

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

試験番号：0759

CAS No. 89-63-4

2014年8月26日

中央労働災害防止協会  
日本バイオアッセイ研究センター

## 目次

標題	.....	i
試験目的	.....	i
試験法	.....	i
GLP 対応	.....	i
動物福祉	.....	i
試験委託者	.....	i
試験施設及び運営管理者	.....	ii
試験日程	.....	ii
試験関係者一覧	.....	ii
試資料の保管	.....	iv
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	.....	iv
陳述書	.....	v
信頼性保証証明書	.....	vi
本文	.....	vii
TABLES	A 1~R 2	
FIGURES	1~6	
PHOTOGRAPHS	1~6	
APPENDICES	1-1~3	

## 標題

4-クロロ-2-ニトロアニリンのラットを用いた経口投与によるがん原性試験（混餌試験）

## 試験目的

4-クロロ-2-ニトロアニリンをラットに 104 週間経口（混餌）投与し、がん原性を検索した。

## 試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準」に準拠し、OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 2009 年 9 月 7 日採択）に準じて実施した。

## GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号、平成 12 年 12 月 25 日付け、労働省告示第 120 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

## 動物福祉

本試験は、平成 18 年 4 月 28 日付け、環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成 18 年 6 月 1 日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び平成 18 年 11 月 27 日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また、本試験計画書は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

## 試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課  
東京都千代田区霞が関 1-2-2

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

試験番号：0759

本文

## 本文目次

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

- 3 観察・検査項目及び方法	9
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	9
- 3 - 2 体重測定	9
- 3 - 3 摂餌量測定	9
- 3 - 4 血液学的検査	9
- 3 - 5 血液生化学的検査	10
- 3 - 6 尿検査	10
- 3 - 7 病理学的検査	10
(1) 剖検	10
(2) 臓器重量	10
(3) 病理組織学的検査	10
- 4 数値処理と統計方法	11
- 4 - 1 数値の取り扱いと表示	11
- 4 - 2 統計処理	11
試験成績	13
- 1 生死状況	13
- 2 一般状態	13
- 3 体重	13
- 4 摂餌量	14
- 5 被験物質摂取量	14
- 6 血液学的検査	15
- 7 血液生化学的検査	15
- 8 尿検査	15
- 9 病理学的検査	16
- 9 - 1 剖検	16
- 9 - 2 臓器重量	17
- 9 - 3 病理組織学的検査	17
- 9 - 4 死因	19

考察及びまとめ	20
- 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、被験物質摂取量	20
- 2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	20
- 3 その他の影響	20
- 4 投与濃度設定の評価	22
- 5 無毒性量 (NOAEL)	22
- 6 他文献との比較等	23
結論	24
文献	25
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	28

## 要約

4-クロロ-2-ニトロアニリンのがん原性を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた混餌経口投与による2年間(104週間)の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群3群と対照群1群の計4群の構成で、雌雄各群とも50匹とし、合計400匹を用いた。被験物質の投与は、4-クロロ-2-ニトロアニリンを混合した飼料を動物に自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雄では0(対照群)、280、1400及び7000 ppm(重量比 w/w)、雌では0、160、800及び4000 ppmとした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、生存率の低下が雌の4000 ppm群にみられ、これは慢性腎症による死亡の増加に起因するものであった。一般状態の観察では、被験物質の代謝物によると考えられる黄色尿と外陰部周囲の被毛の着色(黄色)が雌雄の全投与群で認められた。体重の低値が、雄の7000 ppm群と雌の4000 ppm群で投与期間を通して認められた。摂餌量は、雄の7000 ppm群と雌の4000 ppm群で投与期間を通して低値であった。

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

腫瘍以外の影響として、腎臓では、慢性腎症の発生増加あるいは程度の増強、腎盂における尿路上皮過形成と鉍質沈着の発生増加(雌雄)、乳頭での鉍質沈着の発生増加(雄)が認められた。また、血漿中尿素窒素とクレアチニンの高値(雌雄)及び尿潜血の陽性例の増加(雌)がみられた。血液/造血系では、メトヘモグロビン濃度の高値(雌雄)と貧血を示すパラメータの変化(雌雄とも赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値等)がみられた。その他、雌のみに眼球の角膜炎と虹彩炎、肺における水腫、限局性線維化及び泡沫細胞の出現、心臓の心筋線維症、副腎での出血の発生増加が認められた。

以上、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、4-クロロ-2-ニトロアニリンの2年間(104週間)にわたる混餌経口投与によるがん原性試験を行った結果、腫瘍の発生増加及び腫瘍関連病変の発生増加は雌雄とも認められなかった。

なお、2年間の混餌経口投与における無毒性量(NOEL)は、雌雄とも、腎臓及び血液/造血系への影響をエンドポイントとして、雄では280 ppm(13 mg/kg 体重/日)、雌では160 ppm(9 mg/kg 体重/日)であると考えられた。

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

投与濃度 (ppm)			0	280	1400	7000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数			50	50	50	50		
良 性 腫 瘍	皮膚	角化棘細胞腫	7	2	7	1 *		
	皮下組織	線維腫	4	7	7	2		
	肺	細気管支 肺胞上皮腺腫	2	3	1	1		
	肝臓	肝細胞腺腫	3	0	0	2		
	膵臓	島細胞腺腫	4	2	5	0		
	下垂体	腺腫	15	17	17	0 **		
	甲状腺	C-細胞腺腫	14	5 *	12	6 *		
		濾胞状腺腫	0	1	0	3		
	副腎	褐色細胞腫	7	4	4	0 **		
	精巣	間細胞腫	41	35	43	47		
	包皮腺	腺腫	1	2	3	3		
悪 性 腫 瘍	脾臓	単核球性白血病	4	6	9	6		
	甲状腺	C-細胞癌	2	4	5	0		
		濾胞状腺癌	0	0	1	0		
	甲状腺	C-細胞腺腫+C-細胞癌	16	9	17	6 *		
		濾胞状腺腫+濾胞状腺癌	0	1	1	3		

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

投与濃度 (ppm)			0	160	800	4000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数			50	50	50	50		
良 性 腫 瘍	下垂体	腺腫	14	17	11	0 **		
	甲状腺	C-細胞腺腫	5	6	7	0 *		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	7	7	6	5		
	乳腺	線維腺腫	11	7	14	7		
	陰核腺	腺腫	3	0	0	2		
悪 性 腫 瘍	脾臓	単核球性白血病	6	5	4	2		
	子宮	子宮内膜間質性肉腫	2	3	2	0		

\*: p 0.05 で有意

\*\* : p 0.01 で有意

( Fisher 検定 )

: p 0.05 で有意増加

: p 0.01 で有意増加

( Peto, Cochran-Armitage 検定 )

: p 0.05 で有意減少

: p 0.01 で有意減少

( Cochran-Armitage 検定 )

## 試験材料

### - 1 被験物質の性状等

#### - 1 - 1 名称等

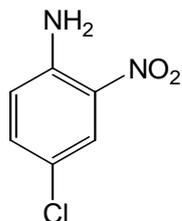
名 称： 4-クロロ-2-ニトロアニリン (4-chloro-2-nitroaniline)

別 名： 1-アミノ-4-クロロ-2-ニトロベンゼン (1-amino-4-chloro-2-nitrobenzene)

CAS No. : 89-63-4

#### - 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 172.58

#### - 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 2)

性 状 : 橙色結晶性粉末

融 点 : 118

溶 解 性 : 水に不溶、エーテルと酢酸に可溶、メタノールに微溶

保 管 条 件 : 冷蔵で暗所に保管

### - 2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : LUTFB

製 造 元 : 東京化成工業(株)

グ レ ー ド : EP (東京化成一級)

純 度 : 99.9% (東京化成工業(株) 試験成績書データ)

### - 3 被験物質の特性

#### - 3 - 1 同一性

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

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

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示す。

#### - 3 - 2 安定性

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

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

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示す。

### - 4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の F344/DuCrIj ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 220 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 200 匹（群構成時体重範囲、雄：113～139 g、雌：90～108 g）を選別し、試験に用いた。

なお、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用給餌器に充填し、動物に自由摂取させた。なお、被験物質混合飼料の交換は 7 日毎に実施した。

#### - 1 - 3 投与期間

投与期間は 104 週間とし、さらに、それぞれの動物の定期解剖前日まで連続投与した。

#### - 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、雄は 280、1400 及び 7000 ppm、雌は 160、800 及び 4000 ppm (重量比 w/w) の 3 段階 (公比 5) に設定した。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

#### - 1 - 5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は、常温で固体であり、かつ、水に不溶であるため、混餌による経口投与とした。

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

投与濃度は、経口投与による 13 週間毒性試験 (試験番号 0745) (文献 7) の結果をもとに設定した。13 週間試験は、F344/DuCrIj ラットの雌雄に、0 (対照群)、640、1600、4000、7000 及び 10000 ppm (w/w) の濃度の被験物質混合飼料を自由摂取させることにより実施した。13 週間試験の結果、投与群に死亡はみられなかったが、以下に示す用量相関性のある変化が認められた。雌雄とも体重増加の抑制や摂餌量の低値が認められ、また、貧血や貧血に対応する変化、肝臓への影響 (肝臓重量の高値、小葉中心性の肝細胞肥大、血漿中の脂質の高値) が認められた。さらに、腎臓に雄では好酸体の増強、雌では近位尿細管の褐色色素沈着が認められた。体重増加の抑制は雄 7000 ppm 以上の群 (最終体重は対照群

に対し、7000 ppm 群：91%、10000 ppm 群：85%）と雌 4000 ppm 以上の群（最終体重は対照群に対し、4000 ppm 群：91%、7000 ppm 群：88%、10000 ppm 群：87%）に、貧血や貧血に対応する変化は雄 4000 ppm 以上の群と雌 1600 ppm 以上の群に、肝臓への影響は全ての投与群に、腎臓の変化は雄 7000 ppm 以上の群と雌 4000 ppm 以上の群に認められた。

以上の結果、雄では 10000 ppm 群で、雌では 7000 ppm 以上の群で対照群に対して 10% 以上の体重増加の抑制があることから、これらの濃度はがん原性試験の最高投与濃度としては高いと考えられた。一方、雄 7000 ppm 群、雌 4000 ppm 群の体重増加の抑制は対照群に対して 10% 以内であり、貧血を含むその他の変化も動物の生死に影響を与えるほどのものではないと考えられた。従って、がん原性試験の最高投与濃度は、雄は 7000 ppm、雌は 4000 ppm が適切であると判断した。なお、がん原性試験の最低濃度は、雌雄とも 13 週間試験では、最低投与濃度の 640 ppm 群でも肝臓への影響が認められたことから、640 ppm 以下の投与濃度が適切であると考えた。

従って、がん原性試験の投与濃度は、雄は 7000 ppm を最高投与濃度とし、以下、1400 ppm 及び 280 ppm（公比 5）、雌は 4000 ppm を最高投与濃度とし、以下、800 ppm 及び 160 ppm（公比 5）に決定した。

#### - 1 - 6 被験物質混合飼料の調製方法

粉末飼料（オリエンタル酵母工業（株）製 CRF-1）と被験物質をスパイラルミキサー（関東混合機工業（株）SS-251、CS-20 または HP-20M）で攪拌混合し、設定した濃度の被験物質混合飼料を調製した。初めに粉末飼料と被験物質を攪拌混合し、20000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 20000 ppm 被験物質混合飼料を更に粉末飼料と攪拌混合し、160、280、800、1400、4000 及び 7000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。試験における濃度の表示は ppm（w/w）とした。また、被験物質混合飼料の調製は、投与開始日前日より 2 週に 1 回調製し、1 週分をラット用餌箱に充填して翌日より動物に与えた。残余は、各濃度毎にビニール袋に小分け密封し、使用時まで冷蔵保管した。

#### - 1 - 7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性

被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性は、初回調製時に 7 点、それ以降は約 3 ヶ月毎に各 3 点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ（株）島津製作所 LC-10）を用いて測定し、確認した。なお、初回調製時のサンプリングは各調製濃度における均一性の確認を合わせて行った。

その結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対して 93.7～109%の範囲にあった。また、均一性は各調製濃度ともばらつきが少なかった。従って、被験物質混合飼料は、設定濃度に

対して正確に調製されたことを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 2-1、均一性については APPENDIX 2-2 に示す。

#### - 1 - 8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性

被験物質混合飼料中の被験物質の安定性は、13 週間毒性試験(試験番号 0745)において、100、640 及び 10000 ppm の被験物質混合飼料で確認した。すなわち、100、640 及び 10000 ppm の被験物質混合飼料をラット用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管(8 日間)したものと、ビニール袋詰めにして密封し、冷蔵保管(8 日間)したものについて、調製時と保管期間後の被験物質濃度を、高速液体クロマトグラフ(株)島津製作所 LC-10)を用いて測定した。調製時と保管期間後の被験物質濃度を比較した結果、被験物質混合飼料中の被験物質は安定であった。

その結果を APPENDIX 2-3 に示す。

#### - 1 - 9 被験物質の摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より、動物の体重(kg)当たりの被験物質 1 日摂取量(mg/kg 体重/日)を算出した。

### - 2 動物管理

#### - 2 - 1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

群名称	雄 使用動物数(動物番号)	群名称	雌 使用動物数(動物番号)
対照群	50匹 (1001 ~ 1050)	対照群	50匹 (2001 ~ 2050)
280 ppm群	50匹 (1101 ~ 1150)	160 ppm群	50匹 (2101 ~ 2150)
1400 ppm群	50匹 (1201 ~ 1250)	800 ppm群	50匹 (2201 ~ 2250)
7000 ppm群	50匹 (1301 ~ 1350)	4000 ppm群	50匹 (2301 ~ 2350)

## - 2 - 2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から体重の中央値に近い雌雄各 200 匹を選別し、体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式)により実施した(文献 8)。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室(雄:203室、雌:205室)に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

## - 2 - 3 飼育条件

### (1) 飼育環境

動物は、全飼育期間を通して以下の環境で飼育した。各飼育室の温度、湿度は実測値(平均値±標準偏差)を< >内に記した。各飼育室内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温度 : 23±2 < 203室:22.5±0.3、205室:22.7±0.3 >

湿度 : 55±15% < 203室:57±2%、205室:56±2% >

明暗サイクル: 12時間点灯(8:00~20:00)/12時間消灯(20:00~8:00)

換気回数 : 15~17回/時

ケージへの動物の収容方法 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

ステンレス製2連網ケージ(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-線照射滅菌飼料)固型または粉末飼料を使用した。検疫期間については固型飼料を固型飼料給餌器により自由摂取させた。馴化期間についてはCRF-1粉末飼料を粉末飼料給餌器により自由摂取させた。投与期間は、各投与群には所定の濃度にCRF-1粉末飼料を用いて調製した被験物質混合飼料を、対照群にはCRF-1粉末飼料のみを粉末飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株)から分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は試験計画書に

規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

### (3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水(神奈川県秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所(神奈川県秦野市落合 729-5)に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

#### - 3 観察・検査項目及び方法

##### - 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日1回、また、一般状態の詳細な観察は週1回行った。

##### - 3 - 2 体重測定

体重測定は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)行った。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重(搬出時体重)を測定した。

##### - 3 - 3 摂餌量測定

摂餌量は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)給餌量、残餌量及び餌こぼし量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂餌量を算出した。

##### - 3 - 4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりEDTA-2カリウム入り採血管及びヘパリンリチウム入り採血管(下記 印検査項目)に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示す。

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

### - 3 - 5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示す。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 $\gamma$ -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 尿検査

投与 104 週の検査時まで生存した動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティステック、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

### - 3 - 7 病理学的検査

#### (1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

#### (2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

#### (3) 病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、鼠径等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

#### - 4 数値処理と統計方法

##### - 4 - 1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

体重は g を単位とし、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 3 に示した単位と桁数により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

##### - 4 - 2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は、Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1～4 に分け、<sup>2</sup>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<sup>2</sup>検定を行った。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの担腫瘍動物数について、Peto 検定（文献 9）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また Peto 検定は病理組

織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法(コンテックス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定)、有病率法(コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定)、死亡率法+有病率法(コンテックス 0~4 の総計で検定)を行った。

各群雌雄ごとに検査数が 2 以下の項目については、検定より除外した。

各検定は 5%の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5%及び 1%の有意水準の表示を行った。

注：Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖動物にみつかった腫瘍

1：死亡/瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思いが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍

4：死亡/瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

## 試験成績

### - 1 生死状況

生死状況を TABLE A 1, 2 及び FIGURE 1, 2 に示す。

#### - 雄 -

各投与群の投与終了時の生存率は対照群とほぼ同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：38 匹（76%）、280 ppm 群：36 匹（72%）、1400 ppm 群：41 匹（82%）、7000 ppm 群：33 匹（66%）であった。

#### - 雌 -

4000 ppm 群の生存率は、投与 89 週目までは対照群と同様であったが、90 週目以降に低下し、投与終了時は対照群より低値であった。160 ppm 群と 800 ppm 群の生存率は対照群とほぼ同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：34 匹（68%）、160 ppm 群：39 匹（78%）、800 ppm 群：42 匹（84%）、4000 ppm 群：3 匹（6%）であった。

### - 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示す。

#### - 雄 -

全投与群で、黄色尿が全投与期間を通して全動物に認められた。また、外陰部周囲の被毛の着色（黄色）が全動物に認められた。

#### - 雌 -

全投与群で、黄色尿が全投与期間を通して全動物に認められた。また、外陰部周囲の被毛の着色（黄色）が 160 ppm 群では 48 匹、800 ppm 群と 4000 ppm 群では全動物に認められた。

### - 3 体重

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

#### - 雄 -

7000 ppm 群では、投与期間を通して体重の低値が認められた。1400 ppm 群と 280 ppm 群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、280 ppm 群：101%、1400 ppm 群：96%、7000 ppm 群：68%であった。

- 雌 -

4000 ppm 群では、投与期間を通して体重の低値が認められた。800 ppm 群と 160 ppm 群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、最終計測日(104週)の各投与群の体重は、対照群に対して、160 ppm 群：101%、800 ppm 群：98%、4000 ppm 群：53%であった。

#### - 4 摂餌量

摂餌量を TABLE D 1～4 及び FIGURE 5, 6 に示す。

- 雄 -

7000 ppm 群では、投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。1400 ppm 群と 280 ppm 群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量(対照群に対する相対比)は、対照群：15.7g、280 ppm 群：15.8g(101%)、1400 ppm 群：15.7g(100%)、7000 ppm 群：14.0g(89%)であった。

- 雌 -

4000 ppm 群では、投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。800 ppm 群と 160 ppm 群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量(対照群に対する相対比)は、対照群：11.4g、160 ppm 群：11.5g(101%)、800 ppm 群：11.6g(102%)、4000 ppm 群：10.4g(91%)であった。

#### - 5 被験物質摂取量

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

- 雄 -

各投与群の被験物質摂取量(mg/kg 体重/日)は、280 ppm 群：10～25、1400 ppm 群：48～122、7000 ppm 群：261～546 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、280 ppm 群：13、1400 ppm 群：65、7000 ppm 群：333 であった。全投与期間にわたって平均した各投与群の被験物質摂取量の比率は、280 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1400 ppm 群で 5.0 倍、7000 ppm 群で 25.6 倍であり、それぞれの群の被験物質摂取量は設定濃度比(公比 5)を反映した値であった。

- 雌 -

各投与群の被験物質摂取量(mg/kg 体重/日)は、160 ppm 群：7～14、800 ppm 群：35～72、4000 ppm 群：200～334 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、160 ppm 群：9、800 ppm 群：46、4000

ppm 群：238 であった。全投与期間にわたって平均した各投与群の被験物質摂取量の比率は、160 ppm 群の被験物質摂取量に対して、800 ppm 群で 5.1 倍、4000 ppm 群で 26.4 倍であり、それぞれの群の被験物質摂取量は設定濃度比（公比 5）を反映した値であった。

#### - 6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示す。

- 雄 -

赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値、並びに血小板数の高値が 1400 ppm 以上の群に認められた。また、網赤血球比とメトヘモグロビン濃度の高値、並びに MCHC、白血球百分率でリンパ球比と好酸球比の低値が 7000 ppm 群で認められた。

- 雌 -

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCHC 及び白血球百分率で好酸球比の低値、並びに MCV、網赤血球比及び白血球百分率で好中球比の高値が 4000 ppm 群で認められた。また、血小板数の高値が 800 ppm 群で認められた。なお、4000 ppm 群のメトヘモグロビン濃度と血小板数は、統計学的に有意でないものの高値傾向であった。

#### - 7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示す。

- 雄 -

A/G 比の低値、並びに総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、尿素窒素、クレアチニン、カルシウム及び無機リンの高値が 1400 ppm 以上の群に認められた。また、総蛋白、アルブミン及びクロールの低値、並びに ALT、 $\gamma$ -GTP 及びカリウムの高値が 7000 ppm 群に認められた。

- 雌 -

総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、グルコース及びトリグリセライドの低値、並びに AST、ALT、LDH、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、無機リンの高値が 4000 ppm 群に認められた。また、総コレステロールとリン脂質の高値が 160 ppm 群と 800 ppm 群に、カルシウムの高値が 800 ppm 群に認められた。

#### - 8 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示す。

- 雄 -

蛋白の陽性度の減少が 280 ppm 以上の群で認められた。また、pH の低下が 1400 ppm

以上の群で認められた。

なお、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン及びウロビリノーゲンの検査において、被験物質の代謝物と考えられる尿の着色(黄色)のため、尿試験紙による判定ができなかった動物がみられた。判定ができなかった動物数は、蛋白：1400 ppm 群 1 匹、7000 ppm 群 17 匹、グルコース：1400 ppm 群 22 匹、7000 ppm 群 28 匹、ケトン体：280 ppm 群 1 匹、1400 ppm 群 2 匹、7000 ppm 群 24 匹、ビリルビン：280 ppm 群 2 匹、1400 ppm 群 20 匹、7000 ppm 群 29 匹及びウロビリノーゲン：280 ppm 群 2 匹であった。

- 雌 -

潜血の陽性例の増加が 4000 ppm 群に認められた。また、pH の上昇が 160 ppm 群、低下が 4000 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

なお、グルコース、ケトン体、ビリルビン及びウロビリノーゲンの検査において、被験物質の代謝物と考えられる尿の着色(黄色)のため、尿試験紙による判定ができなかった動物がみられた。判定ができなかった動物数は、グルコース：800 ppm 群 2 匹、4000 ppm 群 3 匹、ケトン体：800 ppm 群 6 匹、4000 ppm 群 3 匹、ビリルビン：800 ppm 群 9 匹、4000 ppm 群 2 匹及びウロビリノーゲン：800 ppm 群 6 匹であった。なお、4000 ppm 群のグルコース、ケトン体及びビリルビンは、統計学的に評価ができなかった。

## - 9 病理学的検査

### - 9 - 1 剖検

剖検所見を TABLE I 1 ~ 6 に示す。

- 雄 -

腎臓の顆粒状変化が 1400 ppm 以上の群に多くみられた(対照群 5 匹、280 ppm 群 2 匹、1400 ppm 群 13 匹、7000 ppm 群 29 匹)。

精巢の結節が 7000 ppm 群に多くみられた(対照群 32 匹、280 ppm 群 27 匹、1400 ppm 群 36 匹、7000 ppm 群 45 匹)。

- 雌 -

肺の白色斑が 4000 ppm 群で多くみられた(対照群 0 匹、160 ppm 群 1 匹、800 ppm 群 0 匹、4000 ppm 群 29 匹)。

胸腔の胸水貯留が 4000 ppm 群で多くみられた(対照群 2 匹、160 ppm 群 0 匹、800 ppm 群 0 匹、4000 ppm 群 43 匹)。

眼球の混濁が 4000 ppm 群で多くみられた(対照群、160 ppm 群及び 800 ppm 群各 0 匹、4000 ppm 群 5 匹)。

## - 9 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示す。

- 雄 -

肺と肝臓の実重量と体重比の高値が 1400 ppm 以上の群で認められた。また、腎臓の実重量の高値が 1400 ppm 群で、体重比の高値が 1400 ppm 以上の群でみられた。その他、1400 ppm 群あるいは 7000 ppm 群で、副腎、精巣、心臓、脾臓及び脳の実重量や体重比に変化がみられたが、1400 ppm 群と 7000 ppm 群の搬出時体重は対照群と比較して低値であり、これらの臓器重量の変化は体重の低値に関連したものと考えられた。

- 雌 -

肺の実重量と体重比の高値が 4000 ppm 群で認められた。また、肝臓の体重比の高値が 800 ppm 以上の群でみられた。その他、4000 ppm 群で、副腎、卵巣、心臓、腎臓、脾臓及び脳の実重量や体重比に変化がみられたが、4000 ppm 群の搬出時体重は対照群と比較して低値であり、これらの臓器重量の変化は体重の低値に関連したものと考えられた。

## - 9 - 3 病理組織学的検査

検査結果のうち非腫瘍性病変を TABLE L 1～6 に示す。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を TABLE M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を TABLE N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE O 1, 2 に、転移性病変を TABLE P 1, 2 に示す。また、腫瘍のうち統計学的に有意差が認められた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ(検査総匹数と腫瘍発生匹数、試験ごとの平均発生率(%)と発生率(最小%～最大%))を TABLE Q に示す。また、病理組織学的所見の代表例を写真 1～6 に示す。

- 雄 -

### 1) 腫瘍性病変

#### < 甲状腺 >

濾胞状腺腫の発生(対照群: 0 匹, 0%、280 ppm 群: 1 匹, 2%、1400 ppm 群: 0 匹, 0%、7000 ppm 群: 3 匹, 6%) が Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示したが、濾胞状腺癌の発生(対照群: 0 匹, 0%、280 ppm 群: 0 匹, 0%、1400 ppm 群: 1 匹, 2%、7000 ppm 群: 0 匹, 0%) は増加傾向を示さなかった。また、濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生(対照群: 0 匹, 0%、280 ppm 群: 1 匹, 2%、1400 ppm 群: 1 匹, 2%、7000 ppm 群: 3 匹, 6%) が Peto 検定(有病率法)で増加傾向を示したが、当センターのヒストリカルコントロールの範囲(濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生: 最小 0%～最大 8%、平均 2.2%) 内にあることから、これらの腫瘍の発生増加は被験物質投与による影響ではないと判断した。

#### < 精巢 >

間細胞腫の発生( 対照群: 41 匹, 82%、280 ppm 群: 35 匹, 70%、1400 ppm 群: 43 匹, 86%、7000 ppm 群: 47 匹, 94% ) が Peto 検定 ( 有病率法 ) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示したが、当センターのヒストリカルコントロールの範囲 ( 最小 56% ~ 最大 98%、平均 82.3% ) 内にあることから、この腫瘍の発生増加は被験物質投与による影響ではないと判断した。なお、間細胞腫は、剖検時の肉眼所見では精巢の結節として認められた。

皮膚の角化棘細胞腫の発生が Fisher 検定で 7000 ppm 群、甲状腺の C 細胞腺腫の発生が Fisher 検定で 280 ppm 群と 7000 ppm 群に有意な減少を示した。また、下垂体の腺腫、副腎の褐色細胞腫の発生が Fisher 検定で 7000 ppm 群に有意な減少を示し、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

#### 2) 非腫瘍性病変

##### < 腎臓 >

慢性腎症の程度が 1400 ppm 以上の群で増強した。腎盂における尿路上皮過形成の発生が 1400 ppm 以上の群で増加し、腎盂と乳頭の鉍質沈着の発生が 7000 ppm 群で増加した。なお、慢性腎症は、肉眼所見では腎臓の顆粒状変化として認められた。

##### < 骨髄 >

造血亢進の発生が 7000 ppm 群で増加した。

##### < 鼻腔 >

嗅上皮下の嗅腺において褐色色素沈着の発生が 1400 ppm 以上の群で増加した。また、異物性炎症の発生が 7000 ppm 群で増加し、その程度が増強した。

その他、肝臓の肝海綿状変性の発生が 1400 ppm 群で増加したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。また、鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化と腺の呼吸上皮化生の発生減少が 7000 ppm 群に、心臓の心筋線維症と肝臓の好酸性小増殖巣の発生減少が 280 ppm 群に、下垂体の嚢胞の発生減少が 280 ppm 群と 1400 ppm 群にみられた。

- 雌 -

#### 1) 腫瘍性病変

被験物質の投与による腫瘍の発生増加はみられなかった。

下垂体の腺腫と甲状腺の C 細胞腺腫の発生が Fisher 検定で 4000 ppm 群に有意な減少を示し、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

## 2) 非腫瘍性病変

### < 腎臓 >

慢性腎症の発生が 800 ppm 以上の群で増加し、その程度が増強した。腎盂の尿路上皮過形成と鉍質沈着の発生が 4000 ppm 群で増加した。

### < 骨髄 >

造血亢進とヘモジデリン沈着の発生が 4000 ppm 群で増加した。

### < 眼球 >

角膜炎と虹彩炎の発生が 4000 ppm 群で増加した。なお、角膜炎や虹彩炎は、肉眼所見では眼球の混濁として認められた。

### < 肺 >

水腫、限局性線維化及び泡沫細胞の出現の発生が 4000 ppm 群で増加した。水腫には炎症性細胞浸潤を伴うものが多くみられた。なお、水腫、限局性線維化あるいは泡沫細胞の出現は、肉眼所見では肺の白色斑として認められた。

### < 胃 >

腺胃の鉍質沈着の発生が 4000 ppm 群で増加した。

### < 心臓 >

心筋線維症の発生が 4000 ppm 群で増加した。

### < 副腎 >

出血の発生が 4000 ppm 群で増加した。

### < 鼻腔 >

嗅上皮下の嗅腺における褐色色素沈着の発生が 800 ppm 以上の群で増加した。

その他、眼球の網膜萎縮の発生減少が 800 ppm 以上の群に、鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化、呼吸上皮の炎症及び腺の呼吸上皮化生、甲状腺の C 細胞過形成、子宮の嚢胞状内膜過形成の発生減少が 4000 ppm 群にみられた。

## - 9 - 4 死因

病理学的にみた死亡 / 瀕死の原因を TABLE R 1, 2 に示す。

### - 雄 -

7000 ppm 群で慢性腎症による死亡が多く認められた。総死亡 / 瀕死動物数に対して慢性腎症を死因とした動物数は、17 匹中 10 匹であった。

### - 雌 -

4000 ppm 群で慢性腎症による死亡が多く認められた。総死亡 / 瀕死動物数に対して慢性腎症を死因とした動物数は、47 匹中 40 匹であった。

## 考察及びまとめ

4-クロロ-2-ニトロアニリンのラットを用いた 2 年間の混餌投与による経口試験（投与濃度は雄：280、1400 及び 7000 ppm、雌：160、800 及び 4000 ppm）によって、下記の結果を得た。

### - 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、被験物質摂取量

生存率は、雌の 4000 ppm 群で慢性腎症による死亡により顕著な低下がみられた。雄の 7000 ppm 群も慢性腎症を死因とする動物が多かったが、総死亡数は対照群と比較して顕著な差はみられなかった。一般状態の観察では、代謝物によると考えられる黄色尿と外陰部周囲の被毛の着色（黄色）が雌雄の全投与群で認められた。体重は、雄の 7000 ppm 群と雌の 4000 ppm 群で投与期間を通して低値が認められ、最終体重は対照群に対し、雄 7000 ppm 群 68%、雌 4000 ppm 群 53%であった。摂餌量は、雄の 7000 ppm 群と雌の 4000 ppm 群で投与期間を通して低値であった。各群の平均被験物質摂取量は、設定濃度比を反映した値であった。

### - 2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

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

### - 3 その他の影響

4-クロロ-2-ニトロアニリンの混餌経口投与により、雌雄の腎臓及び血液/造血系、雌の眼球、肺、心臓及び副腎に対する影響を認めた。

腎臓では、慢性腎症が雄では対照群を含む殆どの動物にみられ、雌でも多くの動物にみられた。腎臓への影響として、雄の 1400 ppm 以上の群に慢性腎症の程度の増強、雌の 800 ppm 以上の群に発生増加と程度の増強がみられた。また、慢性腎症を死因とする例が雌雄とも最高投与濃度群で多く認められた。慢性腎症はラットの腎臓の加齢性病変であり、長期飼育されたラットに好発することが知られている。本試験で使用した F344 ラットでも高頻度に発生し、雄で顕著であるが、雌ではその発生率は雄より低く、進行も遅いと報告されている（文献 10, 11, 12）。4-クロロ-2-ニトロアニリンの長期投与は、雄ラットの慢性腎症の程度を顕著に増強させ、雌ラットの慢性腎症を顕著に増加・増強させたと考えた。また、雄の 1400 ppm 以上の群で腎盂の尿路上皮過形成の発生増加と血液の尿素窒素とクレアチニンの高値がみられ、7000 ppm 群で腎盂と乳頭の鉍質沈着の発生が増加した。雌では 4000 ppm 群で

腎盂の尿路上皮過形成と鉍質沈着の発生が増加し、尿素窒素とクレアチニンの高値、尿潜血の陽性例の増加が認められた。さらに、雌 4000 ppm 群の腺胃に鉍質沈着や、剖検時に胸腔内への胸水貯留を示す例も多くみられた。慢性腎症の二次的な変化として、様々な臓器や血管壁への鉍質沈着、腎盂の尿路上皮過形成、及び尿素窒素等の血液生化学変化がみられることが知られており（文献 13, 14）、上記の変化は主に慢性腎症に伴った二次的な変化と考えられた。また、本試験の予備試験として行った 13 週間混餌経口投与試験（文献 7）では、腎臓への影響は、 $\alpha_2$ -グロブリン蓄積による好酸体の程度の増強（雄 7000 ppm 以上の群）、尿素窒素の高値（雄 4000 ppm 以上の群と雌の 7000 ppm 以上の群）が認められており、4-クロロ-2-ニトロアニリンの長期投与により、腎臓への影響は雌雄ともより低用量まで認められた。

血液 / 造血系への影響として貧血が示され、雄の 1400 ppm 以上の群と雌の 4000 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の低値が認められ、それらの変化に伴い、MCHC（雌雄）、MCV（雌）にも変化がみられた。また、血小板数の高値（雄 1400 ppm 以上の群、雌 800 ppm 以上の群）、網赤血球比の高値（雄 7000 ppm 群、雌 4000 ppm 群）もみられた。さらに、雄の 7000 ppm 群でメトヘモグロビン濃度の高値が認められ、雌の 4000 ppm 群でも高値傾向であった。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 15, 16）。従って、本試験で雌雄に認められた貧血は、4-クロロ-2-ニトロアニリン投与によるメトヘモグロビン血症によるものと考えられた。また、網赤血球比の高値は、赤血球傷害に対応する代償性的変化と考えられた。病理組織学的検査において、骨髄の造血亢進（雄 7000 ppm 群、雌 4000 ppm 群）とヘモジデリン沈着の発生増加（雌 4000 ppm 群）が認められた。これらの変化は、血液中のメトヘモグロビンの増加による赤血球の破壊の亢進に起因した変化と考えられた。予備試験の 13 週間混餌経口投与試験でも、雌雄ともメトヘモグロビンの増加（雄 10000 ppm 群、雌 7000 ppm 以上の群）や貧血を示すパラメータの変化とその二次的な変化が認められており、4-クロロ-2-ニトロアニリンの長期投与により、メトヘモグロビン血症は雌雄ともより低用量で認められた。

その他、雌の 4000 ppm 群では、眼球に角膜炎と虹彩炎の発生増加、肺に水腫、限局性線維化及び泡沫細胞出現の発生増加、心臓に心筋線維症の発生増加、副腎に出血の発生増加が認められた。これらの変化は、予備試験の 13 週間混餌経口投与試験では、雌雄ともに認められず、4-クロロ-2-ニトロアニリンの長期間投与により雌にのみ影響が示されたが、これらの原因や機序等についてはいずれも不明であった。

なお、鼻腔では、嗅腺に褐色色素沈着（雌雄）と異物性炎症（雄）がみられた。これらの鼻腔の変化は、予備試験の 13 週間混餌経口投与試験ではみられなかったが、4-クロロ-2-ニトロアニリンの長期投与により認められた。被験物質またはその代謝物が血行性に鼻腔に影響を与えた可能性は否定できないが、被験物質を混合した粉餌を吸入することにより、鼻腔に病理組織学的変化が出現した可能性が考えられる。

#### - 4 投与濃度設定の評価

OECD テストガイドライン(文献6)では、がん原性試験の最高用量の設定に際しては、最高用量は主要な標的器官と毒性影響を明らかにするが、苦痛、高度な毒性、病的状態または死亡を引き起こさないような用量とする。すなわち、最高用量は通常、体重増加抑制(約10%)などで示される明らかな毒性が得られるように設定することと定めている。また、労働省労働基準局長通達「がん原性試験による調査の基準」(文献5)でも、最高用量は、「あらかじめ1ヶ月から3ヶ月の短期試験を行い、その結果により決定し、最高用量は腫瘍以外の原因で正常な寿命を変えることなく、かつ、最小限の毒性兆候を表すのに十分な用量とすること」と定めている。

本試験の投与濃度は、予備試験である13週間毒性試験(文献7)の結果をもとに設定した(-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定期理由を参照)。本試験の結果、雌雄とも腫瘍及び腫瘍関連病変の増加は認められなかった。しかし、最高用量では体重増加の抑制(投与終了時に対照群に対し、雄7000 ppm群68%、雌4000 ppm群53%)が認められ、特に雌では顕著な生存率の低下がみられた。その死因の多くは非腫瘍性病変である慢性腎症であった。以上の結果は、予備試験の13週間毒性試験の結果からは推測できないものであったが、結果的に雌雄とも最高用量はやや高い設定であったと考えられる。しかし、雌の4000 ppm群の生存率は、投与90週目以降に低下し、多くの動物は2年間(104週間)の試験期間終了近くまで被験物質を投与された。また、雄の7000 ppm群では、生存率に顕著な差はみられなかった。従って、本試験の濃度設定における発がん性の評価は可能であったと考える。

#### - 5 無毒性量 (NOAEL)

以上のように、本がん原性試験では、雌雄の腎臓及び血液/造血系、雌の眼球、肺、心臓及び副腎への影響を認めた。その中で、最も低用量まで認められた毒性変化は、雄では腎臓への影響(慢性腎症の程度の増強、腎盂尿路上皮過形成の発生増加、尿素窒素とクレアチニンの高値)及び血液/造血系への影響(赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値、血小板数の高値)が、それぞれ1400 ppm群まで認められた。また、雌では、腎臓への影響(慢性腎症の発生増加と程度の増強)及び血液/造血系への影響(血小板数の高値)がそれぞれ800 ppm群まで認められた。従って、本試験における4-クロロ-2-ニトロアニリンのラットに対する2年間混餌経口投与による無毒性量(NOAEL)は、雌雄とも、腎臓及び血液/造血系への影響をエンドポイントとして、雄では280 ppm(13 mg/kg 体重/日)、雌では160 ppm(9 mg/kg 体重/日)であると考えられた。

## - 6 他文献との比較等

### (1) がん原性等

4-クロロ-2-ニトロアニリンのラットを用いた経口投与によるがん原性試験または長期毒性試験の報告はない。

*in vitro*での発がん物質検出試験として、株化細胞のBALB/c-3T3細胞を用いて実施した細胞形質転換試験の報告があり、陰性の結果であった。この形質転換試験では、予備的な細胞毒性試験で細胞毒性が認められる用量(0.638 mM)を確認した後、2回の本試験を実施しており、1回目の本試験の最高用量は0.870 mM、2回目の本試験の最高用量は0.580 mMで実施している(文献17)。

### (2) 遺伝毒性

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

微生物を用いる変異原性試験として、ネズミチフス菌TA98、TA100の2菌株において代謝活性化(ラットS9)の有無で試験を実施した結果、TA98の代謝活性化(ラットS9)による場合で陽性の結果を示した(文献18)。また、ネズミチフス菌TA98、TA100、TA1535、TA1537の4菌株において代謝活性化(ラットS9及びハムスターS9)の有無で試験を実施した結果、TA98及びTA100の代謝活性化(ハムスターS9)による場合、及びTA98の代謝活性化(ラットS9)による場合で陽性の結果を示した(文献19)。

染色体異常試験では、チャイニーズハムスターの株化細胞CHO-W-B1を用いて代謝活性化の有無で試験を実施した結果、代謝活性化による場合は陽性(302-351 µg/mL)、代謝活性化によらない場合は陰性であった(文献20)。

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

マウスリンフォーマ試験では、株化細胞のマウスリンフォーマL5178Y TK<sup>+/+</sup>を用いて代謝活性化の有無で試験を実施した結果、代謝活性化による場合は陽性(90-100 µg/mL)、代謝活性化によらない場合も陽性(1-4 µg/mL)であった(文献21)。

4-クロロ-2-ニトロアニリンの*in vivo*変異原性については、マウス骨髄小核試験で陰性の報告がある。NMRIマウスに2200 mg/kg体重の用量で、単回強制経口投与(雌雄各群5匹)し、投与後24、48、72時間後に小核標本を作製した。試験の結果、小核を伴う多染性赤血球または正染性赤血球の数に増加は認められなかった。また、正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合に有意な変化は認められなかった(文献22)。

## 結論

F344/DuCrIjCrIj 雌雄ラットを用いて、4-クロロ-2-ニトロアニリンの2年間(104週間)にわたる経口投与によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

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

## 文献

1. 化学工業日報社. 2010. 15710 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 752-753.
2. 東京化成工業(株). 2000. 化学物質等安全データシート.
3. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
4. 東京化成工業(株). 2009. 4-クロロ-2-ニトロアニリン, 赤外吸収スペクトル.
5. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日.
6. OECD. 2009. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies", Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
7. 日本バイオアッセイ研究センター. 2011. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの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. 神奈川: 中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター.
8. 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14: 7285-7302 .
9. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. Lyon: IARC. IARC Monographs Suppl 2: 311-426.
10. 伊東信行編著. 1994. 標的器官の毒性病理(2), 泌尿器系 C. 腎臓. 最新毒性病理学. 東京: 中山書店, 193-218.
11. Montgomery CA Jr, Seely JC. 1990. Kidney. In: Pathology. of the Fischer Rat. (Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, MacKenzie WF, eds). San Diego, CA: Academic press, 127-153.

12. Alden CL, Frith CH. 1991. Urinary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology. (Haschek WM, Rousseaux CG, eds). San Diego, CA: Academic press, 315-387.
13. Short BG, Goldstein RS. 1994. Nonneoplastic lesions in the kidney. In: Pathology of the aging rat, Vol 1 (Mohr U, Dungworth DL, Capn CC, eds). Washington, DC: ILSI press, 211-225.
14. Montgomery CA, Seely JC. 1990. Kidney. In: Pathology of the Fischer rat reference and atlas. (Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, MacKenzie WF eds). San Diego: Academic Press, 127-135.
15. Bingham E and McGowan WJ, 2012. Aromatic Nitro and Amino Compounds. In: Patty's Toxicology, 6th ed (Bingham E and Cohrssen B eds.) Hoboken NJ: John Wiley & Sons, Vol. 2, 517-607.
16. 石津澄子. 1978. 芳香族ニトロアミノ化合物による中毒, 新労働衛生ハンドブック(増補第3版). 三浦豊彦 編. 神奈川: 労働科学研究所出版部. 854-859.
17. Matthews EJ, Spalding JW, Tennant RW. 1993. Transformation of BALB/c-3T3 cells: IV. Rank-ordered potency of 24 chemical responses detected in a sensitive new assay procedure. Environ Health Perspect. 101 (Suppl 2): 319-345.
18. 河合明宏, 後藤純雄, 松本由美子, 松下秀鶴. 1987. 脂肪族および芳香族ニトロ化合物の変異原性 工業材料およびその関連物質. 産業医学 29: 34-54.
19. Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Spec W, Zeiger E. 1983. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ Mutagen. 5 (Supple 1): 3-142.
20. Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, et al. 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. Environ Mol Mutagen 10 (Suppl 10): 1-175.
21. National Toxicology Program, Database Search Application: 4-Chloro-2-nitroaniline. [http://tools.niehs.nih.gov/ntp\\_tox/index.cfm?fuseaction=ntpsearch.showStudiesForChemical&cas\\_no=89-63-4](http://tools.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm?fuseaction=ntpsearch.showStudiesForChemical&cas_no=89-63-4) [accessed 22 July 2014].

22. GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals. 2004. 4-Chloro-2-nitroaniline. BUA Report 235. Stuttgart: Hirzel Verlag.

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

尿検査において、投与群では被験物質の代謝物と考えられる尿の着色(黄色)が認められたため、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン及びウロビリノーゲンの検査では、尿試験紙で判定できない動物がみられた。尿検査の中で統計学的に評価ができなかつたものは、雌 4000 ppm 群のグルコース、ケトン体及びビリルビンであった。

その他、予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。