 ppm（公比 2）と決定した。

## II-1-6 被験物質混合飲水の調製方法

被験物質に脱イオン水を加え、マグネチックスターラー（池田理化(株)製 1S 3GL 型）を用いて各設定濃度になるように被験物質を溶解した。なお、試験における濃度の表示は、ppm（w/w）とした。また、調製頻度は給水瓶の交換に合わせ、週に 2 回とした。

## II-1-7 調製時における被験物質混合飲水中の被験物質の濃度

被験物質混合飲水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飲水を 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。

その結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対して 95.6~105%の範囲にあった。従って、被験物質混合飲水中の被験物質は、設定濃度に対して正確に調製されたことを確認した。

その結果を APPENDIX 1-3 に示す。

## II-1-8 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性

被験物質混合飲水中の被験物質の安定性は、13週間毒性試験(試験番号 0692)において、100 ppm と 7500 ppm の被験物質混合飲水で確認した。100 ppm と 7500 ppm の被験物質混合飲水をラット用給水瓶に充填し、動物飼育室内で室温保管(4日間)し、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、被験物質混合飲水中の被験物質は安定であった。

その結果を APPENDIX 1-4 に示す。

## II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂水量及び設定濃度より、被験物質の体重 kg 当りの 1 日摂取量 (mg/kg 体重/日) 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。

群名称	動物数(動物番号)	
	雄	雌
対照群	50 匹 (1001~1050)	50 匹 (2001~2050)
625 ppm 群	50 匹 (1101~1150)	50 匹 (2101~2150)
1250 ppm 群	50 匹 (1201~1250)	50 匹 (2201~2250)
2500 ppm 群	50 匹 (1301~1350)	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：101室、雌：105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、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℃ <101室：23.0±0.3℃、105室：22.8±0.3℃>

湿度：55±15% <101室：57±1%、105室：57±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固型飼料（30kGy-γ線照射滅菌飼料）を使用し、固型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中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株)から分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は本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、検疫期間については市水（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。馴化期間については、脱イオン水を給水瓶により自由摂取させた。投与期間については、各投与群には脱イオン水を用いて所定の濃度に調製した被験物質混合飲水を、対照群には脱イオン水のみを給水瓶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 摂水量測定

摂水量は、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)給水量及び残水量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂水量を算出した。

### II-3-5 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に示す。

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-3-6 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 に示す。

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-3-7 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

### Ⅱ-3-8 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

## 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。

摂水量は g を単位とし、給水量及び残水量を小数点以下第 1 位まで測定し、給水量値から残水量値を減じて摂水量とした。この値を測定期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂水量を算出し、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、摂水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。

### 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、摂水量、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、Dunnnett 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 Dunnnett 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、 $\chi^2$  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。

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

### 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 に示す。

—雄—

各投与群の投与終了時の生存率は対照群とほぼ同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：40 匹（80%）、625 ppm 群：39 匹（78%）、1250 ppm 群：33 匹（66%）、2500 ppm 群：34 匹（68%）であった。

—雌—

2500 ppm 群の生存率は対照群よりやや低値であった。625 ppm 群と 1250 ppm 群の生存率は対照群とほぼ同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：43 匹（86%）、625 ppm 群：40 匹（80%）、1250 ppm 群：42 匹（84%）、2500 ppm 群：35 匹（70%）であった。

#### Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示す。

—雄—

2500 ppm 群では、褐色尿が投与期間を通して全動物に認められた。1250 ppm 群と 625 ppm 群では、被験物質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。

—雌—

2500 ppm 群では、褐色尿が投与期間を通して全動物に認められた。また、外陰部周囲の被毛の着色（褐色）もみられた。1250 ppm 群と 625 ppm 群では、被験物質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 に示す。

—雄—

2500 ppm 群では、投与期間を通して体重の低値が認められた。1250 ppm 群では、投与 98 週目以降に僅かな低値が認められた。625 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、625 ppm 群：96%、1250 ppm 群：94%、2500 ppm 群：85%であった。

—雌—

2500 ppm 群では、投与期間を通して体重の低値が認められた。1250 ppm 群では、投与 82 週目以降に低値が認められた。625 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、625 ppm 群：95%、1250 ppm 群：91%、2500 ppm 群：79%であった。

### Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1~4 及び FIGURE 5, 6 に示す。

—雄—

2500 ppm 群では、投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。1250 ppm 群と 625 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：15.9g、625 ppm 群：15.9g（100%）、1250 ppm 群：15.9g（100%）、2500 ppm 群：15.1g（95%）であった。

—雌—

2500 ppm 群では、投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。1250 ppm 群と 625 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：11.3g、625 ppm 群：11.4g（101%）、1250 ppm 群：11.1g（98%）、2500 ppm 群：10.2g（90%）であった。

### Ⅲ-5 摂水量

摂水量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 7, 8 に示す。

—雄—

2500 ppm 群では、投与期間を通して摂水量の低値が認められた。1250 ppm 群でも投与期間の多くの週で摂水量の低値がみられた。625 ppm 群では、投与初期に摂水量の低値が散見された。

全投与期間における各群の平均一日摂水量（対照群に対する相対比）は、対照群：18.2g、625 ppm 群：17.7g（97%）、1250 ppm 群：16.9g（93%）、2500 ppm 群：14.5g（80%）であった。

—雌—

2500 ppm 群と 1250 ppm 群では、投与期間を通して摂水量の低値が認められた。625 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水量（対照群に対する相対比）は、対照群：17.2g、

625 ppm 群 : 16.5g (96%)、1250 ppm 群 : 14.2g (83%)、2500 ppm 群 : 10.9g (63%)  
であった。

### III-6 被験物質摂取量

体重、摂水量及び設定濃度より算出した被験物質摂取量を TABLE F 1, 2 に示す。

—雄—

各投与群の被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、625 ppm 群 : 23~69、1250 ppm 群 : 44~133、2500 ppm 群 : 82~230 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、625 ppm 群 : 33、1250 ppm 群 : 63、2500 ppm 群 : 114 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、625 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1250 ppm 群で 1.9 倍、2500 ppm 群で 3.5 倍であり、2500 ppm 群の被験物質摂取量は設定濃度比 (公比 2) よりやや低い値を示した。

—雌—

各投与群の被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、625 ppm 群 : 33~81、1250 ppm 群 : 63~152、2500 ppm 群 : 126~248 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、625 ppm 群 : 50、1250 ppm 群 : 88、2500 ppm 群 : 147 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、625 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1250 ppm 群で 1.8 倍、2500 ppm 群で 2.9 倍であり、2500 ppm 群の被験物質摂取量は設定濃度比 (公比 2) よりやや低い値を示した。

### III-7 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示す。

—雄—

被験物質投与によると思われる変化は認められなかった。

—雌—

1250 ppm 群と 2500 ppm 群の白血球分類で、単球及びその他 (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) で統計学的に有意な高値 (1250 ppm 群の単球は低値) が認められたが、対照群とほぼ同様の値であり、僅かな変化であった。

### Ⅲ-8 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE H 1, 2 に示す。

—雄—

尿素窒素の高値が 1250 ppm 以上の群に、 $\gamma$ -GTP の高値が 2500 ppm 群に認められた。

—雌—

尿素窒素の高値とトリグリセライドの低値が 2500 ppm 群に認められた。その他、総ビリルビンの高値が 2500 ppm 群に認められたが、僅かな変化であった。

### Ⅲ-9 尿検査

尿検査の結果を TABLE I 1, 2 に示す。

—雄—

被験物質投与によると思われる変化は認められなかった。

—雌—

潜血の陽性例の増加が 2500 ppm 群に認められた。

### Ⅲ-10 病理学的検査

#### Ⅲ-10-1 剖検

剖検所見を TABLE J 1~6 に示す。

—雌雄—

被験物質投与によると思われる所見の増加は認められなかった。

#### Ⅲ-10-2 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 K 1, 2 と TABLE L 1, 2 に示す。

—雄—

1250 ppm 群と 2500 ppm 群で、副腎、心臓、肺、腎臓、肝臓及び脳の実重量や体重比に変化がみられたが、1250 ppm 群と 2500 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体重の低値に関連したものと考えられた。

—雌—

1250 ppm 群と 2500 ppm 群で、副腎、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓及び脳の実重量や体重比に変化がみられたが、1250 ppm 群と 2500 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体重の低値に関連したものと考えられた。



### Ⅲ-10-3 病理組織学的検査

検査結果のうち非腫瘍性病変を TABLE M 1~6 に示す。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を TABLE N 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を TABLE O 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE P 1, 2 に、転移性病変を TABLE Q 1, 2 に示す。また、腫瘍のうち統計学的に有意差が認め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 (検査総匹数と腫瘍発生匹数、試験ごとの平均発生率 (%) と発生率 (最小%~最大%)) を TABLE R に示す。また、病理組織学的所見の代表例を写真 1~8 に示す。

— 雄 —

#### 1) 腫瘍性病変

##### < 甲状腺 >

甲状腺の濾胞状腺癌の発生 (対照群 : 0 匹, 0%、625 ppm 群 : 0 匹, 0%、1250 ppm 群 : 1 匹, 2%、2500 ppm 群 : 4 匹, 8%) は、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示したが、Fisher 検定では増加を示さなかった。また、1250 ppm 群と 2500 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 8%、平均発生率 1.3%) 内であった。さらに、濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生 (対照群 : 1 匹, 2%、625 ppm 群 : 1 匹, 2%、1250 ppm 群 : 3 匹, 6%、2500 ppm 群 : 5 匹, 10%) は、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示したが、Fisher 検定では増加を示さなかった。2500 ppm 群の発生率 10% は、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 0%~最大 8%、平均発生率 2.3%) を 1 例超えた。なお、濾胞状腺腫の発生 (対照群 : 1 匹, 2%、625 ppm 群 : 1 匹, 2%、1250 ppm 群 : 2 匹, 4%、2500 ppm 群 : 1 匹, 2%) は対照群にもみられ、傾向検定、Fisher 検定ともに増加を示さなかった。また、濾胞上皮には前腫瘍性病変の発生増加もみられなかった。甲状腺の濾胞状腺癌は、強い細胞異型と多層化、線維性被膜の肥厚を特徴とし、線維性被膜を破壊して増殖するものもみられたが、通常対照群でみられるものと病理組織学的に差はなかった。甲状腺の濾胞状腺癌及び濾胞状腺腫の診断では、Pathology of the Fischer Rat (文献 9)、Guides for Toxicologic Pathology, Proliferative Lesions of the Thyroid and Parathyroid Glands (文献 10) 及び毒性病理組織学 (文献 11) を参考にした。

##### < 耳道腺 >

耳道腺の耳道腺腫瘍: 良性と耳道腺腫瘍: 悪性を合わせた発生 (対照群 : 1 匹, 2%、625 ppm 群 : 0 匹, 0%、1250 ppm 群 : 0 匹, 0%、2500 ppm 群 : 3 匹, 6%) は、Peto 検定 (死亡率法、死亡率法+有病率法) で増加傾向を示したが、Fisher 検定では増加を示さなかった。2500 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%、平均発生率 0.9%) を 1 例超えたが、2500 ppm 群の発生は 3 匹と僅かであったこと、また、対照群にも発生がみられたことから、耳道腺腫瘍: 良性と耳道腺腫瘍: 悪性を合わせた

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、副腎の褐色細胞腫の発生が、Fischer 検定で 1250 ppm 群と 2500 ppm 群で統計的に有意な減少を示し、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。また、副腎の褐色細胞腫と褐色細胞腫：悪性を合わせた発生が、Fisher 検定で 2500 ppm 群に統計的に有意な減少を示し、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

下垂体の腺腫の発生が、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。また、下垂体の腺腫と腺癌を合わせた発生が、Fischer 検定で 2500 ppm 群で統計的に有意な減少を示し、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

包皮腺の腺腫の発生が、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

## 2) 非腫瘍性病変

### <腎臓>

腎乳頭壊死と褐色色素沈着（暗褐色）が 2500 ppm 群で増加した。また、慢性腎症が 2500 ppm 群で程度が増強した。腎乳頭壊死の診断は、軽度：乳頭に壊死が認められるもの、中等度：壊死が広く認められ、乳頭先端が欠落するもの（片側）、重度：両側の壊死が広く認められるものとした。

その他、肝臓で肝海綿状変性の発生減少が 2500 ppm 群にみられた。

—雌—

## 1) 腫瘍性病変

被験物質の投与による腫瘍の発生増加はみられなかった。

子宮の子宮内膜間質性ポリープの発生が、Fisher 検定で 625 ppm 群に統計的に有意な減少を示した。

## 2) 非腫瘍性病変

### <腎臓>

腎乳頭壊死と褐色色素沈着（暗褐色）が 1250 ppm 群と 2500 ppm 群で増加した。

### <鼻腔>

嗅上皮のエオジン好性変化が 2500 ppm 群で程度が増強した。

その他、甲状腺の C-細胞過形成の発生減少が 2500 ppm 群でみられた。肝臓の肉芽形成の増加が 625 ppm 群で、炎症性細胞集簇の減少が 625 ppm 群と 1250 ppm 群で、下垂体の血管拡張の増加と眼の網膜萎縮の減少が 1250 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

### Ⅲ-10-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE S 1, 2 に示す。

—雄—

すべての投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡動物の増加はみられなかった。

—雌—

2500 ppm 群で総死亡／瀕死動物数は対照群と比較してやや多かったが、すべての投与群に特定の病変による死亡の増加はみられなかった。

#### IV 考察及びまとめ

3-アミノフェノールのラットを用いた2年間の混水投与による経口試験(投与濃度:625、1250及び2500 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、摂水量、被験物質摂取量

生存率の低下が雌の2500 ppm群にみられたが、雌雄とも特定の病変による死亡の増加はみられなかった。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2500 ppm群に、尿による外陰部周囲の被毛の着色(褐色)が雌の2500 ppm群に認められた。体重の低値が、雌雄の2500 ppm群で投与期間を通して、また、雌雄の1250 ppm群では投与期間終期に認められた。2500 ppm群と1250 ppm群の体重は対照群に対し、雄では2500 ppm群85%、1250 ppm群94%、雌では2500 ppm群79%、1250 ppm群91%であった。摂餌量は、雌雄の2500 ppm群で投与期間を通して低値が認められた。摂水量は、雌雄の2500 ppm群と雌1250 ppm群で投与期間を通して低値が認められた。また、雄の1250 ppm群でも投与期間の多くの週で低値がみられた。なお、雌雄の2500 ppm群で平均被験物質摂取量は設定濃度比よりやや低い値を示した。これは、摂水量の低値に起因したものであった。

##### IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雄では甲状腺の濾胞状腺癌の発生は、Peto検定(有病率法)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示したが、Fisher検定では増加を示さなかった。2500 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(57試験、最小0%~最大8%、平均発生率1.3%)の上限と同率であった。なお、ヒストリカルコントロールデータの最高発生率8%を示した試験は、19年前(1993年導入動物)に実施した1試験のみであった。近年10年間(2002年以降の導入動物)のヒストリカルコントロールデータの範囲(18試験、最小0%~最大2%、平均発生率0.4%)と比較すると、その範囲を超えていた。さらに、濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生は、Peto検定(有病率法)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示したが、Fisher検定では増加を示さなかった。2500 ppm群の発生率10%(5/50匹)は、ヒストリカルコントロールデータの範囲(57試験、最小0%~最大8%、平均発生率2.3%)を1例超えた。また、近年10年間のヒストリカルコントロールデータの範囲(18試験、最小0%~最大6%、平均発生率1.7%)も超えた。なお、濾胞状腺腫の発生は対照群にもみられ、傾向検定、Fisher検定ともに増加を示さなかった。また、濾胞上皮には前腫瘍性病変の発生増加もみられなかった。

従って、雄の甲状腺における濾胞状腺癌、及び濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生は増加傾向を示したが、雄ラットの3-アミノフェノール投与によるがん原性を示す証拠と

しては不十分であると判断した。なお、雌ラットには腫瘍の発生増加及び腫瘍関連病変の発生増加は認められなかった。

OECD テストガイドライン (文献 5) では、がん原性試験の最高用量の設定に際しては、亜慢性毒性試験の結果より、腫瘍以外の原因で正常な寿命を変化させず、10%以下の体重増加の抑制等の最小限の毒性徴候を表すのに十分な用量であるべきであるとしている。即ち、最大耐量 (Maximum Tolerated Dose, MTD) を選択することを定めている。また、労働省労働基準局長通達「がん原性試験による調査の基準」(文献 4) でも、最高用量は、「腫瘍以外の原因で正常な寿命を変えることなく、かつ、最小限の毒性兆候を表すのに十分な用量とすること」と定めている。

本がん原性試験の投与濃度は、II-1-5 に示したように、13 週間毒性試験 (試験番号 0692) の結果 (文献 6) をもとに決定した。13 週間毒性試験は、0、625、1250、2500、4000 及び 5000 ppm で実施し、その結果、5000 ppm 群と 4000 ppm 群では、雌雄とも体重増加の抑制、貧血及び腎臓への影響を示唆する変化がみられることから、2 年間の長期投与では、10%を超える体重抑制と生存率の低下が懸念され、がん原性試験の最高濃度としては高いと考えられた。一方、2500 ppm 群では、体重増加の抑制が雌雄とも 10%以内であり、雄では腎臓と肝臓重量 (体重比) の高値、雌では貧血と腎臓への影響を示唆する変化がみられたもののその程度は軽度であることから、がん原性試験の最高濃度は 2500 ppm とした。

本試験の結果、生存率の低下が雌の 2500 ppm 群にみられたが、雌雄とも特定の病変による死亡の増加はみられなかった。また、2500 ppm 群の最終体重は、雄では対照群の 85%、雌では 79%であり、10%以上の増加抑制が認められた。しかし、10%以上の増加抑制が認められたのは、雄では投与 86 週目以降、雌では投与 42 週目以降であった。従って、最高用量である雌雄の 2500 ppm は、本がん原性試験結果を評価する上で、問題となる用量ではないと判断した。

#### IV-3 その他の影響

3-アミノフェノールの混水経口投与により、雌雄とも腎臓への影響が認められた。さらに雌には鼻腔への影響もみられた。

腎臓への影響として、腎臓乳頭壊死と褐色色素沈着の発生増加が雄の 2500 ppm 群と雌の 1250 ppm 以上の群で、慢性腎症の程度の増強が雄の 2500 ppm 群で認められた。腎乳頭壊死は、13 週間毒性試験 (文献 6) では本試験より高濃度である 4000 ppm 群と 5000 ppm 群の雌雄ともに発生がみられなかったが、2 年間の長期投与により、雄の 2500 ppm 群と雌の 1250 ppm 以上の群で発生増加した。腎臓の褐色色素沈着の発生増加は、13 週間毒性試験でも雄の 4000 ppm 以上の群と雌の 2500 ppm 以上の群に認められたが、2 年間の長期投与により、低濃度でも発生がみられた。なお、沈着した色素を特定するために一部の動物の腎臓を特殊染色し、腎臓に認められた褐色色素はベルリンブルー染色陰性であることか

ら、ヘモジデリン色素ではないと判断した。また、Schmorl 反応陽性（青緑色）、PAS 反応陽性（赤紫色）であり、脂質過酸化物であるリポフスチン（文献 12）と同様の染色性を示した。しかし、リポフスチン沈着は、通常ヘマトキシリン・エオジン染色で黄褐色を呈し（文献 12）、腎臓でみられた褐色色素沈着（暗褐色）とは異なる染色性を示した。従って、腎臓に沈着した色素を特定することはできなかった。慢性腎症の発生が雄では対照群を含むすべての群のほとんどの動物にみられ、雌でも多くの動物でみられたが、雄の 2500 ppm 群でその程度が増強した。慢性腎症はラットの腎臓での加齢性病変であり、長期飼育されたラットに好発することが知られている。F344 ラットでも高頻度に発生し、雄ラットで顕著であるが、雌ラットではその発生率は雄より低く、進行も遅いと報告されており（文献 13、14、15）、本試験でも同様の結果であった。3-アミノフェノールの長期投与は、雄ラットの腎臓の加齢性病変である慢性腎症の程度を増強させたと考えられる。その他、血液生化学検査で腎臓への影響として、尿素窒素の高値が雄の 1250 ppm 以上の群と雌の 2500 ppm 群に、尿検査で潜血の陽性例の増加が雌の 2500 ppm 群に認められた。

鼻腔への影響として、嗅上皮のエオジン好性変化の発生が雌雄とも対照群を含むすべての群のほとんどの動物にみられ、その程度の増強が雌の 2500 ppm 群でみられた。嗅上皮のエオジン好性変化は加齢性の病変であり、老齢のラットで高頻度に観察される（文献 16、17）。なお、13 週間毒性試験では、3-アミノフェノール投与による鼻腔への影響は認められなかった。

その他、血液生化学的検査で、 $\gamma$ -GTP の高値が雄の 2500 ppm 群にみられたが、病理組織学的検査では、肝・胆道系への影響は認められなかった。また、トリグリセライドの低値が雌の 2500 ppm 群にみられた。

#### IV-4 無毒性量 (NOAEL)

以上のように、本がん原性試験では、雌雄とも腎臓に対する影響、さらに雌では鼻腔への影響が認められた。その中で、最も低濃度まで認められた毒性変化は、雄では血漿中の尿素窒素の高値が 1250 ppm 群まで、雌では腎臓の乳頭壊死と褐色色素沈着の発生増加が 1250 ppm 群まで認められた。従って、本試験における 3-アミノフェノールのラットに対する 2 年間混水経口投与による無毒性量 (NOAEL) は、腎臓への影響をエンドポイントとして雌雄とも 625 ppm（雄：33 mg/kg 体重/日、雌：50 mg/kg 体重/日）であると考えられた。

#### IV-5 他文献との比較等

##### (1) がん原性等

3-アミノ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または長期毒性試験の報告は限られている。また、IARC では3-アミノフェノールのがん原性について評価を行っていない。

Kurata らは、*N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) でイニシエートしたラットに、3-アミノフェノールを混餌投与し、肝臓と腎臓の発がん性について報告している(文献 18)。1 群当たり 25 匹の F344 雄ラットに、0.1%の濃度の EHEN を 2 週間飲水投与し、3 週目から 0.8%の濃度の 3-アミノフェノールを 49 週間混餌投与した群 (EHEN+3-アミノフェノール群)、EHEN のみの群、3-アミノフェノールのみの群を設け、52 週目まで飼育した。その結果、肝臓では胎盤型グルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (GST-P) 陽性肝細胞巢の発生個数/cm<sup>2</sup> は、EHEN+3-アミノフェノール群では、EHEN のみの群と比較して減少したが、その発生動物数と面積には差はみられず、肝細胞がんの発生率にも差は認められなかった。また、3-アミノフェノールのみの群では、GST-P 陽性肝細胞巢の発現及び肝細胞がんの発生はみられていない。腎臓では EHEN+3-アミノフェノール群では、微小腺腫 (microadenoma) と腺腫とも、その発生動物数と発生個数/cm<sup>2</sup> の増加はみられなかった。また、3-アミノフェノールのみの群では、微小腺腫と腺腫の発生はみられていない。

##### (2) 遺伝毒性

細菌を用いる復帰変異試験では、ネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98、TA1537 菌株及び大腸菌 WP2*uvrA* 菌株において、代謝活性化の有無 (S9 +/-) にかかわらず陰性の結果を示した(文献 19)。また、TA98 では S9 (-/+) で陰性(文献 20)、TA98 では S9 (+) で陰性、TA100 では S9 (-/+) で陰性(文献 21)の報告がある。なお、ネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA97、TA98 菌株を用いた試験では、TA98 のみで S9 (+) で陽性の報告がある(文献 22)。

チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU) 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構造異常 (24 時間処理) が認められている(文献 23)。

## V 結論

F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、3-アミノフェノールの2年間（104週間）にわたる混水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。

雄ラットの甲状腺における濾胞状腺癌、及び胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生は増加傾向を示したが、3-アミノフェノールの雄ラットに対するがん原性を示す証拠としては不十分であった。雌ラットでは腫瘍の発生増加は認められず、がん原性は示されなかった。



## VI 文献

1. 化学工業日報社. 2012. 16112 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 674.
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). 2007. 3-アミノフェノール, 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. 2008. 3-アミノ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 (混水試験) 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. Hardisty JF, Boorman GA. 1990. 32. Thyroid gland. In: Pathology of the Fischer Rat (Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, MacKenzie WF, eds). San Diego, CA: Academic Press, 519-536.
10. Botts S, Jokinen MP, Isaacs KR, Meuten DJ, Tanaka N. 1991. Proliferative lesions of the thyroid and parathyroid glands, E-3. In: Guides for Toxicologic Pathology. Washington, DC: STP/ARP/AFIP, 1-12.

11. 今井清, 広瀬雅雄. 2000. 各論 15 章, 甲状腺/上皮小体, 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, 435-446.
12. 伊東信行編著. 1994. 毒性病理学概論, B. 毒性発現のメカニズム. 最新毒性病理学. 東京: 中山書店, 9-21.
13. 伊東信行編著. 1994. III 標的器官の毒性病理(2), 泌尿器系 C. 腎臓. 最新毒性病理学. 東京: 中山書店, 193-218.
14. Montgomery CA Jr, Seely JC. 1990. Kidney. In: Pathology. of the Fischer Rat. (Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, MacKenzie WF, eds). San Diego, CA: Academic press, 127-153.
15. Alden CL, Frith CH. 1991. Urinary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology. (Haschek WM, Rousseaux CG, eds). San Diego, CA: Academic press, 315-387.
16. 伊東信行編著. 1994. II 標的器官の毒性病理(1), 呼吸器系 A. 鼻腔. 最新 毒性病理学. 東京: 中山書店, 85-95.
17. 長野嘉介. 2000. 各論 1 章, 上部気道, 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, 99-116.
18. Kurata Y, Tsuda H, Sakata T, Yamashita T, Ito N. 1987. Reciprocal modifying effects of isomeric forms of aminophenol on induction of neoplastic lesions in rat liver and kidney initiated by *N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 8: 1281-1285.
19. 化学物質点検推進連絡協議会. 2001. 3-アミノフェノールの細菌を用いる復帰変異試験. 化学物質毒性試験報告. 8: 704-708.
20. 渡辺徹志、楠本雅典、石原美代、奥村仁美、高瀬みか、脇坂博恵美、平山晃久. 1991. *m*-Phenylenediamine の過酸化水素処理物の変異原性におよぼす染毛剤成分の修飾効果. 衛生化学 37: 512-521.
21. Lovoie E, Tulley L, Fow E, Hoffmann D. 1979. Mutagenicity of aminophenyl and nitrophenyl ethers, sulfides, and disulfides. *Mutat Res* 67: 123-131.

22. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. 1988. Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. Environ Mol Mutagen 11 Suppl 12: 1-158.
23. 化学物質点検推進連絡協議会. 2001. 3-アミノフェノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告. 8: 709-712.

## 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

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はなかつた。

なお、試験計画書と異なつた部分及び追加検討した内容については、以下に記載した。

- ① 病理組織学的検査の診断確定のため、一部の動物の腎臓の病理組織標本について特殊染色（ベルリンブルー染色、Schmorl 染色、PAS 染色）を施し、追加検討した。
- ② 血液生化学的検査の AST、ALT、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、CK については、測定単位が IU/L から U/L に変更されたため、本報告書ではそれぞれ新単位を記載した。