

o-フェニレンジアミン二塩酸塩のラットを用いた
経口投与によるがん原性試験(混水試験)報告書

試験番号：0371

CAS No. 615-28-1

2004年2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

標題

o-フェニレンジアミン二塩酸塩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

o-フェニレンジアミン二塩酸塩をラットに 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ついて」及び 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「試験施設が具備すべき基準」(一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号) に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択) に準じて実施した。

試験委託者

労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課
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
所長 松島 泰次郎
神奈川県秦野市平沢 2445

o-フェニレンジアミン二塩酸塩のラットを用いた
経口投与によるがん原性試験(混水試験)報告書

試験番号：0371

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、示性式、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
Ⅱ-3	観察・検査項目及び方法	9
Ⅱ-3-1	動物の一般状態の観察	9
Ⅱ-3-2	体重測定	10
Ⅱ-3-3	摂水量測定	10
Ⅱ-3-4	摂餌量測定	10
Ⅱ-3-5	血液学的検査	10
Ⅱ-3-6	血液生化学的検査	10
Ⅱ-3-7	尿検査	11
Ⅱ-3-8	病理学的検査	11
Ⅱ-4	数値処理と統計処理	11
Ⅱ-4-1	数値の取り扱いと表示	11
Ⅱ-4-2	母数の取り扱い	12
Ⅱ-4-3	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	摂水量	14
Ⅲ-5	摂餌量	15
Ⅲ-6	被験物質摂取量	15
Ⅲ-7	血液学的検査	15
Ⅲ-8	血液生化学的検査	16
Ⅲ-9	尿検査	16
Ⅲ-10	病理学的検査	16
Ⅲ-10-1	剖検	16
Ⅲ-10-2	臓器重量	16
Ⅲ-10-3	病理組織学的検査	17
Ⅲ-10-4	死因	19

IV	考察及びまとめ	20
IV-1	腫瘍性及び腫瘍関連性病変	20
IV-2	非腫瘍性病変	21
IV-3	その他	21
IV-4	無毒性量(NOAEI)/最小毒性量(LOAEI)及びベンチマーク用量	22
IV-5	他文献との比較等	22
V	結論	24
VI	文献	25

要約

o-フェニレンジアミン二塩酸塩のがん原性を検索する目的でラット (F344/DuCrj(Fischer)) 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、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩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、雄が2000、1000、500 ppm、雌が1000、500、250 ppm (公比2) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重、摂水量及び摂餌量の測定、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。

生存率は、対照群と比べ、変化はみられなかったが、体重と摂水量は雄の全投与群、雌の500 ppm以上の群で低値を示した。摂餌量は、雄の2000 ppm、雌の1000 ppm群で全投与期間、雄の1000 ppm群と500 ppm群で投与期間初期及び終期に低値を示した。

腫瘍性病変として、雌雄ラットに肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められた。雄の肝細胞腺腫の発生率は1000 ppm以上の群で、肝細胞癌の発生率は2000 ppm群で増加した。雌の肝細胞腺腫の発生率は500 ppm以上の群で、雌の肝細胞癌の発生率は1000 ppm群で増加した。また、これらの腫瘍発生率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より高い値であった。従って、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩投与により肝臓に悪性腫瘍を含む腫瘍の増加があると考えた。また、前腫瘍性病変の好塩基性小増殖巣の発生が雄の1000 ppm以上の群と雌のすべての投与群で増加した。肝臓腫瘍の発生以外にも血液生化学的検査の変化(GOT、GPT及び γ -GTPの上昇)が観察された。さらに雄で、膀胱の悪性腫瘍である移行上皮癌と良性腫瘍である移行上皮乳頭腫の2000 ppm群における発生率が、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越え、移行上皮癌と移行上皮乳頭腫を合わせた発生数が増加し、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩投与により膀胱腫瘍の増加があると考えた。また、前腫瘍性病変である移行上皮の過形成の発生が雄の2000 ppm群で増加した。その他、腎臓では雌雄に乳頭壊死、乳頭の鈣質沈着、腎盂上皮の過形成の発生が、鼻腔に嗅上皮のエオジン好性変化の発生が増加し投与によるものと考えられた。なお、雄の甲状腺に濾胞状腺腫の発生増加がみられたが、投与によるものかは明らかではなかった。

ラットにおける2年間の混水投与による*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の無毒性量は、肝臓の塩基性小増殖巣と腎臓の腎盂上皮の過形成の増加が雌で最低濃度の250 ppmでもみられたため、求められなかった。最小毒性量はこれらの所見をエンドポイントとして250 ppm(雌:0.014~0.034 g/kg body weight per day)と考えられた。腎臓の腎盂上皮の過形成の10%ベンチマーク用量は148 ppmとなった。

以上のように、F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いて*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の2年間 (104週間) にわたる混水投与によるがん原性試験を行った結果、雌雄の肝臓で肝細胞腺腫及び肝細胞癌の顕著な発生増加が認められ、さらに、雄の膀胱に移行上皮乳頭腫及び移

行上皮乳頭腫と移行上皮癌を合わせた発生増加が認められた。これらの結果は *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の雌雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠であると結論づけられた。

o-フェニレンジアミン二塩酸塩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	500	1000	2000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	3	2	12*	15**	↑↑	↑↑
	膵臓	膵島腺腫	7	3	1*	1*		↓
	膀胱	移行上皮乳頭腫	1	0	0	6	↑↑	↑↑
	甲状腺	濾胞状腺腫	0	1	0	4	↑↑	↑
	精巣	間細胞腫	37	39	45	43		
	下垂体	腺腫	25	20	10**	13*		↓↓
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌	1	1	6	10**	↑↑	↑↑
	膀胱	移行上皮癌	1	0	0	4	↑↑	↑↑
	甲状腺	濾胞状腺癌	1	0	1	1		
	腹膜	中皮腫	0	3	4	0		
	肝臓	肝細胞腺腫+肝細胞癌	4	3	16**	22**	↑↑	↑↑
	膀胱	移行上皮乳頭腫 +移行上皮癌	2	0	0	10*	↑↑	↑↑
	甲状腺	濾胞状腺腫+濾胞状腺癌	1	1	1	5	↑	↑

o-フェニレンジアミン二塩酸塩のがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雌)

	投与濃度 (ppm)		0	250	500	1000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	1	3	15**	36**	↑↑	↑↑
	膀胱	移行上皮乳頭腫	1	0	1	1		
	下垂体	腺腫	23	9**	14*	11**		↓
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	8	8	9	4		
	乳腺	線維腺腫	5	6	6	1		
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌	0	0	4	18**	↑↑	↑↑
	肝臓	肝細胞腺腫+肝細胞癌	1	3	19**	44**	↑↑	↑↑

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

* : $p \leq 0.05$ で有意

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加

↓ : $p \leq 0.05$ で有意減少

** : $p \leq 0.01$ で有意

↑↑ : $p \leq 0.01$ で有意増加

↓↓ : $p \leq 0.01$ で有意減少

(Fisher 検定)

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

(Cochran-Armitage 検定)

I 試験材料

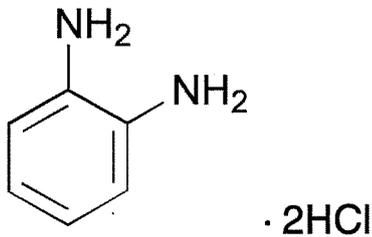
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩
 (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride)
 IUPAC名 : 1,2-フェニレンジアミン二塩酸塩
 (1,2-Phenylenediamine dihydrochloride)
 別 名 : 1,2-ベンゼンジアミン二塩酸塩
 (1,2-Benzenediamine dihydrochloride)
 CAS.No. : 615-28-1

I-1-2 構造式、示性式、分子量(文献 1)

構造式

示性式 : $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2 \cdot 2 \text{HCl}$

分子量 : 181.08

I-1-3 物理化学的性状等(文献 1)

外 観 : 淡紅色結晶性粉末
 融 点 : 258℃
 溶 解 性 : 水に可溶
 保存条件 : 冷蔵で暗所に保存

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : PAG0825
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 グ レ ー ド : 化学用
 純 度 : 99.5%(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、使用した *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩について、マススペクトルを質量分析計(Hitachi M-80B)により測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計(Shimadzu FTIR-8200PC)により測定した。

その結果、被験物質のマススペクトルは、計算値と同一の 2 個の塩酸が解離した擬分子イオンピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値(文献 2)と同じ波数にピークを示し、被験物質は *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩であることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX Q 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性の確認は、使用した *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩について、使用開始前及び使用終了後に、高速液体クロマトグラフ(Hewlett Packard HP1090)を用いてクロマトグラムを測定し、使用開始前と使用終了後のデータを比較することにより行った。

その結果、使用開始前後の測定結果に差はみられず、投与期間中の *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩は安定であることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX Q 2 に示した。

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 番地)の F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。

雌雄各 227 匹を 4 週齢で導入し、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で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(投与開始時体重範囲、雄：109～129g、雌：87～101g)を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)を選択した理由は、遺伝的に安定していること、腫瘍の自然発生率が低いこと、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

経口投与

II-1-2 被験物質の投与方法

被験物質を飲水に溶解し、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。

II-1-3 投与期間

投与期間は104週間とし、定期解剖日の当日まで連続投与した(1998年11月2日～2000年10月31日～11月7日)。

II-1-4 投与濃度

雄は最高投与濃度を2000 ppmに設定し、以下、1000 ppm及び500 ppm(公比2)、雌は最高投与濃度を1000 ppmに設定し、以下、500 ppm及び250 ppm(公比2)とした。なお、対照群として、市水をフィルターろ過し、紫外線照射し、脱イオンし、フィルターろ過した水(以下、脱イオン水という)のみの群を設けた。

II-1-5 投与の方法、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あるため、混水による経口投与とした。

投与期間は、OECDがん原性試験ガイドライン(文献3)に従い、2年間(104週間)とした。

各群の投与濃度は13週間試験(文献4)の結果をもとに設定した。すなわち、13週間試験では6週齢のF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)雌雄に*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を各設定濃度に調製した飲水を13週間自由摂取させた。1群当たりの動物数は雌雄各10匹とし、被験物質投与群を5群、対照群を1群の6群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも3000、2000、1000、500及び250 ppmとした。観察、検査として、一般状態の観察、体重・摂水量・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、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

13 週間試験の結果より、雄では、3000 ppm 群で、体重増加の抑制(抑制率 22%)、摂餌量と摂水量の著しい低下がみられ、被験物質投与による影響として、血液系、腎臓、鼻腔、膀胱及びハーダー腺に変化が認められた。3000 ppm 以上での長期投与は、動物の生死に影響を及ぼすと判断した。2000 ppm 群では、摂水量と摂餌量の低下、体重増加の抑制(14%)がみられたが、比較的軽度であった。また、血液系、腎臓、鼻腔、膀胱及びハーダー腺への影響がみられたものの、被験物質の毒性により、動物の寿命に影響を及ぼす程度の変化ではないと考えられた。従って、雄では 2000 ppm をがん原性試験の最大耐量と考え、以下 1000、500 ppm の 3 段階(公比 2)の濃度を設定した。

雌では、3000 ppm 群で、2 匹の動物が死亡した。また、2000 ppm 群でも著しい摂水量と摂餌量の低下、体重増加の抑制(19%)がみられ、被験物質投与による影響として、血液系、腎臓、鼻腔及びハーダー腺に変化が認められた。2000 ppm 以上での長期投与は、動物の生死に影響を及ぼすと判断した。1000ppm 群では、摂水量と摂餌量の低下、体重増加の抑制(11%)がみられたが、比較的軽度であった。また、臓器重量と血液生化学的検査で軽度の変化がみられたものの、被験物質の毒性により、動物の寿命に影響を及ぼす程度の変化ではないと考えられた。従って、雌では 1000 ppm をがん原性試験の最大耐量と考え、以下 500 ppm、250 ppm の 3 段階(公比 2)の濃度を設定した。

II-1-6 被験物質混合飲水の調製方法

脱イオン水に被験物質を加え、マグネチックスターラ(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、濃度の表示は、ppm(重量対重量比)とした。また、調製頻度は給水瓶の交換頻度に合わせて、毎週 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における被験物質の濃度分析は約 3 ヶ月毎に、各設定濃度毎に調製容器内から 3 点サンプリングし、クロマトグラムを高速液体クロマトグラフ(Hewlett Packard HP1090)を用いて測定し、確認した。

その結果、各群の調製濃度は、設定濃度に対し、94.0~103%の範囲にあり、ほぼ設定濃度どおりに調製された。

その結果を APPENDIX Q 3 に示した。

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における、被験物質の投与状態での安定性は、試験に先立ち最高濃度よりやや高い濃度(3000 ppm)及び最低濃度(250 ppm)について調製時及び調製 8 日目にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ(Hewlett Packard HP1090)を用いて測定し、それぞれの測定結果を比較することにより、確認した。

その結果、調製時の濃度を 100%とした場合に、調製 8 日目には 3000 ppm で 97.3%、250 ppm で 92.0%であった。給水期間中における、飲水中の被験物質の安定性は良好に維持されていた。

その結果について、APPENDIX Q 4 に示した。

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 当たりの一日摂取量(g/kg body weight per day)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、雌雄各群 50 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群名称	使用動物数(動物番号)	群名称	使用動物数(動物番号)
対照群	50 匹(1001~1050)	対照群	50 匹(2001~2050)
500 ppm 群	50 匹(1101~1150)	250 ppm 群	50 匹(2101~2150)
1000 ppm 群	50 匹(1201~1250)	500 ppm 群	50 匹(2201~2250)
2000 ppm 群	50 匹(1301~1350)	1000 ppm 群	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、発育順調で、異常を認めない動物を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(層別体重平均法：適正層別方式)により実施した(文献 5)。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では色素塗布により識別した。

投与期間では耳パンチにより識別した。また、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物は、バリア区域(AC-1 空調エリア)内の独立した室(雄を全飼育期間 101 室、雌を検疫、馴化期間は 103 室、投与期間は 105 室)にそれぞれ収容し、各室に試験番号、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

動物は、飼育期間を通して、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ (実測値 平均 \pm S.D. 101 室 : $23.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 、105 室 : $23.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$)、湿度 $55 \pm 15\%$ (実測値 平均 \pm S.D. 101 室 : $56 \pm 2\%$ 、105 室 : $56 \pm 1\%$)、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/時の環境下で飼育した。動物の健康状態に影響を与えるような大きな環境変化は認められなかった。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連型網ケージ : $170(\text{W}) \times 294(\text{D}) \times 176(\text{H})$ mm)に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。

飼料は、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、定期解剖日前日の夕方からは絶食(18 時間以上)させた。

飲水は、検疫期間中は市水(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、自動給水装置で自由摂取させた。馴化期間中は脱イオン水を給水瓶により自由摂取させた。投与期間中は所定の濃度に調製した被験物質混合飲水を給水瓶により自由摂取させた。また対照群については馴化期間と同様に脱イオン水のみを与えた。なお、給水瓶交換は週 2 回行った。

なお、試験に使用した飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)から分析データを使用ロット毎に入手し、保管した。飼料中の夾雑物については(財)日本食品分析センター(東京都渋谷区元代々木町 52 番 1 号)の分析データを使用ロット毎に入手し、また、飲水については(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)に分析を委託し、それぞれ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、その記録を保存した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の一般状態の観察

全動物について、毎日 1 回生死及び瀕死の確認を行い、一般状態の詳細な観察は毎週 1

回実施した。

II-3-2 体重測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回(但し、104 週にも測定した)、体重を測定した。なお、動物の死亡発見時と切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重を測定した。

II-3-3 摂水量測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回(但し、104 週にも測定した)、給水量と残水量を測定し、その差を給水日数で除した値を 1 日当たりの摂水量とした。

II-3-4 摂餌量測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回(但し、104 週にも測定した)、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除した値を 1 日当たりの摂餌量とした。

II-3-5 血液学的検査

定期解剖時まで生存した採血可能な全動物について、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に採血し、血液学的検査を行った。

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、白血球数、白血球分類

検査方法は APPENDIX R 1 に示した。

II-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存し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、遠心分離して得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。

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、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPK、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

検査方法は APPENDIX R 1 に示した。

II-3-7 尿検査

投与最終週に採尿可能な全動物について新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

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

検査方法は APPENDIX R 1 に示した。

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全動物について、以下に示した臓器の湿重量(臓器実重量)を測定した。また、湿重量の体重比(臓器重量体重比)、すなわち、定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

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

全動物の臓器を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、以下に示した臓器を、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。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、リンパ節、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、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨、その他肉眼的に変化のみられた器官・組織

II-4 数値処理と統計処理

II-4-1 数値の取り扱いと表示

数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

体重については g を単位とし、整数値の 1 の位まで計測し、表示した。

摂水量については、g を単位とし、給水量、残水量を小数点以下第 1 位まで計測し、給水量から残水量を減じて摂水量とした。この値を計測期間の日数で除し、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。

摂餌量については、g を単位とし、給餌量、残餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量から残餌量を減じて摂餌量とした。この値を計測期間の日数で除し、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。

o-フェニレンジアミン二塩酸塩の体重 kg 当りの 1 日摂取量は、摂水量に *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の設定濃度を乗じ、体重で除した値を g/kg body weight per day を単位として小数点以下第 4 位を四捨五入して小数点以下第 3 位まで表示した。

臓器実重量については g を単位とし、小数点以下第 3 位まで計測し、表示した。臓器重量体重比については臓器実重量値を解剖時体重で除し、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、血液生化学的検査については APPENDIX R 2 に示した精度により表示した。

なお、各数値データにおいて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 母数の取り扱い

体重、摂水量及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、その中から欠測となったデータを除外して母数とした。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象とした。麻酔死により欠測となった動物の血液学的検査、血液生化学的検査は除外して母数とした。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

剖検データは、各群の有効動物数(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)を母数とした。病理組織学的検査データは、臓器別に、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

II-4-3 統計処理

体重、摂水量、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として1~4にグレード分けし、 χ^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 χ^2 検定を行った。

なお、予備検定は5%の有意水準で両側検定を行った。最終検定では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。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定(文献 6)、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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

- 0：定期解剖例にみつかった腫瘍
- 1：死亡／瀕死例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／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関わっていた腫瘍

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

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

雌雄とも全投与群の生存率は、対照群とほぼ同様の推移を示した。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、雄では、2000 ppm 群：42 匹(84%)、1000 ppm 群：42 匹(84%)、500 ppm 群：36 匹(72%)、対照群：41 匹(82%)、雌では、1000 ppm 群：41 匹(82%)、500 ppm 群：44 匹(88%)、250 ppm 群：38 匹(76%)、対照群：41 匹(82%)であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を TABLE 7, 8 に示した。

雄では 2000 ppm 群に 56 週より赤色尿がみられ、計 16 匹に認められた。また出血が 85 週より計 4 匹、血尿が 76 週より計 3 匹の動物に認められた。500 ppm 群の外部腫瘍の発生が 22 匹に認められ、対照群に比べて増加した。

雌では対照群と比べて特徴的な所見は認められなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 3, 4 及び APPENDIX B 1, 2 に示した。

雄では、体重の低値が、2000 ppm 群と 1000 ppm 群の全投与期間に、500 ppm 群のほとんどの投与期間に認められた。

雌では、体重の低値が、1000 ppm 群で全投与期間に、500 ppm 群では 9 週までと 74 週目以降に認められた。250 ppm 群では 94 週以降低値傾向がみられた。

なお、最終計測日(104 週)の各投与群の体重は、対照群に対して、雄では 2000 ppm 群：71%、1000 ppm 群：86%、500 ppm 群：93%であり、雌では 1000 ppm 群：81%、500 ppm 群：92%、250 ppm 群：94%であった。

Ⅲ-4 摂水量

摂水量を TABLE 3, 4、FIGURE 5, 6 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

雄の摂水量は、全投与群で投与期間を通して低値を示した。

雌では、1000 ppm 群と 500 ppm 群は投与期間を通して低値で推移した。

全投与期間における各群の平均一日摂水量は、雄では、2000 ppm 群：13.1g(75%)、1000 ppm 群：14.6g(83%)、500 ppm 群：15.8g(90%)、対照群：17.6g(100%)であり、雌では、1000 ppm 群：11.2g(70%)、500 ppm 群：13.5g(85%)、250 ppm 群：15.1g(94%)、対照群：16.0g(100%)であった。

Ⅲ-5 摂餌量

摂餌量を TABLE 5, 6、FIGURE 7, 8 及び APPENDIX D 1, 2 に示した。

雄では、2000 ppm 群で投与期間を通して低値を示し、1000 ppm 群と 500 ppm 群では、投与期間初期と後期に低値を示した。

雌では、1000ppm 群で投与期間を通して低値を示し、500 ppm 群と 250 ppm 群は投与期間を通して対照群とほぼ同様の値で推移した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量は、雄では、2000 ppm 群：14.3g(91%)、1000 ppm 群：15.3g(98%)、500 ppm 群：15.4g(98%)、対照群：15.7g(100%)であり、雌では、1000 ppm 群：10.3g(92%)、500 ppm 群：10.9g(98%)、250 ppm 群：11.2g(100%)、対照群：11.2g(100%)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 APPENDIX E 1, 2 に示した。

全投与期間における 1 日当たりの被験物質摂取量(g/kg body weight per day) は、雄では 2000 ppm 群：0.076~0.182、1000 ppm 群：0.037~0.099、500 ppm 群：0.019~0.055、雌では 1000 ppm 群：0.051~0.110、500 ppm 群：0.026~0.064、250 ppm 群：0.014~0.034 の範囲にあった。

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、雄では 1.7~2.5 の範囲にあり、設定用量比（公比 2）にほぼ対応していた。雌では 26 週まで 1.5~1.6 と低値を示したが、38 週以降は 1.8~2.1 の範囲にあり、設定用量比（公比 2）にほぼ対応していた。

Ⅲ-7 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 9, 10 と APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、MCV の減少が 1000 ppm 群に、MCH の減少が 500 ppm 群と 1000 ppm 群に認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

雌では、ヘモグロビン濃度、MCV、MCH 及び MCHC の減少と血小板数の増加が 1000 ppm 群に認められたが、その程度は軽度であった。

Ⅲ-8 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 11, 12 と APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄では、GOT、GPT の上昇、A/G 比、尿素窒素及びカリウムの増加、総蛋白、総コレステロール、リン脂質及びカルシウムの減少が 2000 ppm 群に、ナトリウムの減少が 1000 ppm 以上の群に認められた。また、カルシウムの減少は 500 ppm 群にも認められた。その他、 γ -GTP の上昇及び CPK の低下が 1000 ppm 群に認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

雌では、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素及びカルシウムの増加と GOT、GPT、ALP 及び γ -GTP の上昇が 1000 ppm 群に認められた。その他、総蛋白の減少が 250 ppm 群に認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-9 尿検査

尿検査の結果を TABLE 13, 14 と APPENDIX H 1, 2 に示した。

雄では、潜血の高い陽性度を示す動物数の増加と、pH の低下を示す動物数の増加が 2000 ppm 群に認められた。

雌では、ケトン体の陽性を示す動物数の増加と、pH の低下を示す動物数の増加が 500 ppm 群と 1000 ppm 群に認められ、潜血を示す動物数の増加と、蛋白の高い陽性度を示す動物数の増加が 1000 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 APPENDIX I 1~6 に示した。

雄では、肝臓の結節の発生が増加した。その発生例数は、対照群で 4 匹、500 ppm 群で 3 匹、1000 ppm 群で 24 匹、2000 ppm 群で 18 匹であった。また、2000 ppm 群で膀胱の結節が 3 匹、甲状腺の腫大が 5 匹に認められた。

雌では、肝臓の結節の発生が投与濃度に対応して増加した。その発生例数は、対照群で 2 匹、250 ppm 群で 2 匹、500 ppm 群で 18 匹、1000 ppm 群で 45 匹であった。

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 15, 16 と APPENDIX J 1, 2、APPENDIX K 1, 2 に示した。

雄では、精巣の実重量の高値が 2000 ppm 群を除く各投与群に、体重比の高値が全投与群で認められた。心臓の実重量の低値が 1000 ppm 以上の群に、体重比の高値が 2000 ppm 群に、脾臓の実重量と体重比の低値が 2000 ppm 群に認められた。なお、副腎、肺、腎臓、肝臓、脳で実重量の低値と、体重比の高値が高濃度群を中心にみられたが、これらの体重比の変化は解剖時体重の低下に起因すると推察された。

雌では、肝臓の実重量と体重比の高値が 1000 ppm 群に認められた。また、副腎の実重量の 1000 ppm 群の平均値は対照群より高値を示したが、これは副腎の褐色細胞腫を持つ動物によるもので、統計学的には低値であった。その他、心臓、肺、脳で実重量の低値と体重比の高値が、卵巣と腎臓での体重比の高値がみられたが、これらの体重比の変化は解剖時体重の低下に起因すると推察された。

Ⅲ-10-3 病理組織学的検査

主な腫瘍性病変と非腫瘍性病変及びそれらの発生数は TABLE 17, 18 に示した。また、非腫瘍性病変の結果を APPENDIX L 1~6 に、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を APPENDIX M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を APPENDIX O 1, 2 に、転移性病変を APPENDIX P 1~6 に示した。

—腫瘍性病変—

日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ(試験毎の発生率(最小%~最大%)と平均発生率(%),発生例数/総数)を雌雄別にそれぞれ TABLE 19 と 20 に示した。本試験でみられた腫瘍について、それぞれの投与濃度における腫瘍発生率をヒストリカルコントロールデータの試験毎の最大発生率と比較した。

<肝臓>

雄では、肝細胞腺腫の発生は、Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 1000 ppm 以上の群に増加を示した。肝細胞腺腫の 2000 ppm 群及び 1000 ppm 群における発生(15 匹及び 12 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を超えた。また、肝細胞癌の発生も Peto 検定(有病率法、有病率法+死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2000 ppm 群に増加を示した。肝細胞癌の 2000 ppm 群及び 1000 ppm 群における発生(10 匹及び 6 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を超えた。肝細胞腺腫と肝細胞癌の 2 種の腫瘍を合わせた発生は、Peto 検定(有病率法、有病率法+死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 1000 ppm 以上の群に増加を示した。

雌では、肝細胞腺腫の発生は、Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾

向を示し、Fisher 検定で 500 ppm 以上の群に増加を示した。肝細胞腺腫の 1000 ppm 群、及び 500 ppm 群における発生 (36 匹及び 15 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を超えた。また、肝細胞癌の発生は Peto 検定(死亡率法、有病率法、有病率法+死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 1000 ppm 群に増加を示した。肝細胞癌の 1000 ppm 群及び 500 ppm 群における発生(18 匹及び 4 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を超えた。肝細胞腺腫と肝細胞癌の 2 種の腫瘍を合わせた発生は、Peto 検定(死亡率法、有病率法、有病率法+死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 500 ppm 以上の群に増加を示した。さらに、雌の 1000 ppm 群に発生した肝細胞癌の 18 匹のうち 5 匹が肺に転移していた。

<膀胱>

雄の移行上皮乳頭腫の発生は、Peto 検定(有病率法、有病率法+死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。移行上皮乳頭腫の 2000 ppm 群における発生(6 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を超えたことから投与による影響と判断した。移行上皮癌の発生は、Peto 検定(死亡率法、有病率法+死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。移行上皮癌の 2000 ppm 群における発生(4 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を超えたことから投与による影響と判断した。移行上皮乳頭腫と移行上皮癌を合わせた発生は、Peto 検定(死亡率法、有病率法、有病率法+死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2000 ppm 群に増加を示した。

<甲状腺>

雄の濾胞状腺腫の発生は Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。濾胞状腺腫の 2000 ppm 群における発生(4 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を超え、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ものの、濾胞状腺癌の発生は対照群に 1 匹、1000 ppm 群と 2000 ppm 各群に 1 匹みられたことから、投与による影響については明らかではなかった。

なお、雄で膵臓の膵島腺腫の発生と下垂体の腺腫の発生は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 1000 ppm 以上の群で減少した。下垂体腺腫は雌でも Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 250 ppm 以上の群で減少した。

—非腫瘍性病変—

<鼻腔>

嗅上皮ののエオジン好性変化の増強を示す動物数が雄の 1000 ppm 以上の群、雌の 250 ppm 以上の群で増加した。

<肝臓>

好塩基性小増殖巣を示す動物数が雄の 500 ppm 以上の群、雌の 250 ppm 以上の群で増加が認められた。明細胞性小増殖巣を示す動物数が雄の 1000 ppm 群で増加が認められた。

<腎臓>

乳頭壊死を示す動物数が雄の 2000 ppm 群、雌の 1000 ppm 群で増加した。乳頭の鉍質沈着を示す動物が雄の 2000 ppm 群と 500 ppm 群、雌の 1000 ppm 群で増加が認められた。腎盂上皮の過形成を示す動物が雄の 2000 ppm 群及び雌の 250 ppm 以上の群での増加が認められた。梗塞を示す動物が雄の 2000 ppm 群で増加が認められた。慢性腎症の程度が雄の 2000 ppm 群と 500 ppm 群で減弱した。

<膀胱>

雄の 2000 ppm 群に移行上皮の結節状過形成を示す動物の増加が認められ、単純過形成を示す動物も増加傾向を示した。

また、鼻腔で鉍質沈着の減少が雄の 2000 ppm 群と雌の 1000 ppm 群に、異物性炎症の減少が雄の 2000 ppm 群で認められた。心臓では心筋線維症の減少が雄の 2000 ppm 群で認められた。肝臓では胆管増生の減少が雌の 1000 ppm 群で認められた。精巣の萎縮が雄の 2000 ppm 群で減少した。

その他、歯の炎症が雄の 1000 ppm 群及び 500 ppm 群で減少し、脾臓の萎縮が雌の 250 ppm 群で増加した。下垂体の嚢胞が雌の 250 ppm 群で増加した。これらの変化は、投与濃度との対応がみられず、被験物質によるものとは考えなかった。

III-10-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 21 に示した。

雄では 2000 ppm 群で膀胱腫瘍による死亡／瀕死動物が 3 匹、雌では肝臓腫瘍による死亡／瀕死動物が 3 匹みられた。

IV 考察及びまとめ

o-フェニレンジアミン二塩酸塩のラットへの2年間混水経口投与(投与濃度:雄 2000、1000、500 ppm、雌 1000、500、250 ppm)によって腫瘍性病変、腫瘍関連病変と非腫瘍性病変およびこれらの病変を反映する諸々の指標の変化が認められた。生存率は、対照群と比べ、変化はみられなかったが、体重と摂水量は、雄の全投与群、雌の500 ppm以上の群で低値を示した。摂餌量は、雄の2000 ppm、雌の1000 ppm群で全投与期間、雄の500 ppm群と1000 ppm群で、投与期間初期及び終期に低値を示した。

IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雄では、肝臓の悪性腫瘍である肝細胞癌と良性腫瘍である肝細胞腺腫、膀胱の悪性腫瘍である移行上皮癌と良性腫瘍である移行上皮乳頭腫及び甲状腺の良性腫瘍である濾胞状腺腫の発生増加が認められた。肝細胞癌は、2000 ppm群で発生数の増加を示し、肝細胞腺腫は、2000 ppm群と1000 ppm群で発生数の増加を示し、いずれも投与用量に依存して増加傾向を示した。また、肝細胞癌及び肝細胞腺腫の2000 ppm群と1000 ppm群における発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。さらに、膀胱の悪性腫瘍である移行上皮癌と良性腫瘍である移行上皮乳頭腫の2000 ppm群における発生率が、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超え、移行上皮癌と移行上皮乳頭腫を合わせた発生数が増加した。また、甲状腺の濾胞状腺腫の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超え、投与用量に依存して増加傾向を示したが、濾胞状腺腫は、増加傾向を示さず、当センターのヒストリカルコントロールの範囲内であった。

雌では、肝細胞癌と肝細胞腺腫の発生増加が認められた。肝細胞癌は1000 ppm群で発生数の増加、肝細胞腺腫は1000 ppm群と500 ppm群で発生数の増加を示し、いずれも投与用量に依存して増加傾向を示した。また、肝細胞癌と肝細胞腺腫の1000 ppm群と500 ppm群における発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。1000 ppm群に発生した肝細胞癌は、18匹中の5匹が肺に転移しており、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩投与により発生した肝細胞癌の悪性度が高いことが示された。

以上のように、雌雄ともにみられた肝臓腫瘍の発生増加は、統計検定結果及びヒストリカルコントロールデータとの比較から、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与により惹起されたと考えられた。また、発生増加のみられた腫瘍は、良性腫瘍に加え、悪性腫瘍の肝細胞癌であり、腫瘍発生数もヒストリカルコントロールデータの範囲より高い値であった。従って、これらの結果は*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の雌雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。また、肝臓腫瘍の発生が観察された濃度は、雄では1000 ppm、雌では500 ppm以上であった。なお、肝臓の前腫瘍性病変である小増殖巣(文献 7)で、好塩基性小増殖巣は、雌雄の全投与群、明細胞性小増殖巣は雄の1000 ppm群で増加を示し

た。

さらに、雄でみられた膀胱腫瘍も、統計検定結果及びヒストリカルコントロールデータとの比較から、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与により惹起されたと考えられた。また、発生増加のみられた腫瘍は、良性腫瘍に加え悪性腫瘍の移行上皮癌であり、腫瘍発生数もヒストリカルコントロールデータの範囲より明らかに高い値であった。従って、これらの結果は*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。膀胱腫瘍の発生が観察された濃度は、雄の 2000 ppm であった。なお、膀胱の前腫瘍性変化である移行上皮の過形成(文献 8)は、雄の 2000 ppm 群で結節状過形成が増加を示した。さらに、雄の 2000 ppm 群では、56 週より赤色尿が認められ、また血尿が 76 週より、出血が 85 週よりみられ、尿検査で潜血の高い陽性度を示す動物がみられた。これらの変化は、膀胱の腫瘍や過形成及び後述する腎臓の乳頭壊死によるものと考えられた。

なお、雄でみられた甲状腺腫瘍は統計検定結果では増加傾向を示したが、悪性腫瘍である濾胞状腺癌は、増加傾向を示さず、当センターのヒストリカルコントロールの範囲内であることから、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与によるものかは明らかではなかった。

IV-2 非腫瘍性病変

鼻腔と腎臓に *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与による影響と考えられる変化がみられた。

鼻腔における嗅上皮のエオジン好性変化の増加あるいは増強(雄の 1000 ppm 以上の群と雌の 250 ppm 以上の群)がみられ、投与濃度に対応しており、投与による影響と考えた。

腎臓への影響として、乳頭壊死(雄の 2000 ppm 群、雌の 1000 ppm 群)の増加、乳頭の鉍質沈着(雄の 2000 ppm 群と 500 ppm 群、雌の 1000 ppm 群)の増加、腎盂上皮の過形成(雄の 2000 ppm 群と雌の全投与群)の増加、梗塞(雄の 2000 ppm 群)の増加が認められ、投与濃度に対応しており、投与による影響と考えた。ラットにおいて加齢性変化として通常みられる、慢性腎症の程度の減弱(雄の 2000 ppm 群と 500 ppm 群)は体重増加の抑制に伴うものと考えた。

IV-3 その他

血液生化学検査では、GOT と GPT の上昇が雌雄の高用量群、ALP と γ -GTP の増加が雌の高用量群で認められ、病理組織学的検査で認められた肝臓への影響と対応した。また尿素窒素の増加が雌雄の高用量群で認められ、病理組織学的検査で認められた腎臓への影響と対応した。

IV-4 無毒性量 (NOAEL)/最小毒性量 (LOAEL)及びベンチマーク用量

ラットにおける2年間の混水投与による*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の無毒性量は、肝臓の好塩基性小増殖巣と腎臓の腎盂上皮の過形成の増加が雌で最低濃度の250 ppmでもみられたため求められなかった。最小毒性量はこれらの所見をエンドポイントとして250 ppm(雌:0.014~0.034 g/kg body weight per day)と考えられた。ベンチマーク用量法は、NOAEL/LOAEL法における若干の問題点を克服する方法として、最近、適用が広がりつつある。腎臓の腎盂上皮の過形成と投与濃度との用量-反応関係にUS.EPA NCEAのBMDLソフトウェア Version 1.3.2(文献9)を適用して、10%ベンチマーク用量(Confidence limit of Benchmark dose yielding the response with 10 % extra risk (BMDL₁₀))を算出した結果、BMDL₁₀値は148 ppm(Logistic Model, P=0.189, AIC=193.1)となった。肝臓の好塩基性小増殖巣では良好な近似が得られるモデルが無く、BMDL₁₀値は求められなかった。

IV-5 他文献との比較等

① 変異原性：

ネズミチフス菌を用いたエームテストではS9添加した場合に変異原性があり(文献10,11,12,13)、さらに、過酸化水素を添加した系では変異原性が軽度に増強する(文献10,11)。ラット肝細胞を用いた不定期DNA合成試験では陽性である(文献14)。小核試験ではマウス、チャイニーズハムスター、モルモットいずれでも陽性を示した(文献15)。

② がん原性：

Weisburgerらは1群25匹の雄のCDラットに*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を4000 ppm、2000 ppmの濃度の混餌で18ヶ月間投与した。その結果肝細胞癌が4000 ppmで5/16匹、2000 ppmで6/18匹発生したとしている。しかし動物数の不足、生存率の問題などにより不十分な試験とされている(文献16)。

③ 日本バイオアッセイ研究センターの*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩のラット2、13週間混水経口投与試験結果

2週間試験では、F344ラット雌雄に*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を混合した飲水を2週間自由摂取(6000、4000、2000、1000及び500 ppm)させた。その結果、雄の6000 ppm群と雌の4000 ppm以上の群で動物の死亡がみられた。肝臓への影響では単細胞壊死が死亡動物と雄の6000 ppm群でみられ、ビリルビンの増加が雌雄の4000 ppm以上の群の生存動物でみられた。腎臓への影響では乳頭壊死が雌の2000 ppm以上の群、雄の4000 ppm以上の群で発生し、尿素窒素の増加が4000 ppm以上の群の生存動物でみられた(文献17)。

13週間試験では、F344ラット雌雄に*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を混合した飲水を13週間自由摂取(3000、2000、1000、500及び250 ppm)させた。その結果雌の3000 ppm群で動物の死亡がみられた。雌雄で腎臓の乳頭変性が、雄で膀胱の移行上皮の単純過形成が

2000 ppm以上の群でみられた。さらに雄では膀胱に結節性過形成が3000 ppmで発生した。しかし、肝臓には病理組織学的変化は認められなかった(文献4)。

④ 日本バイオアッセイ研究センターの *m*-フェニレンジアミン二塩酸塩のがん原性試験結果

F344 ラット雌雄に *m*-フェニレンジアミン二塩酸塩を混合した飲水に、104週間自由摂取(400、160、64 ppm)させた結果、雌の400 ppm群で慢性腎症と鼻腔のエオジン好性変化の程度が増強し、発生数も増加したが、*m*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与による腫瘍性病変は雌雄とも増加しなかった(文献18)。

⑤ *o*-フェニレンジアミンの職業性暴露限界

o-フェニレンジアミン及びその二塩酸塩は、染毛剤、顔料、染料、写真現像剤、農薬や防錆剤の中間体として使用されている。1999年の日本産業衛生学会の許容濃度等の勧告では、*o*-フェニレンジアミンで問題とすべき有害性は、肝腫瘍の発症と感作性であるとして、1997年に提案した *p*-フェニレンジアミンの許容濃度(文献19)を参考に、0.1 mg/m³、皮膚感作性物質第1群の暫定値が提案された(文献20)。ACGIHはTLV-TWA 0.1 mg/m³、発がん性の分類はA3(Confirmed animal carcinogen with unknown relevance to humans)と勧告している(文献21)。ドイツでは、*o*-フェニレンジアミンは感作性物質、催腫瘍性(Category 3B)に分類され、MAK値は提案されていない(文献22)。

V 結論

F344 ラットを用いて *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を 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、雌雄の肝臓で肝細胞腺腫と肝細胞癌の顕著な発生増加が認められ、さらに、雄の膀胱に移行上皮乳頭腫及び移行上皮乳頭腫と移行上皮癌を合わせた発生増加が認められた。これらの結果は *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の雌雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠であると結論づけられた。また、前腫瘍性病変として、肝臓では雌雄に好塩基性小増殖巣の増加が、膀胱では雄に移行上皮の過形成の増加が認められた。なお、雄の甲状腺に濾胞状腺腫の発生増加がみられたが、投与によるものかについては明らかではなかった。その他、腎臓では雌雄に乳頭壊死、乳頭の鉍質沈着、腎盂上皮の過形成の発生が、鼻腔で嗅上皮のエオジン好性変化の発生が増加した。

VI 文献

1. ChemFinder. Cambridge, MA: CambridgeSoft Corporation. Available: <http://chemfinder.cambridgesoft.com>[accessed 19 January 2004]
2. 和光純薬工業(株).1997. *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩、赤外吸収スペクトル.
3. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451 "Carcinogenicity Studies". Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
4. 日本バイオアッセイ研究センター. 2003. *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩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.
5. 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.
6. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance test 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.
7. Bannasch P, Zerban H. 1994. Preneoplastic and neoplastic lesions of the rat liver. In: Pathology of Neoplasia and Preneoplasia in Rodents (Bannasch P, Gössner W, eds). Stuttgart: Schattauer, 18-63.
8. 福島昭治. 2000. 膀胱/尿管/尿道. : 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, 265-282.
9. U.S. EPA. 2001. Help Manual for Benchmark Dose Software Version 1.3 . Washington DC: U.S.EPA Office of Research and Development.
10. Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E. 1975. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. Proc Natl Acad Sci 72:2423-2427.

11. Venitt S, Seale CE. 1976. Mutagenicity and possible carcinogenicity of hair colourants and constituents. In: Environmental Pollution and Carcinogenic Risks. IARC Scientific Publications No13. Lyon : IARC, 263-272.
12. Garner RC, Nutman CA. 1977. Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 1538. *Mutat Res* 44:9-19.
13. Gentile JM, Gentile GL, Plewa MJ. 1987. Mutagenicity of selected aniline derivatives to *Salmonella* following plant activation and mammalian hepatic activation. *Mutat Res* 188:185-196.
14. Thompson CZ, Hill LE, Epp SM, Probst GS. 1983. The induction of bacterial mutation and hepatocyte unscheduled DNA synthesis by monosubstituted anilines. *Environ Mutagen* 5:803-811.
15. Wild D, King MT, Eckhardt K. 1980. Cytogenetic effect of ortho-phenyldiamine in the mouse, Chinese hamster, and guinea pig and of derivatives, evaluated by the micronucleus test. *Arch Toxicol* 43:249-255.
16. Weisburger EK, Russfield AB, Homburger F, Weisburger JH, Boger E, Dongen CG et al. 1978. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J Environ Pathol Toxicol* 2:325-356.
17. 日本バイオアッセイ研究センター. 2003. *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩のラットを用いた経口投与による 2 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.
18. 日本バイオアッセイ研究センター. 1988. メタフェニレンジアミン二塩酸塩のラット及びマウスを用いた経口によるがん原性試験結果報告書. 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.
19. 日本産業衛生学会. 1997. 許容濃度の暫定値(1997)の提案理由. *産業衛生学雑誌*. 39:155-157.

20. 日本産業衛生学会. 1999. 許容濃度の暫定値(1999)の提案理由. 産業衛生学雑誌. 41:138-140.
21. ACGIH. 2003. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Cincinnati,OH:American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
22. Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. 1999. *o*-Phenylendiamine. In:Occupational Toxicants. Critical Data Evaluation for MAK Values and Classification of Carcinogens (Greim H. ed). Vol 13. Weinheim:VCH Verlag. Deutsche Forschungsgemeinschaft, 215-235.