

***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**

試験番号：0352

CAS No. 615-28-1

2003年2月25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

***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**

試験番号：0352

本 文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	2
I-1 被験物質の性状等	2
I-1-1 名称等	2
I-1-2 構造式、示性式、分子量	2
I-1-3 物理化学的性状等	2
I-2 被験物質の使用ロット等	2
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	3
I-3-1 特性・同一性	3
I-3-2 安定性	3
I-4 試験動物	3
II 試験方法	4
II-1 投与	4
II-1-1 投与経路	4
II-1-2 投与方法	4
II-1-3 投与期間	4
II-1-4 投与濃度	4
II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	4
II-1-6 被験物質混合飲水の調製方法	5
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	5
II-1-8 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性	5
II-1-9 被験物質の摂取量	5
II-2 動物管理	6
II-2-1 各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け及び個体識別方法	6
II-2-3 飼育条件	6

Ⅱ-3 観察・検査項目及び方法	7
Ⅱ-3-1 動物の一般状態の観察	7
Ⅱ-3-2 体重測定	7
Ⅱ-3-3 摂水量測定	7
Ⅱ-3-4 摂餌量測定	7
Ⅱ-3-5 血液学的検査	8
Ⅱ-3-6 血液生化学的検査	8
Ⅱ-3-7 尿検査	8
Ⅱ-3-8 病理学的検査	8
(1) 剖検	8
(2) 臓器重量	8
(3) 病理組織学的検査	9
Ⅱ-4 数値処理と統計学的方法	9
Ⅱ-4-1 数値の取り扱いと表示	9
Ⅱ-4-2 母数の取り扱い	10
Ⅱ-4-3 統計方法	10
Ⅲ 試験成績	11
Ⅲ-1 生死状況	11
Ⅲ-2 一般状態	11
Ⅲ-3 体重	11
Ⅲ-4 摂水量	11
Ⅲ-5 摂餌量	12
Ⅲ-6 被験物質摂取量	12
Ⅲ-7 血液学的検査	12
Ⅲ-8 血液生化学的検査	13
Ⅲ-9 尿検査	13
Ⅲ-10 病理学的検査	13
Ⅲ-10-1 剖検	13
Ⅲ-10-2 臓器重量	13
Ⅲ-10-3 病理組織学的検査	14
Ⅳ 考察及びまとめ	15
Ⅴ 文献	19

要 約

α -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 Crj:BDF₁ マウスを用いて経口投与による2年間(104週間)のがん原性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13週間試験を実施した。投与は α -フェニレンジアミン二塩酸塩を各投与濃度に調製した飲水の自由摂取で行った。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500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、4000 ppm 及び5000 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。

被験物質の投与により、全ての群で死亡はみられなかった。

5000 ppm 群では、雌雄とも顕著な摂水量の低下がみられ、摂餌量も低下した。体重も投与期間を通して増加の抑制がみられたが、雌では軽度であった。被験物質投与による影響は、血液系(雌雄とも血液学的パラメータの変化)、腎臓(雄:臓器重量で体重比の高値、雌:血液生化学的パラメータの変化、臓器重量で実重量と体重比の高値)、肝臓(雄:臓器重量で体重比の高値、雌:血液生化学的パラメータの変化、臓器重量で実重量と体重比の高値)に認められた。

4000 ppm 群では、雌雄とも摂水量と摂餌量の低下がみられ、体重増加の抑制がみられたが、雌では軽度であった。また、血液系、腎臓、肝臓への影響が認められた。

2000 ppm 群では、雌雄とも摂水量が低下し、雄では摂餌量の低下と体重増加の抑制が認められた。また、血液系、腎臓、肝臓への影響が認められた。

1000 ppm 群では、雌雄とも摂水量が低下し、雄では摂餌量の低下と軽度の体重増加の抑制が認められた。また、血液系、腎臓への影響が認められた。

500 ppm 群では、被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった

以上のように、血液系(雄雌)、腎臓(雌)への影響は、1000 ppm 以上の群で認められた。従って、無毒性量(NOEL)は、これらの影響をエンドポイントとして、500 ppm(雄:0.050~0.080 g/kg/day、雌:0.082~0.103 g/kg/day)であると考えられた。

以上の結果を考慮し、 α -フェニレンジアミン二塩酸塩のがん原性試験の投与濃度は、雄では、2000 ppm を最高用量に、以下1000 ppm、500 ppm の3段階(公比2)の濃度を設定した。

雌では、4000 ppm を最高用量に、以下2000 ppm、1000 ppm の3段階(公比2)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

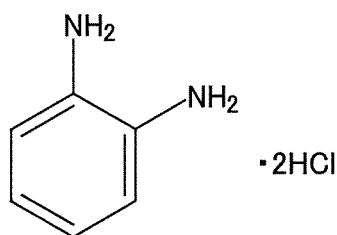
名 称 : α -フェニレンジアミン二塩酸塩 (α -Phenylenediamine dihydrochloride)

IUPAC名 : 1,2-ベンゼンジアミン二塩酸塩

別 名 : 二塩酸 α -フェニレンジアミン

CAS.No. : 615-28-1

I-1-2 構造式、示性式、分子量 (文献 1)



分 子 量 : 181.08

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

外 観 : 赤褐色結晶性粉末 (和光純薬工業 (株) 検査成績書データ)

融 点 : 258°C

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 : WTE0491

製 造 元 : 和光純薬工業 (株)

グ レ ー ド : 和光一級

純 度 : 100.0 (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 α -フェニレンジアミン二塩酸塩について、マス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、被験物質のマススペクトルは、計算値と同一の、2 個の塩化水素分子が解離した分子に相当する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 2) と同じ波長にピークを示すことが認められ、被験物質は α -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 M 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 α -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、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) 及びクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) により測定し、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 α -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 M 2 に示した。

I-4 試験動物

動物は、 α -フェニレンジアミン二塩酸塩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：神奈川県厚木市古沢 795 番地) より購入した Crj:BDF₁ マウス (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 75 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 60 匹 (投与開始時体重範囲、雄：22.4～25.0g、雌：18.4～20.4g) を選別し、試験に供した。

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等の理由から Crj:BDF₁ マウスを使用することが決定している。当試験はがん原性試験の予備試験であるため、Crj:BDF₁ マウスを使用した。

Ⅱ 試験方法

Ⅱ-1 投与

Ⅱ-1-1 投与経路

経口投与

Ⅱ-1-2 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

1998年3月2日より1998年6月2日及び3日までの13週間とし、定期解剖直前まで連続投与した。

Ⅱ-1-4 投与濃度

雌雄とも500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、4000 ppm 及び 5000 ppm の5段階の投与濃度を設定した。なお、対照群として飲水のための群を設けた。

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、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、がん原性試験の投与濃度を決定するために13週間とした。(文献3)

投与濃度は本試験に先立って実施した2週間試験(文献4)の結果をもとに決定した。

2週間試験では被験物質を6000 ppm、4000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、500 ppmの濃度で飲水に添加し、投与した。試験の結果、6000 ppm群では摂水量の減少と、被験物質の影響が原因と考えられる死亡が、雌で1匹認められた。4000 ppm群では死亡動物は認められず、大幅な摂水量の低下(雄:21~48%、雌:21~44%)が認められたが、最終計測時の体重も雄で89%、雌で94%あり、臓器重量で肝臓の重量増加がみられた他、投与によると考えられる変化がみられなかった。従って13週間試験の最高用量は6000 ppmと4000 ppmの間の5000 ppmとした。以下、4000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、500 ppmに設定した。

Ⅱ-1-6 被験物質混合飲水の調製方法

市水をフィルターろ過し、紫外線照射し、脱イオンした水（以下、脱イオン水という）、更にフィルターろ過した飲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は、各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 1090）を用いて分析し、確認した。

その結果、各群の調製濃度は、設定濃度に対し、97.8～99.0%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 M 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（5000 ppm）及び最低濃度（500 ppm）について調製時及び調製後 4 日目に高速液体クロマトグラフ（Hewlett Packard 1090）を用いて分析し、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、4 日目には 5000 ppm で 99.0%、500 ppm で 96.4%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 M 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 当たり一日摂取量（g/kg body weight/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、雌雄各群 10 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	10 匹（1001～1010）	対 照 群	10 匹（2001～2010）
500 ppm 群	10 匹（1101～1110）	500 ppm 群	10 匹（2101～2110）
1000 ppm 群	10 匹（1201～1210）	1000 ppm 群	10 匹（2201～2210）
2000 ppm 群	10 匹（1301～1310）	2000 ppm 群	10 匹（2301～2310）
4000 ppm 群	10 匹（1401～1410）	4000 ppm 群	10 匹（2401～2410）
5000 ppm 群	10 匹（1501～1510）	5000 ppm 群	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、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（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においては色素塗布により、投与期間においては耳パンチにより識別し、またケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物は検疫期間を含む全飼育期間、バリア区域（AC-1 空調エリア）内の独立した室（雌雄とも 103 室）に収容し、飼育室に試験番号、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、全飼育期間を通して、設定温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ （実測値（平均 \pm 標準偏差） $23.6 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ）、設定湿度 $55 \pm 10\%$ （実測値（平均 \pm 標準偏差） $56 \pm 1\%$ ）、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／時に設定した環境下で飼育した。全飼育期間を通じて、動物の状態に影響を与えるような環境変化は認められなかった。

動物は単飼ケージ（ステンレス製二連網ケージ、 $W112 \times D212 \times H120 \text{ mm}$ ）に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。

飼料は、オリエンタル酵母工業（株）千葉工場（千葉県千葉市美浜区新港 8-2）の CRF-1 固型飼料（30KGy- γ 線照射滅菌飼料）を使用し、全飼育期間を通して固型飼料給餌器により自由摂取させた。

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

全動物について、毎週 1 回（投与開始直前及び各週 7 日目）体重を測定した。なお、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

全動物について、週 1 回、給水量と残水量を測定し、その差を給水日数で除し、一日当りの摂水量を算出した。

Ⅱ-3-4 摂餌量測定

全動物について、週に 1 回、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除し、一日当りの摂餌量を算出した。

Ⅱ－3－5 血液学的検査

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 EDTA-2 カリウム入り採血管に採血し、検査を行った。

なお、検査対象動物は解剖日前日より（18 時間以上）絶食させた。

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 N 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検査を行った。

なお、検査対象動物は解剖日前日より絶食（18 時間以上）させた。

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 N 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 N 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。

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

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

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、リンパ節、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髓、末梢神経、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨

II-4 数値処理と統計学的方法

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表示した。

体重については g を単位とし、小数点以下第 1 位まで計測し、表示した。

摂餌量については g を単位とし、給餌量、残餌量を小数点以下第 1 位まで計測した。この値を計測期間の日数で除し、1 日当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。

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 位まで計測した。この差を計測期間の日数で除し、1 日当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。

α -フェニレンジアミン二塩酸塩の体重 kg 当たり一日摂取量は、摂水量に α -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/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 O 1 に示した単位と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、摂餌量、摂水量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、欠測となったデータについては母数より除いた。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象とし、欠測となったデータについては母数より除いた。

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 統計方法

本試験で得られた測定値は原則として、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、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。検定は所見のみられなかった動物をグレード 0 として分類し各グレード毎の動物の度数分布により行った。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、APPENDIX A1, 2 に示した。

雌雄とも、全ての群に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 A 1, 2 に示した。

雄の 5000 ppm 群で糞小粒が 2 週目に 1 匹で観察された以外、雌雄ともに所見は認められなかった。

Ⅲ-3 体重

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

雄では、4000 ppm 以上の群で、全投与期間にわたり、体重の低値が認められた。2000 ppm 群では、3 週目以降低値が認められた。1000 ppm 群では、8、11～13 週目に低値が認められた。500 ppm 群では、対照群との間に差は認められなかった。なお、最終計測日（13 週 7 日）における各投与群の体重は、対照群と比較して、5000 ppm 群：76%、4000 ppm 群：79%、2000 ppm 群：86%、1000 ppm 群：91%、500 ppm 群：96%であった。

雌では、4000 ppm 以上の群で、ほぼ全投与期間にわたり、体重の低値が認められた。2000 ppm 以下の群では、対照群との間に差は認められなかった。なお、最終計測日（13 週 7 日）における各投与群の体重は、対照群と比較して、5000 ppm 群：91%、4000 ppm 群：93%、2000 ppm 群：96%、1000 ppm 群：99%、500 ppm 群：97%であった。

Ⅲ-4 摂水量

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

雌雄とも 1000 ppm 以上の群で、ほぼ全投与期間にわたり、摂水量の低値が認められた。なお、全投与期間中における各群の摂水量は、対照群に対して、雄では、5000 ppm 群：22～47%、4000 ppm 群：29～51%、2000 ppm 群：47～66%、1000 ppm 群：59～73%、500 ppm 群：80～91%、雌では、5000 ppm 群：23～52%、4000 ppm 群：37～50%、2000 ppm 群：51～69%、1000 ppm 群：77～88%、500 ppm 群：95～107%の範囲にあった。

Ⅲ－５ 摂餌量

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

雄では、5000ppm 群で全投与期間にわたり、摂餌量の低値がみられた。4000 ppm、2000 ppm 及び 1000 ppm 群でも多くの週で低値がみられた。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対して、5000 ppm 群：59～92%、4000 ppm 群：64～95%、2000 ppm 群：85～97%、1000 ppm 群：88～95%、500 ppm 群：93～100%の範囲にあった。

雌では、5000 ppm と 4000 ppm 群の多くの週で、摂餌量の低値がみられた。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対して、5000 ppm 群：57～97%、4000 ppm 群：69～100%、2000 ppm 群：86～103%、1000 ppm 群：94～110%、500 ppm 群：94～103%の範囲にあった。

Ⅲ－６ 被験物質摂取量

体重、摂水量及び設定濃度より算出された被験物質一日摂取量を APPENDIX E 1, 2 に示した。

雌雄とも摂水量の低下に伴い、設定濃度に対応した被験物質摂取量を示さなかった。

被験物質一日摂取量 (g/kg body weight/day) は、雄では、5000 ppm：0.289～0.381、4000 ppm 群：0.265～0.321、2000 ppm 群：0.155～0.199、1000 ppm 群：0.083～0.122、500 ppm 群：0.050～0.080、雌では、5000 ppm 群：0.325～0.507、4000 ppm 群：0.332～0.378、2000 ppm 群：0.216～0.255、1000 ppm 群：0.137～0.171、500 ppm 群：0.082～0.103 の範囲にあった。

Ⅲ－７ 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 7, 8, APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、血小板数の増加が 1000 ppm 以上の群で投与濃度に対応して認められた。

雌では、5000 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減少並びに MCV と MCH の増加が認められた。赤血球数とヘモグロビン濃度の減少は 4000 ppm 以上の群で、MCV の増加は 1000 ppm 以上の群で認められた。その他、1000 ppm と 2000 ppm 群で分葉核好中球比の増加及びリンパ球比の減少が、1000 ppm と 4000 ppm 群で MCHC の減少がみられた。

Ⅲ－８ 血液生化学的検査

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

雄では、5000 ppm 群で ALP の上昇がみられ、この変化は、4000ppm 以上の群で認められた。その他、2000 ppm 群で GOT の低下がみられた。

雌では、5000 ppm 群で総コレステロールと尿素窒素の増加、並びに総蛋白とカリウムの減少、ALP の低下が認められた。総コレステロールの増加、総蛋白とカリウムの減少は 4000 ppm 以上の群で、尿素窒素の増加は 1000 ppm 以上の群で認められた。その他、1000 ppm 群でクロールの増加がみられた。

Ⅲ－９ 尿検査

投与期間最終週に行った尿検査の結果を TABLE 11, 12、APPENDIX H 1, 2 に示した。

雄では、5000 ppm 群で pH の低下とケトン体の陽性例の増加が認められた。pH の低下は 4000 ppm 以上の群で認められた。また、4000 ppm、2000 ppm 及び 1000 ppm 群で尿蛋白の陽性度の増加がみられた。

雌では、5000 ppm 群で pH の低下のみられ、この変化は、1000 ppm 以上の群で認められた。また、4000 ppm 群で尿蛋白の陽性度の増加、4000 ppm と 2000 ppm 群でケトン体の陽性例の増加がみられた。

Ⅲ－１０ 病理学的検査

Ⅲ－１０－１ 剖検

定期解剖動物の剖検所見を APPENDIX I 1, 2 に示した。

雄では、脾臓の黒色斑が 500、2000、5000 ppm 群で各 1 匹、水腎症が 500 ppm 群で 1 匹、雌では、脾臓の黒色斑が対照群と 1000 ppm 群で各 1 匹、卵巣の嚢胞が 500、1000 ppm 群で各 1 匹、2000 ppm 群で 2 匹観察されたが、被験物質投与による影響とは考えなかった。

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 13, 14、APPENDIX J 1, 2 (実重量)、K 1, 2 (体重比) に示した。

雄では、解剖時体重の低値に伴ったと思われる体重比の高値が認められた。このうち肝

臓は 1000 ppm 群まで、腎臓は 2000 ppm 群まで体重比の高値が認められ、実重量の低値は認められず投与の影響が示唆された。

雌では、腎臓の体重比の高値が 1000 ppm 以上の群で、実重量の高値が 2000ppm 以上の群で、肝臓の体重比の高値が 2000ppm 以上の群で、実重量の高値が 4000ppm 以上の群で認められた。

Ⅲ－10－3 病理組織学的検査

病理組織学的所見を TABLE 15,16、APPENDIX L 1,2 に示した。

雌雄とも投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して高い発生率を示した所見は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

α -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 Crj:BDF₁ マウスを用いて経口投与による2年間(104週間)のがん原性試験を実施するに当たり、その投与濃度を検索するために13週間試験を実施した。投与は α -フェニレンジアミン二塩酸塩を各投与濃度に調製した飲水の自由摂取で行った。被験物質投与群5群と対照群1群の計6群構成で、雌雄とも各群10匹の動物を用いた。投与濃度は、雌雄とも500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、4000 ppm 及び5000 ppm とした。

(1) 用量-反応関係

被験物質の投与により雌雄とも全ての群に死亡はみられなかった。

5000 ppm 群では、雌雄とも顕著な摂水量の低下がみられ、摂餌量も低下した。体重は投与期間を通して増加の抑制(最終計測時に対照群に対し、雄76%、雌91%)がみられたが、雌では軽度であった。また、雌で血漿中の総蛋白の軽度の減少がみられ、摂餌量の低下に起因する変化と推察された。血液系への影響として、雌で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、MCVとMCHが増加し、軽度の貧血傾向が示された。また、雄で血小板数の増加がみられた。腎臓への影響として、雌で尿素窒素の増加とカリウムの減少がみられ、腎臓の実重量(雌)と体重比(雄雌)の高値がみられた。しかし、病理組織学的検査では、被験物質投与による影響と考えられる変化は認められなかった。肝臓への影響として、雌で総コレステロールが増加し、肝臓の実重量(雌)と体重比(雄雌)の高値がみられた。しかし、病理組織学的検査では、被験物質投与による影響と考えられる変化は認められなかった。その他、雄でALPが上昇し、雌では逆に低下したが、いずれも軽度の変化であった。

4000 ppm 群では、雌雄とも摂水量と摂餌量の低下がみられ、体重増加の抑制(最終計測時に対照群に対し、雄79%、雌93%)がみられたが、雌では軽度であった。また、雌で血漿中の総蛋白の減少がみられたが、軽度の変化であった。血液系への影響として、雄でヘモグロビン濃度の減少、雌で赤血球数とヘモグロビン濃度の減少、MCVの増加がみられ、雄で血小板数が増加した。腎臓への影響として、雌で尿素窒素の増加とカリウムの減少がみられ、腎臓の実重量(雌)と体重比(雄雌)の高値がみられた。肝臓への影響として、雌で総コレステロールが増加し、肝臓の実重量(雌)と体重比(雄雌)の高値がみられた。

2000 ppm 群では、雌雄とも摂水量が低下し、雄では摂餌量の低下と体重増加の抑制が認められた。血液系への影響として、雄で血小板数の増加、雌でMCVの増加がみられた。腎臓への影響として、雌で尿素窒素の増加がみられ、腎臓の実重量(雌)と体重比(雄雌)の高値がみられた。肝臓への影響として、雌雄とも肝臓の体重比の高値がみられた。

1000 ppm 群では、雌雄とも摂水量が低下し、雄では摂餌量の低下と軽度の体重増加の抑制が認められた。血液系への影響として、雄で血小板数の増加、雌でMCVの増加がみられ

た。腎臓への影響として、雌で尿素窒素の増加と、腎臓の体重比の高値がみられた。

500 ppm 群では、被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった

以上のように、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の投与によって、雌雄とも摂水量と摂餌量が低下し、体重増加の抑制が、雄で 1000 ppm、雌で 4000 ppm 以上の群で認められた。また、血液系、腎臓及び肝臓に被験物質投与による影響が認められたが、腎臓と肝臓の変化は血液生化学的パラメータと臓器重量の変化のみで、病理組織学的には変化はみられなかった。本試験でこれらの毒性影響がみられた最低用量は、雄では、1) 血液系への影響は、血小板数の増加が認められた 1000 ppm、2) 腎臓への影響は、腎臓重量（体重比）の高値がみられた 2000 ppm、3) 肝臓への影響は、肝臓重量（体重比）の高値がみられた 1000 ppm であった。

雌では、1) 血液系への影響は、MCV の増加が認められた 1000 ppm、2) 腎臓への影響は、尿素窒素の増加と腎臓重量（体重比）の高値がみられた 1000 ppm、3) 肝臓への影響は、肝臓重量（体重比）の高値がみられた 2000 ppm であった。

(2) 無毒性量 (NOAEL)

上記の結果より、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩の 13 週間混水投与による無毒性量は、血液系への影響（雌雄）、腎臓への影響（雌）をエンドポイントとして、500 ppm（雄：0.050～0.080 g/kg/day、雌：0.082～0.103 g/kg/day）であると考えられた。

(3) 他の文献との比較

① *o*-フェニレンジアミンの亜急性毒性

マウスについての亜急性毒性は、*o*-フェニレンジアミン及び塩酸塩とも報告されていない。1% *o*-フェニレンジアミンと 1.5% *m*-フェニレンジアミンを含有する毛染め剤を過酸化水素と混合してウサギに塗布した試験では、13 週間の塗布によりメトヘモグロビンが約 2 倍高くなった以外は変化が認められなかったと報告された（文献 7）。*o*-フェニレンジアミンの皮膚・粘膜への刺激性、感作性については、軽度な皮膚刺激性と中等度の眼刺激性を有するとされているが、感作性や皮膚刺激性についての十分な情報がない（文献 7）。

② *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は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 6）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 7）。1999 年の許容濃度等の勧告では、化学構造が類似した *m*-フェニレンジアミンも、許容濃度 0.1 mg/m³、皮膚感作性物質第 1 群と

勧告された（文献 7）。ACGIH は TLV-TWA 0.1 mg/m^3 、発がん性の分類は A3（Confirmed animal carcinogen with unknown relevance to humans）と勧告されている（文献 8）。

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 9）。

この 0.1 mg/m^3 の値は、60 kg の体重の労働者が職場で 1 日 8 時間の労働時間に 10 m^3 の空気を吸い、かつ、肺内吸収率を 100% と仮定して、1 日当たりの *o*-フェニレンジアミン摂取量を計算すると、 0.016 mg/kg 体重に相当し、二塩酸塩としては 0.026 mg/kg 体重に相当する。

③ *m*-フェニレンジアミンと *p*-フェニレンジアミンの亜急性毒性

マウスをもちいた *m*-フェニレンジアミン亜急性毒性試験については、報告は見当たらない。*p*-フェニレンジアミンを飼料に混ぜ（1000～4640 ppm）マウスに 7 週間与えた実験では毒性症状は認められなかったと報告されている（文献 7）。

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毒性・がん原性試験結果

④-1. 亜急性毒性

BDF₁ マウス雌雄に *m*-フェニレンジアミン二塩酸塩を飲水に混ぜ、13 週間投与（24.4 ppm、74.1 ppm、222 ppm、667 ppm、2000 ppm）した結果、2000 ppm では死亡がみられ、肝細胞の硝子滴変性や筋肉の壊死が認められた。また、雌雄とも 667 ppm 以上の群では、摂水量、摂餌量及び体重の低下、赤血球系を中心とする血液学的検査値の異常や尿・血液の生化学的検査から示唆される肝・腎臓機能障害が明確であり、病理組織学的検査では色素沈着（褐色、鉄染色陰性）を中心とした変化が脾臓、肝臓、肺、骨髄、精巣、子宮、卵巣、腎臓などにみられた。血液毒性的な変化は雄で 222 ppm 以上、雌では 74.1 ppm 以上の群に観察された（文献 10）。

④-2. *m*-フェニレンジアミンのがん原性

BDF₁ マウス雌雄に *m*-フェニレンジアミン二塩酸塩を飲水に混ぜ、104 週間投与（20 ppm、60 ppm、180 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 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と報告している。また、肺や肝臓、甲状腺（雄の 60 ppm 以上と雌の 20 ppm 以上の群）に特有色素沈着（黄色～褐色、鉄染色陰性）がみられた（文献 10）。

⑤ *m*-フェニレンジアミンと *p*-フェニレンジアミンのヒトでの暴露と臨床報告との関連

⑤-1. *m*-フェニレンジアミン

皮膚・粘膜への刺激性、感作性については、5 年から 10 年の曝露労働者に搔皮試験で感作（即時型アレルギー）が証明されたとする報告があるが（文献 11）、感作性や皮膚刺激性

についての十分な情報がないとされている（文献 7）。

⑤-2. *p*-フェニレンジアミン

皮膚・粘膜への刺激性、感作性（文献 6）については、*p*-フェニレンジアミンは皮膚に刺激性を有し、眼球に接触することにより角膜損傷、経気道的に曝露すると気道を刺激するとされている。また、モルモットの皮膚に強い感作性があることが証明され、また、ヒトに塗布（0.1%、1.0%）することにより感作が成立することが認められている。一年以上にわたって毛染め剤を使用している 200 人に、皮膚のアレルギー（6.5%）、目のアレルギー（16%）、水晶体の異常（89%）、早期の老眼（7%）がみられたとする調査結果がある。*p*-フェニレンジアミンは人を用いた経皮曝露では、投与後 1 週間で、投与量の 0.072~0.205%が尿に排泄され、毛髪中から 14.1~26.5%が回収されたと報告された（文献 6）。

（4）がん原性試験の濃度設定

13 週間試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

雄では、5000 ppm と 4000 ppm 群では、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 を超える濃度での長期投与は、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、腎臓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 ppm、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 群では、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 ppm、1000 ppm の 3 段階（公比 2）の濃度を設定した。

V 文献

1. <http://chemfinder.cambridgesoft.com>
2. 和光純薬工業（株）提供資料（1997）
赤外吸収スペクトル
3. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (1981)
Guideline for Testing of Chemicals 408 for “Subchronic Oral Toxicity”
—Rodent: 90-day Study. Paris, OECD
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ラット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（試験番号 0336），日本バイオアッセイ研究センター，神奈川
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. 日本産業衛生学会、許容濃度等の勧告（1997）
産業衛生学雑誌、39、129 – 168
7. 日本産業衛生学会、許容濃度等の勧告（1999）
産業衛生学雑誌、41、96 – 158
8. American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH)(2002)
Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices, ACGIH, Cincinnati, OH
9. Deutsche Forschungsgemeinschaft (2002)
List of MAK and BAT values 2002, o-Phenylenediamine
p90 Wiley-VCH, Weinheim
10. 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
日本バイオアッセイ研究センター、神奈川

11. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1978)

para- Phenylenediamine (hydrochloride)

In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to
Man. Some Aromatic Amines and Related Nitro Compounds

— Hair Dyes, Coloring Agents and Miscellaneous Industrial Chemicals

Vol.16, pp111-124, IARC Lyon