

4-クロロ-2-ニトロアニリンのラットを用いた
経口投与による2週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0737

CAS No. 89-63-4

2010年 3月 12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	
試験目的	
試験委託者	
試験施設及び運営管理者	
試験日程	
試験関係者一覧	
試資料の保管	
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	
陳述書	
本文	
TABLES	A 1 ~ J 2
FIGURES	1 ~ 4
APPENDICES	1-1 ~ 2

標題

4-クロロ-2-ニトロアニリン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)

試験目的

4-クロロ-2-ニトロアニリンの経口投与によるがん原性試験の投与濃度決定試験(13週間試験)の予備試験として、4-クロロ-2-ニトロアニリンをラットに2週間経口(混餌)投与して、その生体影響を検索した。

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 長野 嘉介
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日	2009年 6月 15日
動物導入日	2009年 6月 18日
群構成日	2009年 7月 2日
被験物質投与開始日	2009年 7月 2日
被験物質投与終了日	2009年 7月 16日
定期解剖日	2009年 7月 16日
試験終了日	2010年 3月 12日

4-クロロ-2-ニトロアニリンのラットを用いた
経口投与による2週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0737

本文

本文目次

	頁
要約	1
試験材料	2
- 1 被験物質の性状等	2
- 1 - 1 名称等	2
- 1 - 2 構造式及び分子量	2
- 1 - 3 物理化学的性状等	2
- 2 被験物質の使用ロット等	2
- 3 被験物質の特性・同一性、安定性	3
- 3 - 1 特性・同一性	3
- 3 - 2 安定性	3
- 4 試験動物	3
試験方法	4
- 1 投与	4
- 1 - 1 投与経路	4
- 1 - 2 被験物質の投与方法	4
- 1 - 3 投与期間	4
- 1 - 4 投与濃度	4
- 1 - 5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	4
- 1 - 6 被験物質混合飼料の調製方法	5
- 1 - 7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性 ..	5
- 1 - 8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性	5
- 1 - 9 被験物質の摂取量	6
- 2 動物管理	6
- 2 - 1 各群の使用動物数	6
- 2 - 2 群分け及び個体識別方法	6
- 2 - 3 飼育条件	6
(1) 飼育環境	6
(2) 飼料	7
(3) 飲水	7

- 3 観察・検査項目及び方法	7
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	7
- 3 - 2 体重測定	8
- 3 - 3 摂餌量測定	8
- 3 - 4 血液学的検査	8
- 3 - 5 血液生化学的検査	8
- 3 - 6 病理学的検査	8
(1) 剖検	8
(2) 臓器重量	9
(3) 臓器の採取保存	9
- 4 数値処理と統計方法	9
- 4 - 1 数値の取り扱いと表示	9
- 4 - 2 統計処理	10
試験成績	11
- 1 生死状況	11
- 2 一般状態	11
- 3 体重	11
- 4 摂餌量	12
- 5 被験物質摂取量	12
- 6 血液学的検査	13
- 7 血液生化学的検査	13
- 8 病理学的検査	13
- 8 - 1 剖検	13
- 8 - 2 臓器重量	14
考察及びまとめ	15
- 1 用量 - 反応関係	15
- 2 他の文献との比較	16
(1) 毒性	16
(2) 遺伝毒性	17
- 3 13 週間試験の濃度決定	17
文献	19
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	20

要約

4-クロロ-2-ニトロアニリンの F344/DuCrIj (Fischer) ラットを用いた経口投与による 2 年間 (104 週間) のがん原性試験のための予備試験である 13 週間試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するために 2 週間試験を実施した。

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 5 匹とし、合計 60 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、雌雄とも、0 (対照群)、1250、2500、5000、10000 及び 20000ppm (重量比 w/w) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び臓器重量の測定を行った。

4-クロロ-2-ニトロアニリン投与の結果、雌雄各群とも動物の死亡は認められなかった。

一般状態の観察では、黄色尿が雌雄とも全投与群の全動物に観察された。また、被毛の着色 (黄色)、糞少量、立毛が雌雄とも高用量群に観察された。体重の低値が、雌雄とも 10000 ppm 以上の群で認められた。投与終了時の体重は、対照群に対し、雄では、1250 ppm 群: 101%、2500 ppm 群: 99%、5000 ppm 群: 97%、10000 ppm 群: 89%、20000 ppm 群: 76%、雌では 1250 ppm 群: 101%、2500 ppm 群: 99%、5000 ppm 群: 97%、10000 ppm 群: 92%、20000 ppm 群: 79%であった。摂餌量の低値が、雌雄とも 5000 ppm 以上の群で認められた。

血液学的検査では、メトヘモグロビンの高値が雄 20000 ppm 群と雌 5000 ppm 以上の群に認められた。また、赤血球への影響を示す変化が雄 10000 ppm 以上の群と雌 5000 ppm 以上の群に認められた。

血液生化学的検査では、溶血に伴う変化を示唆する総ビリルビンの高値が、雄 5000 ppm 以上の群と雌全投与群に認められた。腎臓への影響を示唆する変化として、尿素窒素の高値が雌雄の 20000 ppm 群に認められた。肝臓への影響を示唆する変化として、総コレステロールの高値が雌雄とも 2500 ppm 以上の群に、リン脂質の高値が雄 5000 ppm 以上の群と雌 2500 ppm 以上の群に、 γ -GTP の高値が雌 20000 ppm 群に認められた。また、摂餌量の不足に起因すると考えられるグルコースの低値が雌雄の 10000 ppm 以上の群に認められた。

剖検では、雌雄とも被験物質投与による変化は認められなかった。

臓器重量測定の結果、雌雄とも肝臓の重量増加が全投与群に認められた。また、脾臓の重量増加が雌 10000 ppm 以上の群に認められた。

以上の結果から、4-クロロ-2-ニトロアニリンの 13 週間試験の投与濃度は、雌雄とも 10000 ppm を最高投与濃度とし、以下 7000、4000、1600、640 ppm とした。

試験材料

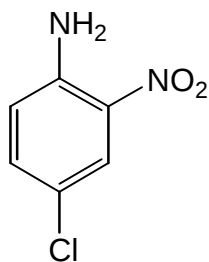
- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

名 称 : 4-クロロ-2-ニトロアニリン
(4-chloro-2-nitroaniline)
IUPAC 名 : 1-アミノ-4-クロロ-2-ニトロベンゼン
(1-amino-4-chloro-2-nitrobenzene)
CAS No. : 89-63-4

- 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 172.58

- 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 2)

性 状 : 橙色結晶性粉末
融 点 : 118
溶 解 性 : 水に不溶、エーテル、酢酸に可溶、メタノールに微溶
保 管 条 件 : 冷暗所保管

- 2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 東京化成工業(株)
グ レ ー ド : EP (東京化成一級)
純 度 : 99.9% (東京化成工業(株)試験成績書データ)
ロ ッ ト 番 号 : GJ01

- 3 被験物質の特性・同一性、安定性

- 3 - 1 特性・同一性

被験物質の同一性は、マスペクトルを質量分析計（株）日立製作所 M-80B）を用いて測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（株）島津製作所 FTIR-8200PC）を用いて測定し、それぞれの文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマスペクトルは文献値（文献 3）と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値（文献 4）と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 4-クロロ-2-ニトロアニリンであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

- 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ（株）島津製作所 LC-10）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示した。

- 4 試験動物

動物は、4-クロロ-2-ニトロアニリンのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー（株）（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の F344/DuCrIj ラット（SPF）の雌雄を使用した。ラット雌雄各 37 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 30 匹（投与開始時体重範囲、雄：117～131g、雌：93～104g）を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCrIj ラット（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週に 2 回実施した。

- 1 - 3 投与期間

投与期間は 2 週間とし、定期解剖直前まで連続投与した。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、1250、2500、5000、10000 及び 20000 ppm (重量比 w/w) の 5 段階 (公比 2) に設定した。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

- 1 - 5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は、常温で固体であり、かつ、水に不溶であるため、混餌による経口投与とした。投与期間は、がん原性試験の投与濃度決定試験 (13 週間毒性試験) の投与濃度を決定するために 2 週間とした。

2 週間試験の投与濃度はフィジビリティー試験 (文献 5) の結果をもとに決定した。

フィジビリティー試験では、F344/DuCrI CrIj ラット (SPF) の雌雄に 0 (対照群)、100、1000、10000 及び 50000 ppm の濃度の被験物質混合飼料を 2 週間自由摂取させることによって行なった。その結果、50000 ppm 群では雌雄とも顕著な体重の低値 (試験終了時、対照群に対し、雄は 50%、雌は 57%) が認められ、雌に死亡も認められた。10000 ppm 群では、雌雄とも死亡は認められず、投与終了時の体重は、対照群に対し、雄は 89%、雌は 93% であった。従って、2 週間の投与に耐える最高投与濃度は、50000 ppm 未満、10000 ppm 以上の範囲にあり、かつ、10000 ppm に近い濃度が適切であると考えた。

以上より、2 週間試験の投与濃度は、雌雄とも 20000 ppm を最高投与濃度とし、以下、10000、5000、2500 及び 1250 ppm (公比 2) に設定した。

- 1 - 6 被験物質混合飼料の調製方法

粉末飼料 (オリエンタル酵母工業(株)製 CRF-1) と被験物質をスパイラルミキサー (関東混合機工業(株) CS-20 あるいは HP20M) で攪拌混合し、40000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 40000 ppm 被験物質混合飼料を更に粉末飼料と攪拌混合し、20000、10000、5000、2500 及び 1250 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、投与開始日前日に実施した。調製量は 2 週間分とし、調製量の一部をラット用餌箱に充填して翌日より動物に投与した。残りの被験物質混合飼料は各濃度ごとにビニール袋に小分け密封し、使用時まで冷蔵で保管した。

- 1 - 7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性

被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性は、調製時に各投与濃度ごとに調製容器内の被験物質混合飼料を 7 点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ (株島津製作所 LC-10) を用いて測定し、確認した。

その結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対して 94.4 ~ 105% の範囲にあった。また、均一性については、変動係数が 3.96 ~ 7.59 % の範囲にあった。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。

その結果、濃度については APPENDIX 1-3、均一性については APPENDIX 1-4 に示した。

- 1 - 8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性

被験物質混合飼料中の被験物質の安定性確認は、本被験物質のフィジビリティ試験 (試験番号 4462) (文献 5) で実施した。すなわち、100 ppm と 50000 ppm の被験物質混合飼料について、動物飼育室内で室温保管 (8 日間) したものと冷蔵保管 (8 日間) したものをを用いて確認した。その結果、被験物質混合飼料中の被験物質は安定であった。本試験の投与濃度はフィジビリティ試験の濃度範囲内 (100 ppm と 50000 ppm) にあることから、本試験における被験物質混合飼料中の被験物質の安定性確認は実施しなかった。

その結果を APPENDIX 1-5 に示した。

- 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 1 日摂取量 (mg/kg 体重/日) を算出した。

- 2 動物管理

- 2 - 1 各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 5 匹の動物を用いた。

群 名 称	動物数 (動物番号)	
	雄	雌
対 照 群	5 匹 (1001 ~ 1005)	5 匹 (2001 ~ 2005)
1250 ppm 群	5 匹 (1101 ~ 1105)	5 匹 (2101 ~ 2105)
2500 ppm 群	5 匹 (1201 ~ 1205)	5 匹 (2201 ~ 2205)
5000 ppm 群	5 匹 (1301 ~ 1305)	5 匹 (2301 ~ 2305)
10000 ppm 群	5 匹 (1401 ~ 1405)	5 匹 (2401 ~ 2405)
20000 ppm 群	5 匹 (1501 ~ 1505)	5 匹 (2501 ~ 2505)

- 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から体重の中央値に近い雌雄各 30 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合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法 (適正層別方式) により実施した (文献 6)。なお、群分けは、被験物質投与開始日の投与直前に行なった。

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 208 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。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 ± 2 < 22.9 ± 0.1 >
 湿 度 : $55 \pm 15\%$ < $54 \pm 1\%$ >
 明暗サイクル : 12 時間点灯(8:00 ~ 20:00) / 12 時間消灯(20:00 ~ 8:00)
 換気回数 : 15 ~ 17 回 / 時
 ケージへの動物の収容方法 : 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 (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。

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、飼料中の夾雑物は本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、結果を本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 回行った。また、一般状態の詳細な観察は、投与開始後 4 (1 週 4 日)、7 (1 週 7 日)、11 (2 週 4 日)、14 (2 週 7 日) 日目に行った。

- 3 - 2 体重測定

測定時に生存していた全動物について、投与開始後 4 (1 週 4 日)、7 (1 週 7 日)、11 (2 週 4 日)、14 (2 週 7 日) 日目に体重測定を行った。

- 3 - 3 摂餌量測定

測定時に生存していた全動物について、体重測定に合わせて週 2 回、給餌量、残餌量及び餌こぼし量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

- 3 - 4 血液学的検査

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及びヘパリンリチウム入り採血管の血液は全血を用いて下記の項目について検査を行なった。検査方法は APPENDIX 2 に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、メトヘモグロビン濃度、白血球数、白血球分類

- 3 - 5 血液生化学的検査

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 2 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、リン脂質、AST、ALT、LDH、 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

- 3 - 6 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、卵巢、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 臓器の採取保存

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した。

採取保存器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、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、精嚢、前立腺、卵巢、子宮、膣、乳腺、脳、脊髓、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、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 2 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。

- 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。

各検査及び測定は、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。

各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% 及び 1% の有意水準の表示を行った。

試験成績

- 1 生死状況

生死状況を TABLE A 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

雌雄ともすべての群に死亡動物はみられなかった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示した。

- 雄 -

全投与群の全動物に黄色尿が投与期間を通して認められた。

10000 ppm 以上の群に被毛の着色（黄色）が投与期間を通して認められた。

その他、20000 ppm 群では立毛と糞少量が投与前期に認められたが、投与後期には消失した。

- 雌 -

全投与群の全動物に黄色尿が投与期間を通して認められた。

10000 ppm 以上の群に被毛の着色（黄色）が投与期間を通して認められた。10000 ppm 群の投与初期と 20000 ppm 群の全投与期間を通して糞少量が認められた。

その他、20000 ppm 群では立毛が投与前期に認められたが、投与後期には消失した。

- 3 体重

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

- 雄 -

10000 ppm 以上の群では、全投与期間を通して体重の低値が認められた。5000 ppm 以下の群では、対照群と同様の推移を示した。

なお、最終計測日における各投与群の体重は、対照群に対して、1250 ppm 群：101%、2500 ppm 群：99%、5000 ppm 群：97%、10000 ppm 群：89%、20000 ppm 群：76%であった。

- 雌 -

10000 ppm 以上の群では、全投与期間を通して体重の低値が認められた。5000 ppm 以下の群では、対照群と同様の推移を示した。

なお、最終計測日における各投与群の体重は、対照群に対して、1250 ppm 群：101%、2500 ppm 群：99%、5000 ppm 群：97%、10000 ppm 群：92%、20000 ppm 群：79%であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1～4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

- 雄 -

5000 ppm 群の投与初期と 10000 ppm 以上の群の全投与期間を通して、摂餌量の低値が認められた。2500 ppm 以下の群では対照群と同様の推移を示した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量(対照群に対する相対比)は、対照群：13.3 g、1250 ppm 群：13.6 g(102%)、2500 ppm 群：13.1 g(98%)、5000 ppm 群：12.7 g(95%)、10000 ppm 群：11.0 g(83%)、20000 ppm 群：8.5 g(64%)であった。

- 雌 -

5000 ppm 群では 7 日目を除き摂餌量の低値が認められた。また、10000 ppm 以上の群で、全投与期間を通して、摂餌量の低値が認められた。2500 ppm 以下の群では対照群と同様の推移を示した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量(対照群に対する相対比)は、対照群：10.3 g、1250 ppm 群：10.1 g(98%)、2500 ppm 群：10.0 g(97%)、5000 ppm 群：9.4 g(91%)、10000 ppm 群：8.1 g(79%)、20000 ppm 群：6.5 g(63%)であった。

- 5 被験物質摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より算出した被験物質摂取量を TABLE E 1, 2 に示した。

- 雄 -

各投与群の被験物質摂取量(mg/kg 体重/日)は、1250 ppm 群：96～117、2500 ppm 群：187～223、5000 ppm 群：382～432、10000 ppm 群：676～801、20000 ppm 群：988～1517 の範囲にあった。また、各投与群における全投与期間を通しての平均被験物質摂取量(mg/kg 体重/日)は、1250 ppm 群：106、2500 ppm 群：204、5000 ppm 群：405、10000 ppm 群：755、20000 ppm 群：1351 であった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、高濃度投与群で設定濃度比(公比 2)を下回る傾向を示した。

- 雌 -

各投与群の被験物質摂取量(mg/kg 体重/日)は、1250 ppm 群：100～113、2500 ppm 群：202～225、5000 ppm 群：379～439、10000 ppm 群：656～824、20000 ppm 群：996～1546 の範囲にあった。また、各投与群における全投与期間を通しての平均被験物質摂取量(mg/kg 体重/日)は、1250 ppm 群：107、2500 ppm 群：216、5000 ppm 群：415、10000 ppm 群：754、20000 ppm 群：1369 であった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、高濃度投与群で設定濃度比(公比 2)を下回る傾向を示した。

- 6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

- 雄 -

MCV と MCH の僅かな低値が 10000 ppm 以上の群に、メトヘモグロビン濃度の高値が 20000 ppm 群に認められた。

- 雌 -

メトヘモグロビンの高値と MCH の低値が 5000 ppm 以上の群に、網赤血球比の高値、並びに、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び MCHC の低値が 10000 ppm 以上の群に認められた。また、MCV の低値が 5000 ppm 群に認められた。

- 7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

- 雄 -

総蛋白、アルブミン及び総コレステロールの高値が 2500 ppm 以上の群に、総ビリルビンとリン脂質の高値、並びに、AST の低値が 5000 ppm 以上の群に、グルコースの低値が 10000 ppm 以上の群に、尿素窒素の高値と CK の低値が 20000 ppm 群に認められた。

- 雌 -

アルブミンと総ビリルビンの高値が全投与群に、総蛋白、総コレステロール、リン脂質の高値、並びに、AST の低値が 2500 ppm 以上の群に、グルコースの低値とカルシウムの高値が 10000 ppm 以上の群に、A/G 比、 γ -GTP 及び尿素窒素の高値が 20000 ppm 群に認められた。

- 8 病理学的検査

- 8 - 1 剖検

剖検所見を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

被験物質投与による変化は認められなかった。

- 8 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量を TABLE I 1, 2 に、体重比を TABLE J 1, 2 に示した。

- 雄 -

肝臓の実重量の高値が 2500 ppm ~ 10000 ppm 群に、体重比の高値が全投与群に認められた。

その他、10000 ppm 以上の群で、胸腺、副腎、精巣、心臓、肺、腎臓、脾臓または脳の実重量や体重比に変化がみられたが、10000 ppm 以上の群の搬出時体重は低値であり、これらの臓器重量の変化は、搬出時体重の低値に関連した変化と考えた。

- 雌 -

肝臓の実重量と体重比の高値が全投与群に認められた。脾臓の実重量と体重比の高値が 10000 ppm 以上の群に認められた。

その他、10000 ppm 以上の群で、胸腺、副腎、卵巣、心臓、肺、腎臓または脳の実重量や体重比に変化がみられたが、10000 ppm 以上の群の搬出時体重は低値であり、これらの臓器重量の変化は、搬出時体重の低値に関連した変化と考えた。

考察及びまとめ

4-クロロ-2-ニトロアニリンの F344/DuCrJ (Fischer) ラットを用いた経口投与による 2 年間 (104 週間) のがん原性試験のための予備試験である 13 週間試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するために 2 週間試験を実施した。被験物質の投与は、4-クロロ-2-ニトロアニリンを混合した飼料を自由摂取させることにより行った。1 群当たりの動物数は雌雄各 5 匹とし、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、1250、2500、5000、10000 及び 20000 ppm (w/w) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び臓器重量の測定を行った。

- 1 用量 - 反応関係

4-クロロ-2-ニトロアニリンの投与の結果、雌雄ともすべての群に死亡動物はみられなかった。

一般状態の観察では、黄色尿が雌雄とも全投与群の全動物に観察された。また、被毛の着色(黄色)が雌雄とも 10000 ppm 以上の群に観察された。その他、糞少量が雄 20000 ppm 群と雌 10000 ppm 以上の群に、立毛が雌雄の 20000 ppm 群に観察された。

体重は、雌雄とも 10000 ppm 以上の群で全投与期間を通して低値が認められた。投与終了時の体重は対照群に対し、雄は 1250 ppm 群 : 101%、2500 ppm 群 : 99%、5000 ppm 群 : 97%、10000 ppm 群 : 89%、20000 ppm 群 : 76%、雌は 1250 ppm 群 : 101%、2500 ppm 群 : 99%、5000 ppm 群 : 97%、10000 ppm 群 : 92%、20000 ppm 群 : 79%であった。

摂餌量は、雄では 5000 ppm 群の投与初期と 10000 ppm 以上の群の全投与期間を通して、雌では 5000 ppm 群の 7 日目を除く全投与期間と 10000 ppm 以上の群の全投与期間を通して低値が認められた。

平均被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、雄では、1250 ppm 群 : 106、2500 ppm 群 : 204、5000 ppm 群 : 405、10000 ppm 群 : 755、20000 ppm 群 : 1351 であった。雌では、1250 ppm 群 : 107、2500 ppm 群 : 216、5000 ppm 群 : 415、10000 ppm 群 : 754、20000 ppm 群 : 1369 であった。各投与群の平均被験物質摂取量の比率は、雌雄とも高濃度投与群で設定濃度比 (公比 2) を下回る傾向を示した。

血液学的検査では、メトヘモグロビンの高値が雄 20000 ppm 群と雌 5000 ppm 以上の群に認められた。また、赤血球への影響を示す変化が雄 10000 ppm 以上の群と雌 5000 ppm 以上の群に認められた。多くの芳香族ニトロ及びアミノ化合物は、メトヘモグロビンを生成し、赤血球を傷害することにより、貧血を発生させることが報告されている (文献 7)。雄で認められた MCV と MCH の低値、雌で認められた貧血 (赤血球数、ヘモグロビン濃

度、ヘマトクリット値の低値)、MCHとMCHCの低値、並びに網赤血球比の高値は、4-クロロ-2-ニトロアニリン投与によるメトヘモグロビン血症によるものと考えられた。

血液生化学的検査では、溶血に伴う変化を示唆する総ビリルビンの高値が、雄 5000 ppm 以上の群と雌全投与群に認められた。腎臓への影響を示唆する変化として、尿素窒素の高値が雌雄の 20000 ppm 群に認められた。また、肝臓への影響を示唆する変化として、雄では、総コレステロールの高値が 2500 ppm 以上の群に、リン脂質の高値が 5000 ppm 以上の群に認められた。雌では、総コレステロール及びリン脂質の高値が 2500 ppm 以上の群に、 γ -GTP の高値が 20000 ppm 群に認められた。摂餌量の不足に起因すると考えられるグルコースの低値が雌雄 10000 ppm 以上の群に認められた。その他、AST の低値が雄 5000 ppm 以上と雌 2500 ppm 以上の群に、CK の低値が雄 20000 ppm 群に認められた。また、総蛋白の高値が雌雄 2500 ppm 以上の群に、アルブミンの高値が雄 2500 ppm 以上の群と雌全投与群に、A/G 比の高値が雌 20000 ppm 群に、カルシウムの高値が雌 10000 ppm 以上の群にみられた。

剖検では、雌雄とも被験物質投与による変化は認められなかった。

臓器重量測定の結果、雄では肝臓の実重量の高値が 2500 ppm から 10000 ppm 群に、体重比の高値が全投与群に認められた。雌では肝臓の実重量と体重比の高値が全投与群に認められた。また、脾臓の実重量と体重比の高値が雌 10000 ppm 以上の群に認められた。

- 2 他の文献との比較

(1)毒性

SD ラットに 0 (対照群)、10、60、300 mg/kg/日の用量で、交配前 14 日から交配を経て、雄では 42 日間、雌では妊娠、分娩を経て哺育 4 日まで強制経口投与した報告がある (文献 8)。投与の結果、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴が雄 300 mg/kg/日群に、脾臓の髄外造血亢進が雌 60 mg/kg/日以上以上の群に認められ、また、ヘマトクリット値の低値が雄 60 mg/kg/日以上以上の群に、網赤血球比の高値が雌 300 mg/kg/日群に、肝臓の重量増加が雌雄 300 mg/kg/日群に、腎臓の重量増加が雄 300 mg/kg/日群に認められたことを報告している。血液への影響と脾臓への影響はメトヘモグロビン血症によるものと考察している。

F344 ラット雌雄に 50、100、200、400、800 mg/kg/日の用量で 13 週間強制経口投与した報告がある (文献 9)。投与の結果、体重増加の抑制が高用量群にみられた。被毛、腎臓、脳、前胃、脂肪、舌が黄色を呈した。標的臓器は脾臓、腎臓、肝臓であった。脾臓にはヘモジデリン沈着が雄 400 mg/kg/日以上と雌 50mg/kg/日以上以上の群にみられた。腎臓では、重量が雌雄とも 800 mg/kg/日群で増加し、近位尿細管の好酸性硝子滴と再生が雄 100 mg/kg/日以上以上の群に、乳頭部の腎盂上皮過形成と慢性炎症が雄 800 mg/kg/日に認められた。肝臓では、重量増加が雄 200 mg/kg/日以上以上の群と雌 50 mg/kg/日群に認められた。その他、赤血球数とヘマトクリット値の減少が雄 800 mg/kg/日群に、AST の低下が雄 400

mg/kg/日以上に認められたことを報告している。

本試験の投与方法は上述の二つの報告とは異なり混餌投与であり、投与期間も異なるが、上述の報告と同様に 4-クロロ-2-ニトロアニリン経口投与によるメトヘモグロビン血症が認められ、赤血球への傷害を反映する変化として総ビリルビンの高値が認められた。その他、上述の報告と同様に肝臓及び腎臓重量の増加もみられた。

(2) 遺伝毒性

BUA レポートに掲載されている *in vitro* と *in vivo* の遺伝毒性試験結果の概要を以下に示す（文献 9）。

微生物を用いる復帰突然変異試験では、5 つの試験報告が記載されている。1) ネズミチフス菌 TA98 で代謝活性化有りの場合に陽性の結果を示した。2) TA98、TA100、TA1535、TA1537 を用いた復帰突然変異試験では、TA98 と TA100 において、代謝活性化有りの場合に陽性の結果を示した。3) ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 を用いた復帰突然変異試験では、TA98 と TA1538 において、代謝活性化有りの場合に陽性の結果を示した。4) ネズミチフス菌 TA98、TA1538 を用いた復帰突然変異試験において、代謝活性化有りの場合に陽性の結果を示した。5) TA1538、TA98、TA98NR、YG1020、AG1021、YG1024 株を用いた復帰突然変異試験では、TA1538 の代謝活性化なしで弱い陽性の結果を示した。

TA1535/pSK 1002 を用いた *umu* test では、代謝活性化の有無に係わらず陰性の結果を示した。

チャイニーズハムスターの卵巣由来の培養細胞を用いた姉妹染色分体交換試験では、代謝活性化の有無に係わらず弱い陽性の結果を示した。染色体異常試験では、代謝活性化有りで陽性の結果を示した。

in vivo 試験では、げっ歯類を用いる小核試験において、マウスに経口投与した場合の末梢血で陰性であった。

- 3 13 週間試験の濃度決定

13 週間試験の投与濃度は、F344/DuCrIj ラットの雌雄に、0 (対照群)、1250、2500、5000、10000 及び 20000 ppm の濃度の被験物質混合飼料を 2 週間自由摂取させた本試験の結果をもとに設定する。

2 週間試験の結果、雌雄ともすべての投与群に死亡はみられなかった。雌雄ともに体重と摂餌量の低値が 10000 ppm 群（対照群比、投与終了時体重：雄 89%、雌 92%、平均摂餌量：雄 83%、雌 79%）と 20000 ppm 群（対照群比、投与終了時体重：雄 76%、雌 79%、平均摂餌量：雄 64%、雌 63%）にみられた。血液学的検査では、メトヘモグロビン濃度の高値が雄 20000 ppm 群と雌 5000 ppm 以上の群にみられ、貧血を示す赤血球数、ヘモグ

ロビン濃度及びヘマトクリット値等の低値が雌 10000 ppm 以上の群にみられた。血液生化学的検査では、溶血に伴う変化を示唆する総ビリルビンの高値が雄 5000 ppm 以上の群と雌全投与群にみられた。その他、尿素窒素の高値が雌雄の 20000 ppm 群にみられ、腎臓への影響も示唆された。臓器重量測定の結果、肝臓重量の増加（実重量と体重比の増加）が雄 2500 ppm から 10000 ppm 群と雌の全投与群にみられた。貧血に関連した変化と考えられる脾臓重量（実重量と体重比）の増加が雌 10000 ppm 以上の群にみられた。

従って、13 週間の連続投与により、20000 ppm では顕著な体重低下と摂餌量の低値が予想されることから、13 週間試験の最高投与濃度としては高すぎると考えられた。10000 ppm では雌雄とも体重増加の抑制が 10%程度で重篤な毒性が出現しないと予想されることから、13 週間試験の最高投与濃度として適切であると考えた。また、13 週間試験の最低投与濃度は、2 週間試験で雌の最低投与濃度の 1250 ppm 群で肝臓重量の増加がみられたことから、無毒性量の情報を得るには、それ以下の濃度の設定が必要と考えられた。

以上より、13 週間試験の投与濃度は、雌雄とも 10000 ppm を最高投与濃度とし、以下 4000、1600、640 ppm（公比 2.5）に設定し、さらに最大耐量をより正確に把握する為 7000 ppm を加えた 5 濃度を設定した。

文献

1. 化学工業日報社．2009．15509 の化学商品．東京：化学工業日報社，746．
2. 東京化成工業(株)．2000．化学物質等安全データシート．
3. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : John Wiley and Sons.
4. 東京化成工業(株)．2009．4-クロロ-2-ニトロアニリン, 赤外吸収スペクトル．
5. 日本バイオアッセイ研究センター．2009．有害性調査実施候補化学物質のフィジビリティ試験報告書(4-クロロ-2-ニトロアニリン)．神奈川：中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター．
6. 阿部正信．1986．長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立．薬理と治療 14 : 7285-7302．
7. Benya TJ and Comish HH, 1994. Aromatic nitro and amino compounds. In: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 4th ed (Clayton GD and Clayton FE eds.) New York: John Wiley & Sons, 947-1085.
8. 星野信人ら．2007．4-クロロ-2-ニトロアニリンのラットを用いる反復経口投与・生殖発生毒性併合試験．経済産業省製造産業局．
9. 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

本試験において、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。