

p-ニトロアニソールのマウス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：0370

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マウス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：0370

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

II-3	観察・検査項目及び方法	
II-3-1	動物の一般状態の観察	7
II-3-2	体重測定	7
II-3-3	摂餌量測定	7
II-3-4	血液学的検査	8
II-3-5	血液生化学的検査	8
II-3-6	尿検査	8
II-3-7	病理学的検査	8
II-4	数値処理と統計処理	
II-4-1	数値の取り扱いと表示	9
II-4-2	母数の取り扱い	9
II-4-3	統計処理	10
II-5	試資料の保管	10
III	試験成績	
III-1	生死状況	11
III-2	一般状態	11
III-3	体重	11
III-4	摂餌量	11
III-5	被験物質摂取量	12
III-6	血液学的検査	12
III-7	血液生化学的検査	13
III-8	尿検査	14
III-9	病理学的検査	
III-9-1	剖検	14
III-9-2	臓器重量	15
III-9-3	病理組織学的検査	15
IV	考察及びまとめ	17
V	試験の信頼性に影響を及ぼしたと考えられる要素	20
VI	文献	21

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 MICE IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 3	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 4	FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
TABLE 5	FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE

FIGURES

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

APPENDIXES

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

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX H 1	GROSS FINDINGS: SUMMARY, MOUSE: MALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX H 2	GROSS FINDINGS: SUMMARY, MOUSE: FEMALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX H 3	GROSS FINDINGS: SUMMARY, MOUSE: MALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX H 4	GROSS FINDINGS: SUMMARY, MOUSE: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX I 1	ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE: SUMMARY, MOUSE: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX I 2	ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE: SUMMARY, MOUSE: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX J 1	ORGAN WEIGHT: RELATIVE: SUMMARY, MOUSE: MALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX J 2	ORGAN WEIGHT: RELATIVE: SUMMARY, MOUSE: FEMALE (13-WEEK STUDY)
APPENDIX K 1	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, MOUSE: MALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX K 2	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, MOUSE: FEMALE: ALL ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX K 3	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, MOUSE: MALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX K 4	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, MOUSE: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX K 5	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, MOUSE: MALE: SACRIFICED ANIMALS (13-WEEK STUDY)
APPENDIX K 6	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, MOUSE: FEMALE: SACRIFICED ANIMALS (13-WEEK STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX L 1	IDENTITY AND IMPURITY OF p-NITROANISOLE IN THE 13-WEEK FEED STUDY
APPENDIX L 2	STABILITY OF p-NITROANISOLE IN THE 13-WEEK FEED STUDY
APPENDIX L 3	CONCENTRATION OF p-NITROANISOLE IN FORMULATED DIETS IN THE 13-WEEK FEED STUDY
APPENDIX L 4	STABILITY OF p-NITROANISOLE IN FORMULATED DIETS IN THE 13-WEEK FEED STUDY
APPENDIX M 1	METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS IN THE 13-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
APPENDIX N1	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（13週間試験）として、p-ニトロアニソールをマウスに13週間経口（混餌）投与し、その生体影響を検索した。

試験にはCrj:BDF₁マウスを用いた。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匹のマウスを用いた。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2500ppm、5000ppm、10000ppm及び20000ppmの4段階（公比2.0）の濃度に、30000ppmを加えた5段階の濃度を設定した。観察、検査項目は、一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、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。

13週間試験の結果、雌雄共に体重の低下または増加の抑制、血液学的検査結果として貧血が認められた。貧血に伴う病理組織学的所見として、脾臓の髄外造血、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。腎臓では腎障害を疑われる所見として尿pHの低下、血液生化学的検査で、尿素窒素の増加、血中電解質の濃度に変化が認められた。これらを考慮してがん原性試験の投与濃度を決定した。

雌雄の30000ppm群では、死亡がみられ、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20000ppm群においては雌では投与終了時における体重増加の抑制は認められず、雄では投与終了時における体重増加の抑制が認められたものの対照群の87%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雌雄ともに20000ppmが適当と思われた。また、20000ppm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、雌雄のがん原性試験の投与濃度は最高投与濃度を20000ppmとし、以下10000ppm、5000ppm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

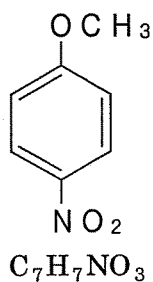
名 称： p-ニトロアニソール(p-nitroanisole)

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)



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 L 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 L 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 Crj:BDF₁ マウス(SPF)の雌雄を使用した。

マウス雌雄各 75 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(投与開始時体重範囲、雄:21.9～24.1g、雌:17.6～19.1g)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 週間定期解剖日前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(文献 4)の結果に基づき決定した。予備試験では投与濃度を雌雄とも 5000、10000、20000、40000 及び 50000ppm (公比 2.0) とし、2 週間連続投与(混餌投与)した。その結果、50000 及び 40000ppm では雌雄とも定期解剖までにすべての動物が死亡した。病理組織学的検査においては、胸腺の萎縮、脾臓の萎縮、骨髓の鬱血等消耗性の変化が雌雄ともに認められ、雄では肝臓の肝細胞中心性肥大、腎臓の近位尿細管直部壊死等もみられた。

20000ppm 及び 10000ppm 群では、黄色尿が投与開始後 3 日から投与期間を通して雌雄共に認められた。雄の 20000ppm 群で体重増加の抑制が認められたが、その他の群の投与終了時における体重は雌雄共に対照群と比較して大きな差は認められなかった。摂餌量についても、20000ppm 群の雄に一時的な低下がみられたが、他の投与群には対照群との間に顕著な差は認められなかった。病理組織学的検査で脾臓の髓外造血と肝細胞の中心性肥大が認められた。血液生化学的検査では GOT、GPT、総コレステロール及びリン脂質の増加が認められた。

これらの 20000ppm 以下の群においてみられた所見は薬物投与に対する適応的变化の範囲であると思われ、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、13 週間試験の投与濃度は 20000ppm、10000ppm、5000ppm 及び 2500ppm

の4段階(公比:2.0)の濃度を設定し、さらに、13週間試験の最大耐量は20000ppm以上と予想されるため、30000ppmを加えた合計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 L3に示した。

各群の調製濃度は設定濃度に対し、94.3~98.3%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 L4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)
2500ppm 群	10 匹 (1101~1110)	2500ppm 群	10 匹 (2101~2110)
5000ppm 群	10 匹 (1201~1210)	5000ppm 群	10 匹 (2201~2210)
10000ppm 群	10 匹 (1301~1310)	10000ppm 群	10 匹 (2301~2310)
20000ppm 群	10 匹 (1401~1410)	20000ppm 群	10 匹 (2401~2410)
30000ppm 群	10 匹 (1501~1510)	30000ppm 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 (111 室) に収容し、飼育室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

II-2-3 飼育条件

動物は全飼育期間を通して、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (実測値: $22.2 \sim 24.2^{\circ}\text{C}$ 、平均: $22.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 15\%$ (実測値: $53 \sim 63\%$ 、平均 $57 \pm 2\%$)、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。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連網ケージ: $112\text{W} \times 212\text{D} \times 120\text{H}$ 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。

なお、動物の死亡発見時にも体重を測定した。

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

定期解剖時まで生存した動物について、定期解剖日前日夕方より絶食し、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った。

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

II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、定期解剖日前日夕方より絶食し、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 M 1 に示した。

II-3-6 尿検査

投与最終週まで生存した動物について、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 M 1 に示した。

II-3-7 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について剖検を行った。

(2) 臓器重量

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位まで表示した。

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 N 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、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、欠測となったデータについては母数より除いた。

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

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

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、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

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。

30000ppm 群で、雄で 5 匹、雌で 7 匹死亡した。他の群には雌雄とも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。

雌雄の 20000ppm 以上の群で投与開始 1 週目（群構成後 2 週目）より、10000ppm 以下の投与群では投与開始 7 週目（群構成後 8 週目）より黄色尿が認められた。また、死亡した動物においては、立毛、円背位、糞小粒等の消耗を示す所見が散発的に認められた。

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。

雄の 10000ppm 以上の群では投与期間を通して体重の増加抑制傾向が認められた。雌では、30000 及び 20000ppm 群で投与開始から 5 週（群構成後 6 週目）までに体重の低値または体重増加の抑制が認められたが、それ以降は対照群と比較して差は認められなかった。その他の群では雌雄ともに対照群と比較して大きな差はなかった。

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。

30000ppm 群では、雄で投与期間初期に摂餌量の低値が認められたが、4 週目（群構成後 5 週目）以降については対照群と比較して大きな差は認められなかった。雌でも投与期間初期に摂餌量の低値を示す傾向が認められたが、投与開始から 6 週目以降（群構成後 7 週目）は対照群と比較して大きな差は認められなかった。その他の群では雌雄ともに対照群と比較して大きな差は認められなかった。

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 30000ppm 群:3.329~5.958g/kg、20000ppm 群:3.040~3.799g/kg、10000ppm 群:1.266~1.571g/kg、5000ppm 群:0.642~0.790g/kg、2500ppm 群:0.325~0.398g/kg、雌では 30000ppm 群:4.466~7.052g/kg、20000ppm 群:2.871~3.856g/kg、10000ppm 群:1.560~1.781g/kg、5000ppm 群:0.821~0.896g/kg、2500ppm 群:0.409~0.444g/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について表 1 に抜粋した。

表1 血液学的検査

	群(ppm)	対照群	2500	5000	10000	20000	30000
雄	動物数	10	9	10	9	10	5
赤血球数($10^6/\mu\text{L}$)	10.69 ± 0.28	10.76 ± 0.28	10.70 ± 0.30	10.49 ± 0.34	9.63 ± 0.36**	10.23 ± 0.38*	
ヘマトクリット値(%)	49.8 ± 1.3	49.9 ± 1.0	50.3 ± 1.5	49.4 ± 1.7	45.2 ± 1.6**	46.7 ± 1.2**	
MCV(fL)	46.6 ± 0.5	46.4 ± 0.5	47.0 ± 0.7	47.1 ± 0.7	46.9 ± 0.5	45.6 ± 0.6*	
MCH(pg)	14.5 ± 0.2	14.5 ± 0.3	14.6 ± 0.2	14.9 ± 0.3*	16.1 ± 0.4**	14.6 ± 0.3	
MCHC(g/dL)	31.1 ± 0.4	31.2 ± 0.5	31.1 ± 0.6	31.5 ± 0.4	34.2 ± 0.6**	31.9 ± 0.3*	
血小板数($10^3/\mu\text{L}$)	1368 ± 87	1382 ± 105	1369 ± 158	1456 ± 96	1514 ± 65*	1528 ± 95*	
雌	動物数	10	10	10	10	10	3
赤血球数($10^6/\mu\text{L}$)	11.05 ± 0.37	11.08 ± 0.26	10.89 ± 0.28	10.69 ± 0.37*	9.82 ± 0.24**	9.49 ± 0.16**	
ヘモグロビン濃度(g/dL)	16.0 ± 0.6	16.1 ± 0.4	16.0 ± 0.4	15.9 ± 0.5	15.3 ± 0.4*	14.2 ± 0.1**	
ヘマトクリット値(%)	50.7 ± 1.9	51.0 ± 1.4	50.0 ± 1.2	50.3 ± 1.4	46.8 ± 1.2**	43.5 ± 1.0**	
MCV(fL)	45.9 ± 0.5	46.0 ± 0.4	46.0 ± 0.8	47.0 ± 0.7**	47.7 ± 0.6**	45.8 ± 0.8	
MCH(pg)	14.5 ± 0.2	14.5 ± 0.2	14.2 ± 0.2	14.8 ± 0.3**	15.6 ± 0.2**	15.0 ± 0.2**	
MCHC(g/dL)	31.5 ± 0.5	31.6 ± 0.4	31.9 ± 0.6	31.6 ± 0.5	32.7 ± 0.3**	32.7 ± 0.5**	
血小板数($10^3/\mu\text{L}$)	1223 ± 77	1307 ± 120	1322 ± 92	1358 ± 102*	1385 ± 84**	1430 ± 15**	

有意差

*: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ ダンネット検定

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

雄では、20000ppm 以上の群で赤血球数、ヘマトクリット値の減少、MCHC と血小板数の増加が認められ、30000ppm 群で MCV の減少が認められた。その他、MCH 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。

雌では、10000ppm 以上の群で赤血球数の減少、MCH、血小板数の増加が認められ、20000ppm 以上の群でヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少、MCHC の増加が認めら

れた。その他、MCV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。

雌雄共に軽い貧血状態であったことが示唆された。

III-7 血液生化学的検査

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。

表2 血液生化学的検査

群(ppm)	対照群	2500	5000	10000	20000	30000
雄	動物数	10	10	10	10	5
総蛋白(g/dL)	4.7 ± 0.2	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.2**	5.1 ± 0.2**	5.4 ± 0.2**	5.8 ± 0.2**
アルブミン(g/dL)	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.1**	2.9 ± 0.1*	3.1 ± 0.1**	3.4 ± 0.1**
グルコース(mg/dL)	171 ± 23	172 ± 37	184 ± 28	183 ± 45	242 ± 52**	308 ± 47**
総コレステロール(mg/dL)	79 ± 10	81 ± 13	81 ± 6	103 ± 21	189 ± 17**	262 ± 17**
トリグリセリド(mg/dL)	52 ± 18	52 ± 31	45 ± 15	42 ± 19	82 ± 32*	65 ± 23
リン脂質(mg/dL)	172 ± 17	169 ± 23	164 ± 11	183 ± 31	293 ± 28**	387 ± 22**
GOT 活性(IU/L)	43 ± 6	44 ± 5	42 ± 4	45 ± 9	47 ± 7	137 ± 52**
GPT 活性(IU/L)	19 ± 3	19 ± 3	19 ± 3	24 ± 7	35 ± 10**	146 ± 57**
LDH (IU/L)	194 ± 29	209 ± 66	204 ± 47	269 ± 119	230 ± 52	386 ± 86**
ALP (IU/L)	130 ± 11	136 ± 10	139 ± 8	147 ± 20	177 ± 19**	285 ± 21**
γ-GTP (IU/L)	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	4 ± 2**
尿素窒素(mg/dL)	23.8 ± 3.6	26.0 ± 5.2	29.4 ± 5.4	32.2 ± 6.5**	30.7 ± 3.6*	31.8 ± 3.1*
ナトリウム(mEq/L)	151 ± 1	152 ± 1	152 ± 1	151 ± 1	150 ± 2	149 ± 1**
クロール(mEq/L)	123 ± 2	122 ± 3	122 ± 2	122 ± 2	120 ± 2*	116 ± 2**
カルシウム(mg/dL)	8.5 ± 0.5	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.2	8.7 ± 0.3	9.1 ± 0.2**	9.4 ± 0.1**
雌	動物数	10	10	10	10	3
総蛋白(g/dL)	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.2 ± 0.1**	5.7 ± 0.2**
アルブミン(g/dL)	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.4 ± 0.1**
A/G 比	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.0**	1.5 ± 0.1
グルコース(mg/dL)	147 ± 22	143 ± 18	159 ± 28	167 ± 25	226 ± 26**	261 ± 7**
総コレステロール(mg/dL)	77 ± 4	69 ± 9	81 ± 12	100 ± 7*	192 ± 17**	208 ± 12**
リン脂質(mg/dL)	160 ± 10	142 ± 22	158 ± 26	178 ± 12	313 ± 27**	347 ± 15**
GOT 活性(IU/L)	50 ± 5	52 ± 7	51 ± 8	50 ± 10	75 ± 18**	202 ± 97*
GPT 活性(IU/L)	19 ± 3	25 ± 15	20 ± 3	24 ± 6	47 ± 12**	182 ± 81**
LDH (IU/L)	188 ± 20	209 ± 30	203 ± 37	204 ± 57	225 ± 30*	405 ± 141**
γ-GTP (IU/L)	2 ± 2	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	7 ± 1**
尿素窒素(mg/dL)	18.1 ± 2.4	20.6 ± 2.5	20.9 ± 2.2	22.4 ± 2.5**	25.0 ± 4.0**	26.1 ± 2.1**
カリウム(mEq/L)	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4.7 ± 0.2	4.7 ± 0.4	4.2 ± 0.5**	5.4 ± 0.7
クロール(mEq/L)	121 ± 2	122 ± 1	122 ± 2	123 ± 2	120 ± 2	116 ± 2**
カルシウム(mg/dL)	8.8 ± 0.2	8.6 ± 0.2	8.8 ± 0.2	8.9 ± 0.2	9.2 ± 0.2**	9.5 ± 0.2**

有意差 *; p ≤ 0.05 **; p ≤ 0.01 ダンネット検定

雄では、5000ppm 以上の群で総蛋白とアルブミンの増加、10000ppm 以上の群で尿素窒素の増加、20000ppm 以上の群でグルコース、総コレステロール、リン脂質及びカルシウムの増加ならびに GPT 活性及び ALP 活性の上昇、クロールの減少が認められ、30000ppm 群で GOT 活性、LDH 活性及び γ-GTP 活性の上昇、ナトリウムの減少が認められた。その他、トリグリ

セライド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。

雌では、10000ppm 以上の群で総コレステロールと尿素窒素の増加、20000ppm 以上の群で総蛋白、グルコース、リン脂質及びカルシウムの増加ならびに GOT 活性、GPT 活性及び LDH 活性の上昇、30000ppm 群でアルブミンの増加、 γ -GTP 活性の上昇、クロールの減少が認められた。その他、A/G 比、カリウム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。

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。

雄の pH は、10000ppm 群までは投与濃度に対応した変化ではなかったが、20000ppm 以上の群では低下が認められた。

雌でも、20000ppm 以上の群で pH の低下傾向がみられた。

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 (全動物) と APPENDIX H 3, 4 (死亡・瀕死動物) に示した。

<投与期間中死亡例>

雌雄とも 30000ppm 群の死亡例の全例に胸腺の萎縮が観察された。

<定期解剖例>

雌雄とも対照群と投与群の全例に著変を認めなかった。

III-9-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量を APPENDIX I 1, 2、体重比を APPENDIX J 1, 2 に示し、統計学的に差を認めた所見について表 3 に抜粋した。

表3 臓器重量

群(ppm)		対照群	2500	5000	10000	20000	30000
雄	動物数	10	10	10	10	10	5
解剖日体重(g)		30.0 ± 1.9	29.2 ± 2.6	29.0 ± 2.5	27.6 ± 1.8*	26.0 ± 1.2**	23.2 ± 1.8**
実重量(g)							
精巣	0.195 ± 0.018	0.222 ± 0.015	0.226 ± 0.032	0.210 ± 0.045	0.218 ± 0.025	0.207 ± 0.023	
心臓	0.159 ± 0.018	0.149 ± 0.011	0.153 ± 0.012	0.151 ± 0.013	0.139 ± 0.013**	0.119 ± 0.009**	
肺	0.159 ± 0.009	0.157 ± 0.009	0.159 ± 0.014	0.159 ± 0.012	0.155 ± 0.005	0.140 ± 0.007**	
腎臓	0.412 ± 0.032	0.406 ± 0.030	0.420 ± 0.035	0.410 ± 0.027	0.385 ± 0.017	0.329 ± 0.021**	
脾臓	0.043 ± 0.005	0.045 ± 0.004	0.047 ± 0.003	0.051 ± 0.004*	0.092 ± 0.018**	0.057 ± 0.011*	
肝臓	1.078 ± 0.073	1.132 ± 0.076	1.178 ± 0.080	1.318 ± 0.100**	1.925 ± 0.214**	2.508 ± 0.287**	
脳	0.441 ± 0.019	0.441 ± 0.015	0.447 ± 0.022	0.453 ± 0.016	0.435 ± 0.012	0.424 ± 0.014	
体重比(%)							
精巣	0.652 ± 0.070	0.765 ± 0.064	0.783 ± 0.132*	0.758 ± 0.146	0.839 ± 0.094**	0.895 ± 0.130**	
心臓	0.530 ± 0.046	0.512 ± 0.027	0.529 ± 0.026	0.549 ± 0.041	0.535 ± 0.055	0.514 ± 0.031	
肺	0.531 ± 0.031	0.541 ± 0.039	0.550 ± 0.034	0.577 ± 0.032*	0.597 ± 0.033**	0.603 ± 0.046**	
腎臓	1.375 ± 0.109	1.396 ± 0.094	1.454 ± 0.119	1.488 ± 0.096	1.482 ± 0.076	1.419 ± 0.096	
脾臓	0.142 ± 0.013	0.154 ± 0.013	0.164 ± 0.012	0.183 ± 0.015**	0.352 ± 0.061**	0.245 ± 0.038**	
肝臓	3.590 ± 0.116	3.889 ± 0.227	4.067 ± 0.177	4.792 ± 0.431**	7.385 ± 0.631**	10.776 ± 0.670**	
脳	1.473 ± 0.092	1.517 ± 0.112	1.548 ± 0.131	1.646 ± 0.089**	1.673 ± 0.065**	1.830 ± 0.118**	
雌	動物数	10	10	10	10	10	3
解剖日体重(g)		20.5 ± 1.1	19.6 ± 0.7	20.2 ± 0.8	20.2 ± 0.5	20.5 ± 0.9	20.9 ± 0.9
実重量(g)							
脾臓	0.050 ± 0.006	0.046 ± 0.006	0.051 ± 0.005	0.055 ± 0.006	0.083 ± 0.011**	0.080 ± 0.008**	
肝臓	0.978 ± 0.061	0.823 ± 0.050	0.895 ± 0.048	0.980 ± 0.059	1.489 ± 0.127**	2.116 ± 0.121**	
体重比(%)							
脾臓	0.245 ± 0.023	0.234 ± 0.030	0.251 ± 0.020	0.271 ± 0.026	0.403 ± 0.044**	0.383 ± 0.026**	
肝臓	4.280 ± 0.153	4.198 ± 0.149	4.428 ± 0.224	4.841 ± 0.240**	7.265 ± 0.367**	10.136 ± 0.160**	

有意差 *; p ≤ 0.05 **; p ≤ 0.01 ダンネット検定

有意差 *; p ≤ 0.05 **; p ≤ 0.01 ダンネット検定

雄では肝臓と脾臓の実重量及び体重比の高値が 10000ppm 以上の群で認められた。その他、解剖時体重の低値に伴ったと思われる実重量の低値や体重比の高値が 5000ppm 以上の群で認められた。

雌では脾臓の実重量と体重比の高値が 20000ppm 以上の群で認められた。また、肝臓に実重量の高値が 20000ppm 以上の群、体重比の高値が 10000ppm 以上の群で認められた。

III-9-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を APPENDIX K 1, 2 (全動物)、APPENDIX K 3, 4 (死亡・瀕死例) 及び APPENDIX K 5, 6 (定期解剖例) に示した。また、脾臓、肝臓及び腎臓については定期解剖例の所見を表 4 に抜粋して示した。

表4 病理組織学的検査(定期解剖例)

群(ppm)		対照群	2500	5000	10000	20000	30000
動物数		10	10	10	10	10	5
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]	髓外造血	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	6 0 0 0 *	3 0 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	5 0 0 0 *	2 8 0 0 **	0 5 0 0 **
[腎臓]	空胞変性: 近位尿細管	7 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	1 0 0 0 *	0 0 0 0 **	0 0 0 0 **
雌							
動物数		10	10	10	10	10	3
[脾臓]	髓外造血	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	6 0 0 0 *	3 0 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	9 0 0 0 **	0 3 0 0 **
	両染色性小増殖巣	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 0 0 0	1 0 0 0

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

<死亡例・瀕死例>

雄では 30000ppm 群の死亡例 (5 例) に、胸腺と脾臓の萎縮(5 例)、骨髓の鬱血(4 例)及び精巢上体の精上皮系細胞の残屑(1 例)が観察された。

雌では 30000ppm 群の死亡例 (7 例) に胸腺と脾臓の萎縮(7 例)及び骨髓の鬱血(6 例)が観察された。

<定期解剖例>

雄では脾臓の髓外造血の発生が 20000ppm 以上の群で認められた。また、肝臓には肝細胞の中心性肥大が 10000ppm 以上の群でみられ、その程度は投与濃度が高い群ほど強かった。腎臓の近位尿細管の空胞変性は 10000ppm 以上の群で減少した。

雌では脾臓の髓外造血の発生が 20000ppm 以上の群で認められた。また、肝臓には肝細胞の中心性肥大が 20000ppm 以上の群でみられ、両染色性の小増殖巣が 20000ppm 群の 3 例と 30000ppm 群の 1 例に観察された。

IV 考察及びまとめ

<雄>

30000ppm 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が投与開始後 1 週目（群構成後 2 週目）より認められた。体重は、投与初期においては低下し、その後は増加の抑制が認められ、投与期間を通して対照群の 67～81%であった。摂餌量も投与期間前半に対照群と比較して低値を示した。特に、投与開始後 1 週目（群構成後 2 週目）は対照群の 53%であり、投与期間前半の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。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それを補う髄外造血が脾臓で認められた。また、腎障害を示唆する所見として、尿検査で pH の低下、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。肝臓の病理組織学的所見として肝細胞の中心性肥大が認められており、この変化は、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、肝重量の増加、総蛋白及びアルブミンの増加、GOT、GPT、LDH、ALP 及びγ-GTP 等の酵素活性の上昇傾向、総コレステロール及びリン脂質等の脂質の増加等、グルコースならびに総蛋白の増加が認められた。また、死亡動物については、すべてが投与開始から 4 週目（群構成後 5 週目）までに急激な体重の低下を伴って死亡した。一方、定期解剖まで生存した 5 匹も一度は死亡した動物と同様に投与開始後体重が低下したが、その後摂餌量が増加し、それに伴って体重も増加した。このことは、肝臓における p-ニトロアニソールまたはその代謝物の代謝酵素誘導との関連が示唆された。すなわち、肝臓において p-ニトロアニソールまたはその代謝物を無毒化して排泄するための代謝酵素を十分に誘導できた個体は急速に回復し、そうでなかった個体は衰弱し、死に至ったと考えられた。なお、死亡した動物の剖検及び病理組織学的所見はいずれも動物の消耗を示す所見であった。

20000ppm 群では一般状態の観察で黄色尿が投与開始後 1 週目（群構成後 2 週目）より認められた。体重は、投与開始 1 週目（群構成後 2 週目）に低下し、その後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。血液学的検査において貧血が認められ、病理組織学的検査で髄外造血が脾臓で認められた。また、尿検査で pH の低下、血液生化学的検査で尿素窒素の増加、クロール、カルシウム等の電解質に変化が認められた。肝臓の病理組織学的所見として肝細胞の中心性肥大が認められ、血液生化学的検査でも 30000ppm と同様の傾向を示した。

10000ppm 群では一般状態の観察で黄色尿が投与開始後 7 週目（群構成後 8 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 90%であった。血液学的検査において 20000ppm 群までみとめられた貧血は認められず、病理組織学的検査においても脾臓の髄外造血は認められなかった。血液生化学的検査で尿素窒素及び総蛋白の増加、病理組

組織学的で肝細胞の中心性肥大が認められた。

5000 及び 2500ppm 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が投与開始後 7 週目（群構成後 8 週目）より認められた。10000ppm 群以上で認められた体重増加の抑制は認められなかった。その他の検査では対照群と比較して大きな差は認められなかった。

<雌>

30000ppm 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が投与開始後 1 週目（群構成後 2 週目）より認められた。体重は、投与初期に低下し、その後投与開始から 4～5 週（群構成後 5～6 週）にかけて急激に増加したが、対照群と比較すると低い値を示した。投与後 6 週（群構成後 7 週）以降は対照群と比較して差は認められなかった。摂餌量は対照群と比較して投与期間を通して大きな差はなかった。血液学的検査において貧血が認められ、病理組織学的検査でそれを補うものと思われる髄外造血が脾臓で認められた。また、腎への影響を示す所見として、尿検査で pH の低下、血液生化学的検査で尿素窒素の増加、ならびにクロール、カルシウム等の電解質に変化が認められた。肝臓の病理組織学的所見として肝細胞の中心性肥大が認められており、この変化は、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る、肝重量の増加、総蛋白の増加、GOT、GPT、 γ -GTP 及び LDH 等の酵素活性の上昇傾向、総コレステロール及びリン脂質等の脂質の増加等、グルコースならびに総蛋白の増加等が認められた。また、死亡動物については、すべてが投与開始から 3 週目（群構成後 5 週目）までに急激な体重の低下を伴って死亡した。一方、定期解剖まで生存した 3 匹も一度は死亡した動物と同様に投与開始後体重が低下したが、その後摂餌量が増加し、それに伴って体重も増加した。このことは、肝臓における p-ニトロアニソールまたはその代謝物の代謝酵素誘導との関連が示唆された。すなわち、肝臓において p-ニトロアニソールまたはその代謝物を無毒化して排泄するための代謝酵素を十分に誘導できた個体は急速に回復し、そうでなかった個体は衰弱し、死に至ったと考えられた。なお、死亡した動物の剖検及び病理組織学的所見はいずれも、動物の消耗を示す所見であった。

20000ppm 群では一般状態の観察で黄色尿が投与開始後 1 週目（群構成後 2 週目）より認められた。体重は、投与開始 1 週目（投与開始後 2 週目）に低下したが、投与後 2 週（群構成後 3 週）以降は対照群と比較して差は認められなかった。摂餌量は対照群と比較して投与期間を通して大きな差はなかった。血液学的検査において貧血が認められ、病理組織学的検査で髄外造血が脾臓で認められた。また、腎臓への影響を示す所見として、尿検査で pH の低下、血液生化学的検査で尿素窒素の増加、ならびにカルシウムに変化が認められた。肝臓の病理組織学的所見として肝細胞の中心性肥大が認められ、臓器重量で肝重量の増加、血液生化学的検査で総蛋白の増加、GOT、GPT 及び LDH 等の酵素活性の上昇傾向、総コレステロール及びリン脂

質等の脂質の増加等、グルコースならびに総蛋白の増加等が認められた。また、この群でのみ認められた肝臓の両染色性小増殖巣は、前癌病変の1つと考えられている(文献6)。

10000ppm 群では一般状態の観察で黄色尿が投与開始後7週目(群構成後8週目)より認められた。体重及び摂餌量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それを補う脾臓での髄外造血は認められなかった。また、腎臓への影響を示す所見としては血液生化学的検査で尿素窒素の増加が認められたのみであった。20000ppm 群まで認められた肝細胞の中心性肥大は認められなかったが、肝重量の増加、総コレステロールの高値は認められた。

5000 及び 2500ppm 群では一般状態の観察で黄色尿が投与開始後7週目(群構成後8週目)より認められた。その他の検査では対照群と比較して大きな差は認められなかった。

13週間試験の結果、雌雄共に体重の低下または増加の抑制、血液学的検査結果として貧血、標的臓器として腎臓及び肝臓が考えられ、これらを考慮してがん原性試験の投与濃度を決定した。

雌雄の30000ppm 群では、死亡が認められ、がん原性試験の長期間の投与には、不适当と考えられた。その下の20000ppm 群においては雌では投与終了時における体重増加の抑制は認められず、雄では投与終了時における体重増加の抑制が認められたものの対照群の約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雌雄ともに20000ppm が适当と思われた。また、20000ppm 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。

以上より、雌雄のがん原性試験の投与濃度は最高投与濃度を20000ppm とし、以下10000ppm、5000ppmの3段階(公比:2.0)を設定した。

V 試験の信頼性に影響を及ぼしたと考えられる要素

試験計画書では、1998年11月6日より被験物質混合飼料による投与開始となる予定であった。しかし、前日の被験物質混合飼料の餌箱への充填作業者が誤って被験物質の混合されていない飼料を充填した。投与開始時の作業者は被験物質混合飼料と思いそのまま投与した。また、この事実は1998年11月12日に翌日からの飼料を餌箱に充填する作業者が、飼料冷蔵庫より調製済みの被験物質混合飼料を持ち出す際、残量が合わないことに気がついたことにより発覚した。この結果、被験物質の投与開始は1998年11月13日からとなり、被験物質投与開始予定日及び動物の投与開始週令が試験計画書から逸脱した。

そこで、当初の投与期間である13週間を確保するために、試験計画書を変更し、被験物質投与終了予定日及び病理解剖(定期)予定日をそれぞれ、1999年2月14日及び1999年2月15日とした。

以上のような試験計画書からの逸脱があったが、13週間の投与期間を確保することにより、本試験の主な目的であるがん原性試験の投与濃度決定のための十分なデータが得られると判断した。

VI 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) 日本バイアッセイ研究センター (2000)

p-ニトロアニソールのマウス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) 伊東信行 (1994)

最新毒性病理学 pp.162-163