

4-クロロ-2-ニトロアニリンのマウスを用いた  
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：0746

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
試験資料の保管	.....	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-ニトロアニリンのマウス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-ニトロアニリンをマウスに 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10月13日
群構成日	2009年10月27日
被験物質投与開始日	2009年10月27日
被験物質投与終了日	2010年1月26, 27日
定期解剖日	2010年1月27, 28日
試験終了日	2011年1月26日

4-クロロ-2-ニトロアニリンのマウスを用いた  
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：0746

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	14
- 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	19
- 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	23



## 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 B6D2F1/Crlj マウスに 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）、1250、2500、5000、10000 及び 20000 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、黄色尿が雌雄とも全投与群に、被毛の着色が雄 1250 ppm 以上の群と雌 20000 ppm 群にみられた。その他、糞少量が雄 10000 ppm 以上の群と雌 5000 ppm 以上の群に散見された。体重は、雄では 10000 ppm 以上の群でほぼ全投与期間を通して、雌では 20000 ppm 群の投与 1 週目に低値がみられた。摂餌量は、雄では 10000 ppm 以上の群で投与 1 週目に低値がみられ、雌では 5000 ppm 以上の群で、投与期間中に低値が散見された。

血液 / 造血系への影響として、メトヘモグロビンの高値が雄 10000 ppm 以上の群と雌 2500 ppm 以上の群に、網赤血球比の高値が雄 2500 ppm 以上の群と雌 10000 ppm 以上の群に、MCH の高値が雄 20000 ppm 群と雌 10000 ppm 以上の群に、その他、雌のみ血小板数の高値が 5000 ppm 以上の群に、MCV の高値が 2500 ppm 群と 10000 ppm 以上の群に、赤血球数の低値が 20000 ppm 群に認められた。また、総ビリルビンの高値が雄 20000 ppm 群に認められた。脾臓には重量の高値が雌雄とも 2500 ppm 以上の群にみられ、ヘモジデリン沈着が雄 2500 ppm 以上の群と雌 10000 ppm 以上の群に、髄外造血の亢進が雌雄とも 20000 ppm 群に認められた。また、骨髓に赤血球造血の増加が雌 20000 ppm 群に認められた。肝臓への影響として、肝臓重量の高値が雄の 2500 ppm 以上の群と雌の全投与群に、また、血液生化学的検査でリン脂質の高値が雌雄の全投与群に、総コレステロールの高値が雄の全投与群と雌の 5000 ppm 以上の群に、ALT の高値が雄 5000 ppm 群と雌雄 20000 ppm 群に認められた。その他、LDH の高値が雌の 10000 ppm 以上の群に認められた。さらに、病理組織学的検査で肝臓には、小葉中心性の肝細胞の肥大が雄 5000 ppm 以上の群と雌 10000 ppm 以上の群に認められた。腎臓への影響として、尿素窒素の高値が雌の 10000 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 1250 ppm 群でも雌雄ともに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 1250 ppm（平均被験物質摂取量は、雄は 165 mg/kg 体重/日、雌は 213 mg/kg 体重/日）であった。

がん原性試験の投与濃度は、雄は 5000 ppm を最高投与濃度とし、以下、1000 ppm 及び 200 ppm（公比 5）、雌は 10000 ppm を最高投与濃度とし、以下、2000 ppm 及び 400 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

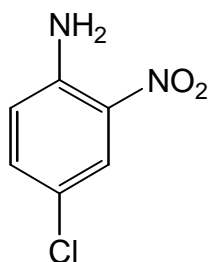
名 称 : 4-クロロ-2-ニトロアニリン (4-chloro-2-nitroaniline)

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 B6D2F1/Crlj マウス (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：22.5～25.0g、雌：18.0～19.7g）を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に B6D2F1/Crlj マウス (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 1250、2500、5000、10000 及び 20000 ppm (重量比 w/w) の 5 段階 (公比 2) 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 0738) (文献 5) の結果をもとに設定した。2 週間試験は、B6D2F1/Crlj マウスの雌雄に、0 (対照群)、2500、5000、10000、20000 及び 30000 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、雌の 30000 ppm 群で死亡がみられた。体重の低値が雌雄 30000 ppm 群 (対照群比、投与終了時体重：雄 84%、雌 88%) にみられた。体重の低値は、雌雄 20000 ppm 群の投与期間中にもみられ、投与終了時の体重値は対照群に比べ雄 94%、雌 98%であった。摂餌量の低値は、雌雄の 30000 及び 20000 ppm 群、ならびに雌の 10000 ppm 群の投与初期にみられた。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 以

上の群と雌 10000 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、雌雄とも 20000 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雌雄とも 5000 ppm 以上の群にみられ、また、肝臓の逸脱酵素である AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 等の高値が雌雄とも 20000 ppm 以上の群にみられた。臓器重量測定の結果、動物の消耗を示唆する胸腺重量の低値が雌雄とも 20000 ppm 以上の群にみられ、肝臓重量の増加（実重量と体重比の増加）が雄 5000 ppm 以上の群と雌の全投与群に、また、貧血に関連した変化と考えられる脾臓重量の増加が雌 10000 ppm 以上の群にみられた。

従って、13 週間の連続投与により、30000 ppm では顕著な体重低下が予想され、死亡を含む重篤な毒性が出現する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は高すぎると考えられ、20000 ppm では雌雄とも体重増加の抑制が 10%以内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 2500 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 20000 ppm を最高投与濃度とし、以下、10000、5000、2500 及び 1250 ppm（公比 2）の 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、1250、2500、5000、10000 及び 20000 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 週分をマウス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 103～111%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 1250 ppm 及び最高投与濃度の 20000 ppm の被験物質混合飼料について、マウス用餌箱に充填し、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、安定であることを確認した。

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:93.3 %、1250 ppm:95.0 %、20000 ppm:97.5 %、冷蔵保管（8 日間）では、100 ppm:94.4 %、1250 ppm:95.7 %、20000 ppm:99.5 %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）
1250 ppm 群	10 匹（1101～1110）	10 匹（2101～2110）
2500 ppm 群	10 匹（1201～1210）	10 匹（2201～2210）
5000 ppm 群	10 匹（1301～1310）	10 匹（2301～2310）
10000 ppm 群	10 匹（1401～1410）	10 匹（2401～2410）
20000 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 108 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 :  $23 \pm 2$  < $22.8 \pm 0.2$ >

湿度 :  $55 \pm 15\%$  < $55 \pm 1\%$ >

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 (112(W) × 212(D) × 120(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。EDTA-2 カリウム入り採血管の血液は全血を用いて、ヘパリンリチウム入り採血管の血液は遠心分離し、得られた赤血球を用いて、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、 $\gamma$ -GTP、CK、尿素窒素、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（ウロラプスティックス、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、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、胆嚢、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、小数点第 1 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、<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。

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 2500 ppm 以上の群では 2 週以降、1250 ppm 群では 7 週以降にみられた。糞少量が 20000 ppm 群の 1, 2 週と 10000 ppm 群の 1 週にみられた。その他、脱毛が 20000 ppm 群の 5 週以降に 1 匹、立毛が 20000 ppm 群の 1 週と 2 週に 1 匹みられた。

#### - 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 20000 ppm 群の 2 週以降にみられた。糞少量が 20000 ppm 群の 1~3 週、10000 ppm 群の 1 週、5000 ppm 群の 1 週と 8 週にみられた。内部腫瘍が 10000 ppm 群の 8 週以降、5000 ppm 群の 6~8 週に各 1 匹みられた。この内部腫瘍は、剖検、病理組織学的検査の結果、水腎症と判明した。水腎症はこの系統の動物に自然発生病変として比較的多くみられることと、投与濃度に対応した発生ではなかったことから、投与の影響ではないと判断した。その他、脱毛が 5000 ppm 群の 5 週以降、2500 ppm 群の 7 週以降、1250 ppm 群の 5 週以降にみられた。

### - 3 体重

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

#### - 雄 -

20000 ppm 群では、全投与期間を通して体重の低値が認められた。10000 ppm 群でもほぼ全投与期間を通して体重の低値が認められた。5000 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、1250 ppm 群：100%、2500 ppm 群：98%、5000 ppm 群：94%、10000 ppm 群：88%、20000 ppm 群：84%であった。

- 雌 -

20000 ppm 群では、投与 1 週目に体重の低値がみられたが、以降は対照群と同様の推移を示した。10000 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、1250 ppm 群：102%、2500 ppm 群：100%、5000 ppm 群：100%、10000 ppm 群：99%、20000 ppm 群：98%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 -

10000 ppm 以上の群では、投与 1 週目に摂餌量の低値がみられたが、以降は対照群と同様の推移を示した。5000 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：3.8 g、1250 ppm 群：3.8 g(100%)、2500 ppm 群：3.9 g(103%)、5000 ppm 群：3.7 g(97%)、10000 ppm 群：3.7 g(97%)、20000 ppm 群：3.5 g(92%)であった。

- 雌 -

5000 ppm 以上の群では、投与期間中に摂餌量の低値が散見された。2500 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：3.7 g、1250 ppm 群：3.8 g(103%)、2500 ppm 群：3.7 g(100%)、5000 ppm 群：3.5 g(95%)、10000 ppm 群：3.4 g(92%)、20000 ppm 群：3.5 g(95%)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、1250 ppm 群：145～198、2500 ppm 群：296～407、5000 ppm 群：570～788、10000 ppm 群：1205～1684、20000 ppm 群：2452～3545 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、1250 ppm 群：165、2500 ppm 群：342、5000 ppm 群：667、10000 ppm 群：1395、20000 ppm 群：2789 であった。各投与群の平均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、1250 ppm 群：200～230、2500 ppm 群：385～486、5000 ppm 群：736～854、10000 ppm 群：1452～1717、20000 ppm 群：

3036～4191 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、1250 ppm 群：213、2500 ppm 群：428、5000 ppm 群：810、10000 ppm 群：1591、20000 ppm 群：3296 であった。各投与群の平均被験物質摂取量の比率は、5000 ppm 以上の群で設定濃度比に近い値を示した。

#### - 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 -

網赤血球比の高値が 2500 ppm 以上の群に、メトヘモグロビンの高値が 10000 ppm 以上の群に、MCH の高値が 20000 ppm 群に認められた。その他、MCV の高値が 10000 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。

- 雌 -

メトヘモグロビンの高値が 2500 ppm 以上の群に、血小板数の高値が 5000 ppm 以上の群に、MCH と網赤血球比の高値が 10000 ppm 以上の群に、MCV の高値が 2500 ppm 群と 10000 ppm 以上の群に、赤血球数の低値が 20000 ppm 群に認められた。

#### - 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 -

総コレステロールとリン脂質の高値がすべての投与群に、カリウムの低値が 5000 ppm 以上の群に、総ビリルビンの高値が 20000 ppm 群に認められた。その他、ALP の低値が 20000 ppm 群を除く投与群に、ALT の高値が 5000 ppm 群と 20000 ppm 群に認められた。

- 雌 -

リン脂質の高値がすべての投与群に (2500 ppm 群では、統計的に有意ではないが高値と判断した)、総コレステロールの高値が 5000 ppm 以上の群に、LDH と尿素窒素の高値が 10000 ppm 以上の群に、ALT の高値とカリウムの低値が 20000 ppm 群に認められた。その他、ALP の低値が 1250 ppm 群、2500 ppm 群及び 20000 ppm 群に認められた。また、総蛋白と無機リンの高値が 10000 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 -

投与による変化はみられなかった。

なお、pH、蛋白及びケトン体の検査において、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（5000 ppm 群 2 匹、10000 ppm 群 3 匹、20000 ppm 群 10 匹）、蛋白（2500 ppm 群 5 匹、5000 ppm 群 9 匹、10000 ppm 群と 20000 ppm 群はそれぞれ 10 匹）、ケトン体（2500 ppm 群 1 匹、10000 ppm 群 4 匹、20000 ppm 群 10 匹）であった。統計学的に評価ができなかったものは、20000 ppm 群の pH とケトン体、5000 ppm 以上の群の蛋白であった。

- 雌 -

pH の上昇が 5000 ppm 群と 10000 ppm 群に、蛋白の陽性例の減少が 1250 ppm ~ 5000 ppm 群にみられた。

なお、pH、蛋白及びケトン体の検査において、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（10000 ppm 群 2 匹、20000 ppm 群 8 匹）、蛋白（5000 ppm 群 4 匹、10000 ppm 群と 20000 ppm 群はそれぞれ 10 匹）、ケトン体（2500 ppm 群 1 匹、5000 ppm 群 6 匹、10000 ppm 群 9 匹、20000 ppm 群 10 匹）であった。統計学的に評価ができなかったものは、20000 ppm 群の pH、10000 ppm 以上の群の蛋白とケトン体であった。

## - 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 -

脾臓と肝臓の実重量と体重比の高値が 2500 ppm 以上の群に認められた。

その他、胸腺、副腎、精巣、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、10000 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、5000 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 -

肝臓の実重量と体重比の高値がすべての投与群に認められた(2500 ppm 群の実重量は統計学的に有意ではないが、対照群と比較して高い値であることから、重量増加と判断した)。脾臓の実重量の高値が5000 ppm 以上の群に、体重比の高値が2500 ppm 以上の群に認められた。

### - 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 -

[20000 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着(軽度 10 匹)及び髄外造血の亢進(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(中等度 10 匹)が認められた。

[10000 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着(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 9 匹、中等度 1 匹)が認められた。

[5000 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着(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。

[2500 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着(軽度 10 匹)が認められた。

[1250 ppm 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 -

[20000 ppm 群]

脾臓には、ヘモジデリン沈着(中等度 10 匹)の程度の増強及び髄外造血の亢進(軽度 6 匹、中等度 4 匹)が認められた。

骨髄には、赤血球造血の亢進(軽度 5 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。

[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。

[5000 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 B6D2F1/Crlj マウス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、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)、1250、2500、5000、10000 及び 20000 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、被毛の着色が雄では 1250 ppm 以上の群、雌では 20000 ppm 群にみられた。その他、糞少量が雄の 10000 ppm 以上の群と雌の 5000 ppm 以上の群で主に投与初期にみられた。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 10000 ppm 以上の群でほぼ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、10000 ppm 群 88%、20000 ppm 群 84% であった。雌では 20000 ppm 群の投与 1 週目に体重の低値がみられたのみであった。

摂餌量は、雄では 10000 ppm 以上の群では、投与 1 週目に低値がみられたが、以降は対照群と同様の推移を示し、雌では 5000 ppm 以上の群で、投与期間中に低値が散見された。なお、各投与群の平均被験物質摂取量の比率は、雌雄とも設定濃度比に近い値を示した。

血液学的検査では、メトヘモグロビンの高値が雄 10000 ppm 以上の群と雌 2500 ppm 以上の群に、網赤血球比の高値が雄 2500 ppm 以上の群と雌 10000 ppm 以上の群に、MCH の高値が雄 20000 ppm 群と雌 10000 ppm 以上の群に、その他、雌のみに血小板数の高値が 5000 ppm 以上の群に、MCV の高値が 2500 ppm 群と 10000 ppm 以上の群に、赤血球数の低値が 20000 ppm 群に認められた。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、本試験で雌に認められた貧血傾向 (赤血球数の低値) 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的変化と考えられた。

血液生化学的検査では、総ビリルビンの高値が雄 20000 ppm 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るが、その変化は僅かであった。肝臓への影響を示唆する変化として、リン脂質の高値が雌雄の全投与群に、総コレステロールの高値が雄の全投与群と雌 5000 ppm 以上の群に、ALT の高値が雄 5000 ppm 群と雌雄 20000 ppm 群に認められた。その他、腎臓への影響を示唆する変化として、尿素窒素の高値が雌 10000 ppm 以上の群に認められたが、病理組織学的変化はみられなかった。また、カリウムの低値が雄 5000 ppm 以上の群と雌 20000 ppm 群に、LDH の高値が雌 10000 ppm 以上の群に認められた。なお、ALP の低値が雌雄に認められたが、減少性の変化であり毒性学的意義は不明であった。

尿検査では、雌で pH の上昇が 5000 ppm 群と 10000 ppm 群に、蛋白の陽性度の減少が 1250 ppm ~ 5000 ppm 群にみられた。

病理学的検査では、脾臓の重量増加が雌雄 2500 ppm 以上の群に、ヘモジデリン沈着が雄 2500 ppm 以上の群と雌 10000 ppm 以上の群に、髄外造血の亢進が雌雄 20000 ppm 群に認められた。ヘモジデリン沈着の発生増加は 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。また、骨髄にも貧血に対応した代償性変化と考えられる赤血球造血の増加が雌 20000 ppm 群に認められた。肝臓には、重量増加が雄 2500 ppm 以上の群と雌の全投与群に、小葉中心性の肝細胞の肥大が雄 5000 ppm 以上の群と雌 10000 ppm 以上の群に認められた。小葉中心性の肝細胞の肥大は、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（文献 11）であることから 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。

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、貧血傾向（雌のみ）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とリン脂質の高値がみられた。腎臓への影響としては、尿素窒素の増加が雌にのみ示された。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：雄では網赤血球比の高値、脾臓へのヘモジデリン沈着の発生増加と脾臓重量の増加がみられた 2500 ppm、雌ではメトヘモグロビンと MCV の高値、ならびに脾臓重量の増加がみられた 2500 ppm
- 2) 肝臓への影響：雄では総コレステロールとリン脂質の高値がみられた 1250 ppm、雌ではリン脂質の高値と肝臓重量の増加がみられた 1250 ppm
- 3) 腎臓への影響：雌で尿素窒素の増加がみられた 10000 ppm であった。

## - 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、最低投与濃度の1250 ppm群で、雄は総コレステロールとリン脂質の高値が認められ、雌では肝臓重量の高値とリン脂質の高値が認められた。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1250 ppm (平均被験物質摂取量は、雄は165 mg/kg 体重/日、雌は213 mg/kg 体重/日) であった。

## - 3 他の文献との比較

### (1) 毒性

B6C3F1 マウス雌雄に4-クロロ-2-ニトロアニリンを0 (対照群)、75、150、300、600及び1200 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、体重増加の抑制が雄1200 mg/kg/日群にみられた。肝臓の実重量と体重比の増加が、雄の150 mg/kg/日群と600 mg/kg/日以上群、及び雌の600 mg/kg/日以上群に認められた。血液学的変化と血液生化学的変化が雌雄とも300 mg/kg/日以上群に認められた。病理組織学的検査で小葉中心性の肝細胞の腫大が雄1200 mg/kg/日群に、多核性の肝細胞が雄300 mg/kg/日以上群に、脾臓の中程度のヘモジデリン沈着症が雄300 mg/kg/日以上群と雌75 mg/kg/日以上群に認められた。この試験でのNOELは雄で150 mg/kg/日であり、雌では求まらなかったと報告している。

本試験の投与方法は上述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脾臓へのヘモジデリン沈着等が認められた。また、肝臓にも重量増加や小葉中心性の肝細胞肥大がみられた。

### (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巣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。雌には摂餌量の低値が僅かにみられるのみで体重増加の抑制はみられなかったが、雄では体重増加の抑制や摂餌量の低値が投与群に認められ、また、雌雄とも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。体重増加の抑制は、雄 10000 ppm 以上の群（最終体重は対照群に対し、10000 ppm 群：88%、20000 ppm 群：84%）に、貧血（雌のみ）や貧血に対応する変化は、雌雄とも 2500 ppm 以上の群に、肝臓への影響は雌雄とも全投与群に認められた。

以上の結果から、雄では 10000 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、10000 ppm 以上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 5000 ppm 群では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、雄のがん原性試験の最高投与濃度は、5000 ppm が適切であると判断した。雌では、本被験物質は高濃度の投与でも体重増加の抑制がなく、その他の影響も僅かであった。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」では、低毒性物質における限界試験の用量は、1000 mg/kg 体重/日とされており、これを著しく超える用量でのがん原性試験は合理的でないと考えた。13 週間試験での 1 日当たりの被験物質摂取量は、雌 20000 ppm 群では 3036 ~ 4191mg/kg 体重/日（平均 3296 mg/kg 体重/日）であり、この用量を著しく超えていた。雌 10000 ppm 群では 1452 ~ 1717 mg/kg 体重/日（平均 1591 mg/kg 体重/日）であり、2 年間の試験の場合、13 週以降は体重当たりの摂餌量が低くなるため、1000 mg/kg 体重/日に近い被験物質摂取量が得られると考えられる。従って、雌のがん原性試験の最高投与濃度は 10000 ppm が適切であると判断した。

なお、がん原性試験の最低投与濃度は、雌雄とも 13 週間試験では最低投与濃度の 1250 ppm 群でも肝臓への影響が認められたことから、1250 ppm 以下の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 5000 ppm を最高投与濃度とし、以下、1000 ppm 及び 200 ppm (公比 5)、雌は 10000 ppm を最高投与濃度とし、以下、2000 ppm 及び 400 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-ニトロアニリンのマウス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/meti/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.

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、雌雄 20000 ppm 群の pH、雄 5000 ppm 以上の群と雌の 10000 ppm 以上の群の蛋白、雄 20000 ppm 群と雌 10000 ppm 以上の群のケトン体であつた。

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。