

p-ニトロアニソールのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0402

CAS No. 100-17-4

2004年3月31日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

標 題

p-ニトロアニソール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

p-ニトロアニソールをマウスに 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

厚生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 番地

p-ニトロアニソールのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0402

本 文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	3
I-1 被験物質の性状等	
I-1-1 名称等	3
I-1-2 構造式、分子式、分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質の使用ロット等	3
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	4
I-3-1 特性・同一性	4
I-3-2 安定性	4
I-4 試験動物	4
II 試験方法	5
II-1 投与	5
II-1-1 投与経路	5
II-1-2 被験物質の投与方法	5
II-1-3 投与期間	5
II-1-4 投与濃度	5
II-1-5 投与の方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法	6
II-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	6
II-1-8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性	7
II-1-9 被験物質の摂取量	7

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	8
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	9
Ⅱ-3-3	摂餌量測定	9
Ⅱ-3-4	血液学的検査	10
Ⅱ-3-5	血液生化学的検査	10
Ⅱ-3-6	尿検査	10
Ⅱ-3-7	病理学的検査	10
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	11
Ⅱ-4-3	統計処理	12
Ⅲ	試験成績	13
Ⅲ-1	生死状況	13
Ⅲ-2	一般状態	13
Ⅲ-3	体重	13
Ⅲ-4	摂餌量	14
Ⅲ-5	被験物質摂取量	14
Ⅲ-6	血液学的検査	15
Ⅲ-7	血液生化学的検査	15
Ⅲ-8	尿検査	15
Ⅲ-9	病理学的検査	16
Ⅲ-9-1	剖検	16
Ⅲ-9-2	臓器重量	16
Ⅲ-9-3	病理組織学的検査	16
Ⅲ-9-4	死因	20

IV 考察及びまとめ	21
IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変	22
IV-2 その他の影響	23
IV-4 他文献との比較等	24
V 結論	24
VI 文献	25

要約

p-ニトロアニソールのがん原性を検索する目的で Crj:BDF₁ 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、*p*-ニトロアニソール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 5000、10000 及び 20000 ppm (公比 2) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重、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、雄の 10000 ppm 群と 20000 ppm 群及び雌の 20000 ppm 群では肝腫瘍による死亡により対照群と比べて低下した。一般状態の観察では、雌雄ともに投与群の全ての動物に黄色尿が認められた。雄の 20000 ppm 群では対照群に比較して多くの動物に内部腫瘍が観察され、雌にも投与濃度に対応して内部腫瘍の増加がみられた。体重は、雌雄ともに、投与濃度に対応した低値を示した。血液学的検査では、雄の赤血球数やヘモグロビン濃度が減少し、貧血を示した。血液生化学的検査では、雌雄ともに GOT、GPT、LDH、 γ -GTP が上昇した。臓器重量測定では、雌雄ともに肝臓の重量が増加した。

病理組織学的検査では、腫瘍性病変として、雄に肝芽腫及び肝細胞癌、雌に肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫の発生増加が認められた。雄では、肝芽腫は全投与群、肝細胞癌は 20000 ppm 群、雌では、肝芽腫は 10000 ppm 以上の群、肝細胞癌は全投与群、肝細胞腺腫は 5000 ppm 群と 10000 ppm 群で発生増加が認められた。また、肝臓の好酸性小増殖巣が雌雄ともわずかに増加し、肝細胞の小葉中心性の肥大が雌雄、小葉中心性の核異型が雄にみられた。その他、雌雄の肺と鼻腔、雌の鼻咽頭にも *p*-ニトロアニソールの投与の影響と思われる病変が増加した。また、脾臓と腎臓にはヘモジデリンの沈着の変化がみられた。

Crj:BDF₁ マウスを用いて *p*-ニトロアニソールの 2 年間(104 週間)にわたる混餌投与によるがん原性試験を行った結果より以下の結論を得た。雌雄のマウスには肝芽腫及び肝細胞癌の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールのがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。雌マウスには良性腫瘍である肝細胞腺腫の発生増加も認められた。

p-ニトロアニソール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	5000	10000	20000	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	6	2	1	1		↓
	脾臓	血管腫	4	1	0	0		↓
	肝臓	肝細胞腺腫	12	17	18	3*		↓
		血管腫	7	2	1*	0**		↓↓
	ハーダー腺	腺腫	3	2	3	2		
悪性腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	3	1	2	1		
	リンパ節	悪性リンパ腫	8	13	6	3		↓
	脾臓	肥満細胞腫	0	0	6*	0		
	肝臓	肝細胞癌	16	11	14	39**	↑↑	↑↑
		肝芽腫	1	12**	18**	38**	↑↑	↑↑
	精巣上体	組織球性肉腫	3	1	1 ^{a)}	1		
	肝臓	肝細胞腺腫/肝細胞癌/ 肝芽腫	22	27	33*	43**	↑↑	↑↑

p-ニトロアニソール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	5000	10000	20000	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	2	2	3	1		
	肝臓	肝細胞腺腫	5	18**	13*	4		
		血管腫	3	1	0	0		↓
	下垂体	腺腫	3 ^{a)}	7	5	0		
	子宮	内膜間質性ポリープ	5	1	0*	0*		↓↓
	ハーダー腺	腺腫	3	1	2	3		
悪性腫瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	16	16	14	3**		↓↓
	脾臓	悪性リンパ腫	7	7	4	1*		↓
	肝臓	肝細胞癌	2	12**	41**	46**	↑↑	↑↑
		肝芽腫	0	0	8**	38**	↑↑	↑↑
		組織球性肉腫	1	0	0	3	↑	
	子宮	組織球性肉腫	15	16	15	12		
	肝臓	肝細胞腺腫/肝細胞癌/ 肝芽腫	7	24**	45**	48**	↑↑	↑↑

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

** : $p \leq 0.01$ 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)

a): 検査動物数 49、他は上段に表示の検査動物数と同じ

I 試験材料

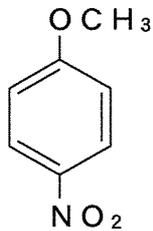
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : *p*-ニトロアニソール (*p*-Nitroanisole)
IUPAC名 : 1-メトキシ-4-ニトロベンゼン (1-Methoxy-4-nitrobenzene)
CAS.No. : 100-17-4

I-1-2 構造式、分子式、分子量 (文献 1)

構造式 :



分子式 : $C_7H_7NO_3$

分子量 : 153.14

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1、2)

外 観 : 結晶
沸 点 : 274℃
融 点 : 54℃
溶 解 性 : 水に不溶、エタノール、エーテルに可溶
保存条件 : 室温で暗所に保存

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : KSJ0005
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
純 度 : 99.6% (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 *p*-ニトロアニソールについて、マススペクトルを質量分析計(Hewlett Packard 5989B)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(株式会社島津製作所 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が確認された。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を示し、被験物質は *p*-ニトロアニソールであることを確認した。

また、試験に使用した *p*-ニトロアニソール中には、不純物として *m*-クロロニトロベンゼンが確認された。*p*-ニトロアニソール中の不純物含有量は 0.28%であった。

それらの結果については、APPENDIX P 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 *p*-ニトロアニソールについて、使用開始前及び使用終了後に、ガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)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、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、投与期間中の *p*-ニトロアニソールは安定であった。

それらの結果については、APPENDIX P 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 Crj:BDF₁ マウス(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：21.3~25.1g、雌：17.4~20.7g)を選別し、試験に供した。

なお、Cj:BDF₁ マウス(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。

II-1-3 投与期間

投与期間は104週間とし、定期解剖日の前日まで連続投与した(1999年12月2日~2001年11月29、12月2~5日)。なお、被験物質混合飼料の交換は7日毎に実施した。

II-1-4 投与濃度

雌雄ともに最高投与濃度を20000 ppmに設定し、以下、10000 ppm及び5000 ppm(公比2)とした。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

II-1-5 投与の方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は常温で固体であり、かつ、水に難溶であるため、混餌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5)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6)の結果をもとに設定した。

試験にはCrj:BDF₁マウスを用いた。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匹のマウスを用いた。被験物質の投与は、*p*-ニトロアニソールを混合調製した粉末飼料を動物に13週間自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも2500、5000、10000及び20000 ppmの4段階(公比2)の濃度に、30000 ppmを加えた5段階の濃度を設定した。観察、検査として、一般状態の観察、体重、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。

13 週間試験の結果、動物の死亡が雌雄の 30000 ppm、体重の低下または増加の抑制が 10000 ppm 以上の雄、血液学的検査結果として貧血が 20000 ppm 以上の雄と 10000 ppm 以上の雌に認められた。貧血に伴う病理組織学的所見として、脾臓の髓外造血が 20000 ppm 以上の雌雄にみられた。また、肝臓には、肝細胞の中心性の肥大が 10000 ppm 以上の雄と 20000 ppm 以上の雌に認められた。腎障害が疑われる所見として尿 pH の低下が 20000 ppm 以上の雄、血液生化学的検査で尿素窒素の増加が 10000 ppm 以上の雌雄、血中電解質の濃度の変化が 20000 ppm 以上の雌雄に認められた。これらを考慮してがん原性試験の投与濃度を決定した。

雌雄の 30000 ppm 群では、死亡がみられ、がん原性試験の長期間の投与には、不相当と考えられた。20000 ppm 群においては雌では投与終了時における体重増加の抑制は認められず、雄では投与終了時における体重増加の抑制が認められたものの対照群の 87%であり、体重を指標としてがん原性試験の最高投与濃度を決定すると雌雄ともに 20000 ppm が適当と思われた。また、20000 ppm 群で認められた各種検査結果には重篤な所見は認められず、毒性により動物の寿命が短縮されないと考えた。したがって、雌雄のがん原性試験の投与濃度は最高投与濃度を 20000 ppm とし、以下 10000、5000 ppm の 3 段階（公比 2）を設定した。

II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

あらかじめ、粉碎機（IKA LABOTECHNIC 製 IKA 20M）で粉碎した被験物質と粉末飼料（オリエンタル酵母工業(株)製 CRF-1）を、粉末飼料混合機（関東混合機工業(株)製、スパイラルミキサーSS-251）を用いて混合し、20000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この混合飼料をさらに粉末飼料と混合することによって、各設定濃度の被験物質混合飼料を調製した。なお、被験物質混合飼料の調製は試験期間中 5 週間を越えない間隔で行い、調製した被験物質混合飼料は、各濃度毎に 1 週間分ずつ小分けにして使用時まで冷蔵で保管した。なお、各試験における濃度の表示は、ppm（重量対重量比）とした。

II-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における被験物質の濃度は、初回調製時及び 3 ヶ月毎に、各投与濃度に調製された混合容器内の被験物質混合飼料を 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 1090）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濃度につき 7 点とし、均一性の確認を行った。

その結果、各群の平均調製濃度は設定濃度に対し、94.7～105%の範囲にあった。また、均一性に関しては、各濃度群内の濃度のばらつきも少なく良好であった。

その結果を濃度については APPENDIX P 3、均一性については APPENDIX P 5 に示した。

II-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について、室温で8日間または冷蔵(7℃)で5週間の安定性を確認した。すなわち、試験開始に先立って実施した13週間試験(文献6)において被験物質混合飼料(40000 ppm 及び 300 ppm)を調製し、室温(動物飼育室)で8日間、7℃で5週間(冷蔵室)それぞれ保管し、被験物質混合飼料調製時の被験物質濃度と各保管期間後の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ(Hewlett Packard 1090)による分析を実施し、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、調製時を100%とした場合、調製後8日目の室温(動物飼育室)では40000 ppm : 93.1%、300 ppm : 84.1%、5週間の冷蔵保管では40000 ppm : 97.3%、300 ppm : 96.8%であり、室温(動物飼育室)及び冷蔵保管の被験物質混合飼料中の被験物質はほぼ安定であった。

その結果を APPENDIX P 4 に示した。

II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂餌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)
5000 ppm	50 匹 (1101~1150)	5000 ppm	50 匹 (2101~2150)
10000 ppm	50 匹 (1201~1250)	10000 ppm	50 匹 (2201~2250)
20000 ppm	50 匹 (1301~1350)	20000 ppm	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 7)。

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、動物は検疫期間を含む全飼育期間、バリア区域 (AC-2 空調エリア) 内の独立した室 (雄：202 室、雌：204 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. 202 室： $23.2 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、204 室： $22.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 15\%$ (実測値 平均 \pm S.D. 202 室： $56 \pm 2\%$ 、204 室： $55 \pm 2\%$)、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：112(W)×212(D)×120(H) mm)に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。

飼料は、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- γ 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 CRF-1 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、全飼育期間を通して市水 (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。

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 3 ヶ月毎に分析を委託し、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)、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)、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-3-4 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 Q 1 に示した。

II-3-5 血液生化学的検査

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、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 Q 1 に示した。

II-3-6 尿検査

投与 103 週まで生存した動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（ウロラブ スティックス、バイエル社製）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

II-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、光学顕微鏡にて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、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、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、小数点以下第 1 位まで計測し、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 日当たりの平均摂取量を算出し、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。

p-ニトロアニソールの体重 kg 当りの 1 日摂取量は、摂餌量に *p*-ニトロアニソールの設定濃度を乗じ、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 Q 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、欠測となったデータを除外して母数とした。

尿検査は、投与 103 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。なお、母数が死亡等により 2 以下になった場合は検定の対象から除外した。

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等を基準として 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 8）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また、Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス（注）を用いて、死亡率法（コンテックス 3、4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0、1、2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法＋有病率法（コンテックス 0~4 の総計で検定）を行った。

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 及び FIGURE 1、2 に示した。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、雄では、対照群：36 匹(72%)、5000 ppm 群：35 匹(70%)、10000 ppm 群：27 匹(54%)、20000 ppm 群：16 匹(32%)、雌では、対照群：23 匹(46%)、5000 ppm 群：27 匹(54%)、10000 ppm 群：30 匹(60%)、20000 ppm 群：13 匹(26%)であった。対照群に比べて、雄の 10000 ppm と 20000 ppm の両群および雌の 20000 ppm 群に生存率の低下が認められた。

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、内部腫瘍の発生动物数を TABLE 5、6 に示した。

雄では、投与群の全ての動物に黄色尿が認められた。また、内部腫瘍の増加が 20000 ppm 群でみられた。発生数は、対照群で 22 匹、5000 ppm 群で 20 匹、10000 ppm 群で 17 匹、20000 ppm 群で 39 匹であった。

雌では、投与群の全ての動物に黄色尿が認められた。また、投与濃度に対応して内部腫瘍の増加がみられた。発生数は、対照群で 18 匹、5000 ppm 群で 24 匹、10000 ppm 群で 34 匹、20000 ppm 群で 49 匹であった。

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。

雄の 20000 ppm 群では、全投与期間にわたって体重値の低値がみられた。投与初期（13 週まで）は対照群と比較して 10%程度の体重増加の抑制がみられ、それ以降は 10~45%程度の低値を示した。10000 ppm 群でもほぼ全投与期間にわたって体重値の低値がみられ、投与初期は対照群と比較して 10%前後の体重増加の抑制がみられ、その後、10~30%程度の低値を示した。5000 ppm 群では、投与期間を通して対照群と比較して大きな差はなかった。

雌の 20000 ppm 群では、投与 1 週目に体重値の低値がみられ、13 週目までは対照群と同様な体重の推移を示したが、それ以降は対照群と比較して 10~30%程度の体重増加の抑制がみられた。10000 ppm でも 18 週目以降は対照群と比較して 10~25%程度の体重増加の

抑制がみられた。5000 ppm 群では投与期間を通して 10%前後の体重の低値が散見された。

なお、最終計測時(104 週)の各投与群の体重は、対照群に対して、雄では 5000 ppm 群 : 97%、10000 ppm 群 : 75%、20000 ppm 群 : 60%であり、雌では 5000 ppm 群 : 90%、10000 ppm 群 : 77%、20000 ppm 群 : 70%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 3、4 と FIGURE 5、6 及び APPENDIX C 1、2 に示した。

雄では、摂餌量の低値が投与開始 1 週目に全ての投与群にみられた。

雌では、20000 ppm 群で投与 1 週目に摂餌量の低値がみられ、その後、対照群と比較して 10%前後の低値が、投与 10 週目までみられた。10000 ppm 群と 5000 ppm 群では投与開始から 14 週目までの間に対照群と比較して、5%前後の低値が散見された。

また、雌雄ともに投与後半の投与群に摂餌量の高値がみられたが、ほぼ同じ時期の動物の体重値は減少または、抑制傾向にあるため、これらの高値は食べこぼした餌が相当量含まれると思われた。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量は、雄では対照群 : 4.4g(100%)、5000 ppm 群 : 4.5g(102%)、10000 ppm 群 : 4.3g(98%)、20000 ppm 群 : 4.5g(102%)であり、雌では、対照群 : 4.2g(100%)、5000 ppm 群 : 4.2g(100%)、10000 ppm 群 : 4.3g(102%)、20000 ppm 群 : 4.1g(98%)であった。

Ⅲ-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 APPENDIX D 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 5000 ppm 群 : 0.484~0.836 (平均 : 0.599)、10000 ppm 群 : 1.143~1.680 (平均 : 1.328)、20000 ppm 群 : 2.827~4.830 (平均 : 3.314)、雌では 5000 ppm 群 : 0.638~0.877 (平均 : 0.745)、10000 ppm 群 : 1.492~1.940 (平均 : 1.663)、20000 ppm 群 : 2.979~4.746 (平均 : 3.496) 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間の被験物質摂取量の比は、2.1~2.5 倍であり、設定用量比(公比 2)に対応していた。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 7、8 と APPENDIX E 1、2 に示した。

雄では 20000 ppm 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び MCHC が減少し、貧血が示唆された。一方、MCV と MCH は 10000 ppm 群で増加した。その他、好酸球比が 20000 ppm 群で減少した。

雌では、20000 ppm 群で MCH と MCHC の減少、血小板数及び杆状核好中球比と分葉核好中球比の増加がそれぞれ認められた。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 9、10 と APPENDIX F 1、2 に示した。

雄では、尿素窒素は全ての投与群で増加し、ALP の上昇は 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で認められた。総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質及びカルシウムの増加、GOT、GPT、LDH、 γ -GTP 及び CPK の上昇が 20000 ppm 群で認められた。グルコースとクロールの増加は 10000 ppm 群のみで認められた。

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、LDH、ALP 及び γ -GTP の上昇が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で認められた。総蛋白、アルブミン及び総ビリルビンの増加と CPK の上昇、クロールの減少が 20000 ppm 群で認められた。

Ⅲ-8 尿検査

尿検査の結果を TABLE 11、12 と APPENDIX G 1、2 に示した。

雄では、蛋白の陽性度の減少が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で認められ、pH の低下が 20000 ppm 群で認められた。

雌では、pH の低下が 20000 ppm 群で認められた。

Ⅲ-9 病理学的検査

Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX H 1~6 に示した。

雄では、肝臓の結節が 20000 ppm 群で増加した。その発生数は、対照群で 34 匹、5000 ppm 群で 33 匹、10000 ppm 群で 35 匹、20000 ppm 群で 43 匹であった。

雌では、肝臓の結節が投与濃度に対応して増加した。発生数は、対照群で 12 匹、5000 ppm 群で 26 匹、10000 ppm 群で 42 匹、20000 ppm 群で 48 匹であった。

Ⅲ-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 13、14、APPENDIX I 1、2 及び APPENDIX J 1、2 に示した。

雄では、肝臓の実重量の高値が 5000 ppm 群と 20000 ppm 群で認められた。肝臓の体重比は 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で高値であった。10000 ppm 群と 20000 ppm 群の他の臓器では、実重量の値は低値、体重比の値は高値を示す傾向が認められたが、これらは定期解剖時の投与群の体重値が対照群と比較して低値であったことに起因するものと思われた。

雌では、肝臓の実重量と体重比の高値が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で認められた。肺の実重量の高値が 5000 ppm 群で認められ、体重比の値はすべての投与群で高値であった。腎臓の実重量は 20000 ppm 群では低値を示したが、5000 ppm 群と 10000 ppm 群では増加傾向を示しており、体重比はすべての投与群で高値であった。他の臓器では、実重量の値は低値、体重比の値は高値を示す傾向が認められたが、これらは定期解剖時の投与群の体重値が対照群と比較して低値であったことに起因するものと思われた。

Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

主な腫瘍性病変及びそれらの発生数を TABLE 15、16 に示した。また、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を APPENDIX L 1、2 に、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX M 1、2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を APPENDIX N 1、2 に、転移性病変を APPENDIX O 1~6 に示した。非腫瘍病変の結果を TABLE 17、18 と APPENDIX K 1~6 に示した。さらに、観察された所見の代表例を PHOTOGRAPH 1~15 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 20 と 21 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。

—雄—

<肝臓>

肝芽腫の発生（対照群：2%、5000 ppm 群：24%、10000 ppm 群：36%、20000 ppm 群：76%）は、Peto 検定（有病率法、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、Fisher 検定で全ての投与群に増加がみられた。肝芽腫のそれぞれの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上回った。また、肝芽腫は他臓器への転移がみられ、投与群で肝芽腫を持つ動物計 68 匹のうち 13 匹に肺（12 匹）や腹膜（1 匹）への転移がみられた。肝芽腫は、細胞質が極めて乏しい小型の腫瘍細胞が密に増殖していた。ヘマトキシリン・エオジン染色標本では好塩基性であり、周囲の組織とは明瞭に区画された病巣として認められた。腫瘍の内部には大きな液胞の形成や、大小の血液腔の形成がみられた。

肝細胞癌の発生（対照群：32%、5000 ppm 群：22%、10000 ppm 群：28%、20000 ppm 群：78%）は、Peto 検定（有病率法、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、Fisher 検定で 20000 ppm 群に増加がみられた。肝細胞癌の 20000 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上回った。また、肝細胞癌は他臓器への転移がみられ、投与群で肝細胞癌を持つ動物計 64 匹のうち 2 匹には肺への転移がみられた。なお、対照群では肝細胞癌を持つ 16 匹のうち 2 匹に肺への転移がみられた。

肝細胞腺腫の発生（対照群：24%、5000 ppm 群：34%、10000 ppm 群：36%、20000 ppm 群：6%）は、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 20000 ppm 群に減少がみられた。

また、肝細胞癌と肝細胞腺腫、肝細胞癌と肝芽腫、肝細胞癌と肝芽腫及び肝細胞腺腫を合わせた発生数は、Peto 検定（有病率法、死亡率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定でいずれの組み合わせでも増加傾向を示した。Fisher 検定においては、20000 ppm 群ではいずれの組み合わせでも増加がみられ、10000 ppm 群では肝細胞癌と肝芽腫、肝細胞癌、肝芽腫及び肝細胞腺腫を合わせた場合に増加がみられた。

<脾臓>

肥満細胞腫（悪性）の発生が 10000 ppm 群においてのみ発生し(12%)、Fisher 検定で増加を示した。10000 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

一タの範囲を上回った。この腫瘍は、全例が肝臓に転移していたほか、胃、腎臓、下垂体及び副腎にも転移した例がみられた。肥満細胞腫は、肥満細胞すなわち好塩基性の顆粒を細胞質内に充満した細胞が広汎に増殖した病変であり、主に赤脾髄内での増殖が多くみられた。

<その他>

雄では、肝臓と脾臓における血管腫または血管肉腫の発生、細気管支の肺胞上皮腺腫または肺胞上皮癌の発生、リンパ節の悪性リンパ腫の発生が減少または減少傾向を示した。

—雌—

<肝臓>

肝芽腫は、10000 ppm 群と 20000 ppm 群で発生（10000 ppm 群：16%、20000 ppm 群：76%）がみられ、Peto 検定（有病率法、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、それぞれの投与群に Fisher 検定で増加がみられた。肝芽腫のそれぞれの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上回った。また、肝芽腫は他臓器への転移がみられ、投与群で肝芽腫を持つ動物計 46 匹のうち 9 匹に肺（2 匹）や腹膜（2 匹）、脾臓（2 匹）、卵巣（2 匹）、リンパ節（1 匹）、膵臓（1 匹）への転移がみられた。

肝細胞癌の発生（対照群：4%、5000 ppm 群：24%、10000 ppm 群：82%、20000 ppm 群：92%）は、Peto 検定（有病率法、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、Fisher 検定で全ての投与群に増加がみられた。肝細胞癌のそれぞれの投与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上回った。また、投与群で肝細胞癌を持つ動物計 99 匹のうち 1 匹に肺への転移がみられた。なお、対照群の肝細胞癌 2 匹には転移がみられなかった。

肝細胞腺腫の発生（対照群：10%、5000 ppm 群：36%、10000 ppm 群：26%、20000 ppm 群：8%）は、5000 ppm 群と 10000 ppm 群に Fisher 検定で増加がみられ、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上回った。

また、肝細胞癌と肝細胞腺腫、肝細胞癌と肝芽腫、肝細胞癌、肝芽腫及び肝細胞腺腫を合わせた発生数は、Peto 検定（有病率法、死亡率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定でいずれの組み合わせでも増加傾向を示した。また、Fisher 検定においては、全ての投与群のいずれの組み合わせにおいても増加がみられた。

<その他>

雌では、肝臓の血管腫の発生、脾臓とリンパ節の悪性リンパ腫の発生、子宮内膜間質性ポリープの発生が減少または減少傾向を示した。

また、肝臓の組織球性肉腫の発生（対照群：2%、5000 ppm 群、10000 ppm 群：0%、20000 ppm 群：6%）は、Peto 検定（有病率法、有病率法+死亡率法）で増加傾向を示し、20000 ppm 群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若干上回った。しかし、全臓器で発生した組織球性肉腫の合計について統計検定を実施した結果、Peto 検定、

Cochran-Armitage 及び Fisher 検定のいずれの手法においても有意差はみられなかった。

－非腫瘍性病変－

<肝臓>

雄では、肝細胞の肥大（小葉中心性）の発生増加が全ての投与群でみられた。核異型（小葉中心性）の発生増加が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群でみられた。また、好酸性小増殖巣が対照群に比べ 20000 ppm 群で多く発生した。

雌では、肝細胞の肥大（小葉中心性）の発生増加が 20000 ppm 群でみられた。また、好酸性小増殖巣の発生が投与濃度に対応して増加した。

その他、雄では肉芽形成の発生減少が 20000 ppm 群でみられた。

<肺>

雌雄ともに、細気管支－肺胞上皮過形成の発生増加が全ての投与群でみられた。この変化は細気管支型の細気管支－肺胞上皮細胞の増生であり、クララ細胞を主とした上皮の増生が、細気管支の終末部を中心とした領域にみられた。

<鼻腔>

雄では、呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群でみられ、嗅上皮の萎縮の発生増加が 10000 ppm 群でみられた。

雌では、嗅上皮のエオジン好性変化の発生増加が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群でみられ、呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加が全ての投与群でみられた。また、鼻腺の呼吸上皮化生の発生増加が 20000 ppm 群でみられた。

<鼻咽頭>

雌では、呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加が 20000 ppm 群でみられた。

<骨髄>

雄では、赤血球造血の亢進が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で増加した。

雌では、赤血球造血の亢進が 20000 ppm 群で増加した。

<脾臓>

雄では、ヘモジデリン沈着が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で増加し、髄外造血の亢進が 20000 ppm 群で増加した。

雌では、ヘモジデリン沈着が全ての投与群で増加し、髄外造血の亢進が 20000 ppm 群で増加した。

<腎臓>

雄では、近位尿細管上皮のヘモジデリン沈着の増加が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群でみられた。また、好塩基性変化が 20000 ppm 群で減少した。

雌では、近位尿細管上皮のヘモジデリン沈着の増加が 20000 ppm 群でみられた。

<心臓>

雌では、鉍質沈着の増加が 20000 ppm 群でみられた。

<その他>

精巢の鉍質沈着が雄の 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で減少し、副腎の紡錘形細胞増生が雌の 20000 ppm 群で減少した。なお、雄の歯に異形成の発生数と程度に変化がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-9-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 19 に示した。

雄では、20000 ppm 群の死亡／瀕死動物 34 匹のうち、26 匹（76％）の死因が肝臓の腫瘍であり、1 匹は肝細胞癌によるもので残りは全て肝芽腫によるものであった。10000 ppm 群の死亡／瀕死動物 23 匹のうち、10 匹（43％）の死因が肝臓の腫瘍であり、2 匹は肝細胞癌と血管腫によるもので、残りは肝芽腫によるものであった。5000 ppm 群の死因は死亡／瀕死動物 15 匹のうち、7 匹（47％）が肝臓の腫瘍であり、肝臓の腫瘍が死因となった動物のうち、3 匹は肝芽腫、2 匹は肝細胞癌で、血管腫と肥満細胞腫によるものが各 1 匹ずつであった。

雌では、20000 ppm 群の死亡／瀕死動物はすべて腫瘍性病変で死亡しており、37 匹のうち、31 匹（84％）の死因が肝臓の腫瘍であり、29 匹が肝芽腫によるもので、残りは肝細胞癌と組織球性肉腫によるものであった。また、10000 ppm 群では肝芽腫による死亡が 2 匹みられた。

なお、雌雄共に腫瘍性病変以外の死因に差は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

p-ニトロアニソールのマウスを用いた2年間の混餌経口投与(投与濃度:5000 ppm、10000 ppm、20000 ppm)によって腫瘍性病変、腫瘍関連病変と非腫瘍性病変及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。雌雄とも肝臓腫瘍、特に肝芽腫により投与群の多くの動物が死亡し、雄の10000 ppmと20000 ppm群及び雌の20000 ppm群に生存率の低下が認められた。

投与終了時の体重は、対照群と比べて、5000 ppm群で雄:97%、雌:90%、10000 ppm群で雄:75%、雌:77%、20000 ppm群で雄:60%、雌:70%であり、雄は10000 ppm群と20000 ppm群で、雌では全ての投与群で低値を示した。摂餌量は、投与初期に雌の投与群で低値がみられたが、対照群と比較して大きな差ではなかった。

一般状態観察で、雌雄ともに内部腫瘍の増加がみられたが、これは肝臓の腫瘍が増加したことによると思われた。また、雌雄の投与群の全動物には黄色尿がみられた。

OECD 発がん性試験ガイドライン(文献5)によれば、がん原性試験における最高投与濃度は、腫瘍以外の影響により正常な寿命の長さを変えないで、最小の毒性兆候を誘発させる濃度であり、血清酵素濃度を変化させるかまたは僅少な体重抑制(対照群と比較して10%以下の抑制)を引き起こす濃度であると定義される。IARC(文献9)は、最高投与濃度を新生物形成の結果以外で動物の寿命の長さを短縮させず、また、対照群と比較して10%以下の体重抑制を引き起こす毒性兆候を惹起させる濃度と定義したが、同時に、体重減少率を10%以下とする勧告は経験的なものであり、結果として超過した場合でも試験を無効にするものではないとも述べている。米国国立がん研究所(NCI)小動物発がん性試験ガイドライン(文献10)では、小動物を用いるがん原性試験の最高投与濃度は、対照群と比較して10%以下の体重減少を引き起こす濃度で、かつ新生物反応に関係する反応以外に、毒性的兆候、病理学的傷害による死亡率の上昇を引き起こさない最高濃度、即ち、最大耐量(Maximum Tolerated Dose (MTD))を最高投与濃度として用いると定義した。本がん原性試験の投与濃度は、II-1-5項に示したように、20000 ppmを最高濃度として設定し、その最高濃度はがん原性試験におけるMTDであると推定した。根拠としては、30000 ppmでは13週間経口投与した雌雄マウスに死亡がみられたこと、および20000 ppm群では、死亡は認められず、体重の減少が対照群の87%(雄)と100%(雌)、諸検査で重篤な症状を呈した動物はみられなかったことから、20000 ppmがMTDであると推定し、雌雄マウスへの最高投与濃度とした。本がん原性試験における10000 ppm以上の群の体重は、対照群に比べて、雌雄ともに、投与期間の後半から10%以上の減少を示し、雄の10000 ppm群と20000 ppm群及び雌の20000 ppm群に生存率の低下が認められた。しかしながら、投与群の生存率の低下は肝臓腫瘍による死亡が増えたためであり、腫瘍以外の死因の増加はなかった。また、体重減少率についても、投与濃度の選択の根拠となる13週目の体重減少率は雄の10000 ppm群と20000 ppm群では10%と13%、雌の10000 ppm群と20000 ppm群では3%と4%であり、

10%以下か、わずかに越える程度であった。IARC（文献 9）の最高投与濃度に関する勧告では、“体重減少率を 10%以下とする勧告は経験的なものであり、結果として超過した場合でも試験を無効にするものではない”と述べており、本試験の結果も最高投与濃度である 20000 ppm 群を含めてがん原性の評価に有効であると判断した。

被験物質として使用した *p*-ニトロアニソールには 0.28%の *m*-クロロニトロベンゼンが不純物として認められた。*m*-クロロニトロベンゼンの動物を用いた癌原性試験の報告はなく（文献 11）、また、変異原性については陰性の報告しかない（文献 11）。本試験での動物の摂取濃度は最高投与濃度の 20000 ppm で 56 ppm 程度であり、不純物として混在した *m*-ニトロクロロベンゼンが試験成績に影響を及ぼしたとは考えられなかった。

IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変

<肝臓>

雄では肝芽腫がすべての投与群で増加し、肝芽腫の発生率はすべての投与群で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上回った。また、肝細胞癌は 20000 ppm 群で増加し、この群の肝細胞癌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上回った。従って、雄の肝芽腫と肝細胞癌の発生増加は被験物質の投与による影響であると考えた。

雌では肝芽腫が 10000 ppm 群と 20000 ppm 群で発生し、これらの群の肝芽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上回った。また、肝細胞癌はすべての投与群で増加し、肝細胞癌の発生率はすべての投与群で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上回った。肝細胞腺腫の発生は、5000 ppm 群と 10000 ppm で増加し、これらの群の肝細胞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上回った。従って、雌の肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫の発生増加は被験物質の投与による影響であると考えた。

肝芽腫と肝細胞癌は悪性に分類される腫瘍であり（文献 12）、他臓器への転移もしばしばみられた。また、肝芽腫は自然発生が稀な腫瘍である。従って、これらの腫瘍の発生増加は *p*-ニトロアニソールの雌雄のマウス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、本試験では、肝臓腫瘍の前腫瘍性病変（文献 12）であるとされる好酸性小増殖巣が雌雄とも僅かに増加した。さらに、雄では、小葉中心性の肝細胞の肥大が雄の全投与群と雌の 20000 ppm 群、小葉中心性の肝細胞の核異型が雄の 10000 ppm 以上の群にみられた。なお、血液生化学的検査で、雌雄ともに GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP が上昇したが、これらは、上記の肝臓腫瘍に起因する肝傷害に関連したものと考えられた。

<脾臓>

悪性肥満細胞腫が雄の 10000 ppm 群でのみ増加し、そ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上回った。また、他の臓器においてもこの腫瘍は 5000 ppm 群の雄の肝臓で 1 匹みられたのみであった。肥満細胞腫は悪性に分類される腫瘍（文献 13）で他臓器への転移が全ての動物にみられた。悪性肥満細胞腫の発生は稀であるが、悪性肥満細胞腫の発生は用量に対応した増加を示さなかったことより、悪性肥満細胞腫の発生は *p*-ニトロアニソールの投与によるものとは断定できなかった。

以上より、雌雄のマウスに悪性腫瘍である肝芽腫及び肝細胞癌の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールのがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。また、雌マウスには良性腫瘍である肝細胞腺腫の発生増加も認められた。なお、雄の 10000 ppm 群では、悪性肥満細胞腫が増加したが、*p*-ニトロアニソールのがん原性を示す証拠とは断定できなかった。

IV-2 その他の影響

腫瘍性病変以外にも *p*-ニトロアニソールの投与の影響と考えられる所見が肺、鼻腔、鼻咽頭及び血液系にみられた。

肺には、細気管支-肺胞上皮過形成が雌雄ともすべての投与群で増加した。この所見は細気管支-肺胞上皮腺腫または細気管支-肺胞上皮癌の前腫瘍性病変として出現することがある（文献 14）が、本試験では肺腫瘍の発生増加が認められないことから、この所見は肺腫瘍の前腫瘍性病変ではなく *p*-ニトロアニソールの肺に対する慢性毒性の 1 つと考えられた。

鼻腔には、雄に呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加が 10000 ppm 以上の群、嗅上皮の萎縮の発生増加が 10000 ppm 群でみられた。雌では、呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加が全ての投与群、嗅上皮のエオジン好性変化の発生増加が 10000 ppm 以上の群、鼻腺の呼吸上皮化生の発生増加が 20000 ppm 群でみられた。また、鼻咽頭にも呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加が雌の 20000 ppm 群でみられた。これらの所見は、*p*-ニトロアニソールの投与が鼻腔などの上部気道に影響を与えることを示唆する変化であると考えた。

血液学的検査では、雄の 20000 ppm 群にヘモグロビン濃度、赤血球数及びヘマトクリット値の減少が認められ、貧血を示したが、雌では貧血の指標となるパラメーターに大きな変化は認められなかった。一方、雌雄とも、脾臓及び腎臓に崩壊した赤血球によるものと思われるヘモジデリンの沈着、また、赤血球の崩壊に対応した変化と思われる髄外造血が脾臓にみられた。赤血球崩壊の要因は、本試験の予備試験である 13 週間試験でも同様の結果を得ていることから、*p*-ニトロアニソールまたはその代謝物が直接赤血球に作用したものと考えられた。

IV-3 他文献との比較等

- ① 変異原性：日本バイオアッセイ研究センターの試験結果によれば、*p*-ニトロアニソールの変異原性は、ネズミチフス菌 (TA100) の代謝活性化による場合とよらない場合にいずれでも復帰変異コロニー数の上昇がみられ、陽性であった (文献 15)。またチャイニーズハムスター株細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験では、*p*-ニトロアニソールは、代謝活性化による場合に、染色体構造異常が誘発された (文献 16)。
- ② 代謝：*p*-ニトロアニソールは *p*450 により、*p*-ニトロフェノールとホルムアルデヒドに代謝される (文献 17)。また、*p*-ニトロフェノールは *p*-アミノフェノール及び *p*-ニトロカテコールに代謝され、*p*-ニトロフェノール、*p*-アミノフェノール及び *p*-ニトロカテコールはそれぞれグルクロン酸抱合または硫酸抱合を受けて体外に排出される (文献 18)。
- ③ 代謝物のがん原性：*p*-ニトロフェノールのがん原性試験は塗布試験において実施されているが、陰性 (文献 19) であった。また、ホルムアルデヒドのがん原性試験では吸入試験において鼻腔扁平上皮癌の発生が報告された (文献 20) が、経口 (飲水) 試験ではがん原性は報告されていない (文献 21)。
- ④ *o*-ニトロアニソール発がん性との比較：ニトロ基の位置が異なる *o*-ニトロアニソールのマウスを用いたがん原性試験 (投与期間:2 年、投与濃度:0、666、2000、6000 ppm) では (文献 22、23)、2000 と 6000 ppm 混餌投与した雄マウスに肝細胞腺腫と癌および肝芽腫の発生率の増加および前腫瘍性病変である好塩基性、好酸性、明細胞性小増殖巣の発生率の増加が報告されている。*o*-ニトロアニソールの発がん性と *p*-ニトロアニソールの発がん性は、肝細胞癌や、肝芽腫、好酸性小増殖巣の発現という点で類似したパターンを示すことが判明した。

V 結論

Crj:BDF₁ マウスを用いて *p*-ニトロアニソールの 2 年間 (104 週間) にわたる混餌投与によるがん原性試験を行った結果より以下の結論を得た。雌雄のマウスに肝芽腫及び肝細胞癌の発生増加が認められ、*p*-ニトロアニソールのがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。雌マウスには良性腫瘍である肝細胞腺腫の発生増加も認められた。

VI 文献

1. 化学工業日報社. 2003. 14303 の化学商品. 東京：化学工業日報社, 717-718.
2. 化学大事典. 1989. 東京：東京化学同人, 1681.
3. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : Jone Wiley and Sons.
4. 和光純薬工業(株). 1999. *p*-ニトロアニソール, 赤外吸収スペクトル.
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451 : "Carcinogenicity studies", Paris : Organization for Economic Co-operation and Development.
6. 日本バイオアッセイ研究センター. 2000. *p*-ニトロアニソール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.
7. 阿部 正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14 : 7285 - 7302.
8. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S et al. 1980. Guideline 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, Monographs, Suppl. 2 : 311 - 426.
9. Griesemer RA, Venitt S. 1986. Long-term and Short-term Assay for Carcinogens : A Critical Appraisal. Lyon : IARC. IARC Scientific Publications No. 83 : 34 - 35.
10. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U. 1976. Guidelines for Carcinogene Bioassay in Small Rodents. NCI-CG-TR-1. DHHS Publication (NIH) 76 - 801. National Cancer Institute. Bethesda, 13 - 15.
11. IARC. 1996. 2-Chloronitrobenzene, 3-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon : IARC, Monographs, 65 : 311 - 426.

12. Deschl U, Cattley RC, Harada T, Küttler K, Hailey JR, Hartig F, et al. 2001. Liver, gallbladder, and exocrine pancreas. In: International Classification of Rodent Tumors, The Mouse (Mohr U. ed). International Agency for Research on Cancer, Berlin : Springer-Verlag, 59 - 86
13. Frith CH, Ward JM, Harleman JH, Stromberg, Harm S, Inoue T, et al. 2001. Hematopoietic system. In: International Classification of Rodent Tumors, The Mouse (Mohr U. ed). International Agency for Research on Cancer, Berlin : Springer-Verlag, 417 - 451.
14. Dungworth DL, Rittinghausen S, Schwartz L, Harkema JR, Hayashi Y, Kittel B, et al. 2001. Respiratory system and mesothelium. In: International Classification of Rodent Tumors, The Mouse (Mohr U. ed). International Agency for Research on Cancer, Berlin : Springer-Verlag, 87 - 137.
15. 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課. 1996. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集. 東京 : 日本化学物質安全・情報センター.
16. 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課. 1997. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集 補遺版. 東京 : 日本化学物質安全・情報センター.
17. 山本 郁夫. 1995. 薬物代謝学辞典 東京 : 廣川書店.
18. Abu-Qare AW, Brownie CF, Abou-Donia MB. 2000. Placental transfer and pharmacokinetics of a single oral dose of [¹⁴C]*p*-nitrophenol in rats. Arch Toxicol 74 : 388 - 396.
19. NTP. 1993. Toxicology and Carcinogenesis Studies of *p*-Nitrophenol (CAS No. 100-02-7) in Swiss-Webster Mice. (Dermal Studies). Technical report 417. Research Triangle Park, NC : National Toxicology Program.
20. Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. 1983. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. Cancer Res 43 : 4382 - 4392.

21. Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VHM, Falke HE. 1989. Two-year drinking-water study of formaldehyde in rats. *Fd Chem Toxic* 27 : 77 - 87
22. NTP. 1993. Toxicology and Carcinogenesis Studies of *o*-Nitroanisole (CAS No. 91-23-6) in F344 Rats and B6C3F₁ Mice (Feed Studies). Technical report 416. Research Triangle Park, NC : National Toxicology Program.
23. Irwin RD, Chhabra R, Eustis S, Pinter A, Prejean JD. 1996. Tumors of the bladder, kidney, and intestine of F344 rats and liver of B6C3F₁ mice administered *o*-nitroanisole in feed. *Fundam Appl Toxicol* 30, 1 - 12.