

p-ニトロアニソールのラットを用いた経口投与による
13 週 間 毒 性 試 験 (混 餌 試 験) 報 告 書

試験番号：0369

CAS No. 100-17-4

2000年12月21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-ニトロアニソールのラットを用いた経口投与による
13 週 間 毒 性 試 験 (混 餌 試 験) 報 告 書

試験番号：0369

本 文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	
I-1 被験物質の性状等	3
I-1-1 名称等	3
I-1-2 構造式、分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質の使用ロット等	3
I-3 被験物質の同一性・安定性	
I-3-1 同一性	4
I-3-2 安定性	4
I-4 試験動物	4
II 試験方法	
II-1 投与	5
II-1-1 投与経路、投与方法及び投与期間	5
II-1-2 投与濃度及びその設定理由	5
II-1-3 被験物質混合飼料の調製方法	6
II-1-4 被験物質混合飼料中の被験物質の濃度測定	6
II-1-5 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性	6
II-1-6 被験物質の摂取量	6
II-2 動物管理	
II-2-1 各群の使用動物数	7
II-2-2 群分け及び個体識別方法	7
II-2-3 飼育条件	7

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	8
II-3-2	体重測定	8
II-3-3	摂餌量測定	8
II-3-4	血液学的検査	9
II-3-5	血液生化学的検査	9
II-3-6	尿検査	9
II-3-7	病理学的検査	9
II-4	数値処理と統計処理	
II-4-1	数値の取り扱いと表示	10
II-4-2	母数の取り扱い	10
II-4-3	統計処理	11
II-5	試資料の保管	11
III	試験成績	
III-1	生死状況	12
III-2	一般状態	12
III-3	体重	12
III-4	摂餌量	12
III-5	被験物質摂取量	13
III-6	血液学的検査	13
III-7	血液生化学的検査	14
III-8	尿検査	15
III-9	病理学的検査	16
III-9-1	剖検	16
III-9-2	臓器重量	16
III-9-3	病理組織学的検査	17
IV	考察及びまとめ	19
V	文献	24

TABLES

TABLE 1	EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 2	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 3	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 4	FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 5	FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE

FIGURES

- FIGURE 1 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
- FIGURE 2 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
- FIGURE 3 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
- FIGURE 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE

APPENDIXES

APPENDIX A 1	CLINICAL OBSERVATION: SUMMARY, RAT : MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX A 2	CLINICAL OBSERVATION: SUMMARY, RAT : FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX B 1	BODY WEIGHT CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX B 2	BODY WEIGHT CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX C 1	FOOD CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX C 2	FOOD CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX D 1	CHEMICAL INTAKE CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX D 2	CHEMICAL INTAKE CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX E 1	HEMATOLOGY: SUMMARY, RAT: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX E 2	HEMATOLOGY: SUMMARY, RAT: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX F 1	BIOCHEMISTRY: SUMMARY, RAT: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX F 2	BIOCHEMISTRY: SUMMARY, RAT: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX G 1	URINALYSIS: SUMMARY, RAT: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX G 2	URINALYSIS: SUMMARY, RAT: FEMALE (13-WEEK STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX H 1	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX H 2	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX I 1	ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE: SUMMARY, RAT: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX I 2	ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE: SUMMARY, RAT: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX J 1	ORGAN WEIGHT: RELATIVE: SUMMARY, RAT: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX J 2	ORGAN WEIGHT: RELATIVE: SUMMARY, RAT: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX K 1	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX K 2	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX L 1	HISTOLOGICAL FINDINGS: NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX M 1	IDENTITY AND IMPURITY OF p-NITROANISOLE IN THE 13-WEEK FEED STUDY
APPENDIX M 2	STABILITY OF p-NITROANISOLE IN THE 13-WEEK FEED STUDY
APPENDIX M 3	CONCENTRATION OF p-NITROANISOLE IN FORMULATED DIETS IN THE 13-WEEK FEED STUDY
APPENDIX M 4	STABILITY OF p-NITROANISOLE IN FORMULATED DIETS IN THE 13-WEEK FEED STUDY
APPENDIX N 1	METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
APPENDIX O 1	UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE

要約

p-ニトロアニソールの経口投与によるがん原性試験の投与濃度決定試験として、p-ニトロアニソールをラットに 13 週間経口(混餌)投与して、その生体影響を検索した。

試験には F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いた。被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群の構成で、雌雄各群とも 10 匹とし、合計 120 匹のラットを用いた。被験物質の投与は、p-ニトロアニソールを混合調製した粉末飼料を動物に 13 週間自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも 1250ppm、2500ppm、5000ppm、10000ppm (公比 2.0) に 8000ppm を加えた 5 段階を設定した。観察、検査項目は、一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

13 週間試験の結果、p-ニトロアニソールの投与により雌雄ともに体重増加の抑制及び溶血性の貧血が認められた。溶血性の貧血に伴う所見として脾臓及び腎臓にヘモジデリンの沈着がみられた。また、p-ニトロアニソールの投与による薬物代謝能の亢進に伴う変化として肝細胞の中心性の肥大が認められた。腎臓では腎障害が疑われる所見として尿蛋白の増加、尿素窒素の増加、血中電解質濃度に変化が認められた。病理組織学的所見としては硝子円柱、好塩基性変化等が認められ、雌の 5000ppm 群の 1 例に異型尿細管過形成を伴う腎細胞癌が認められた。これらを考慮してがん原性試験の用量を決定した。

雄の 10000ppm 群では、顕著な体重増加の抑制が認められ、摂餌量も特に投与開始初期に低い値を示し、がん原性試験の長期間の投与には、不適当と考えられた。その下の投与群の 8000ppm 群でも、体重増加の抑制及び摂餌量の投与開始初期における低値は認められたが、投与終了時における摂餌量に対照群との差は認められず、体重においても対照群の 88%であり、体重を指標としてがん原性試験の最高投与濃度を決定すると 8000ppm が適当と思われた。また、8000ppm 群で認められた各種検査結果は、p-ニトロアニソールの投与に伴う適応的变化の範囲内と考えられ、毒性により動物の寿命を短くするとは考えられなかった。したがって、雄のがん原性試験の投与濃度は最高投与濃度を 8000ppm とし、以下、4000ppm、2000ppm の 3 段階 (公比: 2.0) を設定した。

雌では、体重増加の抑制はすべての投与群で認められ、特に 5000ppm 以上の群で顕著であり投与期間中ほぼ同様の値で推移し、投与終了時における体重値は対照群と比較して 82~84%であった。また、各種検査で認められたほとんどの所見についても 5000ppm 以上の群で大きな差はなく、雄と同様に p-ニトロアニソールの投与に伴う適応的变化の範囲内と考えられ、毒性により動物の寿命を短くするとは考えられなかった。雄と同様に体重を指標としてがん原性試験の最高投与濃度を決めると、2500ppm 以下となる。しかし、2500ppm 群で認められた各種検査の所見は軽度の貧血が認められるのみで、この濃度でがん原性試験を実施した場合、設定用量の低さが原因でがん原性を見落とす可能性が懸念さ

れた。したがって、雌のがん原性試験の投与濃度は、がん原性試験結果の性差を比較することも考慮して雄と同じく最高投与濃度を 8000ppm とし、以下 4000ppm、2000ppm の 3 段階（公比：2.0）を設定した。

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

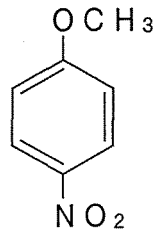
名 称： p-ニトロアニソール(p-nitroanisole)

別 称： 4-ニトロアニソール

1-メトキシ-4-ニトロベンゼン

CAS.No.： 100-17-4

I-1-2 構造式、分子量（文献 1）



$C_7H_7NO_3$

分子量：153.14

I-1-3 物理化学的性状等（文献 1）

性 状：無色の粉末または板状結晶

融 点：54℃

沸 点：274℃

比 重：1.233

溶解性：水に不溶、エタノール、エーテルに可溶

保存条件：火気のない冷暗所に保存

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：ACG7156

製 造 元：和光純薬工業株式会社

グレード：和光一級

純度：99.6%

I-3 被験物質の同一性、安定性

I-3-1 同一性

被験物質の同一性の確認は被験物質のマススペクトルと赤外吸収スペクトルをそれぞれマススペクトルメータ(Hewlett Packard 5989B)及び赤外吸収スペクトロメーター(島津製作所 FTIR-8200PC)で測定し、p-ニトロアニソールの文献値と比較することにより行った。その結果、マススペクトルでは文献(文献 2)と同じ分子イオン及びフラグメントピークが確認された。また、赤外吸収スペクトルでは文献(文献 3)と同じ波数にピークが認められ、p-ニトロアニソールであることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX M 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性は使用開始前及びその使用終了後に、ガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)により p-ニトロアニソールのガスクロマトグラムを測定し、それぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、それぞれの測定結果に差はみられず、投与期間中の p-ニトロアニソールは安定であった。

それらの結果については、APPENDIX M 2 に示した。

I-4 試験動物

動物は日本チャールス・リバー(株)(繁殖所：神奈川県厚木市下古沢 795 番地)より購入した F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。

ラット雌雄各 84 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(群構成時体重範囲、雄:121~133g、雌:94~105g)を選別し、試験に供した。

II 試験方法

試験計画、材料及び方法等の概要を TABLE 1 に示した。

II-1 投与

II-1-1 投与経路、投与方法及び投与期間

経口投与とした。すなわち、p-ニトロアニソールを混合した粉末飼料の自由摂取により、13 週間定期解剖日まで連続投与した。なお、対照群の動物には粉末飼料のみを与えた。

II-1-2 投与濃度及びその設定理由

各群の投与濃度は予備試験である 2 週間試験の結果（文献 4）に基づき決定した。予備試験では投与濃度を雌雄とも 1250ppm、2500ppm、5000ppm、10000ppm、20000ppm（公比 2.0）とし、2 週間連続投与（混餌投与）した。その結果、p-ニトロアニソールの投与により毒性として溶血性の貧血及び体重増加の抑制、標的臓器として腎臓、肝臓、脾臓及びハーダー腺が考えられた。すなわち、最高投与群の 20000ppm 群では雌の全例が死亡し、雄においても著しい体重増加の抑制が認められ、病理組織学的検査では肝臓の巣状壊死、血液学的検査においては貧血が認められ、貧血を補う造血亢進を確認する所見も認められなかった。その下の用量である 10000ppm 群では、雌雄とも体重増加の抑制（対照群に対して、雄：18%、雌：15%）が認められたが、その他の検査において認められた所見は p-ニトロアニソールの投与に対する正常な生体反応と考えられ、直ちに致命的となる毒性兆候とは考えられなかった。

したがって、本試験の投与濃度は 10000ppm を 13 週間試験の最大耐量と考え 10000ppm、5000ppm、2500ppm 及び 1250ppm の 4 段階（公比 2.0）の濃度を設定し、さらに 13 週間の投与により、10000ppm 群で体重増加の抑制が強まることも予想されるため、8000ppm を加えた計 5 段階の投与濃度を設定した。

II-1-3 被験物質混合飼料の調製方法

被験物質を粉末飼料(オリエンタル酵母工業(株)製 CRF-1)に混合し、中間体飼料として 30000ppm の混合飼料を作製し、この中間体飼料を粉末飼料と混合することによって各設定濃度の被験物質混合飼料を調製した。なお、被験物質混合飼料の調製は試験期間中 4 週または 5 週分を 3 回に分けて行った。調製した被験物質混合飼料は、各濃度毎に 1 週分ずつ小分けにして使用時まで冷蔵で保管した。なお、各試験における濃度の表示は、ppm (重量対重量比) とした。

II-1-4 被験物質混合飼料中の被験物質の濃度測定

各投与濃度に調製された被験物質の濃度は、初回投与開始前に高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) による分析を実施した。それらの結果を APPENDIX M 3 に示した。

各群の調製濃度は設定濃度に対し、94.3~97.2%の範囲であった。

II-1-5 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性

被験物質混合飼料中の被験物質について、室温で 8 日間または 7℃で 5 週間の安定性を確認した。すなわち、試験開始に先立って被験物質混合飼料 (40000ppm 及び 300ppm) を調製し、室温(動物飼育室)で 8 日間、7℃で 5 週間 (冷蔵室)それぞれ保管し、被験物質混合飼料調製時の被験物質濃度と各保管期間後の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) による分析を実施し、比較した。その結果、各保管期間前後において被験物質の濃度に大きな差は認められず、被験物質混合飼料中の被験物質はほぼ安定であった。

それらの結果について、APPENDIX M 4 に示した。

II-1-6 被験物質の摂取量

各計測週における摂餌量と設定濃度より体重当たりの被験物質の摂取量(g/kg/day) を算出した。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、雌雄各群 10 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群 名 称	使用動物数（動物番号）	群 名 称	使用動物数（動物番号）
対照群	10 匹（1001～1010）	対照群	10 匹（2001～2010）
1250ppm 群	10 匹（1101～1110）	1250ppm 群	10 匹（2101～2110）
2500ppm 群	10 匹（1201～1210）	2500ppm 群	10 匹（2201～2210）
5000ppm 群	10 匹（1301～1310）	5000ppm 群	10 匹（2301～2310）
8000ppm 群	10 匹（1401～1410）	8000ppm 群	10 匹（2401～2410）
10000ppm 群	10 匹（1501～1510）	10000ppm 群	10 匹（2501～2510）

II-2-2 群分け及び個体識別方法

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

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布した。投与期間においては耳パンチにより識別した。なお、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

動物はバリア区域（AC-1 エリア）内の独立した室（112 室）に収容し、部屋に試験番号、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、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ （実測値:22.9～24.2 $^{\circ}\text{C}$ 、平均:23.1 \pm 0.1 $^{\circ}\text{C}$ ）、湿度 $55 \pm 15\%$ （実測値:54～75%、平均 $57 \pm 1\%$ ）、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。なお、試験実施期間中に電気設備の法定点検に伴う停電があり、一時的（約 2 時間）に飼

育室の湿度が、設定範囲を越える（71～75％）ことがあったが、動物には大きな影響はなかった。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連網ケージ:170W×294D×176H mm)に収容し、ケージ交換は2週間毎に実施した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港 2-8) の CRF-1 を使用し、検疫期間は CRF-1 固型飼料(30KGy- γ 線照射滅菌飼料)を固型飼料給餌器により、また馴化期間及び投与期間は CRF-1 粉末飼料(30KGy- γ 線照射滅菌飼料)を粉末飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖日前日の夕方からは絶食した。飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)、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を使用ロット毎に入手した。

飲水は、全飼育期間を通して、フィルターろ過した市水(秦野市水道局供給)に紫外線を照射し、自動給水装置で、自由摂取させた。飲水は(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)に水道法に準拠した項目について分析を委託した。

なお、飼料の夾雑物及び飲水については、それぞれの分析項目において試験計画書に規定した範囲内であることを確認した。

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

動物の生死確認は1日1回行った。一般状態の詳細な観察は検疫及び馴化期間には、導入時、馴化開始時及び群構成時に行い、投与開始以降は1週間に1回すべての動物について行った。

II-3-2 体重測定

動物の体重測定は検疫及び馴化期間は導入時、馴化開始時及び群構成時に実施し、投与開始以降は1週間に1回すべての動物について行った。

II-3-3 摂餌量測定

体重の計測に合わせて、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除した値を1日当たりの摂餌量とした。

II-3-4 血液学的検査

動物を定期解剖日前日夕方より絶食し、すべての動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2K 入り採血管に採血した血液を用いて血液学的検査を行い、クエン酸ナトリウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いてプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定を行った。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX N 1 に示した。

II-3-5 血液生化学的検査

動物を定期解剖日前日夕方より絶食し、すべての動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX N 1 に示した。

II-3-6 尿検査

すべての動物について、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 N 1 に示した。

II-3-7 病理学的検査

(1) 剖検

定期解剖時にすべての動物について、剖検を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時にすべての動物について TABLE 1 に示した臓器の実重量を測定した。また、実重量の体重比、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

(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、TABLE 1 に示した臓器及び肉眼的に変化のみられた組織を、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。

II-4 数値処理と統計処理

II-4-1 数値の取り扱いと表示

体重についてはgを単位とし、小数点以下第1位を四捨五入して整数値で表示した。

摂餌量についてはgを単位とし、計測期間を通しての摂餌量を小数点以下第1位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、1日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

p-ニトロアニソールの体重当りの摂取量は摂餌量にp-ニトロアニソールの設定濃度を乗じ体重で除した値をg/kg(body weight)/dayを単位として小数点以下第4位を四捨五入して小数点以下第3位まで表示した。

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

血液学的検査、血液生化学的検査についてはAPPENDIX O 1に示した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い表示した。

II-4-2 母数の取り扱い

体重及び摂餌量については、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、全動物を対象とし、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。

II-4-3 統計処理

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非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0 として χ^2 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 生死状況

生死状況を TABLE 2,3 に示した。

雌雄ともすべての群に動物の死亡例はみられなかった。

III-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1,2 に示した。

雄では尿による外陰部周囲の汚染が 8000ppm 以上の群で、黄色尿が 2500ppm 群以上の群で、被毛の着色が 1250ppm 群の 1 匹を除くすべての投与群に認められた。雌では尿による外陰部周囲の汚染が 2500ppm 以上の群で、また、すべての投与群で黄色尿及び被毛の着色が認められた。

III-3 体重

体重の推移を TABLE 2,3、FIGURE 1,2 及び APPENDIX B 1,2 に示した。

雄では 8000ppm 群及び 10000ppm 群に体重増加の抑制が認められた。なお、投与最終日の体重は対照群に対して、10000ppm 群で 79%、8000ppm 群で 88%、5000ppm 群で 96%、2500ppm 群で 100%、1250ppm 群で 99%であった。

雌では、すべての投与群で体重増加の抑制が認められた。なお、投与最終日の体重は対照群に対して、10000ppm 群で 84%、8000ppm 群で 83%、5000ppm 群で 82%、2500ppm 群で 88%、1250ppm 群で 91%であった。

III-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 4,5、FIGURE 3,4 及び APPENDIX C 1,2 に示した。

雄では投与開始より、摂餌量の低値が 8000ppm 群では 5 週目まで、10000ppm 群では 11 週目まで認められた。また、2500 及び 5000ppm 群では 1 週目のみに摂餌量の低値が認められた。

雌では投与開始より、摂餌量の低値が 5000ppm 以上の群では投与終了まで認められた。また、2500ppm 群では 2～5 週目までの間摂餌量の低値が認められた。

III－5 被験物質摂取量

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

被験物質の 1 日当たりの摂取量は、雄で 10000ppm 群：0.524～0.679g/kg、8000ppm 群：0.423～0.580g/kg、5000ppm 群：0.237～0.372g/kg、2500ppm 群：0.115～0.192g/kg、1250ppm 群：0.058～0.102g/kg、雌では 10000ppm 群：0.621～0.744g/kg、8000ppm 群：0.439～0.565g/kg、5000ppm 群：0.278～0.392g/kg、2500ppm 群：0.145～0.201g/kg、1250ppm 群：0.072～0.106g/kg であった。

III－6 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX E 1,2 に示し、統計学的に差を認めた所見を表 1 に抜粋した。

雄では、2500ppm 以上の群で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少と MCV 及び MCH の増加が認められ、貧血が示唆された。5000ppm 以上の群で血小板数、網赤血球比の増加、プロトロンビン時間及び APTT の短縮、8000ppm 以上の群で MCHC の減少が認められた。また、1250ppm 群及び 5000ppm 以上の群で白血球数の増加、10000ppm 群で分葉核好中球比の増加及びリンパ球比の減少が認められた。

雌では、2500ppm 以上の群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び MCHC の減少ならびに MCV の増加が認められ、貧血が示唆された。5000ppm 以上の群で血小板数、網赤血球比及び白血球数の増加、10000ppm 群で好酸球比の減少が認められた。その他、MCH、プロトロンビン時間、APTT に変化がみられたが、投与濃度に対応したものではなかった。

その他、凝固系ではプロトロンビン時間及び APTT の短縮が雄の 5000ppm 以上の群でみられたが、減少性の変化であり、その毒性学的意義は少ないものと考えられた。

表1 血液学的検査

群(ppm)	対照群	1250	2500	5000	8000	10000
雄	動物数	10	10	10	10	10
赤血球数($10^6/\mu\text{L}$)	9.68 ± 0.25	9.51 ± 0.19	9.07 ± 0.24**	8.36 ± 0.16**	7.98 ± 0.17**	8.06 ± 0.32**
ヘモグロビン濃度(g/dL)	16.3 ± 0.3	16.0 ± 0.4	15.5 ± 0.4**	14.4 ± 0.3**	13.8 ± 0.4**	14.0 ± 0.5**
ヘマトクリット値(%)	47.5 ± 1.3	47.1 ± 1.2	45.7 ± 1.5*	42.6 ± 1.0**	41.3 ± 1.1**	41.9 ± 1.5**
MCV(fL)	49.1 ± 0.6	49.5 ± 0.7	50.4 ± 0.5**	51.0 ± 0.8**	51.7 ± 0.7**	52.0 ± 0.9**
MCH(pg)	16.8 ± 0.2	16.8 ± 0.2	17.0 ± 0.2*	17.2 ± 0.2**	17.3 ± 0.2**	17.4 ± 0.2**
MCHC(g/dL)	34.2 ± 0.5	34.0 ± 0.4	33.8 ± 0.3	33.7 ± 0.5	33.4 ± 0.4**	33.4 ± 0.4**
血小板数($10^3/\mu\text{L}$)	708 ± 77	729 ± 21	791 ± 28	911 ± 47**	935 ± 26**	938 ± 20**
網赤血球比(%)	16 ± 2	19 ± 4	25 ± 6	33 ± 7**	42 ± 11**	53 ± 13**
プロトロンビン時間(sec)	15.7 ± 1.3	15.3 ± 1.0	14.4 ± 0.9	13.9 ± 0.5*	13.4 ± 0.4**	13.3 ± 0.3**
APTT(sec)	26.0 ± 1.1	26.3 ± 1.1	23.4 ± 1.5	23.0 ± 2.6*	19.7 ± 2.4**	21.8 ± 0.9**
白血球数($10^6/\mu\text{L}$)	5.77 ± 1.40	7.48 ± 1.46*	6.75 ± 1.09	7.75 ± 1.60*	8.65 ± 1.58**	8.08 ± 1.13**
分葉核好中球(%)	22 ± 2	21 ± 4	22 ± 5	24 ± 5	27 ± 7	30 ± 6**
リンパ球(%)	74 ± 3	74 ± 4	73 ± 5	71 ± 5	69 ± 7	66 ± 6*
雌	動物数	10	10	10	10	10
赤血球数($10^6/\mu\text{L}$)	8.83 ± 0.24	8.58 ± 0.26	8.29 ± 0.32**	7.46 ± 0.25**	7.47 ± 0.25**	7.40 ± 0.21**
ヘモグロビン濃度(g/dL)	16.0 ± 0.5	15.4 ± 0.5	15.1 ± 0.6**	13.7 ± 0.5**	13.4 ± 0.4**	13.1 ± 0.4**
ヘマトクリット値(%)	45.5 ± 1.5	44.0 ± 1.6	43.7 ± 1.9*	40.1 ± 1.4**	39.6 ± 1.4**	39.1 ± 1.4**
MCV(fL)	51.6 ± 0.6	51.3 ± 0.7	52.7 ± 0.7**	53.8 ± 0.6**	53.0 ± 0.5**	52.8 ± 0.6**
MCH(pg)	18.0 ± 0.2	18.0 ± 0.1	18.2 ± 0.2	18.3 ± 0.3**	17.9 ± 0.3	17.7 ± 0.2**
MCHC(g/dL)	35.0 ± 0.5	35.1 ± 0.4	34.6 ± 0.4*	34.1 ± 0.3**	33.8 ± 0.3**	33.5 ± 0.3**
血小板数($10^3/\mu\text{L}$)	836 ± 57	854 ± 59	898 ± 44	960 ± 72**	941 ± 61**	992 ± 45**
網赤血球比(%)	14 ± 3	18 ± 4	19 ± 5	34 ± 10**	41 ± 12**	49 ± 14**
プロトロンビン時間(sec)	13.7 ± 0.4	13.8 ± 0.4	14.2 ± 0.3*	13.9 ± 0.4	13.8 ± 0.3	13.8 ± 0.3
APTT(sec)	19.4 ± 1.7	20.6 ± 1.2	20.2 ± 2.0	21.7 ± 1.1**	21.0 ± 1.4	21.2 ± 2.0
白血球数($10^6/\mu\text{L}$)	3.29 ± 0.76	3.44 ± 0.90	4.19 ± 1.08	5.06 ± 1.04**	5.23 ± 0.70**	5.05 ± 1.07**
好酸球(%)	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1**

有意差 *; $p \leq 0.05$ **; $p \leq 0.01$ ダンネット検定

III-7 血液生化学的検査

定期解剖時に行った血液生化学的検査の結果を APPENDIX F 1,2 に示し、統計学的に差を認めた所見を表 2 に抜粋した。

雄では、2500ppm 以上の群で総蛋白の増加、ALP 活性の低下、5000ppm 以上の群でアルブミン、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素及びカルシウムの増加ならびにトリグリセライド及びクロールの減少が認められ、1250ppm 群と 8000ppm 以上の群で総ビリルビンの増加、A/G 比の減少、8000ppm 以上の群でグルコース及びナトリウムの減少、 γ -GTP 活性の上昇、10000ppm 群で無機リンの増加が認められた。その他、GOT 活性及び GPT 活性に変化がみられた。

雌では、2500ppm 以上の群で A/G 比の減少、5000ppm 以上の群で総蛋白、総コレステロール、尿素窒素の増加、GOT 活性及び ALP 活性の低下、ナトリウム及びクロールの

減少が認められ、8000ppm 以上の群でアルブミン、リン脂質及びカルシウムの増加、 γ -GTP 活性の上昇、10000ppm 群でカリウムの増加が認められた。

表2 血液生化学的検査

群(ppm)	対照群	1250	2500	5000	8000	10000
雄	動物数	10	10	10	10	10
総蛋白(g/dL)	6.1 ± 0.1	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.2*	7.0 ± 0.2**	7.4 ± 0.1**	7.4 ± 0.2**
アルブミン(g/dL)	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.4 ± 0.1*	4.6 ± 0.1*	4.6 ± 0.2**
A/G比	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1*	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.0*	1.6 ± 0.1*
総ビリルビン(mg/dL)	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01**	0.15 ± 0.01**
グルコース(mg/dL)	178 ± 24	178 ± 13	180 ± 10	160 ± 8	151 ± 12*	140 ± 11**
総コレステロール(mg/dL)	67 ± 4	69 ± 4	82 ± 5	118 ± 14**	162 ± 17**	166 ± 17**
トリグリセライド(mg/dL)	75 ± 31	65 ± 23	55 ± 17	45 ± 16**	33 ± 13**	38 ± 19**
リン脂質(mg/dL)	118 ± 11	119 ± 9	130 ± 7	176 ± 19*	236 ± 24**	245 ± 33**
GOT活性(IU/L)	82 ± 40	88 ± 21	57 ± 9	47 ± 4**	51 ± 6	54 ± 9
GPT活性(IU/L)	46 ± 15	48 ± 8	36 ± 5	31 ± 1**	36 ± 4	41 ± 8
ALP(IU/L)	232 ± 16	234 ± 19	209 ± 11**	194 ± 16**	186 ± 15**	177 ± 18**
γ -GTP(IU/L)	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	4 ± 1	8 ± 2**	11 ± 3**
尿素窒素(mg/dL)	20.3 ± 6.7	19.3 ± 1.2	20.7 ± 1.6	26.1 ± 1.7**	29.9 ± 4.3**	29.5 ± 4.3**
ナトリウム(mEq/L)	142 ± 2	142 ± 2	141 ± 2	140 ± 1	139 ± 1**	139 ± 2**
クロール(mEq/L)	105 ± 3	106 ± 2	104 ± 2	101 ± 1*	99 ± 2**	98 ± 2**
カルシウム(mg/dL)	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.3	10.9 ± 0.2**	11.3 ± 0.1**	11.3 ± 0.2**
無機リン(mg/dL)	5.4 ± 1.1	5.7 ± 0.7	5.7 ± 0.9	5.9 ± 0.4	6.0 ± 0.4	6.6 ± 0.5*
雌	動物数	10	10	10	10	10
総蛋白(g/dL)	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.1 ± 0.2	6.6 ± 0.2*	7.2 ± 0.3**	7.5 ± 0.4**
アルブミン(g/dL)	3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.5 ± 0.2**	4.6 ± 0.3**
A/G比	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1**	1.6 ± 0.1**	1.6 ± 0.1*	1.6 ± 0.1**
総ビリルビン(mg/dL)	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02
グルコース(mg/dL)	143 ± 15	140 ± 11	144 ± 14	144 ± 9	137 ± 10	137 ± 18
総コレステロール(mg/dL)	74 ± 5	72 ± 6	79 ± 4	132 ± 9*	178 ± 15**	205 ± 24**
トリグリセライド(mg/dL)	18 ± 5	16 ± 2	14 ± 3	14 ± 3	20 ± 6	24 ± 11
リン脂質(mg/dL)	139 ± 9	131 ± 9	137 ± 5	199 ± 13	260 ± 34**	301 ± 48**
GOT活性(IU/L)	67 ± 11	70 ± 12	64 ± 4	53 ± 6*	53 ± 8*	49 ± 6**
ALP(IU/L)	168 ± 18	162 ± 15	161 ± 10	129 ± 7**	125 ± 25**	117 ± 28**
γ -GTP(IU/L)	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	9 ± 3**	12 ± 3**
尿素窒素(mg/dL)	17.8 ± 1.6	19.8 ± 1.7	20.4 ± 1.3	27.0 ± 2.9**	29.2 ± 3.3**	30.5 ± 2.8**
ナトリウム(mEq/L)	141 ± 2	140 ± 1	140 ± 1	139 ± 2*	139 ± 1*	138 ± 1**
カリウム(mEq/L)	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.3	4.1 ± 0.2**
クロール(mEq/L)	107 ± 2	107 ± 2	107 ± 2	104 ± 2**	101 ± 2**	100 ± 1**
カルシウム(mg/dL)	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.2	9.8 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.9 ± 0.3**	11.1 ± 0.4**

有意差 *; $p \leq 0.05$ **; $p \leq 0.01$ ダンネット検定

III-8 尿検査

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

雄では、5000ppm 以上の群でケトン体の陽性例の減少、8000ppm 以上の群で pH の低下、10000ppm 群で蛋白の陽性度の増加が認められた。

雌の pH は、8000ppm 群までは投与濃度に対応した変化ではなかったが、10000ppm 群では低下傾向を示した。

Ⅲ－９ 病理学的検査

Ⅲ－９－１ 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX H 1, 2 に示した。

雄では、投与群に特徴的な所見あるいは対照群に比較して顕著に高い発生率を示した所見は認められなかった。

雌では定期解剖例で 5000ppm 群に腎臓の結節が 1/10 例認められたが、その他投与に関連したと思われる所見や対照群に比較して顕著に高い発生率を示した所見は認められなかった。

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、J 1,2 に示し、統計学的に実重量または体重比で差を認めた臓器を表 3 に抜粋した。

雄では、肝臓の実重量の高値が 2500ppm 以上の群で、体重比の高値が 5000ppm 以上の群で認められ、精巣、腎臓及び脾臓の実重量と体重比の高値が 5000ppm 以上の群で認められた。

雌では、肝臓の実重量の高値が 8000ppm 以上の群で、体重比の高値が 5000ppm 以上の群で認められ、5000ppm 以上の群では、腎臓及び脾臓の実重量と体重比の高値が認められた。

その他、ストレスや解剖時体重の低値に伴ったと思われる実重量の低値と体重比の高値が、雄では 5000ppm 以上の群で雌では全投与群で多くの臓器に認められた。

表3 臓器重量

群(ppm)		対照群	1250	2500	5000	8000	10000
雄	動物数	10	10	10	10	10	10
解剖日体重(g)		297 ± 17	294 ± 10	295 ± 15	283 ± 18	259 ± 14**	234 ± 10**
実重量(g)							
	胸腺	0.214 ± 0.017	0.204 ± 0.023	0.205 ± 0.026	0.191 ± 0.018	0.184 ± 0.024*	0.171 ± 0.014**
	副腎	0.060 ± 0.009	0.054 ± 0.007	0.053 ± 0.005	0.050 ± 0.005**	0.049 ± 0.009**	0.047 ± 0.005**
	精巣	2.950 ± 0.110	2.876 ± 0.154	3.061 ± 0.090	3.094 ± 0.092*	3.079 ± 0.092*	3.101 ± 0.084*
	心臓	0.945 ± 0.051	0.921 ± 0.033	0.913 ± 0.046	0.917 ± 0.047	0.862 ± 0.070**	0.811 ± 0.038**
	肺	1.029 ± 0.040	1.013 ± 0.047	1.026 ± 0.063	1.036 ± 0.054	1.014 ± 0.058	0.947 ± 0.044**
	腎臓	1.805 ± 0.113	1.809 ± 0.061	1.878 ± 0.094	2.112 ± 0.109**	2.102 ± 0.126**	2.104 ± 0.107**
	脾臓	0.549 ± 0.036	0.538 ± 0.029	0.609 ± 0.089	0.715 ± 0.078**	0.757 ± 0.088**	0.732 ± 0.098**
	肝臓	7.113 ± 0.399	7.258 ± 0.490	8.117 ± 0.601**	9.930 ± 0.849**	11.528 ± 0.841**	11.389 ± 0.712**
	脳	1.732 ± 0.046	1.726 ± 0.034	1.767 ± 0.036	1.730 ± 0.040	1.737 ± 0.045	1.769 ± 0.057
体重比(%)							
	胸腺	0.072 ± 0.007	0.069 ± 0.007	0.069 ± 0.008	0.067 ± 0.005	0.071 ± 0.008	0.073 ± 0.005
	副腎	0.016 ± 0.002	0.018 ± 0.002	0.018 ± 0.004	0.019 ± 0.003	0.022 ± 0.003**	0.023 ± 0.003**
	精巣	0.997 ± 0.071	0.978 ± 0.055	1.039 ± 0.053	1.096 ± 0.073**	1.192 ± 0.049**	1.327 ± 0.078**
	心臓	0.319 ± 0.014	0.314 ± 0.018	0.309 ± 0.009	0.324 ± 0.017	0.333 ± 0.019	0.347 ± 0.012**
	肺	0.348 ± 0.016	0.345 ± 0.011	0.348 ± 0.016	0.366 ± 0.011	0.392 ± 0.012**	0.405 ± 0.026**
	腎臓	0.609 ± 0.025	0.615 ± 0.013	0.637 ± 0.015	0.746 ± 0.022**	0.813 ± 0.040**	0.899 ± 0.031**
	脾臓	0.185 ± 0.013	0.183 ± 0.010	0.206 ± 0.022	0.252 ± 0.017**	0.292 ± 0.026**	0.312 ± 0.036**
	肝臓	2.399 ± 0.077	2.465 ± 0.088	2.748 ± 0.095	3.501 ± 0.119**	4.453 ± 0.148**	4.864 ± 0.201**
	脳	0.636 ± 0.040	0.634 ± 0.025	0.643 ± 0.034	0.678 ± 0.041*	0.731 ± 0.034**	0.795 ± 0.038**
雌	動物数	10	10	10	10	10	10
解剖日体重(g)		163 ± 5	147 ± 8**	143 ± 8**	136 ± 10**	137 ± 10**	139 ± 8**
実重量(g)							
	胸腺	0.171 ± 0.020	0.150 ± 0.022	0.154 ± 0.020	0.144 ± 0.012**	0.143 ± 0.020**	0.149 ± 0.018
	副腎	0.060 ± 0.009	0.054 ± 0.007	0.053 ± 0.005	0.050 ± 0.005**	0.049 ± 0.009**	0.047 ± 0.005**
	心臓	0.605 ± 0.026	0.562 ± 0.058	0.542 ± 0.043*	0.534 ± 0.047**	0.559 ± 0.051	0.571 ± 0.051
	肺	0.763 ± 0.036	0.724 ± 0.045	0.714 ± 0.026*	0.694 ± 0.032**	0.684 ± 0.041**	0.681 ± 0.040**
	腎臓	1.106 ± 0.026	1.078 ± 0.065	1.104 ± 0.056	1.189 ± 0.067*	1.289 ± 0.086**	1.334 ± 0.056**
	脾臓	0.331 ± 0.022	0.328 ± 0.030	0.335 ± 0.034	0.380 ± 0.033*	0.429 ± 0.060**	0.475 ± 0.048**
	肝臓	3.776 ± 0.122	3.611 ± 0.201	3.717 ± 0.171	4.768 ± 0.338	6.083 ± 0.555**	6.977 ± 0.528**
	脳	1.732 ± 0.046	1.726 ± 0.034	1.767 ± 0.036	1.730 ± 0.040	1.737 ± 0.045	1.769 ± 0.057
体重比(%)							
	胸腺	0.105 ± 0.011	0.102 ± 0.013	0.108 ± 0.014	0.106 ± 0.007	0.104 ± 0.008	0.107 ± 0.011
	副腎	0.037 ± 0.006	0.037 ± 0.005	0.037 ± 0.002	0.037 ± 0.003	0.036 ± 0.006	0.034 ± 0.004
	心臓	0.370 ± 0.012	0.384 ± 0.035	0.380 ± 0.015	0.394 ± 0.024	0.410 ± 0.034**	0.410 ± 0.019**
	肺	0.467 ± 0.024	0.494 ± 0.022*	0.502 ± 0.023**	0.513 ± 0.024**	0.502 ± 0.024**	0.490 ± 0.017
	腎臓	0.677 ± 0.016	0.737 ± 0.054	0.776 ± 0.032	0.880 ± 0.047**	0.945 ± 0.052**	0.961 ± 0.047**
	脾臓	0.203 ± 0.015	0.224 ± 0.015	0.235 ± 0.020**	0.281 ± 0.017**	0.313 ± 0.031**	0.342 ± 0.028**
	肝臓	2.312 ± 0.074	2.464 ± 0.055	2.611 ± 0.080	3.519 ± 0.062**	4.450 ± 0.177**	5.018 ± 0.280**
	脳	1.061 ± 0.043	1.181 ± 0.072**	1.243 ± 0.065**	1.283 ± 0.092**	1.277 ± 0.094**	1.276 ± 0.077**

有意差 *; p ≤ 0.05 **; p ≤ 0.01 ダンネット検定

Ⅲ－９－３ 病理組織学的検査

非腫瘍性所見を APPENDIX K1, 2、腫瘍性所見を APPENDIX L1 に示した。また、脾臓、肝臓、腎臓及びハーダー腺の所見については表 4 に抜粋して示した。

雄では脾臓のヘモジデリン沈着と赤血球充満の発生が 5000ppm 以上の群の全例と 2500ppm の 3 例に観察され、これらの所見の程度は投与量が多い群ほど強かった。また、肝臓に中心性の肝細胞の肥大が 8000ppm 以上の群でみられた。腎臓では好塩基性変化の発生増加と好酸体の出現程度の増強が 5000ppm 以上の群、硝子円柱の発生増加が 8000ppm 以上の群、乳頭部の鉍質沈着と顆粒状円柱形成の発生増加が 5000 及び 8000ppm 群に認められた。また、異型性を伴う好塩基性変化が 5000 群の 1 例及び 8000 及び

10000ppm 群の各 2 例に観察された。ハーダー腺には変性の発生増加が 8000ppm 以上の群で認められた。

雌では脾臓のヘモジデリン沈着が 2500ppm 以上の群の全例、赤血球充満の発生が 5000ppm 以上の群の全例と 2500ppm の 1 例に観察され、これらの所見の程度は投与量が多い群ほど強かった。また、肝臓に中心性の肝細胞の肥大が 8000ppm 以上の群でみられた。腎臓では近位尿細管の好酸滴が 5000ppm 以上の群、ヘモジデリンの沈着が 10000ppm 群で有意な発生増加を示し、また、乳頭部の鉍質沈着が 5000ppm 以上の群で 2 から 4 例/群、硝子円柱と乳頭壊死がそれぞれ 10000ppm 群の 2 例にみられた。なお、5000ppm の 1 例の腎臓に腎細胞癌と異型尿細管過形成が観察された。ハーダー腺は、変性が 8000 ppm 以上の群、リンパ球浸潤が 8000 ppm で発生増加を示した。

表4 病理組織学的検査

群(ppm)	対照群	1250	2500	5000	8000	10000
動物数	10	10	10	10	10	10
グレード	<1> <2> <3> <4>	<1> <2> <3> <4>	<1> <2> <3> <4>	<1> <2> <3> <4>	<1> <2> <3> <4>	<1> <2> <3> <4>
雄						
[脾臓]						
ヘモジデリン沈着	0 0 0 0	0 0 0 0	3 0 0 0	5 5 0 0 **	0 10 0 0 **	0 10 0 0 **
赤血球充満	0 0 0 0	0 0 0 0	3 0 0 0	9 1 0 0 **	6 4 0 0 **	0 10 0 0 **
[肝臓]						
肝細胞の肥大：中心性	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	5 0 0 0 *	8 0 0 0 **
[腎臓]						
好塩基性変化	1 0 0 0	3 0 0 0	3 0 0 0	8 2 0 0 **	10 0 0 0 **	0 10 0 0 **
好塩基性変化：異型	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	2 0 0 0	1 1 0 0
好酸体	4 6 0 0	0 10 0 0	0 10 0 0	0 0 10 0 **	0 0 10 0 **	0 0 10 0 **
硝子円柱	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	5 0 0 0 *	8 0 0 0 **
鉍質沈着：乳頭	2 1 0 0	0 0 0 0	3 0 0 0	2 6 0 0 *	4 5 0 0 *	2 0 0 0
顆粒状円柱形成	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	8 0 0 0 **	7 0 0 0 **	0 0 0 0
[ハーダー腺]						
変性	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	10 0 0 0 **	10 0 0 0 **
リンパ球浸潤	1 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	2 1 0 0	3 0 0 0	2 0 0 0
雌						
動物数	10	10	10	10	10	10
[脾臓]						
ヘモジデリン沈着	0 0 0 0	0 0 0 0	10 0 0 0 **	1 9 0 0 **	0 10 0 0 **	0 10 0 0 **
赤血球充満	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	10 0 0 0 **	6 4 0 0 **	0 10 0 0 **
[肝臓]						
肝細胞の肥大：中心性	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	10 0 0 0 **	10 0 0 0 **
[腎臓]						
ヘモジデリン沈着	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	9 1 0 0 **
好酸滴：近位尿細管	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	5 0 0 0 *	10 0 0 0 **	3 7 0 0 **
硝子円柱	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0
乳頭壊死	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0
鉍質沈着：乳頭	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	4 0 0 0	1 1 0 0
異型尿細管過形成	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
[ハーダー腺]						
変性	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	3 0 0 0	9 0 0 0 **	10 0 0 0 **
リンパ球浸潤	0 1 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	4 1 0 0	9 0 0 0 **	4 1 0 0
[腎臓]						
腎細胞癌	0	0	0	1	0	0

有意差 *; $p \leq 0.05$ **; $p \leq 0.01$ χ^2 乗検定

IV 考察及びまとめ

<雄>

p-ニトロアニソールの 13 週間投与により、死亡した動物はみられなかった。

10000ppm 群では一般状態の観察で p-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる黄色尿及び被毛の着色が 1 週目より認められた。体重は、増加の抑制が認められ、投与期間を通して対照群の約 80% であった。摂餌量も投与期間を通して、対照群と比較して低値を示した。特に、投与 1 週目は対照群の 56% であり、飼料摂取不足が体重増加の抑制に大きく影響したと考えられた。また、血液生化学的検査においてはグルコース及びトリグリセライドの低下が認められ、低栄養状態であったことが示唆された。血液学的検査において認められた貧血は、病理組織学的検査において脾臓にヘモジデリンの沈着及び赤血球充満が認められ、かつ、血液学的検査において網状赤血球が増加しており、造血機能に異常がないと思われることから、p-ニトロアニソールの投与により赤血球が障害を受け、脾臓において赤血球が崩壊したことによる溶血性の貧血と思われた。また、血液生化学的検査において認められた総ビリルビンの増加は、赤血球から溶出したヘモグロビンが代謝されることによるものと思われる。病理組織学的検査では、上記した脾臓の所見に加えて、腎臓、肝臓及びハーダー腺にも変化が認められた。腎臓には好塩基性変化と硝子円柱の発生増加及び好酸体を有する細胞数の増加が 5000ppm 以上の群が認められた。好塩基性変化は尿細管の傷害と再生を示す所見であり、硝子円柱の出現も腎臓に対する障害を示唆する所見と推察された。また、尿検査で pH の低下、尿蛋白の陽性度の増加、臓器重量で腎臓の実重量及び体重比の増加、血液生化学的検査で尿素窒素の増加、ならびにナトリウム、カリウム、クロール、無機リン等の電解質に変化が認められた。これら腎臓の病理組織学的所見、尿検査、腎臓重量及び血液生化学的検査の結果は、10000ppm の p-ニトロアニソールの投与によって腎臓に障害が起きることを示している。さらに、病理組織学的検査で好塩基性変化がみられた動物のうちの 2 例には異型を示す像が観察されており、長期間投与によって腎臓の腫瘍が発生する可能性について考慮すべき所見と考えられる。肝臓には、臓器重量で実重量及び体重比の増加、病理組織学的検査で肝細胞の中心性の肥大が観察されており、p-ニトロアニソールの投与により、肝臓での薬物代謝機能が亢進したことに伴う変化と思われた。また、血液生化学的検査では総蛋白の増加、 γ -GTP 活性の上昇、総コレステロール及びリン脂質の増加等の変化が認められた。ハーダー腺には変性の発生増加がみられたがその程度は軽度であった。

8000ppm 群でも、一般状態の観察で黄色尿及び被毛の着色が 1 週目より認められた。体重は、増加の抑制が認められたが、投与期間を通して対照群の 90% をやや下回る程度であった。摂餌量も投与期間初期に対照群と比較して低値を示したが、徐々に差は少なくな

り、投与期間後期においては対照群と比較して差は認められなかった。血液生化学的検査においてはグルコース及びトリグリセライドの低下が認められ、若干の低栄養状態であったことが示唆された。血液学的検査では貧血が認められ、病理組織学的検査では脾臓にヘモジデリンの沈着及び赤血球充満がみられた。また、腎臓に対する影響として、病理組織学的検査で好塩基性変化（2例は異型を伴う）、硝子円柱、乳頭部の鉍質沈着及び顆粒状円柱形成の発生増加と好酸体の程度の増強、尿検査でpHの低下、臓器重量で実重量及び体重比の増加、血液生化学的検査で尿素窒素の増加、ならびにナトリウム、カリウム、クロール等の電解質に変化、総蛋白の増加等が認められた。肝臓に対する影響として血液生化学的検査で γ -GTP活性の上昇、総コレステロール及びリン脂質の増加等の変化、臓器重量で実重量及び体重比の増加、病理組織学的検査で中心性の肝細胞の肥大が認められた。その他、ハーダー腺に変性も病理組織学的検査で認められた。

5000ppm群でも一般状態の観察で黄色尿及び被毛の着色が1週目より認められた。しかし、体重は対照群と比較して大きな差は認められず、投与期間を通して対照群の95%程度であった。摂餌量も投与開始1週目に対照群と比較して低値を示したが、その後は対照群と比較して差は認められなかった。血液学的検査では貧血、病理組織学的検査では脾臓にヘモジデリンの沈着及び赤血球充満がみられたが、その程度は8000ppm群に比較して軽減していた。また、肝臓についても、実重量と体重比の増加がみられるものの、病理組織学的検査では変化を認めなかった。これに対し、腎臓には好塩基性変化（1例は異型を伴う）、乳頭部の鉍質沈着及び顆粒状円柱形成の発生増加と好酸体の程度の増強がみられ、これらの所見の程度は8000ppm群と同程度であった。

2500ppm群でも一般状態の観察で黄色尿が1週目より、被毛の着色が3週目より顕著に認められたが、体重は対照群と比較して大きな差は認められず、摂餌量も投与開始1週目に対照群と比較して低値を示したが、その後は対照群と比較して差は認められなかった。血液学的検査において貧血が認められたが、病理組織学的検査では脾臓の赤血球充満、ヘモジデリンの沈着が数例にみられただけであった。また、肝臓についても、臓器重量で実重量のみの増加がみられるだけであった。腎臓は病理組織学的検査に変化を認めなかった。

1250ppm群では、一般状態の観察で被毛の着色が8週目より認められたが、2500ppm群まで認められた黄色尿は投与期間を通して認められなかった。体重及び摂餌量は対照群と比較して著変が認められず、その他の検査においても対照群と比較して大きな変化はなかった。

<雌>

p-ニトロアニソールの13週間投与により、死亡した動物はみられなかった。

10000ppm群では一般状態の観察でp-ニトロアニソールの代謝物に起因すると思われる

黄色尿及び被毛の着色が1週目より認められた。体重は、増加の抑制が認められ、投与期間を通して対照群の85%前後であった。摂餌量も投与期間を通して、対照群と比較して低値を示し、飼料摂取不足が体重増加の抑制に影響したと考えられた。血液学的検査において認められた貧血は、病理組織学的検査において脾臓及び腎臓にヘモジデリンの沈着、脾臓に赤血球充満が認められ、かつ、血液学的検査において網状赤血球が増加しており、造血機能に異常がないと思われることから、p-ニトロアニソールの投与により赤血球が障害を受け、脾臓において赤血球が崩壊したことによる溶血性の貧血と思われた。また、血液生化学的検査において総ビリルビンの増加傾向は、赤血球から溶出したヘモグロビンが代謝されることによるものと思われる。病理組織学的検査では、上記した脾臓の所見に加えて、腎臓、肝臓及びハーダー腺にも変化が認められた。腎臓には近位尿細管の好酸滴の発生増加が認められ、2例であるが乳頭壊死及び硝子円柱が認められた。また、尿検査でpHの低下傾向、臓器重量で実重量及び体重比の増加、血液生化学的検査で尿素窒素の増加、ならびにナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム等の電解質に変化が認められた。これら腎臓の病理組織学的所見、尿検査、腎臓重量及び血液生化学的検査の結果は、10000ppmのp-ニトロアニソールの投与によって腎臓に障害が起きる可能性を示している。肝臓には、臓器重量の増加、病理組織学的検査で肝細胞の中心性の肥大が観察されており、p-ニトロアニソールの投与により、肝臓での薬物代謝機能が亢進したことに伴う変化と思われた。また、血液生化学的検査では総蛋白、総コレステロール、リン脂質の増加、ALP及びGOT活性の低下ならびに γ -GTP活性の上昇等の変化が認められた。ハーダー腺には変性の発生増加がみられたがその程度は軽度であった。

8000ppm群でも、一般状態の観察で黄色尿及び被毛の着色が1週目より認められた。体重は、増加の抑制が認められ、投与期間を通して対照群の85%前後であった。摂餌量も投与期間を通して、対照群と比較して低値を示した。血液学的検査では貧血が認められ、病理組織学的検査においては脾臓にヘモジデリンの沈着及び赤血球充満がみられた。腎臓では病理組織学的検査で近位尿細管の好酸滴の発生増加、臓器重量で実重量及び体重比の増加、血液生化学的検査で尿素窒素の増加ならびにナトリウム、クロール、カルシウム等の電解質に変化が認められた。肝臓では病理組織学的検査で中心性の肝細胞の肥大、臓器重量で実重量及び体重比の増加、血液生化学的検査で総蛋白、総コレステロール及びリン脂質の増加、 γ -GTP活性の上昇、GOT及びALP活性の低下等の変化が認められた。その他、軽度なハーダー腺の変性の発生が増加した。

5000ppm群でも一般状態の観察で黄色尿及び被毛の着色が1週目より認められた。体重は、増加の抑制が認められ、投与期間を通して対照群の85%前後であった。摂餌量も投与期間を通して、対照群と比較して低値を示した。血液学的検査では貧血が認められ、病理組織学的検査においては脾臓にヘモジデリンの沈着及び赤血球充満がみられた。腎臓で

は病理組織学的検査で近位尿細管の好酸滴の発生増加、異型尿細管過形成ならびに腎細胞癌、臓器重量で実重量及び体重比の増加、血液生化学的検査で尿素窒素の増加ならびにナトリウム、クロール、カルシウム等の電解質に変化が認められた。肝臓では病理組織学的検査で中心性の肝細胞の肥大、臓器重量で体重比の増加、血液生化学的検査で総蛋白の増加、ALP 及び GOT 活性の低下、総コレステロールの増加等の変化が認められた。なお、この投与群で認められた異型尿細管過形成ならびに腎細胞癌は例数としては 1 例であるが、13 週間試験で自然発生的に認められることは極めて稀である。さらに、腎臓は p-ニトロアニソールの標的臓器であることから、投与の影響である可能性を否定できなかった。

2500ppm 群でも一般状態の観察で黄色尿及び被毛の着色が 1 週目より認められた。体重は、増加の抑制が認められ、投与期間を通して対照群の 90%前後であった。摂餌量も投与期間を通して、対照群と比較して低値を示した。血液学的検査においては貧血が認められた。病理組織学的検査においては脾臓のヘモジデリン沈着が認められた。

1250ppm 群でも一般状態の観察で黄色尿及び被毛の着色が 1 週目より認められた。体重は、増加の抑制が認められ、投与期間を通して対照群の 90%前後であった。摂餌量も投与期間を通して、対照群と比較して低値を示した。その他の検査結果においては対照群と比較して大きな差は認められなかった。

現在までに、p-ニトロアニソールのラットを用いたがん原性試験の報告は認められないが、ニトロ基の位置が異なる o-ニトロアニソールのラットを用いたがん原性試験（投与期間:2 年、投与濃度:0、222、666 及び 2000ppm）と投与開始から 27 週間のみ（27 週以降 104 週までは対照群と同じ飼料、投与濃度:6000 及び 18000ppm）投与した試験が報告されている（文献 6）。これによると、がん原性試験では腫瘍性病変としては単核球性白血病の発生増加が認められているだけであるが、高濃度で 27 週間投与した試験では、雄または雌に膀胱（移行上皮乳頭腫と癌、扁平上皮乳頭腫と癌及び肉腫）、大腸（腺腫性ポリプ及び大腸癌）、腎臓（移行上皮乳頭腫及び癌）の腫瘍性病変の発生増加が認められている。これらの試験に先立って行われた 13 週間試験では、13 週目の雄の体重は 6000ppm 群で対照群の 86%、18000ppm 群で対照群の 48%、雌の体重は 6000ppm 群で対照群の 86%、18000ppm 群で対照群の 64%であった。また、この 13 週間試験における各種検査結果では、血液学的検査で貧血、臓器重量で肝臓、腎臓及び脾臓の臓器重量の増加、病理組織学的検査で脾臓のヘモジデリン沈着、肝臓の肝細胞肥大、腎臓の変性の病変など今回実施した本試験と類似した所見が多く見られた。このことは、構造のよく似た p-ニトロアニソールのがん原性試験の投与濃度を決める際、体重を基準とした最大耐量（対照群の 90%）に固執しすぎて濃度設定が低すぎた場合に、がん原性を検出できない可能性を示唆するものと思われた。これらのことも考慮してがん原性試験の用量を決定した。

雄の 10000ppm 群では、顕著な体重増加の抑制が認められ、摂餌量も特に投与開始初期に低い値を示し、がん原性試験の長期間の投与には、不適当と考えられた。その下の投与群の 8000ppm 群でも、体重増加の抑制及び摂餌量の投与開始初期における低値は認められたが、投与終了時における摂餌量に对照群と差は認められず、体重においても对照群の 90%であり、体重を指標としてがん原性試験の最高投与濃度を決定すると 8000ppm が適当と思われる。また、8000ppm 群で認められた各種検査結果は、p-ニトロアニソールの投与に伴う適応的变化の範囲内と考えられ、毒性により動物の寿命を短くするとは断定できない。したがって、雄のがん原性試験の投与濃度は最高投与濃度を 8000ppm とし、以下、4000ppm、2000ppm の 3 段階（公比：2.0）が適当であると考えられた。

雌では、体重増加の抑制はすべての投与群で認められ、特に 5000ppm 以上の群で顕著であり投与期間中ほぼ同様の値で推移し、投与終了時における体重は对照群と比較して 82～84%であった。また、各種検査で認められた所見についても病理組織学的検査における肝細胞の肥大、腎臓のヘモジデリン沈着などを除き、各検査項目でほぼ同程度であった。これらの検査結果は雄と同様に p-ニトロアニソールの投与に伴う適応的变化の範囲内と考えられ、毒性により動物の寿命を短くするとは考えられなかった。雄と同様に、体重を指標としてがん原性試験の最高投与濃度を決めようとする、2500ppm 以下となる。2500ppm 群で認められた各種検査の所見は軽度の貧血が認められるのみで、この濃度でがん原性試験を実施した場合、設定用量の低さが原因でがん原性を見落とす可能性が懸念された。したがって、雌のがん原性試験の投与濃度は、がん原性試験結果の性差を比較することも考慮して雄と同じく最高投与濃度を 8000ppm とし、以下、4000ppm、2000ppm の 3 段階（公比：2.0）を設定した。

V 文献

- 1) 化学大事典 (1989)
東京化学同人 東京
- 2) Fred W. McLafferty (1994) Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition.
Jone Wiley and Sons Inc. (U.S.), Entry Number 38330.
- 3) William W. Simons (1978) The Sadtler Handbook of Infrared Spectra.
Sadtler Research Laboratories, Inc. (U.K.), p.443
- 4) 日本バイオ^オッセイ研究センター (2000)
p-ニトロアニソールのラットを用いた経口投与による 2 週間毒性試験 (混餌試験) 報告書
日本バイオアッセイ研究センター、 神奈川
- 5) 阿部正信 (1986)
長期毒性試験に用いるラット、マウス体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立
薬理と治療、14、7285-7302
- 6) NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (1993)
Toxicology and Carcinogenesis Studies of o-Nitroanisole.
Technical report series No.416
U.S. Department of Health and Human Services.