

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

試験番号：0372

CAS No. 615-28-1

2004年2月26日

**中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター**

標題

o-フェニレンジアミン二塩酸塩のマウスを用いた経口投与によるがん原性試験(混水試験)

試験目的

o-フェニレンジアミン二塩酸塩をマウスに 104 週間経口（混水）投与し、がん原性を検索した。

試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準について」及び OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 1981 年 5 月 12 日採択）に準じて実施した。

GLP 対応

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

試験委託者

労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課
東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

試験施設及び運営管理者

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
所長 松島 泰次郎
神奈川県秦野市平沢 2445

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

試験番号：0372

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、示性式、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 被験物質混合飲水の調製方法	6
II-1-7 調製時における被験物質混合飲水中の被験物質の濃度	6
II-1-8 被験物質混合飲水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	7
Ⅱ－2－3	飼育条件	8
Ⅱ－3	観察・検査項目及び方法	8
Ⅱ－3－1	動物の一般状態の観察	8
Ⅱ－3－2	体重測定	9
Ⅱ－3－3	摂水量測定	9
Ⅱ－3－4	摂餌量測定	9
Ⅱ－3－5	血液学的検査	9
Ⅱ－3－6	血液生化学的検査	9
Ⅱ－3－7	尿検査	10
Ⅱ－3－8	病理学的検査	10
Ⅱ－4	数値処理と統計処理	10
Ⅱ－4－1	数値の取り扱いと表示	10
Ⅱ－4－2	母数の取り扱い	11
Ⅱ－4－3	統計処理	11
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	摂水量	13
Ⅲ－5	摂餌量	14
Ⅲ－6	被験物質摂取量	14
Ⅲ－7	血液学的検査	14
Ⅲ－8	血液生化学的検査	15
Ⅲ－9	尿検査	15
Ⅲ－10	病理学的検査	15
Ⅲ－10－1	剖検	15
Ⅲ－10－2	臓器重量	15
Ⅲ－10－3	病理組織学的検査	16
Ⅲ－10－4	死因	18

IV 考察及びまとめ	19
IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変	19
IV-2 非腫瘍性病変	20
IV-3 その他	20
IV-4 無毒性量(NOAEI)/最小毒性量(LOAEI)及びベンチマーク用量	21
IV-5 他文献との比較等	21
V 結論	23
VI 文献	24

要約

o-フェニレンジアミン二塩酸塩のがん原性を検索する目的でマウス (Crj:BDF₁) を用いた混水経口投与による2年間 (104週間) の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群3群と対照群1群の計4群の構成で、雌雄各群とも50匹とし、合計400匹を用いた。被験物質の投与は、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を混合した飲水を動物に自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雄が2000、1000、500 ppm、雌が4000、2000、1000 ppm (公比2) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重、摂水量及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

生存率は、対照群と比べ、雌でやや高値を示し、体重と摂餌量の低値は、雌雄とも全投与群にみられた。摂水量の低値は雌雄の全投与群にみられたが、雌の2000 ppm以上の群では投与後期に対照群とほぼ同じ値まで回復した。

腫瘍性病変として、雄マウスに肝細胞腺腫、雌マウスに肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められた。雌雄の肝細胞腺腫の発生率はすべての投与群で、雌の肝細胞癌の発生率は2000 ppm以上の群で増加した。また、これらの腫瘍発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲より高い値であった。従って、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩投与により肝臓に悪性腫瘍を含む腫瘍の増加があると考えた。また、前腫瘍性病変の小増殖巣 (好酸性、好塩基性及び明細胞性) の発生が雌の4000 ppm群で増加した。肝臓腫瘍の発生以外にも血液生化学的検査の変化 (ALP 及び GPT の上昇) が観察された。さらに、雌雄で胆嚢の良性腫瘍の乳頭状腺腫の発生増加が認められた。雌雄の乳頭状腺腫の発生率は2000 ppm以上の群で増加した。また、その発生数は当センターのヒストリカルコントロールデータでは前例がない腫瘍であり、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩投与により良性腫瘍の増加があると考えた。その他、鼻腔、鼻咽頭及び腎臓に*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与による影響を示す変化がみられた。

マウスにおける2年間の混水投与による*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の無毒性量及び最小毒性量は、*o*-フェニレンジアミンが強い変異原性を持ち、閾値のない発癌物質と考えられ、肝臓の肝細胞腺腫の増加が最低濃度でもみられたため、求めることは適当ではないと考えた。雄の肝細胞腺腫の10%ベンチマーク用量は134ppm、胆嚢の乳頭状腺腫では1014 ppmとなった。

以上のように、Crj:BDF₁マウスを用いて*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の2年間 (104週間) にわたる混水投与によるがん原性試験を行った結果、雄の肝臓で肝細胞腺腫の発生増加が、雌の肝臓で肝細胞腺腫及び肝細胞癌の顕著な発生増加が、雌雄の胆嚢に乳頭状腺腫の発生増加が認められた。これらの結果は*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の雄マウスに対するがん原性を示す証拠と、雌マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠であると結論づけられた。

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

投 与 濃 度 (ppm)			0	500	1000	2000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数			50	50	50	50		
良性腫瘍	肺	細気管支－肺胞上皮腺腫	5	4	5	2		
	肝臓	肝細胞腺腫	12	25**	34**	35**	↑ ↑	↑ ↑
		血管腫	6	4	1	0*		↓ ↓
	胆嚢	乳頭状腺腫	0	2	4	5*	↑	↑
	全臓器	血管腫	7	5	3	1*		↓
悪性腫瘍	肺	細気管支－肺胞上皮癌	9	4	5	5		
	肝臓	肝細胞癌	6	9	12	10		
	肝臓	肝細胞腺腫＋肝細胞癌	18	29*	39**	38**	↑ ↑	↑ ↑

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

投 与 濃 度 (ppm)			0	1000	2000	4000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数			50	50	50	50		
良性腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	6	22**	23**	34**	↑ ↑	↑ ↑
	胆嚢	乳頭状腺腫	0	1	5*	3		
	下垂体	腺腫	6	3	1	1		↓
	子宮	内膜間質性ポリープ	3	0	0	0		↓
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌	1	4	11**	17**	↑ ↑	↑ ↑
	リンパ節	悪性リンパ腫	22	16	6**	3**		↓ ↓
	子宮	組織球性肉腫	9	18*	10	10		
	全臓器	悪性リンパ腫	23	17	7**	4**		↓ ↓
	肝臓	肝細胞腺腫＋肝細胞癌	6	23**	31**	41**	↑ ↑	↑ ↑

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

* : $p \leq 0.05$ で有意

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加

↓ : $p \leq 0.05$ で有意減少

** : $p \leq 0.01$ で有意

↑ ↑ : $p \leq 0.01$ で有意増加

↓ ↓ : $p \leq 0.01$ で有意減少

(Fisher 検定)

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

(Cochran-Armitage 検定)

I 試験材料

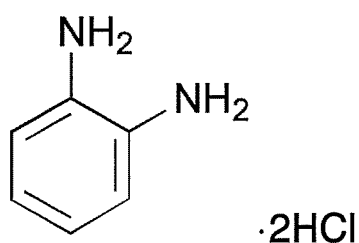
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

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

I-1-2 構造式、示性式、分子量(文献 1)

構造式

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

分子量 : 181.08

I-1-3 物理化学的性状等(文献 1)

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

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : PAG0825
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 グ レ ード : 化学用
 純 度 : 99.5%(和光純薬工業(株)検査成績書データ)

I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性は、使用した *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩について、マスペクトルを質量分析計(Hitachi M-80B)により測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計(Shimadzu FTIR-8200PC)により測定した。

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

それらの結果については、APPENDIX Q 1 に示した。

I-3-2 安定性

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

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

それらの結果については、APPENDIX Q 2 に示した。

I-4 試験動物

動物は日本チャールス・リバー(株)(厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795 番地)の 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：20.9～24.5g、雌：17.5～20.3g)を選別し、試験に供した。

なお、Crj: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

被験物質を飲水に溶解し、設定濃度に調製した被験物質混合飲水を褐色ガラス製給水瓶に充填し、動物に自由摂取させた。

Ⅱ-1-3 投与期間

投与期間は104週間とし、定期解剖日の当日まで連続投与した(1998年12月7日～2000年12月5～11日)。

Ⅱ-1-4 投与濃度

雄は最高投与濃度を2000 ppmに設定し、以下、1000 ppm及び500 ppm(公比2)、雌は最高投与濃度を4000 ppmに設定し、以下、2000 ppm及び1000 ppm(公比2)とした。なお、対照群として、市水をフィルターろ過し、紫外線照射し、脱イオンし、フィルターろ過した水(以下、脱イオン水という)のみの群を設けた。

Ⅱ-1-5 投与の方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は水に可溶であるため、混水による経口投与とした。

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

各群の投与濃度は13週間試験(文献4)の結果をもとに設定した。すなわち、13週間試験では6週齢のCrj:BDF₁マウス(SPF)雌雄にo-フェニレンジアミン二塩酸塩を各設定濃度に調製した飲水を13週間自由摂取させた。1群当たりの動物数は雌雄各10匹とし、被験物質投与群を5群、対照群を1群の6群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも5000、4000、2000、1000及び500 ppmとした。観察、検査として、一般状態の観察、体重・摂水量・摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

13 週間試験の結果より、雄では、5000 ppm と 4000 ppm 群で、体重増加の抑制(抑制率 20%以上)、摂水量と摂餌量の著しい低下がみられた。被験物質投与による影響として、血液系、腎臓及び肝臓にわずかな変化が認められたが、腎臓と肝臓では、病理組織学的には変化はみられなかった。しかし、4000 ppm 以上での長期投与は、動物の寿命に影響を及ぼすと判断した。2000 ppm 群では、摂水量と摂餌量の低下、体重増加の抑制(14%)がみられたが、比較的軽度であった。また、血液系に変化が認められたものの、被験物質の長期投与による毒性により、動物の寿命に影響を及ぼす程度の変化ではないと考えられた。従って、2000 ppm をがん原性試験の最大耐量と考え、以下 1000、500 ppm の 3 段階(公比 2)の濃度を設定した。

雌では、5000 ppm と 4000 ppm 群で、摂水量と摂餌量が低下し、体重増加の抑制がみられたが、5000 ppm 群で 9%、4000 ppm 群で 7%と比較的軽度であった。被験物質投与による影響として、血液系、腎臓及び肝臓に変化が認められたが、腎臓と肝臓では、病理組織学的には変化はみられず、4000 ppm 群での変化は、5000 ppm 群に比べてより軽度であり、被験物質の長期投与による毒性により、動物の寿命に影響を及ぼす程度の変化ではないと考えられた。従って、4000 ppm をがん原性試験の最大耐量と考え、以下 2000、1000 ppm の 3 段階(公比 2)の濃度を設定した。

Ⅱ-1-6 被験物質混合飲水の調製方法

脱イオン水に被験物質を加え、マグネチックスターラ(池田理化(株)製 1S 3GL 型)を用いて各設定濃度になるように被験物質を溶解した。なお、濃度の表示は、ppm(重量対重量比)とした。また、調製頻度は給水瓶の交換頻度に合わせて、毎週 2 回とした。

Ⅱ-1-7 調製時における被験物質混合飲水中の被験物質の濃度

被験物質混合飲水中における被験物質の濃度分析は約 3 ヶ月毎に、各設定濃度毎に調製容器内から 3 点サンプリングし、クロマトグラムを高速液体クロマトグラフ(Hewlett Packard HP1090)を用いて測定し、確認した。

その結果、各群の調製濃度は、設定濃度に対し、93.5～103%の範囲にあり、ほぼ設定濃度どおりに調製された。

その結果を APPENDIX Q 3 に示した。

Ⅱ-1-8 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性

被験物質混合飲水中における、被験物質の投与状態での安定性は、試験に先立ち最高濃度よりやや高い濃度(5000 ppm)及び最低濃度(500 ppm)について調製時及び調製 8 日目にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ(Hewlett Packard HP1090)を用いて測定し、それぞれの測定結果を比較することにより、確認した。

その結果、調製時の濃度を 100%とした場合に、調製 8 日目には 5000 ppm で 100%、500 ppm で 95.4%であった。給水期間中における、飲水中の被験物質の安定性は良好に維持されていた。

その結果について、APPENDIX Q 4 に示した。

Ⅱ-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂水量及び設定濃度より被験物質の体重 kg 当たりの一日摂取量(g/kg body weight per day)を算出した。

Ⅱ-2 動物管理

Ⅱ-2-1 各群の使用動物数

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

雄		雌	
群 名 称	使用動物数(動物番号)	群 名 称	使用動物数(動物番号)
対 照 群	50 匹(1001～1050)	対 照 群	50 匹(2001～2050)
500 ppm 群	50 匹(1101～1150)	1000 ppm 群	50 匹(2101～2150)
1000 ppm 群	50 匹(1201～1250)	2000 ppm 群	50 匹(2201～2250)
2000 ppm 群	50 匹(1301～1350)	4000 ppm 群	50 匹(2301～2350)

Ⅱ-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、発育順調で、異常を認めない動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(層別体重平均法：適正層別方式)により実施した(文献 5)。

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

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

なお、動物は検疫、馴化及び投与期間を通して、バリア区域(AC-1 空調エリア)内の独立した室(雄を 102 室、雌を 103 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. 102 室: $22.8 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 、103 室: $23.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 15\%$ (実測値 平均 \pm S.D. 102 室: $56 \pm 2\%$ 、103 室: $55 \pm 1\%$)、明暗サイクル: 12 時間点灯(8:00~20:00)/12 時間消灯(20:00~8:00)、換気回数 15~17 回/時の環境下で飼育した。動物の健康状態に影響を与えるような大きな環境変化は認められなかった。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連型網ケージ: 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、飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)千葉工場(千葉県千葉市美浜区新港 8-2)の CRF-1 固型飼料(30KGy- γ 線照射滅菌飼料)を使用し、固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖日前日の夕方からは絶食(18 時間以上)させた。

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

なお、試験に使用した飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)から分析データを使用ロット毎に入手し、保管した。飼料中の夾雑物については(財)日本食品分析センター(東京都渋谷区元代々木町 52 番 1 号)の分析データを使用ロット毎に入手し、また、飲水については(財)食品薬品安全センター秦野研究所(神奈川県秦野市落合 729-5)に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、その記録を保存した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の一般状態の観察

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

回実施した。

Ⅱ－3－2 体重測定

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

Ⅱ－3－3 摂水量測定

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

Ⅱ－3－4 摂餌量測定

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

Ⅱ－3－5 血液学的検査

定期解剖時まで生存し、採血可能な全動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血し、血液学的検査を行った。

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

検査方法は APPENDIX R 1 に示した。

Ⅱ－3－6 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。

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

検査方法は APPENDIX R 1 に示した。

Ⅱ-3-7 尿検査

投与最終週に採尿可能な全動物について新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

検査方法は APPENDIX R 1 に示した。

Ⅱ-3-8 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

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

副腎、精巣、卵巢、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

全動物の臓器を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、以下に示した臓器を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、リンパ節、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸(十二指腸を含む)、大腸、肝臓、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、卵巢、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。

摂水量については、g を単位とし、給水量、残水量を小数点以下第 1 位まで計測し、給水量から残水量を減じて摂水量とした。この値を計測期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂水量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

摂餌量については、g を単位とし、給餌量、残餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌

量から残餌量を減じて摂餌量とした。この値を計測期間の日数で除し、1日当たりの平均摂取量を算出し、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。

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

臓器実重量については、g を単位とし、小数点以下第3位まで計測し、表示した。臓器重量体重比については臓器実重量値を解剖時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第4位を四捨五入し、小数点以下第3位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査については APPENDIX R 2 に示した精度により表示した。

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

II-4-2 母数の取り扱い

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

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

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

剖検データは、各群の有効動物数(供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数)を母数とした。病理組織学的検査データは、臓器別に、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

II-4-3 統計処理

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

病理組織学的検査のうち、非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準として 1~4 にグレー

ド分けし、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との χ^2 検定を行った。

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

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定(文献 6)、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法(コンテックス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定)、有病率法(コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定)、死亡率法+有病率法(コンテックス 0~4 の総計で検定)を行った。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖例にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思いが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍

4：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関わっていた腫瘍

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

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

試験終了時の生存率は、対照群と比べて、雌の 4000 ppm 群で高値を、雌の 1000 ppm 群、2000 ppm 群でやや高値を示した。雄では全投与群とも対照群とほぼ同様な生存率を示した。

各群の最終計測日(104 週)における生存動物数(生存率)は、雄では 2000 ppm 群：39 匹(78%)、1000 ppm 群：42 匹(84%)、500 ppm 群：38 匹(76%)、対照群：38 匹(76%)、雌では 4000 ppm 群：34 匹(68%)、2000 ppm 群：28 匹(56%)、1000 ppm 群：29 匹(58%)、対照群：24 匹(48%)であった。

Ⅲ-2 一般状態

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

雌で対照群に比べ投与群に 70 週以降、内部腫瘍が認められた動物が多くみられた。

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。

体重の低値は、雄の 2000 ppm 群と 1000 ppm 群の全投与期間、500 ppm 群の 18 週以降、雌の 4000 ppm 群の全投与期間、2000 ppm 群の 2 週以降と 1000 ppm 群の 5 週以降のほとんどの期間に認められた。

なお、最終計測日(104 週)の各投与群の体重は、対照群に対して、雄では 2000 ppm 群：66%、1000 ppm 群：74%、500 ppm 群：84%であり、雌では 4000 ppm 群：67%、2000 ppm 群：82%、1000 ppm 群：88%であった。

Ⅲ-4 摂水量

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

投与群の摂水量の低値は、雄の 2000 ppm 群と 1000 ppm 群の全投与期間、500 ppm 群の 34 週以降にみられた。

雌では摂水量の低値は、4000 ppm 群で投与開始からみられたが、74 週以降増加に転じ、94 週以降は対照群に近い値まで回復した。2000 ppm 群では摂水量の低値は、投与開始からみられたが、90 週以降増加に転じ、投与終了時には対照群とほぼ同じ値になった。1000

ppm 群では全投与期間に低値がみられた。

全投与期間にわたって平均した各群の平均一日摂水量は雄では、2000 ppm 群：3.2g(76%)、1000 ppm 群：3.5g(83%)、500 ppm 群：3.9g(93%)、対照群：4.2g(100%)であった。

雌では、4000 ppm 群：2.6g(65%)、2000 ppm 群：2.9g(73%)、1000 ppm 群：3.2g(80%)、対照群：4.0g(100%)であった。

Ⅲ－5 摂餌量

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

投与群の摂餌量は、雄の 2000 ppm 群、雌の 4000 ppm 群と 2000 ppm 群では全投与期間にわたって、雄の 1000 ppm 群と 500 ppm 群、雌の 1000 ppm 群では投与初期を除いて、投与濃度に対応した低値を示した。

全投与期間にわたって平均した各群の平均一日摂餌量は雄では、2000 ppm 群：4.2g(88%)、1000 ppm 群：4.4g(92%)、500 ppm 群：4.5g(93%)、対照群：4.8g(100%)であった。雌では、4000 ppm 群：3.3g(84%)、2000 ppm 群：3.6g(90%)、1000 ppm 群：3.8g(94%)、対照群：4.0g(100%)であった。

Ⅲ－6 被験物質摂取量

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

全投与期間における 1 日当たりの被験物質摂取量 (g/kg body weight per day) は、雄で 2000 ppm 群：0.162～0.242、1000 ppm 群：0.083～0.153、500 ppm 群：0.039～0.097、雌で 4000 ppm 群：0.328～0.684、2000 ppm 群：0.193～0.282、1000 ppm 群：0.094～0.175 の範囲にあった。

全投与期間にわたって平均した各投与群の被験物質摂取量の比率は、投与期間初期には 1.4～1.6 で設定用量比(公比 2)より低かったが、雄では 14 週以降、雌では 30 週以降には 1.8 以上と設定用量比(公比 2)とほぼ対応した値となった。さらに雌では投与後期に摂水量の回復がみられたため、投与期間終期には最大 2.8 (94 週の 4000 ppm 群と 2000 ppm 群)となった。

Ⅲ－7 血液学的検査

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

雄では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、MCHC、白血球数、好酸球比及び単球比の減少と、MCV、血小板数及び分葉核好中球比の増加が 2000 ppm 群に認められた。

雌では、ヘモグロビン濃度、MCHC 及び好酸球比の減少と、MCV、血小板数の増加が

4000 ppm 群に認められた。MCHC と好酸球比の減少は 2000 ppm 群にも認められた。

Ⅲ－８ 血液生化学的検査

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

雄では、ALP の上昇が全投与群に認められた。アルブミン、尿素窒素の増加、GPT、CPK の上昇が 2000 ppm 群と 1000 ppm 群に認められた。また、総蛋白、ナトリウムの増加、トリグリセライドとカリウムの減少が 2000 ppm 群に認められた。

雌では、ALP の上昇が全投与群に認められた。アルブミン、総コレステロール、リン脂質及び尿素窒素の増加が 4000 ppm 群と 2000 ppm 群に認められた。また、総蛋白、A/G 比、ナトリウム及びクロールの増加、GPT、CPK の上昇が 4000 ppm 群に認められた。

Ⅲ－９ 尿検査

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

雄では、pH の低下を示す動物数の増加が全投与群に認められた。

雌では、pH の低下を示す動物数の増加が全投与群に、蛋白の高い陽性度を示す動物数とケトン体の陽性を示す動物数の減少が 4000 ppm 群に認められた。

Ⅲ－１０ 病理学的検査

Ⅲ－１０－１ 剖検

剖検所見を APPENDIX I 1～6 に示した。

雌雄とも、肝臓の結節の発生が投与用量に対応して増加し、その発生数は、雄では、対照群で 21 匹、500 ppm 群で 25 匹、1000 ppm 群で 33 匹、2000 ppm 群で 31 匹であり、雌では、対照群で 10 匹、1000 ppm 群で 23 匹、2000 ppm 群で 31 匹、4000 ppm 群で 36 匹であった。また、腎臓の水腎症が各投与群にみられ、雌では特に多く、その発生匹数は、対照群で 2 匹、1000 ppm 群で 7 匹、2000 ppm 群で 12 匹、4000 ppm 群で 7 匹であった。なお、雌では、皮下の浮腫、リンパ節の腫大、卵巣の嚢胞、胸水および腹水の発生は減少する傾向がみられた。

Ⅲ－１０－２ 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE 15, 16 と APPENDIX J 1, 2 、K 1, 2 に示した。

雄では肝臓と脾臓の体重比の高値が全投与群でみられた。なお、心臓と肺に実重量の低値と体重比の高値、副腎、精巣、腎臓及び脳に体重比の高値がみられたが、解剖時体重の低下に起因するものと考えられた。1000 ppm 群と 500 ppm 群の腎臓の体重比の平均値は低値を示したが、対照群に高値の動物がいるためで統計学的には高値であった。

雌では肝臓の体重比の高値が 2000 ppm 以上の群でみられた。腎臓の体重比は、全投与群で低値を示したが、実重量は 4000 ppm 群で減少した。なお高濃度群を中心に、肺、副腎及び脳に実重量の低値と体重比の高値(雌の肺は実重量も低値)、心臓と脾臓に実重量の低値がみられたが、解剖時体重の低下に起因するものと考えられた。

Ⅲ－10－3 病理組織学的検査

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

－腫瘍性病変－

日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ(試験毎の発生率(最小%～最大%)と平均発生率(%))、発生匹数/総数を雌雄別にそれぞれ TABLE 19 と 20 に示し、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最大発生率と比較した。

<肝臓>

雄では、肝細胞腺腫の発生は、Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 500 ppm 以上の群に増加を認めた。肝細胞腺腫の 2000 ppm 群、1000 ppm 群及び 500 ppm 群における発生(35 匹、34 匹及び 25 匹)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。また、肝細胞癌の発生は明らかな増加は認められなかったが、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生は、Peto 検定(有病率法、有病率法＋死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 500 ppm 以上の群に増加を認めた。

雌では、肝細胞腺腫の発生は、Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 1000 ppm 以上の群に増加を認めた。肝細胞腺腫の 4000 ppm 群、2000 ppm 群及び 1000 ppm 群における発生(34 匹、23 匹及び 22 匹)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。また、肝細胞癌の発生は Peto 検定(有病率法、有病率法＋死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2000

ppm 以上の群に増加を認めた。肝細胞癌の 4000 ppm 群と 2000 ppm 群における発生(17 匹と 11 匹)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生は、Peto 検定(有病率法、有病率法 + 死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 1000 ppm 以上の群に増加を認めた。さらに<

雌の発生した肝細胞腫瘍は 4000 ppm 群 41 匹のうち 2 匹、2000 ppm 群 31 匹のうち 5 匹、1000 ppm 群の 23 匹のうち 3 匹が肺に転移していた。

<胆嚢>

雄の乳頭状腺腫の発生は、Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2000 ppm 群に増加を認めた。乳頭状腺腫の 2000 ppm 群、1000 ppm 群及び 500 ppm 群における発生(5 匹、4 匹及び 2 匹)は当センターのヒストリカルコントロールデータで 1 匹も発生がみられないことから投与による影響と判断した。

雌の乳頭状腺腫の発生は、Fisher 検定で 2000 ppm 群に増加を認めた。乳頭状腺腫の 4000 ppm 群、2000 ppm 群及び 1000 ppm 群における発生(3 匹、5 匹及び 1 匹)は当センターのヒストリカルコントロールデータで 1 匹も発生がみられないことから投与による影響と判断した。

なお、雄に肝臓の血管腫の発生減少、雌にリンパ節の悪性リンパ腫と下垂体の腺腫の発生減少がみられた。また、雌で子宮内膜間質性ポリープが減少傾向を示したが、正常範囲内であり、さらに、子宮の組織球性肉腫は低濃度群のみで増加を示したが投与による影響とはいえないと判断した。

—非腫瘍性病変—

<肝臓>

明細胞性小増殖巣を示す動物数が、雌の 4000 ppm 群で増加が認められた。好酸性小増殖巣を示す動物数は、雄の 500 ppm 群で増加が、1000 ppm 群でも増加傾向が認められ、雌では 4000 ppm 群で増加が認められた。好塩基性小増殖巣を示す動物数は、雄で 1000 ppm 以上の群で増加する傾向を示し、雌では 4000 ppm 群で増加が認められた。

<胆嚢>

過形成を示す動物数は、雄の全投与群で増加が認められ、雌では、2000 ppm 以上の群で増加が認められた。

<鼻腔>

呼吸上皮のエオジン好性変化を示す動物数は、雄の 2000 ppm 群と雌の全投与群で増加が認められた。嗅上皮のエオジン好性変化を示す動物数は、雌の 4000 ppm 群で増加が認められた。さらに、腺の呼吸上皮化生を示す動物数が、雌の 2000 ppm 以上の群で増加が認められた。

<鼻咽頭>

エオジン好性変化を示す動物数が、雌の 4000 ppm 群で増加が認められた。

<腎臓>

水腎症を示す動物数が雌の全投与群で増加を認めた。また、炎症性ポリープを示す動物数は、雌の 2000 ppm 群で増加が認められ、4000 ppm 群と 1000 ppm 群でも増加傾向が認められた。

その他、雌の 4000 ppm 群では、下垂体の過形成が減少を示し、副腎の紡錘形細胞増生が程度の減弱を示した。なお、雄で、鼻腔の嗅上皮の呼吸上皮化生、脳の鉍質沈着及び腺胃の過形成、雌で脾臓の髓外造血を示す動物数が減少を示したが、投与濃度に対応しないため、投与との関連はないと判断した。

III-10-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 21 に示した。

雌では水腎症による死亡／瀕死動物が対照群にみられないのに対し、4000ppm 群で 4 匹、2000ppm 群で 6 匹、1000ppm 群に 2 匹認められ、被験物質投与による影響と判断した。また、雌では、白血病による死亡／瀕死動物が投与用量に対応して減少した。

IV 考察及びまとめ

o-フェニレンジアミン二塩酸塩のマウス 2 年間混水経口投与(投与濃度:雄 2000、1000、500 ppm、雌 4000、2000、1000 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。生存率は、対照群と比べ、雌でやや高値を示し、体重と摂餌量の低値は、雌雄とも全投与群にみられた。摂水量の低値は雌雄の全投与群にみられたが、雌の 2000 ppm 以上の群では投与後期に対照群とほぼ同じ値まで回復した。

IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雄では、肝臓の良性腫瘍である肝細胞腺腫と、胆嚢の良性腫瘍である乳頭状腺腫の発生増加が認められた。肝細胞腺腫は、すべての投与群で発生率の増加を示し、投与用量に依存して増加傾向を示した。また、肝細胞腺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超えた。さらに、胆嚢の乳頭状腺腫の発生は投与用量に依存して増加を示し、2000 ppm 群で発生率の増加を認めた。この腫瘍は、1000 ppm 群と 500 ppm 群では統計学的に有意な発生増加を示さなかったが、当センターのヒストリカルコントロールデータでは前例がない腫瘍であり、投与による影響と考えられた。

雌では、肝細胞癌と肝細胞腺腫及び胆嚢の良性腫瘍である乳頭状腺腫の発生増加が認められた。肝細胞癌は 4000 ppm 群と 2000 ppm 群で発生数の増加、肝細胞腺腫は、すべての投与群で発生数の増加を示し、いずれも投与用量に依存して増加傾向を示した。また、肝細胞癌の 4000 ppm 群と 2000 ppm 群と肝細胞腺腫のすべて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超えた。発生した肝細胞腫瘍は、各投与群とも複数の動物で肺に転移しており、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩投与により発生した肝細胞腫瘍の悪性度が高いことが示された。さらに、胆嚢の乳頭状腺腫の発生は投与用量に依存して増加を示し、2000 ppm 群で発生率の増加を示した。この腫瘍は、4000 ppm 群と 1000 ppm 群では統計学的に有意な発生増加を示さなかったが、当センターのヒストリカルコントロールデータでは雌マウスに前例がない腫瘍であることから、この用量での発生も投与による影響と考えられた。

以上のように、雌雄ともにみられた肝臓腫瘍の発生増加は、統計検定結果及びヒストリカルコントロールデータとの比較から、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与により惹起されたと考えられた。また、発生増加のみられた腫瘍は、雄では良性腫瘍のみであるのに対し、雌では良性腫瘍に加え、悪性腫瘍の肝細胞癌であり、腫瘍発生数もヒストリカルコントロールデータの範囲より高い値であった。従って、これらの結果は *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の雌マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠と雄マウスに対するがん原性を示す証拠と考えられた。また、肝臓腫瘍の発生が観察された濃度は、雌雄とも最低用量群で、雄

では 500 ppm 群、雌では 1000 ppm 群から認められた。なお、肝臓の前腫瘍性病変である小増殖巣(文献 7)で、好酸性小増殖巣は、雄の 1000 ppm 群と 500 ppm 群及び雌の 4000 ppm 群、好塩基性小増殖巣と明細胞性小増殖巣が雌の 4000 ppm 群で増加した。

さらに、雌雄でみられた胆嚢腫瘍の発生増加は、統計検定結果及びヒストリカルコントロールデータとの比較から、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与により惹起されたと考えられた。発生増加のみられた腫瘍は、雌雄とも良性腫瘍の乳頭状腺腫であるが、ヒストリカルコントロールデータでは全くみられない腫瘍であった。従って、これらの結果は *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の雌雄マウスに対するがん原性を示す証拠と考えられた。また、胆嚢腫瘍の発生が観察された濃度は、本試験では、雌雄とも最低用量群、すなわち雄では 500 ppm 群、雌では 1000 ppm 群から認められた。なお、胆嚢の前腫瘍性変化である過形成は雄の全投与群と雌の 2000 ppm 以上の群で増加を示した。

IV-2 非腫瘍性病変

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

鼻腔における呼吸上皮のエオジン好性変化(雄の 2000 ppm 群と雌の全投与群)、嗅上皮のエオジン好性変化(雌の 4000 ppm 群)及び腺の呼吸上皮化生(雌の 2000 ppm 以上の群)の増加あるいは増強がみられた。また、鼻咽頭におけるエオジン好性変化(雌の 4000 ppm 群)の増加がみられた。これらの変化は、投与濃度に対応しており、投与による影響と考えた。

腎臓への影響として、雌の投与群に肉眼的に水腎症が多く観察され、組織学的検査でも雌の水腎症の増加が全投与群で示された。また、その原因と考えられる炎症性ポリープの発生が雌の全投与群で認められた。一般的に、マウスでみられる水腎症は、先天的な素因による自然発生病変であるが、投与群での増加が明らかであるため、水腎症と炎症性ポリープはいずれも投与による影響が考えられた。

IV-3 その他

血液生化学的検査では、ALP の上昇が雌雄の全投与群に、GPT の上昇が雄の 1000 ppm 以上の群と雌の 4000 ppm 群に認められ、病理組織学的検査で認められた肝臓への影響と対応した。また尿素窒素の増加が雄の 1000 ppm 以上の群と雌の 2000 ppm 以上の群に認められ、病理組織学的検査で認められた腎臓への影響と対応した。

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

マウスにおける2年間の混水投与による*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の無毒性量及び最小毒性量は、*o*-フェニレンジアミンが強い変異原性を持ち、閾値のない発癌物質と考えられ、肝細胞腺腫の増加が雌雄の最低濃度でもみられることから、求めることは適当ではないと考えた。ベンチマーク用量法は、NOAEL/LOAEL法における若干の問題点を克服する方法として、最近、適用が広がりつつある。投与濃度との用量-反応関係にUS.EPA NCEAのBMDLソフトウェア Version 1.3.2(文献 8)を適用して10%ベンチマーク用量(Confidence limit of Benchmark dose yielding the response with 10 % extra risk (BMDL₁₀))を算出した結果、BMDL₁₀値は、雄の肝細胞腺腫は134 ppm (Multistage Model, P=0.157, AIC=255.9)、雄の胆嚢の乳頭状腺腫では1014 ppm (Multistage Model, P=0.904, AIC=79.7)となった。

IV-5 他文献との比較等

① 変異原性：

ネズミチフス菌を用いたエームテストではS9添加した場合に変異原性があり(文献 9,10,11,12)、さらに、過酸化水素を添加した系では変異原性が軽度に増強する(文献 9,10)。ラット肝細胞を用いた不定期DNA合成試験では陽性である(文献 13)。小核試験ではマウス、チャイニーズハムスター、モルモットいずれでも陽性を示した(文献 14)。

② 癌原性：

Weisburgerらは1群25匹の雌雄のCD-1マウスに*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を4000 ppm(高濃度群)、2000 ppm(低濃度群)の濃度の混餌で5ヶ月間、その後高濃度群は8000 ppm、低濃度群は4000 ppmの濃度の混餌で13ヶ月間投与した。その結果肝細胞癌が雄の高濃度群で3/14匹、低濃度群で5/17匹、雌の高濃度群で6/15匹、低濃度群で6/18匹発生したとしている。しかし動物数の不足、生存率の問題などにより日本産業衛生学会とACGIHで不十分な試験とされている(文献 15)。

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

2週間試験では、BDF₁マウス雌雄に*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を混合した飲水を2週間自由摂取(6000、4000、2000、1000及び500 ppm)させた。その結果、雌の6000 ppm群で動物の死亡がみられた。肝臓への影響では、GOTの増加傾向が雌雄の6000 ppm群でみられ、肝臓重量の増加が雌の4000 ppm群でみられた。腎臓への影響では、尿素窒素の増加が雌雄の6000 ppm群でみられた(文献 16)。

13週間試験ではBDF₁マウス雌雄に*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を混合した飲水を13週間自由摂取(5000、4000、2000、1000及び500 ppm)させた。その結果、雌に腎臓及

び肝臓の重量増加と血液生化学的検査で尿素窒素の増加がみられたが、肝臓と腎臓に病理組織学的変化は認められなかった(文献 4)。

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

BDF₁ マウス雌雄に *m*・フェニレンジアミン二塩酸塩を混合した飲水を、104 週間投与(180、60、20 ppm)した結果、下垂体の腺腫の発生増加が雌の 180 ppm 群と 20 ppm 群にみられたが、*m*・フェニレンジアミン二塩酸塩の催腫瘍性を明確に示すものではなかった。また、肺や肝臓、甲状腺(雄の 60 ppm 以上と雌の 20 ppm 以上の群)に特有な色素沈着(黄色～褐色、鉄染色陰性)がみられた(文献 17)。

⑤ *o*・フェニレンジアミンの職業性暴露限界

o・フェニレンジアミン及びその二塩酸塩は、染毛剤、顔料、染料、写真現像剤、農薬や防錆剤の中間体として使用されている。1999 年の日本産業衛生学会の許容濃度等の勧告では、*o*・フェニレンジアミンで問題とすべき有害性は、肝腫瘍の発症と感作性であるとして、1997 年に提案した *p*・フェニレンジアミンの許容濃度(文献 18)を参考に、0.1 mg/ m³、皮膚感作性物質第 1 群の暫定値が提案された(文献 19)。ACGIH は TLV-TWA 0.1 mg/m³、発がん性の分類は A3(Confirmed animal carcinogen with unknown relevance to humans)と勧告している(文献 20)。ドイツでは、*o*・フェニレンジアミンは感作性物質、催腫瘍性(Category 3B)に分類され、MAK 値は提案されていない(文献 21)。

V 結論

Crj:BDF₁ マウスを用いて *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩を 2 年間(104 週間)にわたる混水経口投与によるがん原性試験を行った結果、雄の肝臓に肝細胞腺腫の発生増加、雌の肝臓に肝細胞腺腫及び肝細胞癌の顕著な発生増加、雌雄の胆嚢に乳頭状腺腫の発生増加が認められた。これらの結果は *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の雄マウスに対するがん原性を示す証拠と、雌マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠であると結論づけられた。また、前腫瘍性病変として、肝臓では雄に好酸性小増殖巣が、雌に好酸性小増殖巣、好塩基性小増殖巣及び明細胞性増殖巣が、胆嚢では雌雄に過形成が増加した。

VI 文献

1. ChemFinder. Cambridge, MA: CambridgeSoft Corporation. Available: <http://chemfinder.cambridgesoft.com>[accessed 19 January 2004]
2. 和光純薬工業(株). 1997. *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩、赤外吸収スペクトル.
3. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451 "Carcinogenicity Studies", Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
4. 日本バイオアッセイ研究センター. 2003. *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩のマウスを用いた経口投与による 13 週間毒性試験 (混水試験) 報告書. 神奈川:中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター.
5. 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14:7285-7302.
6. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance test for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. Lyon : IARC, IARC Monographs Suppl 2:311-426.
7. Bannasch P, Zerban H. 1994. Preneoplastic and neoplastic lesions of the rat liver. In: Pathology of Neoplasia and Preneoplasia in Rodents (Bannasch P, Gössner W, eds). Stuttgart: Schattauer, 18-63.
8. U.S. EPA. 2001. Help Manual for Benchmark Dose Software Version 1.3 . Washington DC:U.S.EPA Office of Research and Development.
9. Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E. 1975. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. Proc Natl Acad Sci 72:2423-2427.
10. Venitt S, Seale CE. 1976. Mutagenicity and possible carcinogenicity of hair colourants and constituents. In:Environmental Pollution and Carcinogenic Risks. IARC Scientific Publications No13. Lyon : IARC, 263-272.

11. Garner RC, Nutman CA. 1977. Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 1538. *Mutat Res* 44:9-19.
12. Gentile JM, Gentile GL, Plewa MJ. 1987. Mutagenicity of selected aniline derivatives to *Salmonella* following plant activation and mammalian hepatic activation. *Mutat Res* 188:185-196.
13. Thompson CZ, Hill LE, Epp SM, Probst GS. 1983. The induction of bacterial mutation and hepatocyte unscheduled DNA synthesis by monosubstituted anilines. *Environ Mutagen* 5:803-811.
14. Wild D, King MT, Eckhardt K. 1980. Cytogenetic effect of ortho-phenyldiamine in the mouse, Chinese hamster, and guinea pig and of derivatives, evaluated by the micronucleus test. *Arch Toxicol* 43:249-255.
15. Weisburger EK, Russfield AB, Homburger F, Weisburger JH, Boger E, Dongen CG et al. 1978. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J Environ Pathol Toxicol* 2:325-356.
16. 日本バイオアッセイ研究センター. 2003. *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩のマウスを用いた経口投与による 2 週間毒性試験（混水試験）報告書. 神奈川:中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター.
17. 日本バイオアッセイ研究センター. 1988. メタフェニレンジアミン二塩酸塩のラット及びマウスを用いた経口によるがん原性試験結果報告書. 神奈川:中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター.
18. 日本産業衛生学会. 1997. 許容濃度の暫定値(1997)の提案理由. 産業衛生学雑誌. 39:155-157.
19. 日本産業衛生学会. 1999. 許容濃度の暫定値(1999)の提案理由. 産業衛生学雑誌. 41:138-140.
20. ACGIH. 2003. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.

21. Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. 1999. *o* - Phenylendiamine. In: Occupational Toxicants. Critical Data Evaluation for MAK Values and Classification of Carcinogens (Greim H. ed). Vol 13. Weinheim: VCH Verlag. Deutsche Forschungsgemeinschaft, 215-235.