

4-クロロ-2-ニトロアニリ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：0745

CAS No. 89 63 4

2011年1月26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	iii
試資料の保管	iii
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 ~ L 2	
FIGURES	1 ~ 4	
APPENDICES	1-1 ~ 3	

標題

4-クロロ-2-ニトロアニリ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

4-クロロ-2-ニトロアニリ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ために、4-クロロ-2-ニトロアニリンをラットに 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。

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

試験日程

試験開始日	2009年9月24日
動物導入日	2009年9月29日
群構成日	2009年10月13日
被験物質投与開始日	2009年10月13日
被験物質投与終了日	2010年1月12, 13日
定期解剖日	2010年1月13, 14日
試験終了日	2011年1月26日

4-クロロ-2-ニトロアニリ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：0745

本文

本文目次

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

- 2	動物管理	6
- 2 - 1	各群の使用動物数	6
- 2 - 2	群分け及び個体識別方法	7
- 2 - 3	飼育条件	7
(1)	飼育環境	7
(2)	飼料	7
(3)	飲水	8
- 3	観察・検査項目及び方法	8
- 3 - 1	動物の生死及び一般状態の観察	8
- 3 - 2	体重測定	8
- 3 - 3	摂餌量測定	8
- 3 - 4	血液学的検査	8
- 3 - 5	血液生化学的検査	9
- 3 - 6	尿検査	9
- 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
- 4	数値処理と統計方法	10
- 4 - 1	数値の取り扱いと表示	10
- 4 - 2	統計処理	10
	試験成績	11
- 1	生死状況	11
- 2	一般状態	11
- 3	体重	11
- 4	摂餌量	12
- 5	被験物質摂取量	12
- 6	血液学的検査	13
- 7	血液生化学的検査	13
- 8	尿検査	14

- 9 病理学的検査	14
- 9 - 1 剖検	14
- 9 - 2 臓器重量	15
- 9 - 3 病理組織学的検査	15
考察及びまとめ	17
- 1 用量 反応関係	17
- 2 無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)	19
- 3 他の文献との比較	19
(1) 毒性	19
(2) 遺伝毒性	20
- 4 がん原性試験の濃度決定	20
文献	22
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	24

要約

4-クロロ-2-ニトロアニリ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、4-クロロ-2-ニトロアニリンを F344/DuCrI CrIj 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、4-クロロ-2-ニトロアニリ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）、640、1600、4000、7000 及び 10000 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。

4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与の結果、雌雄各群とも動物の死亡はみられなかった。一般状態の観察では、黄色尿と被毛の着色が雌雄とも全投与群に認められた。体重は、雄では 7000 ppm 以上の群で、雌では 4000 ppm 以上の群で全投与期間を通して低値が認められた。摂餌量は、雄では 4000 ppm 群の 1 及び 2 週と 7000 ppm 以上の群の全投与期間を通して、雌では 1600 ppm 群の 1 週と 6 週以降に、4000 ppm 群のほぼ全投与期間と 7000 ppm 以上の群の全投与期間を通して低値が認められた。

血液 / 造血器への影響として、貧血を示す赤血球数及びヘマトクリット値の低値が雌雄 4000 ppm 以上の群に、ヘモグロビン濃度の低値が雄 4000 ppm 以上と雌 1600 ppm 以上の群にみられた。また、網赤血球比の高値が雄 4000 ppm 以上と雌 1600 ppm 以上の群に、メトヘモグロビンの高値が雄 10000 ppm と雌 7000 ppm 以上の群にみられた。脾臓には重量増加が雌 1600 ppm 以上の群に、また、ヘモジデリン沈着の程度の増強が雌雄とも 7000 ppm 以上の群に、髄外造血の亢進が雌雄とも 7000 ppm 以上の群に、赤血球充満が雄 10000 ppm 群と雌 7000 ppm 以上の群にみられた。また、総ビリルビンの高値が雄 4000 ppm 以上の群と雌 1600 ppm 以上の群に認められた。肝臓への影響として、肝臓重量の高値が雌雄とも全投与群に、小葉中心性の肝細胞の肥大が雄 10000 ppm 群と雌 7000 ppm 以上の群に、総コレステロールとリン脂質の高値が雌雄とも全投与群に、アルブミンの高値が雄の全投与群と雌の 1600 ppm 以上の群に、総蛋白の高値が雌雄とも 1600 ppm 以上の群に、A/G 比の高値が雄の 10000 ppm 群に、 γ -GTP の高値が雌の 7000 ppm 以上の群に認められた。腎臓への影響として、血液生化学的検査で尿素窒素の増加が雄の 4000 ppm 以上の群と雌の 7000 ppm 以上の群に、病理組織学的検査で好酸体の程度の増強が雄 7000 ppm 以上の群と近位尿細管の褐色色素沈着が雌 4000 ppm 以上の群に認められた。

以上の結果より、最低投与濃度の 640 ppm 群でも雌雄とも毒性影響が認められることから、最小毒性量（LOAEL）は雌雄とも 640 ppm（平均被験物質摂取量は、雄は 38 mg/kg 体重/日、雌は 44 mg/kg 体重/日）であった。

がん原性試験の投与濃度は、雄は 7000 ppm を最高投与濃度とし、以下、1400 ppm 及び 280 ppm（公比 5）、雌は 4000 ppm を最高投与濃度とし、以下、800 ppm 及び 160 ppm（公比 5）に決定した。

試験材料

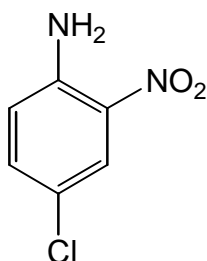
- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

名 称 : 4-クロロ-2-ニトロアニリン (4-chloro-2-nitroaniline)
別 名 : 1-アミノ-4-クロロ-2-ニトロベンゼン
(1-amino-4-chloro-2-nitrobenzene)
CAS No. : 89-63-4

- 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 172.58

- 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 2)

性 状 : 橙色結晶性粉末
融 点 : 118
溶 解 性 : 水に不溶、エーテル、酢酸に可溶、メタノールに微溶
保 管 条 件 : 冷蔵で暗所に保管

- 2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 東京化成工業(株)
グ レ ー ド : EP (東京化成一級)
純 度 : 99.9% (東京化成工業(株) 試験成績書データ)
ロ ッ ト 番 号 : GJ01

- 3 被験物質の特性

- 3 - 1 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（(株)日立製作所 M-80B）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 3）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 4）と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 4-クロロ-2-ニトロアニリ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、4-クロロ-2-ニトロアニリ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（群構成時体重範囲、雄：111～124g、雌：92～100g）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。

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 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。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、雌雄とも 640、1600、4000、7000 及び 10000 ppm (重量比 w/w) の 5 段階に設定した。なお、対照群として粉末飼料のみ (0 ppm) 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、水に不溶であるため、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、経口投与による 2 週間毒性試験 (混餌試験、試験番号 0737) (文献 5) の結果をもとに設定した。2 週間試験は、F344/DuCrIj ラットの雌雄に、0 (対照群)、1250、2500、5000、10000 及び 20000 ppm の濃度の被験物質混合飼料を自由摂取させることにより実施した。

2 週間試験の結果、雌雄ともすべての投与群に死亡はみられなかった。雌雄ともに体重と摂餌量の低値が 20000 ppm 群 (対照群比、投与終了時体重: 雄 76%、雌 79%、平均摂餌量: 雄 64%、雌 63%) と 10000 ppm 群 (対照群比、投与終了時体重: 雄 89%、雌 92%、平均摂餌量: 雄 83%、雌 80%) にみられた。血液学的検査では、メトヘモグロビン濃度の高値が雄 20000 ppm 群と雌 5000 ppm 以上の群にみられ、貧血を示す赤血球数、ヘモグロビン

濃度及びヘマトクリット値等の低値が雌 10000 ppm 以上の群にみられた。血液生化学的検査では、被験物質の肝臓への影響あるいは溶血に伴う変化を示唆する総ビリルビンの高値が雄 5000 ppm 以上の群と雌 1250 ppm 以上の群にみられた。臓器重量測定の結果、肝臓重量の増加（実重量と体重比の増加）が雄 2500 ppm ~ 10000 ppm 群と雌の全投与群にみられた。貧血に関連した変化と考えられる脾臓重量（実重量と体重比）の増加が雌 10000 ppm 以上の群にみられた。その他、尿素窒素の高値が雌雄の 20000 ppm 群にみられ、腎臓への影響も示唆した。

従って、13 週間の連続投与により、20000 ppm では雌雄とも顕著な体重低下と摂餌量の低値が予想されることから、13 週間試験の最高投与濃度としては高すぎると考えられた。10000 ppm では雌雄とも体重増加の抑制が 10%程度で死亡等の重篤な毒性が出現しないと予想されることから、13 週間試験の最高投与濃度として適切であると考えられた。また、13 週間試験の最低投与濃度は、2 週間試験で雌の 1250 ppm 群で肝臓重量の増加がみられたことから、無毒性量の情報を得るには、それ以下の濃度の設定が必要と考えられた。

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 ppm（公比 2.5）に設定し、さらに最大耐量をより正確に把握する為 7000 ppm を加えた 5 濃度を設定した。

- 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）と被験物質をスパイラルミキサー（関東混合機工業(株) CS-20 または HP-20M）で攪拌混合し、設定した濃度の被験物質混合飼料を調製した。初めに粉末飼料と被験物質を攪拌混合し、40000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 40000 ppm 被験物質混合飼料を更に粉末飼料と攪拌混合し、640、1600、4000、7000 及び 10000 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、投与開始日前日より 2 週に 1 回調製し、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。

- 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ごと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（(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 107 ~ 109%の範囲にあった。また、均一性は各群とも大きなばらつきはなかった。従って、被験物質混合飼料は、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、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。

- 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確認は、投与開始前に 100 ppm、最低投与濃度の 640 ppm 及び最高投与濃度の 10000 ppm の被験物質混合飼料について、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、ビニール袋に密閉し、冷蔵保管（8 日間）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 %とした時に、室温保管（8 日間）では、100 ppm:93.5 %、640 ppm:94.6 %、10000 ppm:97.0 %、冷蔵保管（8 日間）では、100 ppm:94.4 %、640 ppm:105 %、10000 ppm:105 %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安定であった。

その結果を APPENDIX 2-3 に示した。

- 1 - 9 被験物質摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より、動物の体重（kg）当たりの被験物質 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 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）
640 ppm 群	10 匹（1101～1110）	10 匹（2101～2110）
1600 ppm 群	10 匹（1201～1210）	10 匹（2201～2210）
4000 ppm 群	10 匹（1301～1310）	10 匹（2301～2310）
7000 ppm 群	10 匹（1401～1410）	10 匹（2401～2410）
10000 ppm 群	10 匹（1501～1510）	10 匹（2501～2510）

- 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 60 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 6)。

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 109 室)に收容し、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。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 ± 2 < 22.8 ± 0.3 >

湿度 : $55 \pm 15\%$ < $58 \pm 3\%$ >

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

ケージへの動物の收容方法 : 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 (30KGy-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

全動物について、週 1 回体重測定を行った。また、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

全動物について、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。

- 3 - 4 血液学的検査

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)に採血した全血を用いて、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、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

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

- 3 - 6 尿検査

投与 13 週目に採尿可能な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

全動物について、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、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、鼠径等）、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、脾臓、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、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 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 3 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、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²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。

試験成績

- 1 生死状況

生死状況を TABLE A 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

雌雄ともすべての群に死亡動物はみられなかった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示した。

- 雄 -

黄色尿が投与群の全動物に投与期間を通してみられた。被毛の着色が 1600 ppm 以上の群では 2 週以降、640 ppm 群では 5 週以降にみられた。糞小粒と糞少量が 7000 ppm 以上の群の 1 週にみられた。

- 雌 -

黄色尿が投与群の全動物に投与期間を通してみられた。被毛の着色が 1600 ppm 以上の投与群では投与期間を通して、640 ppm 群では 4 週以降にみられた。糞小粒と糞少量が 7000 ppm 以上の群の 1 週にみられた。

- 3 体重

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

- 雄 -

7000 ppm 以上の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 以下の群では対照群と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、640 ppm 群：99%、1600 ppm 群：100%、4000 ppm 群：98%、7000 ppm 群：91%、10000 ppm 群：85%であった。

- 雌 -

4000 ppm 以上の群では投与期間を通して体重の低値が認められた。1600 ppm 以下の群では対照群と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、640 ppm 群：99%、1600 ppm 群：96%、4000 ppm 群：91%、7000 ppm 群：88%、10000 ppm 群：87%であった。

- 4 摂餌量

摂餌量の推移を TABLE D 1~4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

- 雄 -

7000 ppm 以上の群では全投与期間を通して、4000 ppm 群では 1 及び 2 週に摂餌量の低値が認められた。1600 ppm 以下の群では対照群と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：14.9 g、640 ppm 群：15.0 g(101%)、1600 ppm 群：14.7 g(99%)、4000 ppm 群：14.4 g(97%)、7000 ppm 群：13.2 g(89%)、10000 ppm 群：12.6 g(85%)であった。

- 雌 -

7000 ppm 以上の群では全投与期間を通して、4000 ppm 群では 4、5 及び 13 週を除く投与期間中に、1600 ppm 群では 1 週と 6 週以降に摂餌量の低値が認められた。640 ppm 群では対照群と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：10.9 g、640 ppm 群：10.6 g(97%)、1600 ppm 群：10.1 g(93%)、4000 ppm 群：10.0 g(92%)、7000 ppm 群：9.1 g(83%)、10000 ppm 群：8.6 g(79%)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、640 ppm 群：29~56、1600 ppm 群：70~141、4000 ppm 群：182~336、7000 ppm 群：314~547、10000 ppm 群：450~784 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、640 ppm 群：38、1600 ppm 群：94、4000 ppm 群：235、7000 ppm 群：397、10000 ppm 群：571 であった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、設定濃度比に近い値を示した。

- 雌 -

各投与群の被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、640 ppm 群：35~59、1600 ppm 群：85~144、4000 ppm 群：232~348、7000 ppm 群：374~562、10000 ppm 群：521~828 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、640 ppm 群：44、1600 ppm 群：106、4000 ppm 群：275、7000 ppm 群：446、10000 ppm 群：622 であった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、7000 ppm 群と 10000 ppm 群で設定濃度比を下回る傾向を示した。

- 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 -

血小板数の高値が 1600 ppm 以上の群に、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、ならびに網赤血球比の高値が 4000 ppm 以上の群に、MCHC の低値が 7000 ppm 以上の群に、メトヘモグロビン濃度の高値が 10000 ppm 群に認められた。その他、MCH の低値が 4000 ppm 群と 7000 ppm 群にみられたが、わずかな変化であり、投与濃度に対応したものではなかった。

- 雌 -

血小板数と網赤血球比の高値、ならびにヘモグロビン濃度の低値が 1600 ppm 以上の群に認められた。赤血球数、ヘマトクリット値、MCH 及び MCHC の低値、ならびに MCV の高値が 4000 ppm 以上の群に認められた。また、メトヘモグロビン濃度の高値が 7000 ppm 以上の群に認められた。その他、単球比の低値が 4000 ppm 以上の群にみられたが、わずかな変化であった。

- 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 -

アルブミン、総コレステロール、リン脂質の高値、ならびに ALP の低値が全投与群に認められた。総蛋白とカルシウムの高値が 1600 ppm 以上の群に認められた。総ビリルビンと尿素窒素の高値、ならびに AST と ALT の低値が 4000 ppm 以上の群に認められた。A/G 比の高値、ならびに LDH とクロールの低値が 10000 ppm 群に認められた。

- 雌 -

総コレステロールとリン脂質の高値が全投与群に認められた。総蛋白、アルブミン、総ビリルビン及びカルシウムの高値が 1600 ppm 以上の群に、尿素窒素の高値が 7000 ppm 以上の群に認められた。γ-GTP の高値が 7000 ppm 以上の群に認められたが、わずかな変化であった。その他、ALP の低値が 4000 ppm 群と 7000 ppm 群にみられたが、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。

- 雄 -

pH の低下が 640 ppm 群 ~ 7000 ppm 群にみられた。

なお、pH、蛋白、ケトン体及びビリルビンの検査において、被験物質の代謝物と考えられる尿の着色（黄色）のため、尿試験紙による判定ができなかった動物がみられた。判定ができなかった動物数は、pH（4000 ppm 群 1 匹、7000 ppm 群 6 匹、10000 ppm 群 9 匹）、蛋白（1600 ppm 群 5 匹、4000 ppm 群 9 匹、7000 ppm 群と 10000 ppm 群はそれぞれ 10 匹）、ケトン体（1600 ppm 群 1 匹、4000 ppm 群 5 匹、7000 ppm 群 7 匹、10000 ppm 群 10 匹）及びビリルビン（1600 ppm 群 6 匹、4000 ppm 群 9 匹、7000 ppm 群と 10000 ppm 群はそれぞれ 10 匹）であった。統計学的に評価ができなかったものは、10000 ppm 群の pH とケトン体、4000 ppm 以上の群の蛋白とビリルビンであった。

- 雌 -

蛋白の陽性度の減少が 640 ppm 群と 1600 ppm 群にみられた。

なお、pH、蛋白、ケトン体及びビリルビンの検査において、被験物質の代謝物と考えられる尿の着色（黄色）のため、尿試験紙による判定ができなかった動物がみられた。判定ができなかった動物数は、pH（7000 ppm 群 1 匹、10000 ppm 群 2 匹）、蛋白（4000 ppm 群 8 匹、7000 ppm 群と 10000 ppm 群はそれぞれ 10 匹）、ケトン体（1600 ppm 群 1 匹、4000 ppm 群 7 匹、7000 ppm 群と 10000 ppm 群はそれぞれ 10 匹）及びビリルビン（1600 ppm 群 1 匹、4000 ppm 群 6 匹、7000 ppm 群と 10000 ppm 群はそれぞれ 10 匹）であった。統計学的に評価ができなかったものは、4000 ppm 以上の群の蛋白、7000 ppm 以上の群のケトン体とビリルビンであった。

- 9 病理学的検査

- 9 - 1 剖検

剖検所見を TABLE I 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

全投与群に被験物質投与による影響は認められなかった。

- 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 -

肝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。精巣の実重量の高値が 7000 ppm 以上の群に、体重比の高値が 4000 ppm 以上の群に認められた。胸腺の実重量の低値が 7000 ppm 以上の群に、体重比の低値が 10000 ppm 群に認められた。

その他、副腎、心臓、肺、腎臓、脾臓及び脳に実重量の低値や体重比の高値がみられたが、7000 ppm 以上の群の搬出時体重は対照群と比較して有意に低く、また、4000 ppm 群でも統計学的に有意ではないが対照群より低いことから、これらの臓器重量の変化は、搬出時体重の低値に伴う変化と考えた。

- 雌 -

肝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。脾臓の実重量の高値が 4000 ppm 以上の群に、体重比の高値が 1600 ppm 以上の群に認められた。

その他、胸腺、卵巣、心臓、肺、腎臓及び脳に実重量の低値や体重比の高値がみられたが、1600 ppm 以上の群の搬出時体重は対照群と比較して有意に低いことから、これらの臓器重量の変化は、搬出時体重の低値に伴う変化と考えた。

- 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。

統計学的に有意差がみられたものを以下に示した。

- 雄 -

[10000 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着（中等度 10 匹）の程度の増強、髄外造血の亢進（軽度 10 匹）及び赤血球充満（軽度 8 匹）が認められた。

肝臓には、小葉中心性の肝細胞の肥大（軽度 10 匹）が認められた。

腎臓には、好酸体（重度 10 匹）の程度の増強が認められた。

[7000 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着（軽度 2 匹、中等度 8 匹）の程度の増強及び髄外造血の亢進（軽度 7 匹）が認められた。

腎臓には、好酸体（重度 10 匹）の程度の増強が認められた。

[4000 ppm 以下の群]

病変の発生数、グレードは、対照群と統計的な差はなかった。

- 雌 -

[10000 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着（軽度 2 匹、中等度 8 匹）の程度の増強、髄外造血の亢進（軽度 10 匹）及び赤血球充満（軽度 10 匹）が認められた。

肝臓には、小葉中心性の肝細胞の肥大（軽度 10 匹）が認められた。

腎臓には、近位尿細管に褐色色素沈着（中等度 10 匹）が認められた。

[7000 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着（軽度 1 匹、中等度 9 匹）の程度の増強、髄外造血の亢進（軽度 10 匹）及び赤血球充満（軽度 10 匹）が認められた。

肝臓には、小葉中心性の肝細胞の肥大（軽度 7 匹）が認められた。

腎臓には、近位尿細管に褐色色素沈着（中等度 10 匹）が認められた。

[4000 ppm 群]

腎臓には、近位尿細管に褐色色素沈着（軽度 10 匹）が認められた。

[1600 ppm 以下の群]

病変の発生数、グレードは、対照群と統計的な差はなかった。

考察及びまとめ

4-クロロ-2-ニトロアニリンの F344/DuCr1Crlj 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。投与は、4-クロロ-2-ニトロアニリ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。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 (対照群)、640、1600、4000、7000 及び 10000 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。

- 1 用量 - 反応関係

4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与の結果、雌雄ともすべての群に死亡動物は認められなかった。一般状態の観察では、黄色尿が雌雄とも全投与群に投与期間を通して、被毛の着色が雌雄とも全投与群にみられた。その他、糞小粒と糞少量が雌雄とも 7000 ppm 以上の投与群の 1 週にみられた。7000 ppm 以上の投与群の 1 週目の糞小粒と糞少量の出現は、特に 1 週目に摂餌量が少なかったことに起因する変化であると考えられた。黄色尿は本物質を投与した他試験でも報告されており (文献 7)、また、4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与により、代謝物の多くが尿中に排泄されることが知られている (文献 8)。従って、黄色尿は被験物質の代謝物によるものと考えられた。

体重は、雄では 7000 ppm 以上の群で全投与期間を通して低値が認められ、投与終了時の体重は対照群に対し、7000 ppm 群 91%、10000 ppm 群 85%であった。雌では 4000 ppm 以上の群で全投与期間を通して低値が認められ、投与終了時の体重は対照群に対し、4000 ppm 群 91%、7000 ppm 群 88%、10000 ppm 群 87%であった。

摂餌量は、雄では 4000 ppm 群の 1 及び 2 週と 7000 ppm 以上の全投与期間を通して、雌では 1600 ppm 群の 1 週と 6 週以降に、4000 ppm 群のほぼ全投与期間を通して、また、7000 ppm 以上の群の全投与期間を通して低値が認められた。なお、各投与群の平均被験物質摂取量の比率は、雄では設定濃度比に近い値を示したが、雌では高濃度投与群 (7000 ppm 群と 10000 ppm 群) で設定濃度比を下回る傾向を示した。

血液学的検査では、貧血を示すパラメータである赤血球数及びヘマトクリット値の低値が雌雄 4000 ppm 以上の群に、ヘモグロビン濃度の低値が雄 4000 ppm 以上と雌 1600 ppm 以上の群にみられた。それらの変化に伴い、MCV、MCH、MCHC にも変化がみられた。また、血小板数の高値が雌雄 1600 ppm 以上の群に、網赤血球比の高値が雄 4000 ppm 以上と雌 1600 ppm 以上の群に、メトヘモグロビンの高値が雄 10000 ppm と雌 7000 ppm 以上の群にみられた。多くの芳香族ニトロ及びアミノ化合物は、メトヘモグロビンを生成し、

赤血球を傷害することにより、貧血を発生させることが報告されている（文献 9,10）。従って、本試験で雌雄に認められた貧血（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値）は 4-クロロ-2-ニトロアニリン投与によるメトヘモグロビン血症によるものと考えられた。また、網赤血球比の高値は貧血に対応する代償性の変化と考えられた。

血液生化学的検査では、総ビリルビンの高値が雄 4000 ppm 以上の群と雌 1600 ppm 以上の群に認められた。総ビリルビンの増加は赤血球の溶血や脾臓での赤血球破壊の亢進に伴う変化と考えられた。腎臓への影響を示唆する変化として、尿素窒素の高値が雄の 4000 ppm 以上の群と雌の 7000 ppm 以上の群に認められた。また、肝臓への影響を示唆する変化として、総コレステロールとリン脂質の高値が雌雄とも全投与群に、アルブミンの高値が雄の全投与群と雌の 1600 ppm 以上の群に、総蛋白の高値が雌雄とも 1600 ppm 以上の群に、A/G 比の高値が雄の 10000 ppm 群に、 γ -GTP の高値が雌の 7000 ppm 以上の群に認められた。なお、雄では、ALP、AST、ALT 及び LDH の低値が認められたが、減少性の変化であることから毒性学的意義は不明であった。

尿検査では、雄で pH の低下が 640 ppm 群～7000 ppm 群に、雌で蛋白の陽性度の減少が 640 ppm 群と 1600 ppm 群にみられた。

病理学的検査では、脾臓に重量増加が雌 1600 ppm 以上の群に、ヘモジデリン沈着の程度の増強が雌雄とも 7000 ppm 以上の群に、髄外造血の亢進が雌雄とも 7000 ppm 以上の群に、赤血球充満が雄 10000 ppm 群と雌 7000 ppm 以上の群に認められた。ヘモジデリン沈着の程度の増強や赤血球充満は 4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与によって傷害を受けた赤血球の脾臓における処理亢進を反映する所見であり、髄外造血の亢進は、貧血に対応した代償性変化であると考えられた。肝臓には、重量増加が雌雄の全投与群に認められ、病理組織学的検査で小葉中心性の肝細胞肥大が雄 10000 ppm 群と雌 7000 ppm 以上の群に認められた。小葉中心性の肝細胞肥大は、チトクローム P-450 等の薬物代謝酵素の誘導の際に観察される所見であることから（文献 11）、4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与による肝臓の薬物代謝の亢進が示唆された。腎臓には好酸体の程度の増強が雄 7000 ppm 以上の群に、近位尿細管の褐色色素沈着が雌 4000 ppm 以上の群に認められた。腎臓の好酸体は、雄ラットでは、無処置の動物にもみられる変化であり（文献 12）、本試験でも対照群含むほぼすべての動物に認められたが、雄の 7000 ppm 以上の群で好酸体の程度の増強が示された。雄ラットにみられる好酸体は近位尿細管上皮細胞への $_{2u}$ -グロブリン蓄積によることが知られており（文献 12、13）、4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与による腎臓への $_{2u}$ -グロブリンの蓄積増加を示す所見と考えられた。また、近位尿細管での褐色色素は、脂質過酸化物であるリポフスチン（文献 14）や 4-クロロ-2-ニトロアニリンの代謝物の可能性が考えられるが、定かではなかった。

その他、精巣重量の高値が雄 4000 ppm 以上の群に、胸腺重量の低値が雄 7000 ppm 以上の群に認められたが、精巣や胸腺には病理組織学的変化はみられなかった。

以上を概括すると、4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与により、雌雄とも動物の死亡はみら

れず、血液/造血系への影響として、メトヘモグロビン血症が生じ、貧血と貧血を補おうとする代償性変化がみられた。肝臓への影響として、肝臓重量の高値や小葉中心性の肝細胞の肥大が認められ、肝臓における薬物代謝の亢進が示唆された。また、雌雄に総コレステロール、リン脂質の高値がみられた。腎臓への影響としては、尿素窒素の増加、病理組織学的検査で雄に好酸体の程度の増強、雌に近位尿細管への褐色色素沈着の発生増加が認められた。これらの毒性影響がみられた最低投与濃度は、以下のとおりであった。

- 1) 血液/造血系への影響：雌雄とも血小板数の高値、雌のヘモグロビン濃度の低値と網赤血球比の高値がみられた 1600 ppm
- 2) 肝臓への影響：雌雄に肝臓重量の増加、総コレステロールとリン脂質の高値がみられた 640 ppm
- 3) 腎臓への影響：雄で尿素窒素の増加、雌で近位尿細管へ褐色色素沈着がみられた 4000 ppm

- 2 無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)

4-クロロ-2-ニトロアニリンの 13 週間混餌投与により、雌雄とも最低投与濃度の 640 ppm 群で肝臓重量の増加と血液生化学的検査で変化が認められた。従って、4-クロロ-2-ニトロアニリンの 13 週間混餌投与による無毒性量 (NOAEL) は求められず、最小毒性量 (LOAEL) は雌雄とも 640 ppm (平均被験物質摂取量は、雄は 38 mg/kg 体重/日、雌は 44 mg/kg 体重/日) であった。

- 3 他の文献との比較

(1) 毒性

SD ラット雌雄に 4-クロロ-2-ニトロアニリンを 0 (対照群)、10、60、300 mg/kg/日の用量で、交配前 14 日から交配を経て、雄では 42 日間、雌では妊娠、分娩を経て哺育 4 日まで強制経口投与した報告がある (文献 7)。投与の結果、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴が雄 300 mg/kg/日群に、脾臓の髄外造血亢進が雌 60 mg/kg/日以上群に認められ、また、ヘマトクリット値の低値が雄 60 mg/kg/日以上群に、網赤血球比の高値が雌 300 mg/kg/日群に、肝臓の重量増加が雌雄 300 mg/kg/日群に、腎臓の重量増加が雄 300 mg/kg/日群に認められたことを報告している。血液への影響と脾臓への影響はメトヘモグロビン血症によるものと考察している。

F344 ラット雌雄に 4-クロロ-2-ニトロアニリンを 50、100、200、400、800 mg/kg/日の用量で 13 週間強制経口投与した報告がある (文献 8)。投与の結果、体重増加の抑制が高用量群にみられた。被毛、腎臓、脳、前胃、脂肪、舌が黄色を呈した。標的臓器は脾臓、腎臓、肝臓であった。脾臓にはヘモジデリン沈着が雄 400 mg/kg/日以上と雌 50mg/kg/日以上

の群にみられた。腎臓では、重量が雌雄とも 800 mg/kg/日群で増加し、近位尿細管の好酸性硝子滴と再生が雄 100 mg/kg/日以上に認められた。乳頭部の腎盂上皮過形成と慢性炎症が雄 800 mg/kg/日群に認められた。肝臓では、重量増加が雄 200 mg/kg/日以上に認められた。その他、赤血球数とヘマトクリット値の減少が雄 800 mg/kg/日群に、AST の低下が雄 400 mg/kg/日以上に認められたことを報告している。

本試験では投与方法は上述の二つの報告とは異なり混餌投与であるが、上述の報告と同様に 4-クロロ-2-ニトロアニリン経口投与によるメトヘモグロビン血症が認められ、赤血球への傷害を反映する変化として総ビリルビンの高値が認められた。また、肝臓にも重量増加がみられた。

(2) 遺伝毒性

BUA レポートに掲載されている *in vitro* と *in vivo* の遺伝毒性試験結果の概要を以下に示す (文献 8)。

微生物を用いる復帰突然変異試験では、5 つの試験報告が記載されている。1) ネズミチフス菌 TA98 で代謝活性化有りの場合に陽性の結果を示した。2) TA98、TA100、TA1535、TA1537 を用いた復帰突然変異試験では、TA98 と TA100 において、代謝活性化有りの場合に陽性の結果を示した。3) TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 を用いた復帰突然変異試験では、TA98 と TA1538 において、代謝活性化有りの場合に陽性の結果を示した。4) TA98、TA1538 を用いた復帰突然変異試験において、代謝活性化有りの場合に陽性の結果を示した。5) TA1538、TA98、TA98NR、YG1020、AG1021、YG1024 株を用いた復帰突然変異試験では、TA1538 の代謝活性化なしで弱い陽性の結果を示した。

TA1535/pSK 1002 を用いた *umu test* では、代謝活性化の有無に係わらず陰性の結果を示した。

チャイニーズハムスターの卵巢由来の培養細胞を用いた姉妹染色分体交換試験では、代謝活性化の有無にかかわらず弱い陽性の結果を示した。染色体異常試験では、代謝活性化有りで陽性の結果を示した。

in vivo 試験では、げっ歯類を用いる小核試験において、マウスに経口投与した場合の末梢血で陰性であった。

- 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。

13 週間試験の結果、投与群に死亡はみられなかったが、以下に示す用量相関性のある変化が認められた。雌雄とも体重増加の抑制や摂餌量の低値が認められ、また、貧血や貧血に対応する変化、肝臓への影響 (肝臓重量の高値、小葉中心性の肝細胞肥大、血漿中の脂質の高値) が認められた。さらに、腎臓に雄では好酸体の程度の増強、雌では近位尿細管の褐色

色素沈着が認められた。体重増加の抑制は雄 7000 ppm 以上の群（最終体重は対照群に対し、7000 ppm 群：91%、10000 ppm 群：85%）と雌 4000 ppm 以上の群（最終体重は対照群に対し、4000 ppm 群：91%、7000 ppm 群：88%、10000 ppm 群：87%）に、貧血や貧血に対応する変化は雌雄とも 1600 ppm 以上の群に、肝臓への影響はすべての投与群に、腎臓の変化は雌雄 4000 ppm 以上の群に認められた。

以上の結果、雄では 10000 ppm 群で、雌では 7000 ppm 以上の群で対照群に対して 10% 以上の体重増加の抑制があることから、これらの濃度はがん原性試験の最高投与濃度としては高いと考えられた。一方、雄 7000 ppm 群、雌 4000 ppm 群の体重増加の抑制は対照群に対して 10% 以内であり、貧血を含むその他の変化も動物の生死に影響を与えるほどのものではないと考えられた。従って、がん原性試験の最高投与濃度は、雄は 7000 ppm、雌は 4000 ppm が適切であると判断した。

なお、がん原性試験の最低濃度は、雌雄とも 13 週間試験では、最低投与濃度の 640 ppm 群でも肝臓への影響が認められたことから、640 ppm 以下の投与濃度が適切であると考えた。

以上のことから、がん原性試験の投与濃度は、雄は 7000 ppm を最高投与濃度とし、以下、1400 ppm 及び 280 ppm（公比 5）、雌は 4000 ppm を最高投与濃度とし、以下、800 ppm 及び 160 ppm（公比 5）に決定した。

文献

1. 化学工業日報社 . 2010 . 15710 の化学商品 . 東京 : 化学工業日報社 , 752-753 .
2. 東京化成工業(株) . 2000 . 化学物質等安全データシート .
3. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : John Wiley and Sons.
4. 東京化成工業(株) . 2009 . 4-クロロ-2-ニトロアニリン, 赤外吸収スペクトル .
5. 日本バイオアッセイ研究センター . 2010 . 4-クロロ-2-ニトロアニリ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 .
6. 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 .
7. 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 . 2007 . 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG422) データシート .
<http://www.safe.nite.go.jp/japan/sougou/data/pdf/reti/sheet/5sheet.pdf>
[accessed 11 January 2011].
8. GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals. 2004. 4-Chloro-2-nitroaniline. BUA Report 235. Stuttgart : Hirzel Verlag.
9. Benya TJ and Comish HH, 1994. Aromatic nitro and amino compounds. In: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 4th ed (Clayton GD and Clayton FE eds.) New York: John Wiley & Sons, 947-1085.
10. 石津澄子 . 1978 . 芳香族ニトロアミノ化合物による中毒, 新労働衛生ハンドブック(増補第 3 版). 三浦豊彦 編 . 神奈川:労働科学研究所出版部 . 854-859.
11. Popp JA, Cattley RC. 1991. Hepatobiliary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (Haschek WM, Rousseaux CG, eds). San Diego, CA:Academic Press, 279-314.

12. 渡辺満利, 西川秋佳. 2000. 各論 8 章, 腎臓. 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, 253.
13. Yamazaki K, Aiso S, Matsumoto M, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, et al. 2005. Thirteen-week oral toxicity study of 1,4-dichloro-2-nitrobenzene in rats and mice. *Ind Health* 43: 597-610.
14. 伊東信行編著. 1994. 最新毒性病理学, B.毒性発現のメカニズム 3.毒性物質に対する細胞反応. 最新毒性病理学. 東京: 中山書店, 16.

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、投与群では被験物質の代謝物と考えられる尿の着色(黄色)が認められたため、pH、蛋白、ケトン体及びビリルビンの検査では、尿試験紙で判定できない動物が投与群にみられた。尿検査の中で統計学的に評価ができなかつたものは、雄 10000 ppm 群の pH、雌雄 4000 ppm 以上の群の蛋白、雄 10000 ppm 群と雌 7000 ppm 以上の群のケトン体、雄 4000 ppm 群以上の群と雌 7000 ppm 以上の群のビリルビンであった。

その他には、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。