

2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いた
経口投与による13週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0549

CAS No. 95-85-2

2006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

2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いた経口投与による 13 週間毒性試験(混餌試験)

試験目的

2-アミノ-4-クロロフェノールの経口投与によるがん原性試験の投与濃度決定試験として、2-アミノ-4-クロロフェノールをラットに 13 週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 408（げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験 1998 年 9 月 21 日採択）を参考にして実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

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 山本 静護
神奈川県秦野市平沢 2445

2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いた
経口投与による 13 週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0549

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

Ⅲ-9 病理学的検査	15
Ⅲ-9-1 剖検	15
Ⅲ-9-2 臓器重量	15
Ⅲ-9-3 病理組織学的検査	16
Ⅳ 考察及びまとめ	18
(1) 用量-反応関係	18
(2) 無毒性量 (NOAEL)	19
(3) がん原性試験の濃度決定	19
Ⅴ 文献	21

要約

2-アミノ-4-クロロフェノール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、2-アミノ-4-クロロフェノールを F344/DuCr1Cr1j (旧 F344/DuCrj) ラットに 13 週間経口 (混餌) 投与して、その生体影響を検索した。

本試験は、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群の構成で、雌雄各群とも 10 匹とし、合計 120 匹を用いた。被験物質の投与は、2-アミノ-4-クロロフェノ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 512、1280、3200、8000 及び 20000 ppm (公比 2.5) 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。

13 週間試験の結果、すべての投与群に死亡はみられなかったが、体重、摂餌量 (雄のみ)、血液、胃及び膀胱に投与の影響が認められた。

体重増加の抑制が、雄の 8000 ppm 以上の群と雌の 20000 ppm 群で認められた。これらの群の最終体重は、対照群に比べ、雄の 8000 ppm 群で 95%、20000 ppm 群で 86%であり、雌の 20000 ppm 群で 93%であった。

摂餌量の低値が雄 20000 ppm 群で全投与期間にわたり認められた。

血液への影響として、雌雄の 8000 ppm 以上の群でメトヘモグロビン濃度の増加が認められた。脾臓には、赤血球の処理機能が亢進したものと考えられる赤血球充満が雌の 3200 ppm 以上の群と雄の 8000 ppm 以上の群で認められ、ヘモジデリン沈着が雌雄の 3200 ppm 以上の群で認められた。また、崩壊した赤血球に由来すると思われる血漿中の総ビリルビン及び尿中のビリルビンの増加が雌雄の 20000 ppm 群で認められた。雌雄の 20000 ppm 群では貧血を示す血液学的検査項目、すなわち、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少が認められ、貧血に対する反応性変化と考えられる血小板数及び網赤血球比の増加が認められた。これらの貧血に関連した血液学的検査項目の幾つかの変化は、雌雄とも 1280 ppm 以上の群で認められた。また、貧血の代償性変化である脾臓の髄外造血が雌雄とも 3200 ppm 以上の群で認められた。なお、脾臓重量の増加が雌雄とも 8000 ppm 以上の群、腎臓重量の増加が雄の 3200 ppm 以上の群と雌の 20000 ppm 群、肝臓重量の増加が雄の 3200 ppm 以上の群と雌の 8000 ppm 以上の群にみられた。

前胃には、重度の扁平上皮の過形成が雌雄 20000 ppm 群のすべての動物で認められ、少数ではあるが、雌雄に潰瘍、雌に糜爛も認められた。雌雄 8000 ppm 群でもすべての動物に前胃の扁平上皮過形成が認められたが、その程度は中等度であった。

膀胱には、20000 ppm 群に移行上皮細胞の腫脹が雌雄にみられ、雄では過形成も認められた。

以上の結果から、2-アミノ-4-クロロフェノールのラットに対する 13 週間の経口 (混餌) 投与による無毒性量 (NOAEL) は、血液への影響をエンドポイントとして 512 ppm (雄 : 29 mg / kg body weight per day、雌 : 33 mg / kg body weight per day) であると考えた。

また、経口（混餌）投与による 2 年間のがん原性試験の最大耐量を雌雄とも 8000 ppm と推定し、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 8000 ppm を最高投与濃度とし、以下 3200 及び 1280 ppm(公比 2.5)の 3 段階の濃度を設定した。

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

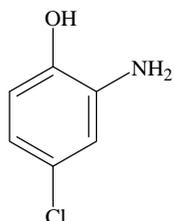
I-1-1 名称等

名 称： 2-アミノ-4-クロロフェノール (2-Amino-4-chlorophenol)

CAS No. : 95-85-2

I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 143.57

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 灰色または茶色の結晶性粉末

比 重 : 0.88

融 点 : 137°C

溶 解 性 : アルコールに易溶、水に難溶 (3g/L 25°C)

保 管 条 件 : 冷暗所

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : CEQ 0194

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

純 度 : 100.6% (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、マススペクトルを質量分析計 (Hewlett Packard 5989B) 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 (Shimadzu 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 2) 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 3) と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 2-アミノ-4-クロロフェノールであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX A 1 に示した。

I-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ガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) 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ることを確認した。

それらの結果は APPENDIX A 2 に示した。

I-4 試験動物

動物は、2-アミノ-4-クロロフェノールのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー(株) (厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795) の F344/DuCrjCrj (旧 F344/DuCrj) ラット (SPF) の雌雄を使用した。なお、がん原性試験で使用する動物は、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理由から、F344/DuCrjCrj ラットと決定している。

ラット雌雄各 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 (投与開始時体重範囲、雄：116～130g、雌：94～105g) を選別し、試験に用いた。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

投与経路は経口投与とした。

II-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3日または4日毎に実施した。

II-1-3 投与期間

投与期間は13週間とし、定期解剖日前日まで連続投与した。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、512、1280、3200、8000及び20000 ppmの5段階（公比2.5）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。

II-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、水に難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13週間とした。

各群の投与濃度は2週間の予備試験（試験番号0482）の結果（文献4）をもとに設定した。試験にはF344/DuCrIjラット(SPF)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5匹とし、合計60匹のラットを用いた。被験物質の投与は、2-アミノ-4-クロロフェノールを混合調製した粉末飼料を動物に2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1280、3200、8000、20000及び50000 ppmの5段階（公比2.5）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、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

2週間試験の結果、50000 ppm群では雄1匹が死亡した。雌雄ともに体重と摂餌量の低

値が 50000 ppm 群（対照群比、体重：雄 59%，雌：69%、摂餌量：雄 55～62%，雌：72～80%）と 20000 ppm 群（対照群比、体重：雄 84%，雌：90%、摂餌量：雄 83～86%，雌：86～89%）でみられ、特に 50000 ppm 群では顕著であった。血液学的検査では、雌雄共に 50000 ppm と 20000 ppm 群でメトヘモグロビン濃度の上昇がみられ、赤血球数とヘモグロビン濃度は 8000 ppm 以上の雌雄の群で減少し、貧血が認められた。病理組織学的検査では、全身性の消耗性変化として胸腺の萎縮が雌雄の 50000 ppm 群でみられ、雌雄の 8000 ppm 以上の群で、メトヘモグロビンの増加に伴う影響と考えられる脾臓の赤血球充満、貧血を補うための機能亢進として髄外造血がみられた。雌雄とも前胃上皮の過形成が 3200 ppm 以上の群で、潰瘍が 20000 ppm と 50000 ppm 群でみられた。なお、メトヘモグロビン濃度の上昇、赤血球数とヘモグロビン濃度の減少に用量依存性がみられ、胸腺の萎縮、脾臓の赤血球充満と髄外造血、前胃上皮の過形成と潰瘍発生率と程度にも用量依存性が認められた。

以上の結果より、2-アミノ-4-クロロフェノールの 13 週間試験の最高投与濃度は、大幅な体重増加の抑制及び消耗性変化が認められず、動物の生存に影響を与えないと考えられる 20000 ppm とし、以下、8000、3200、1280 及び 512 ppm（公比 2.5）の合計 5 段階の濃度を設定した。

II-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）で攪拌混合し、各設定濃度の被験物質混合飼料を調製した。また、被験物質混合飼料の調製は 2 週間に 1 回行い、調製した被験物質混合飼料は使用時まで冷蔵で保管した。なお、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及び均一性は、初回調製時に各投与濃度毎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、クロマトグラムを高速液体クロマトグラフ（Shimadzu 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 97.3～105%の範囲にあった。均一性は、各群ともばらつきが少なかった。従って、被験物質混合飼料中の被験物質は、設定濃度に対してほぼ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 A 3、均一性については APPENDIX A 4 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の安定性は、投与開始前に最低投与濃度の 512 ppm と最高投与濃度の 20000 ppm の被験物質混合飼料を調製し、ラット用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管（5 日間）したものと、ビニール袋に密閉し 2 週間冷蔵保管したものについて、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（Shimadzu LC-10）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、室温保管（5 日間）では、512 ppm : 90.3%、20000 ppm : 98.5%、2 週間の冷蔵保管で 512 ppm : 98.6%、20000 ppm : 97.5%であり、給餌期間中における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 A 5 に示した。

II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂餌量（餌こぼし量で補正）及び設定濃度より被験物質の体重 kg 当たりの 1 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 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）
512 ppm 群	10 匹（1101～1110）	10 匹（2101～2110）
1280 ppm 群	10 匹（1201～1210）	10 匹（2201～2210）
3200 ppm 群	10 匹（1301～1310）	10 匹（2301～2310）
8000 ppm 群	10 匹（1401～1410）	10 匹（2401～2410）
20000 ppm 群	10 匹（1501～1510）	10 匹（2501～2510）

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、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった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（適正層別方式）により実施した（文献 5）。

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 205 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。

II-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

動物は、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 : $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < $22.7 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ >

湿度 : $55 \pm 15\%$ < $56 \pm 2\%$ >

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

ケージへの動物の收容方法 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

ステンレス製 2 連網ケージ (170(W)×294(D)×176(H) mm/匹)

(2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)（千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港 8-2）の CRF-1（30KGy- 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の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、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 52-1）の分析データを使用ロットごとに入手し、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) 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。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-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。

II-3-2 体重測定

体重測定は毎週 1 回行った。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。

II-3-3 摂餌量測定

摂餌量は毎週 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。

II-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）に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX M に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、※メトヘモグロビン濃度、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、白血球数、白血球分類

II-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 M に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

II-3-6 尿検査

投与 13 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（マルティステック、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、ビリルビン、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、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、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、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、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

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

体重は g を単位とし、整数値の 1 の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量、残餌量及び餌こぼし量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値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、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、小数点以下第 3 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 M に示した単位と精度により表示した。

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。

II-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、 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。

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。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE 1, 2 に示した。

—雌雄—

動物の死亡はみられなかった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX B 1, 2 に示した。

—雄—

被毛の着色が 20000 ppm 群で投与開始 2~3 週目にすべての動物にみられ、4 週目には 2 匹に減少したが、その後再び増加し、最終計測日には 6 匹の動物にみられた。

—雌—

被毛の着色が 20000 ppm 群で投与開始 1 週目から最終計測日まで 2~7 匹、8000 ppm 群で 4 週目から最終計測日まで 2 匹、3200 ppm 群で 2 週目から最終計測日まで 2 匹の動物にみられた。尿による外陰部周囲の汚染が 8000 ppm 群で投与開始 2 週目から最終計測日まで 1~3 匹の動物にみられた。

Ⅲ-3 体重

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

—雄—

体重増加の抑制が 8000 ppm 以上の群でみられた。20000 ppm 群では全投与期間にわたり、対照群と比較して 14~18%の体重の低値がみられ、8000 ppm 群では、投与 3 週以降に 5~9%の低値がみられた。他の群では対照群との間に大きな差はみられなかった。

なお、最終計測日における各群の体重は、対照群に対して、512 ppm 群：98%、1280 ppm 群：101%、3200 ppm 群：101%、8000 ppm 群：95%、20000 ppm 群：86%であった。

—雌—

20000 ppm 群で体重増加の抑制がみられ、全投与期間にわたり、対照群と比較して 7~10%の体重の低値がみられた。他の群では対照群との間に大きな差はみられなかった。最終計測日における各群の体重は、対照群に対して、512 ppm 群：102%、1280 ppm 群：101%、3200 ppm 群：99%、8000 ppm 群：96%、20000 ppm 群：93%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 3, 4、FIGURE 3, 4 及び APPENDIX D 1, 2 に示した。

—雄—

20000 ppm 群で全投与期間にわたり、対照群と比較して 7~18%の摂餌量の低値がみられた。他の群では 8000 ppm 群で投与 5 週目に摂餌量の低値がみられたのみで、対照群との間に大きな差はみられなかった。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：14.2 g（100%）、512 ppm 群：13.9 g（98%）、1280 ppm 群：14.1 g（99%）、3200 ppm 群：14.3 g（101%）、8000 ppm 群：13.6 g（96%）、20000 ppm 群：12.7 g（90%）であった。

—雌—

20000 ppm 群で投与 5 週に摂餌量の低値がみられた。

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：9.7 g（100%）、512 ppm 群：9.7 g（100%）、1280 ppm 群：9.7 g（100%）、3200 ppm 群：9.5 g（98%）、8000 ppm 群：9.2 g（95%）、20000 ppm 群：9.0 g（93%）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 E 1, 2 に示した。

—雄—

各投与群の 1 日当たりの被験物質摂取量（g/kg body weight per day）は、512 ppm 群：0.022~0.044（平均：0.029）、1280 ppm 群：0.054~0.113（平均：0.072）、3200 ppm 群：0.142~0.284（平均：0.184）、8000 ppm 群：0.348~0.694（平均：0.460）、20000 ppm 群：0.925~1.681（平均：1.188）の範囲にあった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、設定用量比（公比 2.5）にほぼ対応した値を示した。

—雌—

各投与群の 1 日当たりの被験物質摂取量（g/kg body weight per day）は、512 ppm 群：0.026~0.044（平均：0.033）、1280 ppm 群：0.069~0.107（平均：0.083）、3200 ppm 群：0.165~0.280（平均：0.205）、8000 ppm 群：0.424~0.674（平均：0.513）、20000 ppm 群：1.111~1.807（平均：1.316）の範囲にあった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、設定用量比（公比 2.5）にほぼ対応した値を示した。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 5, 6 と APPENDIX F 1, 2 に示した。

—雄—

網赤血球比が 1280 ppm 以上の群で増加した。また、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び MCHC の減少並びに MCV と血小板数の増加が 3200 ppm 以上の群で認められた。MCH とメトヘモグロビン濃度が 8000 ppm 以上の群で増加した。

—雌—

赤血球数の減少と MCV の増加が 1280 ppm 以上の群で認められた。また、ヘモグロビン濃度と MCHC の減少及び MCH と網赤血球比の増加が 3200 ppm 以上の群で認められた。ヘマトクリット値の減少及び血小板数とメトヘモグロビン濃度の増加が 8000 ppm 以上の群で認められた。但し、8000 ppm 群のメトヘモグロビン濃度は増加しているものの統計学的な差は認められなかった。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 7, 8 と APPENDIX G 1, 2 に示した。

—雄—

20000 ppm 群で総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質及びカリウムの増加と γ -GTP の上昇、ALT と CK の低下がみられた。

—雌—

総コレステロールの増加と γ -GTP の上昇が 8000 ppm 以上の群でみられた。また、総ビリルビン、グルコース及びリン脂質が 20000 ppm 群で増加した。ALT の低下は 3200 ppm 以上の群でみられた。但し、20000 ppm 群の ALT 値には統計学的な差は認められなかった。その他、A/G 比に変化がみられたが、用量に対応した変化ではなく、かつ、僅かな変化であった。

Ⅲ-8 尿検査

尿検査の結果を TABLE 9, 10 と APPENDIX H 1, 2 に示した。

—雄—

蛋白及びケトン体の陽性度が 3200 ppm 以上の群で減少した。但し、8000 ppm 群におけるケトン体の陽性度の減少には統計学的な差は認められなかった。ビリルビンの陽性例の増加と pH の低下が 20000 ppm 群でみられた。

—雌—

20000 ppm 群でケトン体の陽性度が減少し、ビリルビンの陽性例が増加した。また、20000 ppm 群を除く投与群で pH が上昇した。

Ⅲ-9 病理学的検査

Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX I 1,2 に示した。

—雄—

20000 ppm 群の全動物に脾臓の腫大と前胃の肥厚がみられ、1 匹の動物に前胃の潰瘍がみられた。前胃の肥厚は 8000 ppm 群でも 1 匹の動物にみられた。

—雌—

20000 ppm 群の全動物に脾臓の腫大と前胃の肥厚がみられ、2 匹の動物に前胃の潰瘍がみられた。

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 11, 12 と APPENDIX J 1, 2、APPENDIX K 1, 2 に示した。

—雄—

脾臓の実重量と体重比の増加が 8000 ppm 以上の群でみられた。腎臓の実重量の増加が 3200 ppm と 8000 ppm 群で、体重比の増加が 3200 ppm 以上の群でみられた。肝臓の体重比の増加が 3200 ppm 以上の群でみられた。その他、胸腺、副腎、精巣、心臓、肺及び脳の実重量または体重比の値に対照群と比較して差がみられたが、これらは体重増加の抑制に伴う変化と考えられた。

—雌—

脾臓の実重量と体重比の増加が 8000 ppm 以上の群でみられた。腎臓の体重比の増加が 20000 ppm 群でみられた。肝臓の実重量の増加が 20000 ppm 群、体重比の増加が 8000 ppm 以上の群でみられた。その他、副腎、卵巣及び心臓の実重量または体重比の値に対照群と比較して差がみられたが、これらは体重増加の抑制に伴う変化と考えられた。

Ⅲ-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 13, 14 と APPENDIX L 1, 2 に示した。

—雄—

[20000 ppm 群]

脾臓、胃（前胃）、肝臓、腎臓及び膀胱に変化が認められた。

脾臓、肝臓及び腎臓には軽度のヘモジデリンの沈着がすべての動物に認められた。さらに、脾臓には軽度の髄外造血と中等度の赤血球充満もすべての動物に認められた。ヘモジデリンの沈着は赤血球の崩壊を示し、髄外造血は脾臓での造血の亢進、赤血球充満は赤脾髄に血液がうっ滞した状態を示す所見である。

前胃には過形成（扁平上皮の細胞の多層化）がすべての動物に認められ、その程度は重度であった。この内の 1 匹には中等度の潰瘍が認められた。

膀胱には移行上皮の過形成（中等度：5 匹、軽度：4 匹）及び腫脹（中等度：6 匹、軽度：3 匹）が認められた。さらに、移行上皮の扁平上皮化生（軽度：1 匹）が認められた。移行上皮の腫脹は上皮の細胞質の膨化を示し、扁平上皮化生は移行上皮が扁平上皮に置き換わった状態を示す所見である。

[8000 ppm 群]

脾臓、胃（前胃）及び腎臓に変化が認められた。

脾臓には軽度のヘモジデリンの沈着、髄外造血及び赤血球充満がすべての動物に認められた。

前胃には扁平上皮の過形成（中等度：7 匹、軽度：3 匹）が認められた。

腎臓にはヘモジデリンの沈着（軽度：7 匹）が認められた。

[3200 ppm 群]

脾臓に軽度のヘモジデリンの沈着、髄外造血及び赤血球充満がすべての動物に認められた。

[1280、512 ppm 群]

被験物質の影響と思われる所見は、認められなかった。

—雌—

[20000 ppm 群]

脾臓、胃（前胃）、肝臓、腎臓及び膀胱に変化が認められた。

脾臓には軽度のヘモジデリンの沈着と髄外造血及び中等度の赤血球充満が、すべての動物に認められた。

前胃には重度の過形成がすべての動物に認められ、この内の 4 匹には潰瘍または糜爛が認められた。

肝臓には軽度のヘモジデリンの沈着がすべての動物に認められた。

腎臓には軽度のヘモジデリンの沈着がすべての動物に認められた。

膀胱には移行上皮の腫脹（中等度：1匹、軽度：4匹）が認められた。

[8000 ppm 群]

脾臓、胃（前胃）及び腎臓に変化が認められた。

脾臓には軽度のヘモジデリンの沈着、髄外造血及び赤血球充満がすべての動物に認められた。

前胃には扁平上皮に過形成（中等度：7匹、軽度：3匹）が認められた。

腎臓にはヘモジデリンの沈着（軽度：9匹）が認められた。

[3200 ppm 群]

脾臓に軽度のヘモジデリンの沈着と赤血球充満がすべての動物で認められた。

[1280、512 ppm 群]

被験物質の影響と思われる所見は、認められなかった。

IV 考察及びまとめ

2-アミノ-4-クロロフェノール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、2-アミノ-4-クロロフェノールを F344/DuCr1Cr1j ラットに 13 週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

本試験は、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群の構成で、雌雄各群とも 10 匹とし、合計 120 匹を用いた。被験物質の投与は、2-アミノ-4-クロロフェノ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 512、1280、3200、8000 及び 20000 ppm（公比 2.5）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

2-アミノ-4-クロロフェノールの投与の結果、動物の死亡はみられなかったが、体重、摂餌量（雄のみ）、血液、胃及び膀胱に投与の影響が認められた。

体重増加の抑制が、雄の 8000 ppm 以上の群（8000 ppm 群：5～9%、20000 ppm 群：14～18%）と雌の 20000 ppm 群（7～10%）に認められた。最終体重は雄の 20000 ppm 群では対照群の 86%、8000 ppm 群で 95%であった。雌の 20000 ppm 群の最終体重は対照群の 93%であった。

摂餌量の低値が雄の 20000 ppm 群で全投与期間にわたり（対照群と比較して 7～18%の低値）認められた。

血液への影響として、雌雄の 8000 ppm 以上の群でメトヘモグロビン濃度の増加が認められた。雌雄とも 20000 ppm 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値が減少し、貧血が認められ、赤血球数等の変化により、MCV、MCH 及び MCHC の値が変化した。また、貧血に対する反応性変化と考えられる血小板数（文献 6）及び網赤血球比の増加も認められた。これらの貧血に関連した血液学的検査項目の変化の幾つかは、雌雄とも 1280 ppm 以上の群で認められた。本試験で認められた貧血は、被験物質の投与によりメトヘモグロビンが増加し、脾臓の細網細胞により赤血球の破壊が亢進したことに起因すると考えられた。貧血に係る所見は病理組織学検査でも認められた。すなわち、崩壊した赤血球のヘモグロビンに由来するヘモジデリンの沈着が、雌雄とも 20000 ppm 群のすべての動物で脾臓、肝臓及び腎臓にみられ、腎臓においては雌雄の 8000 ppm 群でもみられた。貧血に対する代償性変化と考えられる脾臓の髄外造血が雄では 3200 ppm 以上、雌では 8000 ppm 以上の群のすべての動物にみられ、雌雄とも 8000 ppm 以上の群で脾臓重量の増加が認められた。また、20000 ppm 群の雌雄で認められた血漿中の総ビリルビン及び尿中のビリルビンの増加も、崩壊した赤血球のヘモグロビンに由来するものと考えられた。

前胃には、雌雄の 20000 ppm 群の全動物に剖検で肥厚がみられ、これらはいずれも重度

の扁平上皮過形成であった。また、前胃には雄 1 匹と雌 2 匹に潰瘍、雌 2 匹に糜爛もみられた。雌雄の 8000 ppm 群でも全動物に前胃の扁平上皮の過形成が認められたが、その程度は中等度であった。前胃の扁平上皮の過形成は、被験物質による前胃上皮への直接刺激によるものと考えられた（文献 7）。また、ラットを用いた 2 週間試験（投与濃度は雌雄ともに 1280、3200、8000、20000、50000 ppm）（文献 4）では、3200ppm 群で前胃の扁平上皮の過形成が認められているが、本試験では投与期間の延長にもかかわらず、より高濃度の投与群にしか認められなかったことから長期投与によってある程度の耐性を獲得することが示唆された。

膀胱には、雌雄の 20000 ppm 群に移行上皮の腫脹、雄の 20000 ppm 群に過形成がみられた。2 週間試験（文献 4）でも、雌雄の 50000ppm 群に膀胱への影響（移行上皮細胞の腫脹と細胞質内への空胞の出現）が認められたが、本試験では投与期間の延長により低濃度から出現した。

肝臓重量の増加が雄では 3200 ppm 以上の群で、雌では 8000 ppm 以上の群で認められ、腎臓重量の増加が雄では 3200 ppm 以上の群で、雌では 20000 ppm 群で認められた。

(2) 無毒性量 (NOAEL)

2-アミノ-4-クロロフェノールの 13 週間混餌投与による影響の中で最も低い用量まで認められた変化は、血液への影響を示す血液学的検査項目であり、雌雄ともに 1280 ppm 群（雄：網状赤血球比の増加、雌：赤血球数の減少と MCV の増加）まで認められた。512 ppm 群では投与に関連した明らかな影響は認められなかった。従って、本試験における 13 週間の経口（混餌）投与による無毒性量 (NOAEL) は、血液への影響をエンドポイントとして 512 ppm（雄：29 mg / kg body weight per day、雌：33 mg / kg body weight per day）であると考えた。

(3) 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ように決定した。濃度設定は主に本試験でみられた所見の中で 2 年間の投与期間における動物の生存率に影響を及ぼす可能性があると考えられる所見、すなわち、体重、貧血及び前胃や尿路系の病変と各所見の程度により行った。

雄では、20000 ppm 群の体重増加の抑制が 14%（最終体重）でありこの濃度は雄ラットに対しての最大耐量を越えているものと考えられた。また、前胃に重度の過形成が全動物にみられたこと、貧血の程度が軽度とはいえないこと、膀胱の肥大や過形成の発生部位によっては排尿障害を起こす可能性があることなどから、この濃度でのがん原性試験の実施は不相当と考えられた。8000 ppm 群では、体重増加の抑制はわずかであること、前胃の過形成が重度でないこと、貧血の程度が軽度であること、膀胱の所見がみられないことなどから 8000 ppm 以下の濃度でのがん原性試験を実施した場合、寿命に影響を与えるような重篤な毒性

は出現しないものと考えられ、雄の2年間の経口（混餌）投与によるがん原性試験の最大耐量は8000 ppmと推察された。

雌では、20000 ppm群の体重増加の抑制が7%（最終体重）とわずかであったが、前胃に重度の過形成が全動物にみられたこと、貧血の程度が軽度とはいえないこと、膀胱の移行上皮の腫脹と過形成の発生部位によっては排尿障害を起こす可能性があること等を考慮するとこの濃度でのがん原性試験の実施は不相当と考えられた。8000 ppm群では、体重増加の抑制は認められず、前胃の過形成が重度でないこと、貧血の程度が軽度であること、膀胱の所見がみられないことなどから8000 ppm以下の濃度でのがん原性試験を実施した場合、寿命に影響を与えるような重篤な毒性は出現しないものと考えられ、雌の2年間の経口（混餌）投与によるがん原性試験の最大耐量は8000 ppmと推察された。

従って、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも8000 ppmを最高投与濃度とし、以下3200及び1280 ppm(公比2.5)の3段階の濃度に決定した。

V 文献

1. 化学工業日報社. 2004. 14504 の化学商品. 東京：化学工業日報社, 644.
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : Jone Wiley and Sons.
3. 和光純薬工業(株). 2004. 2-アミノ-4-クロロフェノール, 赤外吸収スペクトル.
4. 日本バイオアッセイ研究センター. 2004. 2-アミノ-4-クロロフェノールのラットを用いた経口投与による2週間毒性試験(混餌試験)報告書. 神奈川：中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター.
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. 宮地勇人. 2002. 血液細胞アトラス-2, 写真と検査データでみる血液細胞の実践的読み方(東海大学医学部付属病院臨床検査科血液検査室編). 東京：東海大学出版会, 13-14.
7. 真鍋淳, 松沼尚史, 高橋道人, 立松正衛, 西川秋佳. 2000. 各論4章, 消化管, 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, 153-178.