

**1,4 - ジクロロ - 2 - ニトロベンゼンのラットを用いた
経口投与による 2 週間毒性試験(混餌試験)報告書**

試験番号：0298

CAS No. 89-61-2

2003年2月25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**

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのラットを用いた
経口投与による 2 週間毒性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0298

本文

本文目次

頁

要約 1

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

- | | |
|-------------------------|---|
| I-1-1 名称等 | 2 |
| I-1-2 構造式、示性式、分子量 | 2 |
| I-1-3 物理化学的性状等 | 2 |

)

I-2 被験物質の使用ロット等 2

I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

- | | |
|--------------------|---|
| I-3-1 特性・同一性 | 3 |
| I-3-2 安定性 | 3 |

I-4 試験動物 3

II 試験方法

II-1 投与

- | | |
|---------------------------------------|---|
| II-1-1 投与経路 | 4 |
| II-1-2 被験物質の投与方法 | 4 |
| II-1-3 投与期間 | 4 |
| II-1-4 投与濃度 | 4 |
| II-1-5 投与方法、投与期間、投与濃度の設定理由 | 4 |
| II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法 | 5 |
| II-1-7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度 | 5 |
| II-1-8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性 | 5 |
| II-1-9 被験物質の摂取量 | 5 |

II-2 動物管理

- | | |
|--------------------------|---|
| II-2-1 各群の使用動物数 | 6 |
| II-2-2 群分け及び個体識別方法 | 6 |

II-2-3 飼育条件	6
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	7
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	8
II-3-6 病理学的検査	8
II-4 数値処理と統計方法	
II-4-1 数値の取り扱いと表示	9
II-4-2 母数の取り扱い	9
II-4-3 統計方法	9
III 試験成績	
III-1 生死状況	11
III-2 一般状態	11
III-3 体重	11
III-4 摂餌量	11
III-5 被験物質摂取量	12
III-6 血液学的検査	12
III-7 血液生化学的検査	12
III-8 病理学的検査	13
III-8-1 剖検	13
III-8-2 臓器重量	13
III-8-3 病理組織学的検査	14
IV 考察及びまとめ	
V 文献	17

要約

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのがん原性を検索する目的で F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いて経口投与による 2 年間（104 週間）の試験を実施するに当たり、その予備試験である 13 週間試験の投与濃度を決定するために本試験（2 週間試験）を実施した。投与は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンを各投与濃度に調製した混餌の自由摂取で行った。1 群当たりの動物数は雌雄各 10 匹とし、被験物質投与群を 5 群、対照群を 1 群の 6 群構成で行った。投与濃度は雌雄とも 10000 ppm、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、625 ppm とした。観察、検査項目として、一般状態の観察、体重・摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、最高用量の 10000 ppm 群で顕著な体重増加の抑制、摂餌量の低下が認められた。肝臓への影響として、肝臓の重量増加、単細胞壊死、GOT と γ -GTP の上昇が認められた。腎臓への影響として、腎臓重量の増加及び血清中の尿素窒素の増加が認められた。血液系への影響としては造血機能の低下が認められた。すなわち、血小板数、網赤血比、MCV の減少、また、病理組織学的検査でも骨髄の造血低下と脾臓の赤血球充満が認められた。その他、消耗性変化として胸腺の萎縮、栄養不良を示唆する変化としてグルコースの減少が認められた。

5000 ppm 以下の投与群では、5000 ppm 群で僅かな体重増加の抑制と摂餌量の減少が認められるのみで、他の検査結果もすぐに動物の生死に影響を及ぼす変化は観察されなかった。

1250 ppm 以上の全投与群で観察された黄色尿は、LC-MS/MS 法と $^1\text{H-NMR}$ 法による同定で、*N*-アセチル-*S*(4-クロロ-3-ニトロフェニル)-*L*-システインであることを確認した。また、2 週間混餌投与による最小毒性量 (LOAEL) は肝臓への影響をエンドポイントとして 625 ppm (雄 : 47~54 mg/kg body weight/day、雌 : 52~55 mg/kg body weight/day) であると考察された。

これらの結果から 10000 ppm の濃度では 13 週間の連続投与に動物は耐えられないと考え、5000 ppm 以上 10000 ppm 未満の濃度が 13 週間試験の最大投与濃度であると考えた。従って、13 週間試験の投与濃度は、雌雄とも最高用量を 7500 ppm とし、以下 5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm (公比 1.5) に設定した。

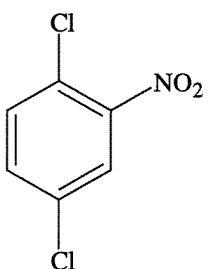
I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (1,4-Dichloro-2-nitrobenzene)
 別 名 : 2,5-ジクロロ-1-ニトロベンゼン (2,5-Dichloro-1-nitrobenzene)
 IUPAC 名 : 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (1,4-Dichloro-2-nitrobenzene)
 CAS.No. : 89-61-2

I-1-2 構造式、示性式、分子量 (文献 1)



C₆H₃C₁₂N O₂

分子量 : 192.0

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1,2)

外 觀 : 淡黄色結晶
 沸 点 : 266°C
 融 点 : 56°C
 溶 解 性 : クロロホルム、ベンゼン、ジエチルエーテルに可溶。
 水に難溶。
 保存条件 : 室温で暗所に保存した。

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : WTR1850
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 グ レ ー ド : 和光試薬 1 級
 純 度 : 98%以上 (和光純薬工業株検査成績書データ)

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、被験物質として本試験に使用した 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンについて、マススペクトルを質量分析装置 (Hewlett Packard 5989B Mass Spectrometer)により測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC Infrared Spectrometer)により測定し、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの文献値と比較することにより行った。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値（文献 3）と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値（文献 4）と同じ波長にピークが認められ、被験物質は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンであることを確認した。

なお、それらの結果は、APPENDIX K 1 に示した。

I - 3-2 安定性

被験物質として使用した 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンについて、投与開始前及び投与終了後に、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC Infrared Spectrometer)により測定し、また、ガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph) により測定し、それぞれのデータを比較した。

その結果、測定結果に差はみられず、投与期間中の 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは安定であることを確認した。

なお、その結果は、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)（神奈川県厚木市下古沢 795 番地）の F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。

雌雄各 75 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、体重の中央値に近い雌雄各 60 匹（投与開始時体重範囲、雄：122～134g、雌：93～103g）を選別し、試験に供した。

なお、がん原性試験で使用する動物は、遺伝的に安定していること、腫瘍の自然発生率が低いこと、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることの理由から F344/DuCrj(Fischer)ラットを使用することが決定している。当試験はがん原性試験の予備試験であるため、F344/DuCrj(Fischer)ラットを使用することにした。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

経口投与

II-1-2 被験物質の投与方法

被験物質を粉末飼料に添加し、設定濃度に調製した被験物質混合飼料を粉末飼料用給餌器に充填し、動物に自由摂取させた。)

II-1-3 投与期間

1995年10月26日～1995年11月9日までの2週間、解剖直前まで連続投与した。なお、被験物質混合飼料の交換頻度は餌重量の測定頻度に合わせ最長4日間とした。

II-1-4 投与濃度

10000 ppm、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm 及び 625 ppm の 5 段階（公比 2）の投与濃度を設定した。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。)

II-1-5 投与方法、投与期間、投与濃度の設定理由

被験物質は常温で固体であり、水に不溶であるため混餌による経口投与とした。

投与期間はがん原性試験の投与濃度決定（13週間試験）に使用する投与濃度を決定するために2週間とした。

各群の投与濃度は予備試験の結果をもとに設定した。すなわち、予備試験では 6 週齢の F344/DuCrj(Fischer) ラット(SPF) 雌雄に 10000 ppm と 50000 ppm の濃度の混餌飼料を 1 週間自由摂取させた。その結果、高用量の 50000 ppm では、雌雄とも餌をほとんど摂取せず、体重は大幅に減少した。低用量の 10000 ppm では、雌雄とも正常な摂餌量、体重増加を示した。以上のことから 2 週間試験の投与濃度は、雌雄ともに最高投与濃度を 10000 ppm に設定し、以下、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、625 ppm（公比 2）とした。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

10000 ppm と 5000 ppm の被験物質混合飼料については、混合機(スパイラルミキサー：関東混合機社 SS-251 型)を用い、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンと粉末飼料を直接混合して調製した。また、2500 ppm、1250 ppm、625 ppm の被験物質混合飼料については、10000 ppm に調製された被験物質混合飼料を中間体として、さらに粉末飼料を加え、混合機(スパイラルミキサー：関東混合機社 SS-251 型)により希釈混合することによって調製した。なお、試験における濃度の表示は、ppm(重量対重量比)とした。また、被験物質混合飼料の作製は投与開始直前に 1 回実施し、調製された被験物質混合飼料は冷蔵保存し、試験終了まで使用した。

II-1-7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度

各投与濃度に調製された被験物質混合飼料中における被験物質の濃度は、各濃度毎に混合容器内の被験物質混合飼料を 7 点サンプリングし、ガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph)を用いて分析し確認した。

分析の結果、各群の平均調製濃度は設定濃度に対し、93.0～98.9%の範囲にあった。また、均一性に関しては、各濃度群内の濃度のばらつきも少なく良好であった。

その結果を APPENDIX K 3 に示した。

II-1-8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性

調製された被験物質混合飼料中における被験物質の投与状態での安定性は、各設定濃度に調製された被験物質混合飼料を 4 日間動物飼育室内に放置し、調製時及び調製後 4 日目にガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph)を用いて分析し、その結果を比較することにより確認した。その結果、調製時を 100% とすると、4 日後には 89.2～93.0% であった。その結果を APPENDIX K 4 に示した。

また、調製された被験物質混合飼料中における被験物質の冷蔵状態での安定性は、各設定濃度に調製された被験物質混合飼料を 25 日間冷蔵保存し、調製時及び冷蔵保存後にガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph)を用いて分析し、その結果を比較することにより確認した。その結果、調製時を 100% とすると、25 日間冷蔵保存後には 93.3～114% であった。その結果を APPENDIX K 4 に示した。

II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より被験物質の体重 kg 当たりの 1 日摂取量(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 10 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群名称	使用動物数 (動物番号)	群名称	使用動物数 (動物番号)
対照群	10 匹 (1001~1010)	対照群	10 匹 (2001~2010)
625 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	625 ppm 群	10 匹 (2101~2110)
1250 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	1250 ppm 群	10 匹 (2201~2210)
2500 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	2500 ppm 群	10 匹 (2301~2310)
5000 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	5000 ppm 群	10 匹 (2401~2410)
10000 ppm 群	10 匹 (1501~1510)	10000 ppm 群	10 匹 (2501~2510)

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 5)。

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により、投与期間においては耳パンチにより識別し、またケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室に収容し、飼育室に試験番号、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、全飼育期間を通して、設定温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (実測値 平均土標準偏差 : $23.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$)、設定湿度 $55 \pm 10\%$ (実測値 平均土標準偏差 : $56 \pm 3\%$)、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/時の環境下で飼育した。動物の状態に影響を与えるような大きな環境変化は認められなかった。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連型網ケージ: 170W×294D×176H mm)に収容した。

飼料は、検疫期間についてはオリエンタル酵母工業(株)の CRF-1 固型飼料(30KGy- γ 線照射滅菌飼料)を使用し固型飼料給餌器により、馴化期間及び投与期間はオリエンタル酵母工業(株)の CRF-1 粉末飼料(30KGy- γ 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。

飲料水は、全飼育期間を通して市水 (秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫

外線滅菌し、自動給水装置で自由摂取させた。

なお、試験に使用した飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)から分析データを入手し、保管した。飼料中の夾雜物については(財)日本食品分析センター(東京都渋谷区元代々木町52番1号)の分析データを入手し、また、飲料水については(財)食品薬品安全センター秦野研究所(神奈川県秦野市落合729-5)に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と比較して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

) 全動物について、生死及び瀕死の確認を毎日1回行い、一般状態の観察を投与開始後1、4、7、11及び14日に行った。

II-3-2 体重測定

0日目(投与開始直前)、1日目(1週1日)、4日目(1週4日)、7日目(1週7日)、11日目(2週4日)及び14日目(2週7日)に体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

週2回、摂餌量を個体別に測定した。

II-3-4 血液学的検査

定期解剖時に採血可能な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-2カリウム入り採血管、クエン酸ナトリウム入り採血管(下記*印検査項目)及びヘパリンリチウム入り採血管(下記#印検査項目)に採血し、雌雄とも各群5匹の動物(メトヘモグロビン濃度については、雌の対照群のみ4匹)について、血液学的検査を行った。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、
 *プロトロンビン時間、*活性化部分トロンボプラスチン時間、白血球数、
 白血球分類、#メトヘモグロビン濃度

検査方法はAPPENDIX L 1に示した。

II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時に採血可能な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シリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿を用いて雌雄とも各群 5 匹の動物について、血液生化学的検査を行った。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、リン脂質、GOT、GPT、LDH、 γ -GTP、CPK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

検査方法は APPENDIX L 1 に示した。

II-3-6 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時に雌雄各群とも 5 匹の動物について、以下に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、湿重量の体重比（臓器重量体重比）、すなわち、定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

雌雄各群とも 2 例の動物の臓器を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、以下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、ヘマトキシリソ・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。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、リンパ節、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、睪丸、乳腺、脳、脊髄、末梢神経、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨、その他肉眼的に変化のみられた器官・組織

II-3-7 尿中代謝物の同定

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンを投与したラット尿を採取し、尿中で黄色を示す代謝物について下記の前処理法と機器による同定を行った。代謝物を同定するために、構造解析の手段として、LC-MS/MS、¹H-NMR を用いた。

1. 前処理

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンを投与したラット尿は、オアシス HLB カラム（日本ウォーターズ社）により、尿中の黄色成分を分離、抽出した。

2. LC-MS/MS

抽出した成分をメタノールに溶解し、LC-MS/MS のネガティブ ESI(Electron Spray Ionization) 法により測定した。測定条件は以下に示した。

Instrument	:TSQ-7000(サーモエクスト社)
Ionization	:ESI(Negative)
Sheath Gas	:Nitrogen(70psi)
Collision Gas	:Argon
Mobile Phase	:Methanol/Acetic Acid(pH3.1)=3/2
Flow Rate	:0.2mL/min.
Injection	:Flow Injection

3. $^1\text{H-NMR}$

抽出した成分を重メタノールに溶解し、 $^1\text{H-NMR}$ の NOE (Nuclear Overhauser Effect) 法により測定した。測定条件は以下に示した。

Instrument	:dpx300(ブルカー社)
測定方法	:NOE(Nuclear Overhauser Effect)
Solvent	:メタノール-d4 (重メタノール)

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

体重については g を単位とし、整数値の 1 の位まで計測し、表示した。

摂餌量については g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を計測期間の日数で除し、1 日当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。

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの体重当たりの摂取量は摂餌量に 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの設定濃度を乗じ体重で除した値を g/kg BW/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/(総蛋白ーアルブミン)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、摂餌量については、全動物を対象に計測した。

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。

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 統計方法

本試験で得られた測定値は原則として、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。

各群雌雄毎に検査数が 2 以下の項目については検定より除外した。

各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% 及び 1% の有意水準の表示を行った。

)

)

III 試験成績

III-1 生死状況

生死状況を TABLE 1, 2、APPENDIX A 1, 2 に示した。

雌雄とも全ての群に死亡動物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。

雄では 625 ppm 群以外の投与群の全動物に投与開始翌日（1週1日）より投与終了（2週7日）まで黄色尿が観察された。また、10000 ppm 群には1週の7日目に3匹の動物に尿による外陰部周囲の汚染が観察され、投与終了時にはほとんどの動物（8匹）に認められた。

雌では雄と同様に 625 ppm 群以外の投与群の全動物に投与開始翌日（1週1日）より投与終了（2週7日）まで黄色尿が観察された。また、10000 ppm 群には投与開始翌日（1週1日）に1例の動物に尿による外陰部周囲の汚染が観察され始め、投与終了時にはほとんどの動物（8匹）に認められた。尿による外陰部周囲の汚染は、少数例（1~2匹）ではあるが 1250、2500、5000 ppm 群の投与中期以降にも認められた。

III-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 1, 2、APPENDIX B 1, 2 に示した。

雌雄とも 10000 ppm 群と 5000 ppm 群に体重増加の抑制が認められた。2500 ppm 以下の投与群では対照群と同様な体重推移を示した。

なお、最終計測日（2週7日）における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 10000 ppm 群 : 52%、5000 ppm 群 : 85%、2500 ppm 群 : 98%、1250 ppm 群 : 99%、625 ppm 群 : 99%、雌では 10000 ppm 群 : 63%、5000 ppm 群 : 93%、2500 ppm 群 : 98%、1250 ppm 群 : 101%、625 ppm 群 : 102% であった。

III-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 3, 4、FIGURE 3, 4、APPENDIX C 1, 2 に示した。

雌雄とも 10000 ppm 群と 5000 ppm 群に摂餌量の低値が認められた。2500 ppm 以下の投与群では対照群と同様な摂餌量を示した。

投与期間中の投与群の摂餌量は対照群に対して雄では 10000 ppm 群 : 34~57%、5000

ppm 群 : 86~92%、2500 ppm 群 : 99~102%、1250 ppm 群 : 98~105%、625 ppm 群 : 97~101%、雌では 10000 ppm 群 : 44~68%、5000 ppm 群 : 84~96%、2500 ppm 群 : 94~99%、1250 ppm 群 : 96~100%、625 ppm 群 : 99~104% であった。

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の体重 kg 当たりの 1 日摂取量を APPENDIX D 1, 2 に示した。

雌雄とも 5000 ppm 以下の投与群では、ほぼ公比どおりの被験物質摂取量を示したが、10000 ppm 群では体重増加の抑制に比べ、摂餌量の低下が大きいため、公比どおりの摂取量を示さなかった。すなわち、設定濃度は雌雄とも 10000、5000、2500、1250、625 ppm (公比 2) であるのに対し、全投与期間の 1 日当たりの被験物質摂取量は雄で 10000 ppm 群 : 0.500~0.689g/kg、5000 ppm 群 : 0.387~0.429g/kg、2500 ppm 群 : 0.194~0.127g/kg、1250 ppm 群 : 0.094~0.111g/kg、625 ppm 群 : 0.047~0.054g/kg、雌では 10000 ppm 群 : 0.564~0.727g/kg、5000 ppm 群 : 0.370~0.423g/kg、2500 ppm 群 : 0.194~0.213g/kg、1250 ppm 群 : 0.100~0.107g/kg、625 ppm 群 : 0.052~0.055g/kg であった。

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 2500 ppm 以上の群で血小板数の減少、5000 ppm 以上の群で赤血球数、ヘマトクリット値及びメトヘモグロビン濃度の増加ならびに MCH の減少、10000 ppm 群でヘモグロビン濃度の増加とプロトロンビン時間の延長ならびに MCV と網赤血球比の減少が認められた。その他、5000 ppm 群のみで MCHC の減少が認められたが投与量に対応した変化ではなかった。

雌では 2500 ppm 以上の群で MCH の減少、5000 ppm 以上の群で MCV の減少、10000 ppm 群で赤血球数及びメトヘモグロビン濃度の増加とプロトロンビン時間の延長ならびに MCHC と血小板数の減少が認められた。

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 に示した。

雄では全投与群で総蛋白、アルブミン、総コレステロール及びリン脂質の増加、5000 ppm 以上の群でグルコースと無機リンの減少、10000 ppm 群で A/G 比、尿素窒素及びクーロールの増加ならびに γ -GTP の上昇が認められた。その他、カルシウムは 10000 ppm 群で減少、1250 ppm 群と 2500 ppm 群で増加が認められたが投与量に対応した変化ではなかった。

雌では全投与群で総蛋白、アルブミン及びリン脂質の増加、5000 ppm 以上の群で総ビリルビンの増加と GOT 及び γ -GTP の上昇ならびにグルコースの減少、10000 ppm 群で A/G 比と尿素窒素及びクロールの増加が認められた。

その他、10000 ppm 群以外の投与群で総コレステロールの増加が認められた。また、5000 ppm 群にのみカルシウムの増加が認められたが、投与量に対応した変化ではなかった。

III-8 病理学的検査

III-8-1 剖検

解剖時に観察した剖検結果を APPENDIX G 1, 2 に示した。

雌雄とも 10000 ppm 群の全動物に胸腺の萎縮が認められた。肝臓のヘルニアが雄の 1250 ppm 群と 10000 ppm 群に各 1 匹、雌の対照群に 2 匹、1250 ppm 群と 2500 ppm 群に各 1 匹認められたが投与濃度に対応したものではなかった。

III-8-2 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 (実重量)、I 1, 2 (体重比) に示した。

雄

肝臓は 10000 ppm 群で実重量の低値を示したものの、他の投与群では実重量の高値を示し、体重比では全投与群で高値を示した。腎臓は 1250 ppm 群と 2500 ppm 群で実重量の高値、10000 ppm 群では実重量の低値を示したが、体重比では 1250 ppm 以上の群で高値を示した。なお、胸腺は 10000 ppm 群で実重量と体重比の低値、精巣は 5000 ppm 群と 10000 ppm 群で実重量と体重比の低値を示した。

雌

肝臓は 10000 ppm 以外の投与群の実重量で高値を示し、体重比では全投与群で高値を示した。腎臓は 10000 ppm 群の実重量で低値を示し、体重比では 2500 ppm 群と 10000 ppm 群で体重比の高値を示した。なお、胸腺は 10000 ppm 群で実重量と体重比の低値を示した。

その他、体重増加の抑制に伴ったと思われる相対的变化を以下に列記する。

雄

- ①副腎は 10000 ppm 群で体重比の高値
- ②心臓は 5000 ppm 群と 10000 ppm 群で実重量の低値及び 10000 ppm 群で体重比の高値
- ③肺は 5000 ppm 群と 10000 ppm 群で実重量の低値及び 10000 ppm 群で体重比の高値

- ④脾臓は 5000 ppm 群と 10000 ppm 群で実重量の低値
 - ⑤脳は 10000 ppm 群で実重量の低値及び 5000 ppm 群と 10000 ppm で体重比の高値
- 雌
- ①副腎は 10000 ppm 群で実重量の低値
 - ②卵巣及び心臓は 5000 ppm 群と 10000 ppm 群で実重量の低値
 - ③肺は 10000 ppm 群で実重量の低値及び体重比の高値
 - ④脾臓は 2500 ppm 以上の群で実重量の低値
 - ⑤脳は 10000 ppm 群で実重量の低値及び体重比の高値

III-8-3 病理組織学的検査

定期解剖動物の病理組織学的所見（雌雄各群とも 2 匹）を APPENDIX J 1, 2 に示した。雄では 5000 ppm 以上の群で精巣の精原細胞壊死（2 匹）、精巣上体の精子減少（2 匹）、最高用量の 10000 ppm 群で骨髄の造血低下（2 匹）、胸腺の萎縮（2 匹）、脾臓の赤血球充满（2 匹）、肝臓の単細胞壊死（2 匹）、脳（脳幹部）の変性（1 匹）が認められた。その他、625 ppm～2500 ppm 群で腎臓の好酸体（各群 2 匹）、5000 ppm 群にのみに精巣上体の精上皮細胞の残屑（2 匹）と肝臓の分裂像増加（2 匹）が認められた。

雌では最高用量の 10000 ppm 群で骨髄の造血低下（2 匹）、胸腺の核崩壊（1 匹）、脾臓の赤血球充满（2 匹）、肝臓の単細胞壊死（1 匹）、脳（脳幹部）の変性（1 匹）及び出血（1 匹）が認められた。その他、5000 ppm 群にのみに肝臓の分裂像増加（1 匹）が認められた。2500 ppm 以下の群では著変は認められなかった。

III-8-4 尿中代謝物の同定

1. LC-MS/MS

測定したマススペクトルを APPENDIX N 1 (Fig. 1) に示した。 $m/z=317$ に $[M-H]^-$ の疑分子イオンが認められ、そのプロダクトイオンが $m/z=187$ に認められた。これらのことから、尿中の黄色成分は、2 つのうちの 1 つの塩素が *N*-アセチルシステインに置換されたモノクロロニトロベンゼンであることが推定された。

2. $^1\text{H-NMR}$

測定した NMR スペクトルを APPENDIX N 1 (Fig. 2) に示した。LC-MS/MS より推定された構造式の中の a、b、c および d のプロトンが 3～8 ppm の領域にピークとして認められた。a は 8.14 ppm にダブルレットのピーク、b は 7.67 ppm にシングレットのピーク、c は 7.66 ppm にダブルレットのピーク、d は 3.27～3.35 ppm と 3.58～3.65 ppm にダブルダブルレットのピークがそれぞれ認められた。これらのピークの NOE 法の測定結果より、a

のプロトンとdのプロトンの干渉位置にはピークが認められなかったことから、プロトンdとプロトンa間の位置関係はプロトンdとb及びc間よりも遠いことが明確であった。従って、尿中代謝物の構造は、APPENDIX N1 (Fig. 2)に示すように、*N*-アセチル-*S*(4-クロロ-3-ニトロフェニル)-*L*-システインであることが同定された。

以上の結果より、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンを投与したラット尿中で黄色を示す代謝物の成分は、*N*-アセチル-*S*(4-クロロ-3-ニトロフェニル)-*L*-システインであることを確認した。

)

)

IV 考察及びまとめ

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのがん原性を検索する目的で F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いて経口（混餌）投与による 2 年間（104 週間）の試験を実施するに当たり、その予備試験である 13 週間試験の投与濃度を決定するために本試験（2 週間試験）を実施した。被験物質投与群を 5 群、対照群を 1 群の 6 群構成で雌雄とも 1 群各 10 匹を用いて試験を行った。用量は雌雄とも 10000、5000、2500、1250、625 ppm と設定した。

試験の結果、全ての投与群に死亡はみられなかった。

最高用量の 10000 ppm 群では雌雄とも顕著な体重増加の抑制（最終計測時 雄：52%、雌：63%）、黄色尿の出現、大幅な摂餌量の低下（雄：34～57%、雌：44～68%）が認められた。血液学的検査では血小板数、網赤血球比及び MCV 等の減少が認められ、造血機能の低下が示唆された。この変化は雄に顕著に認められた。その他、雌雄ともに赤血球数の増加、ヘモグロビン濃度の増加（雄にのみ）、ヘマトクリット値の増加（雄にのみ）等の血液濃縮様の変化が認められた。投与期間が長くなれば、赤血球数の減少等の貧血がみられることが予想される。血液生化学的検査では、雌雄ともに肝臓への影響を示唆する総蛋白、アルブミン、総コレステロール、リン脂質、A/G 比の増加、GOT と γ -GTP の上昇が認められた。その他、腎障害を示唆する尿素窒素の増加、栄養不良を示唆するグルコースの減少が認められた。臓器重量でも、肝臓と腎臓の体重比の高値が認められ、両臓器への影響を示唆した。摂餌量の減少及び体重増加の抑制に起因すると思われる胸腺の実重量と体重比の低値が認められた。また、雄では、精巣重量の低下が認められた。病理組織学的検査では、雌雄に骨髄の造血低下、脾臓の赤血球充満、肝臓の単細胞壊死、脳（脳幹部）の変性が認められ、雄に精巣の精原細胞壊死、精巣上体の精子減少、胸腺の萎縮、雌にのみ胸腺の核崩壊と脳の出血が認められた。

5000 ppm 群では体重増加の抑制（最終計測時 雄：85%、雌：93%）と摂餌量の低下（雄：86～92%、雌：84～96%）、黄色尿の出現が認められた。血液学的検査では、雌雄ともに 10000 ppm 群にみられた造血機能の低下を示唆する変化は軽減した。血液生化学的検査でも、雌雄ともに肝臓への影響を示唆する変化と栄養不良を示唆する変化が軽減した。臓器重量では、雌雄に肝臓の実重量と体重比の高値、雄にのみ腎臓の体重比の高値及び精巣の実重量と体重比の低値が認められた。病理組織学的検査では、雌雄に肝臓の分裂像の増加が認められ、雄に精巣の精原細胞壊死、精巣上体の精子減少と精上皮細胞の残屑が認められた。

2500 ppm 群では体重増加の抑制と摂餌量の低下は認められなかつたが、黄色尿の出現が認められた。血液学的検査では造血機能低下を示唆する変化はわずかに認められたのみであった。血液生化学的検査では肝臓への影響を示唆する変化と栄養不良を示唆する変化は 5000 ppm 群に比べ軽減した。臓器重量では、雌雄に肝臓の実重量と体重比の高値が、雄に腎臓の実重量と体重比の高値が、雌に腎臓の体重比の高値が認められた。病理組織学的検

査では腎臓に好酸体の出現が雄にのみ認められた。

1250 ppm 群では体重増加の抑制と摂餌量の低下は認められなかつたが、黄色尿の出現が認められた。血液学的検査で、著変は認められなかつた。血液生化学的検査では肝臓への影響を示唆する変化と栄養不良を示唆する変化は 2500 ppm 群に比べ軽減した。臓器重量では、雌雄に肝臓の実重量と体重比の高値が、雄にのみ腎臓の体重比の高値が認められた。病理組織学的検査では腎臓に好酸体の出現が雄にのみ認められた。

625 ppm 群では血液生化学的検査で肝臓への影響を示唆する変化がわずかに認められた。臓器重量では雌雄ともに肝臓の実重量と体重比の高値が認められた。病理組織学的検査では腎臓に好酸体の出現が雄にのみ認められた。

1250 ppm 以上の全投与群で、投与開始直後より終了まで、黄色尿が出現した。ジクロロニトロベンゼン系化合物は、肝臓でグルタチオンを経由したメルカプツール酸に代謝されることが知られている（文献 6）。黄色を呈した投与ラットの尿をカラムで分取し、LC-MS/MS 法と ¹H-NMR 法によって同定した結果、黄色尿は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンが代謝され、紫外吸収の長波長へのシフト（黄色）を示す代謝物 *N*-アセチル-*S*(4-クロロ-3-ニトロフェニル)-*L*-システインに変換されることに起因することを確認した（文献 6）。

また、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの 2 週間混餌投与による最小毒性量（LOAEL）は肝臓への影響をエンドポイントとして 625 ppm（雄；47～54 mg/kg body weight/day、雌；52～55 mg/kg body weight/day）であると考察された。

以上のように、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの 2 週間の投与により、最高用量の 10000 ppm 群で顕著な体重増加の抑制、摂餌量の低下が認められ、肝臓、腎臓、血液系への影響が認められるため、10000 ppm の濃度では 13 週間の連続投与に動物は耐えられないと考えた。5000 ppm では体重増加の抑制と摂餌量の減少の程度も低く、他の検査結果もすぐに動物の生死に影響を及ぼす変化は観察されなかつたことから、5000 ppm 以上 10000 ppm 未満の濃度が 13 週間試験の最大投与濃度であると考えた。従つて、13 週間試験の投与濃度は、雌雄とも最高用量を 7500 ppm とし、以下 5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm（公比 1.5）に設定した。

V 文献

1. 化学工業日報社 (2003)
14303 の化学商品
pp.887-888, 化学工業日報社, 東京
2. Buckingham J. and MacDonald F. M. (eds.) (1982)
Dictionary of Organic Compounds
Vol. 2, pp. 1761-1762, Chapman and Hall, New York
3. Heller S. R. and Milne G. W. A. (1978)
EPA/NIH Mass Spectral Data Base Vol.1, p.882
U. S. Government Printing Office, Washington
4. 和光純薬工業（株）提供資料 (1995)
赤外吸収スペクトル
5. 阿部正信 (1986)
長期毒性試験に用いるラット、マウスの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
6. Habig W.H., Pabst M. J. and Jakoby W. B. (1974)
Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation
J. Biol. Chem. 240; 7130 - 7139