

4-クロロ-2-ニトロアニリンのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0760

CAS No. 89-63-4

2014年8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	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～R 2	
FIGURES	1～6	
PHOTOGRAPHS	1～6	
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がん原性試験（混餌試験）

試験目的

4-クロロ-2-ニトロアニリンをマウスに 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 2009 年 9 月 7 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、平成 12 年 12 月 25 日付け、労働省告示第 120 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

4-クロロ-2-ニトロアニリンのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0760

本文

本文目次

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

- 3 観察・検査項目及び方法	9
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	9
- 3 - 2 体重測定	9
- 3 - 3 摂餌量測定	9
- 3 - 4 血液学的検査	10
- 3 - 5 血液生化学的検査	10
- 3 - 6 尿検査	10
- 3 - 7 病理学的検査	10
(1) 剖検	10
(2) 臓器重量	10
(3) 病理組織学的検査	11
- 4 数値処理と統計方法	11
- 4 - 1 数値の取り扱いと表示	11
- 4 - 2 統計処理	11
試験成績	13
- 1 生死状況	13
- 2 一般状態	13
- 3 体重	13
- 4 摂餌量	14
- 5 被験物質摂取量	14
- 6 血液学的検査	15
- 7 血液生化学的検査	15
- 8 尿検査	15
- 9 病理学的検査	16
- 9 - 1 剖検	16
- 9 - 2 臓器重量	16
- 9 - 3 病理組織学的検査	17
- 9 - 4 死因	20

考察及びまとめ	21
- 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、被験物質摂取量	21
- 2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	21
- 3 その他の影響	21
- 4 投与濃度設定の評価	23
- 5 無毒性量 (NOAEL)	24
- 6 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

4-クロロ-2-ニトロアニリンのがん原性を検索する目的で B6D2F1/Crlj マウス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、4-クロロ-2-ニトロアニリンを混合した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、雄では 0 (対照群)、200、1000 及び 5000 ppm (重量比 w/w)、雌では 0、400、2000 及び 10000 ppm 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、生存率の低下が雄の 5000 ppm 群にみられ、これは尿閉による死亡の増加に起因するものであった。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黄色尿が雌雄の全投与群に、内部腫瘍、外陰部周囲の糜爛及び陰茎突出を伴う動物が雄の 5000 ppm 群に多くみられた。体重の低値が、雄の 5000 ppm 群と雌の 10000 ppm 群で投与期間を通して認められた。摂餌量は、雄の 5000 ppm 群で低値が散見され、雌の 10000 ppm 群では投与期間を通して低値であった。

被験物質による腫瘍の発生増加及び腫瘍関連病変の発生増加は、雌雄とも認められなかった。

腫瘍以外の影響として、血液/造血系では、メトヘモグロビン濃度の高値 (雌雄)、貧血を示すパラメータの変化 (雌で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値等) がみられた。泌尿器系では、雄に尿閉に関連した病変 (膀胱の拡張、外陰部周囲皮膚の潰瘍、尿道の炎症)、及びその二次的变化がみられた。また、雌では、腎硬化症、乳頭壊死、水腎症及び腎盂の乳頭状ポリープの発生が増加した。さらに、腎臓への影響として、血漿中尿素窒素の高値と腎臓重量 (体重比) の高値が雌雄にみられた。胃では、前胃と腺胃で過形成の発生増加 (雄) がみられた。肝臓では、小葉中心性の肝細胞肥大 (雌) が増加し、肝臓への影響を示唆する変化 (ALT の高値 (雌)) がみられた。また、アミロイド沈着の増加 (雌雄の舌、雄の大腸、雌の胃と肺) が認められた。

以上、B6D2F1/Crlj マウスを用いて、4-クロロ-2-ニトロアニリンの 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、腫瘍の発生増加及び腫瘍関連病変の発生増加は雌雄とも認められなかった。

なお、2 年間の混餌経口投与における無毒性量 (NOAEL) は、雄では、胃への影響とアミロイド沈着の発生増加をエンドポイントとして 200 ppm (22 mg/kg 体重/日)、雌では、腎臓への影響とアミロイド沈着の発生増加をエンドポイントとして 400 ppm (56 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

4-クロロ-2-ニトロアニリンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (マウス 雄)

投与濃度 (ppm)			0	200	1000	5000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数			50	50	50	50		
良性 腫瘍	肺	細気管支 - 肺胞上皮腺腫	3	8	2	1		
	肝臓	血管腫	7	3	5	0 **		↓
		肝細胞腺腫	10	9	14	4		
	ハート腺	腺腫	2	5	2	1		
悪性 腫瘍	肺	細気管支 - 肺胞上皮癌	5	4	7	0 *		↓
	骨髄	血管肉腫	0	3	0	0		
	リンパ節	悪性リンパ腫	5	7	9	2		
	脾臓	血管肉腫	0	3	0	1		
	肝臓	組織球性肉腫	2	3	0	3	↑	
		血管肉腫	4	4	2	1		
		肝細胞癌	9	7	6	1 **		↓
	精巣上体	組織球性肉腫	3	1	0	0		

4-クロロ-2-ニトロアニリンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (マウス 雌)

投与濃度 (ppm)			0	400	2000	10000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数			49	50	50	50		
良性 腫瘍	肺	細気管支 - 肺胞上皮腺腫	2	2	1	3		
	肝臓	血管腫	1	3	2	0		
		肝細胞腺腫	2	3	2	2		
	下垂体	腺腫	5	6	5	0 *		↓
	卵巣	嚢胞腺腫	4	5	3	1		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	2	3	1	0		
	ハート腺	腺腫	4	3	1	0		
悪性 腫瘍	肺	細気管支 - 肺胞上皮癌	3	2	0	3		
	リンパ節	悪性リンパ腫	17	22	18	6 **		↓↓
	肝臓	組織球性肉腫	3	3	4	1		
	子宮	組織球性肉腫	9	7	6	11		

* : $p \leq 0.05$ 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)

試験材料

- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

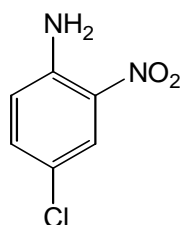
名 称： 4-クロロ-2-ニトロアニリン (4-chloro-2-nitroaniline)

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、エーテルと酢酸に可溶、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

使用ロット番号 : LUTFB

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)

- 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、さらに、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 に示す。

- 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 に示す。

- 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 B6D2F1/Crlj マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 220 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：21.6～25.0 g、雌：17.6～20.6 g）を選別し、試験に用いた。

なお、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 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、雄は 200、1000 及び 5000 ppm、雌は 400、2000 及び 10000 ppm (重量比 w/w) の 3 段階 (公比 5) に設定した。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

- 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、がん原性試験による調査の基準 (安衛法) (文献 5) 及び OECD 化学品テストガイドライン 451 (発癌性試験) (文献 6) に従い、2 年間 (104 週間) とした。

投与濃度は、経口投与による 13 週間毒性試験 (試験番号 0746) (文献 7) の結果をもとに設定した。13 週間試験は、B6D2F1/Crlj マウスの雌雄に、0 (対照群)、1250、2500、5000、10000 及び 20000 ppm (w/w) 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。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 5000 ppm 以上の群 (最

終体重は対照群に対し、5000 ppm 群：94%、10000 ppm 群：88%、20000 ppm 群：84%）に、貧血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 ~ 4191 mg/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 g/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取量が低くなるため、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。

従って、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。

- 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）SS-251、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、20000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 20000 ppm 被験物質混合飼料を更に粉末飼料と攪拌混合し、200、400、1000、2000、5000 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 7 点、それ以降は約 3 ヶ月毎に各 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調製濃度における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 94.0 ~ 113% の範囲にあった。また、均一性は各調製濃度ともばらつきが少なかった。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 に示す。

- 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 0746)において、100、1250 及び 20000 ppm の被験物質混合飼料で確認した。すなわち、100、1250 及び 20000 ppm の被験物質混合飼料を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 2-3 に示す。

- 1 - 9 被験物質の摂取量

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 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	雄 使用動物数(動物番号)	群名称	雌 使用動物数(動物番号)
対照群	50匹 (1001～1050)	対照群	50匹 (2001～2050)
200 ppm群	50匹 (1101～1150)	400 ppm群	50匹 (2101～2150)
1000 ppm群	50匹 (1201～1250)	2000 ppm群	50匹 (2201～2250)
5000 ppm群	50匹 (1301～1350)	10000 ppm群	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 8)。

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:202室、雌:204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 <202室:23.0±0.3、204室:23.1±0.3 >

湿度 : 55±15% <202室:56±2%、204室:53±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(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、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)を行った。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、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

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。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て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

- 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 3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、 γ -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 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(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

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、骨髄（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、小数点以下第 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、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。

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 9）、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 に示す。

雌の対照群の 1 匹 (動物番号 2038) が投与 4 週目に事故死亡したため、当群の有効動物数は 49 匹とした。

- 雄 -

5000 ppm 群の生存率は、投与開始 1 年後以降低下し、投与終了時は対照群より低値であった。200 ppm 群と 1000 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 : 31 匹 (62%)、200 ppm 群 : 33 匹 (66%)、1000 ppm 群 : 37 匹 (74%)、5000 ppm 群 : 10 匹 (20%) であった。

- 雌 -

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 : 25 匹 (51%)、400 ppm 群 : 20 匹 (40%)、2000 ppm 群 : 27 匹 (54%)、10000 ppm 群 : 31 匹 (62%) であった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示す。

- 雄 -

全投与群で、黄色尿が全投与期間を通して全動物に認められた。また、5000 ppm 群で、内部腫瘍 (27 匹)、外陰部周囲の糜爛 (22 匹)、陰茎突出 (12 匹) が多く認められた。

- 雌 -

全投与群で、黄色尿が全投与期間を通して全動物に認められた。

- 3 体重

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

- 雄 -

5000 ppm 群では、投与期間を通して体重の低値が認められた。1000 ppm 群と 200 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、200 ppm 群 : 96%、1000 ppm 群 : 93%、5000 ppm 群 : 73% であった。

- 雌 -

10000 ppm 群では、投与期間を通して体重の低値が認められた。2000 ppm 群では、投

与期間の終期に低値が散見された。400 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、400 ppm 群：103%、2000 ppm 群：93%、10000 ppm 群：74%であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1~4 及び FIGURE 5, 6 に示す。

- 雄 -

5000 ppm 群では、摂餌量の低値が散見された。1000 ppm 群と 200 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：4.2g、200 ppm 群：4.2g(100%)、1000 ppm 群：4.2g(100%)、5000 ppm 群：4.0g(95%)であった。

- 雌 -

10000 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。2000 ppm 群と 400 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：3.9g、400 ppm 群：3.9g(100%)、2000 ppm 群：3.8g(97%)、10000 ppm 群：3.4g(87%)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 に示す。

- 雄 -

各投与群の被験物質摂取量(mg/kg 体重/日)は、200 ppm 群：17~33、1000 ppm 群：87~164、5000 ppm 群：507~790 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、200 ppm 群：22、1000 ppm 群：111、5000 ppm 群：625 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、200 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1000 ppm 群で 5.0 倍、5000 ppm 群で 28.4 倍であり、それぞれの群の被験物質摂取量は設定濃度比(公比 5)をほぼ反映した値であった。

- 雌 -

各投与群の被験物質摂取量(mg/kg 体重/日)は、400 ppm 群：45~77、2000 ppm 群：230~373、10000 ppm 群：1229~1763 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、400 ppm 群：56、2000 ppm 群：279、10000 ppm 群：1406 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、400 ppm 群の被験物質摂取量に対して、2000 ppm 群で 5.0 倍、10000 ppm 群で 25.1 倍であり、それぞれの群の被験物質摂取量は設定濃度比（公比 5）を反映した値であった。

- 6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示す。

- 雄 -

網赤血球比とメトヘモグロビン濃度の高値が 5000 ppm 群で認められた。

- 雌 -

メトヘモグロビン濃度の高値が 2000 ppm 以上の群で認められた。また、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数及び白血球百分率でリンパ球比の低値、並びに MCH、MCHC、血小板数、網赤血球比及び白血球百分率で好中球比の高値が 10000 ppm 群で認められた。

- 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 に示す。

- 雄 -

総コレステロール、リン脂質、ALP 及び尿素窒素の高値が 5000 ppm 群で認められた。

5000 ppm 群の ALP の平均値は対照群より低い値であったが、Dunnett 検定では統計学的に有意な高値を示した。この原因は、対照群に 1 匹非常に高値を示した動物が含まれていたためであった。

- 雌 -

総コレステロール、リン脂質、ALT 及び CK の高値が 2000 ppm 以上の群で認められた。また、A/G 比、総ビリルビン、尿素窒素、カルシウム及び無機リンの高値、並びにトリグリセライドとクロールの低値が 10000 ppm 群で認められた。

- 8 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示す。

- 雄 -

pH の低下が 1000 ppm 以上の群に認められた。

なお、蛋白、グルコース、ケトン体及びウロビリノーゲンの検査において、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、蛋白：1000 ppm 群 20 匹、5000 ppm 群 10 匹、グ

ルコース：5000 ppm 群 3 匹、ケトン体：1000 ppm 群 1 匹、5000 ppm 群 3 匹及びウロビリノーゲン：1000 ppm 群 28 匹、5000 ppm 群 10 匹であった。

- 雌 -

ケトン体の陽性例の増加が 10000 ppm 群に認められた。

なお、pH、蛋白、グルコース、ケトン体及びウロビリノーゲンの検査において、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：10000 ppm 群 6 匹、蛋白：2000 ppm 群 21 匹、10000 ppm 群 32 匹、グルコース：2000 ppm 群 7 匹、10000 ppm 群 26 匹、ケトン体：10000 ppm 群 1 匹及びウロビリノーゲン：2000 ppm 群 21 匹、10000 ppm 群 32 匹であった。

- 9 病理学的検査

- 9 - 1 剖検

剖検所見を TABLE I 1 ~ 6 に示す。

- 雄 -

皮膚の糜爛が 5000 ppm 群で多くみられた(対照群 4 匹、200 ppm 群 2 匹、1000 ppm 群 0 匹、5000 ppm 群 15 匹)。5000 ppm 群にみられた皮膚の糜爛は外陰部周囲に認められた。

腎臓の変形が 5000 ppm 群で多くみられた(対照群 3 匹、200 ppm 群 4 匹、1000 ppm 群 6 匹、5000 ppm 群 13 匹)。

膀胱に尿の多量貯留が 5000 ppm 群で多くみられた(対照群 2 匹、200 ppm 群 4 匹、1000 ppm 群 3 匹、5000 ppm 群 21 匹)。

- 雌 -

腎臓の変形が 10000 ppm 群で多くみられた(対照群 9 匹、400 ppm 群 10 匹、2000 ppm 群 13 匹、10000 ppm 群 23 匹)。

腎臓に水腎症が 2000 ppm 以上の群で多くみられた(対照群 2 匹、400 ppm 群 3 匹、2000 ppm 群 8 匹、10000 ppm 群 14 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 に示す。

- 雄 -

腎臓の体重比の高値が 5000 ppm 群で認められ、実重量は統計学的に有意でないものの対照群に比較して高値であった。

なお、1000 ppm 群あるいは 5000 ppm 群で、精巣、心臓、肺、肝臓及び脳の体重比に変化がみられたが、1000 ppm 群と 5000 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 -

腎臓の体重比の高値が 10000 ppm 群で認められ、実重量は統計学的に有意でないものの対照群と比較して高値であった。

なお、2000 ppm 群あるいは 10000 ppm 群で、副腎、卵巣、心臓、肺、肝臓及び脳の実重量や体重比に変化がみられたが、2000 ppm 群と 10000 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。

- 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 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 Q に示す。また、病理組織学的所見の代表例を写真 1～6 に示す。

- 雄 -

1) 腫瘍性病変

< 肝臓 >

組織球性肉腫の発生 (対照群: 2 匹, 4%、200 ppm 群: 3 匹, 6%、1000 ppm 群: 0 匹, 0%、5000 ppm 群: 3 匹, 6%) が Peto 検定 (死亡率法) で増加傾向を示したが、当センターのヒストリカルコントロールの範囲 (最小 0%～最大 12%, 平均 3.6%) 内にあることから、この腫瘍の発生増加は被験物質投与による影響ではないと判断した。

その他、肺の細気管支 肺胞上皮癌、肝臓の血管腫と肝細胞癌の発生が Fisher 検定で 5000 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

< 皮膚 >

潰瘍の発生が 5000 ppm 群で増加した。この病変は外陰部周囲に認められた。皮膚の潰瘍は組織の欠損が真皮から皮下組織まで広がった病変で炎症を伴っていた。

< 鼻腔 >

鼻腔の嗅部と呼吸部に病変の増加がみられた。

嗅部では、嗅腺の空胞変性及び嗅上皮のエオジン好性変化の発生が 5000 ppm 群で、嗅腺の褐色色素沈着の発生が 1000 ppm 以上の群で増加した。また、嗅腺の萎縮と嗅上皮の萎縮の程度が 5000 ppm 群で増強した。嗅腺の萎縮は背側嗅部固有層内で補腔性の骨形成を伴っていた。

呼吸部では鼻腺の呼吸上皮化生の発生が 1000 ppm 以上の群で増加した。

< 肺 >

水腫の発生が 5000 ppm 群で増加した。この病変は炎症性細胞浸潤を伴っていた。

< 骨髄 >

顆粒球造血増加の発生が 5000 ppm 群で増加した。

< 脾臓 >

髓外造血の発生が 5000 ppm 群で増加した。

< 舌 >

アミロイド沈着の発生が 1000 ppm 以上の群で増加した。

< 胃 >

前胃の過形成と腺胃の過形成が 1000 ppm 群で発生増加した。

< 大腸 >

アミロイド沈着の程度が 1000 ppm 群で増強した。

< 腎臓 >

腎盂の拡張の発生が 5000 ppm 群で増加した。腎盂の拡張は両側性にみられた。また、腎硬化症が統計的に有意ではないものの、発生の増加または程度の増強傾向があった。腎硬化症は腎臓の皮質の一部が楔形に癒痕組織で形成され、一部に再生尿細管や単核細胞浸潤を伴った変化である。

< 膀胱 >

拡張の発生が 5000 ppm 群で増加した。膀胱の拡張は肉眼所見では尿多量貯留として認められた。また、膀胱の内腔を被覆する移行上皮の表層細胞に褐色色素沈着の発生が 5000 ppm 群で増加した。

< 尿道 >

炎症の発生が 5000 ppm 群で増加した。尿道の炎症は主に炎症性細胞浸潤が認められ、尿道腔内に蛋白様物質や精子及び尿路上皮を含んでいた。

その他、歯の異形成と大腸のアミロイド沈着の発生減少が 5000 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。

リンパ節の悪性リンパ腫、下垂体の腺腫の発生が、Fisher 検定で 10000 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

< 鼻腔 >

鼻腔の嗅部と呼吸部に病変の増加がみられた。

嗅部では、嗅腺の空胞変性と褐色色素沈着の発生増加、萎縮の程度の増強が 2000 ppm 以上の群で、嗅腺の呼吸上皮化生及び嗅上皮のエオジン好性変化と呼吸上皮化生の発生増加、嗅上皮の萎縮の発生増加と程度の増強が 10000 ppm 群でみられた。嗅腺の萎縮は背側嗅部固有層内で補腔性の骨形成を伴っていた。また、嗅腺の呼吸上皮化生は嗅腺の萎縮に至る過程の変性所見として認められた。

呼吸部では鼻腺の呼吸上皮化生の発生が 2000 ppm 以上の群で増加した。

< 肺 >

アミロイド沈着の発生が 10000 ppm 群で増加した。

< 脾臓 >

ヘモジデリン沈着と髄外造血の発生が 10000 ppm 群で増加した。

< 舌 >

アミロイド沈着の発生が 2000 ppm 以上の群で増加した。

< 胃 >

アミロイド沈着の発生が 2000 ppm 以上の群で増加した。

< 肝臓 >

小葉中心性肝細胞肥大の発生が 10000 ppm 群で増加した。

< 腎臓 >

水腎症の発生が 2000 ppm 以上の群で増加し、乳頭状ポリープ、腎硬化症及び乳頭壊死の発生が 10000 ppm 群で増加した。乳頭状ポリープは尿管と腎盂の境界領域に尿路上皮が幅広い間質を伴って乳頭状に突出した病変であり、腎盂は拡張し、水腎症とともに認められた。腎硬化症は雄と同様の变化であり、この病変を示した多くの動物の腎乳頭部に壊死がみられた。

その他、副腎の紡錘形細胞過形成の程度の増強が 2000 ppm 群にみられ、腺胃の糜爛が 400 ppm 群で増加したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。また、ハーダー腺の色素沈着の発生減少が 10000 ppm 群にみられた。

- 9 - 4 死因

病理学的にみた死亡 / 瀕死の原因を TABLE R 1, 2 に示す。

- 雄 -

投与群で尿閉による死亡が多く認められた。各群の総死亡 / 瀕死動物数に対して尿閉を死因とした動物数は、対照群 : 19 匹中 0 匹、200 ppm 群 : 17 匹中 4 匹、1000 ppm 群 : 13 匹中 3 匹、5000 ppm 群 : 40 匹中 25 匹であった。

- 雌 -

投与群で水腎症による死亡がやや多く認められた。各群の総死亡 / 瀕死動物数に対して水腎症を死因とした動物数は、対照群 : 24 匹中 0 匹、400 ppm 群 : 30 匹中 1 匹、2000 ppm 群 : 23 匹中 1 匹、10000 ppm 群 : 19 匹中 5 匹であった。

考察及びまとめ

4-クロロ-2-ニトロアニリンのマウスを用いた2年間の混餌投与による経口試験(投与濃度は雄:200、1000及び5000 ppm、雌:400、2000及び10000 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

生存率は、雄の5000 ppm群で尿閉による死亡により顕著な低下がみられた。一般状態の観察では、代謝物によると考えられる黄色尿が雌雄の全投与群で認められ、雄の5000 ppm群では、内部腫瘤、外陰部周囲の糜爛、陰茎突出を伴う動物が多くみられた。体重は、雄の5000 ppm群と雌の10000 ppm群で投与期間を通して低値が認められ、最終体重は対照群に対し、雄5000 ppm群73%、雌10000 ppm群74%であった。摂餌量は、雄の5000 ppm群で低値が散見され、雌の10000 ppm群では、投与期間を通して低値であった。各群の平均被験物質摂取量は、設定濃度比をほぼ反映した値であった。

- 2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与による腫瘍の発生増加及び腫瘍関連病変の発生増加は、雌雄とも認められなかった。

- 3 その他の影響

4-クロロ-2-ニトロアニリンの混餌経口投与により、雌雄の血液/造血系及び泌尿器系、雄の胃(前胃・腺胃)、雌の肝臓への影響を認めた。また、アミロイド沈着の増加を雌雄の舌、雄の大腸、雌の胃と肺に認めた。

血液/造血系への影響として、雌の10000 ppm群において、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が認められ、貧血傾向を示した。また、MCH、MCHC及び血小板数も高値であった。さらに、メトヘモグロビン濃度の高値が雄の5000 ppm群と雌の2000 ppm以上の群に認められた。なお、貧血に関連した変化として、網赤血球比の高値が雄の5000 ppm群と雌の10000 ppm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10, 11)。従って、本試験で雌雄に認められた貧血傾向は、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、赤血球傷害に対応する代償性的変化と考えられた。病理組織学的検査において、脾臓ではヘモジデリン沈着が雌の10000 ppm群で増加し、髄外造血の発生増加が

雄の 5000 ppm 群と雌の 10000 ppm 群で認められた。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。また、本試験の予備試験として行った 13 週間混餌経口投与試験(文献 7)でも、メトヘモグロビンの増加(雄 10000 ppm 以上の群と雌 2500 ppm 以上の群)とその二次的变化が認められている。4-クロロ-2-ニトロアニリンの長期投与により、メトヘモグロビン血症は雌雄ともより低用量で認められた。

泌尿器系への影響として、雄の 5000 ppm 群において、剖検時の肉眼所見では膀胱の尿多量貯留が多く動物に観察され、病理組織学的検査では膀胱の拡張、外陰部周囲皮膚の潰瘍、尿道の炎症が認められ、尿道腔内には蛋白様物質や精子、炎症性細胞や尿路上皮の落屑がみられた。また、これらの所見は、動物の一般状態観察では、内部腫瘍、外陰部周囲の糜爛や陰茎突出として観察された。これらの変化から、尿路を閉塞し排尿障害を起こした可能性があり、膀胱内に尿が多量に貯留し、尿閉により死亡したと考えられた。マウスの泌尿器系加齢性病変として尿閉は一般に対照群でも認められるが(文献 12)、本試験では尿閉が 5000 ppm 群で顕著に増加したことから、4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与により、排尿障害が増強されたと考えられ、雄の生存率の低下は尿閉によるものと考えられた。また、一般状態の観察では黄色尿が観察された。4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与により尿成分に変化が生じた可能性が示唆されたが、排尿障害を増強した原因は不明であった。膀胱の褐色色素沈着、腎盂の拡張、肺の水腫、骨髄の顆粒球造血の増加は主に尿閉を死因とする動物に認められた。膀胱の内腔を被覆する移行上皮の表層細胞の褐色色素沈着は、尿閉により尿が長時間停滞したためみられた変化と考えられ、骨髄の顆粒球造血の増加は炎症を伴った外陰部周囲皮膚の潰瘍や尿道の炎症に対応する変化と考えられた。一方、雌の泌尿器系への影響として、病理組織学的検査では、水腎症の発生が 2000 ppm 以上の群で増加し、腎硬化症、乳頭壊死及び腎盂の乳頭状ポリープの発生が 10000 ppm 群で増加した。水腎症、腎硬化症及び乳頭壊死は対照群でも認められており、加齢性病変としてマウスにみられる変化である。また、腎盂の乳頭状ポリープについても雌の対照群にはみられないものの雄の対照群に認められること、水腎症と共に認められることから、4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与による特有の病変ではなく、投与により一般にマウスにみられる病変を増強したものと考えられる。なお、雄の腎硬化症も統計的に有意ではないものの、発生の増加または程度の増強の傾向がみられ、雌と同様の影響が疑われた。さらに、雌雄の腎臓への影響として、血漿中尿素窒素の高値と腎臓重量の高値(体重比)が雄の 5000 ppm 群と雌の 10000 ppm 群で認められた。剖検時に観察された雌雄の腎臓の変形は、これらの腎臓病変に起因した変化と考えられる。なお、予備試験の 13 週間混餌経口投与試験では、腎臓に病理組織学的変化はみられなかったが、尿素窒素の高値が雌の 10000 ppm 以上の群に認められ、腎臓への影響が示唆された。従って、4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与により、加齢性病変として雌雄マウスにみられる腎臓病変が増強されたと考えられた。

胃への影響として、雄の 1000 ppm 群で、前胃の過形成と腺胃の過形成の発生が増加し

たが、5000 ppm 群では発生増加はみられなかった。雄の 1000 ppm 群における前胃または腺胃の過形成の発生は、そのほとんどが定期解剖時まで生存した動物に認められた。雄の 5000 ppm 群は、投与期間を通して体重の低値が認められたことや投与期間の中期以降、生存率が顕著に低下したことから増殖性病変の形成に至らなかったことが推察される。従って、雄 1000 ppm 群の前胃と腺胃の過形成の発生増加は 4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与による可能性が示唆された。

肝臓への影響として、血液生化学的検査では、雌の 2000 ppm 以上の群で ALT の高値が認められた。また、病理組織学的検査では、小葉中心性の肝細胞肥大の発生が雌の 10000 ppm 群で増加した。予備試験の 13 週間混餌経口投与試験でも、小葉中心性の肝細胞肥大は雌雄ともに認められ、肝臓重量の高値、血液生化学的検査でも肝臓への影響を示唆する変化が認められた。しかし、肝臓への影響は投与期間の延長により、増殖性病変へと進展することはなかった。

アミロイド沈着の増加を雌雄の舌、雄の大腸、雌の胃と肺に認めた。アミロイド沈着は多くの系統のマウスに加齢によって好発することが知られており、沈着する臓器は脳、脊髄、骨、骨髄を除いたほとんどの臓器に認められることが報告されている（文献 13）。また、本試験の対照群にもアミロイド沈着は認められている。従って、これらの結果は、4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与により加齢性病変として雌雄マウスにみられるアミロイド沈着を増強したものと考えられた。

その他、鼻腔では嗅腺（雌雄に萎縮、空胞変性及び褐色色素沈着、雌に嗅腺の呼吸上皮化生）、嗅上皮（雌雄に萎縮とエオジン好性変化、雌に嗅上皮の呼吸上皮化生）、鼻腺（雌雄に呼吸上皮化生）に病理組織学的変化がみられた。これらの鼻腔の変化は、予備試験の 13 週間混餌経口投与試験ではみられなかったが、4-クロロ-2-ニトロアニリンの長期投与により認められた。被験物質またはその代謝物が血行性に鼻腔に影響を与えた可能性は否定できないが、被験物質を混合した粉餌を吸入することにより、鼻腔に病理組織学的変化が出現した可能性が考えられる。

- 4 投与濃度設定の評価

OECD テストガイドライン（文献 6）では、がん原性試験の最高用量の設定に際しては、最高用量は主要な標的器官と毒性影響を明らかにするが、苦痛、高度な毒性、病的状態または死亡を引き起こさないような用量とする。すなわち、最高用量は通常、体重増加抑制（約 10%）などで示される明らかな毒性が得られるように設定することと定めている。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 5）でも、最高用量は、「あらかじめ 1 ヶ月から 3 ヶ月の短期試験を行い、その結果により決定し、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。

本試験の投与濃度は、予備試験である 13 週間混餌経口投与試験（文献 7）の結果をもとに設定した（ - 1 - 5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由を参照）。本試験の結果、雌雄とも腫瘍及び腫瘍関連病変の増加は認められなかった。しかし、最高用量では体重増加の抑制（投与終了時に対照群に対し、雄 5000 ppm 群 73%、雌 10000 ppm 群 74%）が認められ、特に雄では顕著な生存率の低下がみられた。その死因の多くは非腫瘍性的変化である尿閉によるものであった。以上の結果は、予備試験の 13 週間毒性試験の結果からは推測できないものであったが、結果的に雌雄とも最高用量はやや高い設定であったと考えられる。しかし、雌の 10000 ppm 群では生存率の低下は認められず、中間用量（雄 1000 ppm 群、雌 2000 ppm 群）では、最終体重は雌雄とも 93%であり、病理組織学的検査でも被験物質投与による毒性影響が認められた。従って、本試験の濃度設定における発がん性の評価は可能であったと考える。

- 5 無毒性量（NOAEL）

以上のように、本がん原性試験では、雌雄の血液 / 造血系及び泌尿器系、雄の胃（前胃・腺胃）、雌の肝臓への影響を認めた。さらに、雌雄にアミロイド沈着の発生増加が認められた。その中で、最も低用量まで認められた毒性変化は、雄では胃への影響（前胃と腺胃に過形成の発生増加）及びアミロイド沈着の発生増加（舌と大腸）が、それぞれ 1000 ppm 群まで認められた。また、雌では、腎臓への影響（水腎症の発生増加）及びアミロイド沈着の発生増加（舌と胃）がそれぞれ 2000 ppm 群まで認められた。従って、本試験における 4-クロロ-2-ニトロアニリンのマウスに対する 2 年間混餌経口投与による無毒性量（NOAEL）は、雄では、胃への影響とアミロイド沈着の発生増加をエンドポイントとして 200 ppm（22 mg/kg 体重/日）、雌では、腎臓への影響とアミロイド沈着の発生増加をエンドポイントとして 400 ppm（56 mg/kg 体重/日）であると考えられた。

- 6 他文献との比較等

（1）がん原性等

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がん原性試験または長期毒性試験の報告はない。

in vitro での発がん物質検出試験として、株化細胞の BALB/c-3T3 細胞を用いて実施した細胞形質転換試験の報告があり、陰性の結果であった。この形質転換試験では、予備的な細胞毒性試験で細胞毒性が認められる用量（0.638 mM）を確認した後、2 回の本試験を実施しており、1 回目の本試験の最高用量は 0.870 mM、2 回目の本試験の最高用量は 0.580 mM で実施している（文献 14）。

(2) 遺伝毒性

4-クロロ-2-ニトロアニリンの *in vitro* 変異原性については、微生物を用いる変異原性試験、染色体異常試験、姉妹染色分体交換試験、マウスリンフォーマ試験の報告があり、いずれにおいても陽性の結果であった。

微生物を用いる変異原性試験として、ネズミチフス菌 TA98、TA100 の 2 菌株において代謝活性化 (ラット S9) の有無で試験を実施した結果、TA98 の代謝活性化 (ラット S9) による場合で陽性の結果を示した (文献 15)。また、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 の 4 菌株において代謝活性化 (ラット S9 及びハムスター S9) の有無で試験を実施した結果、TA98 及び TA100 の代謝活性化 (ハムスター S9) による場合、及び TA98 の代謝活性化 (ラット S9) による場合で陽性の結果を示した (文献 16)。

染色体異常試験では、チャイニーズハムスターの株化細胞 CHO-W-B1 を用いて代謝活性化の有無で試験を実施した結果、代謝活性化による場合は陽性 (302-351 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、代謝活性化によらない場合は陰性であった (文献 17)。

姉妹染色分体交換試験も CHO-W-B1 を用いて代謝活性化の有無で試験を実施しており、その結果、代謝活性化による場合は陽性 (302 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、代謝活性化によらない場合も陽性 (20-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった (文献 17)。

マウスリンフォーマ試験では、株化細胞のマウスリンフォーマ L5178Y TK^{+/+}を用いて代謝活性化の有無で試験を実施した結果、代謝活性化による場合は陽性 (90-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、代謝活性化によらない場合も陽性 (1-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった (文献 18)。

4-クロロ-2-ニトロアニリンの *in vivo* 変異原性については、マウス骨髄小核試験で陰性の報告がある。NMRI マウスに 2200 mg/kg 体重の用量で、単回強制経口投与 (雌雄各群 5 匹) し、投与後 24、48、72 時間後に小核標本作製した。試験の結果、小核を伴う多染性赤血球または正染性赤血球の数に増加は認められなかった。また、正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合に有意な変化は認められなかった (文献 19)。

結論

B6D2F1/Crlj 雌雄マウスを用いて、4-クロロ-2-ニトロアニリンの2年間(104週間)にわたる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。

雌雄とも腫瘍の発生増加は認められず、4-クロロ-2-ニトロアニリンのマウスに対するがん原性は示されなかった。

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. 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.
6. OECD. 2009. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies", Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
7. 日本バイオアッセイ研究センター. 2011. 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. 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.
8. 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 .
9. 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.
10. Bingham E and McGowan WJ, 2012. Aromatic Nitro and Amino Compounds. In: Patty's Toxicology, 6th ed (Bingham E and Cochrane B eds.) Hoboken NJ: John Wiley & Sons, Vol. 2, 517-607.
11. 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.

12. Gaillard ET. 1999. Urter, Bladder, and Urethra. In: Pathology of the Mouse (Maronpot R, ed). Cache River Press, 235-258.
13. HogenEsch H, GruysDungworth E, Higuchi K. 1996. Senile amyloidosis. In: Pathology of the aging mouse, Vol 1 (Mohr U, Dungworth DL, Capn CC, Carlton WW, Sundberg JP, Ward JM eds). Washington, DC: ILSI press, 237-244.
14. Matthews EJ, Spalding JW, Tennant RW. 1993. Transformation of BALB/c-3T3 cells: IV. Rank-ordered potency of 24 chemical responses detected in a sensitive new assay procedure. Environ Health Perspect. 101 (Suppl 2): 319-345.
15. 河合明宏, 後藤純雄, 松本由美子, 松下秀鶴 . 1987 . 脂肪族および芳香族ニトロ化合物の変異原性 工業材料およびその関連物質. 産業医学 29: 34-54.
16. Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Spec W, Zeiger E. 1983. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ Mutagen. 5 (Supple 1): 3-142.
17. Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, et al. 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. Environ Mol Mutagen 10 (Suppl 10): 1-175.
18. National Toxicology Program, Database Search Application: 4-Chloro-2-nitroaniline. http://tools.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm?fuseaction=ntpsearch.showStudiesForChemical&cas_no=89-63-4 [accessed 22 July 2014].
19. GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals. 2004. 4-Chloro-2-nitroaniline. BUA Report 235. Stuttgart: Hirzel Verlag.

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、グルコース、ケトン体及びウロビリノーゲンの検査において、尿試験紙で判定できない動物がみられた。なお、尿検査の中で統計学的に評価ができなかつた項目はなかつた。

その他、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。