

最終報告書

4-ニトロ-*o*-アニシジンのラットを用いる急性毒性試験

(試験番号：04-213-1)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目次

要約	1
目的	2
材料および方法	2
結果	5
考察	6
文献	7

添付資料

群別平均表

Table 1	死亡率	8
Table 2	一般状態	9
Table 3	体重	10
Table 4	剖検	11

要 約

4-ニトロ-*o*-アニシジンは染顔料として利用されている化学物質で、本物質の経口毒性について、ラットの反復投与毒性および生殖発生毒性についてはすでに検討され、報告¹⁾されている。

今回、4-ニトロ-*o*-アニシジンの急性毒性について、SD系[Crj:CD(SD)IGS]雌ラットを1群3匹として用い、固定用量を死亡状況を確認しながら段階的に単回経口投与する逐次法により検討した。

ステップ1として300mg/kgを投与した結果、死亡は認められなかった。ステップ2として、再度300mg/kgを投与したが、死亡は認められなかった。そこで、ステップ3では用量を上げて2000mg/kgを投与した結果、3匹中3匹の死亡が認められた。

一般症状として、300mg/kgでは、自発運動の低下、体温の低下および黄色尿が認められた。黄色尿は投与翌日まで観察されたが、自発運動の低下および体温の低下は投与後2時間以降には回復し、体重は順調な増加を示した。観察期間終了時の剖検において、内部諸器官の肉眼的変化は認められなかった。2000mg/kgでは、自発運動の低下、横臥、体温の低下、黄色尿ないし黄褐色尿および尿による下腹部の汚れが認められ、観察2日に全例が死亡した。剖検では、3匹中2匹に胸水と副腎の腫大が認められた。

以上の結果より、4-ニトロ-*o*-アニシジンのラット経口投与における概ねの致死量は500mg/kgと推定され、化学物質危険度分類(GHS)ではカテゴリー4に分類された。

目 的

4-ニトロ-*o*-アニシジンについて、ラットの経口投与における急性毒性を明らかにする。

材料および方法

1. 被験物質

4-ニトロ-*o*-アニシジン (CAS No. 97-52-9) は、非水溶性の黄色の粉末である。試験には、製造の試薬
を購入し、密栓して冷暗所 (2~6°C) に保管・使用した。本被験物質の詳細は、Appendix 1 に示す。試験に使用した被験物質は、投与終了後に分析し、試験期間中安定であったことを確認した (Appendix 2)。分析は、
に委託して実施した。

2. 供試動物および飼育条件

SD 系 [Crj:CD(SD)IGS] の SPF 雌ラットを日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター (神奈川県厚木市下古沢 795) より搬入 (9 週齢の 16 匹、出荷時の体重範囲は 200~250g) し、5 日間試験環境に馴化させ、その間に臨床観察および体重測定による検疫を行ない、健康状態が良好であることを確認した。試験には、1 群の動物数を 3 匹とし、ステップ 4 まで実験ができるように、体重分布の中央値に近いものから 12 匹を選んで使用した。群分けは、ステップ 1 の投与前日の体重に基づく層化無作為抽出法により行ない、12 匹を 4 群に振り分けた。動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付とピクリン酸溶液でラットの被毛の一部を染色する方法で行なった。群分け時の平均体重 (体重の範囲) は、ステップ 1 で 249 (241~254) g、ステップ 2 で 248 (240~254) g、ステップ 3 で 249 (240~256) g、ステップ 4 で 251 (239~267) g、また投与時では、ステップ 1 で 220 (212~227) g、ステップ 2 で 220 (217~223) g およびステップ 3 で 226 (218~231) g であった。なお、ステップ 3 までの投与で概略の致死量が求められたので、ステップ 4 の投与は実施せず、そのままステップ 3 の観察期間終了時まで、飼育した。

動物は、馴化期間および投与後の観察期間とも、室温 22±3°C、湿度 55±10%、換気回数 10 回以上/時 (オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間/日 (午前

7時点灯，午後7時消灯）に設定されたバリアーシステム動物室（第10室）で，ステンレス製金網ケージ（260W×380D×180Hmm）に，3匹ずつ収容して飼育した。飼料（固型飼料ラボMRストック，日本農産工業株式会社，Lot.No.041158-2）と飲料水（孔径1 μ mのカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は，自由に摂取させた。給水には自動給水装置を用いた。

なお，動物の飼育期間中，動物室の温度は21.3～21.9 $^{\circ}$ C，湿度は59～61%の範囲で推移（Appendix 3）し，また飼料および飲料水の汚染物質の分析値（Appendices 4&5）は，当研究所が定めた基準値以下であることが確認された。従って，動物の飼育期間を通じて，試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3. 投与用量および投与方法

投与用量は，OECDの試験法ガイドライン423（急性毒性等級法）の別表（Appendix 9参照）に従って，5，50，300あるいは2000mg/kgの固定量とし，逐次法により各ステップごとに死亡状況を確認しながら，概略の致死量が推定できるまで，ステップ1とステップ2は1日間隔，ステップ3はステップ2の2日後に段階的に投与を行なった。本物質の致死量に関する既存情報として，ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験のための投与量設定試験として実施された単回投与で，2000mg/kgでは雄3匹中1匹，雌3匹中2匹，1000mg/kgでは雌3匹中1匹が死亡し，反復投与の本試験での最高用量である300mg/kg/dayでは雌の5匹中2匹が投与3～4週に死亡したとの報告¹⁾があり，概略の致死量は300mg/kg以上と推定されたため，ステップ1の用量は300mg/kgとした。

投与方法は，テフロン製胃ゾンデを用い，動物の胃内に単回投与した。なお，動物は各ステップ毎に，投与前日の午後5時から投与後3時間まで除餌し，飲料水のみを自由に摂取させた。投与は，午前中（ステップ1で9:33～9:34，ステップ2で9:28～9:29，ステップ3では9:22～9:23）に実施した。

4. 投与液の調製

本被験物質は，非水溶性で食物油では均一な懸濁液となることから，投与液はコーン油（ナカライテスク株式会社，ロット番号V4N3566）を媒体とし，所定の濃度

(300mg/kg 群:3w/v%, 2000mg/kg 群:20w/v%) になるような懸濁液に調製した。投与液の調製は投与直前に行なった。投与液量は、体重 1kg 当たり 10mL とし、各個体の投与液量は投与直前の体重より算出した。

5. 観察事項

観察期間は投与後 14 日間とし、一般状態の観察および生死の確認は、観察 1 日（投与日）においては、投与後 1 時間までは継続して、その後は概ね投与後 2, 4 および 6 時間に観察した。観察 2 日は午前、午後の各 1 回、観察 3 日以降は午前中に 1 回行なった。体重は、観察 1（投与直前）、4, 8 および 15 日に測定した。剖検は、死亡動物は発見後速やかに、生存動物は観察 15 日の観察終了後にエーテル麻酔により安楽死させ、内部器官を肉眼的に観察した。

6. 致死量の推定および化学物質危険度分類

OECD の試験法ガイドライン 423（急性毒性等級法）の別表（Appendix 9 参照）に従って、各ステップでの死亡率から概略の致死量を推定し、化学物質危険度分類の万国共通分類法 [Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures (GHS)] に従って、毒性の最も強いカテゴリー 1 から最も弱いカテゴリー 5 のいずれかに分類した。

結 果

1. 死亡率(Table 1)

ステップ1として300mg/kgを投与したが、死亡は認められなかった。確認のため、ステップ2として再度300mg/kgを投与したが、死亡は認められなかった。そこで、ステップ3として2000mg/kgを投与した結果、3匹中3匹の死亡が認められた。このことから、毒性の強さは、化学物質危険度分類(GHS)における300～2000mg/kgの範囲を示すカテゴリー4に分類され、概ねの致死量は500mg/kgと推定された。

2. 一般状態(Table 2, Appendix 6)

300mg/kgにおいて、投与後30分以内から自発運動の低下が認められ、その後、体温の低下および黄色尿が認められた。自発運動の低下および体温の低下は投与後2時間以降には回復したが、黄色尿は投与翌日まで認められた。

2000mg/kgにおいては、全例に、投与30分以内から自発運動の低下、横臥、体温の低下および黄色尿が認められ、観察2日に死亡した。観察2日の死亡前における尿の色調は黄色から黄褐色へと濃くなり、また、1匹には尿による下腹部の汚れが認められた。

3. 体重推移(Table 3, Appendix 7)

300mg/kgにおいて、順調な体重増加を示した。

4. 剖検(Table 4, Appendix 8)

300mg/kgにおいて、観察期間終了時の剖検では内部諸器官の肉眼的変化は認められなかった。

2000mg/kgにおいては、死亡した3匹中2匹に胸水と副腎の腫大が認められた。

考 察

4-ニトロ-*o*-アニシジン¹⁾を雌ラットに、ステップ1として300mg/kgを単回経口投与したが死亡は認められず、ステップ2として再度300mg/kgを投与したが、死亡は認められなかった。そこで、ステップ3として2000mg/kgを投与したところ、3匹中3匹が死亡した。

毒性徴候として、300mg/kgでは、自発運動の低下および体温の低下、さらに2000mg/kgでは、横臥および尿による下腹部の汚れが認められ、2000mg/kgを投与した3匹全例が投与翌日に死亡した。死亡動物の剖検では、胸水と副腎の腫大が認められた。生存した300mg/kg投与の動物は、上述の症状が投与後2時間以内に回復し、体重も順調な増加を示し、観察期間終了時の剖検において、異常は認められなかった。なお、投与後黄色尿ないし黄褐色尿が認められたが、同様な変化は4-ニトロ-*o*-アニシジンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾においても報告され、毒性とは無関係な被験物質あるいはその代謝物の色調に由来する現象と考えられている。

以上の結果により、4-ニトロ-*o*-アニシジンのラット経口投与における概ねの致死量は500mg/kgと推定され、化学物質危険度分類（GHS）ではカテゴリ4に分類された。

文 献

- 1) 山本利男, 4-ニトロ-*o*-アニシジンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, 5, 223-236, 1997.

Table 1 Mortality of female rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Number of animals treated	Number of animals that died													Mortality	Category (GHS)	LD ₅₀ (mg/kg)	
			1						2	3	4	5	6	7	8~15(days)				
			~0.5	~1	~2	~4	~6	~24 (hrs)											
1	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^a /3 ^b		
2	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	4	500
3	2000	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3/3		

a : Number of animals that died; b : Number of animals treated

Table 2 Clinical signs of female rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Findings	Grade						
			~0.5	~1	~2	~4	~6(hrs)	4~15(days)	
1	300	Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	
		Decreased locomotor activity	3	0	3	0	0	0	0
		Hypothermia	0	3	0	0	0	0	0
		Yellow urine	0	3	0	0	0	0	0
2	300	Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	
		Decreased locomotor activity	3	0	3	0	0	0	0
		Hypothermia	0	3	0	0	0	0	0
		Yellow urine	0	3	0	0	0	0	0
3	2000	Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	
		Decreased locomotor activity	3	3	3	3	3	3	
		Prone position	0	3	3	3	3	2	
		Hypothermia	0	3	3	3	3	3	
		Yellow urine	3	0	0	0	0	0	
		Yellowish brown urine	0	0	0	0	0	3	
		Soiled perineal region	0	0	0	0	0	1	

Grade, 1 : Slight; 2 : Moderate

Table 3 Body weights of female rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Number of animals treated	Body weight (g)			
			1	4	8	15 (days)
1	300	3	220 ± 8 (3)	250 ± 7 (3)	256 ± 5 (3)	271 ± 6 (3)
2	300	3	220 ± 3 (3)	249 ± 8 (3)	259 ± 13 (3)	271 ± 11 (3)
3	2000	3	226 ± 7 (3)	(0)	(0)	(0)

Values represent mean body weight ± S.D. (number of animals examined)

Table 4 Incidence of necropsy findings of female rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Findings	Grade	Fate	
				Terminal kill	Found dead
1	300	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	
2	300	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	
3	2000	Number of animals examined		0	3
		No abnormalities detected			1
		Hydrothorax	1		2
		Adrenal gland: enlargement, bilateral	1		2

Grade, 1 : Slight