

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13週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号： 0439

CAS No. 88-73-3

2003年12月19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

標 題

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 13 週間毒性試験（混餌試験）

試験目的

o-クロロニトロベンゼンの経口投与によるがん原性試験試験（混餌試験）の投与濃度決定のために、o-クロロニトロベンゼンをラットに 13 週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン 408（げっ歯類における 90 日間反復投与毒性試験 1998 年 9 月 21 日採択）を参考にして実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示 76 号「試験施設が具備すべき基準」（一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示 13 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課
東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

試験施設及び運営管理者

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
所長 松島 泰次郎
神奈川県秦野市平沢 2445 番地

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13週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号： 0439

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	尿検査	8
II-3-7	病理学的検査	9
(1)	剖検	9
(2)	臓器重量	9
(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	10
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	尿検査	13
III-9	病理学的検査	14
III-9-1	剖検	14
III-9-2	臓器重量	14
III-9-3	病理組織学的検査	15
IV	考察及びまとめ	16
V	文献	21

要 約

o-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) のがん原性試験の投与濃度を決定するために 13 週間試験を実施した。投与は *o*-クロロニトロベンゼンを各設定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 10 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 4000, 2000, 1000, 250, 63 ppm (公比 4 に 2000 ppm を追加) 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、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、雌雄とも全ての群で死亡はみられなかった。

4000 ppm 群では体重増加抑制と摂餌量の低値、代謝産物によると考えられる黄色尿が全投与期間みられた。雌雄の血液/造血系への影響(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ヘマトクリット値の減少、脾臓の重量増加、ヘモジデリン沈着、赤血球充満及び髄外造血の亢進、肝臓のヘモジデリン沈着、骨髄での赤血球造血の亢進)、肝臓(肝臓重量の増加、単細胞壊死、小葉中心性の水腫様変性と肝細胞の肥大、GOT、GPT、ALP 及び γ -GTP の上昇)、腎臓(腎臓重量の増加、近位尿細管への褐色色素沈着と硝子円柱の発生増加(雄のみ)、尿素窒素の増加)、脂質代謝(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)及び雄の生殖系(精巣の重量低下、精原細胞壊死、精巣上皮での精子減少と精上皮系細胞の残屑の出現)への影響がみられた。2000 ppm 群では投与 1 週目にのみ雄に体重、雌雄に摂餌量の低値がみられたものの、その後は対照群との間に差が認められなかった。黄色尿は 1000 ppm 以上の群でみられた。血液/造血系と肝臓への影響は 63 ppm 以上の群、腎臓への影響は 250 ppm 以上の群、脂質代謝への影響は 1000 ppm 以上の群、雄の生殖系への影響は 4000 ppm 群で認められた。従って、*o*-クロロニトロベンゼンの 13 週間の混餌経口投与による最小毒性量 (LOAEL) は、肝臓と血液/造血系に対する影響をエンドポイントとして 63 ppm (雄雌ともに : 0.003~0.005g/kg body weight per day) と考察した。

以上の 13 週間試験の結果より、がん原性試験の濃度を以下の通り設定した。全ての投与群で死亡はみられなかったものの、4000 ppm 群では、体重増加の抑制が認められ、肝臓、脾臓の臓器重量が増加した。また赤血球の破壊とそれに伴う脾臓での髄外造血、骨髄での赤血球造血亢進、さらに肝臓、精巣でも顕著な傷害性変化が認められ、この濃度は 2 年間のがん原性試験の最大耐量を超えると推定した。2000 ppm 群でも、血液/造血系、肝臓、脾臓、脂質代謝への影響がみられたものの、体重、摂餌量は投与 1 週間目に低下がみられたが、その後、対照群との差が認められなかった。以上より、がん原性試験は最高濃度を 2000 ppm とした。また、最低濃度の 63 ppm 群で肝臓、血液/造血系への軽度の影響が認められたことから、最低濃度は 63 ppm に近い濃度がふさわしいと考えられた。従って、公比を 5 とし、2000 ppm、400 ppm、80 ppm と決定した。

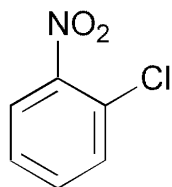
I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : *o*-クロロニトロベンゼン (*o*-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 (被験物質混合飼料の安定性分析のみに使用)
 SEF9795 (本試験の投与に使用)
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 グ レ ー ド : 和光特級
 純 度 : PAK9795 : 99.3%, SEF9795 : 99.9%
 (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 *o*-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、*o*-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) と同じ波数にピークが認められ、被験物質は *o*-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 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 *o*-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 *o*-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 L 2 に示した。

I-4 試験動物

動物は、*o*-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、体重値の中央値に近い雌雄各 60 匹 (投与開始時体重範囲、雄：119～134g、雌：94～103g) 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12月7日から2002年3月10及び11日までの13週間(94~95日間)、定期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週に1回とした。

II-1-4 投与濃度

63, 250, 1000, 2000 ppm 及び 4000 ppm の5段階(公比4に2000 ppmを追加)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、がん原性試験の投与濃度を決定するために13週間とした。(文献4)

各群の投与濃度は、当試験の前に実施した2週間試験の結果(文献5)をもとに決定した。すなわち、2週間試験では、被験物質を粉末飼料に混合し、10000 ppmを最高投与濃度とし、以下、5000, 2500, 1250, 625 ppm(公比2)をF344/DuCrj (Fischer) ラット (SPF) の雌雄各群5匹に2週間自由摂取させた。その結果、10000 ppm群及び5000 ppm群で摂餌量低下と体重増加の抑制がみられた。また血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、剖検、病理組織学的所見では赤血球、肝臓、脾臓、精巣等への影響がみられ、最低濃度の625 ppm群でも軽度ではあるが、肝臓と脾臓への影響が認められた。したがって13週間試験の最高用量は5000 ppmよりやや低い4000 ppmとした。また最低濃度の625 ppmでも影響が認められたことから、NOAELを検討するために、公比を4と大きく取り、1000, 250,

63 ppm の濃度を設定した。さらに、最大耐量をより正確に把握するため、2000 ppm を加えた 5 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、あらかじめ粉砕器（IKA LABOTECHNIC 製 IKA M20）で粉砕した被験物質を混合し、5000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 5000 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 63, 250, 1000, 2000 ppm 及び 4000 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及びその 7 週間後の計 2 回行った。調製した被験物質混合飼料は、翌日の投与開始用とし、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後、動物に供した。残りは約 4800g（各濃度 6 袋）づつビニール袋詰めにして密封し、餌箱充填時まで冷蔵保管した後、動物に供した。

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、96.0～101%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 L 3, 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、投与開始前に 50 ppm と 5000 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（7 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、50 ppm : 88.9%、5000 ppm : 80.4%、冷蔵保管（7 週間）では、50 ppm : 104%、5000 ppm : 99.4%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、僅かに減少するものの、許容できる範囲であると判断した。

それらの結果を APPENDIX L 5 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体重 kg 当りの 1 日被験物質摂取量(g/kg body weight per 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)
63 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	63 ppm 群	10 匹 (2101~2110)
250 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	250 ppm 群	10 匹 (2201~2210)
1000 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	1000 ppm 群	10 匹 (2301~2310)
2000 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	2000 ppm 群	10 匹 (2401~2410)
4000 ppm 群	10 匹 (1501~1510)	4000 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-1 空調エリア) 内の独立した室 (雌雄とも 112 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±標準偏差）： $22.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ）、設定湿度 $55 \pm 15\%$ （実測値（平均±標準偏差）： $55 \pm 2\%$ ）、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、動物の健康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、 $W170 \times D294 \times H176\text{mm}$ ）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）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 回行った。動物の一般状態の詳細な観察は検疫開始日（導入時）、馴化開始日、馴化最終日（群構成時）及び投与開始後は毎週 1 回（各週 7 日目）に実施した。

II-3-2 体重測定

全動物について、検疫開始日（導入時）、馴化開始日、馴化最終日（群構成時）及び投与開始後は毎週 1 回（各週 7 日目）に体重を測定した。なお、定期解剖動物の搬出時にも測定を行った。

II-3-3 摂餌量測定

投与期間中の摂餌量は、全動物について、毎週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その差を給餌日数で除し、1 日当たりの摂餌量を算出した。

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。

なお、検査対象動物は解剖日前日より(18 時間以上)絶食させた。

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 M 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。

なお、検査対象動物は解剖日前日より(18 時間以上)絶食させた。

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 M 1 に示した。

II-3-6 尿検査

投与 13 週 5 日目に採尿可能な全動物について新鮮尿を採取し、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 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

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、光学顕微鏡で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、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 数値処理と統計学的方法

II-4-1 数値の取扱いと表示

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、給餌量と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。

o-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 *o*-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 per 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 N 1 に示した単位と精度により表示した。

なお、各数値データにおける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た。麻酔死により採血できなかった動物(動物番号 1503)の血液学的検査、血液生化学検査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として行い、検査数を母数とした。

剖検データは、各群の有効動物数を母数とした。

病理組織学的検査データは、臓器別の検査動物数を母数とした。

II-4-3 統計方法

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、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非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲等を基準として 1~4 にグレード分けし、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群との χ^2 検定を行った。

なお、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>

黄色尿が投与 1 週目から 4000 ppm と 2000 ppm 群の全動物に、投与 2 週目から 1000 ppm 群の全動物に、それぞれ投与終了時まで観察された。被毛の着色が 4000 ppm 群に投与 5 週目から 1~3 匹にみられた。250 ppm 群以下の動物には異常所見は認められなかった。

<雌>

黄色尿が投与 1 週目から 4000 ppm と 2000 ppm の群の全動物に、1000 ppm 群では投与 3 週目からみられ、5 週目以降は全動物に、それぞれ投与終了時まで観察された。被毛の着色が投与 1 週目から 4000 ppm と 2000 ppm 群に各群 3~8 匹の動物で、投与 3 週目から 1000 ppm 群に 1~5 匹にみられた。尿による外陰部周囲の汚染が 2000 ppm 群に 1 匹 8 週目にみられた。250 ppm 群以下の動物には異常所見は認められなかった。

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>

4000 ppm 群では、全投与期間にわたり、体重の低値が認められた。2000 ppm 群では、投与 1 週目にのみ、体重の低値が認められた。1000 ppm 以下の群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、最終計測日(13 週 7 日)の体重は、対照群と比較して、4000 ppm 群 : 83%、2000 ppm 群 : 97%、1000 ppm 群 : 101%、250 ppm 群 : 101%、63 ppm 群 : 103%であった。

<雌>

4000 ppm 群では、全投与期間にわたり、体重の低値が認められた。2000 ppm 以下の群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

なお、最終計測日(13 週 7 日)の体重は、対照群と比較して、4000 ppm 群 : 87%、2000 ppm 群 : 95%、1000 ppm 群 : 96%、250 ppm 群 : 101%、63 ppm 群 : 99%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>

4000 ppm 群では、ほぼ全投与期間にわたり、摂餌量の低値がみられた。2000 ppm 群では、投与 1 週目に摂餌量の低値を示した。1000 ppm 以下の群では、対照群とほぼ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、4000 ppm 群：68～95%、2000 ppm 群：90～105%、1000 ppm 群：99～109%、250 ppm 群：98～105%、63 ppm 群：101～104%の範囲にあった。

<雌>

4000 ppm 群では、ほぼ全投与期間にわたり、摂餌量の低値がみられた。2000 ppm と 1000 ppm 群では、投与 1 週目に摂餌量の低値を示した。250 ppm 以下の群では、対照群とほぼ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、4000 ppm 群：66～90%、2000 ppm 群：84～106%、1000 ppm 群：93～100%、250 ppm 群：96～104%、63 ppm 群：96～108%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。

各投与群摂取量に対する、一段階高い濃度の群の被験物質摂取量の比は設定比(2 または 4)とほぼ等しい値を示した。しかし、第 1 週の 4000 ppm 群では、2000 ppm 群に比べて、公比 2.0 より低い 1.67 (雄)、1.73 (雌) となり、一時的な摂食忌避が認められた。

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 per day) は、雄では、4000 ppm 群：0.192～0.306、2000 ppm 群：0.094～0.154、1000 ppm 群：0.045～0.080、250 ppm 群：0.011～0.020、63 ppm 群：0.003～0.005、雌では、4000 ppm 群：0.214～0.315、2000 ppm 群：0.115～0.161、1000 ppm 群：0.055～0.080、250 ppm 群：0.013～0.020、63 ppm 群：0.003～0.005 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。雄の 4000 ppm 群で麻酔死が 1 匹あり、検査数は 9 であった。

<雄>

ヘモグロビン濃度と MCHC の減少が 250 ppm 以上の群で認められ、赤血球数とヘマトクリット値の減少及び網赤血球比の増加が 1000 ppm 以上の群で、MCV とメトヘモグロ

ビン濃度の増加が 2000 ppm 以上の群で、血小板数の減少が 4000 ppm 群で認められた。MCH は 4000 ppm 群では増加したが、2000 ppm、1000 ppm 及び 250 ppm の各群では減少した。その他、血小板数の増加が 250 ppm 群、分葉核好中球比の減少が 4000 ppm と 1000 ppm の両群、活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が 1000 ppm 群で認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

63 ppm 群では、血液学的検査項目に変化は認められなかった。

<雌>

赤血球数とヘモグロビン濃度の減少が全投与群で、MCHC の減少が 250 ppm 以上の群で、ヘマトクリット値の減少及び MCV と網赤血球比の増加が 1000 ppm 以上の群で、メトヘモグロビン濃度の増加、プロトロンビン時間の延長及び血小板数の減少が 2000 ppm 以上の群で認められた。MCH は 1000 ppm と 2000 ppm の両群で減少した。

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。雄の 4000 ppm 群で麻酔死が 1 匹あり、検査数は 9 であった。

<雄>

総蛋白とアルブミンの増加が全投与群で、カルシウムの増加が 250 ppm 以上の群で、総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質の増加と GPT の上昇、クロールの減少が 1000 ppm 以上の群で、トリグリセライドの増加、GOT と γ -GTP の上昇が 2000 ppm 以上の群で、LDH と ALP の上昇、尿素窒素の増加及びグルコースとナトリウムの減少が、4000 ppm 群で認められた。ALP は 4000 ppm 群では上昇したが、1000 ppm と 250 ppm の両群で低下した。A/G 比は 2000 ppm、1000 ppm、250 ppm 群で増加した。CPK は 2000 ppm と 1000 ppm の両群で低下した。1000 ppm 群と 250 ppm 群でみられた ALP の低下と CPK の低下は、投与濃度に対応した変化ではなかった。

<雌>

総蛋白とアルブミン及び A/G 比の増加が 250 ppm 以上の群で、総コレステロール、リン脂質及びカルシウムの増加と γ -GTP の上昇が 1000 ppm 以上の群で、総ビリルビン、トリグリセライドの増加と GPT の上昇が 2000 ppm 以上の群で、GOT と ALP の上昇、尿素窒素の増加及びクロールの減少が 4000 ppm 群で認められた。その他、グルコースの増加が 250 ppm 群で認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

III-8 尿検査

尿検査の結果を TABLE 9, 10、APPENDIX G 1, 2 に示した。

pH の低下が雄の 2000 ppm 以上の群でみられた。なお、pH の上昇が雌の 250 ppm 群

で認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-9 病理学的検査

Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX H 1, 2 に示した。

<雄>

2000 ppm 以上の群の全動物に脾臓の粗面化と暗色化、肝臓の暗色化がみられた。なお、肝臓のヘルニアが対照群と 250 ppm 群に各 2 匹、1000 ppm 群と 2000 ppm 群に各 1 匹みられたが、先天的なものであり、投与との関係はないと考えた。

<雌>

4000 ppm 群の全動物に脾臓の粗面化と暗色化、肝臓の暗色化がみられた。なお、肝臓のヘルニアが 2000 ppm 群に 2 匹、63 ppm 群、1000 ppm 群及び 4000 ppm 群に各 1 匹みられたが、先天的なものであり、投与との関係はないと考えた。

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)、APPENDIX J 1, 2 (体重比) に示した。

<雄>

肝臓は全投与群で実重量、250 ppm 以上の群で体重比の高値を示し、腎臓と脾臓は 1000 ppm 以上の群で実重量と体重比の高値を示した。精巣は 2000 ppm 群で実重量と体重比の高値、4000 ppm 群で実重量と体重比の低値を示した。なお、投与群において、胸腺は実重量の低値、心臓と脳は実重量の低値と体重比の高値、肺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 250 ppm 以上の群で体重比、1000 ppm 以上の群で実重量の高値を示し、腎臓は 1000 ppm 以上の群で実重量と体重比の高値を示し、脾臓は 1000 ppm 以上の群で体重比、2000 ppm 以上の群で実重量の高値を示した。63 ppm 群には投与の影響と考えられる変化はみられなかった。

なお、胸腺は実重量の低値、副腎は実重量の低値、肺は実重量の低値と体重比の高値が、心臓と脳は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-9-3 病理組織学的検査

定期解剖時の病理組織学的検査の結果を TABLE 13, 14、APPENDIX K 1, 2 に示した。

<雄>

脾臓、骨髄、肝臓、腎臓、精巣及び精巣上体に投与の影響と考えられる所見が観察された。

脾臓には、ヘモジデリン沈着と赤血球充満が 250 ppm 以上の群、髄外造血の亢進が 1000 ppm 以上の群、被膜増生が 2000 ppm 以上の群でみられた。赤血球充満及び被膜増生は投与濃度に対応してその程度が増強した。

骨髄には赤血球造血の亢進が 2000 ppm 以上の群でみられた。

肝臓には、単細胞壊死、ヘモジデリン沈着及び小葉中心性の水腫様変性が 1000 ppm 以上の群でみられた。また、小葉中心性の肝細胞肥大が 2000 ppm 以上の群に認められた。小葉中心性の水腫様変性及び肝細胞の肥大は投与濃度に対応してその程度が増強した。

腎臓には近位尿細管への褐色色素沈着が 1000 ppm 以上の群でみられ、その程度は投与濃度に対応して増強した。また、硝子円柱の発生が 2000 ppm 以上の群で増加した。なお、好酸体は 2000 ppm 以上の群で減少した。

精巣に精原細胞壊死、精巣上体には精子の減少と精上皮系細胞の残屑の出現が 4000 ppm 群に認められた。

他の臓器及び 63 ppm 群には、投与の影響と考えられる変化はみられなかった。

<雌>

脾臓、骨髄、肝臓及び腎臓に投与の影響と考えられる所見が観察された。

脾臓には、ヘモジデリン沈着と赤血球充満が 250 ppm 以上の群、髄外造血の亢進が 1000 ppm 以上の群、被膜増生が 2000 ppm 以上の群でみられた。赤血球充満及び被膜増生は投与濃度に対応してその程度が増強した。

骨髄には赤血球造血の亢進が 2000 ppm 以上の群でみられた。

肝臓には、単細胞壊死とヘモジデリン沈着が 1000 ppm 以上の群でみられた。また、小葉中心性の水腫様変性が 1000 ppm 以上の群にみられ、その程度は投与濃度に対応し増強した。小葉中心性の肝細胞の肥大は 2000 ppm 以上の群にみられた。

腎臓には近位尿細管への褐色色素沈着が 250 ppm 以上の群にみられ、投与濃度に対応してその程度が増強した。

他の臓器及び 63 ppm 群には、投与の影響と考えられる変化はみられなかった。

IV 考察及びまとめ

o-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) のがん原性試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するために 13 週間試験を実施した。投与は *o*-クロロニトロベンゼンを各設定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 10 匹の動物を用いた。投与濃度は、雌雄ともに、4000, 2000, 1000, 250, 63 ppm (公比 4 に 2000 ppm を追加) に設定した。

(1) 用量-反応関係

4000 ppm 群では、雌雄とも全投与期間にわたり体重及び摂餌量の低値が認められ、一般状態の観察では投与期間を通じて被験物質の代謝産物によると考えられる黄色尿がみられた。被験物質の投与による影響は、血液/造血系、肝臓、腎臓、脂質代謝及び雄の生殖系に認められた。血液/造血系への影響として、血液学的検査で雌雄に貧血を示すパラメータである赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少がみられ、また、血小板数及び MCHC の減少、並びに MCV、網赤血球比及びメトヘモグロビン濃度の増加、雄に MCH の増加、雌にプロトロンビン時間の延長がみられた。脾臓には雌雄とも剖検で粗面化と暗色化、実重量と体重比の増加、病理組織学的検査でヘモジデリン沈着、赤血球充満、髄外造血の亢進及び被膜増生が認められた。骨髄には赤血球造血の亢進が雌雄にみられた。また、ヘモジデリンの沈着は雌雄とも肝臓にも認められた。脾臓や肝臓にヘモジデリン沈着の増加がみられること、及び脾臓での髄外造血の亢進と骨髄の赤血球造血の亢進が認められることから、貧血の原因は、赤血球造血の抑制ではなく、赤血球の溶血や脆弱化による脾臓での破壊の促進によると推察される。また、メトヘモグロビン濃度の増加がみられることから、赤血球の障害には被験物質の投与によるメトヘモグロビン生成が関与していると考えられる。また、総ビリルビンの増加も赤血球の溶血や脾臓での破壊の促進に伴う変化と考えられるが、肝臓からのビリルビンの排泄の抑制も関与している可能性がある (文献 8)。肝臓への影響として、実重量と体重比の増加、血液生化学的検査では GOT、GPT、ALP 及び γ -GTP の上昇が雌雄に、また、LDH の上昇が雄にみられた。剖検では、暗色化が、病理組織学的検査では、単細胞壊死及び小葉中心性の水腫様変性と肝細胞肥大が雌雄にみられた。このように、肝臓には単細胞壊死及び小葉中心性の水腫様変性、並びに肝細胞の傷害を示すパラメータである GOT、GPT、ALP あるいは LDH の上昇がみられることから、投与により肝細胞の傷害が起きていることが示唆された。一方、チトクローム P-450 等の薬物代謝酵素の誘導に伴って観察される所見である小葉中心性の肝細胞の肥大 (文献 8) も認められ、肝臓における毒物代謝の亢進が示唆された。腎臓への影響としては、雌雄とも実重量と体重比の増加がみられ、血液生化学的検査で尿素窒素の増加、病理組織学的検査で近位尿細管への褐色色素沈着が雌雄に、硝子円柱の発生増加

が雄に認められた。脂質代謝では、雌雄に総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の増加が認められた。雄の生殖系への影響として、精巣の実重量と体重比の低下と精原細胞壊死がみられ、精巣上体には精子減少と精上皮系細胞の残屑の出現がみられ、被験物質の投与により精子形成への障害がみられることが示された。その他、被験物質の投与による影響と考えられる変化として、血液生化学的検査で雌雄に総蛋白、アルブミン及びカルシウムの増加、並びにクロールの減少、雄にグルコースとナトリウムの減少、雌にA/G比の増加、尿検査で雄に尿pHの低下がみられた。

2000 ppm 群では、投与 1 週目にのみ雄に体重、雌雄に摂餌量の低値がみられたものの、その後は対照群との間に差が認められなかった。一般状態の観察では黄色尿が投与期間を通じて雌雄にみられ、血液/造血系、肝臓、腎臓及び脂質代謝への影響が認められた。血液/造血系への影響として、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCH 及び MCHC の減少、MCV、網赤血球比及びメトヘモグロビン濃度の増加が雌雄に、プロトロンビン時間の延長、血小板数の減少が雌にみられた。また、脾臓には、雌雄に実重量と体重比の増加が認められ、剖検で雄のみに粗面化と暗色化、病理組織学的検査で雌雄にヘモジデリン沈着、赤血球充満、髄外造血の亢進及び被膜増生がみられた。また、骨髄には雌雄に赤血球造血の亢進がみられた。肝臓への影響として、実重量と体重比の増加、血液生化学的検査で総ビリルビンの増加、GPT、 γ -GTP の上昇が雌雄に、GOT の上昇が雄にみられた。病理組織学的検査では雌雄に単細胞壊死、小葉中心性の水腫様変性と肝細胞肥大、ヘモジデリン沈着がみられた。腎臓への影響として、雌雄に実重量と体重比の増加が認められ、病理組織学的検査では近位尿細管への褐色色素沈着が雌雄にみられ、雄では硝子円柱の発生が増加した。脂質代謝への影響として、雌雄に総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の増加が認められた。その他、血液生化学的検査で雌雄に総蛋白、アルブミン、A/G 比及びカルシウムの増加、雄にクロールの減少、尿検査で雄に尿pHの低下が認められた。

1000 ppm 群では、摂餌量の低値が雌の投与 1 週目にみられただけで、体重は対照群との間に差が認められなかったが、黄色尿が投与初期より雌雄にみられ、血液/造血系、肝臓、腎臓及び脂質代謝への影響が認められた。血液/造血系への影響として、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCH 及び MCHC の減少、網赤血球比の増加が雌雄に、MCV の増加が雌にみられた。脾臓には実重量の増加が雄に、体重比の増加が雌雄にみられ、病理組織学的検査ではヘモジデリン沈着、赤血球充満、髄外造血の亢進が認められたが、赤血球充満の程度はより軽度であった。肝臓への影響として、雌雄とも実重量と体重比の増加、血液生化学的検査で雄に総ビリルビンの増加、GPT の上昇、雌に γ -GTP の上昇がみられ、病理組織学的検査では単細胞壊死、小葉中心性の水腫様変性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、雌雄とも実重量と体重比の増加がみられ、近位尿細管への褐色色素沈着が認められた。脂質代謝への影響として、雌雄に総コレステロールとリン脂質の増加が認められた。その他、血液生化学的検査で雌雄に総蛋

白、アルブミン、A/G 比及びカルシウムの増加、雄にクロールの減少が認められた。

250 ppm 群では、雌雄とも体重及び摂餌量は対照群との間に差が認められなかったが、血液／造血系、肝臓及び腎臓への影響が認められた。血液／造血系への影響として、ヘモグロビン濃度と MCHC の減少が雌雄に、MCH の減少が雄に、赤血球数の減少が雌にみられ、脾臓にはヘモジデリン沈着と赤血球充満が認められた。肝臓への影響として、実重量の増加が雄に、体重比の増加が雌雄にみられたが、病理組織学的検査では雌雄とも変化が認められなかった。腎臓への影響として、雌にのみ近位尿細管への褐色色素沈着がみられた。その他、血液生化学的検査で、雌雄に総蛋白、アルブミン及び A/G 比の増加、雄にカルシウムの増加がみられた。

63 ppm 群では、雌雄とも、体重及び摂餌量は対照群との間に差が認められなかったが、血液／造血系と肝臓への影響が認められた。血液／造血系への影響として、赤血球数、ヘモグロビン濃度の減少が雌にみられた。肝臓への影響として、実重量の増加が雄にのみ認められた。その他、血液生化学的検査で雄に総蛋白及びアルブミンの増加がみられた。

以上のように本試験では *o*-クロロニトロベンゼンの投与による動物の死亡はみられず、体重の増加抑制は 4000 ppm 群のみにみられ、メトヘモグロビン血症によると考えられる血液／造血系への影響、肝臓への影響、腎臓、脂質代謝及び雄の生殖系への影響が認められた。これらの毒性影響がみられた最低用量については、1)血液／造血系への影響は、雌に赤血球数、ヘモグロビン濃度の減少がみられた 63 ppm、2)肝臓への影響は、雄に実重量の増加がみられた 63 ppm、3)腎臓への影響は、雌で近位尿細管へ褐色色素沈着がみられた 250 ppm、4)脂質代謝への影響は、雌雄に総コレステロール、リン脂質の増加がみられた 1000 ppm、5)雄の生殖系への影響は、精巣の実重量と体重比の低下及び精原細胞壊死、精巣上体の精子の減少と精上皮系細胞の残屑の出現がみられた 4000 ppm であった。

(2) 最小毒性量 (LOAEL)

最低投与濃度の 63 ppm まで、血液／造血系に対する影響が雌に、肝臓に対する影響が雄に認められた。従って、*o*-クロロニトロベンゼンの 13 週間の混餌経口投与による最小毒性量は、肝臓と血液／造血系に対する影響をエンドポイントとして 63 ppm (雄雌ともに : 0.003~0.005g/kg body weight per day) と考えた。

(3) 他の文献との比較

①血液毒性：本試験では *o*-クロロニトロベンゼンを経口投与したラットに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、肝臓と脾臓の重量増加とヘモジデリン沈着、骨髄での赤血球造血の亢進、脾臓での髓外造血の亢進、

赤血球充満等血液／造血系への影響が認められ、溶血性貧血と修復性の造血亢進が示唆された。

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、脾臓及び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変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、貧血と赤血球障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という。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、4000 ppm の *o*-クロロニトロベンゼン混餌経口投与した雄ラットは *o*-クロロニトロベンゼンを 1 日 192~306 mg/kg 摂取し、メトヘモグロビン濃度は 1.4%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 per day と推定される。このように、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、1000 ppm 以上の群で、*o*-クロロニトロベンゼン投与期間中、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、排泄されることが知られている（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職業性暴露限界：*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、がん原性試験結果の不充分性を考慮し、*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 15）。

(4) がん原性試験の濃度設定

がん原性試験の投与濃度を以下の通り設定した。

13 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、4000 ppm 群では、体重増加の抑制が認められ、肝臓、脾臓の臓器重量が増加した。また赤血球の破壊とそれに伴う脾臓での髄外造血、骨髄での赤血球造血亢進、さらに肝臓、精巣でも顕著な傷害性変化が認められ、この濃度は 2 年間のがん原性試験の最大耐量を超えると推定した。2000 ppm 群でも、血液／造血系、肝臓、脾臓、脂質代謝への影響がみられたものの、体重、摂餌量は投与 1 週間目に低下がみられたが、その後、対照群との差が認められなかった。以上より、がん原性試験は最高濃度を 2000 ppm とした。また、最低濃度の 63 ppm 群で肝臓、血液／造血系への軽度の影響が認められたことから、最低濃度は 63 ppm に近い濃度がふさわしいと考えられた。従って、公比を 5 とし、2000, 400, 80 ppm と決定した。

V 文献

1. 化学工業日報社. 2003. 14303 の化学商品. 東京:化学工業日報社,886-887.
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York,NY:John Wiley and Sons.
3. 和光純薬工業(株). 2001. *o*-クロロニトロベンゼン,赤外吸収スペクトル.
4. OECD. 1998. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 408 “Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents”, Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
5. 日本バイオアッセイ研究センター.2003.*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. 神奈川: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.
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. 織田敏次,山中正己.1975. 肝小葉内における薬物代謝系の局在:薬物と肝臓 (織田敏次, 市田文弘, 山中正己 編).東京:中外医学社, 7-11.
8. Popp JA, Cattley RC. 1991. Hepatobiliary System. In:Handbook of Toxicologic Pathology.(Haschek WM, Rousseaux CG, eds). San Diego,CA:Academic Press, 279-314.
9. Nair RS, Johannsen FR, Levinskas GJ, Terrill JB. 1986. Assessment of toxicity of *o*-nitrochlorobenzene in rats following a 4-week inhalation exposure. Fundam Appl Toxicol 7:609-614.
10. Travlos GS, Mahler J, Ragan HA, Chou BJ, Bucher JR. 1996. Thirteen-week inhalation toxicity of 2-and 4-chloronitrobenzene in F344/N rats and B6C3F₁ mice. Fundam Appl Pharmacol 30:75-92.

11. NTP. 1993. NTP Technical Report on Toxicity Studies of 2-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene (CAS No. 88-73-3 and 100-00-5). Administered by Inhalation to F344/N Rats and B6C3F₁ Mice. Toxicity Report Series 33. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program.
12. Watanabe T, Ishihara N, 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 DE, Held SD. 1990. Metabolism of chloronitrobenzenes by isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 18:5-9.
14. IARC. 1996. 2-Chloronitrobenzene, 3-chloronitrobenzene and 4-chloronitrobenzene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 65. Printing Process and Printing Inks, Carbon Black and Some Nitro Compounds: Lyon: International Agency for Research on Cancer, 263-296.
15. DFG. 1992. *o*-Chloronitrobenzene. In: Occupational Toxicants. Critical Data Evaluation for MAK Values and Classification of Carcinogens. (Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area (Chairman: Henschler D.) ed). Vol 4. Weinheim: VCH Verlag. Deutsche Forschungsgemeinschaft, 107-114.