

5-クロロ-2-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	: 5-クロロ-2-ニトロアニリン (別名 2-アミノ-4-クロロ-1-ニトロベンゼン、5-クロロ-2-ニトロベンゼンアミン、2-ニトロ-5-クロロアニリン)
製造元	: 東京化成工業 (株)
CAS No.	: 1635-61-6
ロット番号	: PTW3K
含量	: 99.9 %
分子量	: 172.57

1.2 物理化学的性状等

外観及び性状	: 黄色～赤みの黄色、結晶～粉末
融点	: 128°C
溶解性	: 水に殆ど溶けない

1.3 製造・輸入量及び用途

製造・輸入量	: 1,000 t (平成 28 年度)
用途	: 動物医薬・駆虫剤・医薬・染料中間体

1.4 有害性情報

急性毒性	: LD50 : 5,000 mg/kg (ラット経口)
刺激性	: 情報なし
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/DuCrIj ラットを用いた肝中期発がん性試験 (伊東法) を用いて、5-クロロ-2-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、オリブ油に混和させた被験物質を 0 (媒体対照群)、50、100 及び 200 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) 陽性細胞巣（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巣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、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。

3週間反復投与試験では、被験物質投与量を0（媒体対照、オリーブ油）、30、100、300及び1000 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、1000 mg/kg は投与後に顕著な麻酔様症状（流涙、自発運動減少、失調歩行、横臥）が観察され、体重の著しい減少もみられたことから、投与を5回で中止した。300 mg/kg では投与期間初期の投与後に軽微な麻酔作用（流涙、失調歩行）や体重の僅かな減少がみられたが、徐々に回復し、最終体重は対照動物に比較して95%であった。剖検で肉眼病変は観察されなかったが、30 mg/kg 以上で肝臓の相対重量の増加がみられ、100 mg/kg と 300 mg/kg では腎臓の相対重量の増加も認められた。また、30 mg/kg 以上では血中の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）、100、200及び300 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、12日間、被験物質を強制経口投与した。その結果、300 mg/kg は投与期間初期の投与後に3週間反復投与試験の300 mg/kg でみられた症状と比較して強い麻酔様症状（失調歩行、転倒、横臥）を呈する動物がみられ、部分肝切除が被験物質の動物への感受性を上昇させると考えられた。100 mg/kg と 200 mg/kg では麻酔様症状は観察されなかった。最終体重は対照動物に比較して300 mg/kg は90%、200 mg/kg は96%、100 mg/kg は98%であった。また、肝臓の相対重量は、いずれの投与群も増加し、溶媒対照に対して300mg/kg で138%、200mg/kg で140%、100mg/kg で129%であった。

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、200 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200 mg/kg に設定し、公比2で除して中用量を100 mg/kg、低用量を50 mg/kg とした。

5 結果

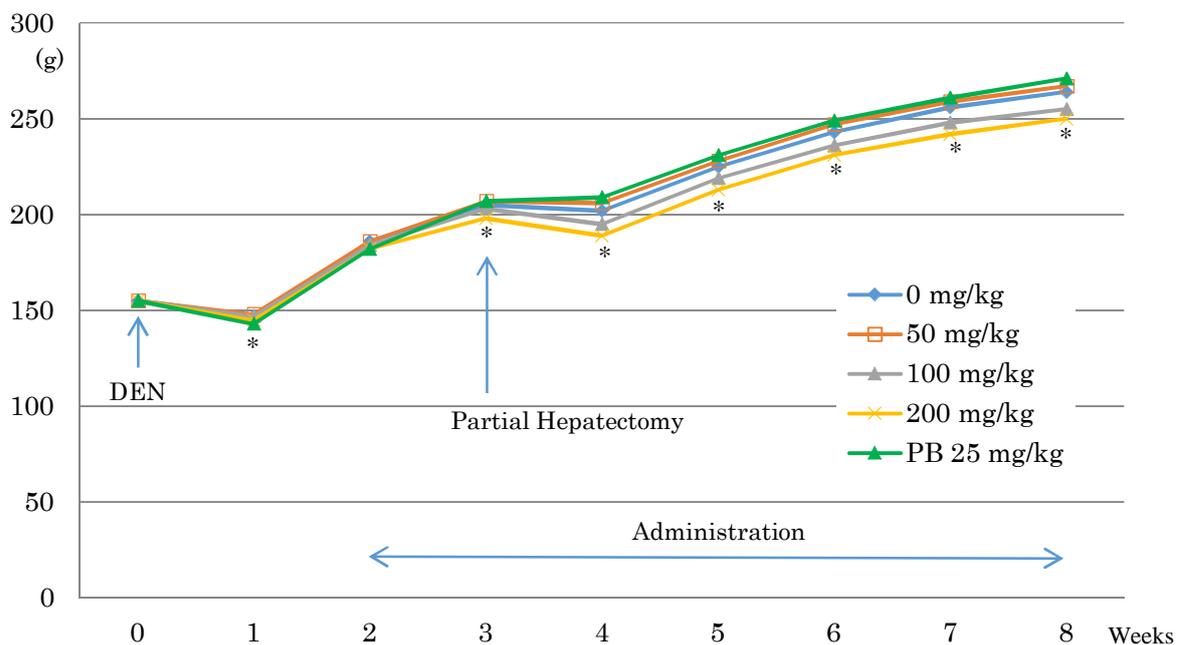
投与に起因する一般状態所見は観察されなかった。100 mg/kg 以上の群では体重増加の抑制が認められ、200 mg/kg 群では一時的な摂餌量の減少も認められた。また、50 mg/kg 以上の全ての投与群には、肝臓と腎臓の実重量及び重量体重比の投与用量に対応した増加が認められた。ヘマ

トキシリン・エオジン染色標本による病理組織検査では、肝臓、腎臓ともに被験物質投与による毒性病変は認められなかった。肝臓の GST-P 陽性細胞巢を解析した結果、50 mg/kg 以上のすべての投与群で投与用量に対応して、単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巢（直径 0.2mm 以上）の数及び面積が有意な減少を示した。この減少は、肝臓重量の増加による相対的なものと考えられたが、減少が著しい理由は明らかでなかった。

陽性対照群は、肝臓の GST-P 陽性細胞巢について、単位面積当たりの数、面積ともに明らかな増加を示すことから、肝臓に対する発がんプロモーション作用は陽性であると確認された。

6 結論

5-クロロ-2-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 $p < 0.05$.

図1 5-クロロ-2-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 5-クロロ-2-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	19	247 ± 15	6.045 ± 0.659	2.448 ± 0.250
50	21	248 ± 14	6.984 ± 0.551**	2.815 ± 0.141**
100	19	235 ± 13*	7.261 ± 0.720**	3.086 ± 0.253**
200	19	228 ± 14**	8.119 ± 0.820**	3.564 ± 0.255**
PB 25	21	249 ± 16	7.766 ± 0.530**	3.120 ± 0.134**

^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 5-クロロ-2-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	19	4.044 ± 1.752	0.342 ± 0.168
50	21	2.600 ± 1.071*	0.199 ± 0.113**
100	19	1.791 ± 0.851**	0.135 ± 0.082**
200	19	0.854 ± 0.468**	0.039 ± 0.027**
PB 25	21	7.454 ± 2.125**	0.727 ± 0.289**

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

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