

o-ニトロアニリンのラットを用いた強制経口投与による肝中期発がん性試験

日本バイオアッセイ研究センター

1 被験物質

1.1 名称等

名称	: <i>o</i> -ニトロアニリン (別名 2-ニトロアニリン)
製造元	: 東京化成工業 (株)
CAS No.	: 88-74-4
ロット番号	: SSXKD
含量	: 99.8 %
分子量	: 138.12

1.2 物理化学的性状等

外観及び性状	: うすい黄色～黄赤色 結晶～粉末
融点	: 71℃
溶解性	: 水に難溶

1.3 製造・輸入量及び用途

製造・輸入量	: 1,000 ～ 2,000 t 未満 (平成 28 年度)
用途	: 医薬・染料・顔料・ゴム薬原料

1.4 有害性情報

急性毒性	: LD50 : 1,838 mg/kg (ラット経口)
刺激性	: ウサギの眼に対して軽度刺激性
遺伝毒性	: エームス試験 : 陽性、染色体異常試験 : 陽性
発がん性	: 情報なし
特定標的臓器毒性	: なし

2 目的

F344/DuCrjラットを用いた肝中期発がん性試験 (伊東法) を用いて、*o*-ニトロアニリンの肝臓に対するプロモーション作用の有無を検索した。

3 方法

試験は、被験物質投与群 3 群、媒体対照群及び陽性対照群の計 5 群の構成で、各群 22 匹の F344 ラット (雄 6 週齢) を用いて行った。起始物質として *N*-ニトロソジエチルアミン (DEN) 200 mg/kg を腹腔内へ投与した後、第 3 週目より 6 週間、オリーブ油に混和させた被験物質を 0 (媒体対照群)、100、200 及び 400 mg/kg/day の用量で、また、陽性対照群にはフェノバルビタールナトリウムを 25 mg/kg/day の用量で、毎日 1 回、強制経口投与した。DEN 処置後、第 3 週目の終わりには肝臓

の 2/3 を切除する手術を行った。動物は投与終了日の翌日に安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変である胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢 (直径 0.2 mm 以上) の数及び面積を計測し、肝臓単位面積当たりの陽性細胞巢の数及び面積を算出することでプロモーション作用の有無を評価した。

4 投与量設定の理由

被験物質の投与量は、以下に示す用量設定試験の結果を基に決定した。用量設定試験は、急性 (3 回投与) 試験、3 週間反復投与試験及び部分肝切除した動物を用いる 2 週間反復投与試験を実施した。

急性 (3 回投与) 試験は、被験物質投与量を 400、800、1500 mg/kg に設定して雄の F344 ラット 3 匹に 8 週齢から毎日、最大 3 日間、強制経口投与した。その結果、1500 mg/kg では投与直後に顕著な麻酔様症状 (睡眠、痙攣、歩行失調等) が現れ、2 回投与で 3 匹が死亡、800 mg/kg と 400 mg/kg では投与初期には軽微な麻酔作用 (瞬き、歩行失調等) がみられて体重はわずかに減少したが死亡はみられなかった。

急性 (3 回投与) 試験の結果を基に、3 週間反復投与試験では、6 週齢で *N*-ニトロソジエチルアミン (DEN) を腹腔内単回投与 (200 mg/kg) し、被験物質投与量を 0 (媒体対照、オリーブ油)、50、100、200 及び 400 mg/kg に設定して、雄の F344 ラットに 8 週齢から毎日、3 週間、強制経口投与して投与終了翌日に剖検した。その結果、一般状態や体重に影響はみられなかったが、200 mg/kg 以上の用量で肝臓重量が増加し、血液生化学検査ではすべての投与群で総コレステロールの増加、400 mg/kg では γ -GTP 活性の上昇も認められた。

これらの用量設定試験の結果を基に、本試験の高用量を最終決定する目的で、部分肝切除した動物を用いる 2 週間反復投与試験を実施した。被験物質投与量は 0 (媒体対照、オリーブ油)、200、400 及び 600 mg/kg とし、9 週齢で部分肝切除した雄の F344 ラットに、部分肝切除翌日から毎日、2 週間、被験物質を強制経口投与した。その結果、400 mg/kg 及び 600 mg/kg では投与初日の投与直後に麻酔様症状がみられ、600 mg/kg の 1 回目の投与直後には顕著に認められた。しかし、その後の投与では回復 (適応) がみられ、3 回目以降に麻酔症状はみられなくなった。600 mg/kg では体重増加の軽微な抑制も認められた。また、肝臓重量の顕著な増加が 200 mg/kg から用量に対応して認められた。

以上の結果から、本試験に用いる高用量は、動物にわずかな毒性兆候がみられるが、動物が 6 週間の投与に耐え得る用量として、400 mg/kg が適切であると判断した。したがって、本試験では、高用量を 400 mg/kg に設定し、公比 2 で除して中用量を 200 mg/kg、低用量を 100 mg/kg とした。

5 結果

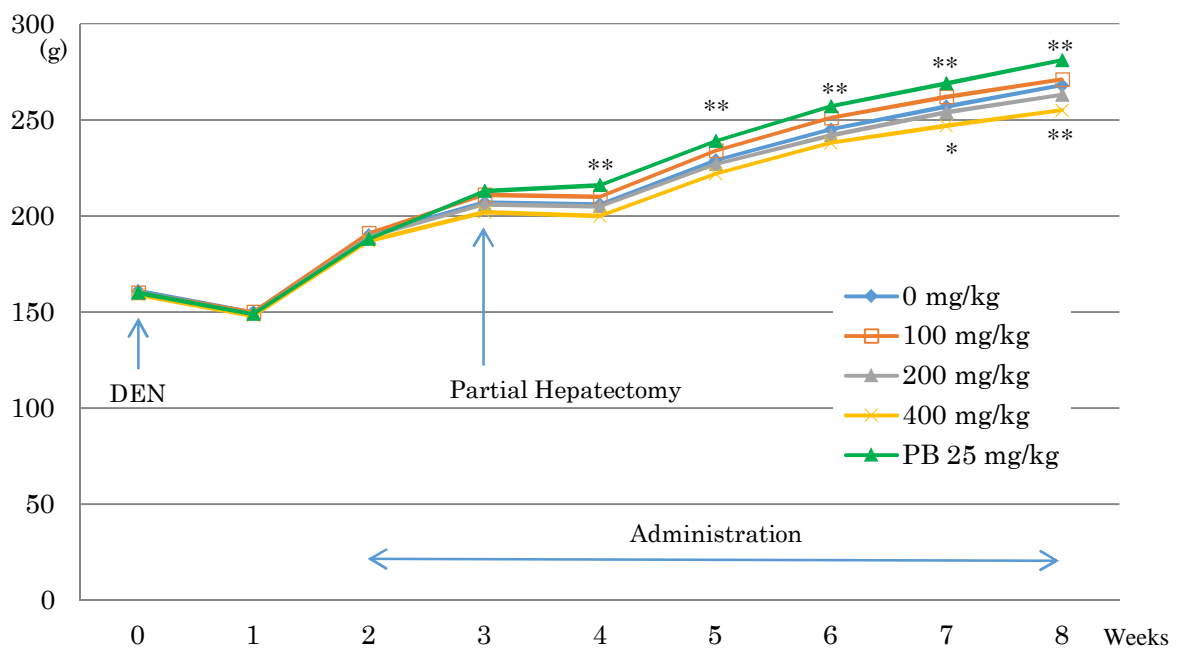
400 mg/kg 群には 1 例に部分肝切除翌日の投与後に一時的な失調性歩行がみられ、また、軽度ではあるが体重増加の抑制や一時的な摂餌量の減少も認められた。肝臓重量については、100 mg/kg 以上の群で絶対重量と相対重量の増加がみられた。また、腎臓重量については、200 mg/kg 以上の群で相対重量の増加が認められた。病理組織学的検査では投与の影響が考えられる毒性病変は認

められなかった。肝臓の GST-P 陽性細胞巢は、単位面積当たりの数、面積ともに 200 mg/kg 以上の群で投与用量に対応した減少がみられたが、これは肝臓重量増加による相対的な減少であると判断した

陽性対照群では、媒体対照群に比較して体重、摂餌量、肝臓重量（絶対重量、相対重量）及び腎臓重量（絶対重量、相対重量）は増加した。また、肝臓の GST-P 陽性細胞巢については単位面積当たりの数、面積が増加したことから肝臓に対する発がんプロモーション作用は陽性であることを確認した。

6 結論

o-ニトロアニリンは、本試験条件下では肝臓に対する発がんプロモーション作用を示さないと結論した。



*, ** : Significantly different from control group at $p < 0.05$, 0.01 , respectively.

図1 *o*-ニトロアニリンの肝中期発がん性試験における体重推移

表1 *o*-ニトロアニリンの肝中期発がん性試験における肝臓重量結果

投与量 (mg/kg/day)	有効 動物数	剖検時体重 ^a (g)	肝臓絶対重量 (g)	肝臓相対重量 (%)
0	21	251 ± 10	6.058 ± 0.513	2.414 ± 0.134
100	22	254 ± 13	6.913 ± 0.556**	2.715 ± 0.149**
200	18	244 ± 7	7.448 ± 0.452**	3.050 ± 0.184**
400	22	236 ± 13**	8.520 ± 0.611**	3.619 ± 0.228**
PB 25	19	260 ± 16*	8.189 ± 1.198**	3.160 ± 0.506**

^a : The value presented were obtained after the animals were fasted overnight.

* : Significantly different from control group at p<0.05.

** : Significantly different from control group at p<0.01.

表2 *o*-ニトロアニリンの肝中期発がん性試験における免疫組織化学的検査結果

投与量 (mg/kg/day)	有効 動物数	GST-P 陽性細胞巢	
		陽性細胞巢数 (no./cm ²)	陽性細胞巢面積 (mm ² /cm ²)
0	21	4.363 ± 1.990	0.472 ± 0.302
100	22	3.736 ± 1.939	0.322 ± 0.185
200	18	2.597 ± 1.573*	0.165 ± 0.108**
400	22	2.888 ± 1.846*	0.184 ± 0.144**
PB 25	19	8.202 ± 2.655**	0.954 ± 0.510**

* : Significantly different from control group at p<0.05.

** : Significantly different from control group at p<0.01.