

1-クロロ-2-ニトロベンゼンのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0462

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-ニトロベンゼンのマウス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-ニトロベンゼンをマウスに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-ニトロベンゼンのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0462

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	12
Ⅲ-1	生死状況	12
Ⅲ-2	一般状態	12
Ⅲ-3	体重	12
Ⅲ-4	摂餌量	13
Ⅲ-5	被験物質摂取量	13
Ⅲ-6	血液学的検査	14
Ⅲ-7	血液生化学的検査	14
Ⅲ-8	尿検査	14

Ⅲ-9 病理学的検査	15
Ⅲ-9-1 剖検	15
Ⅲ-9-2 臓器重量	15
Ⅲ-9-3 病理組織学的検査	15
Ⅲ-9-4 死因	18
Ⅳ 考察及びまとめ	19
Ⅳ-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量	19
Ⅳ-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	19
Ⅳ-3 非腫瘍性病変	19
Ⅳ-4 量-反応関係	20
Ⅳ-5 投与濃度設定の評価	20
Ⅳ-6 他文献との比較等	21
Ⅴ 結論	23
Ⅵ 文献	24

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 B6D2F1/Crlj (旧 Crj:BDF₁) マウス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 100、500 及び 2500 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 2500 ppm 群と 500 ppm 群、雌の 2500 ppm 群で肝臓腫瘍の発生によって生存率が低下した。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 2500 ppm 群の全動物に全投与期間を通してみられた。また雌雄とも内部腫瘍の発生が多くみられた。体重は、雌雄とも 2500 ppm 群では投与期間を通して低値を示し、対照群に比べて、雄の 2500 ppm 群の最終体重は 60%、雌の 2500 ppm 群の最終体重は 71%であった。雌雄の 500 ppm 群の体重は、投与期間終期に低値を示し、最終体重は対照群に比べて、雄が 78%、雌が 88%であった。雌雄の 100 ppm 群は対照群と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、肝芽腫、肝細胞腺腫) にみられた。これらの腫瘍の発生増加が認められた濃度は、雌雄とも最低濃度の 100 ppm であった。

腫瘍以外の影響は雌雄の肝臓、脾臓、腎臓及び骨髄、雌の鼻腔にみられた。

肝臓には雌雄に小葉中心性の肝細胞肥大、雄に核の大型化がみられた。脾臓は、ヘモジデリン沈着、髄外造血が増加、腎臓にヘモジデリン沈着、骨髄の赤血球造血の増加が雌雄にみられた。鼻腔は嗅上皮のエオジン好性変化、嗅上皮と腺の呼吸上皮化生が雌にみられた。

以上のように、B6D2F1/Crlj マウスを用いた 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。

雌雄とも肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫の発生増加が認められ、雌雄マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠である。

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 (マウス 雄)

	投与濃度 (ppm)		0	100	500	2500	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	19	29 *	30 *	34 **	↑↑	↑
		肝細胞癌 肝芽腫	15 1	14 6	20 35 **	35 ** 44 **	↑↑ ↑↑	↑↑ ↑↑
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌+肝芽腫 +肝細胞腺腫	30	36	49 **	49 **	↑↑	↑↑

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 (マウス 雌)

	投与濃度 (ppm)		0	100	500	2500	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	8	22 **	48 **	38 **	↑↑	↑↑
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌 肝芽腫	0 0	3 0	14 ** 9 **	48 ** 28 **	↑↑ ↑↑	↑↑ ↑↑
		肝細胞癌+肝芽腫 +肝細胞腺腫	8	24 **	50 **	50 **	↑↑	↑↑

*: $p \leq 0.05$ 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

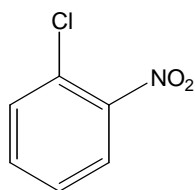
名 称： 1-クロロ-2-ニトロベンゼン (1-Chloro-2-nitrobenzene)

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 B6D2F1/Crlj (旧 Crj:BDF₁) マウス (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：21.3～24.9g、雌：17.1～20.3g) を選別し、試験に用いた。

なお、B6D2F1/Crlj マウス (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 100、500 及び 2500 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 B6D2F1/Crlj マウス(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 匹のマウスを用いた。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 78、313、1250、2500 及び 5000 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、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、病理組織学的検査で赤血球、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ことから、がん原性試験の最低濃度は 78 ppm と 313 ppm の間と考えた。従って、がん原性試験の濃度は、2500、500 及び 100 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、100、500 及び 2500 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 92.4~107%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、マウス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 : 87.9%、5000 ppm : 80.6%、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)
100 ppm 群	50 匹 (1101~1150)	100 ppm 群	50 匹 (2101~2150)
500 ppm 群	50 匹 (1201~1250)	500 ppm 群	50 匹 (2201~2250)
2500 ppm 群	50 匹 (1301~1350)	2500 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 106 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 : $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ < $22.9\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ >

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 (112(W)×212(D)×120(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- γ 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、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、 γ -GTP、CK、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

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（ウロラブステックス、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、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、骨髓（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、胆嚢、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、脊髓、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、小数点以下第 1 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 **Dunnnett** 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 **Dunnnett** 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、 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間との χ^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 だと思いが、確かでない腫瘍
- 3：多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍
- 4：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

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

—雄—

2500 ppm 群と 500 ppm 群では生存率が低下した。100 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：35 匹（70%）、100 ppm 群：35 匹（70%）、500 ppm 群：17 匹（34%）、2500 ppm 群：8 匹（16%）であった。

—雌—

2500 ppm 群では生存率が低下した。100 ppm 群と 500 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：29 匹（58%）、100 ppm 群：34 匹（68%）、500 ppm 群：26 匹（52%）、2500 ppm 群：5 匹（10%）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 2500 ppm 群の全動物に投与初期より全投与期間を通してみられた。内部腫瘍が 2500 ppm 群では 17 週から、72 週には 50%以上の動物に、500 ppm 群では 43 週から投与終了まで多い週で 15 匹に、100 ppm 群では 62 週から投与終了まで多い週で 11 匹にみられた。

—雌—

黄色尿が 2500 ppm 群の全動物に全投与期間を通してみられた。内部腫瘍が 2500 ppm 群では 37 週から発生し、57 週には 50%以上の動物にみられた。また、500 ppm 群では 66 週から投与終了まで多い週で 12 匹に、100 ppm 群では 58 週から投与終了まで、多い週で 6 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—

2500 ppm 群では投与 12 週以降に、500 ppm 群でも投与 94 週以降に体重の低値が認められた。100 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、100 ppm 群：96%、500 ppm 群：78%、2500 ppm 群：60%であった。

—雌—

2500 ppm 群では投与 38 週以降に、500 ppm 群でも投与 94 週以降に体重の低値が認められた。100 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、100 ppm 群：101%、500 ppm 群：88%、2500 ppm 群：71%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—

2500 ppm 群では、14 週から 58 週目まで摂餌量の低値を示す週が散見された。500 ppm 群と 100 ppm 群では、全投与期間を通して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：4.3g（100%）、100 ppm 群：4.2g（98%）、500 ppm 群：4.2g（98%）、2500 ppm 群：4.3g（100%）であった。

—雌—

各投与群とも、全投与期間を通して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：4.1g（100%）、100 ppm 群：4.2g（102%）、500 ppm 群：4.2g（102%）、2500 ppm 群：4.2g（102%）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、100 ppm 群：0.008～0.016（平均：0.011）、500 ppm 群：0.040～0.081（平均：0.054）、2500 ppm 群：0.260～0.479（平均：0.329）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、500 ppm 群で 100 ppm 群の被験物質摂取量に対して、5.0 倍、2500 ppm 群で 100 ppm 群の被験物質摂取量に対して、30.0 倍であり、2500 ppm 群では体重の低値に伴う増加を示したものの、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。

—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、100

ppm 群 : 0.011~0.020 (平均 : 0.014) 、 500 ppm 群 : 0.056~0.095 (平均 : 0.069) 、 2500 ppm 群 : 0.327~0.524 (平均 : 0.396) 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、100 ppm 群の被験物質摂取量に対して、500 ppm 群で 5.0 倍、2500 ppm 群で 28.3 倍であり、2500 ppm 群では体重の低値に伴う増加を示したものの、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—

網赤血球比の増加と好酸球比の減少が 500 ppm 以上の群で、分葉核好中球比の増加とリンパ球比の減少が 2500 ppm 群で認められた。

—雌—

網赤血球比の増加と好酸球比の減少が 500 ppm 以上の群で、分葉核好中球比の増加と白血球数及びリンパ球比の減少が 2500 ppm 群で認められた。

その他、MCH の減少が 500 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-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—

総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質及びカルシウムの増加、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP 及び CK の上昇が 500 ppm 以上の群で認められた。また、カリウムと無機リンの増加とグルコースの減少が 2500 ppm 群で認められた。

—雌—

総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質及びカルシウムの増加、AST、ALT、LDH、ALP 及び γ -GTP の上昇が 500 ppm 以上の群で認められた。また、尿素窒素、カリウム及び無機リンの増加とグルコースの減少が 2500 ppm 群で認められた。

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—

蛋白の陽性例の減少が 2500 ppm 群にみられた。

—雌—

ケトン体の陽性例の増加が 2500 ppm 群に認められた。その他、蛋白の陽性例の減少が 500 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 I 1~6 に示した。

—雄—

肝臓の結節が投与群で増加した。その発生匹数は、対照群で 27 匹であったのに対し、100 ppm 群で 33 匹、500 ppm 群で 47 匹、2500 ppm 群で 48 匹であった。

—雌—

肝臓の結節が投与群で増加した。その発生匹数は、対照群で 9 匹であったのに対し、100 ppm 群で 20 匹、500 ppm 群で 47 匹、2500 ppm 群で 50 匹であった。腹腔内の出血が 2500 ppm 群で 12 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—

肝臓の実重量及び体重比の高値、腎臓と脾臓の体重比の高値が 500 ppm 以上の群に認められた。副腎、精巣、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群があったが、解剖時体重の低値に起因する変化と考えられた。

—雌—

肝臓の実重量及び体重比の高値、腎臓の体重比の高値が 500 ppm 以上の群に認められた。また、脾臓の体重比の高値が 500 ppm 群に認められた。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群があったが、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—

1) 腫瘍性病変

<肝臓>

肝細胞腺腫の発生は、Peto 検定 (有病率法、死亡率法+有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で全投与群に増加がみられた。肝細胞腺腫の 100、500 及び 2500 ppm 群における発生 (29 匹,58%、30 匹,60%及び 34 匹,68%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 4%~最大 36%、平均発生率 18.6%) を超えていた。肝細胞癌の発生は、Peto 検定 (死亡率法、有病率法、死亡率法+有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2500 ppm 群に増加がみられた。肝細胞癌の 2500 ppm 群における発生 (35 匹,70%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 2%~最大 42%、平均発生率 19.2%) を超えていた。肝芽腫の発生は、Peto 検定 (死亡率法、有病率法、死亡率法+有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 500 ppm 以上の群に増加がみられた。肝芽腫の 100、500 及び 2500 ppm 群における発生 (6 匹,12%、35 匹,70%及び 44 匹,88%) 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 0.8%) を超えていた。従って、これらの腫瘍の発生増加は、被験物質の投与によるものと考えられた。なお、肝臓腫瘍の転移が 2500 ppm で肺に 20 匹、後腹膜に 2 匹、500 ppm 群で肺に 8 匹、後腹膜に 2 匹みられた。

その他、肺の細気管支-肺胞上皮腺癌と細気管支-肺胞上皮腺腫、並びにリンパ節の悪性リンパ腫が減少した。

2) 非腫瘍性病変

<肝臓>

小葉中心性の肝細胞肥大が全投与群で増加し、投与濃度が高い群ほどその程度が増強した。小葉中心性の核の大型化が 500 ppm 以上の群で増加した。なお、肉芽形成が全投与群で減少した。

<脾臓>

ヘモジデリン沈着が全投与群で、髄外造血が 500 ppm 以上の群で増加した。

<腎臓>

ヘモジデリン沈着が 500 ppm 以上の群で増加した。

<骨髄>

赤血球造血が 500 ppm 以上の群で増加した。

<肺>

細気管支-肺胞上皮の増生が 500 ppm 以上の群で増加した。

その他、唾液腺のリンパ球浸潤が 500 ppm 以上の群で、副腎の紡錘形細胞増生が 2500 ppm 群で減少した。なお、肺の炎症性細胞の発生が 500 ppm 群で増加したが投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

1) 腫瘍性病変

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 検定で全投与群で増加した。肝細胞腺腫の 100、500 及び 2500 ppm 群における発生（22 匹,44%、48 匹,96%及び 38 匹,6%）は、いずれもヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 0%～最大 16%、平均発生率 6.0%）を超えていた。肝細胞癌の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法、死亡率法+有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 500 ppm 以上の群で増加した。肝細胞癌の 500 ppm 群と 2500 ppm 群における発生（14 匹,28%、8 匹,96%）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 2.4%）を超えていた。肝芽腫の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法、死亡率法+有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 500 ppm 以上の群で増加した。肝芽腫は当センターのヒストリカルコントロールデータにはこれまで発生のない腫瘍であるが、500 ppm 群の 9 匹（18%）及び 2500 ppm 群の 28 匹（56%）に発生した。従って、これらの腫瘍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、肝臓腫瘍の転移が 2500 ppm で肺に 30 匹、膵臓及び骨髄に各 2 匹、脾臓、卵巣及びハーダー腺に各 1 匹、500 ppm 群で肺に 2 匹みられた。

その他、肺の細気管支-肺胞上皮腺腫、下垂体の腺腫、子宮の組織球性肉腫及びリンパ節の悪性リンパ腫が減少した。

2) 非腫瘍性病変

<肝臓>

小葉中心性の肝細胞肥大が 500 ppm 以上の群で増加し、投与濃度が高い群ほどその程度が増強した。肉芽形成は 500 ppm 以上の群で減少した。

<脾臓>

ヘモジデリン沈着の増加が 2500 ppm 群で、髄外造血の増加が 500 ppm 以上の群でみられた。

<腎臓>

ヘモジデリン沈着の増加が 2500 ppm 群でみられた。

<骨髄>

赤血球造血の増加が 500 ppm 以上の群でみられた。

<鼻腔>

嗅上皮のエオジン好性変化、嗅上皮と腺の呼吸上皮化生が 2500 ppm 群で増加した。呼吸上皮のエオジン好性変化が 500 ppm 群で増加した。

<肺>

細気管支-肺胞上皮の増生が 500 ppm 群で増加した。

その他、卵巣の嚢胞と子宮内膜の嚢胞状増生の減少が 2500 ppm 群でみられ、腺胃の過形成と副腎の紡錘形細胞増生の程度が 2500 ppm 群で減弱した。なお、下垂体の過形成が 500 ppm 群で増加したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

III-9-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 19 に示した。

—雄—

肝臓腫瘍による死亡が 500 ppm 以上の群に多くみられた。肝臓腫瘍により死亡した動物は、対照群では 7 匹であったのに対し、100 ppm 群では 2 匹、500 ppm 群では 29 匹、2500 ppm 群では 40 匹であった。

—雌—

肝臓腫瘍による死亡が 500 ppm 以上の群に多くみられた。肝臓腫瘍により死亡した動物は、対照群では 1 匹であったのに対し、100 ppm 群では 1 匹、500 ppm 群では 7 匹、2500 ppm 群では 39 匹であった。

IV 考察及びまとめ

1-クロロ-2-ニトロベンゼンのマウスを用いた2年間の混餌経口投与(投与濃度:100 ppm, 500 ppm, 2500 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500 ppm以上の群で生存率が低下した。雄の100 ppm群の生存率は、対照群とほぼ同様であった。雌の2500 ppm群で生存率が低下した。雌の100 ppm群と500 ppm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2500 ppm群の全動物に全投与期間を通してみられた。内部腫瘍が雌雄の2500 ppm群の50%以上に、また、100 ppm群と500 ppm群にも対照群と比較して多くみられた。

体重は、雌雄とも2500 ppm群では投与期間を通して著しい低値を示し、対照群に比べて、雄の2500 ppm群の最終体重は60%、雌の2500 ppm群の最終体重は71%であった。500 ppm群の体重は、投与期間終期に低値を示し、最終体重は対照群に比べて、雄が78%、雌が88%であった。雌雄の100 ppm群は対照群と同様の推移を示した。

摂餌量は、雄の2500 ppm群で低値が散見された。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

雌雄の肝臓に腫瘍の著しい発生増加がみられた。

<肝臓腫瘍>

雌雄とも、肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の発生増加が認められた。肝細胞腺腫の発生増加は全ての投与群にみられた。肝細胞癌と肝芽腫は悪性腫瘍に分類される腫瘍であり、肝臓腫瘍(肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫)の発生増加は、雌雄マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えた。なお、肝細胞腫瘍の前腫瘍病変である小増殖巣(文献9)の発生増加は認められなかった。

IV-3 非腫瘍性病変

雌雄の肝臓、脾臓、腎臓及び骨髄、雌の鼻腔に影響がみられた。

肝臓では小葉中心性の肝細胞肥大が雄の全ての投与群と雌の500 ppm以上の群で、核の大型化が雄の500 ppm以上の群で増加した。

脾臓ではヘモジデリン沈着が雄の全投与群と雌の 2500 ppm 群で、髄外造血が雌雄の 500 ppm 以上の群で増加した。腎臓ではヘモジデリン沈着が雄の 500 ppm 以上の群と雌の 2500 ppm 群で増加した。骨髄では赤血球造血が雌雄の 500 ppm 以上の群で増加した。これらの変化は血液毒性による影響か、腫瘍による二次的变化であるかは判断できなかった。その他、鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化、嗅上皮と粘膜下腺の呼吸上皮化生が雌の 2500 ppm 群で増加した。

なお、血液生化学検査で雌雄ともに AST、ALT、LDH 及び γ -GTP の上昇、総ビリルビンの増加等が 500 ppm 以上の群でみられたが、雌雄とも最低濃度から肝臓腫瘍の増加がみられていることから、これらの変化は、発生した腫瘍の影響か、または、被験物質の肝臓に及ぼす毒性影響であるか区別できなかった。

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雌雄とも 100 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が雄の 100 ppm、雌の 500 ppm に、脾臓にヘモジデリン沈着が雄の 100 ppm に、髄外造血が雌の 500 ppm に、腎臓にヘモジデリン沈着が雄の 500 ppm、雌の 2500 ppm に、骨髄に赤血球造血が雌雄とも 500 ppm、肺に細気管支の増生が雄の 500 ppm、鼻腔に嗅上皮のエオジン好性変化、嗅上皮と腺の呼吸上皮化生)が 2500 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。雌雄の 2500 ppm 群では体重増加の抑制が対照群と比較して 41%及び 33%であり、最大耐量(MTD)の基準(文献 10,11,12)である 10%を超えた。しかし、10%を超える体重抑制が見られた時期は雄 26 週、雌 46 週以降であった。2500 ppm 群では肝芽腫及び肝細胞癌の悪性肝腫瘍が多発し、雌雄 2500 ppm 群の体重低下は悪性肝臓腫瘍の多発に起因するものと考えた。また、2500 ppm 群の雄 40 匹と雌 39 匹が肝臓腫瘍によって死亡し、生存率の低下は腫瘍発生が関与していると考えられる。雌雄の 500 ppm 群でも体重増加の抑制が 10%を超えたが、その時期は雄 90 週、雌 102 週と投与期間の終わりに近く、これらの群でも悪性肝臓腫瘍が多発し、10%を超える最終体重の低下は肝臓腫瘍の発生に起因するものと考えた。従って、本試験における雌雄マウスへの用量設定は、MTD の基準を満たしていると考え、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-ニトロベンゼンのマウスを用いたがん原性試験は Weisburger ら (文献 13) の報告があり、肝臓腫瘍の増加がみられたと報告している。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 14)

NTP では、B6C3F₁ マウスに 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 15)。

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) のマウスを用いたがん原性試験 (文献 16) を最高投与濃度 2000 ppm で実施した。その結果、雄に血管腫、悪性リンパ腫及び肝細胞癌、雌に肝臓の血管肉腫と肝細胞癌の発生増加が認められたが、発生率は低値であることからがん原性は断定できなかった。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) のマウスを用いたがん原性試験 (文献 17,18) を実施した。1,4-DCNB の最高濃度は雌雄とも 2000 ppm、2,4-DCNB の最高濃度は雄で 3000 ppm、雌で 6000 ppm であった。その結果、1,4-DCNB では、雄に肝芽腫と肝細胞癌、雌に肝細胞癌と肝細胞腺腫の発生増加が認められ、雌雄に対するがん原性を示す明らかな証拠であると結論づけられた。2,4-DCNB では、雌雄に肝芽腫、肝細胞癌、肝細胞腺腫及び腹膜の血管肉腫の発生増加が認められ、雌雄マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠であると結論づけられた。本試験では、雌雄ともに肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫が 1,4-DCNB 及び 2,4-DCNB より高率に発生した。従って、これらの 3 種の塩化ニトロベンゼンは肝臓を標的臓器とした発がん性を示しており、その中でも 1-クロロ-2-ニトロベンゼンは肝臓への最も強い発がん性を示していると考えられる。

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 19) 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 WP2*uvrA* 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 20) 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 14, 21）。また Bray ら（文献 22）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

B6D2F1/Crlj マウスを用いて 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。

雌雄とも肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫の発生増加が認められ、雌雄マウスに対する
がん原性を示す明らかな証拠である。

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. 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. Harada T, Enomoto A, Boorman GA, Maronpot RR. 1999. Liver and gallbladder. In: Pathology of the Mouse (Maronpot RR, ed). Vienna, IL: Cache River Press, 119-183.
10. 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.

11. 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.
12. Haseman JK. 1985. Issues in carcinogenicity testing: dose selection. *Fundam Appl Toxicol* 5: 66-78.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 日本バイオアッセイ研究センター. 2003. 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのマウス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.
18. 日本バイオアッセイ研究センター. 2005. 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンのマウス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.

19. 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
20. 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,
21. Rickert DE, Held SD. 1990. Metabolism of chloronitrobenzenes by isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 18: 5-9.
22. Bray HG, James SP, Thorpe WV. 1956. The metabolism of the monochloronitrobenzenes in the rabbit. *Biochem J* 64: 38-44.