

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

試験番号：0328

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-ニトロベンゼンのラットを用いた  
経口投与によるがん原性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0328

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 .....	4
I - 1 - 2 構造式、示性式、分子量 .....	4
I - 1 - 3 物理化学的性状等 .....	4

I - 2 被験物質の使用ロット等 .....	4
-------------------------	---

## I - 3 被験物質の特性・同一性、安定性

I - 3 - 1 特性・同一性 .....	5
I - 3 - 2 安定性 .....	5

I - 4 試験動物 .....	5
------------------	---

## II 試験方法

## II - 1 投与

II - 1 - 1 投与経路 .....	6
II - 1 - 2 被験物質の投与方法 .....	6
II - 1 - 3 投与期間 .....	6
II - 1 - 4 投与濃度 .....	6
II - 1 - 5 投与方法、投与期間、投与濃度及びその設定理由 .....	6
II - 1 - 6 被験物質混合飼料の調製方法 .....	7
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 .....	7
II - 1 - 8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性 .....	7
II - 1 - 9 被験物質の摂取量 .....	8

## II -2 動物管理

II -2-1 各群の使用動物数 .....	8
II -2-2 群分け及び個体識別方法 .....	8
II -2-3 飼育条件 .....	9

## 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 .....	9
II -3-2 体重測定 .....	9
II -3-3 摂餌量測定 .....	10
II -3-4 血液学的検査 .....	10
II -3-5 血液生化学的検査 .....	10
II -3-6 尿検査 .....	10
II -3-7 病理学的検査 .....	11

## II -4 数値処理と統計処理

II -4-1 数値の取り扱いと表示 .....	11
II -4-2 母数の取り扱い .....	12
II -4-3 統計処理 .....	12

## III 試験成績

III-1 生死状況 .....	14
III-2 一般状態 .....	14
III-3 体重 .....	14
III-4 摂餌量 .....	14
III-5 被験物質摂取量 .....	15
III-6 血液学的検査 .....	15
III-7 血液生化学的検査 .....	15
III-8 尿検査 .....	16
III-9 病理学的検査 .....	16
III-9-1 剖検 .....	16
III-9-2 臓器重量 .....	16
III-9-3 病理組織学的検査 .....	17
III-9-4 死因 .....	20

IV 考察及びまとめ .....	21
IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連性病変 .....	21
IV-2 非腫瘍性病変 .....	23
IV-3 無毒性量(NOAEL)/最小毒性量(LOAEL)及びベンチマーク用量 .....	24
IV-4 他文献との比較等 .....	24
V 結論 .....	25
VI 文献 .....	26

## 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)ラットを用いた混餌経口投与による 2 年間（104 週間）の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、雌雄各群とも 50 匹とし、合計 400 匹を用いた。被験物質の投与は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン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 320ppm、800ppm、2000ppm（公比 2.5）とした。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。

雌雄とも全投与群の生存率は、対照群とほぼ同様の推移を示した。雌雄 2000ppm 群では投与期間を通して顕著な体重の低値が認められ、800ppm 群と 320ppm 群でも雄では投与期間の終期に、雌ではほぼ全投与期間を通して僅かな体重の低値が認められた。摂餌量は、雄の 2000 ppm 群では投与期間の初期に、雌の 2000 ppm 群では投与期間を通して、有意な低値を示した。また、雌雄ともに全投与群に、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みられた。

腫瘍性病変として、雄ラットに肝細胞腺腫及び肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生の増加、並びに耳道腺腺腫の発生増加が 2000ppm 群で認められた。これらの腫瘍発生数は、投与濃度に対応した有意な増加傾向を示すこと及び当センターのヒストリカルコントロールデータの自然発生率を超えていることから、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与によって惹起された腫瘍であると考えられた。さらに、肝臓腫瘍の前腫瘍性病変として好塩基性小増殖巣の増加が雄の 800ppm 以上の投与群で、また肝臓への影響を示唆する  $\gamma$ -GTP の上昇と肝重量の増加が雌雄とも全投与群で認められた。

雄ラットには腎細胞腺腫と腎細胞癌の僅かな発生増加もみられた。この腎腫瘍の増加は慢性腎症の増強や腎孟上皮の過形成、腎臓乳頭部の鉱質沈着の発生増加を伴っていることから、13 週間試験でみられた  $\alpha$ 2 マイクログロブリンの蓄積に関連した腫瘍増加と考えられた。また、腎臓への影響を示す尿素窒素の増加が雄の 320ppm 群を除く雌雄の全投与群に認められた。

その他、雄ラットの皮膚腫瘍、雌ラットの子宮乳頭状腺腫と腺癌及び乳腺腺癌も、腫瘍発生数の統計検定結果及びヒストリカルコントロールデータとの比較から、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与により発生増加した可能性があることが示唆された。

血液学的検査では、雌にのみ 800ppm 群と 2000ppm 群で貧血を示唆する軽度の変化が認められた。

ラットにおける 2 年間の混餌投与による 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの最小毒性量 (LOAEL) は、肝臓への影響 ( $\gamma$ -GTP と肝重量) をエンドポイントとして、320 ppm(0.012

～0.028 g/kg body weight/day)と考察された。また、 $\gamma$ -GTP と投与濃度との用量一反応関係から算出した 10%ベンチマーク用量(BMDL<sub>10</sub>)は 56.2 ppm となった。

以上のように、F344/DuCrj(Fisher) ラットを用いた 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの 2 年間(104 週間)にわたる混餌投与によるがん原性試験の結果、雄に肝細胞腺腫及び肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生の増加、ならびに耳道腺腺腫の発生増加が認められ、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのがん原性を示す証拠と考えられた。また、雄に皮膚腫瘍、雌に子宮腫瘍(乳頭状腺腫と腺癌)と乳腺の腺癌の発生増加が認められ、これらの腫瘍の発生増加も 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による可能性があると示唆された。なお、雄では、雄ラットに特有な好酸体の増加に起因すると推察される腎臓腫瘍の発生増加もみられた。

## 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雄)

	投与濃度 (ppm)		0	320	800	2000	ペトーレ 検定	コクラン-アミテージ 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	0	1	0	6*	↑↑	↑↑
	腎臓	腎細胞腺腫	0	0	0	2		
	耳道腺	腺腫	0	0	0	4	↑↑	↑↑
	皮膚	扁平上皮乳頭腫	1 <sup>a)</sup>	2	3	4		
		角化棘細胞腫	0 <sup>a)</sup>	3	3	2		
	精巣	間細胞腫	34	41	41	40		
		精巣網腺腫	4	1	5	1		
	下垂体	腺腫	19	16	12	9*		↓
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌	0	0	1	2		
	腎臓	腎細胞癌	0	1	0	1		
	皮膚	扁平上皮癌	0	0	1	1		
	脾臓	单核球性白血病	5	8	5	1		↓
皮膚	肝臓	肝細胞腺腫+肝細胞癌	0	1	1	8*	↑↑	↑↑
	腎臓	腎細胞腺腫+腎細胞癌	0	1	0	3	↑	↑
		扁平上皮乳頭腫+角化棘細胞腫+扁平上皮癌	1 <sup>a)</sup>	5	6	7*	↑	

## 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雌)

	投与濃度 (ppm)		0	320	800	2000	ペトーレ 検定	コクラン-アミテージ 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	子宮	内膜間質性ポリープ	6 <sup>a)</sup>	7	9	11	↑	
		乳頭状腺腫	0 <sup>a)</sup>	0	0	1		
	甲状腺	C-細胞腺腫	0 <sup>a)</sup>	5*	2	3 <sup>a)</sup>		
	乳腺	線維腺腫	10	5	2*	5		
	副腎	褐色細胞腫	3	2	0	0		
悪性腫瘍	子宮	腺癌	1 <sup>a)</sup>	2	2	3		
	乳腺	腺癌	0	0	0	4	↑↑	↑↑
	副腎	褐色細胞腫: 悪性	1	1	1	0		
	子宮	乳頭状腺腫+腺癌	1 <sup>a)</sup>	2	2	4	↑	
	副腎	褐色細胞腫+褐色細胞腫: 悪性	4	3	1	0		↓

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

\*: p≤0.05 で有意

\*\*: p≤0.01 で有意

(フィッシャー検定)

↑: p≤0.05 で有意増加

↑↑: p≤0.01 で有意増加

(ペトーレ、コクラン-アミテージ 検定)

↓: p≤0.05 で有意減少

↓↓: p≤0.01 で有意減少

(コクラン-アミテージ 検定)

a) : 検査動物数 49、他は上段に表示の検査動物数と同じ

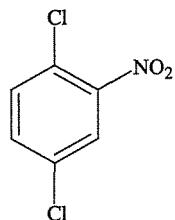
## I 試験材料

### 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）



C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>N O<sub>2</sub>

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

### 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 一 ド : 和光試薬 1 級  
 純 度 : 98.8% (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 P 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、赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) により赤外吸収スペクトルを測定し、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、それぞれ使用前後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 P 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 F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。

雌雄各 227 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 200 匹（投与開始時体重範囲、雄：115～132g、雌：88～103g）を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)を選択した理由は、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による。

## 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 104 週間とし、定期解剖日の前日まで連続投与した(1997 年 2 月 13 日～1999 年 2 月 11～17 日)。なお、被験物質混合飼料の交換は 7 日毎に実施した。

#### II-1-4 投与濃度

最高投与濃度を 2000ppm に設定し、以下、800ppm 及び 320ppm (公比 2.5) 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 投与の方法、投与期間及び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、OECD がん原性試験ガイドライン（文献 5）に従い、2 年間（104 週間）とした。

各群の投与濃度は 13 週間予備試験（文献 6）の結果をもとに設定した。すなわち、13 週間予備試験では 6 週齢の F344/DuCrj(Fischer) ラット(SPF) 雌雄に 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンを各設定濃度に調製した混餌を 13 週間自由摂取させた。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。被験物質投与濃度は、雌雄とも 7500ppm、5000ppm、3333ppm、2222ppm、1481ppm (公比 1.5) とした。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、最高用量の 7500ppm 群と 5000ppm 群では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/脾臓への影響が認められた。3333ppm 群と 2222ppm 群では、体重増加の抑制と摂餌量の減少の程度もより軽度であったが、雌雄ともに貧血傾向、雄には腎臓に尿細管上皮の剥離が認められた。1481ppm 群では、雄の腎臓の尿細管上皮の剥離の程度も軽く、貧血を示す検査値も顕著な変化を示さなかった。

上記の結果から、2222ppm 以上の濃度では 104 週間の連続投与に動物は耐えられないと考えた。1481ppm 群では、雄に軽度の腎臓尿細管上皮の剥離と貧血が認められた。従って、がん原性試験の最大耐量は、1481ppm 以上、2222ppm 未満の濃度範囲に存在すると考え、最高投与濃度を雌雄ともに 2000ppm とし、以下、公比 2.5 で 800ppm、320ppm に設定した。

#### II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

被験物質は、ロータースピードミル（フィリッヂ社製 P-14 型）を用いて、粒径 0.5 mm 以下に粉碎し、混合機（関東混合機社製 スパイラルミキサー SS-251 型）を用い、粉末飼料と直接混合して 5000ppm の被験物質混合飼料を調製した。さらに、この 5000ppm の被験物質混合飼料に粉末飼料を加え、混合機（関東混合機社製 スパイラルミキサー SS-251 型）により各設定濃度になるように混合した。なお、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 2 週間を越えない間隔で実施した。調製された被験物質混合飼料は各濃度毎に使用時まで冷蔵保存した。

#### 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

被験物質混合飼料中における被験物質の濃度は、概ね 3 ヶ月毎に、各投与濃度に調製された混合容器内の被験物質混合飼料を 3 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。なお、初回調製時のサンプリングは各濃度につき 7 点とし、均一性の確認をおこなった。

分析の結果、各群の平均調製濃度は設定濃度に対し、89.7～109.1% 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 P 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安定性は、2000 ppm 及び 320 ppm の被験物質混合飼料について調製時及び調製後 15 日目に投与状態（室温放置）と冷蔵保存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、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、調製後 15

日目には投与状態（室温放置）では 320ppm : 91.6%、2000ppm : 87.5%、冷蔵保存では 320ppm : 92.5%、2000ppm : 87.8%であり、投与状態（室温放置）及び冷蔵保存の被験物質混合飼料中の被験物質は安定であった。その結果を APPENDIX P 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 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、雌雄各群 50 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	50 匹 (1001~1050)	対照群	50 匹 (2001~2050)
320 ppm	50 匹 (1101~1150)	320 ppm	50 匹 (2101~2150)
800 ppm	50 匹 (1201~1250)	800 ppm	50 匹 (2201~2250)
2000 ppm	50 匹 (1301~1350)	2000 ppm	50 匹 (2301~2350)

##### 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により群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(層別体重平均法：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した。投与期間においては耳パンチにより識別した。また、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物は検疫期間を含む全飼育期間、バリア区域 (AC-2 空調エリア) 内の独立した室 (雄を 203 室、雌を 205 室) にそれぞれ収容し、各室に試験番号、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、飼育期間を通して、温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ （実測値 平均±S.D 203室： $23.2 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、205室： $23.1 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ）、湿度  $55 \pm 10\%$ （実測値 平均±S.D 203室： $55 \pm 1.8\%$ 、205室： $56 \pm 1.7\%$ ）、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、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)の CRF-1 固型飼料(30KGy- $\gamma$ 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- $\gamma$ 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3ヶ月毎に分析を委託し、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

投与開始後14週までは週1回、それ以降は4週に1回、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

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（但し、104 週にも測定した）、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除した値を 1 日当たりの摂餌量とした。

### II-3-4 血液学的検査

定期解剖時まで生存した採血可能な全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 Q 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た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、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 Q 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、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

検査方法は APPENDIX Q 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。

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、胰臓、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、腎、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-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、残餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量から残餌量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 日当たりの平均摂取量を算出し、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、群毎の平均体重で除した値を 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 Q 2 に示した精度により表示し

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

体重及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、その中から欠測となったデータを除外して母数とした。

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を除外して母数とした。

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

剖検データは、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。病理組織学的検査データは、臓器別に、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

#### II-4-3 統計処理

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。

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  $\chi^2$  検定を行った。検定は所見のみ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  $\chi^2$  検定を行った。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定（文献 8）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また、Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス（注）を用いて、死亡率法（コンテックス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法+有病率法（コンテックス 0~4 の総計で検定）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。

各検定は 5% の有意水準で両側検定（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定は片側検定）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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

- 0 : 定期解剖例にみつかった腫瘍
- 1 : 死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍
- 2 : 多分 1 だと思うが、確かにない腫瘍
- 3 : 多分 4 だと思うが、確かにない腫瘍
- 4 : 死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関わっていた腫瘍

)

)

### III 試験成績

#### III-1 生死状況

生死状況を TABLE 1, 2 及び FIGURE 1, 2 に示した。

雌雄とも全投与群の生存率は、対照群とほぼ同様の推移を示した。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、雄では、対照群：40 匹(80%)、320 ppm 群：44 匹(88%)、800 ppm 群：41 匹(82%)、2000 ppm 群：39 匹(78%)、雌では、対照群：38 匹(76%)、750 ppm 群：35 匹(70%)、800 ppm 群：39 匹(78%)、2000 ppm 群：34 匹(68%) であった。

#### III-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を TABLE 5, 6 に示した。

雌雄ともに全ての投与群に投与直後から黄色尿が認められた。被毛の着色は、雌雄ともに 320 ppm 群では数匹に、800 ppm 群と 2000 ppm 群では約 40 匹に認められた。投与群の外部腫瘍と内部腫瘍の発生数は、対照群に比べて、ほぼ同じであった。

#### III-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 3, 4 及び APPENDIX B 1, 2 に示した。

雄では、体重の低値が、320 ppm 群の 98 週と 104 週に、800 ppm 群の 5~9 週と 82~104 週に、2000 ppm 群の全投与期間に認められた。

雌では、体重の低値が、320 ppm 群の 5 週と 8~98 週に、800 ppm 群で 5~98 週に、2000 ppm 群で全投与期間に認められた。

なお、投与終了時の各投与群の体重は、対照群に対して、雄では 320 ppm 群：95%、800 ppm 群：93%、2000 ppm 群：87% であり、雌では 320 ppm 群：97%、800 ppm 群：95%、2000 ppm 群：81% であった。

#### III-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 3, 4 と FIGURE 5, 6 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

雄の摂餌量は、320 ppm 群と 800 ppm 群では、対照群と同様な推移を示したが、2000 ppm 群では投与期間初期（10 週まで）に低下した。

雌では、320 ppm 群と 800 ppm 群は投与期間を通して対照群よりやや低い値で推移した。

2000 ppm 群では投与期間を通して低値が認められた。全投与期間における各群の平均一日摂餌量は、雄では、対照群：15.6g(100%)、320 ppm 群：16.0g(103%)、800 ppm 群：15.6g(100%)、2000 ppm 群：15.7g(101%)であり、雌では、対照群：11.7g(100%)、320 ppm 群：11.2g(96%)、800 ppm 群：11.0g(94%)、2000 ppm 群：10.3g(88%)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 日当たりの被験物質摂取量(g/kg body weight/day) は、雄で 320 ppm 群：0.012～0.028、800 ppm 群：0.031～0.069、2000 ppm 群：0.083～0.174、雌では 320 ppm 群：0.016～0.028、800 ppm 群：0.042～0.070、2000 ppm 群：0.113～0.166 の範囲にあった。

全投与期間にわたって平均した各投与群の被験物質摂取量の比率は、2.4～2.7 の範囲にあり、設定用量比（公比 2.5）に対応していた。

### III-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 7, 8 と APPENDIX E 1, 2 に示した。

雄では、MCV の減少が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に、MCH の減少が 2000 ppm 群に認められた。

雌では、ヘモグロビン濃度、MCV 及び MCH の減少が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に、ヘマトクリット値の減少が 2000 ppm 群に認められた。

### III-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 9, 10 と APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、 $\gamma$ -GTP の上昇が全投与群に、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、尿素窒素及びクレアチニンの増加が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に、カルシウムの増加及び A/G 比と CPK の低下が 2000 ppm 群に認められた。

雌では、総コレステロール、リン脂質及び尿素窒素の増加、並びに $\gamma$ -GTP の上昇が全投与群に、総蛋白、アルブミン、カルシウムの増加が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に、グルコースの増加が 2000 ppm 群に認められた。

### III-8 尿検査

尿検査の結果を TABLE 11, 12 と APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄では、ケトン体陽性を示す動物数は、800 ppm 群と 2000 ppm 群で減少した。蛋白の陽性度の増加を示す動物数が 2000 ppm 群で増加した。pH の低下傾向は 800 ppm 群に認められた。

雌では、ケトン体陽性を示す動物数は 800 ppm 群と 2000 ppm 群で減少した。

### III-9 病理学的検査

#### III-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX H 1~6 に示した。

雄では、腎臓の顆粒状変化が投与濃度に対応して増加した。その発生例数は、対照群で 7 匹、320 ppm 群で 10 匹、800 ppm 群で 27 匹、2000 ppm 群で 32 匹であった。

雌では、子宮の結節の発生数は、対照群で 6 匹、320 ppm 群で 6 匹、800 ppm 群で 7 匹、2000 ppm 群で 12 匹であった。

#### 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 13, 14 と APPENDIX I 1, 2、APPENDIX J 1, 2 に示した。

雄では、対照群に比較して、肝臓の実重量と体重比の高値が全投与群で認められた。腎臓の実重量の高値が 2000 ppm 群に、体重比の高値が全投与群に、また、精巣の体重比の高値が 2000 ppm 群に認められた。なお、320 ppm 群で肺と脳の体重比の高値、800 ppm 群で副腎、心臓、肺及び脳の体重比の高値、2000 ppm 群で心臓の実重量の低値と体重比の高値、副腎、肺及び脳の体重比の高値が認められたが、これらの体重比の変化は全投与群の解剖時体重の有意な低下に起因すると推察された。

雌では、肝臓の実重量の高値が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に、体重比の高値は全投与群に認められた。また、腎臓の体重比の高値が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に認められた。なお、2000 ppm 群では、解剖時体重の低下に起因すると思われる心臓と肺の実重量の低値及び体重比の高値、副腎と脾臓の実重量の低値、卵巣と脳の体重比の高値が認められた。

### III-9-3 病理組織学的検査

主な腫瘍性病変と非腫瘍性病変及びそれらの発生数は TABLE 15, 16 に示した。また、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を APPENDIX L 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX M 1, 2 に、統計解析(Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定)の結果を APPENDIX N 1, 2 に、転移性病変を APPENDIX O 1~6 に示した。

#### 一腫瘍性病変一

本試験でみられた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ（試験毎の発生率（最小%～最大%）と平均発生率(%)、発生例数/総数）を雌雄別にそれぞれ TABLE 18 と 19 に示した。それぞれの投与濃度における腫瘍発生率をヒストリカルコントロールデータの試験毎の最大発生率と比較した。

#### <肝臓>

雄の肝細胞腺腫の発生数は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2000 ppm 群に増加がみられた。肝細胞腺腫の 2000 ppm 群における発生率(6 匹、12%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。雄の 2000 ppm 群でみられた肝細胞癌の発生(2 匹、4%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。なお、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生数は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2000 ppm 群に増加がみられた(8 匹、16%)。肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生率(16%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。

#### <腎臓>

雄の腎細胞腺腫は 2000 ppm 群に 2 匹(4%)、腎細胞癌は 320 ppm 群と 2000 ppm 群に各 1 匹(2%) みられたが、ともに傾向検定による増加傾向あるいは Fisher 検定による発生率の増加を示さなかった。しかし腎細胞腺腫と腎細胞癌を合わせた発生数(3 匹、6%) は、Peto 検定（有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。雄の腎細胞腺腫の 2000 ppm 群における発生率(4%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲よりやや高い値であった。雄の腎細胞癌の 320 ppm 群と 2000 ppm 群における発生率(2%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内であった。2000 ppm 群における腎細胞腺腫と腎細胞癌を合わせた発生率(3 匹、6%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。

#### <耳道腺>

雄の腺腫の発生数は、Peto 検定（有病率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。2000 ppm 群における腺腫発生率(4 匹、8%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。

## &lt;子宮&gt;

乳頭状腺腫は、2000 ppm 群に 1 匹 (2%)、また、腺癌は、対照群に 1 匹 (2%)、320 ppm 群に 2 匹 (4%)、800 ppm 群に 2 匹 (4%) 及び 2000 ppm 群に 3 匹 (6%) みられた。これらの腫瘍は、単独では傾向検定による増加傾向も Fisher 検定による発生率の増加を示さなかった。しかし、乳頭状腺腫と腺癌を合わせた発生数は、Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。2000 ppm 群でみられた乳頭状腺腫は、発生匹数が 1 匹ではあったが、当センターのヒストリカルコントロールデータで前例がない腫瘍であった。また、子宮腺癌の 2000 ppm 群における発生率(6%)は、ヒストリカルコントロールデータの範囲よりやや高い値であった。2000 ppm 群における乳頭状腺腫と腺癌の合わせた発生率 (8%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。

内膜間質性ポリープの発生数は、Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示したが、このポリープの 2000 ppm 群における発生率 (22%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内であった。

## &lt;乳腺&gt;

雌の線維腺腫の発生数は、Fisher 検定で 800 ppm 群に減少がみられた。しかし 800 ppm 群における発生率 (2 匹、4%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内にあり、投与用量と線維腺腫発生率の減少との関係は明らかではないと判断した。

雌の腺癌の発生数は Peto 検定（死亡率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。乳腺腺癌の 2000 ppm 群における発生率 (4 匹、8%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲よりやや高い値であった。

## &lt;脾臓&gt;

雄の单核球性白血病の発生数は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。この腫瘍の 2000 ppm 群における発生率 (1 匹、2%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲の下限よりも低い値となり、腫瘍発生は投与用量に対応して減少すると判断した。

## &lt;甲状腺&gt;

雌の C一細胞腺腫の発生数は、Fisher 検定で 320 ppm 群に有意な増加がみられた。しかし、この腺腫の 320 ppm 群における発生率 (5 匹、10%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内にあり、投与用量に対応した発生率の増加ではないと判断した。

## &lt;下垂体&gt;

雄の腺腫の発生数は、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。Fisher 検定で 2000 ppm 群に減少がみられた発生 (9 匹、18%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲の下限の値に相当し、投与用量と腺腫発生との関係は明らかではないと判断した。

## &lt;副腎&gt;

雌の褐色細胞腺腫は、対照群に3匹(6%)、320 ppm群に2匹(4%)の発生がみられ、褐色細胞腺腫(悪性)は対照群、320 ppm群及び800 ppm群に各1匹(2%)の発生がみられた。これに対し、雌の2000 ppm群にはこれらの腫瘍の発生がみられなかった(0匹、0%)。しかし投与群におけるいずれの腫瘍発生率もヒストリカルコントロールデータの範囲内にあった。雌の褐色細胞腺腫と褐色細胞腫(悪性)を合わせた発生数は、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示したが、2000 ppm群での発生率(0%)は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲の下限にあった。従って、腫瘍発生率の減少傾向は投与用量に対応した変化ではないと判断した。

## &lt;皮膚&gt;

雄の扁平上皮乳頭腫、角化棘細胞腫、扁平上皮癌のそれぞれの腫瘍の発生は、傾向検定による増加傾向も Fisher 検定による発生率増加も示さなかった。しかし、扁平上皮乳頭腫の800 ppm群における発生(3匹、6%)と2000 ppm群における発生(4匹、8%)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。角化棘細胞腫の各投与群における発生(320 ppmと800 ppm群:3匹、6%、2000 ppm群:2匹、4%)及び扁平上皮癌の800 ppmと2000 ppm群における発生(1匹、2%)は、それぞれのヒストリカルコントロールデータの範囲内にあった。3種の腫瘍を合わせた発生数は、Peto 検定(有病率法)で増加傾向を示し、Fisher 検定で2000 ppm群に増加を示し(7匹、14%)、この発生率(14%)は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲よりやや高い値であった。

## -非腫瘍性病変-

非腫瘍性病変の結果を TABLE 15, 16、APPENDIX K 1~6 に示した。

## &lt;肝臓&gt;

雄では、好塩基性小増殖巣の発生数が800 ppm群と2000 ppm群で有意に増加した。胆管増生の程度は2000 ppm群で減弱した。

雌では、中心性壊死は、2000 ppm群で4匹(軽度)に発生したのに対し、対照群では2匹(中等度)の発生がみられ、両群の間に統計学的な有意差が示されたが、生物学的に有意な変化であるとは考えられなかった。

## &lt;腎臓&gt;

雄の慢性腎症は、投与濃度が高い群ほど、重度の病変を有する動物が多くなった。また、雄の腎孟上皮の過形成も各投与群で増加、乳頭部の鉱質沈着は800 ppm以上の群で増加を示した。

雌については、2000 ppm群の乳頭部の鉱質沈着の発生が他の群に比べて増加傾向を示した。

## &lt;鼻腔&gt;

雄では、呼吸上皮のエオジン好性変化の発生が 2000 ppm 群で増加した。

雌では、嗅上皮のエオジン好性変化の発生が 2000 ppm 群で低下を示した。

## &lt;骨髄&gt;

造血亢進が雌の 2000 ppm 群で増加した。

## &lt;前立腺&gt;

炎症の発生は、投与濃度が高い群ほど減少し、800 ppm 以上の群に低下が認められた。

## &lt;眼球&gt;

白内障と網膜萎縮は雌の 2000 ppm 群で減少がみられた。

## III-9-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 17 に示した。

雄では、2000ppm 群の死亡／瀕死動物 11 匹のうち、3 匹の死因が慢性腎症であり、対照群（0/10 匹）に比べやや多かった。

雌では、2000ppm 群の死亡／瀕死動物 16 匹のうち、4 匹の死因が乳腺腫瘍、3 匹の死因が子宮腫瘍であり、対照群（12 匹中各 1 匹）に比べ、やや多かった。

## IV 考察及びまとめ

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのラット2年間混餌経口投与（投与濃度：320 ppm, 800 ppm, 2000 ppm）によって腫瘍性病変、腫瘍関連病変と非腫瘍性病変及びこれらの病変を反映する諸々の指標の変化が認められた。すべての投与群の生存率は対照群に比べて、ほぼ同様な推移を示した。投与終了時の体重は、対照群と比べて、320 ppm 群で雄：95、雌：97%、800 ppm 群で雄：93、雌：95%、2000 ppm 群で雄：87、雌：81%であり、雌雄とともに2000 ppm 群で低値を示した。摂餌量は、雄の2000 ppm 群では投与期間の初期に、雌の2000 ppm 群では投与期間を通して低値を示した。

### IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変

腫瘍は、雄では肝臓、腎臓、耳道腺、精巣、下垂体、脾臓に、雌では子宮、甲状腺、乳腺、副腎に発生した。

#### <肝臓腫瘍>

雄の肝細胞腺腫は、用量に関連して増加傾向を示し、2000ppm で増加した。雄の肝細胞癌は、増加傾向を示さなかったが、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生数は増加傾向を示した。また、2000 ppm 群における肝細胞腺腫、肝細胞癌および肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。以上の試験結果から、これらの肝腫瘍は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与によるものと考察される。また、本試験では、肝臓腫瘍の前腫瘍性病変である好塩基性小増殖巣が（文献 9）、肝腫瘍の発生が増加する濃度(2000ppm)よりも低い投与濃度 (800ppm) から認められており、好塩基性小増殖巣を通して肝臓腫瘍が形成された可能性を示唆している。肝臓への影響として、逸脱系酵素の GOT と GPT に変化が認められないが、 $\gamma$ -GTP が用量依存性に 320 ppm 群から上昇していることから、肝腫瘍や前腫瘍病変の発生がみられる濃度よりもさらに低い投与濃度で、慢性的な肝への影響が起きていると考えられる。さらにコレステロール、リン脂質あるいは蛋白の増加及び肝臓重量の増加がみられ、肝の慢性的な影響とともに、肝臓機能の亢進が示唆された。本被験物質の 13 週間経口投与試験（文献 6）において、投与ラットに $\gamma$ -GTP の上昇、肝重量の増加、肝臓の中心性腫脹がみられ、13 週間の経口投与でも本被験物質による肝臓への影響が認められている。1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による肝腫瘍の形成には、肝臓傷害に対する増殖性反応と肝代謝亢進が背景に存在すると推察される。

#### <腎臓腫瘍>

雄では、投与群に腎細胞腺腫と腎細胞癌がみられたが、それぞれの発生率は増加傾向を示さなかった。腎細胞腺腫の 2000 ppm 群における発生率(4%)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲よりやや高い値であった。また、両腫瘍を合わせた発生率は、

Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、かつ 2000 ppm 群における両腫瘍の発生率(6%)は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。以上の結果から、これらの腎臓腫瘍は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による可能性があると示唆された。腫瘍の発生に加えて、本試験の雄ラットでは、中程度(3+)および重度(4+)の慢性腎症が 320 ppm から投与用量に依存して増加した。また、腎孟上皮の過形成が、腫瘍発生濃度(2000 ppm)よりも低い投与濃度(320 ppm)から、また、腎臓乳頭部の鉱質沈着が 800 ppm と 2000 ppm で用量依存性に増加した。13 週間の 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン混餌経口投与試験(文献 6)では、雄にのみ最低濃度である 1481 ppm 群まで腎臓に好酸体の出現の増強とともに好塩基性変化と尿細管上皮の剥離が認められた。好酸体の出現は  $\alpha_2$  マイクログロブリンが尿細管上皮内に蓄積する病変であり、過剰な沈着により尿細管上皮が傷害を受ける。このため、好酸体の増強を起こす化学物質を長期投与すると、慢性腎症の増強や腎孟上皮の過形成、腎臓乳頭部の鉱質沈着とともに尿細管上皮由来の腎臓腫瘍の発生が促進されることが知られている(文献 10)。従って、本試験の腎臓腫瘍の発生も 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による影響であり、13 週間試験でみられた好酸体の出現( $\alpha_2$  マイクログロブリンの蓄積)が長期投与によって腎臓腫瘍の形成に寄与したと考察される。なお、 $\alpha_2$  マイクログロブリンの蓄積は雄ラットに特有な病変と考えられている(文献 10)。

#### <耳道腺腺腫>

雄の腺腫の発生は、傾向検定で用量に対応した増加傾向を示し、2000 ppm 群における腫瘍発生率(8%)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。従って、耳道腺腺腫の発生は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与によるものと考えられた。

#### <子宮腫瘍>

乳頭状腺腫と腺癌の発生数は、個別には増加傾向を示さなかったが、当センターのヒストリカルコントロールデータよりやや高い値であった。また、両腫瘍を合わせた発生数は Peto 検定で増加傾向を示し、合わせた腫瘍の 2000 ppm 群における発生率(8%)は当センターのヒストリカルコントロールデータを越えた。従って、これらの子宮腫瘍の発生は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による可能性があると示唆された。

なお、内膜間質性ポリープの発生数も Peto 検定で増加傾向を示し、投与に関連した腫瘍增加の可能性が示唆された。しかし、このポリープの 2000 ppm 群における発生率(22%)は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内であり、投与との関係は明らかでなかった。

#### <乳腺腫瘍>

雌の乳腺の腺癌の発生数は傾向検定で増加傾向及び 2000 ppm 群で発生率(8%)の増加を示し、かつ、当センターのヒストリカルコントロールデータよりやや高い値であった。従って、雌の乳腺腺癌の発生は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による可能性があると示唆された。

雌における子宮の乳頭状腺腫と腺癌、及び乳腺の腺癌の発生匹数はそれぞれ1～4匹であり、ヒストリカルコントロールデータの範囲を越えるものの、顕著な発生増加ではなかった。また、内膜間質性ポリープの発生も増加傾向がみられるものの、ヒストリカルコントロールデータの範囲内であり、投与との関係が明らかでなかった。しかし、最高用量である2000 ppm群で性ホルモンの支配を受ける子宮と乳腺に共通して腫瘍の発生増加がみられることを考慮すると、これらの腫瘍の発生増加と1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与との関連を否定できないと判断した。

#### <皮膚腫瘍>

雄の扁平上皮乳頭腫、角化棘細胞腫、扁平上皮癌を合わせた発生数は増加傾向を示した。しかし、それぞれの腫瘍の発生は、傾向検定による増加傾向もFisher検定による発生増加を示さず、当センターのヒストリカルコントロールデータと比較すると扁平上皮乳頭腫の発生のみが800 ppm群(6%)と2000 ppm群(8%)で範囲を超えた。合わせた発生数(14%)はヒストリカルコントロールデータの上限(12%)と比較すると高い値であったが、その差は僅かであった。従って、これら皮膚腫瘍と1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与との関連を否定できないものの、発生増加は顕著ではなく、また、投与との関係を支持する他の関連所見が認められないことから、がん原性の証拠としては不十分であり、不明確な証拠と考えた。

#### <その他の腫瘍>

傾向検定で発生率の減少傾向を示す腫瘍として、雄の単核球性白血病がみられた。この腫瘍の発生率低下は当センターのヒストリカルコントロールデータの下限よりも低く、投与との関連は否定できないが、二次的作用による可能性もある。雄の下垂体の腺腫と雌の副腎の褐色細胞腺腫と褐色細胞腫(悪性)も減少傾向が認められたが、これらの腫瘍発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの下限に相当し、発生率の減少と投与の関係は明らかではないと判断した。

なお、雌の乳腺の線維腺腫と甲状腺のC細胞腺腫は発生率の減少が認められたが、それぞれの腫瘍発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内にあり、かつ、中間用量にのみ認められた変化であることから、これらの腫瘍の発生率減少は投与に関連したものではないと判断した。

従って、これらの腫瘍は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与に対応したものと判断しなかつた。

## IV-2 非腫瘍性病変

2000 ppm群では、雄に鼻腔呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加と肝臓の胆管増生の減弱、雌に骨髄の造血亢進の有意な増加、鼻腔嗅上皮のエオジン好性変化、及び白内障と網膜萎縮の減少がみられた。また、前立腺の炎症が雄800ppmと2000ppm両群で減少した。

#### IV-3 無毒性量 (NOAEL)/最小毒性量 (LOAEL)及びベンチマーク用量

ラットにおける2年間の混餌経口投与による1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの最小毒性量は、肝臓重量の増加と $\gamma$ -GTPの上昇をエンドポイントとして320 ppm(0.012~0.028 g/kg body weight/day)であると考察される。ベンチマーク用量法は、NOAEL/LOAEL法における若干の問題点を克服する方法として、最近、適用が広がりつつある（文献11）。 $\gamma$ -GTPと投与濃度との用量一反応関係にUS.EPA NCEAのBMDLソフトウェアVersion 1.3.1（文献12）を適用して10%ベンチマーク用量（Confidence limit of Benchmark dose yielding the response with 10 % extra risk (BMDL<sub>10</sub>)）を算出した結果(Polynomial Model, P=0.476, AIC=567.8)、 $\gamma$ -GTPに対するBMDL<sub>10</sub>値は56.2 ppmとなった。

#### IV-4 他文献との比較等

① 変異原性：日本バイオアッセイ研究センターの試験結果（文献13）によれば、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの変異原性は、ネズミチフス菌(TA100)の代謝活性化による場合で、用量に依存して増加し、溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇がみられ、陽性であった。またチャイニーズハムスター株細胞(CHL/IU)を用いた染色体異常試験では、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは、代謝活性化による場合に、染色体構造異常が誘発された。これらの結果は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの代謝物が変異原性を有することを示す。

② 代謝：本試験では、黄色尿が全ての投与群に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14）。1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの2週間混餌経口投与により、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<sup>1</sup>H-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-システインに起因することを確認した（文献15）。

## V 結論

F344/DuCrj(Fisher) ラットを用いて 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの 2 年間(104 週間)にわたる混餌投与によるがん原性試験を行った結果より以下の結論を得た。

雄の肝臓の肝細胞腺腫及び肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生の増加、ならびに耳道腺腺腫の発生増加が認められ、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのがん原性を示す証拠と考えられた。また、雄に皮膚腫瘍、雌に子宮腫瘍（乳頭状腺腫と腺癌）と乳腺の腺癌の発生増加が認められ、これら腫瘍の発生増加も 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンによる可能性があると示唆された。なお、雄では、雄ラットに特有な好酸体の増加に起因すると推察される腎臓腫瘍の発生増加もみられた。

また、雄では肝臓に前腫瘍性病変である好塩基性小増殖巣の増加が 800 ppm 以上、腎臓に慢性腎症の程度の増強が 320 ppm まで認められた。これらの結果は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による影響と考えられた。

## VI 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. McLafferty F. W. (1994)  
Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition, Entry Number 74222  
John Wiley and Sons, Inc. New York
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 Cooperation and Development (OECD) (1981)  
451: Carcinogenicity studies. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals  
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-ニトロベンゼンのラット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  
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. Peto R., Pike M. C., Day N. E., et al. (1980)  
Guidelines for simple, sensitive significance test for carcinogenic effects in long-  
term animal experiments  
In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical  
Appraisal, IARC Monographs Suppl 2, 311-426. IARC, Lyon

9. Popp J. A., and Cattley R. C. (1991)  
Hepatobiliary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (eds. by W. M. Haschek, C. G. Rousseaux). Chap 14, 279 - 314  
Academic Press, New York
10. Alden C.L. and Frith C.H. (1991)  
Urinary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (eds. by Haschek W.M., and Rousseaux C.G.) Chap 15, 315- 387  
Academic Press, New York
11. Risk Assessment Forum. U.S. Environmental Protection Agency (1995)  
The Use of the Benchmark Dose Approach in Health Risk Assessment  
EPA/630/R-94/007. Washington D.C.
12. Risk Assessment Forum. U.S. Environmental Protection Agency (2000)  
Benchmark Dose Technical Guidance Document  
EPA/630/R-00/001. Washington, D.C.
13. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集 (1996)  
日本化学物質安全・情報センター(JETOC) 編集・発行, 東京
14. 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
15. 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  
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川