

o-クロロ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： 0440

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）

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（混餌試験）の投与濃度を決定するために、o-クロロニトロベンゼンをマウスに 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： 0440

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	8
	(1) 剖検	8
	(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	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	尿検査	14
III-9	病理学的検査	14
	III-9-1 剖検	14
	III-9-2 臓器重量	15
	III-9-3 病理組織学的検査	15
IV	考察及びまとめ	17
V	試験の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項	21
VI	文献	22

要 約

o-クロロニトロベンゼンの Crj:BDF₁ マウス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 5000, 2500, 1250, 313, 78 ppm (公比 4 に 2500 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、5000 ppm 群では体重の増加抑制が投与初期にのみみられ、代謝産物によると考えられる黄色尿がみられた。被験物質投与による影響は、血液/造血系(赤血球数減少等の血液学的パラメータの変化、脾臓重量の増加、脾臓での赤血球充満と髄外造血の亢進、脾臓、肝臓及び腎臓でのヘモジデリン沈着)、肝臓(肝臓重量の増加、小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型、GPT、 γ -GTP 及び ALP の上昇)、腎臓(腎臓重量の増加、尿素窒素の増加)、脂質代謝への影響(総コレステロールとリン脂質の増加)及び鼻腔(嗅上皮の萎縮)にみられた。血液生化学的検査では総蛋白、アルブミン及びカルシウムの増加等が認められた。2500 ppm 群では体重は対照群とほぼ同様の推移を示した。黄色尿は 1250 ppm 以上の群でみられた。血液/造血系、肝臓への影響及び脂質代謝への影響は 313 ppm 以上の群、腎臓への影響は 1250 ppm 以上の群、鼻腔への影響は 2500 ppm 以上の群でみられた。78 ppm 群では投与の影響と考えられる所見は認められなかった。

上記の結果より、血液/造血系への影響(脾臓のヘモジデリン沈着の増加)、肝臓への影響(小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型)及び脂質代謝(リン脂質の増加)をエンドポイントとして、*o*-クロロニトロベンゼンの混餌経口投与による無毒性量 (NOAEL) は 78 ppm(雄 : 0.010~0.013 g/kg body weight per day、雌 : 0.012~0.015 g/kg body weight per day)と考えた。

以上の 13 週試験結果より、がん原性試験の投与濃度を以下の通り設定した。

5000 ppm 群では、肝臓、脾臓の臓器実重量が増加した。また、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、病理組織学的検査の結果から、赤血球の破壊とそれに伴う脾臓でのヘモジデリン沈着と髄外造血亢進が認められ、さらに肝臓でも小葉中心性肝細胞の核異型等の顕著な変化が認められ、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。2500 ppm 群でも、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、病理組織学的所見で赤血球、肝臓、脾臓等への影響がみられたが、体重、摂餌量は対照群とほぼ同様の推移を示した。以上の結果より、がん原性試験は最高濃度を 2500 ppm とした。また最低濃度の 78 ppm 群では投与の影響と考えられる異常所見は認められなかった。従って、最低濃度は 78 ppm と 313 ppm の間と考え、公比を 5 とし、2500, 500, 100 ppm と決定した。

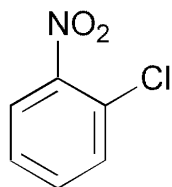
I 試験材料

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 Crj:BDF₁ マウス (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 Crj:BDF₁ マウスを使用することが決定している。

マウス雌雄各 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：21.4～24.0g、雌：17.3～19.7g) 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14日から2002年3月17及び18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

78, 313, 1250, 2500 ppm 及び 5000 ppm の 5 段階（公比 2 に 2500 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 Crj:BDF₁ マウス (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 群では雌雄とも 5 匹中 2 匹が死亡した。5000 ppm 群では体重、摂餌量にはほとんど影響がみられなかったが、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、脾臓等への影響がみられ、最低濃度の 625 ppm 群でも肝臓、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 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、1250, 313, 78 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、2500 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 78, 313, 1250 及び 2500 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、マウス用餌箱に充填して翌日の投与開始まで室温で保管した。残りは約 2200g（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。

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、95.0～101%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マウス用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管（8 日間）したものと、ビニール袋詰めにして密封し、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 : 89.7%、5000 ppm : 80.6%、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)
78 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	78 ppm 群	10 匹 (2101~2110)
313 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	313 ppm 群	10 匹 (2201~2210)
1250 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	1250 ppm 群	10 匹 (2301~2310)
2500 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	2500 ppm 群	10 匹 (2401~2410)
5000 ppm 群	10 匹 (1501~1510)	5000 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 111 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 \pm 標準偏差）： $22.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ）、設定湿度 $55 \pm 15\%$ （実測値（平均 \pm 標準偏差）： $56 \pm 3\%$ ）、明暗サイクル：12 時間点灯（8：00～20：00）／12 時間消灯（20：00～8：00）、換気回数 15～17 回／時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、W112×D212×H120mm）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、死亡及び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、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

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、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、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、胆のう、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、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、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、測定可能な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。クロットにより検査できなかった動物(動物番号 1209)の血液学的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、臓器別に欠損による検査不能の動物数を減じた動物数を母数とした。欠損臓器は、胸腺では雄の対照群で1匹、卵巣では雌の78 ppm群で1匹、上皮小体では、雄の対照群、78 ppm群、313 ppm群、2500 ppm群及び5000 ppm群で各1匹、1250 ppm群で2匹、雌の対照群で1匹、78 ppm群で2匹、313 ppm群で4匹であった。

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、APPENDIX A 1 に示した。

雄の 1250 ppm で 4 週 6 日に死亡動物が 1 匹みられた。雌では、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>

1250 ppm 以上の群で全ての動物に、黄色尿が投与 1 週目から投与終了時まで観察された。なお、1250 ppm 群で死亡した 1 匹の動物は、1 週 7 日に糞少量が、3 週 7 日に糞小粒と胸部に外部腫瘍がみられ、4 週 6 日に死亡した。その他、5000 ppm 群では、1 匹に糞小粒、2 匹に糞少量が投与 1,2 週にみられた。また、313 ppm 群と 78 ppm 群には異常所見はみられなかった。

<雌>

1250 ppm 以上の群で全ての動物に、黄色尿が投与 1 週目から投与終了時まで観察された。その他、78 ppm 群で投与 6 週より内部腫瘍が 1 匹にみられた。313 ppm 群には異常所見はみられなかった。

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>

5000 ppm 群では、投与 1 週目に、体重が低下し、2 週目と 7 週目に低値を示したが、以降大きな差はみられなかった。

2500 ppm 以下の 4 投与群では、対照群と同様な体重の推移を示した。

なお、最終計測日(13 週 7 日)の体重は、対照群と比較して、雄では、5000 ppm 群 : 93%、2500 ppm 群 : 100%、1250 ppm 群 : 103%、313 ppm 群 : 103%、78 ppm 群 : 104%であった。

<雌>

全投与群とも対照群とほぼ同様な体重の推移を示した。

なお、最終計測日(13 週 7 日)の体重は、対照群と比較して、5000 ppm 群 : 107%、2500 ppm 群 : 107%、1250 ppm 群 : 110%、313 ppm 群 : 105%、78 ppm 群 : 103%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>

5000 ppm 群では投与 1 週目に摂餌量の低値がみられたが、2 週目以降は、対照群とほぼ同様の摂餌量の推移を示した。2500 ppm 以下の群では対照群と同様の摂餌量の推移を示した。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、5000 ppm 群：76～103%、2500 ppm 群：95～121%、1250 ppm 群：98～108%、313 ppm 群：95～111%、78 ppm 群：98～108%の範囲にあった。

<雌>

5000 ppm 群では投与 6 週目に摂餌量の低値がみられたが、その他の週は、対照群とほぼ同様の摂餌量の推移を示した。2500 ppm 以下の群では対照群と同様の摂餌量の推移を示した。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、5000 ppm 群：92～114%、2500 ppm 群：94～106%、1250 ppm 群：97～105%、313 ppm 群：97～106%、78 ppm 群：94～103%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、各投与群の被験物質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公比(4 または 2)とほぼ同じ値を示した。

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 per day) は、雄では 5000 ppm 群：0.652～0.820、2500 ppm 群：0.300～0.442、1250 ppm 群：0.153～0.207、313 ppm 群：0.039～0.053、78 ppm 群：0.010～0.013、雌では 5000 ppm 群：0.711～0.969、2500 ppm 群：0.372～0.434、1250 ppm 群：0.188～0.226、313 ppm 群：0.049～0.059、78 ppm 群：0.012～0.015 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。ただし、5000 ppm 群のヘモグロビン濃度測定時、試薬と血液を混合した反応液が混濁した。シアンメトヘモグロビン法による測定は原理が比色法であるため、測定値に正の誤差(高値)が生じた。この混濁の原因は、被験物質の影響で血液中の赤血球が異常赤血球に変化したためと考えられる。このためヘモグロビン濃度及びヘモグロビン濃度を計算式に用いる MCH と MCHC は、5000 ppm 群については評価の対象として用いなかった(21 頁:第 V 項参照)。

<雄>

赤血球数、ヘモグロビン濃度(5000 ppm 群は評価の対象外)及びヘマトクリット値の減少、リンパ球比の増加が 1250 ppm 以上の群でみられた。分葉核好中球比と好酸球比の減少が 2500 ppm 以上の群でみられた。その他、MCH の増加が 2500 ppm 群で、MCHC の減少が 313 ppm 群で、MCV の増加が 1250 ppm 群でみられたが、投与の影響かは明らかでなかった。78 ppm 群に血液学的検査項目の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(5000 ppm 群は評価の対象外)の減少が 1250 ppm 以上の群でみられた。ヘマトクリット値の減少が 2500 ppm 以上の群でみられた。その他、MCV の増加が 313 ppm 群と 1250 ppm でみられた。MCHC の減少が 1250 ppm 群でみられた。78 ppm 群ではヘマトクリット値が増加したが、高濃度群では逆に減少しており、投与の影響とは考えなかった。

(付記) マウスでは、採血量が少ないため、メトヘモグロビン濃度の測定は、本試験における血液学的検査での検査項目としては実施せず、本試験では余剰血液を用いてメトヘモグロビン濃度測定検討を同時に実施した。その結果、定期解剖時まで生存した 119 匹のうち 116 匹について、メトヘモグロビン濃度の測定が可能であり、メトヘモグロビン濃度の投与濃度に対応した増加傾向(雄; 対照群: 0.3%、78 ppm 群: 0.3%、313 ppm 群: 0.3%、1250 ppm 群: 0.4%、2500 ppm 群: 0.9%、5000 ppm 群: 1.7%、雌; 対照群: 0.3%、78 ppm 群: 0.3%、313 ppm 群: 0.3%、1250 ppm 群: 0.6%、2500 ppm 群: 0.9%、5000 ppm 群: 2.0%) が認められた (APPENDIX O 1 参照)。

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>

総蛋白の増加が 313 ppm 以上の群で認められた。アルブミン、総コレステロール、リン脂質及びカルシウムの増加が 1250 ppm 以上の群で認められた。尿素窒素の増加と GPT の上昇が 2500 ppm 以上の群で、ALP と γ -GTP の上昇、クロールの減少が 5000 ppm 群でみられた。その他、トリグリセライドの増加と GOT の低下が 1250 ppm 群で、グルコースの増加が 2500 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。78 ppm 群に血液生化学的検査項目の変化は認められなかった。

<雌>

リン脂質の増加が 313 ppm 以上の群で認められた。総蛋白、総コレステロール、カルシウムの増加及び GPT の上昇が 1250 ppm の以上の群でみられた。アルブミンとグルコー

スの増加が 2500 ppm 以上の群で認められた。総ビリルビン、尿素窒素及び無機リンの増加と γ -GTP の上昇、クロールの減少が 5000 ppm 群でみられた。その他、ALP は 313 ppm から 2500 ppm の 3 群で低下、トリグリセライドは 2500 ppm 群で増加、カリウムは 1250 ppm で減少を示したが、投与との関係については明らかでなかった。78 ppm 群では血液生化学的検査項目の変化は認められなかった。

III-8 尿検査

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

雌雄とも投与の影響と考えられる変化は認められなかった。なお、雄の 1250 ppm 群でケトン体の陽性度例の増加、雌の 2500 ppm 群で pH の上昇が認められたが、投与濃度に対応した変化ではないと考えた。

III-9 病理学的検査

III-9-1 剖検

剖検所見を、途中死亡動物のあった雄については、定期解剖動物を APPENDIX H 1 に、途中死亡動物を APPENDIX H 2 に、雌については全動物を APPENDIX H 3 に示した。

<雄>

5000 ppm 群の全動物で、肝臓と脾臓の暗色化が観察された。2500 ppm 以下の群では投与の影響と考えられる変化はみられなかった。

なお、水腎症の発生は 5000 ppm、313 ppm、78 ppm、対照群に各 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>

5000 ppm 群の全動物で、肝臓と脾臓の暗色化が観察された。2500 ppm 以下の群では投与の影響と考えられる変化はみられなかった。

なお、水腎症が 78 ppm 群に 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。

<死亡動物>

雄の 1250 ppm 群で 1 匹死亡動物がみられ、水腎症と胸腺の萎縮がみられた。

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 及び APPENDIX I 1, 2 (実重量)、APPENDIX J 1, 2 (体重比) に示した。

<雄>

肝臓は、実重量・体重比ともに 1250 ppm 以上の群で増加した。脾臓は、実重量・体重比ともに 2500 ppm 以上の群で増加した。腎臓は、実重量が 1250 ppm 以上の群で、体重比が 2500 ppm 以上の群で増加した。副腎は、実重量・体重比ともに 5000 ppm 群で減少した。なお、5000 ppm 群で心臓、肺及び脳の体重比が増加を示したが、体重低下による変化と判断した。313 ppm 以下の群に臓器重量の変化は認められなかった。

<雌>

肝臓は、実重量が 1250 ppm 以上の群で、体重比が 313 ppm 以上の群で増加した。脾臓は、実重量・体重比ともに 2500 ppm 以上の群で増加した。腎臓は、実重量が 2500 ppm 以上の群で、体重比が 5000 ppm 群で増加した。また、5000 ppm 群では、心臓の実重量の増加と脳の実重量の減少がみられた。78 ppm 群に臓器重量の変化は認められなかった。

Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

病理組織学的所見は、TABLE 13, 14、途中死亡動物のあった雄については、定期解剖動物を APPENDIX K 1 に、途中死亡動物を APPENDIX K 2 に、雌については全動物を APPENDIX K 3 に示した。

<雄>

肝臓、脾臓、腎臓及び鼻腔に投与の影響と考えられる所見が観察された。

肝臓で小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型が 313 ppm 以上の群で発生し、その程度は投与濃度に応じて増強した。また、ヘモジデリン沈着が 1250 ppm 以上の群にみられた。

脾臓でヘモジデリン沈着発生が 313 ppm 以上の群で増加し、5000 ppm 群では程度が増強した。また、髄外造血の亢進と赤血球充満が 1250 ppm 以上の群でみられ、その程度は投与濃度に応じて増強した。

腎臓ではヘモジデリン沈着が 5000 ppm 群でみられた。

鼻腔で嗅上皮の萎縮が 2500 ppm 以上の群でみられた。

78 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>

肝臓、脾臓、腎臓及び鼻腔に投与の影響と考えられる所見が観察された。

肝臓では小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型及びヘモジデリン沈着が 1250 ppm 以上の

群の全動物でみられ、小葉中心性肝細胞の肥大は投与濃度に応じ程度が増強した。313 ppm 群では小葉中心性の肝細胞の肥大が1匹に認められた。また、炎症性細胞集簇が1250 ppm 以上の群に4~7匹みられ増加傾向を示した。

脾臓ではヘモジデリン沈着発生が313 ppm 以上の群、髄外造血の亢進と赤血球充満が1250 ppm 以上の群でみられた。これらの所見は投与濃度に対応して程度が増強した。

腎臓ではヘモジデリン沈着が5000 ppm 群でみられた。

鼻腔で嗅上皮の萎縮が2500 ppm 以上の群でみられた。

<死亡動物>

雄の1250 ppm 群に1匹死亡動物がみられ、胸腺で萎縮、脾臓でヘモジデリン沈着、心臓で血栓と壊死、肝臓で小葉中心性肝細胞の核異型、腎臓で水腎症と炎症性ポリープがみられた。この動物の死因は水腎症であると診断されたが、投与濃度に対応したものではないことから、被験物質の影響によらないものと考えた。

IV 考察及びまとめ

o-クロロニトロベンゼンの Crj:BDF₁ マウス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 5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、313 ppm、78 ppm (公比 4 に 2500 ppm を追加) に設定した。

(1) 用量-反応関係

5000 ppm 群では、雄にのみ投与 1、2 週目に体重、1 週目に摂餌量の低値がみられたが、3 週目以降は対照群とほぼ同様の推移を示した。一般状態の観察では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、脂質代謝及び鼻腔に認められた。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とヘマトクリット値の減少がみられた。脾臓には雌雄とも剖検で暗色化、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、赤血球充満及び髄外造血の亢進がみられた。また、ヘモジデリンの沈着は肝臓と腎臓にも認められた。脾臓や肝臓、腎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た。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。その他、血液/造血系の変化として、雄では白血球分類で分葉核好中球比、好酸球比の減少とリンパ球比の増加がみられた。肝臓への影響として、雌雄に実重量と体重比の増加、血液生化学検査で雌雄に GPT と γ -GTP、雄に ALP の上昇がみられた。剖検では雌雄に暗色化が、病理組織学的検査では、雌雄に小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型が全動物にみられ、雌には炎症性細胞集簇が 5 匹にみられた。小葉中心性の肝細胞肥大はチトクローム 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り (文献 8)、肝臓における毒物代謝亢進が示唆される。肝臓への影響は、小葉中心性の肝細胞の肥大に加えて核異型がみられたのが特徴であり、被験物質の投与による肝細胞の核への影響を示す変化と考えられる。一方、血液生化学検査では GPT の増加がみられ、肝細胞に傷害性の変化が起きていることが示唆されるが、雌にのみ炎症性細胞集簇がみられただけであり、肝細胞への傷害を示す明らかな病理組織学的変化は認められなかった。腎臓への影響として、ヘモジデリン沈着に加えて、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は腎臓の障害を示唆する尿素窒素の増加が雌雄に認められた。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。また、鼻腔への影響として、

嗅上皮の萎縮が雌雄の全動物にみられ、被験物質の投与により嗅上皮に傷害が発生することが示された。その他、血液生化学的検査では、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、雌には総ビリルビン、グルコース及び無機リンの増加も認められた。

2500 ppm 群では、雌雄とも体重、摂餌量は対照群とほぼ同様の推移を示した。黄色尿が投与期間を通じて雌雄の全動物にみられ、血液／造血系、肝臓、腎臓、脂質代謝及び鼻腔への影響が認められた。血液／造血系への影響として、雌雄に赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、脾臓の実重量と体重比の増加、病理組織学的検査では、脾臓にヘモジデリン沈着、赤血球充満及び髄外造血の亢進、肝臓にヘモジデリン沈着がみられた。また、雄では白血球分類で分葉核好中球比、好酸球比の減少とリンパ球比の増加がみられた。肝臓への影響として、雌雄で実重量と体重比の増加、GPT の上昇がみられ、病理組織学的検査で、雌雄の全動物に小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型及びヘモジデリン沈着がみられ、雌 7 匹に炎症性細胞集簇巣がみられた。腎臓への影響として、雌雄で実重量の増加、雄に体重比の増加と尿素窒素の増加がみられた。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。また、鼻腔への影響として、雌雄で嗅上皮の萎縮の発生が増加した。その他、血液生化学的検査では、雌雄に総蛋白、アルブミン、グルコース及びカルシウムの増加がみられた。

1250 ppm 群では、体重、摂餌量は雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示した。黄色尿が投与期間を通じて雌雄の全動物にみられ、血液／造血系、肝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、雌雄に赤血球数とヘモグロビン濃度の減少、雄にヘマトクリット値の減少がみられた。脾臓ではヘモジデリン沈着、赤血球充満及び髄外造血の亢進がみられた。肝臓への影響として、雌雄の実重量と体重比の増加、雌で GPT の上昇がみられた。病理組織学的検査で雌雄の全動物に、小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型及びヘモジデリン沈着がみられ、雌には炎症性細胞集簇巣が 4 匹にみられた。腎臓への影響として、雄に実重量の増加がみられた。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は、雌雄に総蛋白とカルシウムの増加、雄にアルブミンの増加がみられた。

313 ppm 群では、体重、摂餌量は雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示したが、血液／造血系と肝臓及び脂質代謝への影響が認められた。血液／造血系への影響は、雌雄の脾臓でのヘモジデリン沈着の増加がみられたただけであった。肝臓への影響として、雄では小葉中心性の肝細胞の肥大が全動物に、核異型が 6 匹にみられたが、雌では体重比のみ増加が認められ、小葉中心性の肝細胞の肥大が 1 匹にみられたただけであった。脂質代謝への影響として、雌にリン脂質の増加がみられた。その他、血液生化学的検査では、雄に総蛋白の増加がみられた。

78 ppm 群では、投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

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と考えられる動物の死亡はみられなかった。体重の増加抑制は 5000 ppm 群で投与初期にのみにみられ、血液／造血系、肝臓、腎臓、脂質代謝及び鼻腔への影響がみられた。本試験で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雄の脾臓でのヘモジデリン沈着の増加がみられた 313 ppm、2)肝臓への影響は雄で小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型、雌で体重比の増加がみられた 313 ppm、3)腎臓への影響は雄に実重量の増加がみられた 1250 ppm、4)脂質代謝への影響は雌にリン脂質の増加がみられた 313 ppm、5)鼻腔は雌雄で嗅上皮の萎縮の増加がみられた 2500 ppm であった。

(2)無毒性量 (NOAEL)

上記の結果より、血液／造血系への影響（脾臓のヘモジデリン沈着）、肝臓への影響（小葉中心性の肝細胞の肥大と核異型）及び脂質代謝（リン脂質の増加）をエンドポイントとして、*o*-クロロニトロベンゼンの混餌経口投与による無毒性量は 78 ppm(雄：0.010～0.013 g/kg body weight per day、雌：0.012～0.015 g/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マウスに赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、肝臓と脾臓の重量増加とヘモジデリン沈着、脾臓での髄外造血の亢進、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。また、試験成績 III-6 項の中に示したとおり、メトヘモグロビン濃度が投与濃度に対応し、2500 ppm 以上の群で増加した。*o*-クロロニトロベンゼンの急性及び亜急性毒性影響に関する実験中毒学的研究については、これまでに若干例報告されている。Travlos 等（文献 9）は、*o*-クロロニトロベンゼンを 1.1、2.3、4.5、9、18 mg/m³ x 6 hrs per day x 5 days/wk で 13 週間吸入暴露した B6C3F₁ マウスにおいて、メトヘモグロビン血症とヘモジデリン沈着等の病理組織学的所見の他に、肝臓、鼻腔、前胃等の病理組織学的病変を報告した。また、NTP の報告（文献 10）によれば、*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 B6C3F₁ マウスでは貧血と赤血球傷害に関連する組織学的病変と呼吸上皮の過形成等が観察された。
- ②代謝：本試験では 1250 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 11, 12）。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 13）。

(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決定した。

5000 ppm 群では、肝臓、脾臓の臓器実重量が増加した。また、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、病理組織学的検査の結果から、赤血球の破壊とそれに伴う脾臓でのヘモジデリン沈着と髄外造血亢進が認められ、さらに肝臓でも小葉中心性肝細胞の核異型等の顕著な変化が認められ、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。2500 ppm 群でも、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、病理組織学的所見で赤血球、肝臓、脾臓等への影響がみられたが、体重、摂餌量は対照群とほぼ同様の推移を示した。以上の結果より、がん原性試験は最高濃度を 2500 ppm とした。また最低濃度の 78 ppm 群では投与の影響と考えられる異常所見は認めらなかった。従って、最低濃度は 78 ppm と 313 ppm の間と考え、公比を 5 とし、2500 ppm、500 ppm、100 ppm と決定した。

V 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項

血液学的検査におけるヘモグロビン濃度の測定は、総合血液学検査装置を用いて、シアンメトヘモグロビン法により実施した。5000 ppm 群のヘモグロビン濃度測定時、試薬と血液を混合した反応液が混濁した。シアンメトヘモグロビン法による測定は原理が比色法であるため、測定値に正の誤差（高値）が生じた。この混濁の原因は、被験物質の影響で血液中の赤血球が異常赤血球に変化したためと考えられる。また、ヘモグロビン濃度を計算式に用いる、演算項目である MCH、MCHC も同様に影響を受けている。従って、5000 ppm 群におけるヘモグロビン濃度、MCH 及び MCHC の測定値は信頼性のないものであり、結果から除外すべきであると判断した。

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.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. 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.
10. 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.

11. Rickert DE, Held SD. 1990. Metabolism of chloronitrobenzenes by isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 18:5-9.
12. 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.
13. 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.