

*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

試験番号：0361

CAS No. 100-17-4

2000年7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*-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

試験番号：0361

本 文

## 本文目次

	頁
要 約	1
I 試験材料	2
I－1 被験物質	2
I－1－1 名称	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 被験物質のロット等	2
I－3 被験物質の同一性・安定性	3
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	4
II－1 投与	4
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	4
II－1－3 被験物質の調製方法	4
II－1－4 調製被験物質の濃度測定	4
II－1－5 調製被験物質の安定性	4
II－1－6 被験物質の摂取量	5
II－2 動物管理	5
II－2－1 各群の使用動物数	5
II－2－2 群分け及び個体識別方法	5
II－2－3 飼育条件	6

II－3	観察・検査項目及び方法	6
II－3－1	動物の一般状態の観察	6
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	7
II－3－5	血液生化学的検査	7
II－3－6	病理学的検索	7
II－4	数値処理と統計処理	8
II－4－1	数値の取り扱いと表示	8
II－4－2	母数の取り扱い	8
II－4－3	統計処理	9
II－5	試資料の保管	9
III	試験成績	10
III－1	生死状況	10
III－2	一般状態	10
III－3	体重	10
III－4	摂餌量	10
III－5	被験物質摂取量	11
III－6	血液学的検査	11
III－7	血液生化学的検査	11
III－3	病理学的検査	12
III－3－1	剖検	12
III－3－2	臓器重量	12
III－3－3	病理組織学的検査	13
IV	考察及びまとめ	15
VI	文献	17

## TABLES

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

## FIGURES

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

## APPENDIXES

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



## APPENDIXES (CONTINUED)

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



## APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX K 1	IDENTITY AND IMPURITY OF p-NITROANISOLE IN THE 2-WEEK FEED STUDY
APPENDIX K 2	STABILITY OF p-NITROANISOLE IN FEEDING OF MICE IN THE 2-WEEK FEED STUDY
APPENDIX K 3	CONCENTRATION OF p-NITROANISOLE IN FORMULATED DIETS IN THE 2-WEEK FEED STUDY
APPENDIX K 4	STABILITY OF p-NITROANISOLE IN FORMULATED DIETS IN THE 2-WEEK FEED STUDY
APPENDIX L 1	METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY IN THE 2-WEEK FEED STUDY OF p-NITROANISOLE
APPENDIX M1	UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY IN THE 2-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）の予備試験として、p-ニトロアニソールをマウスに2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 Crj:BDF<sub>1</sub> 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 5 匹とし、合計 60 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2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 5000ppm、10000ppm、20000ppm 及び 40000ppm の 4 段階（公比 2.0）の濃度に、50000ppm 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、体重の測定、摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

2 週間の投与の結果、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、骨髄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 以下の群については、黄色尿が投与開始後 3 日から投与期間を通して雌雄共 10000ppm 以上の群で認められた。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。

従って、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。

## I 試験材料

## I - 1 被験物質の性状等

## I - 1 - 1 名称等

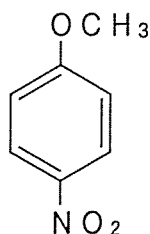
名 称 : P-ニトロアニソール(p-nitroanisole)

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 (20℃)

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 : 704S4061

製 造 元 : 関東化学株式会社

グ レード : 関東化学特級

純 度 : 99.7%(実測値)

### I - 3 被験物質の特性・同一性・安定性

#### I - 3 - 1 特性・同一性

被験物質の同一性の確認は被験物質のマススペクトル及び赤外吸収スペクトルを測定し、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）と同じ波長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 K 1 に示した。

#### I - 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は投与開始前及びその投与終了後に、ガスクロマトグラフによる分析を実施し、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 K 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)厚木飼育センター（所在地：神奈川県厚木市下古沢 795 番地）より導入した Crj:BDF<sub>1</sub> マウス(SPF)の雌雄を使用した。

マウス雌雄各 36 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 30 匹(投与開始時体重範囲、雄:22.7～24.9g、雌:16.9～18.8g)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、2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

雌雄とも 5000ppm、10000ppm、20000ppm 及び 40000ppm の4段階（公比 2.0）の濃度に、50000ppm を加えた5段階の濃度を設定した。

#### II - 1 - 3 被験物質の調製方法

被験物質を粉末飼料(オリエンタル酵母製 CRF-1)に混合し、50000ppm の混合飼料を作った。この混合飼料を更に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。また、被験物質混合飼料の調製は投与開始前日に行った。調製した被験物質飼料は、半量を投与開始1週目用とし室温で保管した。残りの半量は2週目用とし冷蔵保存した。

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 調製被験物質の濃度測定

各投与濃度に調製された被験物質混合飼料の濃度は、ガスクロマトグラフを用いて分析した。それらの結果を APPENDIX K 3 に示した。

各群の調製濃度は設定濃度に対し、98.2～102.0%であった。

#### II - 1 - 5 被験物質混合飼料中の被験物質安定性

調製した被験物質混合飼料について冷蔵及び室温で8日間の安定性を

それぞれ確認した。すなわち、50000ppm と 5000ppm に調製混合した被験物質混合飼料を調製直後と室温（動物飼育室）及び 5℃（冷蔵室）でそれぞれ 8 日間保管した後に被験物質混合飼料中の被験物質濃度をガスクロマトグラフによって分析した。その結果、各保管期間において被験物質混合飼料中の被験物質濃度に変化は認められず被験物質混合飼料中の被験物質は安定であった。

それらの結果について、APPENDIX K 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 5 匹の動物を用いた。

群 番 号	群 名 称	雄 使用動物数 (動物番号)	雌 使用動物数 (動物番号)
0	対 照 群	5 匹 (1001～1005)	5 匹 (2001～2005)
1	5000ppm 群	5 匹 (1101～1105)	5 匹 (2101～2105)
2	10000ppm 群	5 匹 (1201～1205)	5 匹 (2201～2205)
3	20000ppm 群	5 匹 (1301～1305)	5 匹 (2301～2305)
4	40000ppm 群	5 匹 (1401～1405)	5 匹 (2401～2405)
5	50000ppm 群	5 匹 (1501～1505)	5 匹 (2501～2505)

### II - 2 - 2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより群間の体重の偏りを小さ

くする群分け方法(適正層別方式)により実施した(文献 4)。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布した。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(103室)に収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

## II-2-3 飼育条件

動物は、各試験ともに、全飼育期間を通して、温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  (実測値:  $23.1\sim 23.7^{\circ}\text{C}$ 、平均:  $23.3\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ )、湿度  $55\pm 10\%$  (実測値:  $52\sim 62\%$ 、平均  $54\pm 1\%$ )、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。

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)(工場所在地: 千葉県千葉市美浜区新港 8-2)の CRF-1 を使用し、検疫期間は CRF-1 固型飼料(30KGy- $\gamma$  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- $\gamma$  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。

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、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、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ごとに入手し、飲料水については(財)食品薬品安全センターに分析を委託し、それぞれ異常のないことを確認した。

## II-3 観察・検査項目及び方法

### II-3-1 動物の一般状態の観察

1 日 1 回、動物の生死を確認し、一般状態の詳細な観察を投与開始直前(群構成時)、投与開始後 1、3、7、10 及び 14 日目に生存するすべての動物について行った。



## II - 3 - 2 体重測定

投与開始直前（群構成時）、投与開始後 1、3、7、10 及び 14 日目に生存する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、その差を給餌期間で除した値を 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、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 L 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、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 L 1 に示した。

## II - 3 - 6 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  $\text{g/kg}(\text{body weight})/\text{day}$  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 M 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。

#### 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。

#### 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、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。

雌雄の 50000 及び 40000ppm 群では全ての動物が投与開始後 3～11 日までに死亡した。他の群には雌雄とも動物の死亡例は認められなかった。

#### III-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1,2 に示した。

雌雄の 10000ppm 以上の全動物で黄色尿が認められた。その他、死亡した雌雄の 50000 及び 40000ppm 群では動物の消耗を伴って、糞少量、糞小粒、立毛、円背位等が認められた。雌の 20000ppm 群では投与前半に糞少量が認められた。

#### 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。

死亡した 50000 及び 40000ppm 群で投与開始から死亡するまで雌雄共に減少し続けた。雄の 20000ppm 群では投与開始翌日から 3 日まで体重が減少し、その後増加したが投与期間を通して対照群と比較して有意な低値であった。10000ppm 群では投与翌日に有意な低値を認めたが、その後増加し、定期解剖日には対照群と比較して差はなかった。雌の 20000ppm 群では投与開始翌日から 3 日まで体重が減少したが、その後増加し、定期解剖時の体重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。

死亡した雌雄の 50000 及び 40000ppm 群では投与開始から死亡するまで摂餌量の低値が認められた。雄の 20000ppm 群では投与開始翌日に顕著な低値が認められたが、その後増加し対照群と比較して大きな差は認められなかった。その他の雌雄の群においては、対照群と比較して大きな差はなかった。なお、本試験では動物の p-ニトロアニソールに対する忌避が特に

高投与群に多く認められ、それに伴い摂餌量にばらつきがみられた。

### 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 50000ppm 群：4.545g/kg、40000ppm 群：8.903g/kg、20000ppm 群：3.379～3.265g/kg、10000ppm 群：1.668～1.571g/kg、5000ppm 群：0.772～0.749g/kg、雌では 40000ppm 群：2.569g/kg、20000ppm 群：5.643～3.676g/kg、10000ppm 群：2.090～1.991g/kg、5000ppm 群：1.087～1.023g/kg であった。なお、50000ppm 群は早期に死亡したため算出できなかった。

### Ⅲ－６ 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX E 1,2 に示した。

雄では、全投与群で M C H の減少、20000ppm 群で M C V の減少が認められた。

雌では、特に変化はみられなかった。

### 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 1 に抜粋した。雄では、20000ppm 群で総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、総コレステロール及びカルシウムの増加、リン脂質の増加傾向、G O T 活性及び G P T 活性の上昇、C P K 活性の上昇傾向が認められた。

雌では、G P T 活性の上昇が 10000ppm 群と 20000ppm 群、総蛋白、アルブミン、総コレステロール、リン脂質の増加が 20000ppm 群で認められた。

表1 血液生化学的検査

	群(ppm)	対照群	5000	10000	20000	40000	50000
雄	動物数	3	5	5	5	0	0
総蛋白(g/dL)		4.8 ± 0.3	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.2	5.8 ± 0.2**	-	-
アルブミン(g/dL)		2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.4 ± 0.1**	-	-
総ビリルビン(mg/dL)		0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.02*	-	-
総コレステロール(mg/dL)		87 ± 13	86 ± 5	100 ± 12	225 ± 21**	-	-
GOT活性(IU/L)		37 ± 7	38 ± 2	38 ± 5	56 ± 10**	-	-
GPT活性(IU/L)		23 ± 6	24 ± 2	23 ± 5	53 ± 12*	-	-
カルシウム(mg/dL)		9.3 ± 0.1	9.6 ± 0.3	9.4 ± 0.2	9.9 ± 0.3**	-	-
雌	動物数	5	5	5	5	0	0
総蛋白(g/dL)		4.9 ± 0.2	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.3	5.6 ± 0.2**	-	-
アルブミン(g/dL)		3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.3 ± 0.1**	-	-
総コレステロール(mg/dL)		75 ± 12	76 ± 5	78 ± 41	202 ± 29**	-	-
リン脂質(mg/dL)		148 ± 14	151 ± 7	173 ± 14	325 ± 40**	-	-
GPT活性(IU/L)		27 ± 5	24 ± 4	35 ± 6*	41 ± 5**	-	-

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

## III - 3 病理学的検査

## III - 3 - 1 剖検

解剖時に観察された剖検所見のまとめを APPENDIX G 1～2 に示した。また、死亡・瀕死動物の解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX G 3～4 に示し、定期解剖例の解剖時に観察された所見を APPENDIX G 5～6 に示した。

## &lt;投与期間中死亡例&gt;

雄では 50000ppm 群に胸腺の萎縮(3/5 例)、40000ppm 群に胸腺の萎縮(4/5 例)が認められた。雌では 40000ppm 群に胸腺の萎縮(3/5 例)が認められた。

## &lt;定期解剖例&gt;

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

## III - 3 - 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 H 1～2、APPENNDIX I 1～2 に示し、統計学的に差を認めた臓器の実重量及び体重比を表 2 に抜粋した。

表2 臓器重量

群(ppm)	対照群	5000	10000	20000	40000	50000
雄	動物数	5	5	5	0	0
解剖日体重(g)	26.2 ± 0.7	25.5 ± 0.8	26.0 ± 0.8	24.1 ± 0.9**	-	-
実重量(g)						
心臓	0.144 ± 0.007	0.138 ± 0.003	0.137 ± 0.007	0.123 ± 0.002**	-	-
肺	0.162 ± 0.009	0.158 ± 0.006	0.159 ± 0.010	0.146 ± 0.009*	-	-
腎臓	0.403 ± 0.025	0.374 ± 0.008	0.368 ± 0.034	0.351 ± 0.013**	-	-
肝臓	1.410 ± 0.077	1.369 ± 0.116	1.607 ± 0.076**	2.037 ± 0.029**	-	-
体重比(%)						
心臓	0.550 ± 0.019	0.541 ± 0.025	0.527 ± 0.033	0.511 ± 0.021	-	-
肺	0.618 ± 0.025	0.619 ± 0.025	0.612 ± 0.039	0.604 ± 0.035	-	-
腎臓	1.537 ± 0.067	1.467 ± 0.063	1.419 ± 0.148	1.455 ± 0.054	-	-
肝臓	5.387 ± 0.382	5.371 ± 0.475	6.190 ± 0.351*	8.454 ± 0.272**	-	-
雌	動物数	5	5	5	0	0
解剖日体重(g)	19.0 ± 0.9	19.7 ± 0.4	20.1 ± 0.7	20.1 ± 1.0	-	-
実重量(g)						
肺	0.136 ± 0.008	0.149 ± 0.008*	0.149 ± 0.004*	0.140 ± 0.004	-	-
脾臓	0.061 ± 0.014	0.068 ± 0.005	0.083 ± 0.012	0.101 ± 0.025**	-	-
肝臓	0.879 ± 0.063	1.064 ± 0.135*	1.157 ± 0.104**	1.694 ± 0.103**	-	-
体重比(%)						
肺	0.714 ± 0.023	0.758 ± 0.032*	0.740 ± 0.022	0.696 ± 0.019	-	-
脾臓	0.323 ± 0.079	0.344 ± 0.023	0.414 ± 0.062	0.499 ± 0.105**	-	-
肝臓	4.628 ± 0.254	5.393 ± 0.616	5.770 ± 0.564**	8.424 ± 0.410**	-	-

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

雄では、10000ppm 群以上の群に肝臓の実重量と体重比の高値が認められた。

雌では、20000ppm 群は肝臓と脾臓の実重量と体重比の高値を示し、10000ppm 群では肝臓の実重量と体重比の高値と肺の実重量の高値を示した。5000ppm 群では肝臓の実重量の高値、肺の実重量と体重比の高値が認められた。

その他、雄の 20000ppm 群に解剖時体重の低値に伴ったと思われる実重量の低値が心臓、肺、腎臓に認められた。

### III - 3 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果のまとめを APPENDIX J 1～J 2 に示し、死亡・瀕死例(雌雄の 50000ppm 群と 40000ppm 群の全例)に観察された所見を APPENDIX J 3～J 4 に示し、定期解剖例に観察された所見を APPENDIX J 5～J 6 に示した。また、投与の影響があったと思われる所見については表 3(全動物)に抜粋した。



表3 病理組織学的検査

群(ppm)		対照群				5000				10000				20000				40000				50000			
動物数		5				5				5				5				5				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>
<b>雄</b>																									
[骨髓]																									
	鬱血	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
[胸腺]																									
	萎縮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0
[脾臓]																									
	萎縮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	1	0	4	0
	髓外造血	0	0	0	0	2	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	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	2	0	0	3	2	0	0
[腎臓]																									
	尿細管壊死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
[精巣上体]																									
	精上皮系細胞残屑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0

## &lt;投与期間中死亡例&gt;

雄では、50000ppm 群に骨髓の鬱血(3/5 例)、胸腺の萎縮(5/5 例)、脾臓の萎縮(5/5 例)、肝臓の肝細胞の中心性肥大(5/5 例)、腎臓の尿細管壊死(2/5 例)及び精巣上体の精上皮系細胞の残屑(2/5 例)が認められた。40000ppm 群に、骨髓の鬱血(2/5 例)、胸腺の萎縮(5/5 例)、脾臓の萎縮(5/5 例)、肝臓の肝細胞の中心性肥大(4/5 例)及び腎臓の尿細管壊死(1/5 例)が認められた。

雌では、50000ppm 群に骨髓の鬱血(3/5 例)、胸腺の萎縮(5/5 例)、脾臓の萎縮(5/5 例)、認められ、40000ppm 群には骨髓の鬱血(5/5 例)、胸腺の萎縮(5/5 例)、脾臓の萎縮(5/5 例)が認められた。

## &lt;定期解剖例&gt;

雄では、20000ppm 群に脾臓の髓外造血(5/5 例)と肝臓の肝細胞の中心性肥大(5/5 例)が認められ、10000ppm 群には脾臓の髓外造血(5/5 例)が認められ、5000ppm 群には脾臓の髓外造血(2/5 例)が認められた。

雌では、20000ppm 群に脾臓の髓外造血(5/5 例)と肝臓の肝細胞の中心性肥大(4/5 例)、10000ppm 群には脾臓の髓外造血(5/5 例)と肝臓の肝細胞の中心性肥大(1/5 例)、5000ppm 群には脾臓の髓外造血(1/5 例)が認められた。

その他、雌では肝臓に肉芽形成、腎臓に水腎症と乳頭の鉍質沈着が認められたが、これらは投与濃度に対応した発生を示していないことから投与の影響と考えなかった。

#### IV 考察及びまとめ

##### <雄>

p-ニトロアニソールの投与により、50000 及び 40000ppm では定期解剖までにすべての動物が死亡した。これらの群においては、投与開始から死亡するまで、体重が減少し、一般状態の観察では、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認められた。病理組織学的検査においては、肝臓の肝細胞中心性肥大、腎臓の近位尿細管直部壊死等がみられた。また、胸腺の萎縮、脾臓の萎縮、骨髄の鬱血等消耗性の変化も認められた。

20000ppm 群では、体重が投与開始 3 日まで減少し、その後増加したが定期解剖日まで体重増加の抑制が認められた。黄色尿は投与開始後 3 日から投与期間を通して認められた。病理組織学的検査で脾臓における髓外造血が認められたが、血液学的検査で MCV 及び MCH の低値が認められ p-ニトロアニソールが赤血球に対して影響を及ぼすことが示唆された。血液生化学的検査において、GPT 及び GOT 活性が上昇し、肝障害が疑われたが、それに呼応した病理組織学的所見は認められなかった。しかし、肝重量増加と肝細胞中心性肥大が認められたことより、p-ニトロアニソールの投与により肝臓の代謝機能が亢進していたことが考えられた。その他、血液生化学的検査において、総コレステロール及びリン脂質が増加傾向にあり、脂質の代謝異常が疑われた。

10000ppm 群では体重に大きな変化は認められなかった。黄色尿は投与開始後 3 日から投与期間を通して認められた。血液学的検査では MCH の低値が認められ病理組織学的検査では脾臓の髓外造血が認められた。また、肝臓重量の増加も認められたが病理組織学的検査では著変を認めなかった。

5000ppm 群では体重に大きな変化は認められなかった。10000ppm 群まで認められた黄色尿も認められなかった。血液学的検査では MCH の低値が認められ病理組織学的検査では脾臓の髓外造血が認められた。

##### <雌>

p-ニトロアニソールの投与により、50000 及び 40000ppm の定期解剖までにすべての動物が死亡した。これらの群においては、投与開始から死亡するまで、体重が減少し、一般状態の観察では、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認められた。病理組織学的検査においては、胸腺の萎縮、脾臓の萎縮、骨髄の鬱血等消耗性の変化が共通して認められた。

20000ppm 群では、体重は投与開始 3 日までは減少したが、その後増加し定期解剖時には対照群と比較して差はなかった。黄色尿は投与開始後 3 日から投与期間を通して認められた。病理組織学的検査で脾臓における髄外造血が認められ、脾臓重量の増加も認められたものの血液学的検査では大きな変化は認められなかった。また、雄と同様に肝臓での代謝機能の亢進に付随すると思われる肝重量の増加（病理組織学的検査）及び肝細胞の中心性肥大が認められたが、肝障害を疑う変化は血液生化学的検査での GPT 活性が上昇のみであった。その他、血液生化学的検査において、総コレステロール及びリン脂質が増加傾向にあり、脂質の代謝異常が疑われた。

雌の 10000ppm 群では、体重は対照群と比較して差は認められなかった。黄色尿は投与開始後 3 日から投与期間を通して認められた。病理組織学的検査で脾臓における髄外造血が認められが、血液学的検査では大きな変化は認められなかった。また、肝臓での代謝機能の亢進に付随すると思われる肝重量の増加（病理組織学的検査）及び肝細胞の中心性肥大が認められたが、肝障害を疑う変化は血液生化学的検査での GPT 活性が上昇のみであった。

5000ppm 群でも一般状態及び体重に著変は認められなかった。病理組織学的検査で脾臓における髄外造血も 1 例が認められたのみだった。肝臓重量の増加は認められたが、その他の検査には著変を認めなかった。

以上より、p-ニトロアニソールの投与による標的臓器として肝臓、腎臓及び血液が考えられた。

本試験の最高投与群の 50000 及び 40000ppm 群では雌雄の全例が死亡した。しかしながら、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にあると思われ、直ちに致命的となる毒性兆候とは考えられなかった。

従って、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 段階の投与濃度が適当であると考えた。

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. John 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.), pp.443
- 4) 阿部正信 (1968)  
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