

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのマウスを用いた
経口投与による13週間毒性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0302

CAS No. 89-61-2

2003年3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-ニトロベンゼンのマウスを用いた
経口投与による 13 週間毒性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0302

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	4
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	6
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	数値処理と統計処理	
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	統計処理	10
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	12
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	13
Ⅲ-8	病理学的検査	13
Ⅲ-8-1	剖検	13
Ⅲ-8-2	臓器重量	14
Ⅲ-8-3	病理組織学的検査	14
Ⅳ	考察及びまとめ	17
Ⅴ	文献	19

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 Crj:BDF₁ マウスを用いて経口投与による 2 年間の試験を実施するに当たり、その投与濃度を設定するために予備試験 (13 週間試験) を実施した。投与は、被験物質を混合した粉末飼料を動物に自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも 7500 ppm、5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm (公比 1.5) に設定し、1 群当たりの動物数を雌雄各 10 匹とし、被験物質投与群 5 群、対照群 1 群の 6 群構成で実施した。観察、検査として、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、尿検査、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、7500 ppm 群で死亡、摂餌量の低下と体重の減少がみられた。被験物質による毒性の標的臓器は、雄では肝臓、血液系/脾臓、精巣及び鼻腔であり、雌では肝臓、血液系/脾臓及び腎臓であった。これらの臓器への影響は、肝臓への影響 (雌雄とも中心性の肝細胞の巨大細胞化、雄の肝臓重量の増加と血漿のリン脂質の増加) は雌雄とも 1481 ppm まで認められた。血液系/脾臓への影響は、雄では 2222 ppm 以上の群 (赤血球数の減少、脾臓でのヘモジデリン沈着と髄外造血の増加)、雌では 1481 ppm 群まで (脾臓でのヘモジデリン沈着) 認められた。精巣への影響 (精原細胞の壊死、精巣重量の低下、精巣上体における精上皮系細胞の残屑の出現と精子の消失) と鼻腔への影響 (嗅上皮の萎縮) が雄の 7500 ppm 群でみられた。また、腎臓への影響 (腎臓重量の増加、血漿の尿素窒素の増加) は雌の 5000 ppm 以上の群に認められた。従って、マウスにおける 13 週間の混餌投与による最小毒性量 (LOAEL) は、雌雄の肝臓への影響及び雌の血液系/脾臓への影響をエンドポイントとして 1481 ppm (雄; 0.245 g/kg body weight/day、雌; 0.284 g/kg body weight/day) であると考えられる。なお、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの代謝物である *N*-アセチル-*S*-(4-クロロ-3-ニトロフェニル)-*L*-システインに起因する黄色尿が雌雄とも全ての投与群でみられた。

2 年間混餌投与によるマウスのがん原性試験における被験物質の投与濃度は、動物の死亡、ならびに体重、肝臓及び血液系への影響をもとに、雌雄とも最大耐量と推定される 2000 ppm を最高投与濃度とし、以下、公比 2.5 で 800 ppm、320 ppm に設定した。

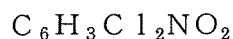
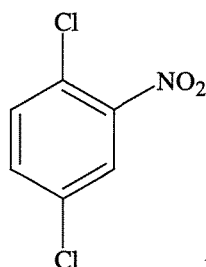
I 試験材料

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)



分子量 : 192.0

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1,2)

外 観 : 淡黄色結晶
 沸 点 : 266℃
 融 点 : 56℃
 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

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : SKG1643
 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 : 100.0% (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、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計 (Hewlett Packard 5989B)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)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 L 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性の確認は、使用した 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンについて、使用開始前及び使用終了後に、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC)により測定し、また、ガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) によりガスクロマトグラムを測定し、使用開始前及び使用終了後のそれぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、使用開始前後の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 L 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) (厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795 番地) の Crj:BDF₁ マウス(SPF)の雌雄を使用した。

雌雄各 75 匹を 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、異常を認めない動物から、体重の中央値に近い雌雄各 60 匹 (投与開始時体重範囲、雄：21.3～23.7g、雌：18.2～19.7g) 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、理由から Crj:BDF₁ マウス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、Crj:BDF₁ マウスを使用した。

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

投与期間は、がん原性試験の投与濃度を決定するために13週間（1995年2月15日～1995年5月16,19日：92～95日間）とし、解剖前日まで連続投与した。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7日間に一回とした。

Ⅱ-1-4 投与濃度

最高投与濃度を7500 ppmに設定し、以下、5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm（公比1.5）とした。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた

Ⅱ-1-5 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、水に難溶であるため、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を決定するために13週間とした（文献 5）。

各群の投与濃度は2週間の予備試験（文献 6）の結果をもとに設定した。すなわち、2週間試験では6週齢のCrj:BDF₁マウス(SPF)雌雄に10000 ppm、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、625 ppm（公比2）の濃度の混餌飼料を2週間自由摂取させた。その結果、10000 ppm群では雄に2匹、雌に6匹の動物が死亡し、雌雄ともに顕著な体重増加の抑制と摂餌量の低下、肝臓、腎臓、血液系への影響が認められた。5000 ppm群では、体重増加の抑制と摂餌量の減少は認められず、肝臓、腎臓、血液系への影響も減少した。

これらの結果から、13 週間試験の最高投与濃度は 5000 ppm 以上 10000 ppm 未満に設定すべきであると考えた。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。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

7500 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）を用いて粒径 0.5 mm 以下に粉碎した 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、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm の被験物質混合飼料については、まず、混合機（スパイラルミキサー：関東混合機社 CS-20 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 10000 ppm の被験物質混合飼料を調製し、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調製は、投与開始直前に 1 回、投与期間中に 2 回の計 3 回実施した。調製された被験物質混合飼料は冷蔵保存し、1 回の調製分につき最長 6 週間使用した。

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、初回調製時、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）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、99.3～101.0%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 L 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、10000 ppm 及び 625 ppm の被験物質混合飼料について調製時及び調製後 7 日目に室温放置の被験物質混合飼料中における被験物質濃度をガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）を用いて分析し、測定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、調製後 7 日目には 90.2～95.3 % であり、投与状態（室温放置）での被験物質混合飼料

中の被験物質は安定であることを確認した。その結果を APPENDIX L 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、試験に先立ち 10000 ppm 及び 625 ppm の被験物質混合飼料について調製時及び調製後 14 週目に冷蔵保存の被験物質混合飼料中における被験物質濃度をガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) を用いて分析し、測定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、14 週間冷蔵保存後には 89.3～96.5 % であり、測定濃度に大きな差はみられず、冷蔵状態での混合飼料中の被験物質は安定であることを確認した。その結果を APPENDIX L 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 当たり一日摂取量 (g/kg body weight/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)
1481 ppm群	10匹 (1101～1110)	1481 ppm群	10匹 (2101～2110)
2222 ppm群	10匹 (1201～1210)	2222 ppm群	10匹 (2201～2210)
3333 ppm群	10匹 (1301～1310)	3333 ppm群	10匹 (2301～2310)
5000 ppm群	10匹 (1401～1410)	5000 ppm群	10匹 (2401～2410)
7500 ppm群	10匹 (1501～1510)	7500 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、発育順調で、異常を認めない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こと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 7)。

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(AC-2、空調エリア)内の独立した室(雌雄とも 202 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、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (実測値 平均 \pm 標準偏差: $22.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 10\%$ (実測値 平均 \pm 標準偏差: $56 \pm 2\%$)、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。

全飼育期間を通して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、112W \times 212D \times 120H mm)に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。

飼料は、検疫期間についてはオリエンタル酵母工業(株) 千葉工場(千葉県千葉市美浜区新港 8-2)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について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。ただし、定期解剖日前日の夕方からは絶食させた。

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)から分析データを使用ロット毎に入手し、保管した。飼料中の夾雑物については(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)の分析データを使用ロット毎に入手し、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、毎日1回生死及び瀕死の確認を行い、一般状態の詳細な観察は毎週1回実施した。

Ⅱ-3-2 体重測定

全動物について、毎週1回（投与開始直前及び各週7日目）に体重を測定した。なお、動物の死亡発見時と切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重を測定した。

Ⅱ-3-3 摂餌量測定

週1回、摂餌量を個体別に測定した。

Ⅱ-3-4 血液学的検査

定期解剖時まで生存し、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、血液学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食（18時間以上）させた。

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(MCV)、
平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、
血小板数、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 M 1に示した。

Ⅱ-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存し、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ン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血液生化学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食（18時間以上）させた。

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、トリグリセライド、リン脂質、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、

CPK、尿素窒素、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 M 1 に示した。

II-3-6 尿検査

投与最終週に採尿可能な全動物について新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

検査方法は APPENDIX M 1 に示した。

II-3-7 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

定期解剖時まで生存した全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

全動物の臓器を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、以下に示した臓器を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・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、胆嚢、膵臓、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、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨

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、小数点以下第1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kg当たりの1日摂取量は、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 body weight/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に示した単位及び桁数により表示した。

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、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、欠測となったデータについては母数より除いた。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

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。ただし、非腫瘍性病変については有効臓器数（供試臓器数から欠損臓器を除いた臓器数）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、対照群を基準として、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には、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対照群と各投与群のDunnett（型）の多重比較を行った。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。検定は、所見の見られなかった動物をグレード0として分類し各グレード毎の動物の度数分布により行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との χ^2 検定を行った。

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。

なお、予備検定については5%の有意水準で両側検定を行い、最終検定では5%及び1%両側検定を行った。

Ⅲ 試験成績

投与開始後 3 週 6 日目に雄の 1481 ppm 群において事故のため 1 匹の動物が死亡した。従って、当該動物は試験成績から除外した。

Ⅲ-1 生死状況

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

雄：

7500 ppm 群で投与開始後 2 週目で 2 匹、3 週目及び 7 週目で 1 匹の計 4 匹の死亡が認められた。また、3333 ppm 群で 3 週目に 1 匹の死亡が認められた。

雌：

7500 ppm 群で投与開始後 3 週目、4 週目、7 週目及び 8 週目でそれぞれ 1 匹の死亡が認められた。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に示した。

雌雄ともに全投与群で投与開始翌週（1 週 7 日）より、投与終了（13 週 7 日）まで黄色尿が観察された。その他、雌雄とも、7500 ppm 群で立毛が投与中期に少数例（雄：1～4 匹、雌：1～3 匹）観察された。

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 7500 ppm 群で体重の著しい減少が初期の 4～5 週にみられ、その後も体重増加の抑制傾向がみられた。他の投与群の体重は、対照群と同様な推移を示した。

最終計測日（13 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 7500 ppm 群：66 %、5000 ppm 群：96 %、3333 ppm 群：98 %、2222 ppm 群：99 %、1481 ppm 群：99 %、雌では 7500 ppm 群：78 %、5000 ppm 群：103 %、3333 ppm 群：108 %、2222 ppm 群：105 %、1481 ppm 群：104 %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。

雄では、7500 ppm 群で投与開始後 4 週目から 9 週目まで、雌では、7500 ppm 群で投与開始後 4 週目から 12 週目まで、ともに摂餌量の低値が認められた。

投与期間中の投与群の摂餌量は、対照群に対して、雄では 7500 ppm 群：67～114 %、5000 ppm 群：81～106 %、3333 ppm 群：87～111 %、2222 ppm 群：93～116 %、1481 ppm 群：93～121 %、雌では 7500 ppm 群：70～103 %、5000 ppm 群：86～119 %、3333 ppm 群：89～112 %、2222 ppm 群：94～108 %、1481 ppm 群：94～111 %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摂取量を APPENDIX D 1, 2 に示した。

全投与期間における 1 日当たりの平均被験物質摂取量 (g/kg body weight/day) は、雄で 7500 ppm 群：1.647、5000 ppm 群：0.775、3333 ppm 群：0.530、2222 ppm 群：0.374、1481 ppm 群：0.245、雌では 7500 ppm 群：1.601、5000 ppm 群：0.936、3333 ppm 群：0.613、2222 ppm 群：0.423、1481 ppm 群：0.284 であった。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 5, 6, APPENDIX E 1, 2 に示した。

雄：

血小板数の減少が 7500 ppm 群を除く全ての群、赤血球数の減少が 2222 ppm 以上の群、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の減少が 5000 ppm 以上の群、メトヘモグロビン濃度と分葉核好中球比の増加ならびにリンパ球比の減少が 7500 ppm 群で認められた。その他、2222 ppm 群と 5000 ppm 群で MCV の増加、2222 ppm 群で MCH の増加が認められた。

雌：

MCV の増加が 7500 ppm 群を除く全ての群、赤血球数の減少と MCH の増加が 3333 ppm と 7500 ppm 群、メトヘモグロビン濃度の増加ならびにヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少が 7500 ppm 群で認められた。その他、1481 ppm 群と 2222 ppm 群で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 TABLE 7, 8、APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄：

リン脂質の増加が全投与群、総コレステロールとカルシウムの増加が 2222 ppm 以上の群、総蛋白とアルブミンの増加ならびに GOT と GPT の上昇が 3333 ppm 以上の群、LDH、ALP、 γ -GTP 及び CPK の上昇が、A/G 比と総ビリルビンの増加及びカリウムの減少が 7500 ppm 群で認められた。その他、3333 ppm 群と 5000 ppm 群でトリグリセライドの増加が認められた。

雌：

カリウムの減少が 2222 ppm 群を除く各投与群、総コレステロールとリン脂質の増加ならびに GOT 及び GPT の上昇が 2222 ppm 以上の群で、総蛋白の増加が 2222 ppm 群、5000 ppm 群及び 7500 ppm 群、カルシウムの増加とクロールの減少が 3333 ppm 以上の群、 γ -GTP の上昇と尿素窒素の増加が 5000 ppm 以上の投与群、アルブミンの増加が 1481 ppm 群と 7500 ppm 群、ALP の上昇とナトリウムの減少が 7500 ppm 群で認められた。その他、2222 ppm 群、3333 ppm 群及び 5000 ppm 群でトリグリセライドの増加が認められた。

Ⅲ-8 尿検査

投与期間の最終週に行った尿検査の結果を TABLE 9, 10、APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄： 7500 ppm 群で蛋白の陽性度の減少が認められた。その他、1481 ppm 群で pH の低下、3333 ppm 群でケトン体の陽性度の増加が認められた。

雌： 3333 ppm 群と 7500 ppm 群で蛋白の陽性度の減少が認められた。

Ⅲ-9 病理学的検査

Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX H 1, 2 (全動物)、APPENDIX H 3,4 (死亡・瀕死動物)、APPENDIX H 5 (定期解剖動物 雄のみ、雌は所見なし) に示した。

瀕死・死亡例 (雄：3333 ppm 群 1 匹、7500 ppm 群 4 匹、雌：7500 ppm 群 4 匹) では、雄に胸腺の萎縮が 3333 ppm 群に 1 匹、7500 ppm 群に 3 匹認められた。雌では 7500 ppm 群に胸腺の萎縮が 3 匹と胃の潰瘍が 1 匹認められた。

定期解剖匹では、雄に肝臓の白色斑が投与濃度に対応して認められた (対照群：2 匹、1481 ppm 群：1 匹、2222 ppm 群：3 匹、3333 ppm 群 3 匹、5000 ppm 群 6 匹、7500 ppm 群 3 匹)。脾臓に黒色斑、肝臓に結節、水腎症が認められた。

雌には変化は認められなかった。

Ⅲ-9-2 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 TABLE 11, 12、APPENDIX I 1, 2（実重量）、J 1, 2（体重比）に示した。

雄：

肝臓では、実重量と体重比の高値が全ての投与群に認められた。

脾臓では、3333 ppm 群と 5000 ppm 群に実重量と体重比の高値が認められ、7500 ppm 群では実重量のみが高値を示した。

精巣では、実重量と体重比の低値が 7500 ppm 群に認められた。

雌：

肝臓では、実重量と体重比の高値が 2222 ppm 以上の群に認められた。

脾臓では、2222 ppm 群、3333 ppm 群及び 5000 ppm 群に実重量と体重比の高値が認められ、7500 ppm 群では実重量のみが高値を示した。

卵巣では、実重量と体重比の低値が 7500 ppm 群に認められた。

その他、雌雄ともに腎臓の実重量と体重比が 5000 ppm 群で高値を示した。解剖時体重の差に伴う実重量や体重比の統計学的な有意差が、雌雄とも心臓、肺及び脳に示された。

Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE 13, 14、APPENDIX K 1, 2（全動物）、APPENDIX K3, 4（死亡瀕死動物）APPENDIX K 5, 6（定期解剖動物）に示した。

<死亡瀕死例>

雄：

7500 ppm 群の途中死亡例（4 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（中等度 2 匹、重度 2 匹）、単細胞壊死（軽度 4 匹）、結晶沈着（軽度 3 匹）及び中心性の空胞変性（重度 1 匹）、脾臓に萎縮（軽度 4 匹）とヘモジデリン沈着（中等度 1 匹）、精巣に精原細胞の壊死（中等度 4 匹）ならびに精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現（軽度 3 匹、中等度 1 匹）と精子の消失（重度 1 匹）及び鼻腔に嗅上皮の萎縮（軽度 2 匹）、胸腺に萎縮（中等度 3 匹）がみられた。しかし、これらの所見は動物の死亡の原因となりえる変化ではなく、病理組織学的に死因を特定できなかった。

なお、雄 3333 ppm 群の途中死亡例（1 匹）には、病理組織学的に変化を認めなかった。

雌：

7500 ppm 群の途中死亡例（4 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（軽度 1 匹、中等度 2 匹、重度 1 匹）、単細胞壊死（軽度 1 匹）、結晶沈着（軽度 3 匹）及び中心性の空胞変性（軽度 1 匹）、脾臓に萎縮（軽度 2 匹、中等度 2 匹）とヘモジデリン沈着（軽度 2 匹）、前胃の潰瘍（軽度 1 匹）、鼻腔に嗅上皮の萎縮（軽度 2 匹）、肺に鬱血（軽度 3 匹）、胸腺に萎縮（軽度 1 匹）、ならびに脳に出血（軽度 1 匹）がみられた。しかし、これらの所見は動物の死亡の原因となりえる変化ではなく、病理組織学的に死因を特定できなかった。

<定期解剖例>

雄の肝臓、脾臓、精巣、鼻腔及び精巣上体、雌の肝臓と脾臓に投与による影響を示す所見が観察された。

雄：

7500 ppm 群（6 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（軽度 1 匹、重度 5 匹）、巣状壊死（軽度 1 匹）、単細胞壊死（軽度 6 匹）、及び結晶沈着（軽度 6 匹）がみられた。肝細胞の巨大細胞化は細胞質の増大に加えて核の大型化を伴っていた。脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 3 匹、中等度 3 匹）と髄外造血の増加（軽度 2 匹、中等度 4 匹）、精巣に精原細胞の壊死（中等度 6 匹）、ならびに精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現（軽度 3 匹、中等度 3 匹）と精子の消失（重度 5 匹）が認められた。鼻腔に嗅上皮の萎縮（軽度 4 匹）がみられた。

5000 ppm 群（10 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（中等度 1 匹、重度 9 匹）、巣状壊死（軽度 4 匹、中程度 1 匹）、単細胞壊死（軽度 10 匹）、及び結晶沈着（軽度 10 匹）が認められた。脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）と髄外造血の増加（軽度 3 匹、中等度 7 匹）、精巣上体に精子の消失が 1 匹（軽度）でみられた。

3333 ppm 群（9 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（中等度 1 匹、重度 8 匹）、巣状壊死（軽度 3 匹）、単細胞壊死（軽度 8 匹）、及び結晶沈着（軽度 9 匹）が認められた。脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 9 匹）と髄外造血の増加（軽度 7 匹、中等度 2 匹）がみられた。

2222 ppm 群（10 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（中等度 10 匹）、巣状壊死（軽度 2 匹）、単細胞壊死が 3 匹（軽度）と結晶沈着（軽度 5 匹）が認められた。脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）と髄外造血の増加（軽度 5 匹）がみられた。

1481 ppm 群（9 匹）では、中心性の肝細胞の巨大細胞化（中等度 9 匹）、巣状壊死（軽度 1 匹）、単細胞壊死（軽度 1 匹）が認められた。また、脾臓にはヘモジデリン沈着が 6 匹（軽度 5 匹、中等度 1 匹）と髄外造血（軽度 1 匹）で観察された。

雌：

7500 ppm 群（6 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（重度 6 匹）、単細胞壊死（軽度 5 匹）及び結晶沈着（軽度 6 匹）が認められた。脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 6 匹）と髄外造血の増加（軽度 1 匹、中等度 4 匹）がみられた。

5000 ppm 群と 3333 ppm 群（各 10 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（3333 ppm 群：中等度 4 匹、重度 6 匹、5000 ppm 群：重度 10 匹）、単細胞壊死（両群とも軽度 10 匹）、及び結晶沈着（両群とも軽度 10 匹）が認められた。脾臓にヘモジデリン沈着（両群とも軽度 10 匹）と髄外造血の増加（3333 ppm 群：軽度 10 匹、5000 ppm 群：軽度 8 匹、中等度 2 匹）がみられた。

2222 ppm 群（10 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（軽度 5 匹、中等度 5 匹）と単細胞壊死（軽度 4 匹）及び結晶沈着（軽度 10 匹）が認められた。脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 7 匹）と髄外造血の増加（軽度 4 匹）がみられた。

1481 ppm 群（10 匹）では、肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化（軽度 10 匹）と単細胞壊死（軽度 3 匹）が認められた。脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）と髄外造血の増加（軽度 2 匹）がみられた。

IV 考察及びまとめ

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの混餌投与によるがん原性試験の投与濃度を設定するために、Crj:BDF₁ マウスを用いて 13 週間試験を実施した。被験物質投与群 5 群、対照群 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。投与用量は、雌雄とも 7500 ppm、5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm とした。

(1) 用量－反応関係

7500 ppm 群では、雌雄ともに、4 例の死亡、顕著な体重の減少と摂餌量の低下が認められた。肝臓への影響として、雌雄ともに総蛋白、アルブミン、総コレステロール及びリン脂質の増加、ALP、 γ -GTP、GOT、GPT 及び LDH（雄のみ）の上昇及び雄に総ビリルビンの増加が認められた。また、雄の半数に肝臓の白色斑が、雌雄ともに肝臓の実重量と体重比の高値、肝臓に巣状壊死、単細胞壊死及び中心性の肝細胞の巨大細胞化が認められた。血液系への影響として、雌雄ともに赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、メトヘモグロビン濃度の増加及び脾臓に髓外造血増加とヘモジデリン沈着が認められた。腎臓への影響として、雌にのみ尿素窒素の増加及び腎臓の実重量と体重比の高値が認められた。なお、尿蛋白の陽性度は雌雄とも低下した。精巣への障害として、精原細胞壊死、精巣上体の精巣上皮系細胞の残屑の出現と精子の消失が認められた。消耗性変化として、雄に CPK の上昇及び雌雄の死亡例に胸腺の萎縮が観察された。雄の鼻腔に嗅上皮の萎縮が認められ、鼻腔への影響も示唆された。

5000 ppm 群では、雌雄ともに死亡、体重増加の抑制と摂餌量の低下は認められなかった。

肝臓への影響として、総蛋白、総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の増加、 γ -GTP、GOT、GPT の上昇が雌雄ともに、アルブミンの増加、ALP と LDH の上昇が雄に、約半数の動物に肝臓の白色斑が、肝臓の実重量と体重比の高値が雌雄に、肝臓の巣状壊死、単細胞壊死及び中心性の肝細胞の巨大細胞化が認められた。血液系への影響として、雄に赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少、脾臓には雌雄とも実重量と体重比の高値、髓外造血増加及びヘモジデリン沈着が認められた。腎臓への影響として、雌にのみ尿素窒素の増加及び腎臓の実重量と体重比の高値が認められた。消耗性変化として、雄にのみ CPK の上昇が認められた。

3333 ppm 群では、雄 1 例の死亡が認められた。肝臓への影響として、GOT と GPT の上昇、総コレステロールとリン脂質の増加が雌雄ともに、総蛋白とアルブミンの増加が雄にのみ、雌雄の肝臓に実重量と体重比の高値及び肝臓の単細胞壊死、結晶沈着と中心性の肝細胞の巨大細胞化の発生が認められた。血液系への影響として、雌雄の赤血球数の減少、脾臓には雌雄とも実重量と体重比及び髓外造血増加とヘモジデリン沈着が認められた。

2222 ppm 群では、肝臓への影響として、GOT と GPT の上昇及び総蛋白の増加が雌にのみ、総コレステロールとリン脂質の増加、肝臓の実重量と体重比の高値、肝臓の中心性の

肝細胞の巨大細胞化、単細胞壊死、結晶沈着が認められた。血液系への影響として雄に赤血球数の減少、脾臓には雌雄ともにヘモジデリン沈着、髄外造血の増加、雌にのみ実重量と体重比の高値が認められた。

1481 ppm 群では、肝臓への影響として、雄にのみ総コレステロールとリン脂質の増加及び肝臓の実重量と体重比の高値、また雌雄ともに肝臓に中心性の肝細胞の巨大細胞化と単細胞壊死が認められた。また、雌にのみ脾臓に軽度なヘモジデリン沈着が認められた。

なお、雌雄ともに、黄色尿が全投与群に投与期間を通して観察された。

被験物質の 13 週間混餌投与によるマウスの毒性影響は、下記のように概括される。被験物質の投与により、7500 ppm 群で死亡、摂餌量の低下と体重の減少がみられた。被験物質による毒性の主要標的臓器は、雄では肝臓、血液系/脾臓、生殖器及び鼻腔であり、雌では肝臓、血液系/脾臓及び腎臓であった。これらの臓器への影響は、肝臓では雌雄とも 1481 ppm 以上の群でみられ、特に、その変化は 2222 ppm 以上の群で顕著であった。血液系/脾臓への影響は雄では 2222 ppm 以上、雌では 1481 ppm 以上の群でみられたが、3333 ppm 以下の群では軽度の影響であった。なお、雄のみに生殖器及び鼻腔への影響が 7500 ppm 群、雌にのみ腎臓への影響が 5000 ppm 以上の群でみられた。

(2) 無毒性量 (NOAEL) /最小毒性量 (LOAEL)

従って、マウスにおける 13 週間の混餌投与による最小毒性量は、雌雄の肝臓への影響及び雌の血液系/脾臓への影響をエンドポイントとして 1481 ppm (雄 ; 0.245 g/kg body weight/day、雌 ; 0.284 g/kg body weight/day) であると考えられる。

(3) 他文献との比較等

- ① 黄色尿が全ての投与群で投与期間を通して観察された。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 8)。黄色を呈した 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン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 9)。
- ② 投与濃度に対応したメトヘモグロビン濃度の増加、血液学的指標値の変化及び脾臓のヘモジデリン沈着と髄外造血の増加が認められた。染料等に多用される芳香族ニトロ化合物に暴露された労働者のメトヘモグロビン血症は、メトヘモグロビン形成と赤血球ハイנטツ小体の特徴とし、20 %以上のメトヘモグロビン濃度で自覚症状が出現し、溶血による貧血をもたらすことが知られている (文献 10)。本試験では血液学的指標値の変化として赤血球の低下などがみられ、脾臓ではヘモジデリン沈着の増加が認められることから、赤血球の溶血が亢進していることが示唆される。しかし、メトヘモグロビン濃度

の値はわずか 1.4～1.6%であり、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの血液系への影響の成因として、メトヘモグロビン形成による溶血以外の要因も検討する必要がある。

(4) がん原性試験の最大耐量

被験物質の2年混餌投与によるマウスのがん原性試験における投与濃度は、上記の13週試験結果を考慮して、下記のように設定した。5000 ppm 群、3333 ppm 群及び2222 ppm 群では、体重増加の抑制はほとんどみられなかったが、肝臓への影響は顕著であった。従って、2222 ppm 以上の濃度の104週間連続投与に動物は耐えられないと考えた。また1481 ppm 群では体重増加の抑制及び摂餌量の低下はみられず、臓器への重篤な影響も認められなかったことから、がん原性試験の最大耐量は1481 ppm 以上で2222 ppm 未満の濃度範囲に存在すると考え、最高投与濃度を2000 ppm に設定した。また2週間試験の625 ppm 投与濃度で中心性の肝細胞肥大が認められたことから（文献 6）、がん原性試験の最低濃度は625 ppm 以下にすべきと考え、320 ppm に設定した。従って、がん原性試験の投与濃度は、雌雄ともに2000 ppm, 800 ppm, 320 ppm（公比 2.5）に設定することに決定した。

V 文献

1. 化学工業日報社 (2000)
13700 の化学商品
p.823, 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. McLafferty F. W. (1984)
Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition,
Entry Number 7422. John Wiley and Sons, Inc. (U.S.)
4. 和光純薬工業 (株) 提供資料 (1995)
赤外吸収スペクトル
5. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (1981)
Guideline for Testing of Chemicals 408 for "Subchronic Oral Toxicity"
—Rodent: 90-day Study. OECD, Paris.
6. 日本バイオアッセイ研究センター (2003)
1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのマウス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 0299), 日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
7. 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.
8. 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., 249, 7130 – 7139.

9. 日本バイオアッセイ研究センター (2003).

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), 日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川

10. 石津澄子 (1994)

芳香族ニトロ・アミノ化合物による中毒
現代労働衛生ハンドブック (増補改定第2版・本編), 三浦豊彦、他編,
pp. 855 – 860, (財) 労働科学研究所出版部、神奈川