

o—クロロ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： 0433

C A S N o . 88-73-3

2003年3月31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

o-クロロ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： 0433

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	2
I-1 被験物質の性状等	2
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	3
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	4
II-1 投与	4
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、投与期間及び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及び均一性	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	6
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	7
II-3 観察・検査項目及び方法	7
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	8
II-3-4 血液学的検査	8
II-3-5 血液生化学的検査	8
II-3-6 病理学的検査	8
(1) 割検	8
(2) 臓器重量	8
(3) 病理組織学的検査	9
II-4 数値処理と統計学的方法	9
II-4-1 数値の取扱いと表示	9
II-4-2 母数の取扱い	9
II-4-3 統計方法	10
III 試験成績	11
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	14
III-8-1 割検	14
III-8-2 臓器重量	14
III-8-3 病理組織学的検査	15
IV 考察及びまとめ	17
V 文献	22

要 約

σ -クロロニトロベンゼンの F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いた経口投与による 2 年間 (104 週間) のがん原性試験のための予備試験である 13 週間試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するために 2 週間試験を実施した。投与は σ -クロロニトロベンゼンを各投与濃度に調製した混餌飼料の自由摂取で行った。1 群当たりの動物数は、雌雄とも各 5 匹とし、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 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 (公比 2) 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、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

2 週間試験の結果、雌雄とも全ての群で死亡はみられなかつたが、体重増加抑制と摂餌量の低下がみられ、肝臓への影響、血液／造血系への影響及び精巣への影響がみられた。体重は、雄の 2500 ppm 以上の群と雌の 5000 ppm 以上の群で低値を示した。肝臓への影響は、雌雄とともに、中心性肝細胞肥大、単細胞壊死、分裂像の増加、GOT と GPT の上昇、総ビリルビンの増加や γ -GTP の上昇、総蛋白とアルブミンの増加、脂質代謝の変化がみられ、影響は全投与群で認められた。また、血液／造血系への影響は、雌雄ともに、メトヘモグロビン濃度と網赤血球比の増加、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び血小板数の減少、MCV と MCH の増加と MCHC の減少、並びに骨髄の造血亢進及び脾臓の赤血球充満と髄外造血がみられ、ヘモジデリン沈着が脾臓、肝臓及び腎臓にみられ、これらのメトヘモグロビン生成による赤血球傷害と代償性造血は全投与群でみられた。さらに、精巣の精原細胞壊死と精巣上体の精子数減少が 2500 ppm 以上の群で認められた。このほか、消耗性の変化として、胸腺の萎縮やグルコースの減少が高濃度投与群でみられた。また、 σ -クロロニトロベンゼンの代謝物と思われる黄色尿が 2500 ppm 以上の群でみられた。

以上のように、 σ -クロロニトロベンゼンの 2 週間混餌経口投与による影響は、肝臓の障害、血液／造血系におけるメトヘモグロビン血症と代償性造血の亢進、精巣の傷害を特徴とすることが明らかとなつた。

以上の結果から、ラットにおける σ -クロロニトロベンゼンの 13 週間試験の最高投与濃度は、雌雄ともに、5000 ppm より若干低い濃度の 4000 ppm を最高投与濃度として設定し、無毒性量 (NOAEL) を検討するために公比を大きめに 4.0 とし 1000 ppm、250 ppm、63 ppm の濃度を設定し、さらに、高投与濃度域での用量一反応関係をより詳細に検討するために、2000 ppm を加えた。すなわち 13 週間混餌経口投与は 4000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、250 ppm、63 ppm の 5 段階の濃度を投与濃度に設定した。

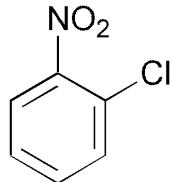
I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : σ クロロニトロベンゼン (σ -Chloronitrobenzene)
 別 名 : 1-クロロ-2-ニトロベンゼン (1-Chloro-2-nitrobenzene)
 IUPAC 名 : 1-クロロ-2-ニトロベンゼン (1-Chloro-2-nitrobenzene)
 CAS No. : 88-73-3

I-1-2 構造式、示性式、分子量 (文献 1)



分 子 量 : 157.56

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 黄色針状晶
 比 重 : 1.368 (22/4°C)
 融 点 : 32.5°C
 沸 点 : 245.7°C
 溶 解 性 : 水に難溶
 保 存 条 件 : 冷暗所に保存

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : PAK9795
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 グ レ 一 ド : 和光特級
 純 度 : 99.3% (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 σ クロロ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、 σ クロロ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 2) と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、赤外吸収スペクトルも文献値 (文献 3) と同じ波長にピークが認められ、被験物質は σ クロロニトロベンゼンであることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX K 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 σ クロロニトロベンゼンについて、投与開始前及び投与終了後に、高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) により、クロマトグラムを測定し、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 σ クロロニトロベンゼンは安定であることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX K 2 に示した。

I-4 試験動物

動物は、 σ クロロニトロベンゼンのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、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) より購入した F344/DuCrj (Fischer) ラット (SPF) の雌雄を使用した。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等の理由から F344/DuCrj (Fischer) ラットを使用することが決定している。

ラット雄 37 匹、雌 36 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、体重値の中央値に近い雌雄各 30 匹 (投与開始時体重範囲、雄：117～131g、雌：93～101g) を選別し、試験に供した。

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混合し、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

2001年7月17日から2001年7月31日までの2週間、定期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週に1回とした。

II-1-4 投与濃度

625 ppm、1250 ppm、2500 ppm、5000 ppm 及び 10000 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、かつ、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、がん原性試験の予備試験である、13週間試験に使用する投与濃度を決定するため 2 週間とした。

各群の投与濃度は、当試験の前に実施した検討試験の結果を参考に決定した。すなわち、検討試験では、被験物質を粉末飼料に混合し、3000 ppm（1日当たりの摂餌量に LD₅₀ 値（ラット強制経口投与：268 mg/kg（文献 4）に相当する被験物質を含有する濃度）、1000 ppm、333 ppm を F344/DuCrj (Fischer) ラット (SPF) の雌雄（3 用量と対照群、各群 2 匹）に 2 週間自由摂取させ、体重と摂餌量を測定した。その結果、3000 ppm 群で僅かな摂餌量低下と体重増加の抑制がみられた他に、一般状態の観察では明らかな被験物質投与による影響は認められなかった。従って、2 週間試験の最高用量は OECD 化学品テストガイドライン 407（文献 5）で示されている、1000 mg/kg body weight/day に相当する濃度(8860 ppm)

よりやや高い、10000 ppm を最高投与濃度とし、以下、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、625 ppm（公比 2）の 5 段階の濃度を設定した。

II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

粉末飼料（オリエンタル酵母工業（株）製 CRF-1）を粉末飼料混合機（関東混合機工業（株）製スパイラルミキサー SS-251）で攪拌しながら、あらかじめ粉碎器（IKA LABOTECHNIC 製 IKA M20）で粉碎し、整粒した被験物質を混合し、10000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 10000 ppm 被験物質混合飼料を更に粉末飼料と攪拌混合することによって 625 ppm、1250 ppm、2500 ppm 及び 5000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。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日前日に 1 回行った。調製した被験物質混合飼料は、半量を投与 1 週目用とし、ラット用餌箱に充填して翌日の投与開始まで室温で保管した。残りの半量は投与 2 週目用とし、ビニール袋詰にして密封し、翌週まで冷蔵保管した。

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及び均一性

被験物質混合飼料中における被験物質の濃度は、各濃度毎に調製容器内から 7 点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ（Hewlett Packard 1090）を用いて分析し、確認した。

その結果、各群の平均濃度は設定濃度に対し、93.6～97.6% の範囲にあり、ほぼ設定濃度通りに調製された。また、均一性に関しては、各濃度群内のばらつきも少なく良好であった。

それらの結果を APPENDIX K 3, K 4 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

被験物質混合飼料中の被験物質の安定性は、500 ppm と 10000 ppm の被験物質混合飼料をラット用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管（8 日間）したものと、ビニール袋詰にして密封し、冷蔵保管（8 日間と 8 週間）したものについて、高速液体クロマトグラフ（Hewlett Packard 1090）を用いて分析し、確認した。

その結果、調製時の濃度を 100% とした場合に、室温保管（8 日間）では、500 ppm : 77.1%、10000 ppm : 77.8%、冷蔵保管（8 日間）では、500 ppm : 99.4%、10000 ppm : 96.8%、8 週間では、500 ppm : 105%、10000 ppm : 96.2% であった。冷蔵保管での安定性は良好であったが、8 日間の室温保管では、僅かに減衰するものの、許容できる範囲であると判断した。

それらの結果を APPENDIX K 5 に示した。

II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂餌量（餌こぼし量で補正）及び設定濃度より体重 kg 当りの 1 日被験物質摂取量 (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 5 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	5 匹 (1001～1005)	対 照 群	5 匹 (2001～2005)
625 ppm 群	5 匹 (1101～1105)	625 ppm 群	5 匹 (2101～2105)
1250 ppm 群	5 匹 (1201～1205)	1250 ppm 群	5 匹 (2201～2205)
2500 ppm 群	5 匹 (1301～1305)	2500 ppm 群	5 匹 (2301～2305)
5000 ppm 群	5 匹 (1401～1405)	5000 ppm 群	5 匹 (2401～2405)
10000 ppm 群	5 匹 (1501～1505)	10000 ppm 群	5 匹 (2501～2505)

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 匹づつ割り当て、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 6）。

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（雌雄とも 207 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の区別を行った。

II-2-3 飼育条件

動物は、全飼育期間を通して、設定温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ （実測値（平均士標準偏差）： $22.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ）、設定湿度 $55 \pm 15\%$ （実測値（平均士標準偏差）： $57.6 \pm 1.3\%$ ）、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／時に設定した環境下で飼育した。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（ステンレス製二連網ケージ、W170×D294×H176mm）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）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自由摂取させた。馴化期間は、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。投与期間は、各投与群には CRF-1 粉末飼料（30KGy- γ 線照射滅菌飼料）を使用し、所定の濃度に調製した被験物質混合飼料、対照群には CRF-1 粉末飼料（30KGy- γ 線照射滅菌飼料）のみを粉末飼料給餌器により自由摂取させた。

飲水は、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、紫外線照射し、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照合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、一般状態の詳細な観察を、投与開始直前（群構成時）、投与開始後 3 日目（1 週 3 日）、7 日目（1 週 7 日）、10 日目（2 週 3 日）、14 日目（2 週 7 日）に行った。

II-3-2 体重測定

全動物について、投与開始直前（群構成時）、投与開始後 3 日目（1 週 3 日）、7 日目（1 週 7 日）、10 日目（2 週 3 日）、14 日目（2 週 7 日）に体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

全動物について、給餌量（0、7日目）、残餌量及び餌こぼし量（3、7、10、14日目）を測定し、その値から摂餌量を算出した。

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、ヘパリンリチウム入り採血管（下記※印検査項目）及びクエン酸ナトリウム入り採血管（下記＊印検査項目）に採血し、検査を行った。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、※メトヘモグロビン濃度、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、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（APTT）、白血球数、白血球分類
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

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、骨髓、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、腎、乳腺、脳、脊髓、末梢神経、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨

II-4 数値処理と統計学的方法

II-4-1 数値の取扱いと表示

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、残餌量及び餌こぼし量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量から残餌量及び餌こぼし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。

σ クロロ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 σ クロロ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、小数点以下第 3 位までを表示した。

臓器重量については 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 に示した単位と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、摂餌量については、全動物を対象に計測した。

血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量は、定期解剖時まで生存した動物を対象にし、欠測となったデータについては母数より除いた。

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の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 に示した。

雌雄ともに、全ての群に、死亡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>

黄色尿が 2500 ppm 以上の 3 投与群全動物 (各群 5 匹) に投与 7 日目から 14 日目まで観察された。 10000 ppm 群に円背位 1 匹 が投与 14 日目にみられた。

<雌>

黄色尿が、2500 ppm 以上の 3 投与群全動物(各群 5 匹)に投与 7 日目から 14 日目まで観察された。外陰部汚染が 10000 ppm と 5000 ppm の両群に投与 3 日目に 1 匹づつみられた。被毛の着色が、10000 ppm 群では全動物(5 匹)、全投与期間を通して、5000 ppm 群では全動物(5 匹)、7 日目から 14 日目まで、2500 ppm 群では 1 匹は 7 日目から 14 日目まで、他の 1 匹は、14 日目にみられた。 1250 ppm 群では、14 日目に 1 匹みられた。

III-3 体重

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

<雄>

2500 ppm 以上の 3 投与群では、全投与期間にわたり、体重の低値が認められた。 1250 ppm と 625 ppm の両群では、対照群と同様の推移を示した。

<雌>

10000 ppm 群と 5000 ppm 両群では、全投与期間にわたり、体重の低値が認められた。 2500 ppm 群では、投与 10 日目までは低値がみられたが、14 日目には回復した。 1250 ppm 群と 635 ppm 群の体重は、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、投与最終日(14 日目)の体重は、対照群と比較して、雄では、10000 ppm 群 : 57%、5000 ppm 群 : 77%、2500 ppm 群 : 90%、1250 ppm 群 : 97%、625 ppm 群 : 98%、雌では、10000 ppm 群 : 71%、5000 ppm 群 : 85%、2500 ppm 群 : 94%、1250 ppm 群 : 101%、625 ppm 群 : 101% 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>

10000 ppm 群と 5000 ppm 群では、全投与期間にわたり、摂餌量の低値がみられた。2500 ppm 群では、投与 3, 7, 10 日目に摂餌量の低値を示した。1250 ppm と 625 ppm の両群では、対照群と同様の推移を示した。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、10000 ppm 群：26～54%、5000 ppm 群：44～79%、2500 ppm 群：71～94%、1250 ppm 群：92～102%、625 ppm 群：97～104% の範囲にあった。

<雌>

10000 ppm 群と 5000 ppm 群では、全投与期間にわたり摂餌量の低値がみられた。2500 ppm 群では投与 3 日目と 7 日目に低値を示した。1250 ppm と 625 ppm の両群では、1250 ppm 群の投与 3 日目を除いて、対照群と同様の推移を示した。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、10000 ppm 群：26～63%、5000 ppm 群：40～78%、2500 ppm 群：57～92%、1250 ppm 群：84～103%、625 ppm 群：94～101% の範囲にあった。

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。

雌雄ともに、投与 3 日目には、各投与群摂取量に対する一段階高い投与濃度群の摂取量の比率が公比(2)よりも低値を示した。投与 7 日目以降には、5000 ppm 以下の投与群では、この比率は公比とほぼ同じ値を示した。しかし、10000 ppm 群では、5000 ppm 群に比べて、被験物質摂取の比率が 1.67 から 1.71 となった。従って、投与濃度が高くなるに従って、被験物質摂取量は抑制される傾向を示した。

全投与期間における各群の 1 日当たりの被験物質摂取量 (g/kg body weight/day) は、雄では、10000 ppm 群：0.317～0.664、5000 ppm 群：0.238～0.397、2500 ppm 群：0.175～0.208、1250 ppm 群：0.099～0.109、625 ppm 群：0.049～0.055、雌では、10000 ppm 群：0.306～0.756、5000 ppm 群：0.216～0.395、2500 ppm 群：0.143～0.212、1250 ppm 群：0.097～0.111、625 ppm 群：0.051～0.055 の範囲にあった。

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>

10000 ppm 群では、赤血球数、ヘモグロビン濃度及び血小板数の減少、MCV と MCH の増加、MCHC の減少、メトヘモグロビン濃度の増加及びプロトロンビン時間の延長が認め

られた。赤血球数の減少、MCV の増加及びプロトロンビン時間の延長は 5000 ppm 以上の群で、ヘモグロビン濃度、MCHC 及び血小板数の減少及びメトヘモグロビン濃度の増加は、2500 ppm 以上の群で認められた。また、ヘマトクリット値の減少は 5000 ppm から 1250 ppm までの 3 群で、網赤血球比は 10000 ppm 群で増加傾向がみられ、5000 ppm 群と 2500 ppm 群で増加がみられた。分葉核好中球比の増加とリンパ球比の減少は 10000 ppm 群で認められた。625 ppm 群では、血液学的指標の変化は認められなかった。

＜雌＞

10000 ppm 群では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、血小板の減少、MCV と MCH の増加及び MCHC の減少、メトヘモグロビン濃度の増加及びプロトロンビン時間の延長が認められた。赤血球数、ヘモグロビン濃度、MCHC の減少は全投与群で、メトヘモグロビン濃度の増加は 1250 ppm 以上の群で、MCV の増加、血小板数の減少及びプロトロンビン時間の延長は 5000 ppm 以上の群で、MCH の増加は 2500 ppm 以上の群で認められた。また、ヘマトクリット値の減少は 5000 ppm から 625 ppm までの 4 群でみられた。網赤血球比の増加は 5000 ppm 群と 2500 ppm 群でみられた。

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＞

10000 ppm と 5000 ppm の両群では、リン脂質、総ビリルビンの増加、GPT 及び γ -GTP の上昇、アルブミン、A/G 比、尿素窒素及びカリウムの増加、グルコース濃度の減少が認められた。GOT と GPT の上昇、総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質の増加は 2500 ppm 以上の群で、グルコースの減少は 1250 ppm 以上の群で、アルブミンの増加は全投与群でみられた。総蛋白は、5000 ppm と 625 ppm との間の 4 群で増加した。

＜雌＞

10000 ppm と 5000 ppm の両群で、総コレステロール、リン脂質、総ビリルビンの増加、GOT、GPT、 γ -GTP の上昇、尿素窒素、カリウムの増加及びグルコースの減少が認められた。総コレステロール、リン脂質の増加は全投与群で、グルコースの減少は 1250 ppm 以上の群で、総ビリルビンの増加は 2500 ppm 以上の群で認められた。総蛋白の増加は 5000 ppm から 625 ppm までの 4 群で、アルブミンの増加は 5000 ppm と 2500 ppm の両群でみられた。なお、カルシウムは 5000 ppm から 625 ppm までの 4 群で増加した。カルシウムの増加は総蛋白と連動しており、蛋白結合性のカルシウムが増加している結果を反映していると考えられた。

III-8 病理学的検査

III-8-1 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX G 1, 2 に示した。

<雄>

1250 ppm 以上の群全動物に脾臓の腫大と暗色化がみられ、5000 ppm 以上の群で肝臓の暗色化が全動物にみられた。なお、肝臓のヘルニアが 5000 ppm 群の 1 匹にみられたが、投与との関係はないと考えた。

<雌>

1250 ppm 以上の群全動物に、脾臓の腫大と暗色化、10000 ppm 群の全動物に肝臓の暗色化がみられた。なお、肝臓のヘルニアが 10000 ppm 群の 1 匹にみられたが、投与との関係はないと考えた。

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 TABLE 9, 10、APPENDIX H 1, 2 (実重量)、APPENDIX I 1, 2 (体重比) に示した。

<雄>

肝臓は全ての投与群で実重量と体重比の高値を示し、脾臓は 1250 ppm 以上の群で体重比の高値と 2500 ppm 以上の群で実重量の高値を示した。また、腎臓は全ての投与群で体重比の高値と 10000 ppm 群で実重量の低値を示した。胸腺は 5000 ppm 群で実重量の低値と 10000 ppm 群で体重比の低値を示し、精巣は 5000 ppm 群で体重比の低値と 10000 ppm 群で体重比の低値を示した。なお、投与群において、肺、心臓及び脳は実重量の低値と体重比の高値、副腎は体重比の高値を示したが、いずれも体重の低値に伴う変化と考えた。

<雌>

肝臓は全ての投与群で実重量と体重比ともに高値を示し、脾臓は全ての投与群で体重比の高値と 2500 ppm 以上の群で実重量の高値を示し、腎臓は 2500 ppm 以上の群で体重比の高値を示した。また、胸腺は 5000 ppm 以上の群で実重量の低値と 10000 ppm 群で体重比の低値、卵巣は 5000 ppm 以上の群で実重量の低値を示した。

なお、副腎は 2500 ppm 群と 10000 ppm 群で実重量の低値がみられたが投与濃度に対応しておらず、心臓、肺及び脳は実重量の低値と体重比の高値がみられたが、体重の低値に伴う変化と考えた。

III-8-3 病理組織学的検査

定期解剖動物の病理組織学的検査の結果を TABLE 11, 12, APPENDIX J 1, 2 に示した。

<雄>

10000 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（重度：5 匹）、単細胞壊死（軽度 3 匹）、ヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）及び髄外造血（軽度：1 匹）がみられ、骨髓に造血亢進（軽度：5 匹）、脾臓に赤血球充满（中等度：5 匹）、髄外造血（中等度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（中等度：5 匹）がみられた。また、胸腺に萎縮（軽度：5 匹）、腎臓にヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）がみられた。精巢に精原細胞壊死（中等度：5 匹）と精巢上体に精子減少（重度：5 匹）がみられた。さらに、脳に出血（軽度：2 匹）がみられた。

5000 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（中等度：5 匹）、単細胞壊死（軽度：4 匹）、分裂像增加（軽度：3 匹）及びヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）がみられた。骨髓に造血亢進（軽度：5 匹）、脾臓に赤血球充满（中等度：5 匹）、髄外造血（中等度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（中等度：5 匹）がみられた。また、腎臓にはヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）がみられ、精巢に精原細胞壊死（中等度：5 匹）、精巢上体に精子減少（中等度：5 匹）と精上皮系細胞の残屑（重度：5 匹）がみられた。

2500 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（中等度：4 匹、軽度：1 匹）、単細胞壊死（軽度：3 匹）及び分裂像增加（軽度：4 匹）がみられた。また、骨髓に造血亢進（軽度：5 匹）、脾臓に赤血球充满（中等度：5 匹）、髄外造血（中等度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）がみられた。さらに、精巢に精原細胞壊死（軽度：1 匹）と精巢上体に精上皮系細胞の残屑（軽度：1 匹）がみられた。

1250 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（軽度：5 匹）がみられ、骨髓に造血亢進（軽度：4 匹）、脾臓に赤血球充满（中等度：4 匹、軽度：1 匹）、髄外造血（中等度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（軽度 5 匹）がみられた。また、腎臓には好酸体（軽度：4 匹）がみられた。

625 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性肝細胞肥大（軽度：5 匹）、脾臓に赤血球充满（軽度：5 匹）と髄外造血（軽度 5 匹）がみられた。腎臓に好酸体（軽度 5 匹）がみられた。

対照群では、腎臓に好酸体（軽度：5 匹）がみられた。

なお、投与群の少数動物に、肝臓のヘルニア、腎臓の乳頭の鉱質沈着及び前立腺のリンパ球浸潤がみられたが、いずれも自然発生病変と考え、投与とは関係がないと考えた。

<雌>

10000 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（重度：5 匹）、単細胞壊死（軽度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）がみられた。また、骨髓に造血亢進（軽度：5 匹）、脾臓に赤血球充满（中等度：5 匹）、髄外造血（中等度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（中等度：5 匹）がみられ、腎臓にヘモジデリン沈着（中等度：5 匹）、胸腺に萎縮（軽度：1 匹）及び脳に出血（軽度：1 匹）がみられた。

5000 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（中等度：5 匹）、単細胞壊死（軽度：5 匹）、分裂像増加（軽度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）がみられた。また、骨髓に造血亢進（軽度：5 匹）、脾臓に赤血球充満（中等度：5 匹）、髓外造血（中等度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（中等度：5 匹）がみられた。さらに、腎臓にヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）と肺に出血（軽度：1 匹）がみられた。

2500 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（中程度：5 匹）、単細胞壊死（軽度：4 匹）及び分裂像増加（軽度：4 匹）がみられた。また、骨髓に造血亢進（軽度：5 匹）、脾臓に赤血球充満（中程度：5 匹）、髓外造血（中程度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（軽度：4 匹、中程度：1 匹）がみられた。

1250 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（軽度：5 匹）、単細胞壊死（軽度：2 匹）及び分裂像増加（軽度：2 匹）がみられた。また、骨髓には造血亢進（軽度：5 匹）、脾臓に赤血球充満（中程度：5 匹）、髓外造血（中程度：5 匹）及びヘモジデリン沈着（軽度：5 匹）がみられた。

625 ppm 群 5 匹では、肝臓に中心性の肝細胞肥大（軽度：5 匹）と分裂像増加（軽度：2 匹）がみられた。また、骨髓には造血亢進（軽度：3 匹）、脾臓に赤血球充満（軽度：5 匹）と髓外造血（軽度：5 匹）が観察された。

なお、投与群の少数動物に、肝臓のヘルニア、骨髓の肉芽、腎臓の好塩基性変化と皮髓境界部の鉛質沈着がみられたが、いずれも自然発生病変と考え、投与とは関係がないと考えた。

IV 考察及びまとめ

σ クロロニトロベンゼンの F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いた経口投与による 2 年間 (104 週間) のがん原性試験のための予備試験である 13 週間試験を実施するに当たり、その投与濃度を検索するために 2 週間試験を実施した。投与は σ クロロニトロベンゼンを各投与濃度に調製した混餌飼料の自由摂取で行った。被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群構成で、雌雄とも各群 5 匹の動物を用いた。投与濃度は、雌雄ともに、10000 ppm、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、625 ppm (公比 2) とした。

投与の結果、すべての投与群に死亡はみられなかった。摂餌量と体重が減少し、肝臓、血液／造血系及び精巣に影響がみられた。

(1) 用量－反応関係

10000 ppm 群では、雌雄ともに、摂餌量の減少と体重の減少、胸腺の重量低下と萎縮及び血中グルコースの減少が観察され、これらの消耗性変化は、毒性影響に加えて被験物質が混入した飼料に対する忌避に伴う摂餌量の低下も影響するものと考えられた。被験物質の肝臓への影響として、雌雄ともに、病理組織学的検査で単細胞壊死、血液生化学的検査で、GPT の上昇と GOT の上昇傾向及び総ビリルビンの増加がみられ、これらの変化は肝細胞傷害性であると考えた。また、薬物代謝の亢進を示唆する (文献 7,8) 肝重量の増加と中心性肝細胞肥大が観察された。さらに、アルブミン、A/G 比、リン脂質の増加及び γ -GTP の上昇から肝臓の代謝への影響が示唆された。また、血液／造血系への影響として、雌雄とともに、血液学的検査でメトヘモグロビン濃度の増加、赤血球数、ヘモグロビン濃度及び血小板数の減少、MCV と MCH の増加及び MCHC の減少がみられ、病理組織学的検査で骨髄の造血亢進、脾臓の重量増加、赤血球充満、髄外造血、ヘモジデリン沈着がみられた。ヘモジデリン沈着は肝臓と腎臓にも観察された。これらの変化は、メトヘモグロビン生成による赤血球傷害による赤血球減少 (貧血) とこれに伴う代償性の造血亢進を反映するものと考えた。さらに、雄では、精巣の重量低下、精巣の重度の精原細胞壊死とこれに伴う精巣上体の精子数減少 (精子消失) がみられ、精子形成への影響が認められた。その他、腎臓の体重比の高値、尿素窒素とカリウムの増加、雌では、卵巣の重量低下がみられ、腎臓と卵巣に対する影響が考えられた。

5000 ppm 群では、雌雄ともに、摂餌量の減少と体重の増加抑制、胸腺の重量低下と萎縮及び血中グルコースの減少が観察され、これらの消耗性変化は、毒性影響に加えて、被験物質の忌避も関与すると考えた。被験物質の肝臓への影響として、雌雄ともに、肝臓重量の増加、病理組織学的検査で中心性肝細胞肥大、単細胞壊死及び分裂像増加、血液生化学的検査で、GOT、GPT 及び γ -GTP の上昇とアルブミン、総蛋白及び総ビリルビンの増加がみられ、また、脂質代謝への影響と思われる総コレステロールとリン脂質の増加がみられた。このうち肝臓の分裂像の増加は 10000 ppm 群ではみられておらず、5000 ppm 群では肝臓は変

性・壊死がみられるものの、再生の機転にあると考えた。また、血液／造血系への影響として、雌雄ともに、血液学的検査でメトヘモグロビン濃度の増加と赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度及び血小板数の減少、網赤血球比、MCV と MCH の増加及び MCHC の減少がみられ、骨髄の造血亢進、脾臓の重量増加、赤血球充满、髄外造血、ヘモジデリン沈着がみられた。ヘモジデリン沈着は肝臓と腎臓にもみられた。これらの変化は、溶血／赤血球崩壊による赤血球減少（貧血）とこれに伴う造血亢進を示すものと考えた。さらに、雄では、精巣の重量低下、精巣の精原細胞壊死と多核細胞の出現と共に伴う精巣上体の精子数減少と精上皮系細胞残屑がみられた。その他、腎臓の体重比の高値、尿素窒素とカリウムの増加、雌では、卵巣の重量低下がみられ、腎臓と卵巣に対する影響が考えられた。

2500 ppm 群では、雌雄ともに、摂餌量の減少、体重の増加抑制とグルコースの減少が観察され、毒性影響に加えて、被験物質の忌避による消耗性変化の関与も示唆された。被験物質の肝臓への影響として、雌雄ともに、肝臓重量の増加、病理組織学的検査で中心性肝細胞肥大、単細胞壊死及び分裂像増加、血液生化学的検査で、GOT と GPT の上昇（雄のみ）とアルブミン、総蛋白及び総ビリルビンの増加がみられ、また、脂質代謝への影響と思われる総コレステロールとリン脂質の増加がみられた。血液／造血系への影響として、雌雄ともに、血液学的検査でメトヘモグロビン濃度の増加と赤血球数（雌のみ）、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度及び血小板数（雄のみ）の減少、網赤血球比、MCH（雌のみ）の増加がみられ、骨髄の造血亢進、脾臓の重量増加、赤血球充满、髄外造血、ヘモジデリン沈着がみられた。これらの変化は、メトヘモグロビン生成による赤血球崩壊による赤血球減少（貧血）と共に伴う造血亢進を示すものと考えた。さらに、雄では、精巣の精原細胞壊死と共に伴う精巣上体の精上皮系細胞残屑がみられた。その他、腎臓の好酸体の減少（雄）と体重比の高値がみられた。

1250 ppm 群では、体重の増加抑制はみられなかった。被験物質の肝臓への影響として、雌雄ともに、肝臓重量の増加、病理組織学的検査で中心性肝細胞肥大、単細胞壊死（雌）及び分裂像増加（雌）がみられ、血液生化学的検査で、アルブミン（雄のみ）と総蛋白の増加がみられ、また、脂質代謝への影響と思われる総コレステロールとリン脂質の増加が雌にみられた。また、血液／造血系への影響として、血液学的検査で、雌にメトヘモグロビン濃度の増加と赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度及び MCHC の減少がみられた。また、雌雄ともに、骨髄の造血亢進、脾臓の重量増加、赤血球充满、髄外造血、ヘモジデリン沈着がみられた。これらの変化は、溶血／赤血球崩壊による赤血球減少（貧血）と共に伴う造血亢進を示すものと考えた。また、雄のみに、腎臓の体重比の高値がみられた。

625 ppm では、肝臓への影響として、雌雄ともに、肝重量の増加、中心性肝細胞肥大、総蛋白の増加がみられ、アルブミンの増加が雄に、総コレステロールとリン脂質の増加が雌にみられた。血液／造血系への影響として、雌にのみに赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び MCHC の減少が認められ、骨髄に造血亢進（雌雄）および脾臓に体重比の増加（雌雄）、赤血球充满（雌雄）、髄外造血（雌雄）がみられた。また、雄のみに腎臓

の体重比の高値がみられた。これらの変化は、溶血／赤血球崩壊による赤血球減少（貧血）とこれに伴う造血亢進を示すものと考えた。

以上のように、*o*クロロニトロベンゼン投与によって、肝臓、血液／造血系、精巣への影響が強く認められ、腎臓や卵巣にも影響が示唆された。これらの毒性影響がみられた最低用量は、肝臓と血液／造血系及び腎臓への影響については最低投与濃度の 625 ppm、精巣への影響では 2500 ppm、卵巣への影響では 5000 ppm であった。また、被験物質の忌避による体重の増加抑制とグルコース濃度の低下などの消耗性変化は 2500 ppm 以上の群で認められた。

(2) 無毒性量 (NOAEL) ／最小毒性量 (LOAEL)

肝臓と血液／造血系に対する影響は、最低投与濃度 625 ppm (摂取量: 49~55 mg/kg/day (雄)) まで認められ、かつ、625 ppm 群でも肝重量が対照群の 1.5 倍であり、骨髄の造血亢進も肉眼で確認し得る程の強さであった。従って、*o*クロロニトロベンゼンの混餌経口投与による最小毒性量を求めるには、今回の設定投与濃度は高すぎたので、最小毒性量は求められなかった。

(3) 他の文献との比較

① 毒性：ラットに対する *o*クロロニトロベンゼンの急性及び亜急性毒性について、これまでに若干例報告されている。Nair ら（文献 9）は、雌雄 SD ラットに *o*クロロニトロベンゼンを 10, 30, 60 mg/m³ の濃度で 4 週間吸入暴露（1 日 6 時間、週 5 日）した実験で、メトヘモグロビン濃度の増加と赤血球数、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の減少、肝臓と腎臓の重量増加がみられたことから、*o*クロロニトロベンゼンの標的器官は造血系であると報告した。Travlos ら（文献 10）は、F344/N ラットに *o*クロロニトロベンゼンを 1.1, 2.3, 4.5, 9, 18 ppm の濃度で 13 週間吸入暴露（1 日 6 時間、週 5 日）した実験で、メトヘモグロビン血症とそれに関連する血液学的指標値の変化、ヘモジデリン沈着等の病理組織学的所見に加えて、肝臓、鼻腔、前胃等に病理組織学的变化があることを報告した。また、NTP の報告（文献 11）によれば、F344/N ラットに *o*クロロニトロベンゼンを 2 週間及び 13 週間吸入暴露した実験で、再生性貧血と赤血球傷害に関連する組織学的変化及び呼吸上皮の過形成等が観察され、ラットでは最低暴露濃度 1.1 ppm (7.0 mg/m³) までメトヘモグロビン濃度の増加と関連する病理組織学的変化がみられた。渡辺ら（文献 12）は、100 μmol/kg(15.8 mg/kg) の *o*-, *m*-, *p*-クロロニトロベンゼンを腹腔内投与した雄ラットのメトヘモグロビン濃度は *m*-異性体で 31.9%、*o*-異性体で 20.6%、*p*-異性体で 16.9% となり、*m*-異性体が最も強いメトヘモグロビン血症を示すことを報告した。本試験では、10000 ppm の *o*クロロニトロベンゼン混餌経口摂取した雄ラットは *o*-クロロニトロベンゼンを 1 日 317~664 mg/kg 摂取し、メトヘモグロビン濃度は 2.8% となった。メトヘモグロビン濃度 4.8% を与える

吸入暴露濃度 60 mg/m³ (文献 9) 及びメトヘモグロビン濃度 1%を与える暴露濃度 18 ppm(117 mg/m³) (文献 10) の 6 時間暴露の体内負荷量は(60 or 117 mg/m³ x 2.0 ml x 100 times/min x 360 min x 100%(肺吸収率)/0.3kg (体重))、それぞれ 14.4 mg or 28 mg/kg/day と推定される。従って、*o*-クロロニトロベンゼンの標的臓器は血液／造血系であることを確認した。さらに、混餌経口投与は、吸入暴露や腹腔内投与に比べて、軽度のメトヘモグロビン血症を示すことがわかった。この差異は、投与経路の相違に起因すると考えられる。

- ② 代謝：本試験では、2500 ppm 以上の群で、*o*-クロロニトロベンゼン投与開始 7 日目から、雌雄ともに黄色尿が観察された。*o*-クロロニトロベンゼンは、肝臓で 2-クロロアニリン、2-クロロアニリン-N-グルクロン酸、S-(2-ニトロフェニル)グルタチオンに代謝され、排泄されている (文献 13, 14)。黄色尿はこれらの代謝物に起因すると考えられる。
- ③ 貧血：本試験では、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骨髄での造血亢進、脾臓での髄外造血、赤血球充満及びヘモジデリン沈着が認められ、溶血性貧血と修復性の造血反応亢進が示唆された。*o*-クロロニトロベンゼンのラット、マウスへの暴露によるメトヘモグロビン血症は、Nair ら (文献 9)、Travlos ら (文献 10)、NTP (文献 11) 及び渡辺ら (文献 12) による報告があり、本試験の結果はこれらの報告を確認するものである。芳香族ニトロ化合物に暴露された労働者での、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ンツ小体出現を特徴とし、20 %以上のメトヘモグロビン濃度で自覚症状がみられ、溶血による貧血をもたらすことが知られている (文献 15)。
- ④ 職業性暴露限界：*p*-クロロニトロベンゼンの職業性暴露限界値は、ACGIH によって 0.1 ppm (0.64 mg/m³) および US.OSHA によって 1 mg/m³(PEL) と定められている (文献 16)。日本産業衛生学会は *p*-クロロニトロベンゼンの職業性暴露限界値として 0.1 ppm (0.64 mg/m³) を勧告している (文献 17)。しかし、*o*-クロロニトロベンゼンの職業性暴露限界値は現在のところ定められていないが、ドイツでは、メトヘモグロビン血症、変異原性試験結果の不一致、がん原性試験結果の不充分性等を考慮し、*o*-クロロニトロベンゼンを MAK 値リストの催腫瘍性(Category 3B)に分類している (文献 18)。

(4) 13 週間試験の濃度設定

13 週間試験の投与濃度を以下の通り設定した。

2 週間試験の結果、全ての投与群で死亡はみられなかったものの、10000 ppm 群と 5000 ppm 群では、雌雄ともに摂餌量の低下と体重の減少が強くみられ、肝臓と血液／造血系への強い影響が認められた。5000 ppm 群の体重は、雄で対照群の 77%、雌で 85% である事から、これより低い濃度に設定する必要があると考えた。2500 ppm 群では、雌雄ともに血液／造血系に対する影響が比較的強いものの、摂餌量の低下と体重増加の抑制は少ない (雄

で対照群の 90%、雌で 95%）ことから、13 週間の投与に耐え得る可能性があり、肝臓と精巣に顕著な影響がみられたが、生存に対する重篤な影響は少ないと判断した。

以上のことから、ラットにおける σ クロロニトロベンゼンの 13 週間試験の最高投与濃度は、雌雄ともに、5000 ppm より若干低い濃度の 4000 ppm を最高投与濃度として設定し、NOAEL を検討するために公比を大きめに 4 とし 1000 ppm、250 ppm、63 ppm の濃度を設定し、さらに、高投与濃度域での用量一反応関係をより詳細に検討するために、2000 ppm を加えた。すなわち 13 週間混餌経口投与は 4000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、250 ppm、63 ppm の 5 段階の投与濃度に設定した。

V 文献

1. 化学工業日報社 (2003)
14303 の化学商品
pp.886 - 887, 化学工業日報社, 東京
2. McLafferty F.W. (1994)
Entry Number 42503
Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition,
John Wiley and Sons, Inc., New York, NY
3. 和光純薬工業 (株) 提供資料 (1999)
赤外吸収スペクトル
4. National Institute for Occupational Safety and Health (1997)
Accession number: CZ0875000, 1-Chloro-2-nitrobenzene
Registry of Toxic Effect of Chemical Substances.
NIOSH, Cincinnati, OH
5. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (1995).
Guideline for Testing of Chemicals 407 for “Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents”, OECD, Paris
6. 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
7. 薬物と肝臓 (1975)
編集：織田敏次、市田文弘、山中正己、pp. 4 – 11、中外医学社、東京
8. H Popp J.A. and Cattley R.C.(1991)
Hepatobiliary System
In: Handbook of Toxicologic Pathology.
Eds. W.A. Haschek and C.G.Rousseaux.
pp. 279 – 295. Academic Press, New York, NY

9. Nair, R.S., Johannsen, F.R., Levinskas, G.J. and Terrill, J.B. (1986)
 Assessment of toxicity of σ -nitrochlorobenzene in rats following a 4-week inhalation exposure
 Fundam. Appl. Toxicol. 7, 609 – 614
10. Travlos, G.S., Mahler, J., Ragan, H.A., Chou, B.J. and Bucher, J.R. (1996)
 Thirteen-week inhalation toxicity of 2- and 4-chloronitrobenzene in F344/N rats and B6C3F1 mice
 Fundam. Appl. Pharmacol. 30, 75 – 92
11. National Toxicology Program (NTP) (1993)
 NTP Technical Report on Toxicity Studies of 2-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene Administered by Inhalation to F344/N Rats and B6C3F1 Mice
 Toxicity Report Series. No. 33. NTP, Research Triangle Park, NC
12. Watanabe, T., Ishihara, N. and Ikeda, M. (1976)
 Toxicity of and biological monitoring for 1,3-diamino-2,4,6-trinitrobenzene and other nitro-amino derivatives of benzene and chlorobenzene.
 Int. Arch. Occup. Environ. Health 37, 157 – 168
13. Rickert, D.E. and Held, S.D. (1990)
 Metabolism of chloronitrobenzenes by isolated rat hepatocytes
 Drug Metab. Dispos. 18, 5 – 9
14. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1996).
 2-Chloronitrobenzene, 3-chloronitrobenzene and 4-chloronitrobenzene.
 IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans
 Vol 65, pp.263 – 296. IARC, Lyon.
15. 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

16. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (2002)
Guide to Occupational Exposure Values—2002
P28, ACGIH Cincinnati, OH
17. Japan Society for Occupational Health (2001).
Recommendation of Occupational Exposure Limits (2001 – 2002)
J Occup Health 43, 208 – 223
18. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (1992)
*o*Chloronitrobenzen
Critical Data for MAK Values and Classification of Carcinogens
Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in
Work Area (Chairman:D.Henschler).
vol. 4, pp107 – 114, VCH Verlag, Weinheim