

***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**

試験番号：0337

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 2 週間毒性試験(混水試験)報告書**

試験番号：0337

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 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	8
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	9
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	12
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 病理学的検査	13
Ⅲ-9-1 剖検	13
Ⅲ-9-2 臓器重量	14
Ⅲ-9-3 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（被験物質）のCrj:BDF₁マウス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。投与は、被験物質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5匹とし、被験物質投与群を5群、対照群を1群の計6群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも 6000 ppm、4000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、500 ppmとした。観察、検査項目として、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、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、6000 ppm群では雌に1匹の死亡が認められた。6000 ppm群では、被験物質の忌避によると考えられる顕著な摂水量の低下（対照群に対して、雄：14～30%、雌：15～37%）が認められた。雌雄ともに顕著な摂餌量の低下（雄：58～74%、雌：53～74%）と体重低下及び増加の抑制（対照群に対して、最終計測時 雄：65%、雌：71%）が認められた。消耗性変化と考えられる胸腺の萎縮が雌雄の定期解剖動物と雌の死亡動物に、脾臓の萎縮が雌の死亡動物に認められた。被験物質投与の影響は、肝臓（雌雄にGOT、 γ -GTP、総ビリルビンの増加傾向）、腎臓（雌雄ともに尿素窒素の増加）、血液系/造血器（雌雄に白血球数とリンパ球比の減少傾向、雌に血小板数の増加、雌の死亡動物に骨髓のうっ血）及び筋組織の壊死が認められた。4000 ppm群では、雌雄とも摂水量の低下（雄：21～48%、雌：21～44%）、摂餌量の低下（雄：74～100%、雌：71～109%）、投与期間後期まで体重増加の抑制（最終計測時には対照群に対して 雄：89%、雌：94%）が認められた。また、肝臓への影響として、雌で肝重量の実重量と体重比の高値が認められた。2000 ppm群では、摂水量の減少（雄：43～55%、雌：46～51%）が認められたが、摂餌量の低下、体重増加の抑制は認められなかった。肝臓への影響として、雌に肝重量の体重比の高値が認められた。1000 ppm群では、雌雄にわずかな摂水量の減少（雄：76～82%、雌：63～72%）が認められた。肝臓への影響として、雌に肝重量の体重比の高値が認められた。500 ppm群では、雌雄にわずかな摂水量の減少（雄：76～97%、雌：83～98%）が認められた。

α -フェニレンジアミン二塩酸塩の2週間混水投与の無毒性量(NOAEL)は、雌の肝臓への影響をエンドポイントとして1000 ppm（雌：0.145～0.169 g/kg body weight/day）と考えた。

以上の試験結果より、 α -フェニレンジアミン二塩酸塩の13週間混水投与のマウスの投与濃度は、雌雄とも最高用量を5000 ppmとし、以下 4000 ppmより公比2で2000 ppm、1000 ppm、500 ppm に設定した。

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

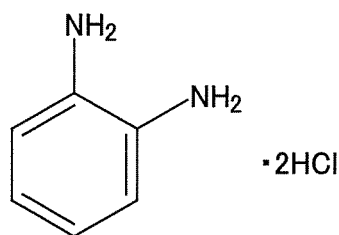
名 称 : *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩 (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride)

I U P A C 名 : 1,2-ベンゼンジアミン二塩酸塩

別 名 : 二塩酸 *o*-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 : 淡紅色結晶性粉末 (和光純薬工業 (株) 検査成績書データ)

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 : WTM0491

製 造 元 : 和光純薬工業 (株)

グ レ ー ド : 和光一級

純 度 : 100.2% (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 L 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 L 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 37 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 30 匹 (投与開始時体重範囲、雄：21.4～24.2g、雌：18.2～20.1g) 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

1997年9月15日より1997年9月29日までの2週間（14日間）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6000 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みを設けた。

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、がん原性試験の予備試験である13週間試験に使用する投与濃度を決定するために、2週間（14日間）とした。

2週間試験における経口（混水）投与濃度は、 α -フェニレンジアミン（フリーベース）のLD₅₀値（文献3）を参考にし、さらに、試験に先立って実施した検討試験（試験番号4134）の結果を参考にして決定した。すなわち、LD₅₀値（366 mg/kg）に相当する被験物質が1日当たりの飲水摂取量に含まれる濃度を算出し、この濃度を最高用量として設定した。検討試験では、4000 ppm、1333 ppm、444 ppmの被験物質を混合した飲水をマウスに雌雄各2匹ずつ2週間投与した。その結果、4000 ppm群の雌雄で体重が投与開始より減少し、摂水量も対照群の39～42%と抑制されたが、解剖時の剖検所見に異常はみられなかった。その他の群では、投与による顕著な影響は認められなかった。したがって、最高投与濃度は、4000 ppmより高い6000 ppm

とし、以下 4000 ppm より公比 2 で 2000 ppm、1000 ppm、500 ppm を設定した。

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）を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、97.3～103%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 L 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（6000 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、6000 ppm で 102%、500 ppm で 99.4%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 L 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/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 5 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	5 匹（1001～1005）	対 照 群	5 匹（2001～2005）
500 ppm 群	5 匹（1101～1105）	500 ppm 群	5 匹（2101～2105）
1000 ppm 群	5 匹（1201～1205）	1000 ppm 群	5 匹（2201～2205）
2000 ppm 群	5 匹（1301～1305）	2000 ppm 群	5 匹（2301～2305）
4000 ppm 群	5 匹（1401～1405）	4000 ppm 群	5 匹（2401～2405）
6000 ppm 群	5 匹（1501～1505）	6000 ppm 群	5 匹（2501～2505）

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 4）。

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た。また、全飼育期間を通じて、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 102 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） $22.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ）、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×D212×H120 mm）に収容した。

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、自動給水装置により自由摂取させた。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、生死及び瀕死の確認を毎日1回行い、動物の一般状態の詳細な観察は導入時、群構成時、及び投与開始後1日目（1週1日）、3日目（1週3日）、7日目（1週7日）、10日目（2週3日）及び14日目（2週7日）に実施した。

Ⅱ-3-2 体重測定

全動物について、投与開始直前（群構成時）、投与開始後1日目（1週1日）、3日目（1週3日）、7日目（1週7日）、10日目（2週3日）及び14日目（2週7日）に体重を測定した。なお、死亡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、週に2回、給水量（0、3、7、10日目）、残水量（3、7、10、14日目）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（0、7日目）、残餌量（7、14日目）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

定期解剖時に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。

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 M 1 に示した。

Ⅱ-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時に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。

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、GOT、GPT、LDH、 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 M 1 に示した。

Ⅱ-3-7 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した全動物について、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、陰、乳腺、脳、脊髄、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。この差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 N 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。

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。

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。

雄では、全投与群で死亡はみられなかった。

雌では、6000 ppm 群で投与開始後 10 日目（2 週 3 日）に 1 匹死亡がみられた。4000 ppm 以下の投与群では、死亡は認められなかった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に示した。

雄では、6000 ppm 群で 10 日目（2 週 3 日）より尿による外陰部周囲の汚染及び糞小粒が 2～4 匹に認められた。その他、糞少量が 2000 ppm、1000 ppm 及び 500 ppm 群に各 1 匹づつ、立毛が 1000 ppm 群に 1 匹認められたが、これらの動物は剖検時に水腎症であることが判明した。

雌では、6000 ppm 群で 10 日目（2 週 3 日）より立毛と糞小粒が各 1 匹に認められた。4000 ppm 以下の群では、特記すべき所見は認められなかった。死亡した 6000 ppm 群の動物には、特記すべき所見はみられなかった。

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、6000 ppm 群で 10 日目（2 週 3 日）まで体重が減少し、14 日目（2 週 7 日）には僅かに増加したものの、対照群と比較して低値であり、投与開始時の値まで回復しなかった。4000 ppm 群では、3 日目まで減少し、それ以降は増加したものの、対照群と比較して、有意な低値は 10 日目（2 週 3 日）まで続いた。2000 ppm 以下の群では、対照群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、6000 ppm 群で 7 日目（1 週 7 日）まで体重が減少し、10 日目（2 週 3 日）以降は増加したものの、対照群と比較して低値であり、投与開始時の値まで回復しなかった。4000 ppm 群では、3 日目まで減少し、それ以降は増加したものの、対照群と比較して、低値は 10 日目（2 週 3 日）まで続いた。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。

最終計測日（2 週 7 日）における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では、6000 ppm 群：65%、4000 ppm 群：89%、2000 ppm 群：97%、1000 ppm 群：98%、500 ppm 群：95%、雌では、6000 ppm 群：71%、4000 ppm 群：94%、2000 ppm 群：99%、1000 ppm 群：97%、500 ppm 群：102%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。

雌雄ともに 2000 ppm 以上の群で、投与濃度に対応した摂水量の低値が認められた。また、雌の 1000 ppm と 500 ppm 群でも投与期間中期に摂水量の低値が認められた。投与期間中の投与群の摂水量は対照群に対し、雄では、6000 ppm 群：14～30%、4000 ppm 群：21～48%、2000 ppm 群：43～55%、1000 ppm 群：76～82%、500 ppm 群：76～97%、雌では、6000 ppm 群：15～37%、4000 ppm 群：21～44%、2000 ppm 群：46～51%、1000 ppm 群：63～72%、500 ppm 群：83～98%の範囲にあった。

Ⅲ-5 摂餌量

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

雌雄とも 6000 ppm 群の全投与期間と 4000 ppm 群の投与期間前期で、対照群と比較して摂餌量の低値が認められた。その他の投与群では、対照群と比較して差は認められなかった。投与期間中の投与群の摂餌量は、対照群に対して、雄では、6000 ppm 群：58～74%、4000 ppm 群：74～100%、2000 ppm 群：89～113%、1000 ppm 群：92～103%、500 ppm 群：95～100%、雌では、6000 ppm 群：53～74%、4000 ppm 群：71～109%、2000 ppm 群：97～103%、1000 ppm 群：100～103%、500 ppm 群：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 (g/kg body weight/day) 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は、雄では、6000 ppm 群：0.201～0.438、4000 ppm 群：0.187～0.361、2000 ppm 群：0.164～0.191、1000 ppm 群：0.133～0.143、500 ppm 群：0.071～0.084、雌では 6000 ppm 群：0.268～0.635、4000 ppm 群：0.270～0.423、2000 ppm 群：0.207～0.232、1000 ppm 群：0.145～0.169、500 ppm 群：0.094～0.106 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 APPENDIX F 1, 2 に示した。

本試験では水腎症が雄では 6000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm、対照群に各 1 匹、雌では対照群に 1 匹認められた。特に雄の対照群では、採血不能動物が 2 匹あり、水腎症の動物を含む 3 匹のデータしかない為、当センターで実施した、直近の 2 週間試験 5 試験

の対照群のデータ（試験番号:0287、0299、0308、0315、0333 TABLE 7 参照）と比較検討した。

雄では、6000 ppm 群で分葉核好中球比の増加傾向、白血球数とリンパ球比の減少傾向が認められた。

雌では、6000 ppm 群で血小板数の増加及び分葉核好中球比の増加傾向、白血球数とリンパ球比の減少傾向が認められた。

Ⅲ－8 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX G 1, 2 に示した。

Ⅲ－7 血液学的検査で述べた通り、雄の対照群では、採血不能動物が 2 匹あり、水腎症の動物を含む 3 匹のデータしかない為、当センターで実施した、直近の 2 週間試験 5 試験の対照群のデータ（試験番号:0287、0299、0308、0315、0333 TABLE 7 参照）と比較検討した。

雄では、6000 ppm 群でクロールの増加、GOT と γ -GTP の上昇傾向、総ビリルビン、尿素窒素及びナトリウムの増加傾向、グルコースとリン脂質の減少傾向が認められた。また、500 ppm 群でクロールの増加が認められた。

雌では、6000 ppm 群でアルブミン、総コレステロール及び尿素窒素の増加が認められ、総蛋白とナトリウムの増加傾向、GOT の上昇傾向が認められた。

Ⅲ－9 病理学的検査

Ⅲ－9－1 剖検

死亡動物及び定期解剖動物を合わせた全動物の剖検所見を APPENDIX H 1, 2 に、死亡動物がみられた雌については、定期解剖動物の剖検所見を APPENDIX H 3 に死亡動物の剖検所見を APPENDIX H 4 に示した。

雄では、投与群や対照群で、水腎症と脾臓の黒色斑が観察されたが、被験物質投与による影響とは考えなかった。

雌の死亡動物（6000 ppm 群 1 匹）では、特記すべき所見は認められなかった。

定期解剖動物では、投与群や対照群で、水腎症と脾臓の黒色斑が観察されたが、被験物質による影響とは考えなかった。

Ⅲ-9-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を APPENDIX I 1, 2 (実重量)、J 1, 2 (体重比) に示した。

雄では、6000 ppm 群は解剖時体重が顕著に低く、胸腺、心臓、腎臓、脾臓、肝臓及び脳に実重量の低値がみられ、体重比では、精巣、肺及び脳で高値が、胸腺と脾臓で低値が認められた。

4000 ppm 群では、脾臓と脳で実重量の低値が認められた。

雌では、6000 ppm 群は解剖時体重が顕著に低く、胸腺、卵巣、心臓、脾臓及び脳で実重量の低値がみられ、体重比は、肺、腎臓、肝臓及び脳で高値が、胸腺と脾臓で低値が認められた。

4000 ppm 群では、肝臓で実重量と体重比の高値、心臓で実重量の低値が認められた。

2000 ppm 群と 1000 ppm 群では、肝臓の体重比の高値が認められた。

Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

死亡動物及び定期解剖動物を合わせた全動物の病理組織学的所見を APPENDIX K 1, 2 に、死亡動物がみられた雌については、定期解剖動物の病理組織学的所見を APPENDIX K 3 に、死亡動物の病理組織学的所見を APPENDIX K 4 に示した。

<雄>

6000 ppm 群では、胸腺の萎縮 (4 匹)、脾臓の萎縮 (3 匹)、筋組織の壊死 (3 匹) が認められた。また、水腎症が 1 匹認められ、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm 及び対照群にも各 1 匹みられた。

4000 ppm 以下の群では、被験物質投与による影響は認められなかった。

<雌>

死亡動物 (6000 ppm 群 1 匹) :

6000 ppm 群では、胸腺と脾臓の萎縮、骨髄のうっ血が認められた。

定期解剖動物 :

6000 ppm 群では、胸腺の萎縮の萎縮 (3 匹)、筋組織の壊死 (1 匹) が認められた。

4000 ppm 以下の群では、被験物質投与による影響は認められなかった。

なお、対照群に水腎症が 1 匹みられた。

IV 考察及びまとめ

α -フェニレンジアミン二塩酸塩の Crj:BDF₁マウス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。投与は、被験物質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5匹とし、被験物質投与群を5群、対照群を1群の6群構成で試験を行った。投与用量は、雌雄とも500, 1000, 2000, 4000, 6000 ppmと設定した。なお、雄の対照群で定期解剖時に採血不能動物が2匹、採血を行った3匹の動物の中の1匹に水腎症の動物が認められたため、血液学的検査と血液生化学的検査値は当センターで実施した直近の2週間試験5試験の対照群のデータ(試験番号:0287、0299、0308、0315、0333)と比較検討した。なお、本試験では水腎症が高率に認められた(雄:6000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm、対照群に各1匹、雌:対照群に1匹)。

(1) 用量-反応関係

2週間試験の結果、6000 ppm群では雌に1匹の死亡が認められた。被験物質の忌避によると考えられる顕著な摂水量の減少(対照群に対して、雄:14~30%、雌:15~37%)が認められた。雌雄ともに顕著な摂餌量の減少(雄:58~74%、雌:53~74%)と体重減少及び増加の抑制(対照群に対して、最終計測時 雄:65%、雌:71%)が認められ、雄の定期解剖動物では尿による外陰部周囲の汚染、糞小粒が観察された。雄ではグルコースの減少傾向が認められ、低栄養状態を示唆した。消耗性変化と考えられる胸腺の萎縮が、雌雄の定期解剖動物と雌の死亡動物に、脾臓の萎縮が雌の死亡動物に認められた。

6000 ppm群では、肝臓、腎臓、血液系/造血器に被験物質の毒性影響が認められた。肝臓への影響として、雌雄にGOT、 γ -GTPの上昇傾向、総ビリルビンの増加傾向がみられた。腎臓への影響として、雌雄ともに尿素窒素が増加した。血液系/造血器への影響として、雌雄に白血球数とリンパ球比の減少傾向、雌の死亡動物に骨髓のうっ血、雌に血小板数の増加が認められた。その他、筋組織の壊死がみられた。

4000 ppm群では、雌雄とも摂水量の減少(雄:21~48%、雌:21~44%)が認められた。また、投与期間前期での摂餌量の減少(雄:74~100%、雌:71~109%)、投与期間後期まで体重増加の抑制が認められ、最終計測時には対照群に対して雄では89%、雌では94%であった。肝臓への影響として、雌で肝臓重量の実重量と体重比の高値が認められた。

2000 ppm群では、摂水量の減少(雄:43~55%、雌:46~51%)が認められたのみで、摂餌量、体重への影響は認められなかった。肝臓への影響として、雌に肝臓重量の体重比の高値が認められた。

1000 ppm群では、雌雄にわずかな摂水量の減少(雄:76~82%、雌:63~72%)が認められた。肝臓への影響として、雌に肝臓重量の体重比の高値が認められた。

500 ppm群では、雌雄にわずかな摂水量の減少(雄:76~97%、雌:83~98%)が認められた。

α -フェニレンジアミン二塩酸塩の2週間混水投与によって、6000 ppm 群では雌に1匹の死亡が認められた。被験物質忌避による摂水量の減少が雌雄の全投与群に投与濃度に対応して認められた。また、摂餌量の減少と体重の減少及び増加の抑制が、雌雄とも4000 ppm以上の群で認められた。消耗性変化と考えられる胸腺の萎縮が6000 ppm 群の雌雄の定期解剖動物と雌の死亡動物に、脾臓の萎縮が雌の死亡動物に認められた。それに加えて、被験物質の毒性影響が、肝臓、腎臓、血液系/造血器及び筋組織に認められた。本試験でこれらの毒性影響がみられた最低用量は1) 肝臓への影響は、雌の肝臓重量の体重比の高値が認められた1000 ppm、2) 腎臓への影響は、雌雄ともに尿素窒素が増加した6000 ppm、3) 血液系/造血器への影響は、雌雄に白血球数とリンパ球比の減少傾向、雌の死亡動物に骨髓のうっ血、雌に血小板数の増加が認められた6000 ppm、4) 筋組織への影響は、筋肉の壊死がみられた6000 ppmであった。

(2) 無毒性量 (NOAEL) について

以上の結果より、 α -フェニレンジアミン二塩酸塩の2週間混水投与による無毒性量は、雌の肝臓への影響をエンドポイントとして500 ppm (雌: 0.094~0.106 g/kg body weight/day)と考えた。

(3) 他の文献との比較

① α -フェニレンジアミンの急性毒性

マウスに関しては、 α -フェニレンジアミン塩酸塩の報告はないが、 α -フェニレンジアミンのマウスにおける経口投与によるLD₅₀値は331~450 mg/kgと報告された(文献5)。マウスへの α -フェニレンジアミン及び塩酸塩の短期間投与による毒性については、報告がない。

② α -フェニレンジアミンの職業性暴露限界

α -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、 α -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

-フェニレンジアミンの許容濃度(文献5)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6)。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6)。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)と勧告されている(文献7)。ドイツでは、 α -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8)。

この0.1 mg/m³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 m³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 α -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急性毒性

m-フェニレンジアミン塩酸塩の報告はないが、*m*-フェニレンジアミンのマウスにおける皮下投与によるLD₅₀値は450 mg/kg、経皮投与によるLD₅₀値は5000 mg/kgと報告された（文献 6）。また、急性毒性の症状は、振戦、痙攣、興奮、チアノーゼ、虚脱がみられたと報告されている（文献 6）。

p-フェニレンジアミンのマウスについての急性毒性に関する報告はない。2週間に準じる短期間投与による毒性は、*p*-フェニレンジアミン及び塩酸塩ともに報告がない。

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毒性・がん原性試験結果

④-1. 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1回強制経口投与（68 mg/kg、102 mg/kg、153 mg/kg、230 mg/kg、345 mg/kg）した結果、雌雄とも153 mg/kg以上で死亡がみられ、死亡動物には肺と肝臓にうっ血、脾臓に萎縮と核崩壊、胸腺に核崩壊、鼻腔上皮に変性認められたが、2週間の生存動物には投与に起因した変化はみられなかった（文献 11）。

②2週間投与による毒性

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、2週間投与（111 ppm、333 ppm、1000 ppm、3000 ppm、9000 ppm）した結果、雌雄とも3000 ppm以上の群で死亡がみられ、3000 ppm以上の群では死亡動物、生存動物とも、肝臓に単細胞壊死と色素沈着、脾臓に萎縮や髄外造血の亢進、色素沈着、胸腺及びリンパ節に萎縮、副腎に出血、骨髓にうっ血や減形成、色素沈着、精巣に萎縮、胃に潰瘍、が認められ、また、肝臓の色素沈着が雄の1000 ppm以上と雌の333 ppm以上の群、骨髓の色素沈着が雌雄とも333 ppm以上の群、脾臓の髄外造血の亢進と色素沈着が雄の333 ppm以上と雌の111 ppm以上の群でみられた（文献 11）。

④-3. 104週間投与によるがん原性

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）に特有な色素沈着（黄色～褐色、鉄染色陰性）がみられた。

⑤ *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. *p*-フェニレンジアミン

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（文献 5）。*p*-フェニレンジアミンの人の事故例では、コップ一杯の水で薄められた

毛染め剤を誤飲した男性に呼吸困難、心窩部痛、顔から全身の浮腫が生じ、血中myoglobinの異常高値、筋生検で筋の壊死が証明され、腎不全で25病日に死亡した。また、スプーン一杯程度を飲んだ女性は、CPKの高値を示したが、その後回復したと報告された（文献 5）。

本試験でも α -フェニレンジアミン二塩酸塩の2週間経口投与によりマウスの筋肉に壊死が認められており、この筋肉への影響は注目に値する。

（4）13 週間試験の濃度決定

以上の試験結果より、 α -フェニレンジアミン二塩酸塩の 13 週間混水投与のマウスの投与濃度を下記のように決定した。高用量群では雌雄とも摂水量の減少が認められた。特に、最高用量の 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%）が認められたものの、最終計測時の体重は雄で対照群に比較して 89%、雌で 94%あり、臓器重量で肝臓の重量増加がみられた以外は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 5000 ppm とし、以下、4000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm（公比 2）の用量を設定した。

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. National Institute for Occupational Safety and Health (1997)
Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
Accession number : SS7875000, *o*-Phenylenediamine
NIOSH, Cincinnati, OH
4. 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
5. 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
6. 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
7. American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH)(2002)
Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological
Exposure Indices, ACGIH, Cincinnati, OH
8. Deutsche Forschungsgemeinschaft (2002).
List of MAK and BAT values 2002, *o*-Phenylenediamine
p90 Wiley-VCH, Weinheim
9. Weisburger E.K., Russfield A.B., Homburger F., Weisburger J.H., Boger E., Van
Dongen C.G. and Chu K.C. (1978)
Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term
toxicity or carcinogenicity
J. Environ. Pathol. Toxicol. 2; 325 – 356
10. Watanabe, T., Ishihara, N. and Ikeda M. (1976)
Toxicity of and biological monitoring for 1,3-diamino-2,4,6-trinitrobenzene and
Other nitro-amino derivatives of benzene and chlorobenzene.
Int. Arch. Occup. Environ. Health 37, 157 – 168

11. 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

12. 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