

1-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：0461

CAS No. 88-73-3

2006年 4月 13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

1-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)

## 試験目的

1-クロロ-2-ニトロベンゼンをラットに104週間経口(混餌)投与し、がん原性を検索した。

## 試験法

本試験は、平成9年3月11日付け、基発第144号「がん原性試験による調査の基準」に準拠し、OECD化学品テストガイドライン451(発癌性試験 1981年5月12日採択)に準じて実施した。

## GLP 対応

本試験は、昭和63年9月1日付け、労働省告示第76号「試験施設等が具備すべき基準(安衛法GLP)」(一部改正。平成12年3月29日付け、労働省告示第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対策課  
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  
山本 静護  
神奈川県秦野市平沢2445

1-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：0461

本文

## 本文目次

	頁
要約 .....	1
I 試験材料 .....	3
I-1 被験物質の性状等 .....	3
I-1-1 名称等 .....	3
I-1-2 構造式及び分子量 .....	3
I-1-3 物理化学的性状等 .....	3
I-2 被験物質の使用ロット等 .....	3
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性 .....	4
I-3-1 特性・同一性 .....	4
I-3-2 安定性 .....	4
I-4 試験動物 .....	4
II 試験方法 .....	5
II-1 投与 .....	5
II-1-1 投与経路 .....	5
II-1-2 被験物質の投与方法 .....	5
II-1-3 投与期間 .....	5
II-1-4 投与濃度 .....	5
II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由 .....	5
II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法 .....	6
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 ..	6
II-1-8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性 .....	6
II-1-9 被験物質の摂取量 .....	7

Ⅱ-2	動物管理	7
Ⅱ-2-1	各群の使用動物数	7
Ⅱ-2-2	群分け及び個体識別方法	7
Ⅱ-2-3	飼育条件	8
(1)	飼育環境	8
(2)	飼料	8
(3)	飲水	8
Ⅱ-3	観察・検査項目及び方法	9
Ⅱ-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	9
Ⅱ-3-2	体重測定	9
Ⅱ-3-3	摂餌量測定	9
Ⅱ-3-4	血液学的検査	9
Ⅱ-3-5	血液生化学的検査	9
Ⅱ-3-6	尿検査	10
Ⅱ-3-7	病理学的検査	10
(1)	剖検	10
(2)	臓器重量	10
(3)	病理組織学的検査	10
Ⅱ-4	数値処理と統計方法	10
Ⅱ-4-1	数値の取り扱いと表示	10
Ⅱ-4-2	統計処理	11
Ⅲ	試験成績	13
Ⅲ-1	生死状況	13
Ⅲ-2	一般状態	13
Ⅲ-3	体重	13
Ⅲ-4	摂餌量	14
Ⅲ-5	被験物質摂取量	14
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 生存率、一般状態、体重、摂餌量	21
Ⅳ-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	21
Ⅳ-3 非腫瘍性病変	22
Ⅳ-4 量-反応関係	23
Ⅳ-5 投与濃度設定の評価	23
Ⅳ-6 他文献との比較等	23
Ⅴ 結論	26
Ⅵ 文献	27

## 要約

1-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/DuCr1Cr1j(旧 F344/DuCrj)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-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80、400及び2000 ppm(公比5)とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、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。

雄の2000 ppm群は、53週より動物の死亡がみられ、103週までに全動物が死亡した。その死因は非腫瘍性病変である慢性腎症であり、雄の投与濃度2000 ppmは最大耐量(MTD)を超えていると考えられた。80 ppm群と400 ppm群の生存率は、対照群とほぼ同様であった。雌の各投与群の生存率は対照群とほぼ同様であった。体重は、雌雄とも2000 ppm群では投与期間を通して低値を示し、雄の2000 ppm群は対照群と比較して、34週で89%に低下した。雌の2000 ppm群は対照群と比較して、最終計測週の104週で82%に低下した。雄の400 ppm群でも投与期間終期に低値を示した。一般状態の観察では、雌雄とも被験物質の代謝物と考えられる黄色尿が2000 ppm群の全動物に全投与期間を通してみられた。摂餌量は、雄の2000 ppm群で投与期間初期と終期に低値が認められた。その他の群では対照群とほぼ同様の推移を示した。

腫瘍の発生増加は雌雄の肝臓(肝細胞癌、肝細胞腺腫)と雌の腎臓(腎細胞腺腫)にみられた。肝臓腫瘍の発生増加は雌雄ラットに対するがん原性を示す証拠である。これらの腫瘍の発生増加が認められた濃度は、雄の400 ppm、雌の2000 ppmであった。腎臓腫瘍の発生増加は雌ラットに対するがん原性を示唆する証拠である。腎臓腫瘍の発生増加が認められた濃度は雌の2000 ppmであった。肝臓腫瘍の前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣が雌雄の400 ppm群に、好塩基性小増殖巣及び肝海綿状変性が雄の400 ppm群に、明細胞性小増殖巣が雌の2000 ppm群にみられた。腎臓腫瘍の前腫瘍性病変である異型尿細管過形成は雌の2000 ppm群にみられた。なお、雄の2000 ppm群には、腎細胞癌の発生があった。

腫瘍以外の影響は、雌雄の腎臓、脾臓及び雌の肝臓に影響がみられた。雌雄とも慢性腎症が全ての投与群で投与濃度に依存して病変の程度が増強し、近位尿細管上皮への褐色色素沈着、腎盂尿路上皮の過形成が増加した。脾臓ではヘモジデリン沈着、赤血球充満、血管拡張と被膜の増生が認められた。雌の肝臓では小葉中心性の水腫様変性、肝細胞への褐色色素沈着が認められた。

以上のように、F344/DuCr1Cr1jラットを用いた1-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、以下の結論を得た。

雌雄とも肝細胞癌と肝細胞腺腫の発生増加が認められ、雌雄ラットに対するがん原性を示す証拠である。

## 1-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	80	400	2000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	2	3	7	(1)	↑	
	腎臓	腎細胞腺腫	0	1	0	(1)		
悪性 腫瘍	肝臓	肝細胞癌	0	0	3	(1)	↑↑	↑
	腎臓	腎細胞癌	0	0	0	(4)		
	肝臓	肝細胞癌+肝細胞腺腫	2	3	10 *	(2)	↑↑	↑↑

## 1-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	80	400	2000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	0	0	2	20 **	↑↑	↑↑
	腎臓	腎細胞腺腫	0	0	0	2		
悪性 腫瘍	肝臓	肝細胞癌	0	0	0	4	↑↑	↑↑
	肝臓	肝細胞癌+肝細胞腺腫	0	0	2	23 **	↑↑	↑↑

雄の 2000 ppm 群は最大耐量を超えたと考えられるので参考値として()内に示し、検定は実施しなかった。

\* :  $p \leq 0.05$  で有意

\*\* :  $p \leq 0.01$  で有意

(Fisher 検定)

↑ :  $p \leq 0.05$  で有意増加

↑↑ :  $p \leq 0.01$  で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)



I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

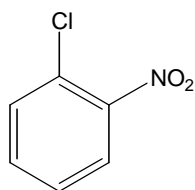
名 称： 1-クロロ-2-ニトロベンゼン (1-Chloro-2-nitrobenzene)

別 名： *o*-クロロニトロベンゼン (*o*-Chloronitrobenzene)

CAS No.： 88-73-3

I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式：



分 子 量： 157.56

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状： 黄色針状結晶

比 重： 1.368 (22/4℃)

融 点： 33℃

沸 点： 245℃

溶 解 性： 水に不溶

保 管 条 件： 冷蔵暗所

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号： LDE9795

製 造 元： 和光純薬工業(株)

グ レ ー ド： 和光特級

純 度： 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

被験物質の同一性は、マススペクトルを質量分析計 (Hewlett Packard 5989B) を用いて測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定し、それぞれの文献値と比較することにより確認した。

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、また、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 1-クロロ-2-ニトロベンゼンであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX A 1 に示した。

#### I-3-2 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX A 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) の F344/DuCrIj (旧 F344/DuCrj) 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、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 200 匹 (投与開始時体重範囲、雄：116～134g、雌：93～105g) を選別し、試験に用いた。

なお、F344/DuCrIj 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

投与経路は経口投与とした。

#### II-1-2 被験物質の投与方法

投与は、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。なお、被験物質混合飼料の交換は7日毎に実施した。

#### II-1-3 投与期間

投与期間は104週間とし、さらに、それぞれの動物の定期解剖日前日まで連続投与した。

#### II-1-4 投与濃度

投与濃度は、雌雄とも80、400及び2000 ppmの3段階（公比5）に設定した。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

#### II-1-5 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、水に不溶であるため混餌による経口投与とした。

投与期間は、がん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献4）及びOECD化学品テストガイドライン451（発癌性試験）（文献5）に従い、2年間（104週間）とした。

各群の投与濃度は13週間試験（文献6）の結果をもとに設定した。

試験にはF344/DuCrIjラット(SPF)を用いた。被験物質投与群5群と対照群1群の計6群の構成で、雌雄各群とも10匹とし、合計120匹のラットを用いた。被験物質の投与は、1-クロロ-2-ニトロベンゼンを混合調製した粉末飼料を動物に13週間自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも63、250、1000、2000及び4000 ppmの5段階を設定した。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。

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、体重、摂餌量は投与1週目に低下がみられたが、その後、対照群との差は認められなかった。以上の結果より、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、がん原性試験の最低濃度は63 ppm に近い濃度がふさわしいと考えた。従って、がん原性試験の濃度は、2000、400 及び 80 ppm (公比 5) と設定した。

#### II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

あらかじめ粉砕器 (IKA LABOTECHNIC 製 IKA 20M) で粉砕し、整粒した被験物質を、粉末飼料 (オリエンタル酵母工業(株)製 CRF-1) に添加し、混合器 (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、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混合することによって、80、400 及び 2000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。被験物質混合飼料の調製は原則として2週間に1回行った。但し、被験物質混合飼料の安定性を確認している範囲内で、調製日を変更した。調製した被験物質混合飼料は使用時まで冷蔵で保管した。なお、試験における濃度の表示は、ppm (重量対重量比) とした。

#### 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、初回調製時及び3ヶ月毎に、各投与濃度毎に調製容器内の被験物質混合飼料を3点サンプリングし、クロマトグラムを高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) を用いて測定し、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、均一性の確認を合わせて行った。

その結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対して95.0~106%の範囲にあった。均一性は、各群ともばらつきが少なかった。従って、被験物質混合飼料中の被験物質は、設定濃度に対してほぼ正確に調製されたことを確認した。

その結果を濃度については APPENDIX A 3、均一性については APPENDIX A 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、本試験では実施せず、先立って実施した 13

週間予備試験（文献 6）において確認した。すなわち、50 ppm と 5000 ppm の被験物質混合飼料を調製し、ラット用餌箱に充填して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）したものについて確認した。被験物質混合飼料調製時の被験物質濃度と各保管期間後の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ（Hewlett Packard 1090）を用いて測定し、それぞれの測定結果を比較することにより確認した。

その結果、調製時の濃度を 100%とした場合に、室温保管（8 日間）では、50 ppm : 88.9%、5000 ppm : 80.4%、7 週間の冷蔵保管で 50 ppm : 104%、5000 ppm : 99.4%であった。従って、冷蔵保管での安定性は良好であり、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。

その結果を APPENDIX A 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被験物質の体重 kg 当たりの 1 日摂取量 (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 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群名称	動物数 (動物番号)	群名称	動物数 (動物番号)
対照群	50 匹 (1001~1050)	対照群	50 匹 (2001~2050)
80 ppm 群	50 匹 (1101~1150)	80 ppm 群	50 匹 (2101~2150)
400 ppm 群	50 匹 (1201~1250)	400 ppm 群	50 匹 (2201~2250)
2000 ppm 群	50 匹 (1301~1350)	2000 ppm 群	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、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した（文献 7）。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室（雌雄とも 107 室）に収容し、室の扉に試験番号、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

### (1) 飼育環境

動物は、飼育期間を通して以下の環境で飼育した。飼育室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を< >内に記した。飼育室内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温度 :  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  < $22.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ >

湿度 :  $55 \pm 15\%$  < $53 \pm 2\%$ >

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

ケージへの動物の収容方法 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

ステンレス製 2 連網ケージ (170(W)×294(D)×176(H) mm/匹)

### (2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、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（30KGy- $\gamma$ 線照射滅菌飼料）固型または粉末飼料を使用した。検疫期間については固型飼料を固型飼料給餌器により自由摂取させた。馴化期間については、CRF-1 粉末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、各投与群には所定の濃度に CRF-1 粉末飼料を用いて調製した被験物質混合飼料を、対照群には CRF-1 粉末飼料のみを粉末飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

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)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、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 52-1）の分析データを使用ロットごとに入手し、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、保管した。

### (3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(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）に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を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、保管した。

## II-3 観察・検査項目及び方法

### II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日1回、また、一般状態の詳細な観察は週1回行った。

### II-3-2 体重測定

体重測定は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)行った。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重(搬出時体重)を測定した。

### II-3-3 摂餌量測定

摂餌量は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)給餌量及び残餌量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂餌量を算出した。

### II-3-4 血液学的検査

定期解剖時に生存してい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)に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法はAPPENDIX Qに示した。

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、白血球数、白血球分類

### II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存してい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た血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法はAPPENDIX Qに示した。

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、AST、ALT、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、CK、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

## II-3-6 尿検査

投与 104 週の検査時まで生存した動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティステックス、バイエル社製）を用いて、下記の項目について検査を行った。

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

## 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、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：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

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、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。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、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（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

## II-4 数値処理と統計方法

### II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

体重は g を単位とし、整数値の 1 の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、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。

被験物質の体重 kg 当たりの 1 日摂取量は、摂餌量に被験物質の設定濃度を乗じ、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。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、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、血液生化学的検査は APPENDIX Q に示した単位と精度により表示した。

なお、各数値データ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 統計処理

各群の有効動物数は、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とした。病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

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うち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などを基準にしてグレード 1~4 に分け、 $\chi^2$  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、各群ごとの担腫瘍動物数について、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。

各群雌雄ごとに検査数が 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、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖動物にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死動物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、確かでない腫瘍

3 : 多分 4 だと思うが、確かでない腫瘍

4 : 死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係っていた腫瘍

### Ⅲ 試験成績

#### Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE 1, 2、FIGURE 1, 2 及び APPENDIX B 1, 2 に示した。

—雄—

2000 ppm 群では、53 週目より動物が死亡し、103 週までに全動物が死亡した。400 ppm 群と 80 ppm 群の生存率は、対照群とほぼ同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：40 匹（80%）、80 ppm 群：40 匹（80%）、400 ppm 群：39 匹（78%）、2000 ppm 群：0 匹（0%）であった。

—雌—

各投与群の生存率は、対照群とほぼ同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：41 匹（82%）、80 ppm 群：42 匹（84%）、400 ppm 群：45 匹（90%）、2000 ppm 群：39 匹（78%）であった。

#### Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX B 1, 2 に示した。

—雄—

黄色尿が 2000 ppm 群の全動物に全投与期間を通して認められた。尿による被毛の着色が 2000 ppm 群に 11 週から 92 週まで、多い週で 14 匹にみられた。外部腫瘍が 2000 ppm 群と 400 ppm 群で対照群と比較して多くみられた。また、貧血が 2000 ppm 群に 62 週以降、主に死亡前にみられた。

—雌—

黄色尿が 2000 ppm 群の全動物に全投与期間を通して認められた。尿による被毛の着色が 2000 ppm 群に 2 週からみられ、投与終了時には殆どの動物に観察され、400 ppm 群では 10 週から投与終了まで多い週で 12 匹にみられた。

#### Ⅲ-3 体重

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

—雄—

2000 ppm 群の体重は、投与 1 週より低値がみられ、対照群と比較して、34 週で 89%に低下し、54 週に最大となり、以降減少に転じた。400 ppm 群でも、投与 70 週以降に 3~12%の低値が認められた。80 ppm 群では、対照群と同様の体重推移を示した。

なお、最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、80 ppm 群：100%、400 ppm 群：90%であった。

—雌—

2000 ppm 群の体重は、全投与期間を通して、対照群と比較して 3~18%の低値がみられた。80 ppm 群と 400 ppm 群では、対照群と同様の体重推移を示した。

なお、最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、80 ppm 群：100%、400 ppm 群：97%、2000 ppm 群：82%であった。

### III-4 摂餌量

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

—雄—

2000 ppm 群では、14 週以前と 74 週目以降に摂餌量の低値が認められた。80 ppm 群と 400 ppm 群では、対照群と摂餌量の差は認められなかった。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：14.9g（100%）、80 ppm 群：15.1g（101%）、400 ppm 群：15.2g（102%）、2000 ppm 群：14.0g（94%）であった。

—雌—

各投与群とも、投与期間前半に摂餌量の僅かな低値が散見された。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：10.7g（100%）、80 ppm 群：10.5g（98%）、400 ppm 群：10.6g（99%）、2000 ppm 群：10.4g（97%）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 E 1, 2 に示した。

—雄—

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 per day)は、80 ppm 群：0.003~0.007（平均：0.004）、400 ppm 群：0.015~0.032（平均：0.019）、2000 ppm 群：0.071~0.149（平均：0.099）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、80 ppm 群の被験物質摂取量に対して、400 ppm 群で 4.8 倍、2000 ppm 群で 24.8 倍であり、設定用量比（公比 5）にはほぼ対応した被験物質摂取量を示した。

—雌—

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 per day)は、80 ppm 群：0.004~0.007（平均：0.004）、400 ppm 群：0.019~0.033（平均：0.022）、2000 ppm 群：0.105~0.156（平均：0.117）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、80 ppm 群の被験物質摂取量に対して、400 ppm 群で 5.5 倍、2000 ppm 群で 29.3 倍であり、2000 ppm 群では体重増加の抑制に伴う高値を示したものの、設定用量比（公比 5）にほぼ対応した被験物質摂取量を示した。

### III-6 血液学的検査

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

—雄—

2000 ppm 群は投与期間内に全動物が死亡したため検査を行わなかった。

メトヘモグロビン濃度は 400 ppm 群で 0.4% であり、有意な増加が認められた。

MCV と MCH の減少が 80 ppm 群と 400 ppm 群に、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の減少及び血小板数の増加が 400 ppm 群に認められた。その他、赤血球数の増加が 80 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

メトヘモグロビン濃度は、2000 ppm 群で 1.3%、400 ppm 群で 0.4% であり、有意な増加が認められた。ヘモグロビン濃度、MCH 及び MCHC の減少、血小板数の増加が 400 ppm 以上の群に認められた。赤血球数とヘマトクリット値の減少及び白血球数と分葉核好中球比の増加が 2000 ppm 群に認められた。その他、MCV が 400 ppm 群で減少したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

### 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 と APPENDIX G 1, 2 に示した。

—雄—

2000 ppm 群は投与期間内に全動物が死亡したため検査を行わなかった。

総コレステロールの増加と  $\gamma$ -GTP の上昇が 80 ppm 群と 400 ppm 群に、トリグリセライド、リン脂質、尿素窒素、クレアチニン、カルシウム及び無機リンの増加とアルブミン、A/G 比及びクロールの減少、LDH の低下が 400 ppm 群に認められた。

—雌—

総コレステロール、リン脂質及び尿素窒素の増加、 $\gamma$ -GTP の上昇及び LDH の低下が 400 ppm 以上の群に認められた。総ビリルビン、クレアチニン、カルシウム及び無機リンの増加、ALT の上昇、アルブミン、A/G 比、ナトリウム及びクロールの減少が 2000 ppm 群に認められた。その他、グルコースが 400 ppm 群で増加、ALP が 2000 ppm 群で上昇し 400 ppm 群で低下したが、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 と APPENDIX H 1, 2 に示した。

—雄—

2000 ppm 群は投与期間内に全動物が死亡したため検査を行わなかった。

pH の低下が 400 ppm 群に認められた。

—雌—

蛋白とビリルビンの陽性例の増加が 400 ppm 以上の群に、pH の低下とケトン体の陽性例の減少が 2000 ppm 群に認められた。

### Ⅲ-9 病理学的検査

#### Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX I 1~6 に示した。

—雄—

肝臓の結節と褐色化、腎臓の表面の顆粒化と嚢胞、脾臓の表面の顆粒化及び胸部大動脈の硬化の発生が増加した。肝臓の結節は、対照群が 2 匹であったのに対し、80 ppm 群で 4 匹、400 ppm 群で 16 匹、2000 ppm 群で 3 匹にみられた。肝臓の褐色化は 400 ppm 群で 1 匹、2000 ppm 群で 48 匹にみられた。腎臓表面の顆粒状変化は、対照群で 4 匹であったのに対して、80 ppm 群で 9 匹、400 ppm 群で 41 匹、2000 ppm 群で 49 匹にみられた。腎臓の嚢胞は 80 ppm 群で 1 匹、400 ppm 群で 5 匹、2000 ppm 群で 8 匹にみられた。脾臓表面の顆粒状変化も 2000 ppm 群で 25 匹にみられた。また、胸部大動脈の硬化が 2000 ppm 群の 12 匹にみられた。

—雌—

肝臓の結節と小葉明瞭化、腎臓と脾臓の表面の顆粒化の発生が増加した。肝臓の結節は、対照群が 1 匹であったのに対し 400 ppm 群で 2 匹、2000 ppm 群で 35 匹にみられた。小葉の明瞭化は 2000 ppm 群の 17 匹にみられた。腎臓表面の顆粒状変化は、80 ppm 群で 1 匹、400 ppm 群で 4 匹、2000 ppm 群で 37 匹にみられた。脾臓表面の顆粒状変化も 2000 ppm 群の 38 匹にみられた。

#### 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 と APPENDIX J 1, 2, APPENDIX K 1, 2 に示した。

—雄—

2000 ppm 群は投与期間内に全動物が死亡したため検査を行わなかった。

肝臓の実重量と体重比の高値が 80 ppm 群と 400 ppm 群で、腎臓の実重量と体重比の高値が 400 ppm 群で認められた。また、肺の実重量と体重比の低値が 400 ppm 群で認められた。80 ppm 群と 400 ppm 群の脾臓は実重量、体重比とも有意差はみられなかった。

その他、400 ppm 群で脳、副腎及び心臓の体重比に統計学的な有意差がみられたが、解剖時体重の低値に起因する変化と考えられた。

—雌—

肝臓の実重量の高値が全投与群で、体重比の高値が 400 ppm 以上の群で認められた。腎臓の実重量と体重比の高値が 400 ppm 以上の群でみられた。また、脾臓の実重量と体重比の高値が 2000 ppm 群で認められた。

その他 2000 ppm 群で、副腎、卵巣、心臓、肺及び脳で実重量や体重比に統計学的な有意差がみられたが、解剖時体重の低値に起因する変化と考えられた。

### 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を TABLE 13~16 に示した。また、非腫瘍性病変を APPENDIX L 1~6 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を APPENDIX M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を APPENDIX O 1, 2 に、転移性病変を APPENDIX P 1~6 に示した。また、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(%), 発生匹数/総匹数) を雌雄別にそれぞれ TABLE 17 と 18 に示した。雄の 2000 ppm 群は、「IV-5 投与濃度設定の評価」に述べるように MTD を超えていたと判断したので検定より除外した。

—雄—

#### 1) 腫瘍性病変

##### <肝臓>

肝細胞腺腫の発生は、Peto 検定 (有病率法) で増加傾向を示した。肝細胞腺腫の 400 ppm 群における発生 (7 匹、14%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 0%~最大 8%、平均発生率 1.7%) を超えていた。肝細胞癌の発生は、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。また肝細胞癌の 400 ppm 群における発生 (3 匹、6%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 0%~最大 2%、平均発生率 0.3%) を超えていた。さらに、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生は、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 400 ppm 群に増加がみられた。従って、肝細胞癌と肝細胞腺腫の発生増加は被験物質の投与によるものと考えられた。

肝細胞癌と肝細胞腺腫は基本構造を逸脱した肝細胞の増生であり、これらの腫瘍は1匹に複数個みられた。肝細胞腺腫は索状構造を示し、層の厚さは2~3層で形成されていた。肝細胞癌は異型な腫瘍細胞が多層化したまたは不整型の索状構築、あるいは偽腺管状や腺胞状の構造を示していた。

#### <精巣>

間細胞腫の発生は、Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。しかし、間細胞腫はラットにきわめて高率に自然発生する腫瘍（平均発生率 85.2%）であり、400 ppm 群における発生（45 匹、90%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 56%~最大 98%）内であることから、この腫瘍の発生増加は被験物質投与による影響ではないと判断した。

#### <腎臓>

腎細胞癌が 2000 ppm 群に 4 匹みられた。また、腎細胞腺腫が 80 ppm 群と 2000 ppm 群に各 1 匹みられ、それぞれの腺腫の大きさは最長径が 0.7 mm と 1.0 mm であった。腎細胞癌の大きさは最長径が 3.0mm から 7.0mm であり、これらの腫瘍は多形性に富んだ上皮細胞で形成されていた。

その他、脾臓の単核球性白血病、甲状腺の C-細胞腺腫及び下垂体の腺腫の発生が減少した。

## 2) 非腫瘍性病変

#### <肝臓>

好酸性小増殖巣、好塩基性小増殖巣及び肝海綿状変性の発生が 400 ppm 群で増加した。胆管増生が 400 ppm 群で減少した。

#### <腎臓>

慢性腎症は全ての投与群で投与濃度に依存して程度の増強が認められ、2000 ppm 群動物の途中死亡の主因となった。また、腎盂尿路上皮の過形成、嚢胞及び近位尿細管上皮への褐色色素沈着が 400 ppm 群で増加した。

#### <脾臓>

ヘモジデリン沈着と赤血球充満が 400 ppm 群で増加した。

#### <精巣>

過形成が 400 ppm 群で増加した。



その他、鼻腔の腺の呼吸上皮化生が 400 ppm 群で減少した。なお、甲状腺の C-細胞増生 (80 ppm 群) の発生に対照群と投与群の間で統計的有意差が示されたが、投与濃度に対応した変化ではないことから投与による影響ではないと判断した。

なお、2000 ppm 群でみられた変化として、肝臓では、小葉中心性の水腫様変性、肝細胞への褐色色素沈着、肝細胞の脂肪変性並びに単細胞壊死が増加した。腎臓では、ほとんどの動物に超重度の慢性腎症がみられ、腎盂尿路上皮の過形成、嚢胞、近位尿細管上皮への褐色色素沈着、異型尿細管過形成及び皮質への鉍質沈着が増加した。脾臓では、ヘモジデリン沈着、血管拡張及び被膜の増生が増加した。その他、動脈の鉍質沈着、肺の尿毒症性肺炎、上皮小体の過形成、眼球の角膜炎、腺胃の鉍質沈着及び鼻腔の呼吸上皮の炎症が増加した。

—雌—

#### 1) 腫瘍性病変

##### <肝臓>

肝細胞腺腫の発生は、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 (20 匹、40%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 0%~最大 6%、平均発生率 1.2%) を超えていた。肝細胞癌の発生は、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。肝細胞癌の 2000 ppm 群における発生 (4 匹、8%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 0%~最大 2%、平均発生率 0.1%) を超えていた。また、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生は、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。従って、肝細胞癌と肝細胞腺腫の発生増加は被験物質の投与によるものと考えられた。また、肝細胞癌の肺への転移が 2000 ppm 群の 1 匹に観察された。

##### <腎臓>

腎細胞腺腫が 2000 ppm 群に (2 匹、4%) 認められた。この腫瘍はきわめてまれな腫瘍であり、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 0%~最大 2%、平均発生率 0.1%) を超えていた。従って、腎細胞腺腫の発生増加は被験物質の投与によるものと考えられた。腎細胞腺腫の大きさは最長径が 0.7mm と 1.5mm であり、これらの腫瘍は基本構築を逸脱した尿細管上皮の結節状増生であった。

##### <陰核腺>

腺腫が Peto 検定 (死亡率法) で増加傾向を示したが、2000 ppm 群の発生 (3 匹、6%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内であり (最小 0%~最大 8%、平均発生率 2.8%) 投与の影響とは考えなかった。

その他、子宮内膜間質性ポリープの発生が減少した。

## 2) 非腫瘍性病変

### <肝臓>

好酸性小増殖巣の発生が 400 ppm 以上の群で増加した。また、小葉中心性の水腫様変性、褐色色素沈着、明細胞性小増殖巣並びに単細胞壊死が 2000 ppm 群で増加した。その他、好塩基性小増殖巣は全ての投与群で、肉芽形成が 2000 ppm 群で減少した。なお、肝臓の胆管増生は 2000 ppm 群では減少したが、400 ppm 群では増加しており、投与との関連は明らかでなかった。

### <腎臓>

慢性腎症は全ての投与群で発生の増加が認められ、投与濃度に依存して病変の程度が増強した。また、近位尿細管上皮への褐色色素沈着が 400 ppm 以上の群で増加した。さらに、腎盂尿路上皮の過形成が 2000 ppm 群で増加した。また、異型尿細管過形成の発生が 2000 ppm 群の 5 匹にみられた。

### <脾臓>

ヘモジデリン沈着が 400 ppm 以上の群で増加した。また、被膜の増生、赤血球充満及び髓外造血亢進が 2000 ppm 群で増加した。なお、血管拡張が 2000 ppm 群の 5 匹にみられた。

その他、鼻腔の嗅上皮と呼吸上皮のエオジン好性変化、甲状腺の C-細胞増生及び副腎皮質の巣状脂肪変性は 2000 ppm 群で発生が減少した。

## III-9-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE19 に示した。

—雄—

慢性腎症による死亡が 400 ppm 群の 3 匹と 2000 ppm 群の 47 匹でみられた。

—雌—

特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

#### IV 考察及びまとめ

1-クロロ-2-ニトロベンゼンのラットを用いた2年間の混餌経口投与（投与濃度：80 ppm, 400 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。

##### IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

雄の2000 ppm群は、53週より動物の死亡がみられ、103週までに全動物が死亡した。80 ppm群と400 ppm群の生存率は、対照群とほぼ同様であった。雌の各投与群の生存率は対照群とほぼ同様であった。

一般状態の観察では、雌雄とも被験物質の代謝物と考えられる黄色尿が2000 ppm群の全動物にみられ、被毛の着色が雌雄の2000 ppm群、雌の400 ppm群にみられた。

体重は、雌雄とも2000 ppm群では投与期間を通して低値を示した。雄の2000 ppm群の体重は、対照群と比較して、34週で89%に低下し、54週に最大となり、以降減少に転じた。雌の2000 ppm群は、対照群と比較して、74週で88%、最終計測週の104週で82%に低下した。雄の400 ppm群でも投与期間終期に90%の低値を示した。雌の400 ppm群と雌雄の80 ppm群は対照群と同様の推移を示した。

摂餌量は、雄の2000 ppm群で投与期間初期と終期に低値が認められた。その他の群では対照群とほぼ同様の推移を示した。

##### IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雌雄の肝臓と腎臓に、腫瘍の発生増加がみられた。

###### <肝臓腫瘍>

雌雄とも、肝細胞癌と肝細胞腺腫の発生増加が認められた。肝細胞癌は悪性腫瘍に分類される腫瘍であるが、がん原性を示す明らかな証拠とするには、肝細胞癌の発生数は比較的少なく、肝臓腫瘍（肝細胞癌、肝細胞腺腫）の発生増加は雌雄ラットに対するがん原性を示す証拠と考えた。肝臓腫瘍の発生増加がみられた濃度は、雄が400 ppm、雌が2000 ppmであった。また、肝細胞腫瘍の前腫瘍病変は、雄では好酸性小増殖巣、好塩基性小増殖巣及び肝海綿状変性（文献9）の発生増加が腫瘍と同様に400 ppm群で、雌では好酸性小増殖巣が400 ppm以上の群に、明細胞性小増殖巣（文献9）が腫瘍と同様に2000 ppm群で発生増加がみられた。

###### <腎臓腫瘍>

雄の2000 ppm群に腎細胞癌と腎細胞腫瘍の前腫瘍性病変である異型尿細管過形成（文

献 10) が認められたが、雄に対する 2000 ppm は MTD を超えた濃度であることから、2000 ppm 投与による雄の腎臓腫瘍及び前腫瘍性病変発生の増加はがん原性評価の対象から除外した。しかし、腎細胞癌は自然発生がまれな腫瘍であること、前腫瘍性病変の発生があること、また、雌にも腎臓腫瘍の発生があることから、雄の 2000 ppm 群に発生した腎細胞癌の発生は被験物質投与による影響と示唆された。

雌では、腎細胞腺腫の発生が 2000 ppm 群 (2 匹、4%) に認められた。腎細胞腺腫は良性腫瘍に分類される腫瘍であり、この腫瘍の発生は統計的有意差を示さなかったが、腎細胞腺腫は発生がまれな腫瘍であり、その発生はヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 0%~最大 2%、平均発生率 0.1%) を超えていた。腎細胞腺腫の発生は雌ラットに対するがん原性を示唆する証拠と考えた。腎細胞腫瘍の前腫瘍性病変である異型尿細管過形成 (文献 10) も腫瘍と同様 2000 ppm 群で発生が認められた。1-クロロ-2-ニトロベンゼンには、S9 活性化による場合に強い変異原性が認められ (文献 11)、また、腎臓  $\beta$ -リアーゼによるシステイン基付加代謝物が変異原性を有するという報告 (文献 12) があり、被験物質の代謝物が腎臓腫瘍の発生に関与していることも考えられる。一方、慢性腎症が腎臓腫瘍の発生に関与するとの報告 (文献 13) もあり、本試験でみられた腎臓腫瘍の発生増加は、慢性腎症と関係するとの考えも完全には否定できない。しかし、慢性腎症により発生した腫瘍の最長径は 0.4mm から 1.0mm であるとの報告 (文献 14) と比較すると、本試験でみられた腎臓腫瘍のサイズと悪性腎腫瘍の存在及び被験物質の変異原性から、腎臓腫瘍の発生は被験物質の投与によるものであると示唆された。

#### IV-3 非腫瘍性病変

雌雄の腎臓、脾臓及び雌の肝臓に影響がみられた。

腎臓では、雌雄とも慢性腎症の程度の増強が全ての投与群にみられ、投与濃度に依存して病変が重度化した。腎盂尿路上皮の過形成と嚢胞の発生が雄の 400 ppm 群で、腎盂尿路上皮の過形成が雌の 2000 ppm 群で増加し、慢性腎症に伴う変化と考えられた。また、近位尿細管上皮の褐色色素が雄の 400 ppm 群と雌の 400 ppm 以上の群で増加した。この色素は、大小の球状を呈し、シュモール反応陽性、PAS 反応一部陽性、ベルリンブルー染色陰性でありヘモジデリンとは異なる物質であったが、その本態は不明であった。

脾臓では、ヘモジデリン沈着が雄の 400 ppm 群と雌の 400 ppm 以上の群で、赤血球充満が雄の 400 ppm 群と雌の 2000 ppm 群で、被膜の増生と髄外造血亢進が雌の 2000 ppm 群で増加した。これらの変化はメトヘモグロビンの 400 ppm 群での増加及び血液学的検査での貧血指標の変化とも一致し、血液/造血系への毒性によるものと考えられた。

肝臓の小葉中心性水腫様変性、褐色色素沈着並びに単細胞壊死が雌の 2000 ppm 群で増加した。褐色色素は主に肝細胞の細胞質内に大小の球状顆粒として認められ、シュモール反応陽性、PAS 反応陽性、ベルリンブルー染色陰性でありヘモジデリンとは異なる物質で

あったが、その本態は不明であった。

なお、MTD を超えた雄の 2000 ppm 群では、超重度の慢性腎症がほとんどの動物に認められ、腎盂尿路上皮の過形成、嚢胞及び近位尿細管上皮への褐色色素沈着の発生が増加した。脾臓にヘモジデリン沈着、血管拡張及び被膜の増生が認められた。肝臓に小葉中心性の水腫様変性、褐色色素沈着が認められた。

#### IV-4 量-反応関係

本試験で腫瘍発生のみられた濃度は、肝臓では雄の 400 ppm、雌の 2000 ppm、腎臓では、雌の 2000 ppm であった。また、腫瘍以外の影響として、肝臓に小葉中心性の水腫様変性、褐色色素沈着及び単細胞壊死が雌の 2000 ppm に、腎臓に慢性腎症が雌雄とも 80 ppm にみられた。

#### IV-5 投与濃度設定の評価

本試験の投与濃度は 13 週間試験（文献 6）の結果をもとに設定した。しかし、雄の 2000 ppm 群では、著しい体重増加の抑制が認められ、全動物が死亡し、その死因のほとんどは非腫瘍性病変である慢性腎症であった。以上のことから、雄の投与濃度 2000 ppm は最大耐量（MTD）を超えていると考えられた。雄の 80 ppm 群と 400 ppm 群では、投与最終週における体重増加の抑制は 10%及びそれ以下であり、生存率も対照群とほぼ等しいことから、雄の投与濃度 80 ppm と 400 ppm は MTD の基準(文献 15,16,17)を満たしていると考えられた。雌の 2000 ppm 群では体重増加の抑制は 18%であったが、抑制率が 10%を超えたのは 74 週以降であり、生存率も低下していないこと、及び雌の 80 ppm 群と 400 ppm 群の生存率と体重は対照群とほぼ等しいことから、雌に対する全ての投与濃度は MTD の基準を満たしていると考えられた。従って、本試験における用量設定は、雄の 2000 ppm を除いて、妥当であると判断した。

#### IV-6 他文献との比較等

##### ① がん原性試験

1-クロロ-2-ニトロベンゼンのラットを用いたがん原性試験は Weisburger ら（文献 18）の報告があり、複数の腫瘍(腫瘍名の記載はない)の増加がみられたとしている。しかし、IARC は、動物数の不足などから、彼等の試験をがん原性の評価には不十分であるとしている。（文献 19）

NTP では、F344/N ラットに 1-クロロ-2-ニトロベンゼンを 2 週間及び 13 週間吸入暴露（1 日 6 時間、週 5 日）した実験を実施したが、がん原性試験は実施せず報告をまとめて

いる（文献 20）。

日本バイオアッセイ研究センターで、1-クロロ-2-ニトロベンゼンの異性体である 1-クロロ-4-ニトロベンゼン(パラクロロニトロベンゼン) のラットを用いたがん原性試験（文献 21）を最高投与濃度 1000 ppm で実施した。その結果、雌雄に脾臓の線維腫、線維肉腫、骨肉腫、血管肉腫、副腎の褐色細胞腫、雄のみに肉腫 NOS の発生増加があり、明らかながん原性が認められた。両異性体の発がん性は、塩素とニトロ基の相対的位置の相違によって、発がんの標的臓器が異なることを示している。

日本バイオアッセイ研究センターで、1-クロロ-2-ニトロベンゼンの同族体である、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン(1,4-DCNB)及び 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼン(2,4-DCNB) のラットを用いたがん原性試験（文献 22, 23）を実施した。1,4-DCNB の最高濃度は 2000 ppm、2,4-DCNB の最高濃度は 3000 ppm であった。その結果、1,4-DCNB では、雄に肝細胞腺腫、肝細胞癌及び耳道腺腫の発生増加が認められ、がん原性を示す証拠であると結論づけられた。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、がん原性を示唆する証拠であると結論づけられた。2,4-DCNB では、雌雄とも、腎臓腫瘍（腎細胞癌、腎細胞腺腫）の顕著な発生増加が認められ、これらの腫瘍の発生増加は雌雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠であると考えられた。また、両被験物質ともに投与濃度に依存した慢性腎症の発生増加が認められた。本試験では、雌雄ともに肝細胞癌と肝細胞腺腫の発生が増加し、雌で腎細胞腺腫が 2 匹に発生した。従って、これらの 3 種の塩化ニトロベンゼンは、肝臓と腎臓を標的臓器とした発がん性を示すものと考えられる。

## ② 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 11）によれば、1-クロロ-2-ニトロベンゼンの微生物を用いる復帰突然変異試験では、代謝活性化による場合において、TA98、TA100 及び WP2uvrA の 3 菌株において、強い陽性を示した（mg 当りの比活性値の最大値：TA100 で 987）。ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験（文献 24）では、チャイニーズハムスターの培養細胞（CHL/IU）を使用し、ラット肝 S9 を用いた代謝活性化によらない場合にだけ陽性を示した(D20 値：0.6mg/mL)。

## ③ 代謝

1-クロロ-2-ニトロベンゼンは、ラットの肝臓で 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 19, 25）。また Bray ら（文献 26）はウサギの実験で 1-クロロ-2-ニトロベンゼンはウサギの体内で還元され 2-クロロアニリンに、水酸化され 2-クロロ-3-ニトロフェノール、または 3-クロロ-2-ニトロフェノールになり、さらに 3-アミノ-2-クロロフェノール、または 2-アミノ-3-クロロフェノールになると報告している。

本試験では、雌雄の 2000 ppm 群で、1-クロロ-2-ニトロベンゼンの投与により、黄色尿が観察された。黄色尿はこれらの代謝物に起因すると考えられる。

## V 結論

F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて1-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。

雌雄とも肝細胞癌と肝細胞腺腫の発生増加が認められ、雌雄ラットに対するがん原性を示す証拠である。



## VI 文献

1. (社)有機合成化学協会 編. 1985. 有機化合物辞典. 東京: 講談社, 290.
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. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発 第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies", Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. 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 13 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.
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 MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S. et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens : A Critical Appraisal. Lyon: IARC. IARC Monographs Suppl 2: 311-426.
9. Bannasch P, Zerban H. 1994. Preneoplastic and neoplastic lesions of the rat liver. In: Pathology of Neoplasia and Preneoplasia in Rodents (Bannasch P, Gössner W, eds). Stuttgart, NY: Schattauer, 18-63.
10. Hard GC, Alden CL, Stula EF, Trump BF. 1995. Proliferative lesions of the kidney in rats. In: Guides for Toxicologic Pathology. Washington, DC: STP/ARP/AFIP, 1-19.

11. 日本化学物質安全・情報センター編. 1997. 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, 東京: 日本化学物質安全・情報センター, 補遺版, 157-160.
12. Vamvakas S, Elfarra AA, Dekant W, Henschler D, Anders MW. 1988. Mutagenicity of amino acid and glutathione *S*-conjugates in the Ames test. *Mutat Res* 206: 83-90.
13. Seely JC, Haseman JK, Nyska A, Wolf DC, Everitt JI, Hailey JR. 2002. The effect of chronic progressive nephropathy on the incidence of renal tubule cell neoplasms in control male F344 rats. *Toxicol Pathol* 30: 681-686.
14. Hard GC, Seely JC. 2005. Recommendations for the interpretation of renal tubule proliferative lesions occurring in rat kidneys with advanced chronic progressive nephropathy (CPN). *Toxicol Pathol* 33: 641-649.
15. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U. 1976. Guidelines for carcinogen bioassay in small rodents. Bethesda, MD : National Cancer Institute. NCI Carcinogenesis Technical Report Series No.1: 13-15.
16. Bannasch P, Griesemer RA, Anders F, Becker R, Cabral JR, Della Porta G et al. 1986. Long-term assays for carcinogenicity in animals. In: Long-term and Short-term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. (Montesano R, Bartsch H, Vainio H, Wilbourn J, Yamasaki H. eds.). Lyon: IARC, IARC Scientific Publications No. 83: 34-36.
17. Haseman JK. 1985. Issues in carcinogenicity testing: dose selection. *Fundam Appl Toxicol* 5: 66-78.
18. Weisburger EK, Russfield AB, Homburger F, Weisburger JH, Boger E, Van Dongen CG et al. 1978. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J Environ Pathol Toxicol* 2: 325-356.

19. IARC. 1996. 2-Chloronitrobenzene, 3-chloronitrobenzene and 4-chloronitrobenzene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 65. Printing Processes and Printing Inks, Carbon Black and Some Nitro Compounds. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 263-296.
20. 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 B6C3F<sub>1</sub> Mice. Toxicity Report Series 33. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program.
21. 日本バイオアッセイ研究センター. 1991. パラクロロニトロベンゼンのラット及びマウスを用いた経口（混餌）によるがん原性試験報告書. 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.
22. 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がん原性試験（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.
23. 日本バイオアッセイ研究センター. 2005. 2,4-ジクロロ-1-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. 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.
24. 日本化学物質安全・情報センター編. 2005. 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. 東京：日本化学物質安全・情報センター, 補遺 3 版: 65,218-219.
25. Rickert DE, Held SD. 1990. Metabolism of chloronitrobenzenes by isolated rat hepatocytes. Drug Metab Dispos 18: 5-9.
26. Bray HG, James SP, Thorpe WV. 1956. The metabolism of the monochloronitrobenzenes in the rabbit. Biochem J 64: 38-44.