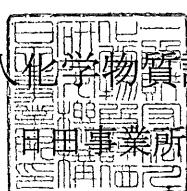


## 最終報告書

遺伝子発現量解析のための  
*p*-Nitroanisole のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

2015 年 3 月

一般財団法人 化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

一般財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

2015 年 3 月 26 日

試験責任者 寶珠山五月

## 目 次

	頁
1. 表 題 .....	4
2. 試験委託者 .....	4
3. 試験施設 .....	4
4. 試験目的 .....	4
5. 試験法 .....	4
6. GLP 基準 .....	4
7. 動物愛護 .....	5
8. 試験日程 .....	5
9. 試験責任者 .....	5
10. 試験関係者及び業務分担 .....	5
11. 試資料の保管 .....	6
12. 最終報告書の承認 .....	6
13. 要 約 .....	7
14. 試験材料 .....	8
14.1 被験物質 .....	8
14.2 媒 体 .....	9
14.3 使用動物 .....	9
14.4 飼育環境 .....	10
15. 試験方法 .....	10
15.1 被験物質の設定用量 .....	10
15.2 群構成 .....	11
15.3 投与液 .....	11
15.4 投 与 .....	12
15.5 一般状態観察 .....	12
15.6 詳細な一般状態観察 .....	12
15.7 機能検査 .....	13
15.8 体重測定 .....	13
15.9 摂餌量測定 .....	13
15.10 尿検査 .....	14
15.11 血液検査 .....	14
15.12 病理学的検査 .....	17
15.13 統計学的方法 .....	20
16. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因及び試験計画書からの逸脱 .....	20
17. 試験成績 .....	21
17.1 一般状態 .....	21
17.2 詳細な一般状態 .....	21
17.3 機能検査 .....	21

17.4 体 重 .....	21
17.5 摂餌量 .....	21
17.6 尿検査 .....	21
17.7 血液検査 .....	21
17.8 病理学的検査 .....	22
18. 考 察 .....	25
19. 参考文献 .....	26

#### Figures

1 Body weights.....	27
2 Food consumption .....	28

#### Tables

1 Summary of general clinical observations .....	29
2 Summary of detailed clinical observations.....	30
3 Summary of functional observations.....	34
4 Summary of body weights.....	35
5 Summary of food consumption .....	36
6 Summary of urinalyses.....	37
7 Summary of hematological examinations .....	40
8 Summary of blood chemical examinations .....	44
9 Summary of absolute organ weights .....	48
10 Summary of relative organ weights.....	52
11 Summary of macroscopic examinations.....	56
12 Summary of histopathological examinations .....	60

#### Appendices

1 General clinical observations of individual animals .....	66
2 Detailed clinical observations of individual animals.....	69
3 Functional observations individual animals .....	72
4 Body weights of individual animals.....	73
5 Food consumption of individual animals .....	85
6 Urinalytic data of individual animals .....	86
7 Hematological data of individual animals .....	92
8 Blood chemical data of individual animals .....	104
9 Absolute organ weights of individual animals .....	116
10 Relative organ weights of individual animals .....	128
11 Pathological findings of individual animals.....	140

## 1. 表 題

遺伝子発現量解析のための *p*-Nitroanisole のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

## 2. 試験委託者

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究第一部  
所在地 〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600 番地

## 3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所  
所在地 〒877-0061 大分県日田市石井町 3 丁目 822 番地

## 4. 試験目的

*p*-Nitroanisole をラットに 28 日間毎日反復経口投与したときに現れる生体の機能及び形態の変化を観察することにより、*p*-Nitroanisole の毒性を明らかにすることを目的とする。また、遺伝子発現量解析のための試料を採取する。

## 5. 試験法

以下の試験法を参考に実施した。

- a) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号、一部改正: 平成 24 年 4 月 2 日、薬食発 0402 第 1 号、平成 24・03・28 製局第 2 号、環保企発第 120402001 号) に定める「哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験」
- b) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 407, October 3, 2008, "Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents"

## 6. GLP 基準

適用しなかった。

## 7. 動物愛護

以下の法律、指針、基準等を参考に当試験施設が作成した「日田事業所動物実験に関する規程」に従って試験を実施した。

- a) 「動物の愛護及び管理に関する法律」(法律第 105 号、昭和 48 年)
- b) 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省、平成 18 年)
- c) 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(厚生労働省、平成 18 年)
- d) 「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(農林水産省、平成 18 年)
- e) 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省、平成 18 年)
- f) 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、平成 18 年)

## 8. 試験日程

試験開始日	2014 年 9 月 3 日
動物入荷日	2014 年 9 月 9 日
投与開始日	2014 年 9 月 18 日
1回投与後解剖日	2014 年 9 月 19 日
7日間投与後解剖日	2014 年 9 月 25 日
14日間投与後解剖日	2014 年 10 月 2 日
28日間投与後解剖日	2014 年 10 月 16 日
試験終了日	2015 年 3 月 26 日

## 9. 試験責任者

竇珠山 五 月 (所属 試験第二課)

## 10. 試験関係者及び業務分担

試験担当者 菊 池 純 一

(動物の検疫・馴化及び飼育管理、被験物質液の調製、投与、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、詳細な一般状態観察及び機能検査についての動物試験業務に対して責任を持つ)

病理検査責任者 大 嶋 浩

(剖検、組織採取、器官重量測定及び病理組織学的検査についての病理検査業務に対して責任を持つ)

臨床検査責任者 室 井 貴 子

(尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査についての臨床検査業務に対して責任を持つ)

11. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、その他の記録、標本及び被験物質は当試験施設に保管する。

保管期間は試験終了後 10 年間とする。なお、保管期間中の被験物質の安定性は確認しない。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

12. 最終報告書の承認

2015 年 5 月 26 日

試験責任者

寶珠山五月

### 13. 要 約

*p*-Nitroanisole の生物学的な影響及び遺伝子発現に及ぼす影響について検討する目的で、化審法テストガイドライン及びOECD テストガイドライン 407 を参考に 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。

5 週齢の雄の Crl:CD(SD)ラットにコーン油に溶解させた *p*-Nitroanisole を 1、7、14 又は 28 日間毎日強制経口投与した。投与用量は 0 (コーン油)、100 及び 500 mg/kg/day とし、1、7 及び 14 日間投与後に解剖するサテライト群には 1 群あたり 4 匹、28 日間投与群には 1 群あたり 5 匹を使用した。投与期間中は全例について一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行い、各投与期間終了後に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 混合ガス麻酔下で血液を採取した後解剖して、血液検査、病理学的検査及び遺伝子発現量解析のための試料採取を実施した。加えて、28 日間投与群については、投与期間中に詳細な一般状態観察及び機能検査を行い、最終投与日の翌日に尿を採取して尿検査を行った。

一般状態観察では、100 及び 500 mg/kg 群で流涎及び橙色尿、500 mg/kg 群で自発運動低下、呼吸数減少、半眼、鼻及び口周囲の汚れがみられた。

体重では、500 mg/kg 群で投与 3、7、14、21 及び 28 日目に低値がみられた。

摂餌量では 500 mg/kg 群で投与 3 日目に低値がみられた。

尿検査では 500 mg/kg 群で褐色尿がみられた。

血液学的検査では、500 mg/kg 群で 7 日間投与後から網状赤血球数比率及び単球比率の高値、白血球数の高値又は高値傾向、14 日間投与後から好中球比率の高値、MCHC 及びリンパ球比率の低値、28 日間投与後に赤血球数の低値、MCV 及びメトヘモグロビン比率の高値がみられた。

血液生化学的検査では、500 mg/kg 群で 1 回投与後に ALP の高値、1 回投与後から総ビリルビンの高値又は高値傾向、7 日間投与後から ALT の高値、28 日間投与後に  $\gamma$ -GTP の高値がみられた。

器官重量では、500 mg/kg 群で 1 回投与後から肝臓の絶対及び相対重量の高値、14 日間投与後から脾臓の絶対及び相対重量の高値、28 日間投与後に甲状腺の相対重量の高値がみられた。

剖検では、500 mg/kg 群で 1 回投与後に胃の餌による膨満及び腸間膜リンパ節の白色化、7 日間投与後に前胃の粘膜粗造部又は粗造化、7 日間投与後から肝臓の腫大及び脾臓の黒色化、14 日間投与後から脾臓の腫大、14 日間投与後に前胃の粘膜隆起部がみられた。

病理組織学的検査では、100 mg/kg 群で 28 日間投与後に脾臓の髄外造血亢進及び骨髓の赤芽球系細胞過形成、500 mg/kg 群で 1 回投与後に肝臓の小葉周辺性肝細胞グリコーゲン蓄積、1 回、7 及び 14 日間投与後に肝臓の核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴うびまん性肝細胞肥大、7 日間投与後に前胃の限局性扁平上皮過形成、粘膜下層の水腫及び細胞浸潤、びらん、14 日間投与後に前胃の限局性扁平上皮過形成、7 日間投与後から脾臓のうっ血、14 日間投与後から脾臓のヘモジデリン沈着及び髄外造血亢進、28 日間投与後に肝臓の核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴う小葉中心性肝細胞肥大及び小肉芽腫、骨髓の赤芽球系細胞過形成がみられた。

詳細な一般状態観察及び機能検査では被験物質投与による影響は認められなかった。

以上のとおり、本試験条件下において *p*-Nitroanisole の投与により、血液、肝臓及び消化管への毒性影響が認められた。

#### 14. 試験材料

##### 14.1 被験物質

###### a) 名称等

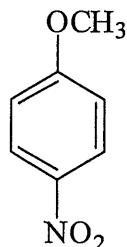
名 称	<i>p</i> -Nitroanisole
別 名	4-Nitroanisole
	1-Methoxy-4-nitrobenzene
CAS 番号	100-17-4

###### b) 製造元及びロット番号

製造元	東京化成工業
ロット番号	OEAAB

###### c) 構造式等

###### 構造式



分子式 C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>

分子量 153.14

###### d) 純度等

純 度 99.1% (GC)

被験物質は純度 100% として取り扱った。

###### e) 物理化学的性状

融 点 53.2°C

沸 点 274°C

常温における性状 わずかにうすい黄色～黄色の結晶固体

安定性 適切な条件下においては安定

###### f) 保管条件

遮光した気密容器に入れ、被験物質保管室のキャビネットにて室温（許容範囲 10～30°C）で保管した。

###### g) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設で実施した「*p*-Nitroanisole の安定性、被験物質液の安定性及び濃度確認試験」（試験番号 X02-0287、非 GLP 試験）において確認した。

独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物のスペクトルデータベース（Spectral Database for Organic Compounds: SDBS）から入手した赤外吸収スペクトルと当試験施設

において測定したスペクトルを比較することにより、被験物質の同一性を確認した。その結果、投与開始前に測定したスペクトルは SDBS から入手したスペクトルと同様であることが確認された。

また、投与開始前及び投与期間終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における被験物質の安定性を確認した。投与開始前と比較して投与期間終了後のスペクトルに変化は認められなかったことから、被験物質は保管期間中安定であったと判断した。

#### h) 取扱い上の注意

皮膚及び目への接触並びに吸入をさけるため、手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用した。

### 14.2 媒体

#### a) 名称

コーン油

#### b) 選択理由

被験物質液の調製法はコーン油を用いて検討した。その結果、約 65°C に加温して融解させた被験物質は、同様に加温したコーン油に 20.0 w/v% の濃度で溶解した。マグネットスターラーで攪拌しながら室温に戻すと、20.0 w/v% の被験物質液は懸濁液であったが、10.0 w/v% の被験物質液は溶液であった。また、被験物質液は調製後 7 日間の室温保管で色調の変化等の異常がみられなかったことから、コーン油を媒体として選択した。

#### c) 製造元、グレード、ロット番号及び保管

名称	製造元	グレード	ロット番号	保管場所	保管温度
コーン油	ナカライトスク	化学用 (CP)	V3T2547	試薬保管室	室温

### 14.3 使用動物

実験動物として確立された動物であり、一般毒性試験に汎用され、当試験施設においても背景データを保有している Crl:CD(SD)ラット (SPF) を日本チャールス・リバー日野飼育センターから入手した。

4 週齢の雄ラットを 55 匹入手し、1 ケージあたり 5 匹の群飼育で入荷 6 日後まで検疫・馴化を行った。さらに、投与開始 1 日前に相当する入荷 8 日後まで馴化し、すべての動物に異常がみられなかつたため、当日測定した体重を用いて体重層別無作為抽出法で群分けし、51 匹を試験に使用した。群分け後は投与開始まで個別飼育で馴化した。群分けにより外れた動物は試験から除外した。また、受入れから投与開始までは、一般状態及び排泄物を毎日 1 回以上観察した。

動物は、群分け前は尾部へ油性インクを塗布し、群分け後は耳鉗を付けて識別した。ケージにはラベルを付け、ラックは試験番号を表示してそれぞれ識別した。

投与開始時の動物の週齢は 5 週齢、体重範囲は 135.8～167.0 g であり、全例の体重が全體の平均体重±20% の範囲内であることを確認した。

#### 14.4 飼育環境

動物は、検疫・馴化期間中を含む全飼育期間を通して、温度 21~25°C、相対湿度 40~70%、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔（7 時点灯、19 時消灯）に設定したバリアーシステムの飼育室（検疫期間中は検疫室 1、検疫終了後は飼育室 3）に収容した。

ケージは、群分け前は W260×D380×H180 mm、群分け後は W165×D300×H150 mm のステンレス製金網床ケージを使用し、採尿時は W150×D200×H263 mm の代謝ケージを使用した。なお、金網床ケージ使用時にはトレイを併用した。

トレイは、検疫期間終了時及び群分け時に交換し、群分け後は週 2 回の頻度で交換した。さらに、動物を飼育室から解剖室に搬出する際にも交換した。なお、橙色尿がみられた動物については、尿の観察が出来るように、異常尿の確認時にも交換した。給餌器、ケージ及びラックは、群分け時に交換した。また、サテライト群（1、7 及び 14 日間投与群）については解剖室に搬出する際にもラックを交換した。

飼料は固型飼料 MF（ロット番号 140411 及び 140715、オリエンタル酵母工業）を、飲料水は日田市上水道水に給水末端での塩素濃度が 3~5 ppm となるように次亜塩素酸ナトリウム（ピューラックス）を添加した水を、それぞれ自由摂取させた。飼料及び飼育用器材はオートクレーブ滅菌（121°C、30 分間）したものを使い、それらをそれぞれ使用した。

飼料は、製造元から混入物の分析データを入手し、米国環境保護庁有害物質規制法の「飼料及び媒体の汚染物質限度」（1979）を参考に、当試験施設で定めた基準値内であることを確認したロットを使用した。

飲料水については、厚生労働省の「水質基準に関する省令」（厚生労働省令第 101 号）に準拠した水質検査を年 2 回の頻度で実施しており、動物入荷前に入手した検査結果及び最終報告書作成までに入手した検査結果が、同省令の基準を満たしていることを確認した。

### 15. 試験方法

#### 15.1 被験物質の設定用量

用量設定試験として、当試験施設で「*p*-Nitroanisole のラットにおける 7 日間反復経口投与毒性試験」（試験番号 P12-0123、非 GLP 試験）を実施した。用量設定試験ではコーン油で調製した被験物質液を、各群 3 匹の 5 週齢の Crl:CD(SD)雄ラットに 0、250、500 及び 1000 mg/kg/day の用量で 7 日間毎日投与した。投与期間中は一般状態観察及び体重測定を行い、最終投与 1 日後に剖検及び器官重量測定を行った。その結果、250 mg/kg 以上の群で橙色尿、肝臓の相対重量高値及び腫大、500 mg/kg 以上の群で被毛の汚れ、下腹部の汚れ、脾臓の黒色化、1000 mg/kg 群で自発運動低下、呼吸数減少、半眼、腹臥位及び摂食不良等の毒性症状、体重減少及び低値、腎臓の相対重量高値、肝臓の褐色化、胸腺の小型化がみられ、溶血性貧血並びに肝臓及び腎臓への影響が示唆された。1000 mg/kg 群では死亡はみられなかったものの種々の毒性症状が観察され、体重減少や肝臓の著しい腫大がみられたことから、1000 mg/kg/day の用量で 28 日間反復投与すると瀕死や死亡等の重篤な毒性影響が発現する可能性があると考えた。

したがって、本試験では 500 mg/kg/day を高用量とし、低用量として 100 mg/kg/day を設定した。

## 15.2 群構成

被験物質投与群として2用量群を設けた他、媒体のみを投与する媒体対照群を設定した。また、媒体対照群及び各用量群に、1、7及び14日間投与後に解剖するサテライト群を設けた。以下、媒体対照群は対照群と記載する。

サテライト群の投与期間中の観察及び測定データは28日間投与群に含めて取り扱った。

試験群	投与用量 (mg/kg/day)	投与容量 (mL/kg)	被験物質液 濃度(w/v%)	動物数 (動物番号)
媒体対照 (1回投与)	0	5	0	4(1 - 4)
媒体対照 (7日間投与)	0	5	0	4(5 - 8)
媒体対照 (14日間投与)	0	5	0	4(9 - 12)
媒体対照 (28日間投与)	0	5	0	5(13 - 17)
被 験 物 質	低用量 (1回投与)	100	5	2.00 4(18 - 21)
	低用量 (7日間投与)	100	5	2.00 4(22 - 25)
	低用量 (14日間投与)	100	5	2.00 4(26 - 29)
	低用量 (28日間投与)	100	5	2.00 5(30 - 34)
	高用量 (1回投与)	500	5	10.0 4(35 - 38)
	高用量 (7日間投与)	500	5	10.0 4(39 - 42)
	高用量 (14日間投与)	500	5	10.0 4(43 - 46)
	高用量 (28日間投与)	500	5	10.0 5(47 - 51)

## 15.3 投与液

### a) 被験物質液の調製及び保管

調製に先立ち被験物質及びコーン油を60~70°Cのウォーターバスで加温した。融解した被験物質を秤量し、コーン油を加えて攪拌した後に、コーン油を加えて定容し、10.0 w/v%の被験物質液を調製した。さらに、10.0 w/v%の被験物質液の一部を採取し、コーン油を加えて希釈し、2.00 w/v%の被験物質液を調製した。なお、各濃度の被験物質液はマグネチックスターで攪拌しながら室温に戻した。

調製した各濃度の被験物質液及び投与に用いる媒体は蓋付きプラスチック容器にそれぞれ小分けし、試薬保管室のキャビネットにて室温（許容範囲10~30°C）で保管した。被験物質液は調製後17日以内に使用した。

小分け保管した各濃度の被験物質液及び媒体は、各投与日に投与に必要な個数を保管場所から取り出し、飼育室まで室温で運搬し投与に用いた。

### b) 被験物質液の安定性の確認

10.0及び0.100 w/v%の被験物質液の室温保管での安定性を、当試験施設においてX02-0287で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により確認した。

室温保管で調製19日後に測定した被験物質濃度が、調製直後の測定濃度に対し10.0及び0.100 w/v%の被験物質液とともに100%であったことから、保管条件下で18日間安定であることが確認された。

c) 投与に用いる被験物質液の濃度確認

初回に調製した 10.0 及び 2.00 w/v% の被験物質液の調製直後の濃度を、当試験施設において X02-0287 で HPLC により確認した。

測定した被験物質濃度が設定値に対し 10.0 及び 2.00 w/v% の被験物質液でそれぞれ 103% 及び 98.5% と  $100 \pm 10\%$  以内であったため、適切に調製できたと判定して投与に用いた。

#### 15.4 投与

1、7、14 又は 28 日間毎日 1 回、強制経口投与した。投与は 9:15～11:14 に行った。

投与にはネラトンカテーテル（テルモ）を取り付けた注射筒（テルモ）を用い、測定した最新の体重を基に、5 mL/kg で投与した。

#### 15.5 一般状態観察

投与期間中は毎日 3 回（投与前、投与直後～1 時間後、投与 2～6 時間後）、生死を含む一般状態を観察した。

#### 15.6 詳細な一般状態観察

28 日間投与群について、投与開始前に 1 回、投与開始後は週 1 回の頻度で次表の項目を観察した。投与開始後の観察は動物に乱数（検査動物番号）を割付け、動物の並び替えを行った後、試験群が判別できない状態（盲検法）で行った。

ケージから取り出す際の反応	ケージに手を入れてから、動物をケージ外に取り出すまでの反応（出し易さ及び発声）を、スコアリング法で評価
手にとっての詳細な観察	筋緊張及び体温低下の有無、被毛の状態（立毛、毛の汚れ及び被毛粗剛）、皮膚及び粘膜の色（蒼白、発赤及びチアノーゼ）、眼の異常（流涙、眼球突出及び瞳孔径）、流涎及び分泌物の有無を観察
アリーナ内での行動の観察	動物を 90 cm×60 cm の観察台上に 1 分間以上（5 分以内）置き、姿勢、活動性、呼吸、歩行の状態、眼瞼閉鎖、振戦・攣縮・痙攣、常同行動及び異常行動の有無を観察 1 分間の排糞回数（糞の数）及び排尿回数（尿のプール数）を測定

### 15.7 機能検査

28日間投与群について、投与4週目（投与23日目）に1回、次表の項目を検査した。反応性及び握力は詳細な一般状態観察と同様に試験群が判別できない状態で検査した。

反応性	視 覚	顔面前約3cmにボールペンの鞘を近づけ、4秒間保持したときの反応をスコアリング法で評価
	聴 覚	頭上で指を鳴らしたときの反応をスコアリング法で評価
	痛 覚	洗濯バサミで尾の1/3尾根部側を挟んだときの反応を観察
	瞳孔反射	眼を手で覆った後、瞳孔に光を当てたときの反応の有無を観察
	空中正向反射	約30cmの高さから、動物の腹部を上にした状態で落としたときの異常反応の有無を観察
握 力	握力メータ FGC-2（メイティス）を用い、前肢及び後肢の握力を2回測定し、平均値で評価	
自発運動量	ラット用運動量測定装置 ACTIMO-10（シンテクノ）を用い、動物の運動量を1時間（10分間隔で6回）測定し、赤外線（42.6cm×26.5cmの範囲を縦横5cm間隔で発生）を横切った回数で評価	

### 15.8 体重測定

全例について、電子上皿天秤（ザルトリウス）を用い、下記の日に体重を測定した。

- ・群分け日
- ・投与1、3、7、14、21及び28日目
- ・各試験群の解剖日（飼育室からの搬出前、絶食状態）

### 15.9 摂餌量測定

7、14及び28日間投与群について、電子上皿天秤（ザルトリウス）を用い、下記の日に餌重量を測定した。

- ・群分け日の給餌量
- ・投与1、3、7、14、21及び28日目の残餌量

投与7、14及び21日目には残餌量測定後に餌を補充し、補充後の給餌量を測定した。

測定した給餌量と残餌量から各測定日間での1日平均摂餌量を求めた。なお、各測定日に絶食を行う動物については残餌量のみを測定し、餌の補充及び給餌量の測定は行わなかった。

## 15.10 尿検査

### a) 採尿

28日間投与群について、投与1週目に自然排尿又は膀胱圧迫により新鮮尿を採取した。また、投与28日目の午後に代謝ケージに動物を収容し、自由飲水及び絶食状態で翌日までの約16時間の蓄積尿を採取した。

### b) 検査項目及び方法

新鮮尿について、試験紙法によりウロビリノーゲンの検査を行った。また、採取した蓄積尿を用い次表の項目を測定した。なお、尿沈渣は対照群及び高用量群を検査した結果、高用量群で被験物質の投与に関連した変化が認められなかつたため、低用量群については検査を行わなかつた。

項目	方法	機器
尿量 (Urine volume)	メスシリンドーによる計量	—
色調 (Color)	肉眼観察	—
濁り (Turbidity)		—
尿浸透圧 (Uosm)	冰点降下法	A
pH		
蛋白 (Protein)	試験紙法	
ケトン体 (Ketones)	(試験紙にはラブスティックス(シーメンス)を使用)	—
糖 (Glucose)		
潜血 (Occult blood)		
尿沈渣 (Urinary sediment)	Sternheimer 変法	B

使用機器 A: 自動浸透圧計 OM-6040 (アーレイ)

B: システム生物顕微鏡 BX41 (オリンパス)

## 15.11 血液検査

### a) 採血及び検査試料

各試験群について最終投与日の午後から絶食し、翌日（絶食開始16～20時間後）、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>混合ガス(CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>混合比=4:1)麻酔下で腹部大動脈から次表のとおり採血し、検査試料を作製した。なお、サテライト群については血漿の試料作製は行わなかつた。また、28日間投与群については、パクスジーン RNA 採血管（日本ベクトン・ディッキンソン）を用いて血液を採取し転倒混和し、室温で2時間以上静置後、-20°Cで24時間保管した。その後、-80°Cで保管し、ドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。

検査試料	作製方法
全 血	EDTA-2K 添加採血びん SB-41 (ロット番号 G2030、シスメックス) で採血した血液
血 漿	くえん酸三ナトリウム二水和物 (ロット番号 CTR6101、和光純薬工業) の3.2w/v%水溶液を100μL添加したガラス製試験管で採血し、遠心分離(3000 r.p.m.×10 mins)して得た血漿
血 清	ガラス製試験管で採血し遠心分離(3000 r.p.m.×10 mins)して得た血清

b) 血液学的検査

全血及び血漿を用い次表の項目を測定した。さらに、28日間投与群については、全血を用いて Van Assendelft 法によるメトヘモグロビン比率 (Met Hb) の測定を行った。メトヘモグロビン比率の測定には紫外可視分光光度計 U-2910 (日立ハイテクノロジーズ) を用いた。サテライト群についてはメトヘモグロビン比率、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の測定は行わなかった。また、すべての項目について機器測定できたため、全血を用いた塗抹標本は作製しなかった。

項目	方法	機器
赤血球数 (RBC)	暗視野板法	C
ヘモグロビン濃度 (Hb)	シアンメトヘモグロビン法	
ヘマトクリット値 (Ht)	$\frac{RBC \times MCV}{10^3}$	
平均赤血球容積 (MCV)	暗視野板法	
平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	$\frac{Hb}{RBC} \times 10^3$	
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)	$\frac{Hb}{RBC \times MCV} \times 10^5$	
血小板数 (Platelet)	暗視野板法	
網状赤血球数比率 (Reticulo)	RNA 染色法	
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー法	
白血球百分率 (Differentiation of leukocyte) 好中球 (Neutro) 、 リンパ球 (Lymph) 好酸球 (Eosino) 、 好塩基球 (Baso) 単球 (Mono) 、 大型非染色球 (LUC)	フローサイトメトリー法	
プロトロンビン時間 (PT)	粘度変化感知方式	D
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	粘度変化感知方式	

検査試料 C には全血、D には血漿を使用

使用機器 C: 総合血液学検査装置 ADVIA 120 (シーメンス)

D: 全自動血液凝固線溶測定装置 STA Compact (ロシュ・ダイアグノスティックス)

## c) 血液生化学的検査

血清を用いて次表の項目を測定した。サテライト群についてはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリ性 fosfataーゼ、尿素窒素、クレアチニン及び総ビリルビンを測定し、その他の項目は測定しなかつた。

項目	方 法	機器
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	UV 法 JSCC 標準化対応法	E
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	UV 法 JSCC 標準化対応法	
アルカリ性 fosfataーゼ (ALP)	p-Nitrophenyl phosphate 法	
コリンエステラーゼ (ChE)	Butyrylthiocholine iodide 法	
γグルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GTP)	L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 法	
総コレステロール (T-Chol)	COD・ESPAS 法	
トリグリセリド (TG)	GPO・ESPAS グリセロール消去法	
尿素窒素 (BUN)	Urease・GIDH 法	
クレアチニン (Creatinine)	Creatininase・F-DAOS 法	
総蛋白 (T-Protein)	Biuret 法	
アルブミン (Albumin)	Bromocresol green 法	
A/G 比 (A/G ratio)	Albumin T - Protein - Albumin	—
血糖 (Glucose)	Hexokinase・G-6-PDH 法	E
総ビリルビン (T-Bil)	酵素法	
総胆汁酸 (TBA)	酵素サイクリング法	
無機リン (IP)	Fiske-Subbarow 法	
カルシウム (Ca)	OCPC 法	
ナトリウム (Na)	Crown-Ether 膜電極法	F
カリウム (K)	Crown-Ether 膜電極法	
塩素 (Cl)	MO 膜法	

使用機器 E: 生化学自動分析装置 7170 形 (日立製作所)

F: 電解質分析装置 PVA-EX II (A&T)

## 15.12 病理学的検査

### a) 剖 検

各試験群について最終投与日の翌日のいずれも採血後に、動物を腹部大動脈から放血して安樂死させ、体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔及び骨盤腔とその内容について肉眼的観察を行った。

### b) 組織採取及び器官重量測定

#### (a) サテライト群

1、7 及び 14 日間投与群について、剖検時に次表の器官・組織を採取した。

分 類	器官・組織
消化器系	胃#、肝臓*
心・血管系	心臓*
泌尿器系	腎臓*
生殖器系	精巣*、精巣上体*、腹葉前立腺*、背側葉前立腺*
神経系	脳*（大脳、小脳及び橋を含む）
造血器系	骨髓（大腿骨）、腸間膜リンパ節#、脾臓*、胸腺*
内分泌系	下垂体*、甲状腺*（上皮小体を含む）、副腎*

#No. 1 及び No. 2 を除く。

胃は 10% 中性緩衝ホルマリン液を注入して同液に浸漬した後、内容物を水洗除去した。

甲状腺以外の「\*」を付した器官は、固定液又は保存液に浸漬する前に電子天秤（ザルトリウス）で重量を測定した。腎臓、精巣及び精巣上体は左右を別々に測定し、左右の合計を算出した。副腎は左右をまとめて測定した。背側葉前立腺は尿道の一部を含めて測定した。甲状腺は上皮小体を含めて気管から分離せずに 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、翌日、左右の葉を気管から分離して重量を測定した。重量を測定した器官については、解剖日に測定した体重を基に相対重量も算出した。

## (b) 28日間投与群

剖検時に次表の器官・組織を採取した。

分類	器官・組織
呼吸器系	気管、肺
消化器系	顎下腺、胃、腸（十二指腸から直腸、パイエル板を含む）、脾臓、肝臓*
心・血管系	心臓*
泌尿器系	腎臓*、膀胱
生殖器系	精巣*、精巣上体*、腹葉前立腺*、背側葉前立腺*、精嚢*（凝固腺を含む）
神経系	脳*（大脳、小脳及び橋を含む）、脊髄、坐骨神経
造血器系	骨髓（大腿骨）、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓*、胸腺*
内分泌系	下垂体*、甲状腺*（上皮小体を含む）、副腎*
感覚器	眼球
筋・骨格系	骨格筋（大腿部）、骨（大腿骨）
皮膚・付属器	乳腺

気管、肺及び膀胱は10%中性緩衝ホルマリン液を注入後に採取し、胃及び腸は10%中性緩衝ホルマリン液を注入して同液に浸漬した後、内容物を水洗除去した。

甲状腺以外の「\*」を付した器官は、固定液又は保存液に浸漬する前に電子天秤（ザルトリウス）で重量を測定した。腎臓、精巣及び精巣上体は左右を別々に測定し、左右の合計を算出した。副腎は左右をまとめて測定した。背側葉前立腺は尿道の一部を含めて測定した。精嚢は凝固腺を含めて起始部を糸で結紮して採取し、重量を測定した。甲状腺は上皮小体を含めて気管から分離せずに10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、翌日、左右の葉を気管から分離して重量を測定した。重量を測定した器官については、解剖日に測定した体重を基に相対重量も算出した。

### c) 組織の固定及び保存

採取した器官・組織は、以下のように固定及び保存した。

肝臓は、重量を測定後、外側左葉の中央部から（門脈側とその反対側を結ぶ対角線に沿って）2~3 mm 幅の組織片 4 枚を採取し、遺伝子発現量解析用に供した。2 枚ずつの重量が 1.5 g 以下であることを確認後、それぞれ重量の 5 倍量以上の *RNAlater*® (Ambion, Inc.) に浸漬させた。1.5 g を超える場合は組織片の両端を切除し調節した。右葉は氷冷後、-80°C で保存した。外側左葉の遺伝子発現量解析用部位の採取後の残り部分及び残りの葉を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

腎臓は、左右別々に重量を測定後、右側の中央部から乳頭を含むように横断で 4~5 mm 幅の組織片を採取した。組織片から被膜を取り除いた後、正中で二分した。半分を幅 3 mm 以内に細切り *RNAlater* に浸漬した。残りの半分から乳頭、髓質内帯、髓質外帯及び皮質を分けてサンプリングし、それぞれ *RNAlater* に浸漬した。残りの部分は氷冷後、-80°C で保存した。左側は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、左右いずれかのみに病変が認められた場合は、病変部を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、反対側を遺伝子発現量解析及び-80°C 凍結保存に供した。

精巣は、左右別々に重量を測定後、右側を 4 分割し、組織片の半分を *RNAlater* に浸漬した。残りの半分は氷冷後、-80°C で保存した。左側は変法デビットソン液で固定した。

精巣上体は、重量を測定後、左右とも変法デビットソン液で固定した。

腹臍前立腺は、重量測定後、正中で二分し、一方を *RNAlater* に浸漬した。残りは 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

脳は、重量を測定後、氷冷したメタカーン液（メタノール:クロロホルム:酢酸混合比=6:3:1）に浸漬した。氷冷下で 5 時間振とうした後、無水エタノールに交換した。さらに氷冷下で振とうしながら、1 時間おきに 2 回、無水エタノールを交換した。氷冷下で一晩振とうした後、無水エタノールを再度交換し 4°C で保存した。保存した試料は保冷剤を同封して東京農工大学に送付した。

下垂体は、重量を測定後、*RNAlater* に浸漬した。

*RNAlater* に浸漬した各組織は *RNAlater* を組織に浸潤させるため、4°C で 24 時間放置した後、*RNAlater* に浸漬させたまま-80°C で凍結し、ドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。-80°C 凍結保存した組織についてはドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。

その他の器官・組織は、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

d) 病理組織学的検査

(a) サテライト群

1、7及び14日間投与群の対照群及び高用量群について、胃（No. 1及びNo. 2を除く）、肝臓、腎臓、精巣、前立腺、骨髓（大腿骨）、腸間膜リンパ節（No. 1及びNo. 2を除く）、脾臓、胸腺のパラフィン包埋薄切片を作製し、ヘマトキシリノ・エオジン（HE）染色後、光学顕微鏡的に検査した。骨髓（大腿骨）は切り出し前に10%蟻酸・ホルマリン液による脱灰を行った。また、1回投与群では肝臓、7及び14日間投与群では胃、肝臓及び脾臓に、高用量群で被験物質の投与に関連した変化が疑われたため、低用量群についても当該器官・組織の病理組織学的検査を行った。さらに、肉眼的病変部として1回投与群の低用量群の1例（No. 20）の腎臓及び7日間投与群の低用量群の1例（No. 23）の精巣について検査を行った。

このほか、1回投与群の肝臓で高用量群のHE染色標本において肝細胞の空胞化が認められ、グリコーゲンの蓄積が疑われたことから、対照群の1例（No. 1）及び高用量群の2例（No. 36及びNo. 37）についてPAS反応による検査を行った。

(b) 28日間投与群

対照群及び高用量群について、脳及び下垂体を除いて採取したすべての器官又は組織のパラフィン包埋薄切片を作製し、HE染色後、光学顕微鏡的に検査した。骨及び骨髓（大腿骨）は切り出し前に10%蟻酸・ホルマリン液による脱灰を行った。また、高用量群で肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、骨髓及び脾臓に被験物質の投与に関連した変化が疑われたため、低用量群についても当該器官・組織の病理組織学的検査を行った。

このほか、高用量群の脾臓のHE染色標本において褐色色素が認められ、ヘモジデリンの沈着が疑われたことから、対照群及び高用量群の各1例（No. 15及びNo. 49）についてベルリン青染色による検査を行った。さらに、高用量群の腎臓のHE染色標本において硝子滴が認められ、 $\alpha$ 2u-グロブリンとの関連性を検討する必要があったため、対照群及び高用量群の各1例（No. 15及びNo. 51）について抗 $\alpha$ 2u-グロブリン抗体による免疫組織化学的検査を行った。

### 15.13 統計学的方法

体重、摂餌量、握力、自発運動量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿量、尿浸透圧及び器官重量の成績については、Bartlett法による等分散検定を行い、5%有意水準で等分散が認められた場合は、Dunnett法による検定を行った。等分散が認められない場合はノンパラメトリックのDunnett法による検定を行った。排糞回数（糞の数）及び排尿回数（尿のプール数）はノンパラメトリックのDunnett法による検定を行った。

### 16. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因及び試験計画書からの逸脱

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因及び試験計画書からの逸脱は認められなかった。

## 17. 試験成績

### 17.1 一般状態 (Table 1, Appendix 1)

500 mg/kg 群で流涎、橙色尿及び自発運動低下が 13 例、呼吸数減少が 12 例、半眼が 11 例、鼻及び口周囲の汚れが 4 例、顔の被毛の汚れ及び腹部の脱毛が各 1 例で観察された。自発運動低下は投与 1 日目から、呼吸数減少及び半眼は投与 2 日目から、橙色尿は投与 3 日目から発現し、いずれも投与期間を通して散発的又は継続的にみられた。流涎は投与 3 日目からほぼ継続して観察されたほか、投与 26 日目には 1 例で投与直前にも発現したが、いずれも投与後 15 分以内に消失した。鼻及び口周囲の汚れは投与 2~7 日目に単発的に認められた。顔の被毛の汚れは投与 3 日目のみの発現であり、腹部の脱毛は投与 15~21 日目に認められた。100 mg/kg 群では流涎が 10 例、橙色尿が 5 例で認められた。流涎は投与 5 日目から散発的に観察されたが、投与後 15 分以内に消失した。また、投与回数の増加とともに発現例数が減少する傾向が認められ、投与 23 日目以降の発現はみられなかった。橙色尿は投与 25 日目から継続して認められた。対照群に異常は認められなかった。

### 17.2 詳細な一般状態 (Table 2, Appendix 2)

被験物質投与群で排糞回数及び排尿回数に有意な変動は認められず、他の詳細観察項目においても被験物質投与群及び対照群に異常は認められなかった。なお、投与開始前の検査において、100 mg/kg 群で排糞回数の有意な低値がみられた。

### 17.3 機能検査 (Table 3, Appendix 3)

被験物質投与群で握力及び自発運動量に有意な変動は認められず、反応性検査においても被験物質投与群及び対照群に異常は認められなかった。

### 17.4 体重 (Fig. 1, Table 4, Appendix 4)

500 mg/kg 群で投与 3、7、14、21 及び 28 日目に有意な低値（それぞれ対照群の 92.6%、93.9%、93.5%、91.2% 及び 92.3%）がみられ、投与 3 日目には 13 例中 2 例で前回測定値からの大幅な減少がみられた。100 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

### 17.5 摂餌量 (Fig. 2, Table 5, Appendix 5)

500 mg/kg 群で投与 3 日目に有意な低値（対照群の 70.0%）がみられたが、それ以降は有意な変動は認められなかった。100 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

### 17.6 尿検査 (Table 6, Appendix 6)

新鮮尿を用いたウロビリノーゲンの検査では、被験物質投与群及び対照群に異常は認められなかった。

蓄積尿を用いた検査では、被験物質投与群で尿量及び尿浸透圧に有意な変動は認められなかったが、500 mg/kg 群で褐色尿が 5 例中 3 例でみられた。100 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかった。

### 17.7 血液検査

#### a) 血液学的検査 (Table 7, Appendix 7)

1 回投与群では被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

7 日間投与群において、500 mg/kg 群で網状赤血球数比率及び単球比率の有意な高値、白血球数の高値傾向がみられた。100 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

14 日間投与群において、500 mg/kg 群で網状赤血球数比率、好中球比率、単球比率の有

意な高値、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）及びリンパ球比率の有意な低値がみられた。なお、100 及び 500 mg/kg 群で大型非染色球比率の有意な高値がみられたが、用量依存性に乏しい変動であった。

28 日間投与群において、500 mg/kg 群で赤血球数、MCHC 及びリンパ球比率の有意な低値、平均赤血球容積（MCV）、網状赤血球数比率、メトヘモグロビン比率、白血球数、好中球比率及び単球比率の有意な高値がみられた。100 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

#### b) 血液生化学的検査 (Table 8、Appendix 8)

1 回投与群において、500 mg/kg 群でアルカリ性フォスファターゼ（ALP）の有意な高値、総ビリルビンの高値傾向がみられた。100 mg/kg 群では尿素窒素（BUN）の有意な高値がみられたが、用量依存性がないことから偶発的変動と考えた。

7 日間投与群において、500 mg/kg 群でアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及び総ビリルビンの有意な高値がみられた。100 mg/kg 群ではクレアチニンの有意な低値がみられたが、用量依存性がないことから偶発的変動と考えた。

14 日間投与群において、500 mg/kg 群で ALT の有意な高値、総ビリルビンの高値傾向がみられた。100 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

28 日間投与群において、500 mg/kg 群で ALT、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)、総コレステロール、トリグリセリド、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン及び無機リンの有意な高値がみられた。100 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

### 17.8 病理学的検査

#### a) 器官重量 (Table 9 及び 10、Appendix 9 及び 10)

1 回投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 124.7% 及び 124.4%）がみられた。100 mg/kg 群では腎臓の相対重量の有意な高値がみられたが、用量依存性がないことから偶発的変動と考えた。

7 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 148.8% 及び 150.9%）がみられた。100 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

14 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 151.7% 及び 161.8%）、脾臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 194.2% 及び 207.4%）が認められたほか、解剖時体重が低値傾向（対照群の 93.9%）を示し、精巣上体の絶対重量の有意な低値がみられた。100 mg/kg 群では脳及び甲状腺の絶対重量の有意な低値がみられたが、用量依存性がないことから偶発的変動と考えた。

28 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 148.9% 及び 164.8%）、腎臓の相対重量の有意な高値（対照群の 119.5%）、脾臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 167.6% 及び 181.9%）、甲状腺の相対重量の有意な高値（対照群の 148.3%）が認められたほか、解剖時体重が低値傾向（対照群の 90.4%）を示し、精巣上体の絶対重量の有意な低値、脳の相対重量の有意な高値がみられた。100 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

b) 割 検 (Table 11、Appendix 11)

1回投与群において、500 mg/kg 群で胃の餌による膨満が 4 例中 3 例、腺胃の粘膜黒色部及び腸間膜リンパ節の白色化が各 1 例に認められたほか、100 mg/kg 群で右側腎臓の腎孟拡張が 1 例にみられた。対照群に異常は認められなかった。

7 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の腫大が 4 例全例、前胃の粘膜粗造部又は粗造化が各 1 例、脾臓の黒色化が 1 例に認められたほか、100 mg/kg 群で精巣の両側性の小型化が 1 例にみられた。対照群に異常は認められなかった。

14 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の腫大並びに脾臓の黒色化及び腫大が 4 例全例、前胃の粘膜隆起部が 1 例に認められた。100 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかった。

28 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の腫大及び脾臓の黒色化が 5 例全例、脾臓の腫大が 2 例、腎臓の両側性の腫大が 1 例に認められた。100 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかった。

c) 病理組織学的検査 (Table 12、Appendix 11)

1回投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴うびまん性肝細胞肥大（軽度）が 4 例全例、肝臓の小葉周辺性肝細胞グリコーゲン蓄積（軽度）が 2 例に認められたほか、腎臓の被膜下の囊胞が 1 例にみられた。なお、肉眼的に腺胃の粘膜陥凹部がみられた 1 例では、腺胃に異常は認められなかった。100 mg/kg 群では、肉眼的に右側腎臓の腎孟拡張がみられた 1 例で組織学的にも腎孟拡張が確認された。対照群に異常は認められなかった。

7 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴うびまん性肝細胞肥大（軽度～中等度）が 4 例全例、脾臓のうつ血（軽度～中等度）が 3 例に認められたほか、肉眼的に前胃の粘膜粗造部又は粗造化がみられた 2 例で前胃の限局性扁平上皮過形成（軽度又は重度）、粘膜下層の水腫及び細胞浸潤（中等度）又はびらん（軽度）が認められ、腎臓の被膜下の囊胞が 1 例にみられた。また、100 及び 500 mg/kg 群並びに対照群で、肝臓の限局性肝細胞壊死が各 1 例にみられた。なお、肉眼的に精巣の両側性の小型化がみられた 100 mg/kg 群の 1 例では、精巣に異常は認められなかった。

14 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴うびまん性肝細胞肥大（中等度）及び脾臓のうつ血（軽度～中等度）が 4 例全例、脾臓のヘモジデリン沈着（軽度）及び髓外造血亢進（軽度～中等度）が各 3 例に認められたほか、肉眼的に前胃の粘膜隆起部がみられた 1 例で前胃の限局性扁平上皮過形成（軽度）が認められ、脾臓の被膜炎が 1 例にみられた。また、100 及び 500 mg/kg 群で肝臓の限局性肝細胞壊死が各 1 例にみられた。対照群に異常は認められなかった。

28 日間投与群において、500 mg/kg 群で肝臓の核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴う小葉中心性肝細胞肥大（中等度）、脾臓のうつ血（軽度～中等度）、ヘモジデリン沈着（軽度～中等度）及び髓外造血亢進（中等度）が 5 例全例、肝臓の小肉芽腫（軽度～中等度）が 3 例、骨髄の赤芽球系細胞過形成（軽度）が 4 例、腎臓の皮質の近位尿細管硝子滴（軽度）が各 1 例に認められた。100 mg/kg 群では、脾臓の髓外造血亢進（軽度）が 3 例、骨髄の赤芽球系細胞過形成（軽度）が 1 例に認められた。そのほか、100 及び

500 mg/kg 群で肝臓の限局性肝細胞壊死が各 1 例、対照群及び 500 mg/kg 群で精巣の精母細胞の変性が各 1 例、500 mg/kg 群で精巣の限局性精細管萎縮及び精巣上体の両側性精細胞残渣が 1 例にみられた。

なお、1 回投与群の対照群の 1 例及び 500 mg/kg 群の 2 例について実施した肝臓の PAS 反応による検査の結果、対照群では肝細胞内に PAS 陽性物質がほとんど認められなかつたのに対し、500 mg/kg 群では 2 例とも小葉周辺性に肝細胞内に PAS 陽性物質が認められたことから、肝細胞内にグリコーゲンが蓄積していることが確認された。また、28 日間投与群の対照群及び 500 mg/kg 群の各 1 例について実施した脾臓のベルリン青染色による検査の結果、対照群では青色物質がほとんど認められなかつたのに対し、500 mg/kg 群では赤脾髄のマクロファージ内に多量の青色物質が認められたことから、褐色色素がヘモジデリンであることが確認された。さらに、28 日間投与群の対照群及び 500 mg/kg 群の各 1 例について実施した腎臓の抗  $\alpha$  2u-グロブリン抗体による免疫組織学的検査では、対照群において皮質の近位尿細管上皮細胞に陽性物質が少量認められたのみであったが、500 mg/kg 群では皮質の近位尿細管上皮細胞に陽性物質が多く認められ、硝子滴が  $\alpha$  2u-グロブリンの沈着によるものであることが確認された。

## 18. 考 察

被験物質は芳香族アミンの 1 つであり、厚生労働省及び環境省による GHS 分類では、ラットで雌雄に肝細胞腺腫、雌に子宮腺がん、マウスで雌雄に肝芽腫及び肝細胞がん、雌に肝細胞腺腫の発生増加が認められたとして、発がん性に関して区分 2（人に対する発がん性の疑いがある物質）に分類されている。実験動物に対する反復投与毒性としては、ラットを用いた 2 及び 13 週間混餌投与試験において、溶血性貧血のほか肝臓及び腎臓に対する毒性がみられたと報告されている（日本バイオアッセイ研究センター, 2000）。本試験においても被験物質投与により、血液、肝臓及び消化管への毒性影響が認められた。

血液に対する影響として、500 mg/kg 群において、14 日間投与後から MCHC の低値、28 日間投与後に赤血球数の低値及び MCV の高値が認められ、軽度な大球性貧血が生じていると考えられた。貧血の発現機序としては、1 回投与後から総ビリルビンの高値又は高値傾向、7 日間投与後から脾臓の黒色化及びうっ血、14 日間投与後から脾臓のヘモジデリン沈着、28 日間投与後にメトヘモグロビン比率の高値がみられたことから、メトヘモグロビン形成により脾臓での溶血が亢進したものと考えた。これに対し、500 mg/kg 群において、7 日間投与後から網状赤血球数比率の高値、14 日間投与後から脾臓の髄外造血亢進、28 日間投与後に骨髓の赤芽球系細胞過形成がみられ、反応性の造血が認められた。14 日間投与後からみられた脾臓の絶対及び相対重量の高値並びに肉眼的腫大は、うっ血及び髄外造血亢進を反映した変化と考えられた。なお、血液学的検査でみられた単球比率及び白血球数の高値は、後述の胃粘膜での炎症反応のほかに、貧血に対する反応として生じた造血の結果、末梢血中に出現した赤芽球（有核赤血球）が機器により誤って計数された可能性も否定できない。血液に対する影響は、100 mg/kg 群においても、28 日間投与後に脾臓の髄外造血亢進及び骨髓の赤芽球系細胞過形成として認められた。

肝臓に対する影響として、500 mg/kg 群において、1 回投与後から絶対及び相対重量の高値、7 日間投与後から肉眼的な腫大が認められ、病理組織学的検査では、1 回投与後に小葉周辺性肝細胞グリコーゲン蓄積、1 回、7 及び 14 日間投与後に核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴うびまん性肝細胞肥大、28 日間投与後に核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴う小葉中心性肝細胞肥大が認められた。肝細胞肥大は、蛋白質合成の亢進と考えられる核小体明瞭化及び薬物代謝酵素誘導と考えられるくもり硝子変性を伴っていたことから、適応性変化と考えた。しかしながら、血液生化学的検査において、1 回投与後から総ビリルビンの高値又は高値傾向、7 日間投与後から ALT の高値、28 日間投与後に  $\gamma$ -GTP の高値がみられ、病理組織学的検査においても 28 日間投与後に限局性肝細胞壊死の発現頻度が増したことから、肝障害も同時に生じていたことが示唆された。なお、28 日間投与後にみられた甲状腺の相対重量の高値は、肝臓での薬物代謝酵素活性亢進による二次的な影響である可能性が考えられた。

消化管に対する影響として、500 mg/kg 群において、剖検で 7 日間投与後に前胃の粘膜粗造部又は粗造化、14 日間投与後に前胃の粘膜隆起部がみられ、病理組織学的検査で 7 日間投与後に前胃の限局性扁平上皮過形成、粘膜下層の水腫及び細胞浸潤又はびらん、14 日間投与後に前胃の限局性扁平上皮過形成が認められた。これらの所見から、被験物質は胃粘膜に対する刺激性を有し、投与期間中に 100 及び 500 mg/kg 群で観察された流涎もこれに関連した

症状と考えた。500 mg/kg 群でみられた白血球数、好中球比率及び単球比率の高値は、胃粘膜の傷害に対する炎症反応と考えた。なお、1回投与後に 500 mg/kg 群でみられた胃の餌による膨満及び腸間膜リンパ節の白色化は、胃粘膜への刺激性により一時的に胃腸の運動が低下し、消化及び吸収が停滞したことを見所とされた。同様に、ALP の高値も小腸への影響を示唆する変化と考えられた。

被験物質投与によるその他の影響として、投与期間中に 100 及び 500 mg/kg 群で橙色尿が観察され、28 日間投与後の尿検査において 500 mg/kg 群で褐色尿がみられたが、投与 1 週目に実施したウロビリノーゲン検査では異常が認められなかったことから、尿の着色は溶血や肝障害に関連するものではなく、尿中に排泄された被験物質又はその代謝物によるものと考えた。なお、500 mg/kg 群で 28 日間投与後に腎臓の相対重量の高値及び肉眼的な腫大がみられたが、組織学的には  $\alpha$  2u-グロブリンの沈着による皮質の近位尿細管の硝子滴が 1 例に認められたのみであり、尿検査及び血液生化学的検査において腎障害を示す異常が認められなかったことから、毒性学的意義は小さいと判断した。

投与期間中に 500 mg/kg 群でみられた自発運動低下、呼吸数減少、半眼、鼻及び口周囲の汚れ、体重の低値、摂餌量の一過性の低値は、血液、肝臓及び消化管に対する毒性影響を反映したものと考えた。

投与期間中又は各投与期間終了時にみられたその他の変化は、用量依存性のない変動であること、一過性の変動であること、1 例のみでの発現であること、他に関連する変化が認められないこと、又は自然発生病変として散見される所見であること等から、被験物質投与とは関連のない変化と考えた。

以上のとおり、本試験では被験物質投与により血液、肝臓及び消化管への毒性影響が認められた。その他の消化器系、呼吸器系、心・血管系、泌尿器系、生殖器系、神経系、内分泌系、感覚器、筋・骨格系、乳腺への影響は検出されなかった。

## 19. 参考文献

日本バイオア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.

日本バイオア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 13 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.