

**P-クロロニトロベンゼンのラット及びマウスを用いた
経口（混餌）によるがん原性試験結果報告書**

試験番号

急性：ラット/0032；マウス/0033
2週間：ラット/0051；マウス/0052
13週間：ラット/0057；マウス/0058
がん原性：ラット/0065；マウス/0066

労働安全衛生法特定化学物質第二類名称
パラニトロクロルベンゼン
CAS No. 100-00-5

平成3年12月27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

P-クロロニトロベンゼンのラット及びマウスを用いた
経口(混餌)によるがん原性試験結果報告書

本 文

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

| | |
|--------------------------------|----|
| 要 旨 | 1 |
| p - C N B について | 2 |
| I 試験材料 | |
| I - 1 被験物質の使用ロット等 | 7 |
| I - 2 被験物質の同一性・安定性 | 7 |
| I - 2 - 1 同一性 | 7 |
| I - 2 - 2 安定性 | 7 |
| I - 3 試験動物 | 8 |
| II 試験方法 | |
| II - 1 投与 | |
| II - 1 - 1 投与経路、投与方法及び投与期間 | 9 |
| II - 1 - 2 投与量または投与濃度及びその設定の理由 | 9 |
| II - 1 - 3 被験物質の濃度調整 | 12 |
| II - 1 - 4 調製時における濃度測定 | 12 |
| II - 1 - 5 投与条件下における被験物質の安定性 | 12 |
| II - 1 - 6 被験物質の摂取量 | 12 |
| II - 2 動物管理 | |
| II - 2 - 1 群分け及び個体識別方法 | 13 |
| II - 2 - 2 飼育条件 | 13 |
| 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 | 14 |
| II - 3 - 2 体重測定 | 14 |
| II - 3 - 3 摂餌量測定 | 14 |
| II - 3 - 4 血液学的検査 | 14 |
| II - 3 - 5 血液生化学的検査 | 14 |
| II - 3 - 6 尿検査 | 15 |
| II - 3 - 7 病理学的検査 | 15 |
| II - 4 数値処理と統計学的方法 | 16 |
| II - 5 試資料の保管 | 17 |

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 ラットを用いた試験

Ⅲ-1-1 急性試験

| | |
|-------------------|----|
| (1) 動物の状態観察 | 18 |
| (2) 病理学的検査 | 19 |

Ⅲ-1-2 2週間試験

| | |
|-------------------|----|
| (1) 動物の状態観察 | 20 |
| (2) 病理学的検査 | 21 |

Ⅲ-1-3 13週間試験

| | |
|-------------------------------|----|
| (1) 動物の状態観察 | 22 |
| (2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 | 23 |
| (3) 病理学的検査 | 24 |

Ⅲ-1-4 がん原性試験

| | |
|-------------------------------|----|
| (1) 動物の状態観察 | 26 |
| (2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 | 27 |
| (3) 病理学的検査 | 28 |

Ⅲ-2 マウスを用いた試験

Ⅲ-2-1 急性試験

| | |
|-------------------|----|
| (1) 動物の状態観察 | 35 |
| (2) 病理学的検査 | 36 |

Ⅲ-2-2 2週間試験

| | |
|-------------------|----|
| (1) 動物の状態観察 | 37 |
| (2) 病理学的検査 | 38 |

Ⅲ-2-3 13週間試験

| | |
|-------------------------------|----|
| (1) 動物の状態観察 | 39 |
| (2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 | 40 |
| (3) 病理学的検査 | 41 |

Ⅲ-2-4 がん原性試験

| | |
|-------------------------------|----|
| (1) 動物の状態観察 | 43 |
| (2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 | 44 |
| (3) 病理学的検査 | 45 |

Ⅳ 考察

Ⅴ 結論

Ⅵ 文献

TABLES

| | | |
|-------|----|--|
| TABLE | 1 | EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE FEED (OR GAVAGE) STUDIES OF P-CHLORONITROBENZENE |
| TABLE | 2 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT (ACUTE STUDIES) |
| TABLE | 3 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT (ACUTE STUDIES) |
| TABLE | 4 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT (TWO-WEEK STUDIES) |
| TABLE | 5 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT (TWO-WEEK STUDIES) |
| TABLE | 6 | FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT (TWO-WEEK STUDIES) |
| TABLE | 7 | FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT (TWO-WEEK STUDIES) |
| TABLE | 8 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDIES) |
| TABLE | 9 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDIES) |
| TABLE | 10 | FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDIES) |
| TABLE | 11 | FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDIES) |
| TABLE | 12 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT (TWO-YEAR STUDIES) |
| TABLE | 13 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT (TWO-YEAR STUDIES) |
| TABLE | 14 | FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT (TWO-YEAR STUDIES) |
| TABLE | 15 | FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT (TWO-YEAR STUDIES) |
| TABLE | 16 | CLINICAL OBSERVATION (104W-SUMARY) - RAT:TWO-YEAR STUDIES - |

TABLES (CONTINUED)

| | |
|----------|---|
| TABLE 17 | NEOPLASTIC LESIONS (SPLEEN) INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS :RAT :MALE |
| TABLE 18 | NEOPLASTIC LESIONS (SPLEEN) INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS :RAT :FEMALE |
| TABLE 19 | NUMBER OF RAT WITH SELECTED SPLEEN LESION (MALE) |
| TABLE 20 | NUMBER OF RAT WITH SELECTED SPLEEN LESION (FEMALE) |
| TABLE 21 | NEOPLASTIC LESIONS (LIVER) INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS :RAT :MALE |
| TABLE 22 | NEOPLASTIC LESIONS (ADRENAL GRAND) INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS :RAT :MALE |
| TABLE 23 | NEOPLASTIC LESIONS (ADRENAL GRAND) INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS :RAT :FEMALE |
| TABLE 24 | CAUSE OF DEATH : RAT |
| TABLE 25 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE (ACUTE STUDIES) |
| TABLE 26 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE (ACUTE STUDIES) |
| TABLE 27 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE (TWO-WEEK STUDIES) |
| TABLE 28 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE (TWO-WEEK STUDIES) |
| TABLE 29 | FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE (TWO-WEEK STUDIES) |
| TABLE 30 | FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE (TWO-WEEK STUDIES) |

TABLES (CONTINUED)

| | |
|----------|--|
| TABLE 31 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDIES) |
| TABLE 32 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDIES) |
| TABLE 33 | FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDIES) |
| TABLE 34 | FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDIES) |
| TABLE 35 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE (TWO-YEAR STUDIES) |
| TABLE 36 | SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE (TWO-YEAR STUDIES) |
| TABLE 37 | FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE (TWO-YEAR STUDIES) |
| TABLE 38 | FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE (TWO-YEAR STUDIES) |
| TABLE 39 | CLINICAL OBSERVATION (104W-SUMMARY) -MOUSE:TWO-YEAR STUDIES- |
| TABLE 40 | NUMBER OF MOUSE WITH SELECTED SPLEEN LESION (MALE) |
| TABLE 41 | NUMBER OF MOUSE WITH SELECTED SPLEEN LESION (FEMALE) |
| TABLE 42 | CAUSE OF DEATH : MOUSE |

F I G U R E S

- FIGURE 1 METABOLIC PATHWAY OF P-CHLORONITROBENZENE
- FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE : RAT:MALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 3 SURVIVAL ANIMAL RATE : RAT:FEMALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:MALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 5 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:FEMALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 6 FOOD CONSUMPTION : RAT:MALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION : RAT:FEMALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 8 SURVIVAL ANIMAL RATE : MOUSE:MALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 9 SURVIVAL ANIMAL RATE : MOUSE:FEMALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 10 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:MALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 11 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:FEMALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 12 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:MALE (TWO-YEAR STUDIES)
- FIGURE 13 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:FEMALE (TWO-YEAR STUDIES)

P H O T O G R A P H S

- PHOTOGRAPH 1 SPLEEN, ENLARGED AND BLACK (74.1ppm, 222ppm, 667ppm, 2000ppm)
13-WEEK STUDY, RAT, MALE, STUDY NO. 0057
- PHOTOGRAPH 2 SPLEEN, DEPOSIT OF HEMOSIDERIN (MODERATE) : A
13-WEEK STUDY, RAT, MALE, CONTROL, ANIMAL NO. 0057-1002
(H. E., X150) (WHITE PULP : D, RED PULP : E)
- PHOTOGRAPH 3 SPLEEN, CONGESTION (MARKED) : A,
DEPOSIT OF HEMOSIDERIN (MARKED) : B
EXTRAMEDULLARY HEMATOPOIESIS (MODERATE) : C
13-WEEK STUDY, RAT, MALE, 2000ppm, ANIMAL NO. 0057-1504
(H. E., X150) (WHITE PULP : D, RED PULP : E)
- PHOTOGRAPH 4 SPLEEN, CAPSULE HYPERPLASIA (MODERATE) : F
13-WEEK STUDY, RAT, FEMALE, 667ppm, ANIMAL NO. 0057-2407
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 5 SPLEEN, ENLARGED (2000ppm, 6000ppm) AND BLACK (667ppm, 2000ppm,
6000ppm)
13-WEEK STUDY, MOUSE, MALE, STUDY NO. 0058
- PHOTOGRAPH 6 SPLEEN, CONGESTION (MODERATE) : A
DEPOSIT OF HEMOSIDERIN (MARKED) : B
EXTRAMEDULLARY HEMATOPOIESIS (MARKED) : C
13-WEEK STUDY, MOUSE, MALE, 6000ppm, ANIMAL NO. 0058-1503
(H. E., X150) (WHITE PULP : D, RED PULP : E)
- PHOTOGRAPH 7 SPLEEN, FIBROSIS (SEVERE) : A
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1304
(H. E., X60)
- PHOTOGRAPH 8 SPLEEN, CAPSULE HYPERPLASIA : A
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1316
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 9 SPLEEN, FATTY METAMORFOSIS : A
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1309
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 10 SPLEEN, FATTY METAMORFOSIS : A
TWO-YEAR STUDY, RAT, FEMALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-2329
(OIL RED O X60)
- PHOTOGRAPH 11 SPLEEN, NODULE (FIBROMA) : A
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1304

P H O T O G R A P H S (CONTINUED)

- PHOTOGRAPH 12 SPLEEN, FIBROMA
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1304
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 13 SPLEEN, NODULE (FIBROSARCOMA) : A
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1319
- PHOTOGRAPH 14 SPLEEN, FIBROSARCOMA
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1332
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 15 SPLEEN, OSTEOSARCOMA
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1335
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 16 SPLEEN, HEMANGIOSARCOMA
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1335
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 17 ADRENAL, PHEOCHROMOCYTOMA : A
TWO-YEAR STUDY, RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO. 0065-1319
(H. E., X60) (CORTEX : B)
- PHOTOGRAPH 18 LIVER, HEPATOCELL CARCINOMA : A
TWO-YEAR STUDY, MOUSE, FEMALE, 2000ppm, ANIMAL NO. 0066-2338
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 19 LIVER, HEMANGIO SARCOMA
TWO-YEAR STUDY, MOUSE, FEMALE, 2000ppm, ANIMAL NO. 0066-2306
(H. E., X60)
- PHOTOGRAPH 20 SPLEEN, DEPOSIT OF HEMOSIDERIN : A
TWO-YEAR STUDY, MOUSE, FEMALE, 2000ppm, ANIMAL NO. 0066-2310
(H. E., X60)
- PHOTOGRAPH 21 SPLEEN, OSSIFICATION : A
TWO-YEAR STUDY, MOUSE, FEMALE, 2000ppm, ANIMAL NO. 0066-2343
(H. E., X60)
- PHOTOGRAPH 22 NASAL CAVITY, DEPOSIT OF HEMOSIDERIN : A
104WEEK STUDY, MOUSE, MALE, 2000ppm, ANIMAL NO. 0066-1306
(H. E., X150) (OLFACTORY EPITHELIUM : B)
- PHOTOGRAPH 23 LUNG, BRONCHIOLAR CELL HYPERPLASIA : A
104WEEK STUDY, MOUSE, FEMALE, 2000ppm, ANIMAL NO. 0066-2310
(H. E., X150) (BRONCHIOLE : B, ALVEOLAR : C)

APPENDIXES

- APPENDIX A 1-1 CLINICAL OBSERVATION (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX A 1-2 CLINICAL OBSERVATION (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 1-3 CLINICAL OBSERVATION (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 1-4 CLINICAL OBSERVATION (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX A 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 3-1 GROSS FINDINGS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 3-2 GROSS FINDINGS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 3-3 GROSS FINDINGS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 3-4 GROSS FINDINGS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 3-5 GROSS FINDINGS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 3-6 GROSS FINDINGS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 3-7 GROSS FINDINGS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 3-8 GROSS FINDINGS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX A 4-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 4-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 4-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 4-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 4-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 4-6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 4-7 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 4-8 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (ACUTE STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 5-1 IDENTITY AND PURITY IN OF p-CNB
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(ACUTE STUDIES)
- APPENDIX A 5-2 STABILITY OF p-CNB
AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(ACUTE STUDIES)
- APPENDIX A 5-3 RESULTS OF ANALYSIS OF FORMULATED DIETS
IN THE ACUTE STUDIES OF p-CNB

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 1-1 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 1-2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 1-3 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 1-4 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 4-1 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 4-2 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 4-3 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 4-4 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 5-1 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX B 5-2 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 5-3 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 5-4 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX B 5-5 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX B 5-6 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 5-7 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX B 6-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 6-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 6-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 6-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 6-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 6-6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 6-7 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 7-1 IDENTITY AND PURITY OF p-CNB
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-WEEK STUDIES)
- APPENDIX B 7-2 STABILITY OF p-CNB
AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-WEEK STUDIES)
- APPENDIX B 7-3 RESULTS OF ANALYSIS OF FORMULATED FIETS
IN THE TWO-WEEK STUDIES OF p-CNB
- APPENDIX B 7-4 RESULTS OF STABILITY OF FORMULATED DIETS
IN THE TWO-WEEK STUDIES OF p-CNB

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX C 1-1 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX C 1-2 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 1-3 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 1-4 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX C 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX C 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX C 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX C 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX C 4-1 CHEMICAL INTAKE CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX C 4-2 CHEMICAL INTAKE CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 4-3 CHEMICAL INTAKE CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 4-4 CHEMICAL INTAKE CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX C 5-1 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX C 5-2 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 5-3 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 5-4 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX C 6-1 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX C 6-2 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 6-3 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 6-4 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX C 7-1 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX C 7-2 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 7-3 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 7-4 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX C 8-1 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX C 8-2 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX C 8-3 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX C 8-4 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX C 8-5 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX C 9-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:MALE
- APPENDIX C 9-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 9-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 9-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX C 10-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), RELATIVE
RAT:MALE
- APPENDIX C 10-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), RELATIVE
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 10-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 10-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX C 11-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX C 11-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX C 11-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX C 11-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX C 11-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX C 12-1 IDENTITY AND PURITY OF p-CNB
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- APPENDIX C 12-2 STABILITY OF p-CNB
AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- APPENDIX C 12-3 RESULTS OF ANALYSIS OF FORMULATED DIETS
IN THE THIRTEEN-WEEK STUDIES OF p-CNB
- APPENDIX C 12-4 RESULTS OF STABILITY OF FORMULATED DIETS
IN THE THIRTEEN-WEEK STUDIES OF p-CNB

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX D 1 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX D 2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX D 3 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX D 4 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX E 1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX E 2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX E 3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX E 4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX F 1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX F 2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX F 3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX F 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX G 1 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX G 2 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX G 3 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX G 4 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX H 1 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX H 2 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX H 3 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX H 4 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
-
- APPENDIX I 1 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX I 2 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX I 3 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX I 4 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
-
- APPENDIX J 1 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX J 2 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX J 3 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX J 4 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX K 1 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX K 2 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX K 3 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX K 4 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX K 5 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX K 6 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX K 7 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX K 8 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX L 1 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:MALE
- APPENDIX L 2 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:FEMALE
- APPENDIX L 3 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:MALE
- APPENDIX L 4 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX M 1 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), RELATIVE
RAT:MALE
- APPENDIX M 2 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), RELATIVE
RAT:FEMALE
- APPENDIX M 3 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:MALE
- APPENDIX M 4 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX N 1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX N 2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX N 3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX N 4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX N 5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX N 6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS
- APPENDIX N 7 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX N 8 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX O 1 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
RAT:MALE
- APPENDIX O 2 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
RAT:FEMALE
- APPENDIX O 3 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
MOUSE:MALE
- APPENDIX O 4 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX P 1 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND TIME OF TUMOR OCCURRENCE
RAT:MALE
- APPENDIX P 2 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND TIME OF TUMOR OCCURRENCE
RAT:FEMALE
- APPENDIX P 3 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND TIME OF TUMOR OCCURRENCE
MOUSE:MALE
- APPENDIX P 4 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND TIME OF TUMOR OCCURRENCE
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX Q 1 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
RAT:MALE
- APPENDIX Q 2 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
RAT:FEMALE
- APPENDIX Q 3 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
MOUSE:MALE
- APPENDIX Q 4 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX R 1 IDENTITY AND PURITY OF p-CNB
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-YEAR STUDIES)
- APPENDIX R 2 STABILITY OF p-CNB AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-YEAR STUDIES)
- APPENDIX R 3 RESULTS OF ANALYSIS OF FORMULATED DIETS
IN THE TWO-YEAR STUDIES OF p-CNB
- APPENDIX R 4 RESULTS OF STABILITY OF FORMULATED DIETS
IN THE TWO-YEAR STUDIES OF p-CNB
- APPENDIX S 1 NUTRIENTS IN RAT AND MOUSE FEED
- APPENDIX S 2 CONTAMINANTS IN RAT AND MOUSE FEED
- APPENDIX T 1 METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS
- APPENDIX T 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

要旨

p-クロロニトロベンゼン (p-CNB) の投与によるがん原性を検索する目的で、ラットとマウスを用いて経口投与による2年間(104週間)の試験を実施した。試験に使用した動物はF344/DuCrj(Fischer)ラットとCrj:BDF₁マウスで雌雄各群とも50匹とし、被験物質の投与群を3群と対照群1群の計4群の構成で行った。投与濃度はラットで1000ppm、200ppm、40ppm、マウスでは2000ppm、500ppm、125ppmとしp-CNBを混合した粉末飼料の自由摂取で、104週間投与した。観察、検査項目は一般状態の観察、体重、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。

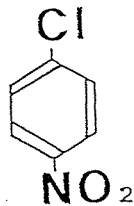
生死状況についてはラットの雌雄の1000ppm群で生存率の低下が認められ、死因の多くは脾臓の腫瘍であった。

腫瘍性病変についてはラットでは雌雄に脾臓の線維腫、線維肉腫、骨肉腫、血管肉腫及び肉腫NOS、副腎の褐色細胞腫の発生増加が認められ、p-CNBのF344/DuCrj(Fisher)ラットに対する明かながん原性が証明された。腫瘍の発生する濃度については、脾臓では雄で200ppm以上、雌では1000ppmであり、副腎では雌雄とも1000ppmであった。

マウスでは、雄に血管腫、悪性リンパ腫及び肝細胞癌、雌に肝臓の血管肉腫と肝細胞癌の発生増加が認められたが、発生率が低値であることから、p-CNBのCrj:BDF₁マウスに対するがん原性は断定できなかった。

p-CNB について

< 構造式、分子量 >



分子量 : 157.56

CAS.No. : 100-00-5

< 名称と別名 >

名 称 : p-Chloronitrobenzene (p-クロロニトロベンゼン^{*1})

別 名 : p-Nitrochlorobenzene (ハロラ-ニトロクロルベンゼン^{*2})

1-Chloro-4-nitrobenzene (1-クロロ-4-ニトロベンゼン^{*1})

4-Chloronitrobenzene (4-クロロニトロベンゼン)

4-Chloro-1-nitrobenzene (4-クロロ-1-ニトロベンゼン)

^{*1} IUPAC命名法

^{*2} 労働安全衛生法特定化学物質障害予防規則第二類名称

< 物理化学的性状等 >

性 状 : 黄色、結晶

融 点 : 83℃

沸 点 : 242℃

比 重 : d_4^{20} 1.52

蒸 気 圧 : 0.15torr (30℃)

溶 解 性 : 水に不溶

エーテル、二硫化炭素、温エタノールに可溶

保存条件 : 火気のない冷所に保存

<用途>

日本においては、p-フェニレンジアミン、p-ニトロアニリル(ファスレッドGGベース)、p-アニシジン、2-クロロ-p-アニシジン(ファストレッドRベース)、3-ニトロ-p-アニシジン(ファストボルド-GPベース)、p-アミノフェノール、p-クロロアニリル、2,5-ジアミノ-1-ニトロベンゼンなどのアゾ染料、硫化染料の中間体、フェナセチン(風邪薬等)、p-フェネチジン(ゴム老化防止剤、食品酸化防止剤、飼料防腐剤等)、アセトアミノフェノンなどの原料、ビタミン製造の中間体などに使用されている。(文献 1,2,3,4)

米国においては、染料、ゴムの製造の中間体、農薬の製造の中間体などに使用されている。(文献 5)

<生産量>

日本では、1978年に 19,177t、1987年に 19,600t、1988年に 20,400t、1989年に 21,700t生産された。(文献 2,3,4,6)

<許容濃度>

作業環境中の許容濃度は、日本(日本産業衛生学会、1990)では、0.1ppmであり、管理濃度は、 $1\text{mg}/\text{m}^3$ である。(文献 7,8)

米国(ACGIH)はTLVを0.1ppm(Skin)としている。また、ドイツ、チェコスロバキア、ソビエトにおいては許容濃度を $1\text{mg}/\text{m}^3$ に設定している。(文献 5)

<法的規制>

日本においては、労働安全衛生法の特定化学物質等障害予防規則における特定第二類物質に指定されており、作業主任者の選任、労働衛生教育、製造に係わる設備、局排の性能等が規制されている。(文献 1)

<人への影響>

人への影響は、局所の刺激は少ないが、皮膚からよく吸収され、メトヘモグロビン形成に起因する溶血性貧血がみられ、赤血球にはハインツ小体が見られることがある。そのほか、悪心、嘔吐、頭痛、食欲不振、めまい、息苦しさなどの自覚症状がみられる。(文献 9,10)

田淵ら(1985)によると最近の中毒発生事例においては、頭重、食欲不振、皮膚刺激、全身倦怠、吐き気、めまい、睡眠障害などを自覚症状として訴え、顕著なチアノーゼがみられ、この事例では、経皮吸収の程度が大きかったものと判断されている。(文献 11)

<代謝>

ラットにおける代謝は、Yoshidaら(1991)によると腹腔内にp-CNBを投与した後、8~24時間後の尿より8つの代謝物(p-クロロアニリン、2,4-ジクロロアニリン、p-ニトロチオフェノール、2-クロロ-5-ニトロフェノール、2-アミノ-5-クロロフェノール、p-クロロホルムアニリド、4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド、p-クロロアセトアニリド)と未変化のp-CNBが確認された。(Figure 1, 文献 12)

ACGIH(1986)の資料ではラットに経口投与した後、72時間以内に尿中に95.5%排泄され、主な尿中代謝物は、ニトロクロロフェノールの抱合体であり、また、ニトロベンゼンがN-アセチルシステインと抱合したものである。その他の代謝物としては、アミノクロロフェノールとN-アセチル化したアミノクロロフェノールであると報告している。(文献 5)

人における代謝は、吉田ら(1987)によると急性中毒患者の尿より、その主代謝物はp-クロロアニリンと推定した。(文献 13)

<変異原性>

微生物を用いた試験ではS.Haworthら(1983)によると代謝活性化を用いた場合においてTA100、TA1535で変異原性が認められた。(文献 14)

また、労働安全衛生に関する調査研究(1981)によると代謝活性化を用いた場合においてTA100で変異原性が認められた。(文献 15)

S.M.Gallowayら(1987)によると培養細胞CHO(チャイニーズハムスターの卵巣細胞)を用いた染色体異常試験では代謝活性化を用いた場合及び用いない場合で、染色体異常誘発性が認められた。また、姉妹染色体分体交換(SCE)では、代謝活性化を用いた場合において染色体異常誘発(SCEの

増加)が認められた。(文献 16)

労働安全衛生に関する調査研究(1981)によると培養細胞C H L (チャイニーズハムスターの肺細胞)を用いた染色体異常試験では代謝活性化を用いた場合において、染色体異常誘発性が認められた。(文献 17)

S.Zimmeringら(1989)によるとin vivoの変異原性試験であるショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験では変異原性は認められていない。(文献 18)

<動物試験>

急性試験は、N I O S H (1987)の資料によると、経口投与のLD₅₀値はラットでは420mg/kg、マウスは650mg/kgであり、経皮投与のLD₅₀値はラットでは16mg/kgとの報告がある。(文献 19)

亜慢性毒性試験は、A C G I H (1987)の資料によると、ラットに1日6時間、2週間にわたってp-C N B を0.05、0.29、0.64mg/ℓの濃度で吸入暴露した試験では、すべての濃度でメトヘモグロビン血症と脾重量の増加が生じ、0.29及び0.64mg/ℓ群では細精管の変性、副睾丸の精子数の異常、脾、骨髓及び腎の病理組織学的変化がみられ、0.64mg/ℓ群で肝の重量比の増加がみられたと報告している。(文献 5)

R.Nairら(1986)によるとラットに1日6時間、週5日間、4週間にわたって5、15、45mg/m³の濃度で吸入暴露した試験ではメトヘモグロビン濃度が投与用量に対応した増加がみられ、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度が15及び45mg/m³群で有意に減少した。脾臓及び肝臓の臓器重量は45mg/m³群で増加した。また、脾臓に髄外造血とヘモジデリン沈着がみられた。(文献 20)

長期試験では、K.Weisburgerら(1978)によると、ラットの雄に2000、4000mg/kgで3ヶ月間、続いて250、500mg/kgで2ヶ月間、さらに500、1000mg/kgで13ヶ月間の合計18ヶ月間p-C N B を混餌により投与を行った結果は、腫瘍の発生はみられなかった。同様にマウスの雌雄に3000、6000mg/kgの濃度で18ヶ月間投与を行った結果は、雌雄の高濃度群で血管腫瘍の増加と、雄の低濃度群で肝腫瘍の増加がわずかにみられた。(文献 21)

A C G I H (1987)の資料によると、ラットの雌雄に2年間0.1、0.7、5.0mg/kg/dayの投与量で強制経口により投与を行った結果は、中及び高濃度群で血中メトヘモグロビン濃度の上昇がみられたのみと報告している。(文献 5)

＜芳香族アミノ化合物と芳香族ニトロ化合物のメトヘモグロビン形成と脾臓腫瘍について＞

一般的にこれらの化合物の毒性としては、メトヘモグロビン血症を起こすことは知られている。このメトヘモグロビン血症はヘモグロビンのヘムの鉄イオンが2価鉄から酸化作用を受けて3価鉄になることによって生じる。また、メトヘモグロビンはNADH依存のメトヘモグロビン還元酵素により還元され、この還元酵素活性は種によって異なり、人と比べてラットは5倍、マウスは10倍活性が高いことも知られている。(文献 22,23)

これらの化合物は長期の動物試験において脾臓の鬱血、ヘモジデリン沈着が起こり、線維化を形成する。さらにラットの脾臓の線維化から線維腫、線維肉腫、骨肉腫及び血管腫を起こすという報告がある。

(文献 24,25,26)

以上のことからメトヘモグロビン血症を起こすp-CNBも脾臓に腫瘍を起こすと思われる。

I 試験材料

I-1 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号

急性試験：WKE1251

2週間試験：CDR3186

13週間試験：CDM5913

がん原性試験：CDG0305

製造元：和光純薬工業株式会社

グレード：特級

純度：99.8%以上

I-2 被験物質の同一性・安定性

I-2-1 同一性

被験物質として使用するp-CNBを各ロット毎に赤外吸収スペクトルを測定し、文献値と比較することにより、同一であることを確認した。なお、それらの結果について、急性試験は Appendix A 5-1、2週間試験は Appendix B 7-1、13週間試験は Appendix C 12-1、がん原性試験は Appendix R 1 に示した。

I-2-2 安定性

被験物質として使用するp-CNBを各ロット毎に受領時及びその使用終了時に、赤外吸収スペクトル、ガスクロマトグラムを測定し、安定であることを確認した。なお、それらの結果について、急性試験は Appendix A 5-2、2週間試験は Appendix B 7-2、13週間試験は Appendix C 12-2、がん原性試験は Appendix R 2 に示した。

I - 3 試験動物

動物は急性試験、2週間試験、13週間試験及びがん原性試験ともに日本チャールス・リバー(株)のF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)及びCrj:BDF₁マウス(SPF)の雌雄を使用した。

急性試験では、ラット、マウスとも雌雄各 72匹を生後5週齢で導入し、1週間の検疫・馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見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 60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:103~116g、雌:81~88g/マウス雄:19.1~22.2g、雌:14.5~16.8g)を選別し、試験に供した。

2週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各 72匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見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 60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:128~145g、雌:99~109g/マウス雄:21.6~24.8g、雌:17.6~20.3g)を選別し、試験に供した。

13週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各 72匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見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 60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:122~136g、雌:90~108g/マウス雄:21.5~24.4g、雌:18.1~20.1g)を選別し、試験に供した。

がん原性試験では、ラット、マウスとも雌雄各 240匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見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(投与開始時体重範囲、ラット雄:115~131g、雌:97~108g/マウス雄:14.6~20.1g、雌:13.5~17.3g)を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF₁マウスを選択した理由は、以下のとおりである。

動物の選択理由

イ) 遺伝的に安定している。

ロ) 腫瘍の自然発生率が低い。

ハ) 過去にがん原性試験のデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られている。

Ⅱ 試験方法

Ⅱ-1 投与

Ⅱ-1-1 投与経路、投与方法及び投与期間

急性試験は、p-CNBのオリーブ油懸濁液を胃ゾンデによって胃内に1回強制経口投与した。動物は投与前日より絶食させ、投与容量は各群とも、体重(投与当日測定)10g当りラットでは0.1mlとし、マウスでは0.2mlとした。なお、対照群についても同様にオリーブ油を胃ゾンデによって胃内に体重10g当りラットでは0.1ml、マウスでは0.2ml強制経口投与した。

2週間試験、13週間試験およびがん原性試験については、p-CNBを混合した粉末飼料の自由摂取とし、2週間試験では14日間連続、13週間試験では92～94日間、がん原性試験では104週間連続投与とした。

Ⅱ-1-2 投与量または投与濃度及びその設定の理由

急性試験

急性試験では、ラットの最高用量を2030mg/kg(体重1kg当りの投与量)に設定し、それ以下、1350mg/kg、900mg/kg、600mg/kg、400mg/kg(公比1.5)とした。マウスでは、最高用量を4000mg/kgに設定し、それ以下、2500mg/kg、1560mg/kg、977mg/kg、610mg/kg(公比1.6)とした。

LD₅₀の文献値(文献19)を利用してラットは1680mg/kg、840mg/kg、420mg/kg、210mg/kg、105mg/kg(公比2.0)、マウスは4000mg/kg、1818mg/kg、826mg/kg、376mg/kg、171mg/kg(公比2.2)で急性試験の予備試験を行った結果より急性試験の投与濃度を決定した。

2週間試験

2週間試験では、ラットの最高投与濃度を4860ppmに設定し、それ以下、1620ppm、540ppm、180ppm、60ppm(公比3.0)とした。マウスでは、最高投与濃度を9000ppmに設定し、それ以下、3000ppm、1000ppm、333ppm、111ppm(公比3.0)とした。

急性試験の結果、ラットでは 900mg/kg以上の群で8割以上の動物が死亡し、600mg/kg以下の群ですべての動物が生存した。2週間試験の最高投与濃度は确实中毒量の 600～700mg/kgを1日の摂餌量中に混入すればよいと考えて 4860ppmとした。最低投与濃度は、毒性を現さない条件を満たすと考えられる 60ppmとした。

マウスでは、雄では 2500mg/kg以上の群で全例死亡し、1560mg/kg群で 5/10例、雌では 2500mg/kg以上の群で全例死亡し、1560mg/kg群で 7/10例、977mg/kg群で 1/10例死亡した。2週間試験の最高投与濃度は确实中毒量の 1500mg/kg～1600mg/kgを1日の摂餌量中に混入すればよいと考えて 9000ppmとした。最低投与濃度は、毒性を現さない条件を満たすと考えられる 111ppmとした。

13週間試験

13週間試験では、ラットの最高投与濃度を 2000ppmに設定し、それ以下、667ppm、222ppm、74.1ppm、24.7ppm(公比3.0)とした。マウスでは、最高投与濃度を 6000ppmに設定し、それ以下、2000ppm、667ppm、222ppm、74.1ppm(公比3.0)とした。

2週間試験の結果、ラットは最高投与群の 4860ppm群で雌 3匹が死亡・瀕死となり、生存動物では雌雄とも円背位、立毛等の症状が観察され、体重では対照群に比べ 50%程度であり、剖検、病理組織学的検査で血液障害を裏付ける所見が観察され、毒性が強く現れたと考えた。1620ppm群では全例生存したが体重増加の抑制(対照群にくらべ雄は 92%、雌は 95%)、剖検、病理組織学的検査で血液障害を裏付ける所見が観察された。

以上の結果、13週間試験の最高濃度は 4860ppmと 1620ppmの間にあり 1620ppmに近いと考えて 2000ppmと決定した。最低濃度は 60ppmで脾臓の黒色腫大とヘモデジリン沈着、うっ血、髄外造血等の血液障害を裏付ける所見が認められたことから 60ppm以下の 24.7ppmとした。

マウスでは、最高投与群の 9000ppm群で雄 5匹、雌 9匹が死亡し、生存動物では雌雄とも円背位、立毛等の症状が観察され、体重では対照群に比べ 70%程度の体重増加であり、剖検、病理組織学的検査で血液障害を裏付ける所見が観察され、毒性が強く現れたと考えた。3000ppm以下の群では、3000ppm群にも剖検、血液・生化学的検査、臓器重量の測定、病理組織学的検査で血液障害を裏付ける所見が観察されが全例生存し、体重増加抑制はみられなかった。以上の結果、13週間試験の最高濃度は 6000ppmと決定した。最低濃度は、最高濃度の 6000ppmから公比 3で下げて 5段階設定し 74.1ppmとした。

がん原性試験

がん原性試験では、ラットの最高投与濃度を 1000ppm に設定し、それ以下、200ppm、40ppm (公比5.0) とした。マウスでは、最高投与濃度を 2000ppm に設定し、それ以下、500ppm、125ppm (公比4.0) とした。

13週間試験の結果、ラットは全例生存し、投与期間中 74.1ppm 以上の投与群では、剖検、血液・生化学的検査、臓器重量の測定、病理組織学的検査で血液障害を裏付ける所見が観察された。特に最高投与群の 2000ppm では貧血様症状とわずかの体重増加の抑制もみられた。以上の結果、がん原性試験の最高投与濃度は 2000ppm と 667ppm の間にあると考えて 1000ppm と決定した。最低投与濃度は 74.1ppm と 24.7ppm の間にあると考えて 40ppm とした。

マウスでは、最高投与群の 6000ppm で雌に1例死亡動物がみられ、雌雄とも体重増加の抑制(対照群に比べて雄で85.1%、雌で94.7%)がみられ、全例に貧血様症状、剖検、血液・生化学的検査、臓器重量の測定、病理組織学的検査で血液障害を裏付ける所見が観察された。2000ppm 以下の群では体重の増加抑制はみられなかったが貧血様症状、剖検、血液・生化学的検査、臓器重量の測定、病理組織学的検査で血液障害を裏付ける所見が 222、667ppm 群で観察された。以上の結果、がん原性試験の最高投与濃度は 2000ppm と決定した。最低投与濃度は 74.1ppm と 222ppm の間にあると考えて 125ppm とした。

II - 1 - 3 被験物質の濃度調製

急性試験では、投与当日、各投与群毎にp-CNBをオリーブ油に懸濁し、被験物質溶液を調製した。なお、投与濃度はラットでは203g/ℓを最高濃度として、以下135g/ℓ、90g/ℓ、60g/ℓ、40g/ℓとし、マウスでは200g/ℓを最高濃度とし、以下125g/ℓ、78g/ℓ、48.85g/ℓ、30.5g/ℓとした。

2週間試験、13週間試験、がん原性試験では、p-CNBと粉末飼料を混合して所定の濃度(2週間試験はラット1.2% マウス2.2%、13週間試験は2.8%、がん原性試験は6%)に調製し、さらに、各設定濃度になるように粉末飼料を加え希釈調製した。なお、本試験における濃度の表示は%値、ppm値ともに、重量対重量比とした。また、調製頻度は餌の交換にあわせて週1回とした。

II - 1 - 4 調製時における濃度測定

急性試験で投与したp-CNBのオリーブ油懸濁液の濃度、2週間、13週間、がん原性試験で投与したp-CNBの混合飼料の濃度は、急性、2週間、13週間試験では試験開始後に、がん原性試験では試験開始後3ヶ月毎にガスクロマトグラフ法によって測定し、設定濃度に対し急性試験では93.2~105.3%、2週間試験では81.7~92.5%、13週間試験では79.3~102.9%、がん原性試験では67.8~116.0%の範囲に各々調製されていることを確認した。

なお、それらの結果について、急性試験はAppendix A 5-3、2週間試験はAppendix B 7-3、13週間試験はAppendix C 12-3、がん原性試験はAppendix R 3に示した。

II - 1 - 5 投与条件下における被験物質の安定性

粉末飼料と混合調製したp-CNBの安定性については、その濃度をガスクロマトグラフ法により測定し、7日間の安定性を確認した。

なお、それらの結果について、2週間試験はAppendix B 7-4、13週間試験はAppendix C 12-4、がん原性試験はAppendix R 4に示した。

II - 1 - 6 被験物質の摂取量

2週間、13週間、がん原性試験のp-CNBの摂取量は、体重と摂餌量の測定値及び設定濃度から算出した。

なお、それらの結果について、2週間試験はAppendix B 4-1~4、13週間試験はAppendix C 4-1~4、がん原性試験はAppendix G 1~4に示した。

Ⅱ－２ 動物管理

Ⅱ－２－１ 群分け及び個体識別方法

供試動物の各投与群への割り当ては、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 27）。

試験期間中の動物の個体識別は、ケージに個体識別番号を付すことにより行った。

なお、ラットとマウスは、バリア区域内の独立した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、他試験と区別した。

Ⅱ－２－２ 飼育条件

動物は、急性試験、2週間試験、13週間試験及びがん原性試験ともに、全飼育期間を通して、温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ 、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。

動物のケージへの収容は、全ての試験の検疫期間においては1ケージ当り5匹の群飼（ステンレス製網ケージ、ラット：340W×294D×176H mm、マウス：224W×212D×120H mm）、急性試験の観察飼育期間、2週間試験、13週間試験、がん原性試験の馴化期間及び投与期間においては1ケージ当り1匹の単飼（ステンレス製二連網ケージ、ラット：170W×294D×176H mm、マウス：112W×212D×120H mm）とし、ケージ交換は2週間毎に実施した。なお、2週間試験、13週間試験及びがん原性試験の馴化期間及び投与期間においては、被験物質の飛散防止の為に、動物は排気型キャビネット（ドラフト形式）内で飼育し、がん原性試験においては、2週間毎のケージ交換時にケージ配置のローテーションを実施した。

飼料は、オリエンタル酵母工業（株）のCRF-1を使用し、2週間試験、13週間試験、がん原性試験の馴化期間及び投与期間はCRF-1粉末飼料（3Mrad- γ 線照射滅菌飼料）を粉末飼料給餌器により、また急性試験の全飼育期間及び2週間試験、13週間試験、がん原性試験の検疫期間はCRF-1固型飼料（3Mrad- γ 線照射滅菌飼料）を固型飼料給餌器により自由摂取させた。

飲水は、全飼育期間を通して、市水（秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線滅菌し、自動給水により自由摂取させた。

なお、がん原性試験における使用飼料の品質管理は、栄養成分についてはオリエンタル酵母工業（株）の分析データ資料を、夾雑物については、（財）日本食品分析センターの分析データ資料を使用ロットごとに入手し、異常のないことを確認した。（Appendix S 1,2）

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

急性試験では、p-CNBの強制経口投与当日は投与後1時間以内、1～2時間、2～4時間、4～6時間、その翌日からは毎日朝夕2回、また、2週間試験、13週間試験及びがん原性試験では毎日朝夕2回、動物の一般状態の観察を行った。

Ⅱ－３－２ 体重測定

急性試験及び2週間試験では、0日(投与開始直前)、1日(1週1日)、2日(1週2日)、4日(1週4日)、7日(1週7日)、10日(2週3日)及び14日(2週7日)、13週間試験では週1回、がん原性試験では14週間までは週1回、それ以降は2週に1回、体重を測定した。

Ⅱ－３－３ 摂餌量測定

2週間試験及び13週間試験では週1回、がん原性試験では14週までは週1回、それ以降は2週に1回、摂餌量を測定した。

Ⅱ－３－４ 血液学的検査

13週間試験及びがん原性試験の定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血したEDTA-2K加血液を用いて血液学的検査を行った。

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。

検査項目は Table 1、検査方法は Appendix T 1 に示した。

Ⅱ－３－５ 血液生化学的検査

13週間試験及びがん原性試験の定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血したヘパリンナトリウム加血液を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。

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。

検査項目は Table 1、検査方法は Appendix T 1 に示した。

Ⅱ－3－6 尿検査

13週間試験及びがん原性試験の投与最終週まで生存した動物について、投与最終週の後半に新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

検査項目は Table 1、検査方法は Appendix T 1 に示した。

Ⅱ－3－7 病理学的検査

各試験とも解剖時に全動物について肉眼的に観察を行った。急性試験と2週間試験では雌雄各群の2～4例の動物の臓器を、13週間試験とがん原性試験では全動物の臓器を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、Table 1に示した臓器及び肉眼的に変化のみられた臓器を、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。なお、鼻腔については切歯の後端(レベル1)、切歯乳頭(レベル2)、第一臼歯の前端(レベル3)の3カ所で切り出し(横断)、検査した。

臓器重量は13週間試験及びがん原性試験の定期解剖時まで生存した動物についてTable 1に示した臓器の湿重量を測定した。

腫瘍性病変についてはPeto検定に用いるコンテックス(0:定期解剖例に発見された腫瘍、1:死亡/瀕死例に発見された腫瘍で、かつ、直接死因に関係しない腫瘍、2:多分1だと言うが、確かでない腫瘍、3:多分4だと言うが、確かでない腫瘍、4:死亡/瀕死例に発見された腫瘍で、直接死因に関係する腫瘍)を付与した。(文献 28)

II - 4 数値処理と統計学的方法

(1) 数値の取扱いと表示

各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、ラットでは小数点以下第1位を四捨五入して整数値で、マウスでは小数点以下第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、1週間(7日)を通しての摂餌量を小数点以下第1位まで計測し、この値を7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。

p-CNBの摂取量は摂餌量にp-CNBの設定濃度を乗じ体重で除した値をmg/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 T 2に示した精度により表示した。A/G比はアルブミン/(総蛋白-アルブミン)による計算で求め小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

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った。

(2) 母数の取扱いと表示

各種統計検定における群内動物数(母数)は総括表に示した。

体重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、欠測となったデータについては「-」で表示し、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「-」で表示し母数より除いた。

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。

剖検と病理組織学的検査データは、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。

ただし、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器を除いたものを母数とした。

(3) 統計方法

本試験で得られた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。

予備検定については5%の有意水準で両側検定を行い、最終検定では5%及び1%で両側検定を行った。

なお、病理組織学的検査のうち13週試験及びがん原性試験では非腫瘍性病変について、死亡/瀕死例、定期解剖例に分け、所見のみられなかった動物をグレード0として χ^2 検定を行った。また、尿検査についても χ^2 検定を行った。なお χ^2 検定は対照群と各投与群間との検定である。

腫瘍性病変については、各臓器、腫瘍ごとに、各群いずれかの発生率が5%を越える腫瘍について、Peto検定、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(Ⅱ-3-7 病理学的検査を参照)を用いて、死亡率法<Standard rates:以下STAと略す。>(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<Prevalence rates:以下PREと略す。>(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<Combined rates:以下COMと略す。>(コンテックス0~4の総計で検定)を行った。Fisher検定は対照群と各投与群間の検定を行った。

Ⅱ-5 試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、被験物質、その他本試験に係る資料は日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書にしたがって、試資料保管施設に保管する。保管期間は最終報告書提出後10年間とする。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 ラットを用いた試験

Ⅲ-1-1 急性試験（試験番号：0032）

（1）動物の状態観察

生死状況をTable 2,3 に示した。

動物の死亡は、雌雄とも 900mg/kg以上の群でp-CNB投与後1日から4日の間に認められ、雄では 2030mg/kg群：10/10例、1350mg/kg群：9/10例、900mg/kg群：8/10例、雌では 2030mg/kg群：10/10例、1350mg/kg群：10/10例、900mg/kg群：8/10例であった。

この生死状況より、Litchfield Wilcoxon法を用いてp-CNBの経口投与によるLD₅₀値を算出すると以下のとおりである。

| | |
|--|--------------------------|
| <性・種・系統> : <LD ₅₀ 値(95%信頼限界)> | |
| 雄 ラット F344/DuCrj : | 860mg/kg(735~1006mg/kg) |
| 雌 ラット F344/DuCrj : | 680mg/kg(544~ 850mg/kg) |

一般状態の観察結果を Appendix A 1-1,2 に示した。

観察期間の一般状態の観察においては、死亡動物では、雌雄とも多くの動物に自発運動量減少、円背位、尿による外陰部周囲の汚染及び汚染部の着色（被毛が黄褐色に着色）、立毛、鼻血性分泌物及び鼻漿液性分泌物等の所見が認められ、また、一部の動物に失調性歩行、流涙等の所見が認められた。生存動物では、観察期間前半に、雌雄の 900mg/kg以上の群で、死亡例とはほぼ同様の所見が認められたが、投与後14日の最終観察時には立毛以外に所見は認められなかった。また、雌雄の 600mg/kg以下の群においては、観察期間前半に、円背位、尿による外陰部周囲の汚染及び汚染部の着色（被毛が黄褐色に着色）、立毛及び鼻血性分泌物等の所見が認められたが、投与後14日の最終観察時にはそれらの所見は全く認められなくなった。

体重の推移をTable 2,3、Appendix A 2-1,2 に示した。

死亡動物の体重は、雌雄ともに死亡発見時まで継続して低下していた。生存動物の体重は、雌雄の 900mg/kg以上の群で、投与後4日までは低下していたが、7日以降は増加に転じ推移した。また、雌雄の 600mg/kg以下の

群の体重は、投与後1日または2日まで低下したが、それ以降は増加に転じ推移した。なお、投与後14日の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 1350mg/kg群:87%、900mg/kg群:82%、600mg/kg群:93%、400mg/kg群:97%、雌では 900mg/kg群:101%、600mg/kg群:102%、400mg/kg群:101%であった。

(2) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見をAppendix A 3-1~4 に示した。

死亡動物では雌雄とも多くの例に肺の褐色化、胸腺の萎縮や赤色斑、心臓の赤色斑、膀胱の赤色または褐色尿貯留、及び血液の褐色化が観察された。

定期解剖動物では精巣の萎縮が雄の 600mg/kg以上の群で、脾臓の腫大が雌の 900mg/kg群で観察された。

病理組織学的検査

病理組織学的所見をAppendix A 4-1~4 に示した。

雄

死亡動物に肺、心臓、脳及び眼球の出血、胸腺の萎縮、出血及び核崩壊、肝臓の中心性壊死、及び精巣の萎縮が観察された。

定期解剖動物では脾臓のヘモジデリン沈着が全投与群で、脾臓の鬱血、肝臓と腎臓のヘモジデリン沈着、及び精巣の萎縮が 600mg/kg以上の群で、骨髄のヘモジデリン沈着が 900mg/kg以上の群で観察された。

雌

死亡動物に鼻腔の血栓、肺、心臓、副腎及び脳の出血、胸腺の萎縮、出血及び核崩壊、脾臓の鬱血、肝臓の中心性壊死、及び腎臓の尿細管壊死が観察された。

定期解剖動物では脾臓の鬱血とヘモジデリン沈着、及び肝臓のヘモジデリン沈着が全投与群で、骨髄の赤血球造血の増加と腎臓のヘモジデリン沈着が 600mg/kg以上の群で観察された。

Ⅲ-1-2 2週間試験（試験番号：0051）

（1）動物の状態観察

生死状況をTable 4,5 に示した。

動物の死亡は、雌の 4860ppm群においてのみ、p-CNB投与開始後11～12日の間に3/10例認められた。

一般状態の観察結果を Appendix B 1-1,2 に示した。

投与期間中の一般状態の観察においては、雌の 4860ppm群の死亡動物では、円背位、尿による外陰部周囲の汚染及び汚染部の着色（被毛が黄褐色に着色）、立毛、流涙、鼻血性分泌物、自発運動量減少及び瘦削等の所見が認められ、衰弱により死亡した。生存動物では、4860ppm群においては雌雄ともに死亡動物とはほぼ同様の所見が認められ、14日の最終観察時には多くの動物が衰弱状態に陥っていた。また、1620ppm以下の群では、1620ppm群において着色（尿による外陰部周囲の汚染部の被毛が黄褐色に着色）が多数例に認められたが、他の群においては雌雄ともにp-CNB投与と関連があると思われる所見は認められなかった。

体重の推移をTable 4,5、Appendix B 2-1,2 に示した。

雌雄の 4860ppm群では、投与開始以降、体重は継続して低下した。雌雄の1620ppm群では投与期間を通して、対照群と比較して、体重増加の抑制が認められ、雄では91～94%、雌では90～95%であった。一方、雌雄の 540ppm以下の群の体重推移は対照群と顕著な差は認められなかった。

14日の最終計測日における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 4860ppm群：50%、1620ppm群：92%、540ppm群：99%、180ppm群：101%、60ppm群：100%、雌では 4860ppm群：53%、1620ppm群：95%、540ppm群：99%、180ppm群：99%、60ppm群：101%であった。

摂餌量をTable 6,7、Appendix B 3-1,2 に示した。

雌雄ともに 1620ppm以上の群において、1週の摂餌量が対照群と比較して低下し、雄では 4860ppm群：45%、1620ppm群：75%、雌では 4860ppm群：53%、1620ppm群：70%であった。一方、雌雄の 540ppm以下の群の摂餌量は対照群と差は認められなかった。

(2) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見をAppendix B 5-1～3 に示した。

死亡動物(雌)では肺の褐色化と褐色斑、胸腺の萎縮と褐色化、脾臓の腫大、黒色化及び破裂、肝臓と腎臓の褐色化や黒色化、膀胱の褐色尿貯留、副腎と血液の褐色化、及び全身の貧血様色調が観察された。

雄の定期解剖動物では脾臓の腫大と黒色化が 180ppm以上の群で、血液の褐色化が 540ppm以上の群で、肺と肝臓の褐色化、及び膀胱の褐色尿貯留が 1620ppm以上の群で、皮下組織の黄疸様色調、胸腺、肝臓及び精巣の萎縮、及び腎臓の黒色化が 4860ppm群で観察された。また、腎臓の褐色化が 1620ppm群にのみ観察された。

雌の定期解剖動物では脾臓の黒色化が全投与群で、脾臓の腫大が180ppm以上の群で、肝臓と腎臓の褐色化が 540ppm以上の群で、皮下組織の黄疸様色調、及び肺と血液の褐色化が 1620ppm以上の群で、腎臓の黒色化と胸腺の萎縮が 4860ppm群で観察された。また、膀胱の褐色尿貯留が 1620ppm群と540ppm群に、肺の出血が 1620ppm群にのみ観察された。

病理組織学的検査

病理組織学的所見をAppendix B 6-1～3 に示した。

雄

定期解剖動物では脾臓の鬱血と髄外造血が全投与群で、脾臓のヘモジデリン沈着と肝臓の髄外造血が 180ppm以上の群で、骨髄の赤血球造血の増加、肝臓と腎臓のヘモジデリン沈着、及び精巣の萎縮が 1620ppm以上の群で、鼻腔の血栓、骨髄のヘモジデリン沈着、胸腺の萎縮、盲腸の潰瘍、及び肝臓の中心性壊死が 4860ppm群で観察された。また、腎臓の好酸体の増強が 1620ppm群にのみ観察された。

雌

死亡動物に鼻腔の血栓、肺の出血と浮腫、骨髄の赤血球造血の増加、胸腺の萎縮、脾臓の鬱血、ヘモジデリン沈着及び髄外造血、心臓の血栓、肝臓の中心性壊死、ヘモジデリン沈着及び髄外造血、及び腎臓のヘモジデリン沈着が観察された。

定期解剖動物では脾臓の鬱血、ヘモジデリン沈着及び髓外造血が全投与群で、骨髓の赤血球造血の増加と肝臓の髓外造血が180ppm以上の群で、肝臓のヘモジデリン沈着が540ppm以上の群で、腎臓のヘモジデリン沈着が1620ppm以上の群で、鼻腔の血栓、肺の炎症、骨髓のヘモジデリン沈着、胸腺の萎縮、心臓の血栓と巣状壊死、及び肝臓の中心性壊死が4860ppm群で観察された。また、ハーダー腺の炎症が1620ppm群にのみ観察された。

Ⅲ-1-3 13週間試験(試験番号:0057)

(1) 動物の状態観察

生死状況をTable 8,9 に示した。

動物の死亡は、雌雄ともに全ての群で認められなかった。

一般状態の観察結果をAppendix C 1-1,2 に示した。

投与期間中の一般状態の観察において、p-CNB投与との関連性が示唆された主な所見は、雌雄ともに222ppm以上の群に認められた貧血、雄の2000ppm群及び雌の667ppm以上の群に認められた着色(尿による外陰部周囲の汚染部の黄褐色の着色)であった。

体重の推移をTable 8,9、Appendix C 2-1,2 に示した。

2000ppm群において、雌雄とも投与期間前半に、対照群と比較して体重増加の抑制が認められ、その抑制率は雄では6~19%、雌では7~15%であった。一方、雄の667ppm群、222ppm群及び24.7ppm群では投与期間後期に、対照群と比較して体重の増加が認められ、その増加率は667ppm群:5~6%、222ppm群:6~7%、24.7ppm群:6%であった。

13週の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では2000ppm群:97%、667ppm群:106%、222ppm群:107%、74.1ppm群:104%、24.7ppm群:106%、雌では2000ppm群:96%、667ppm群:102%、222ppm群:103%、74.1ppm群:103%、24.7ppm群:103%であった。

摂餌量を Table 10, 11, Appendix C 3-1, 2 に示した。

雌雄の 2000ppm 群及び雌の 667ppm 群において投与期間初期(雄では投与開始後 1~4 週、雌では 1~2 週)に、対照群と比較して摂餌量の低下が認められ、その低下率は雄では 6~37%、雌では 10~40%であった。

一方、雄では 2000ppm 群の 8 週以降、667ppm 以下の群の 4 週以降、雌では 4~5 週以降に全投与群での多くの週に、対照群と比較して摂餌量の増加が認められ、その増加率は雄では 3~18%、雌では 11~25%であった。

(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix C 5-1, 2 に示した。

雄では、74.1ppm 以上の群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少が認められ、222ppm 以上の群で平均赤血球容積の増加が認められた。また、血小板数は 667ppm 以上の群では減少し、74.1ppm、24.7ppm 群では増加するという相反する結果を示した。さらに、2000ppm 群で分葉核好中球比の減少及びリンパ球比の増加が認められた。

雌では、全投与群で赤血球数の減少が認められ、222ppm 以上の群で平均赤血球容積の増加及びヘモグロビン濃度の減少、667ppm、222ppm 群でヘマトクリット値の減少がそれぞれ認められ、667ppm 以上の群で血小板数の減少が認められた。さらに、2000ppm 群で分葉核好中球比の減少及びリンパ球比の増加が認められた。

その他、雌雄の 2000ppm 群で白血球数の著しい増加がみられたが、これは、白血球数を測定する際に、被験物質の投与による影響で、通常では認められない赤血球の不完全溶血が生じ、これを白血球として誤計測してしまったことが原因と考えられた。したがって、正確な白血球数は不明であった。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix C 6-1, 2 に示した。

雄では、222ppm 以上の群で L A P 活性の低下が認められ、667ppm 以上の群で総蛋白量の減少、G P T 活性、A L P 活性の低下及び総ビリルビン量、無機リン量の増加が認められ、2000ppm 群で総コレステロール量、尿素窒素量の増加、G O T 活性の上昇が認められた。その他、667ppm 群でアルブミ

ン量の減少がみられた。

雌では、222ppm以上の群でALP活性、LAP活性の低下が認められ、667ppm以上の群でA/G比、総ビリルビン量の増加が認められ、2000ppm群でGPT活性の低下及び尿素窒素量の増加が認められた。

尿検査

尿検査の結果を Appendix C 7-1,2 に示した。

雌雄ともに特記すべき変化は認められなかった。

(3) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix C 8-1,2 に示した。

雄では脾臓の腫大と黒色化、及び腎臓の黒色または緑色化が74.1ppm以上の群で、肝臓の褐色または黒色化が667ppm以上の群で、精巣の萎縮が2000ppm群に観察され、また、脾臓の表面の顆粒状化が667ppm、222ppm群の多くの例に認められた。

雌でも脾臓の黒色化が全投与群で、脾臓の腫大、及び腎臓の黒色または緑色化が74.1ppm以上の群で、肝臓の褐色化が667ppm以上の群で観察され、また、脾臓の表面の顆粒状化が667ppm、222ppm群の多くの例に認められた。

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 C 9-1,2、C 10-1,2 に示した。

雄では肝臓の実重量と体重比の高値が74.1ppm以上の群で、脾臓の実重量と体重比の高値と精巣の体重比の低値が222ppm以上の群で、心臓、腎臓及び脳の実重量と体重比、副腎及び肺の体重比の高値、胸腺と精巣の実重量と体重比の低値が2000ppm群でみられた。その他、心臓と腎臓の実重量の高値が667ppmから24.7ppm群で、肝臓の実重量の高値が24.7ppm群でみられたが、これらの群の解剖時体重は対照群に比べ高く、体重比では有意差が認められなかったことから、体重の差による変化と考えられた。また、精巣の体重比のみの低値が222ppm群で認められたが、投与用量に対応した変化ではなかった。

雌では脾臓の実重量と体重比、脳の実重量、及び肝臓の体重比の高値が222ppm以上の群で、心臓及び腎臓の実重量と体重比、及び肝臓の実重量の高値が667ppm以上の群で、肺と脳の体重比の高値が2000ppm群でみられた。その他、胸腺の実重量と体重比の高値が667ppm群にみられたが、投与用量に対応した変化ではなかった。

なお、上記の臓器のうち脾臓の変化が最も顕著であり、2000ppm群の実重量の平均値(雄:5412mg、雌:4102mg)は対照群(雄:548mg、雌:369mg)に比べ約10倍の増加を示した。

病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix C 11-1,2 に示した。

雄

脾臓の鬱血と髄外造血の発生増加、及びヘモジデリン沈着の程度の増強が74.1ppm以上の群で、骨髓の赤血球造血の増加、脾臓の被膜増生、肝臓のヘモジデリン沈着の発生増加、及び腎臓の好酸体の程度の増強が222ppm以上の群で、腎臓のヘモジデリン沈着とハーダー腺の炎症の発生増加が667ppm以上の群で、肝臓の髄外造血と中心性腫脹、精巣の萎縮と間細胞増生の発生増加が2000ppm群で認められた。

雌

脾臓の鬱血と髄外造血、腎臓のヘモジデリン沈着の発生増加、及び脾臓のヘモジデリン沈着の程度の増強が74.1ppm以上の群で、骨髓の赤血球造血の増加と脾臓の被膜増生の発生増加が222ppm以上の群で、肝臓のヘモジデリン沈着とハーダー腺の炎症の発生増加が667ppm以上の群で、肝臓の髄外造血の発生増加が2000ppm群で認められた。

Ⅲ-1-4 がん原性試験（試験番号：0065）

（1）動物の状態観察

生死状況をTable 12,13及び Figure 2,3 に示した。

動物の生存率は、雄の 1000ppm群の72～104週において、対照群に比較して低下した。

各群の104週における生存動物数（生存率）は、雄では 1000ppm群：12/50例（24%）、200ppm群：42/50例（84%）、40ppm群：46/50例（92%）、対照群：43/50例（86%）、雌では 1000ppm群：28/50例（56%）、200ppm群：38/50例（76%）、40ppm群：41/50例（82%）、対照群：36/50例（72%）であった。

一般状態の観察結果を Appendix D 1,2 に示した。また投与期間中の一般状態の観察においてp-CNB投与との関連性が示唆された主な所見及び外部腫瘍をTable 16 に示した。

ほぼ全投与期間を通じて、雄では 1000ppm群、雌では 40ppm以上の群で、着色（尿による外陰部周囲の汚染部の黄褐色の着色）、雌雄の 200ppm以上の群で貧血が認められた。また、1000ppm群の死亡動物においては、雄では62週、雌では70週以降に、腹腔内部（腹腔内左側、脾臓付近）に腫瘍が触診される動物が増加し、その一部の動物では腹部膨隆も認められた。

外部腫瘍の保有動物数は、雌雄ともに各投与群と対照群の間に顕著な差は認められなかった。

体重の推移を Table 12,13、Figure 4,5 及び Appendix E 1,2 に示した。

体重は、雌雄ともに 1000ppm群の全投与期間（1～104週）及び雌では200ppm群の 40週以降において、対照群と比較して増加抑制が認められ、その抑制率は雄では 1000ppm群：4～12%、雌では 1000ppm群：4～20%、200ppm群：3～7%であった。

摂餌量を Table 14,15、Figure 6,7 及び Appendix F 1,2 に示した。

摂餌量は、雌雄ともに 1000ppm群の投与初期（1～8週）に、対照群と比較して低下が認められ、その低下率は雄では 3～17%、雌では 3～22%であった。一方、雌雄ともに各投与群において投与期間中に対照群と比較して摂餌量の増加を示す週が散見され、その増加率は雄では 3～10%、雌では 4～12%であった。

(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液学的検査

血液学的検査の結果をAppendix H 1,2に示した。

雄では、200ppm以上の群で平均赤血球容積、血小板数の増加、ヘモグロビン濃度の減少及び減少傾向が認められ、1000ppm群で赤血球数、ヘマトクリット値の減少が認められた。その他、1000ppm群で桿状核好中球比の増加がみられた。

雌では、200ppm以上の群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少及び平均赤血球容積の増加が認められた。その他、1000ppm群で単球比の減少、200ppm群で血小板数の減少及び異型リンパ球比の増加がみられた。

なお、雌雄の1000ppm群で白血球数の増加がみられたが、これは、白血球数を測定する際に、被験物質の投与による影響で、通常では認められない赤血球の不完全溶血が生じ、これを白血球として誤計測してしまったことが原因と考えられた。したがって、正確な白血球数は不明であった。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果をAppendix I 1,2に示した。

雄では、1000ppm群で総蛋白量の減少及び総ビリルビン量の増加、ALP活性の上昇がみられた。

雌では、200ppm以上の群で総ビリルビン量の増加が認められ、1000ppm群で尿素窒素量、カリウム量、無機リン量の増加及びグルコース量の減少が認められた。その他、200ppm以上の群で γ -GTP活性の低下、1000ppm群でGPT活性の低下、200ppm群でA/G比の増加、40ppm群で総コレステロール量、リン脂質量の増加がみられた。

尿検査

尿検査の結果をAppendix J 1,2に示した。

雌の1000ppm、40ppm群でpH値の分布に有意な差がみられた。

その他には、特記すべき変化は認められなかった。

(3) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix K 1~4 に示した。それらのうち、対照群と比較して投与群に特徴的あるいは発生率の高かった所見について以下に述べる。

雄では、死亡/瀕死例に 1000ppm群で、リンパ節の腫大と赤色化、脾臓の結節、変形及び顆粒状化、肝臓の結節、膵臓の結節、腹膜の結節、腹腔の出血と腫瘍、胸腔の出血の観察される例が多かった。定期解剖例に、投与群では 200ppm群で脾臓の混濁、嚢胞、200ppm以上の群で脾臓の腫大、結節、変形、表面の粗、1000ppm群で膵臓の結節、全臓器の暗色化が対照群より高い発生率を示した。

雌では、死亡/瀕死例に 200ppm以上の群で肺の赤色化、脾臓の変形と顆粒状化、腹腔の出血、1000ppm群で脾臓の結節、肝臓の結節、腹膜の結節、腹腔の腫瘍、胸腔の出血の観察される例が多かった。定期解剖例では投与群に 200ppm以上の群で脾臓の腫大、混濁、梗塞、嚢胞、変形及び表面の粗、膵臓の結節、1000ppm群で、脾臓の結節、ハーダー腺の赤色点/斑、全臓器の暗色化が観察される例が対照群より多く観察された。

臓器重量

定期解剖時に測定した臓器重量を Appendix L 1,2(総括表・実重量)、Appendix M 1,2(総括表・体重比)に示した。

雄では脾臓と肝臓の実重量と体重比の高値が200ppm以上の群でみられた。また、心臓、肺及び脳の実重量と体重比、副腎の体重比の高値が1000ppm群でみられた。なお、腎臓は200ppm群で実重量と体重比、1000ppm群で体重比のみの高値を示した。

雌では脾臓と脳の実重量と体重比、心臓、肺及び肝臓の体重比の高値が200ppm以上の群でみられた。また、心臓、肺及び肝臓の実重量、副腎、卵巣及び腎臓の体重比の高値が1000ppm群でみられた。

病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を Appendix N 1~4 に示した。腫瘍性病変の結果は担腫瘍動物数及び腫瘍数を Appendix O 1,2 に、発生率を解剖時期とともに Appendix P 1,2 に、統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)の結果を Appendix Q 1,2 にそれぞれ示した。

脾臓

非腫瘍性病変について雄では、線維化が死亡/瀕死例の 1000ppm群、定期解剖例の 200ppm以上の群で、皮膜の増生が死亡/瀕死例、定期解剖例ともに 200ppm以上の群で、鬱血と髄外造血が定期解剖例の 200ppm群で、脂肪性変態が定期解剖例の 200ppm以上の群で対照群と比較して有意な発生増加を示した。また、ヘモジデリン沈着の発生減少が死亡/瀕死例の 1000ppm群で対照群と比較して有意にみられた。

雌では、線維化が死亡/瀕死例の 1000ppm群、定期解剖例の 200ppm以上の群で、皮膜の増生が死亡/瀕死例、定期解剖例ともに、200ppm以上の群で、鬱血と髄外造血と脂肪性変態が定期解剖例の 200ppm以上の群で対照群と比較して有意な発生増加を示した。

腫瘍性病変について雄では、線維腫(1000ppm群:15/50, 200ppm群:1/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)がPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定では1000ppm群で対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。また、線維肉腫(1000ppm群:29/50, 200ppm群:0/50, 40ppm群:1/50, 対照群:0/50)がPeto検定(STA、PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定では1000ppm群に対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。骨肉腫(1000ppm群:11/50, 200ppm群:0/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)はPeto検定(STA、PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定では1000ppm群で対照群と比較して有意な発生率の増加をみた。肉腫NOS(1000ppm群:6/50, 200ppm群:1/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)はPeto検定(STA、PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定では1000ppm群で対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。血管肉腫(1000ppm群:7/50, 200ppm群:5/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)はPeto検定(STA、PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定では200ppm以上の群で対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。線維腫、線維肉腫、骨肉腫、肉腫NOS、血管肉腫を合わせた統計処理(1000ppm群:47/50, 200ppm群:7/50, 40ppm群:1/50, 対照群:0/50)でもPeto検定(STA、PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定で200ppm以上の群が対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。なお、脾臓の腫瘍

(単核球性白血病を除く)の他臓器への転移が 1000ppm群の30/47例にみられた。転移先は肝臓、脾臓、腹膜、精巣、前立腺、肺、リンパ節、精嚢、皮下組織、膀胱及び副腎であった。なお、単核球性白血病(1000ppm群:2/50, 200ppm群:1/50, 40ppm群:2/50, 対照群:7/50)はFisher検定で200ppm群に対照群と比較して有意な発生率の減少を示したが投与用量との対応はみられなかった。(Table 17,19)

雌では線維腫(1000ppm群:3/50, 200ppm群:1/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)はPeto検定(PRE)とCochran-Armitage検定で増加傾向が示された。また線維肉腫(1000ppm群:17/50, 200ppm群:0/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)はPeto検定(STA、PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定では1000ppm群で対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。骨肉腫(1000ppm群:3/50, 200ppm群:0/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)はPeto検定(STA、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。血管肉腫(1000ppm群:4/50, 200ppm群:2/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)はPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。線維腫、線維肉腫、骨肉腫、肉腫NOS、血管肉腫を合わせた統計処理(1000ppm群:26/50, 200ppm群:3/50, 40ppm群:0/50, 対照群:0/50)でもPeto検定(STA、PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定で1000ppm群が対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。なお、脾臓の腫瘍(単核細胞性白血病を除く)の他臓器への転移が1000ppm群の20/26例にみられた。転移先は肝臓、腹膜、脾臓、肺、副腎、リンパ節、心臓、大腸であった。なお、単核球性白血病(1000ppm群:4/50, 200ppm群:7/50, 40ppm群:1/50, 対照群:11/50)はFisher検定で40ppm群に対照群と比較して有意な発生率の減少を示したが投与用量との対応はみられなかった。(Table 18,20)

肝臓

非腫瘍性病変について雄では、白血病細胞浸潤の発生減少が死亡/瀕死例の1000ppm群で対照群と比較して有意にみられた。また、肉芽形成の発生減少が定期解剖例の40ppm群に対照群と比較して有意にみられたが投与用量との対応はみられなかった。

雌では、肉芽形成の発生減少が定期解剖例の1000ppm群に対照群と比較して有意にみられた。また、虚脱と白血病細胞浸潤が死亡/瀕死例の1000ppm群に対照群と比較して有意な発生減少がみられたが、両方とも早期死亡による変化であった。

雄の腫瘍性病変については肝細胞腺腫(1000ppm群:0/50, 200ppm群:5/50, 40ppm群:2/50, 対照群:0/50)はFisher検定で200ppm群が対照群と比較して有意な発生率の増加を示したが投与用量との対応はみられなかった。(Table 21)

下垂体

非腫瘍性病変について雌の血管拡張の発生減少が定期解剖例の200ppm以上の群に対照群と比較して有意にみられたが投与用量との対応はみられなかった。

腫瘍性病変について雄の下垂体腺腫(1000ppm群:7/50, 200ppm群:20/50, 40ppm群:13/50, 対照群:14/50)はCochran-Armitage検定で減少傾向を示し、腺腫、腺癌を合わせた統計処理(1000ppm群:7/50, 200ppm群:20/50, 40ppm群:14/50, 対照群:14/50)においてもCochran-Armitage検定で減少傾向を示したが、これは早期死亡による変化であった。

甲状腺

腫瘍性病変について雄のC-細胞腺腫、C-細胞癌を合わせた統計処理(1000ppm群:4/49, 200ppm群:7/50, 40ppm群:9/50, 対照群:2/49)ではFisher検定で40ppm群に対照群と比較して有意な発生率の増加を示したが投与用量との対応はみられなかった。

副腎

非腫瘍性病変について雄では、髄質の過形成の発生増加が定期解剖例の40ppm群に対照群と比較して有意にみられたが投与用量との対応はみられなかった。

雌では皮質、髄質それぞれの過形成の発生増加が定期解剖例の1000ppm群に対照群と比較して有意にみられた。髄質の過形成の発生減少が死亡/瀕死例の200ppm群に、また紫斑症様変化の発生減少が定期解剖例の200ppm以上の群にともに対照群と比較して有意にみられたが投与用量との対応みられなかった。

腫瘍性病変について雄では、褐色細胞腫(1000ppm群:16/50, 200ppm群:6/50, 40ppm群:7/50, 対照群:7/50)はPeto検定(PRE)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。褐色細胞腫、悪性褐色細胞腫を合わせた統計処理(1000ppm群:18/50, 200ppm群:9/50, 40ppm群:9/50, 対照群:9/50)ではPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。(Table 22)

雌では、褐色細胞腫(1000ppm群:16/50, 200ppm群:4/50, 40ppm群:6/50, 対照群:3/50)はPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定で1000ppm群に対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。褐色細胞腫、悪性褐色細胞腫を合わせた統計処理(1000ppm群:17/50, 200ppm群:5/50, 40ppm群:6/50, 対照群:3/50)ではPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定で1000ppm群に対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。(Table 23)

精巣

非腫瘍性病変については、萎縮の発生減少が死亡/瀕死例の1000ppm群に対照群と比較して有意にみられたが早期死亡による変化であった。

腫瘍性病変については、間細胞腺腫(1000ppm群:44/50, 200ppm群:46/50, 40ppm群:49/50, 対照群:42/50)はPeto検定(PRE)で増加傾向を示した。

卵巣

非腫瘍性病変については、嚢胞の発生増加が定期解剖例の40ppm群に対照群と比較して有意にみられたが投与用量との対応はみられなかった。

鼻腔

非腫瘍性病変について雄では、ヘモジデリン沈着の発生増加が死亡/瀕死例の1000ppm群、定期解剖例の200ppm以上の群に対照群と比較して有意にみられた。嗅上皮のエオジン好性変化の発生増強が定期解剖例の40ppm群に対照群と比較して有意に見られたが投与用量との対応はみられなかった。

雌では、ヘモジデリン沈着の発生増加が死亡/瀕死例及び定期解剖例の200ppm以上の群に対照群と比較して有意にみられた。嗅上皮のエオジン好性変化の発生減少が定期解剖例の200ppm以上の群に対照群と比較して有意に見られた。鼻腺の呼吸上皮化生の発生減少が定期解剖例の40ppm以上の群で対照群と比較して有意にみられた。嗅上皮のエオジン好性変化の発生減少が死亡/瀕死例の40ppm群に対照群と比較して有意に見られ、また呼吸上皮のエオジン好性変化の発生減少が定期解剖例の40ppm, 200ppm群に対照群と比較して有意にみられたが両方とも投与用量との対応はみられなかった。

鼻涙管

非腫瘍性病変について雄の炎症の発生減少が死亡/瀕死例の1000ppm群に対照群と比較して有意にみられたが早期死亡による変化であった。

骨 髄

非腫瘍性病変について雄では、造血亢進の発生増加が死亡/瀕死例、定期解剖例の 1000ppm群に対照群と比較して有意にみられた。白血病細胞浸潤の発生減少が死亡/瀕死例の 1000ppm群に対照群と比較して有意にみられたが早期死亡による変化であった。

雌では、造血亢進、肉芽形成、出血が定期解剖例の 1000ppm群に対照群と比較して有意な発生増加がみられた。白血病細胞浸潤の発生減少が死亡/瀕死例の 1000ppm群に対照群と比較して有意にみられたが早期死亡による変化であった。

リンパ節

非腫瘍性病変について雄では、肉芽形成の発生増加が定期解剖例の 1000ppm群で対照群と比較して有意にみられた。なお発生減少が定期解剖例の 40ppm群で対照群と比較して有意にみられたがこれは投与用量と対応していなかった。

雌では、ヘモジデリン沈着と肉芽形成が定期解剖例の 200ppm以上の群で対照群と比較して有意な発生増加がみられた。白血病細胞浸潤の発生減少が死亡/瀕死例の 1000ppm群に対照群と比較して有意にみられたが早期死亡による変化であった。

胃

非腫瘍性病変について雌の前胃の過形成の発生減少が死亡/瀕死例の 1000ppm群で対照群と比較して有意にみられたが早期死亡による変化であった。

心臓

非腫瘍性病変について雄の心筋線維症の発生減少が定期解剖例の 200ppm群に対照群と比較して有意にみられたが投与用量との対応はみられなかった。

脾臓

非腫瘍性病変について雄の萎縮の発生減少が死亡/瀕死例の 1000ppm群に対照群と比較して有意にみられたが早期死亡による変化であった。

眼 球

非腫瘍性病変について雌雄の網膜萎縮の発生増加が定期解剖例の 1000 ppm 群に対照群と比較して有意にみられた。

ハ ー ダ ー 腺

非腫瘍性病変について雌雄の炎症の発生増加が定期解剖例の 1000 ppm 群に対照群と比較して有意にみられた。

死 因

病理学的にみた死亡/瀕死例の死因を Table 24 に示した。

雌雄の最高投与群 (1000 ppm 群) は脾臓腫瘍が死因と考えられた例が多くみられた。

Ⅲ - 2 マウスを用いた試験

Ⅲ - 2 - 1 急性試験 (試験番号: 0033)

(1) 動物の状態観察

生死状況をTable 25, 26 に示した。

動物の死亡は、雄では 1560mg/kg以上の群でp-CNB投与当日から投与後4日、また、雌では 977mg/kg以上の群で投与当日から投与後5日の間に認められ、雄では 4000mg/kg群:10/10例、2500mg/kg群:10/10例、1560mg/kg群:5/10例、雌では 4000mg/kg群:10/10例、2500mg/kg群:10/10例、1560mg/kg群:7/10例、977mg/kg群:1/10例であった。

この生死状況より、Litchfield Wilcoxon法を用いてp-CNBの経口投与によるLD₅₀値を算出すると以下のとおりである。

＜性・種・系統＞ : <LD₅₀値(95%信頼限界)>
 雄 マウス Crj:BDF₁ : 1560mg/kg(1248~1950mg/kg)
 雌 マウス Crj:BDF₁ : 1400mg/kg(1120~1750mg/kg)

一般状態の観察を Appendix A 1-3, 4 に示した。

観察期間の一般状態の観察においては、死亡動物では、雌雄ともに自発運動量減少、円背位、尿による外陰部周囲の汚染及び汚染部の着色(被毛が黄褐色に着色)、立毛及び鼻漿液性分泌物等の所見が、また、一部の動物に失調性歩行、痙攣性歩行、挙尾、流涙、痙攣(雌のみ)等の所見が認められ、異常呼吸(不整呼吸より呼吸抑制)及び体温低下を伴う衰弱により動物は死亡した。生存動物では、観察期間前半に、雌雄の 977mg/kg以上の群において、自発運動量減少、円背位、立毛、着色(尿による外陰部周囲の汚染部の被毛が黄褐色に着色)等、雌雄の 610mg/kg群に立毛、雄の 610mg/kg群に自発運動量減少が多数の例に認められた。また、雌雄の 977mg/kg以上の群の極一部の動物においては、失調性歩行、痙攣性歩行、挙尾、流涙及び痙攣等の所見が認められた。観察期間後半にはほとんどみられなくなった。

体重の推移をTable 25, 26、Appendix A 2-3, 4 に示した。

死亡動物の体重は、雌雄ともに死亡発見時まで継続して低下していた。生存動物の体重は、1560mg/kg群においては雄では投与後4日、雌では2日まで、また雌雄ともに 977mg/kg以下の群においては投与後1~2日まで投与時体重と比較して低下していたが、それ以降は増加に転じ推移した。

投与後14日の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 1560mg/kg群:100%、977mg/kg群:102%、610mg/kg群:101%、雌では 1560mg/kg群:101%、977mg/kg群:103%、610mg/kg群:101%であった。

(2) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見をAppendix A 3-5～8 に示した。

死亡動物では雌雄とも肺の赤色または褐色化、胸腺の萎縮、血液の褐色化等が観察された。

定期解剖動物では雌雄とも脾臓の黒色化が全投与群の多くの例に観察された。また、胸腺の萎縮が 977mg/kg群に観察された。

病理組織学的検査

病理組織学的所見をAppendix A 4-5～8 に示した。

雄

死亡動物に鼻腔の嗅上皮の変性、リンパ節の核崩壊、胸腺の核崩壊と萎縮、脾臓の鬱血と核崩壊、及び精巣の萎縮が観察された。

定期解剖動物では脾臓の髄外造血の程度の増強、鬱血及びヘモジデリン沈着、及び精巣の萎縮が全投与群で、骨髓のヘモジデリン沈着、及び肝臓のヘモジデリン沈着と中心性の腫脹が 977mg/kg以上の群で、筋組織の壊死が 1560mg/kg群で観察された。また、膀胱の出血が 977mg/kg群にのみ観察された。

雌

死亡動物に鼻腔の嗅上皮の変性、リンパ節の核崩壊、胸腺の核崩壊と萎縮、脾臓の鬱血と核崩壊、及び肝臓と腎臓の脂肪変性が観察された。

定期解剖動物では脾臓の髄外造血の程度の増強とヘモジデリン沈着が全投与群で、肝臓のヘモジデリン沈着が 977mg/kg以上の群で観察された。また、骨髓のヘモジデリン沈着が 977mg/kg群にのみ観察された。

Ⅲ - 2 - 2 2 週間試験 (試験番号:0052)

(1) 動物の状態観察

生死状況をTable 27,28 に示した。

動物の死亡は、雌雄ともに 9000ppm群において、雄ではp-CNB投与開始後10~13日の間に5/10例、雌では7~12日の間に9/10例認められた。

一般状態の観察結果を Appendix B 1-3,4 に示した。

投与期間中の一般状態の観察においては、死亡動物では、雌雄ともに 9000ppm群において、円背位、尿による外陰部周囲の汚染及び汚染部の着色(被毛が黄褐色に着色)、立毛、失調性歩行、自発運動量減少及び瘦削等の所見が認められた。生存動物では、雌雄ともに 9000ppm群においては、死亡動物とはほぼ同様の所見が認められ、14日の最終観察時にはほとんどの動物が衰弱状態に陥っていた。また、3000ppm以下の群では、雄の 3000ppm群において着色(尿による外陰部周囲の汚染部の被毛が黄褐色に着色)がほぼ半数例に認められたが、他の群においては雌雄ともにp-CNB投与と関連のあると思われる所見は認められなかった。

体重の推移を Table 27,28、Appendix B 2-3,4 に示した。

雌雄ともに 9000ppm群においては、投与開始以降、体重は継続して低下した(但し、雄では14日に3/5例が増加に転じていた。)。また、雌雄ともに 3000ppm以下の群の体重推移は、対照群と顕著な差は認められなかった。

14日の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 9000ppm群:71%、3000ppm群:100%、1000ppm群:98%、333ppm群:99%、111ppm群:98%、雌では 9000ppm群:69%、3000ppm群:104%、1000ppm群:102%、333ppm群:102%、111ppm群:102%であった。

摂餌量をTable 29,30、Appendix B 3-3,4 に示した。

雌雄ともに 9000ppm群における1週と2週、雌の 3000ppm群における1週の摂餌量が対照群と比較して低下し、雄では 9000ppm群:45~56%、雌では 9000ppm群:61~79%、3000ppm群:79%であった。一方、雌では 1000ppm群の2週において摂餌量の増加が認められ、それは対照群と比較して112%であった。

(2) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見をAppendix B 5-4～7 に示した。

雄の死亡動物では胸腺の萎縮、脾臓の腫大、心臓の淡色化、膀胱の赤色尿貯留、及び血液の褐色化が観察された。雌の死亡動物では胸腺の萎縮と脾臓の腫大が観察された。

雄の定期解剖動物では脾臓の腫大と血液の褐色化が 3000ppm以上の群で、胸腺と精巣の萎縮が 9000ppm群で観察された。雌の定期解剖動物では脾臓の腫大と黒色化が 1000ppm以上の群で、肝臓の褐色化が 3000ppm群で観察された。

病理組織学的検査

病理組織学的所見をAppendix B 6-4～7 に示した。

雄

死亡動物に骨髓の赤血球造血の増加とヘモジデリン沈着、胸腺の萎縮、脾臓の髄外造血の程度の増強、鬱血及びヘモジデリン沈着、心臓の血栓、肝臓の単細胞壊死、ヘモジデリン沈着、髄外造血及び中心性の腫脹、腎臓の硝子滴とヘモジデリン沈着、及び精巣の萎縮が観察された。

定期解剖動物では脾臓の髄外造血の程度の増強、鬱血及びヘモジデリン沈着が 1000ppm以上の群で、骨髓と腎臓のヘモジデリン沈着、及び肝臓のヘモジデリン沈着と中心性の腫脹が 3000ppm以上の群で、骨髓の赤血球造血の増加、胸腺の萎縮、心臓の血栓と巣状壊死、肝臓の単細胞壊死と髄外造血、及び精巣の萎縮が 9000ppm群で観察された。

雌

死亡動物に骨髓の赤血球造血の増加とヘモジデリン沈着、胸腺の萎縮と核崩壊、脾臓の髄外造血の程度の増強、鬱血及びヘモジデリン沈着、心臓の血栓、肝臓の単細胞壊死、ヘモジデリン沈着、及び腎臓のヘモジデリン沈着が観察された。

定期解剖動物では脾臓の髄外造血の程度の増強とヘモジデリン沈着が333ppm以上の群で、骨髓のヘモジデリン沈着、脾臓の鬱血、及び肝臓のヘモジデリン沈着と髄外造血が1000ppm以上の群で、骨髓の赤血球造血の増加、肝臓の中心性の腫脹、及び腎臓のヘモジデリン沈着が3000ppm以上の群で、胸腺の萎縮、心臓の血栓、及び肝臓の単細胞壊死が9000ppm群で観察された。

Ⅲ - 2 - 3 13週間試験（試験番号：0058）

（1）動物の状態観察

生死状況をTable 31,32に示した。

動物の死亡は、雌の6000ppm群において投与開始後7週に1/10例認められた。

一般状態の観察結果をAppendix C 1-3,4に示した。

投与期間中の一般状態の観察において、p-CNB投与との関連性が示唆された主な所見は、雌の6000ppm群の死亡動物に認められた貧血であった。また、生存動物では、雌雄の2000ppm以上の群に認められた貧血、雄の2000ppm以上の群に認められた着色（尿による外陰部周囲の汚染部の黄褐色の着色）であった。

体重の推移をTable 31,32、Appendix C 2-3,4に示した。

6000ppm群において、雄では全投与期間、雌では投与期間前半（1～6週）に、対照群と比較して体重増加の抑制が認められ、その抑制率は雄では10～20%、雌では6～18%であった。なお13週の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では6000ppm群：85%、2000ppm群：98%、667ppm群：107%、222ppm群：105%、74.1ppm群：102%、雌では6000ppm群：95%、2000ppm群：106%、667ppm群：107%、222ppm群：109%、74.1ppm群：106%であった。

摂餌量をTable 33,34、Appendix C 3-3,4に示した。

6000ppm群において、雌雄ともにほぼ全投与期間を通じて対照群と比較して摂餌量の低下が認められ、その低下率は雄では11～36%、雌では18～29%であった。

(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix C 5-3,4 に示した。

雄では、2000ppm以上の群で赤血球数、ヘマトクリット値の減少及び平均赤血球容積の増加が、6000ppm群で血小板数の減少及び単球比の増加が認められた。

雌では、667ppm以上の群で赤血球数の減少及び平均赤血球容積の増加が、2000ppm以上の群でヘマトクリット値の減少が、6000ppm群で血小板数、分葉核好中球比の減少及び単球比の増加が認められた。

その他、雌雄の2000ppm以上の群で白血球数の著しい増加がみられたが、これは、白血球数を測定する際に、被験物質の投与による影響で、通常では認められない赤血球の不完全溶血が生じ、これを白血球として誤計測してしまったことが原因と考えられた。したがって、正確な白血球数は不明であった。

また、雌雄ともにヘモグロビン濃度が6000ppm群では減少し、2000ppm群では増加するという相反する結果を示したが、これも不完全溶血の赤血球がヘモグロビン濃度の測定に正誤差を生じさせたためと考えられるので、正確なヘモグロビン濃度は不明であった。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix C 6-3,4 に示した。

雄では、6000ppm群でGOT活性、GPT活性、LDH活性、ALP活性の上昇、総ビリルビン量、総蛋白量、総コレステロール量、尿素窒素量の増加が認められた。その他、667ppm群でグルコース量の増加がみられた。

雌では、2000ppm以上の群で総コレステロール量、尿素窒素量の増加が認められ、6000ppm群でGOT活性、GPT活性、LDH活性の上昇、総ビリルビン量、総蛋白量、グルコース量の増加が認められた。

その他、雌雄ともにLAP活性が6000ppm群では増加し、2000ppm群では減少するという相反する結果を示した。

尿検査

尿検査の結果を Appendix C 7-3, 4 に示した。

雌雄ともに2000ppm以上の群でpH値の低下及び蛋白の陽性度の減少が認められた。また、雄の222ppm群でpH値の分布の変化に有意な差がみられた。

(3) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix C 8-3~5 に示した。

死亡動物(雌)では肺の赤色化、脾臓の腫大、肝臓の緑色化、及び腎臓の褐色化が観察された。

雄の定期解剖動物では脾臓の黒色化が667ppm以上の群で、皮下組織の黄疸様色調、脾臓の腫大、及び肝臓と腎臓の褐色または黒色化が2000ppm以上の群で、肝臓の白色斑が6000ppm群で観察された。

雌の定期解剖動物でも、脾臓の黒色化が222ppm以上の群で、脾臓の腫大、及び腎臓の褐色または黒色化が667ppm以上の群で、皮下組織の黄疸様色調、及び肝臓の褐色または黒色化が2000ppm以上の群で観察された。

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 C 9-3, 4 C 10-3, 4 に示した。

雄では脾臓と肝臓の実重量と体重比及び心臓と腎臓の体重比の高値、胸腺の実重量の低値が2000ppm以上の群でみられ、また、副腎と肺の実重量と体重比、心臓の実重量及び脳の体重比の高値、精巣の実重量の低値が6000ppm群でみられた。

雌では脾臓の実重量と体重比及び肝臓の実重量の高値が667ppm以上の群で、肝臓の体重比と心臓の実重量の高値が2000ppm以上の群で、心臓と腎臓の体重比の高値が6000ppm群でみられた。

なお、上記の臓器のうち脾臓の変化が最も顕著であり、6000ppm群の実重量の平均値(雄:520mg、雌:508mg)は対照群(雄:46mg、雌:59mg)に比べ約10倍の増加を示した。

病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果をAppendix C 11-3~5 に示した。

雄

定期解剖動物に脾臓のヘモジデリン沈着の発生増加が 222ppm以上の群で、脾臓の髄外造血の発生増加が 667ppm以上の群で、骨髓の赤血球造血の増加とヘモジデリン沈着、脾臓の鬱血、及び肝臓と腎臓のヘモジデリン沈着の発生増加が 2000ppm以上の群で、肝臓の血栓、巣状壊死、髄外造血及び中心性の腫脹、精巣の萎縮の発生増加、腎臓の近位尿細管上皮空胞化の発生減少が6000ppm群で認められた。

雌

死亡した 6000ppm群の1例に骨髓の赤血球造血の増加とヘモジデリン沈着、脾臓のヘモジデリン沈着の程度の増強、心臓の拡張、肝臓のヘモジデリン沈着と髄外造血、及び腎臓の近位尿細管上皮空胞化が観察された。

定期解剖動物では脾臓のヘモジデリン沈着の程度の増強が 222ppm以上の群で、脾臓の鬱血の発生増加と髄外造血の程度の増強が 667ppm以上の群で、骨髓の赤血球造血の増加とヘモジデリン沈着、肝臓のヘモジデリン沈着、髄外造血及び中心性の腫脹、及び腎臓のヘモジデリン沈着の発生増加が 2000ppm以上の群で認められた。

Ⅲ - 2 - 4 がん原性試験 (試験番号: 0 0 6 6)

(1) 動物の状態観察

生死状況を Table 35, 36 及び Figure 8, 9 に示した。

動物の生存率は、雄の 2000ppm群の104週において、対照群に比較して低下した。

各群の104週における生存動物数(生存率)は、雄では 2000ppm群:38/50例(76%)、500ppm群:42/50例(84%)、125ppm群:49/50例(98%)、対照群:47/50例(94%)、雌では2000ppm群:29/50例(58%)、500ppm群:35/50例(70%)、125ppm群:35/50例(70%)、対照群:32/50例(64%)であった。

一般状態の観察を Appendix D 3, 4 に示した。また投与期間中の一般状態の観察において、p-CNB投与との関連性が示唆された主な所見、内部腫瘍及び外部腫瘍をTable 39 に示した。

雌雄ともに 500ppm以上の群において貧血が認められ、この所見は雄の 500ppm以上の群、雌の 2000ppm群においては投与期間のほぼ全週にわたって、ほぼ全例に認められ、雌の 500ppm群においては投与期間の半ば以降にほぼ2/3例に認められた。また、内部腫瘍及び外部腫瘍の発現状況については、雌雄の各投与群で対照群と比較して差は認められなかった。

体重の推移を Table 35, 36、Figure 10, 11 及び Appendix E 3, 4 に示した。

体重は、2000ppm群において雄では投与期間前半(10~46週の多くの週)及び終期(102~104週)、雌では投与開始後1週に対照群と比較して増加抑制が認められ、その抑制率は雄では3~8%、雌では7%であった。

摂餌量を Table 37, 38、Figure 12, 13 及び Appendix F 3, 4 に示した。

2000ppm群において雌雄ともに体重増加の抑制がみられたのとほぼ同時期に、摂餌量の低下を示す週が散見されたが、500ppm以下の群では対照群との間に顕著な差はみられなかった。

(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液学的検査

血液学的検査の結果をAppendix H 3,4に示した。

雄では、500ppm以上の群で赤血球数の減少が認められ、2000ppm群でヘマトクリット値の減少及び平均赤血球容積、血小板数の増加が認められた。

雌では、500ppm以上の群で赤血球数、ヘマトクリット値の減少が認められ、2000ppm群で平均赤血球容積、血小板数の増加が認められた。

なお、雌雄の2000ppm群で白血球数の増加がみられたが、これは、白血球数を測定する際に、被験物質の投与による影響で、通常では認められない赤血球の不完全溶血が生じ、これを白血球として誤計測してしまったことが原因と考えられた。したがって、正確な白血球数は不明であった。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果をAppendix I 3,4に示した。

雄では、2000ppm群でGOT活性、LDH活性、CPK活性の上昇が認められた。

雌では、500ppm以上の群で総コレステロール量、リン脂質量の増加が認められ、2000ppm群でトリグリセライド量、カリウム量の増加が認められた。

尿検査

尿検査の結果をAppendix J 3,4に示した。

雄では、500ppm以上の群でケトン体の陽性例の減少がみられ、500ppm群でpH値の上昇及び蛋白の陽性度の減少がみられた。

雌では、500ppm以上の群で潜血の陽性例の減少がみられ、2000ppm群でグルコース及びウロビリノーゲンの陽性例の増加がみられ、500ppm群でpH値の上昇がみられた。

(3) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix K 5～8 に示した。それらのうち、対照群と比較して投与群に特徴的あるいは発生率の高かった所見について以下に述べる。

雄では、死亡/瀕死例の 2000ppm群に肝臓の腫大が観察される例が多く、定期解剖例では 2000ppm群に全臓器の暗色化がほとんどの例に観察された。雌では、死亡/瀕死例の 500ppm以上の群で脾臓の腫大、結節が観察される例が多く、定期解剖例では 500ppm以上の群に脾臓の腫大と結節が観察される例が多く、2000ppm群にリンパ節の腫大と全臓器の暗色化がほとんどの例で観察された。

臓器重量

定期解剖時に測定した臓器重量を Appendix L 3,4(総括表・実重量)、Appendix M 3,4(総括表・体重比)に示した。

雄では心臓、肺、脾臓及び肝臓の実重量と体重比、及び精巣と腎臓の体重比の高値が2000ppm群でみられた。

雌では、心臓、腎臓及び肝臓の実重量と体重比、及び脾臓の実重量の高値が2000ppm群でみられた。また、肺の実重量と体重比が500ppm以上の群で対照群との間に有意差を示した(対照群の肺の実重量と体重比は投与群より高値であるが、これは対照群に 2例、結節を有するものがあるためであり、Dunnet型検定によれば投与群の有意な高値と判定される)。

病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を Appendix N 5～8 に示した。腫瘍性病変の結果は担腫瘍動物数及び腫瘍数を Appendix O 3,4 に、発生率を解剖時期とともに Appendix P 3,4 に、統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)の結果をAppendix Q 3,4 にそれぞれ示した。

骨髓

腫瘍性病変について雌の血管腫(2000ppm群:0/50, 500ppm群:6/50, 125ppm群:1/50, 対照群:0/50)はFisher検定で 500ppm群に対照群に比較して有意な発生増加を示したが投与用量との対応はみられなかった。

リンパ節

腫瘍性病変について雄の悪性リンパ腫(2000ppm群:8/50, 500ppm群:1/50, 125ppm群:2/50, 対照群:2/50)はPeto検定(STA、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。

脾臓

非腫瘍性病変について雄では、鬱血の発生増加が定期解剖例の2000ppm群に対照群と比較して有意にみられた。

雌では、鬱血が定期解剖例の2000ppm群、死亡/瀕死例の2000ppm群に対照群と比較して有意な発生増加がみられた。ヘモジデリン沈着の発生増加が定期解剖例の2000ppm群に対照群と比較して有意にみられた。その他特異的変化として、骨化の発生が2000ppm群の定期解剖例に4例、死亡/瀕死例に2例みられた。

腫瘍性病変について雄では、血管腫と血管肉腫を合わせた統計処理(2000ppm群:4/50, 500ppm群:2/50, 125ppm群:0/50, 対照群:5/49)ではFisher検定で125ppm群に対照群と比較して有意な発生率の減少を示したが投与用量との対応はみられなかった。(Table 40)

雌では、血管肉腫(2000ppm群:2/50, 500ppm群:5/50, 125ppm群:1/50, 対照群:0/50)がFisher検定で500ppm群に対照群に比較して有意な発生率の増加を示し、また血管腫と血管肉腫を合わせた統計処理(2000ppm群:3/50, 500ppm群:5/50, 125ppm群:1/50, 対照群:0/50)でもFisher検定で500ppm群に対照群と比較して有意な発生率の増加を示したがどちらも投与用量との対応はみられなかった。

(Table 41)

肝臓

腫瘍性病変について雄では、肝細胞癌(2000ppm群:6/50, 500ppm群:1/50, 125ppm群:3/50, 対照群:1/50)がPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた統計処理(2000ppm群:8/50, 500ppm群:5/50, 125ppm群:5/50, 対照群:4/50)ではPeto検定(COM)で増加傾向を示した。

雌では肝細胞癌(2000ppm群:5/50, 500ppm群:2/50, 125ppm群:0/50, 対照群:2/50)はPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた統計処理(2000ppm群:8/50, 500ppm群:5/50, 125ppm群:1/50, 対照群:5/50)ではPeto検定(PRE、COM)で増加傾向を示した。血管肉腫(2000ppm群:5/50, 500ppm群:0/50, 125ppm群:1/50, 対照群:0/50)はPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定で2000ppm群に対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。血管腫と血管肉腫を合わせた統計処理(2000ppm群:5/50, 500ppm群:0/50, 125ppm群:2/50, 対照群:0/50)ではPeto検定(PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定で2000ppm群に対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。

鼻腔

非腫瘍性病変について雄では、ヘモジデリン沈着の発生増加が死亡/瀕死例の2000ppm群、定期解剖例の500ppm以上の群に対照群と比較して有意にみられた。また嗅上皮のエオジン好性変化の発生減少が定期解剖例の125ppm群に、嗅上皮の呼吸上皮化生の発生減少が定期解剖例の500ppm群に対照群と比較して有意にみられたが、これらの所見は投与用量との対応はみられなかった。

雌では、ヘモジデリン沈着が死亡/瀕死例、定期解剖例の500ppm以上の群に、嗅上皮と鼻腺の呼吸上皮化生が定期解剖例の2000ppm群に対照群と比較して有意な発生増加を示した。呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加が定期解剖例の125ppm群、2000ppm群に対照群と比較して有意にみられたが投与用量との対応はみられなかった。

肺/気管支

非腫瘍性病変について雄では、細気管支上皮増生の発生増加が定期解剖例の500ppm以上の群に対照群と比較して有意にみられた。

雌では、細気管支上皮増生の発生増加が死亡/瀕死例、定期解剖例の500ppm以上の群に対照群と比較して有意にみられた。肺胞壁の肥厚の発生増加が死亡/瀕死例の2000ppm群に対照群と比較して有意にみられた。

心臓

非腫瘍性病変について雌の血栓の発生増加が死亡/瀕死例の2000ppm群に対照群と比較して有意にみられた。

卵巣

非腫瘍性病変について子宮腫瘍の転移が死亡/瀕死例の500ppm群に、嚢胞状変化が定期解剖例の500ppm群に対照群と比較して有意な発生増加がみられたが投与用量との対応はみられなかった。

脳

非腫瘍性病変について雄の石灰沈着の発生減少が定期解剖例の2000ppm群に対照群と比較して有意にみられた。

以上の他、雄では全ての臓器の血管腫を合わせた統計処理(2000ppm群:5/50, 500ppm群:1/50, 125ppm群:0/50, 対照群:3/50)で、Peto検定(PRE)とCochran-Armitage検定で増加傾向が認められ、全ての臓器の悪性リンパ腫を合わせた統計処理(2000ppm群:10/50, 500ppm群:2/50, 125ppm群:3/50, 対照群:5/50)で、Peto検定(STA、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向が認められた。また全ての臓器の血管肉腫を合わせた統計処理(2000ppm群:5/50, 500ppm群:2/50, 125ppm群:2/50, 対照群:5/50)で、peto検定(STA)で増加傾向が認められたが投与用量との対応はみられなかった。

雌では、全ての臓器の血管肉腫を合わせた統計処理(2000ppm群:8/50, 500ppm群:5/50, 125ppm群:2/50, 対照群:0/50)でPeto検定(STA、PRE、COM)とCochran-Armitage検定で増加傾向が認められ、Fisher検定で500ppm以上の群に対照群と比較して有意な発生率の増加を示した。

死因

病理学的にみた死亡/瀕死例の死因をTable 42 に示した。

雄の2000ppm群では白血病(悪性リンパ腫)による死亡が比較的多くみられた。雌では投与用量に対応した特徴的死因はみられなかった。

IV 考察

<生死の状況>

がん原性試験におけるp-CNB投与群の生存率はラットでは雌雄とも最高投与群の1000ppm群で低下が認められた。この群での死因の多くは脾臓の腫瘍であり、生存率の低下はこの要因によるものと考えられた。一方、マウスでは雄の最高投与群の2000ppm群でやや低い値を示したが、この生存率は他の試験と比べ特に低い成績ではないことから、p-CNBの投与による影響とは考えられなかった。また、この群の生存率の低下を説明し得る死因については特定することはできなかった。

<被験物質と腫瘍発生の関係について>

ラット

今回のがん原性試験で発生した腫瘍のうち主なものについて表-1に示したが、このうち、脾臓と副腎の腫瘍がp-CNBの投与との関連性を強く示唆した。

まず脾臓の腫瘍についてみると、その発生増加は雄の200ppm以上の群と雌の1000ppm群でみられ、これらは間葉系組織由来の線維腫、線維肉腫、骨肉腫、肉腫NOS、血管肉腫であった。また、この腫瘍は皮下組織、肺、心臓、リンパ節、肝臓、脾臓、副腎、大腸、膀胱、精巣、精囊、前立腺及び腹膜等他臓器への転移がみられることから、悪性であると判断された。その他、脾臓の非腫瘍性病変ではあるが線維化、皮膜増生、脂肪性変態、髓外造血及び鬱血等が観察され、さらに、予備試験(2週間、13週間)においてもがん原性試験と同様に脾臓の鬱血と髓外造血の発生増加、ヘモジデリン沈着の程度の増強等が観察されていることから、これらの病変は上記の脾臓での腫瘍発生の前段階的病変と考えられた。

副腎では雌雄とも1000ppm群で褐色細胞腫の発生増加が認められた。なお、副腎の前腫瘍性病変についても髓質の過形成が雄の40ppm群と雌の1000ppm群で認められたことから雌にのみp-CNBの影響による変化が示された。

マウス

今回のがん原性試験で発生した腫瘍のうち主なものについて表-2に示した。

雄ではリンパ節の悪性リンパ腫、肝細胞癌及び全臓器でみた血管腫、雌では肝臓の血管肉腫と肝細胞癌及び全臓器でみた血管肉腫の発生が増加傾向を示した。しかし、これらの腫瘍の発生率は低く、p-CNB投与との関連性は断定できなかった。

表1 本試験における主な腫瘍発生 (p-クロロニトロベンゼンのがん原性試験:ラット)

| 雄 | 投与濃度 (ppm) | | 0 | 40 | 200 | 1000 | ベ ト ー 検 定 |
|------------------|------------|-----------|----|----|-----|-------|--------------|
| | 検 査 動 物 数 | | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| 良 性 腫 瘍 | 皮下組織 | 線 維 腫 | 2 | 7 | 5 | 1 | ↑ ↑ |
| | 脾 臓 | 線 維 腫 | 0 | 0 | 1 | 15 ** | |
| | 肝 臓 | 肝細胞腺腫 | 0 | 2 | 5 * | 0 | |
| | 下垂体 | 腺 腫 | 14 | 13 | 20 | 7 | ↑ ↑ ↑ |
| | 甲状腺 | C-細胞腺腫 | 2 | 6 | 4 | 4 | |
| | 副 腎 | 褐色細胞腫 | 7 | 7 | 6 | 16 | |
| | 精 巢 | 間 細 胞 腫 | 42 | 49 | 46 | 44 | |
| | 乳 腺 | 線 維 腺 腫 | 1 | 3 | 1 | 1 | |
| | 包皮腺 / 陰核腺 | 腺 腫 | 1 | 3 | 1 | 1 | |
| 悪 性 腫 瘍 | 脾 臓 | 線 維 肉 腫 | 0 | 1 | 0 | 29 ** | ↑ ↑ |
| | | 骨 肉 腫 | 0 | 0 | 0 | 11 ** | ↑ ↑ |
| | | 肉腫 NOS | 0 | 0 | 1 | 6 * | ↑ ↑ |
| | | 単核球性白血病 | 7 | 2 | 1 | 2 | ↑ ↑ |
| | | 血 管 肉 腫 | 0 | 0 | 5 * | 7 * | |
| | 甲状腺 | C-細胞癌 | 0 | 3 | 3 | 0 | |
| | 副 腎 | 褐色細胞腫: 悪性 | 2 | 3 | 3 | 2 | |
| | 腹 膜 | 中 皮 腫 | 3 | 0 | 1 | 0 | |
| | | | | | | | |

| 雌 | 投与濃度 (ppm) | | 0 | 40 | 200 | 1000 | ベ ト ー 検 定 |
|------------------|------------|-------------|----|------|-----|-------|--------------|
| | 検 査 動 物 数 | | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| 良 性 腫 瘍 | 脾 臓 | 線 維 腫 | 0 | 0 | 1 | 3 | ↑ |
| | 下垂体 | 腺 腫 | 26 | 27 | 24 | 24 | ↑ ↑ |
| | 甲状腺 | C-細胞腺腫 | 5 | 4 | 3 | 2 | |
| | 副 腎 | 褐色細胞腫 | 3 | 6 | 4 | 16 ** | |
| | 子宮 | 子宮内膜間質性ポリープ | 9 | 9 | 7 | 11 | |
| | 乳 腺 | 線 維 腺 腫 | 9 | 5 | 5 | 8 | |
| | 包皮腺 / 陰核腺 | 腺 腫 | 4 | 2 | 6 | 1 | |
| 悪 性 腫 瘍 | 脾 臓 | 線 維 肉 腫 | 0 | 0 | 0 | 17 ** | ↑ ↑ |
| | | 骨 肉 腫 | 0 | 0 | 0 | 3 | ↑ ↑ |
| | | 単核球性白血病 | 11 | 1 ** | 7 | 4 | ↑ ↑ |
| | | 血 管 肉 腫 | 0 | 0 | 2 | 4 | |
| | 子宮 | 子宮内膜間質性肉腫 | 1 | 3 | 0 | 2 | |
| | 乳 腺 | 腺 癌 | 3 | 2 | 2 | 0 | |
| | | | | | | | |

表2 本試験における主な腫瘍発生（p-クロロニトロベンゼンのがん原性試験：マウス）

| 雄 | 投与濃度（ppm） | | 0 | 125 | 500 | 2000 | ベ ト ー 検 定 |
|------------------|--------------------|---------|----|-----|-----|------|--------------|
| | 検 査 動 物 数 | | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| 良 性 腫 瘍 | 歯 肝 臓 全 臓 器 | 歯 牙 腫 | 2 | 5 | 3 | 3 | ↑ |
| | | 肝細胞腺腫 | 3 | 2 | 4 | 2 | |
| | | 血 管 腫 | 3 | 0 | 1 | 5 | |
| | | | | | | | |
| 悪 性 腫 瘍 | リンパ節 脾 臓 肝 臓 | 悪性リンパ腫 | 2 | 2 | 1 | 8 | ↑↑ ↑↑ |
| | | 悪性リンパ腫 | 3 | 1 | 0 | 2 | |
| | | 血 管 肉 腫 | 3 | 0 | 1 | 3 | |
| | | 肝細胞癌 | 1 | 3 | 1 | 6 | |

| 雌 | 投与濃度（ppm） | | 0 | 125 | 500 | 2000 | ベ ト ー 検 定 |
|------------------|------------------------------------|-------------|----|-----|-----|------|--------------|
| | 検 査 動 物 数 | | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| 良 性 腫 瘍 | 肺／気管支 骨 髄 歯 肝 臓 下 垂 体 | 細気管支－肺胞上皮腺腫 | 3 | 1 | 1 | 3 | |
| | | 血 管 腫 | 0 | 1 | 6* | 0 | |
| | | 歯 牙 腫 | 5 | 3 | 2 | 1 | |
| | | 肝細胞腺腫 | 4 | 1 | 3 | 3 | |
| | | 腺 腫 | 3 | 0 | 5 | 1 | |
| | | | | | | | |
| 悪 性 腫 瘍 | 肺／気管支 リンパ節 脾 臓 肝 臓 子 宮 | 細気管支－肺胞上皮癌 | 1 | 3 | 2 | 1 | ↑↑ ↑ |
| | | 悪性リンパ腫 | 11 | 11 | 7 | 12 | |
| | | 悪性リンパ腫 | 7 | 5 | 8 | 4 | |
| | | 血 管 肉 腫 | 0 | 1 | 5* | 2 | |
| | | 血 管 肉 腫 | 0 | 1 | 0 | 5* | |
| | | 肝細胞癌 | 2 | 0 | 2 | 5 | |
| | | 組織球性肉腫 | 6 | 8 | 10 | 9 | |

*：有意水準5%以下で有意、**：有意水準1%以下で有意（フィッシャー検定）

↑：有意水準5%以下で有意、↑↑：有意水準1%以下で有意（ベトー検定）

<被験物質と非腫瘍性病変との関係について>

ラット

骨髓の肉芽形成と出血、リンパ節の肉芽形成、眼球の網膜萎縮、ハート腺の炎症及び副腎の皮質の過形成の発生増加についてはp-CNBの投与による影響が示唆された。

マウス

脾臓の鬱血とヘモジデリン沈着の発生増加が最高投与群で認められたが、これらの所見は、予備試験(急性、2週間、13週間)でも観察された変化であり、p-CNBの投与に伴う血液系の障害による病変と考えられた。また、脾臓の骨化が雌の2000ppm群で観察されたが、この所見は極めてまれな症例であり、p-CNBの投与に関係した所見と考えられた。その他、肺の細気管支増生、肺胞壁の肥厚及び心臓の血栓の発生増加の所見についてもp-CNBの投与による影響と考えられた。

<血液学的及び血液生化学的変化について>

予備試験(13週間)ではラット、マウスとも血液学的検査で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、平均赤血球容積の増加がみられ、貧血の発生が示された。また、血液生化学的検査で総ビリルビン量の増加が観察され、貧血の発生機作は溶血性貧血と考えられた。がん原性試験でもラットに赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少や平均赤血球容積と総ビリルビン量の増加が観察された。また、マウスでも赤血球数とヘマトクリット値の減少、平均赤血球容積の増加が観察され、予備試験(13週間)と同様にp-CNBの投与による赤血球系への障害が示された。p-CNBを含めた芳香族ニトロ化合物及びアミノ化合物の特徴としてメトヘモグロビン血症等の赤血球障害をおこすことは既に知られているが、本試験においてもこれを再現する結果となった。

<他のがん原性試験データとの比較>

K.Weisburgerら(文献21)は、雄ラット(4000-500ppm、2000-250ppm)と雌雄マウス(6000ppm、3000ppm)にp-CNBを18ヵ月間飼料中に混ぜ投与した試験を実施した。その結果、ラットでは腫瘍の発生増加については記載されていないが、マウスでは雌雄の高濃度群で血管腫瘍の増加と雄の低濃度群で肝腫瘍の増加が僅かにみられたと報告しており、p-CNBのがん原性については明らかではなかったとしている。

当センターで行った今回のがん原性試験では前述したごとく、ラットでの脾臓腫瘍の顕著な増加がみられ、K.Weisburgerらの結果とは異なった成

績が得られた。この差異については、投与濃度の設定方法、期間等の差によるものと考えられるものの、試験条件の詳細な記述がないので十分な検討は出来なかった。また、マウスでは、雌の肝臓の血管肉腫と肝細胞癌、雌雄の全臓器を合わせた血管腫瘍の発生の増加が認められ、K.Weisburgerらの結果と近似していた。しかし、これらの腫瘍の発生率は低率であり、K.Weisburgerらの結論と同様にp-CNBの投与との関連性は明確にできなかった。

表-3に各種の芳香族ニトロ化合物及びアミノ化合物のメトヘモグロビン形成と脾臓への影響についての動物実験の報告を一覧とした。アニリン塩酸塩、p-クロロアニリン、o-トルイジン塩酸塩及びアゾベンゼンはメトヘモグロビン血症の原因となるとともに、ラットでは脾臓に線維化等の変化を引き起こし、さらに脾臓腫瘍が発生することが報告されている。また、D&C Red No.9はメトヘモグロビンの形成について報告はないが、ラットでは脾臓腫瘍が発生することが知られている。当センターで行った今回の試験でも、p-CNB投与によりラットの脾臓に線維化、皮膜増生、脂肪性変態等の変化が発生するとともに、脾臓腫瘍の顕著な増加がみられ、明らかながん原性が証明されたことから、p-CNBは上記の芳香族ニトロ化合物及びアミノ化合物と同様に赤血球障害及び脾臓の繊維化等の毒性発現の過程を経て脾臓の腫瘍化に至ったと考えられた。一方、マウスではこれらの化合物による脾臓腫瘍の発生は報告されておらず、当センターで行った今回の試験でも脾臓腫瘍の発生は認められなかった。

表 3 芳香族アミノ化合物、芳香族ニトロ化合物のメトヘモグロビン形成性、毒性、催腫瘍性、変異原性

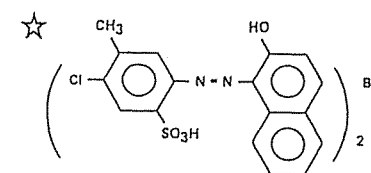
| | p-クロロニトロ ベンゼン | アニリン塩酸塩 | p-クロロアニリン | o-トリイソ 塩酸塩 | m-フェニレンジア ミン二塩酸塩 | 2,4-ジニトロ トルエン | 5-ニトロ-o- トリイソ | アゾベンゼン | D & C Red No. 9 | p-ニトロアニリン 塩酸塩 |
|------------|------------------|----------|--------------|---------------|---------------------|------------------|------------------|--------------|--------------------|------------------|
| 構造式 | | | | | | | | | ☆ | |
| | ラット | マウス | ラット | マウス | ラット | マウス | ラット | マウス | ラット | マウス |
| | 雄雌 | 雄雌 | 雄雌 | 雄雌 | 雄雌 | 雄雌 | 雄雌 | 雄雌 | 雄雌 | 雄雌 |
| メトヘモグロビン血症 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 脾臓の線維化 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 脂肪性変態 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 被膜増生 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 鬱血/出血 | -- | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 脾臓の腫瘍 | | | | | | | | | | |
| 線維腫 | ++ | -- | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ |
| 線維肉腫 | ++ | -- | | | | | | | | |
| 骨肉腫 | ++ | -- | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| 肉腫NOS | ++ | -- | | | | | | | | |
| 血管肉腫 | ++ | -- | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ |
| 変異原性試験 | + | - | + | - | + | + | + | + | - | + |
| 文献 | | (24, 29) | (25, 26, 29) | (26, 29) | (30) | (31) | (32) | (26, 29, 33) | (24, 26, 34) | (35) |

空欄は未実施

+: 所見がみられた。

-: 所見がみられない。

*: 線維腫、線維肉腫、骨肉腫、肉腫NOS、血管肉腫を含む腫瘍の発生がみられる。



V 結論

F344/DuCrj(Fisher)ラット及びCrj:BDF₁マウスを用いて、p-CNB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。

ラットでは雌雄に脾臓の線維腫、線維肉腫、骨肉腫、血管肉腫及び肉腫NOS、副腎の褐色細胞腫の発生増加が認められ、p-CNBのF344/DuCrj(Fisher)ラットに対する明らかながん原性が証明された。腫瘍の発生する濃度は脾臓では雄の200ppm以上、雌の1000ppmであり、副腎では雌雄とも1000ppmであった。

マウスでは、雄に血管腫、悪性リンパ腫及び肝細胞癌、雌に肝臓の血管肉腫と肝細胞癌の発生増加が認められたが、発生率は低値であることから、p-CNBのCrj:BDF₁マウスに対するがん原性は断定できなかった。

VI 文献

1. 労働省安全衛生部労働衛生課(1988)
特定化学物質等障害予防規制の解説
中央労働災害防止協会, 東京.
2. 化学工業日報社(1980)
7680の化学商品
pp. 659, 化学工業日報社, 東京.
3. 化学工業日報社(1989)
10889の化学商品
pp. 675-676, 化学工業日報社, 東京.
4. 化学工業日報社(1990)
11290の化学商品
pp. 681-682, 化学工業日報社, 東京.
5. American Conference of Governmental Industrial Hygienists(1986)
Documentation of the threshold limit values, 5th ed. pp. 432
ACGIH, Cincinnati, OH.
6. 化学工業日報社(1991)
11691の化学商品
pp. 708, 化学工業日報社, 東京.
7. 日本産業衛生学会(1990)
許容濃度の勧告(1990)
産業医学, 32, 381-401
8. 日本産業衛生学会 許容濃度に関する委員会(1989)
許容濃度暫定値(1989)の提案理由
産業医学, 31, 288-289.
9. 後藤 稷、池田正之、原 一郎 編(1981)
産業中毒便覧(増補版), PP. 1286-1287, 医歯薬出版, 東京.

- 1 0 . 中央労働災害防止協会 (1991)
化学物質の危険・有害便覧
pp, 706-707, 中央労働災害防止協会, 東京.

- 1 1 . 田淵武夫、原 一郎、南 正康、山城久和 (1985)
港湾作業者における急性パラクロルニトロベンゼン中毒例
大阪府立公衛研所報、労働衛生編, 23, 25-30

- 1 2 . Yoshida, T., Andoh, K. and Taguchi, T. (1991)
Identification of urinary metabolites in rats treated with
p-chloronitrobenzen
Archives of Toxicology 65, 52-58.

- 1 3 . 吉田俊明、安藤 剛、田淵武夫 (1987)
パラクロルニトロベンゼン急性中毒患者の尿中代謝物による吸収量の推定
大阪府立公衛研所報, 労働衛生編. 25, 1-6.

- 1 4 . Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W. and Zeigr, E. (1983)
Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals
Envirommental Mutagenesis Supplment, 1, 3-142.

- 1 5 . 松島泰次郎、松下秀鶴、清水英佑、鈴木勇司 (1981)
変異原性に着目したがん原性物質のスクーリング技術開発に関する研究
労働安全衛生に関する委託研究, pp173-177.

- 1 6 . Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B.,
Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J.,
Margolin, B. H., Resnick, M. A., Anderson, B. and Zeiger, E. (1987)
Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese
hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals
Envirommental and Molecular Mutagenesis, 10, Supplement 10: 1-175.

- 1 7 . 館 正知、浅倉眞澄、鶴井淑江、山岸美紀 (1988)
既存の化学物質に係る変異原性の評価に関する調査研究
労働安全衛生に関する調査研究, pp116-125, 中央労働災害防止協会, 東京.

- 1 8 . Zimmering, S., Mason, J. M. and Valencia, R. (1989)
Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. 7, Results of 22 coded
compounds tested for the National Toxicology Program.
Environmental Mutagenesis, 14, 245-251.
- 1 9 . Sweet, D. V. (ed) (1987)
Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (1985-86 ed.)
Vol 1, pp, 806,
NIOSH, U.S. Dept. Health and Human Services, Washington, D. C.
- 2 0 . Nair, R. S., Johannsen, F. R., Levinskas, G. J. and Terrill, J. B. (1986)
Subchronic inhalation toxicity of p-nitroaniline and
p-nitrochlorobenzene in rats.
Fundamental Appl. Toxicol. 6, 618-627.
- 2 1 . 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 F
for long-term toxicity or carcinogenicity.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology, 2, 325-356.
- 2 2 . Boorman, G. A., Eutis, S. L., Elwell, M. R., Montgomery, C. A.
and Mackenzie, W. F. (eds), (1990)
Pathology of The Fischer Rat, Reference and Atlas
Academic Press, INC., San Diego, CA.
- 2 3 . Torkelson, T. R. and Rowe, V. K. (1982)
Halogenated aliphatic hydrocarbons.
In: Clayton, G. D. and Clayton, F. E. (eds),
Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, Vol 2A, pp. 2413-2419,
John Wiley and Sons, New York, NY.
- 2 4 . Weinberger, M. A., Albert, R. H. and Montgomery, S. B. (1985)
Splenotoxicity associated with splenic sarcomas in rats fed high
doses of D&C Red No. 9 or aniline hydrochloride.
J. National Cancer Institute, 75, 681-690.

- 2 5 . Chhabra, R. S. , Huff, J. E. , Haseman, J. K. and Elwell, M. R. (1991)
Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice.
Food Chem. Toxicol. , 29, 119-124.
- 2 6 . Goodman, D. G. , Ward, J. M. and Reichardt, W. D. (1984)
Splenic fibrosis and sarcomas in F344 rats fed diets containing
aniline hydrochloride, p-chloroaniline, azobenzene, o-toluidine
hydrochloride, 4,4'-sulfonyldianiline or D&C Red No.9.
J. National Cancer Institute, 73, 265-273.
- 2 7 . 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.
- 2 8 . Peto, R. , Pike, M. C. , Day, N. E. , Gray, R. G. , Lee, P. N. , Parish, S. , Peto, J. ,
Richrds, S. and Wahrendorf. J. (1980)
Guidlines for simple, sensitive significance test for carcinogenic
effects in long-term animal experiments.
In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogenes:
A Critical Appraisal, IARC Monographs, Suppl. 2, pp. 311-426,
International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- 2 9 . National Institute of Health (1987)
Toxicology and Carcinogenesis Studies of Oxytetracycline
Hydrochloride in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice, (Feed Studies)
NTP Technical Report 315,
U.S. Department of Health and Human Services,
Reserch Triangle Park, N. C.
- 3 0 . 日本バイオアッセイ研究センター (1989)
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
がん原性試験報告書
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川.

- 3 1 . National Cancer Institute(1978)
Bioassay of 2,4-Dinitrotoluene for Possible Carcinogenicity,
NCI Carcinogenesis Technical Report Series No.54,
NCI,U.S.Department of Health,Education and Welfare,Washington D.C.
- 3 2 . National Cancer Institute(1978)
Bioassay of 5-Nitro-o-Toluidine for Possible Carcinogenicity,
NCI Carcinogenesis Technical Report Series No.107,
NCI,U.S.Department of Health,Education and Welfare,Washington D.C.
- 3 3 . George,E.,Andrews,M. and Westmoreland,C. (1990)
Effect of azobenzene and aniline in the rodent bone marrow micro-
nucleus test
Carcinogenesis,11,1551-1555
- 3 4 . National Institute of Health(1982)
Carcinogenesis Bioassay of D & C RED No.9 in F344 Rats and B6C3F₁
Mice, (Feed Study)
NTP Technical Report 225,
U.S.Department of Health and Human Services,
Reserch Triangle Park,NC.
- 3 5 . National Institute of Health(1991)
Toxicology and Carcinogenesis Studies of p-Nitroaniline in B6C3F₁
Mice, (Gavage Studies)
NTP Technical Report 418,
U.S.Department of Health and Human Services,
Reserch Triangle Park,NC.