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

試験番号：０４２１

CAS　Ｎｏ．６１１－０６－３

2005 年 3 月 25 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

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)

試験目的

2,4-ジクロロ-1-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」及び 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
副所長　山本　静護
神奈川県秦野市平沢 2445

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

試験番号：０４２１

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、示性式及び分子量 …… 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　投与の方法、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 …… 7
　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

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 …… 11
Ⅱ－4－1　数値の取り扱いと表示 …… 11
Ⅱ－4－2　母数の取り扱い …… 11
Ⅱ－4－3　統計方法 …… 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 …… 19

Ⅳ　考察及びまとめ …… 20
Ⅳ－1 生存率、一般状態、体重、摂餌量 …… 20
Ⅳ－2 腫瘍性及び腫瘍関連病変 …… 20
Ⅳ－3 非腫瘍性病変 …… 21
Ⅳ－4 量－反応関係 …… 21
Ⅳ－5 他文献との比較等 …… 21

Ⅴ　結論 …… 23

Ⅵ　文献 …… 24

要約

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンのがん原性を検索する目的で F344/DuCrj(Fischer)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、2,4-ジクロロ-1-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 750、1500 及び 3000 ppm（公比 2）とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重・摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、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。

雌雄とも被験物質の投与による生存率の低下は認められなかった。体重は、投与濃度に対応した増加の抑制を示し、104 週の雌雄 3000 ppm 群の体重抑制率は、対照群と比較して、それぞれ 14%と 15%であった。摂餌量は、雌雄とも投与群で投与開始初期に僅かな低値が散見された。一般状態の観察では、雌雄とも 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの代謝物に起因する黄色尿が投与群の全ての動物に投与期間を通して観察された。

腫瘍の発生増加は、腎臓（腎細胞癌、腎細胞腺腫）と包皮腺（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、腎臓腫瘍が雌雄とも 1500 ppm 以上、包皮腺腫瘍が雄の 3000 ppm であった。また、腎臓腫瘍の前腫瘍性病変である異型尿細管過形成は、雌雄とも最低濃度の 750 ppm 群からみられた。

腫瘍以外の影響は、雌雄とも腎臓（雌雄で慢性腎症と近位尿細管の好酸滴、雄で腎乳頭の鉱質沈着と腎盂上皮の過形成）にみられた。これらの影響は、雌雄とも最低濃度の 750 ppm からみられた。

以上のように、F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いた 2,4-ジクロロ-1-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、腎臓腫瘍（腎細胞癌及び腎細胞腺腫）の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、雄では包皮腺の腺腫の発生増加もみられた。

2,4-ジクロロ-1-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	750	1500	3000	Peto 検定	Cochran-Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	皮膚/付属器	毛嚢上皮腫	1	0	3	1		
		角化棘細胞腫	1	3	3	1		
	皮下織	線維腫	4	7	3	3		
	肺	細気管支-肺胞上皮線	0	1	0	3	↑	↑
	肝臓	肝細胞腺種	2	1	5	3		
	膵臓	島細胞腺種	0	3	1	0		
	腎臓	腎細胞腺腫	0	0	3	26 **	↑↑	↑↑
	下垂体	腺腫	16	11	6 *	5 **a)		↓↓
	甲状腺	C-細胞腺腫	9	7	4	0 **		↓↓
	副腎	褐色細胞腫	2	2	5	1		
	精巣	間細胞腫	43	48	50 **	49 *	↑↑	↑
	乳腺	線維腺種	1	2	4	3		
	包皮腺	腺腫	1	4	2	7 *	↑	↑
	腹膜	中皮腫	2	0	3	3		
悪性腫瘍	脾臓	単核球性白血病	2	2	3	0		
	腎臓	腎細胞癌	0	0	2	23 **	↑↑	↑↑
	甲状腺	C-細胞腺癌	0	1	1	0		
	腎臓	腎細胞腺腫＋腎細胞癌	0	0	5 *	38 **	↑↑	↑↑
	甲状腺	C-細胞腺腫+C-細胞腺癌	9	8	5	0 **		↓↓

a）：検査動物数 49、他は上段に表示の検査動物数と同じ

2,4-ジクロロ-1-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	750	1500	3000	Peto 検定	Cochran-Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	腎臓	腎細胞腺腫	0	0	3	26 **	↑↑	↑↑
	下垂体	腺腫	11	11	13	12		
	甲状腺	C-細胞腺腫	6	4	4	3		
	子宮	子宮内膜間質性ﾎﾟﾘｰﾌﾟ	11	9	7	14		
	乳腺	線維腺種	7	5	12	5		
	包皮腺	腺腫	2	1	4	2		
悪性腫瘍	脾臓	単核球性白血病	8	3	3	1 *		↓
	腎臓	腎細胞癌	0	0	0	12 **	↑↑	↑↑
	子宮	子宮内膜間質性肉腫	2	3	4	4		
	腎臓	腎細胞腺腫＋腎細胞癌	0	0	3	32 **	↑↑	↑↑

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

＊：p≦0.05 で有意　　＊＊：p≦0.01 で有意　　(Fisher 検定)
↑：p≦0.05 で有意増加　　↑↑：p≦0.01 で有意増加　　(Peto, Cochran-Armitage 検定)
↓：p≦0.05 で有意減少　　↓↓：p≦0.01 で有意減少　　(Cochran-Armitage 検定)

Ⅰ　試験材料

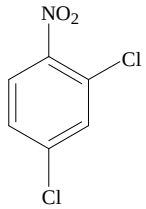
Ⅰ－1　被験物質の性状等

Ⅰ－1－1　名称等

名　　称　：　2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼン（2,4-Dichloro-1-nitrobenzene）
CAS.No.　：　611-06-3

Ⅰ－1－2　構造式、示性式及び分子量（文献 1）

構 造 式　：



示 性 式　：　$C_6H_3Cl_2NO_2$
分 子 量　：　192.00

Ⅰ－1－3　物理化学的性状等（文献 1）

性　　状　：　淡黄色の固体
比　　重　：　1.439（80℃）
融　　点　：　33℃
沸　　点　：　258.5℃
溶 解 性　：　水に難溶
保存条件　：　室温暗所で保管

Ⅰ－2　被験物質の使用ロット等

使用ロット番号　：　SEF4737
製　　造　　元　：　和光純薬工業株式会社
グ　レ　ー　ド　：　和光一級
純　　度　：　99.4%（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、その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、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 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンであることを確認した。

また、試験に使用した 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼン中には、不純物として 1,5-ジクロロ-2,3-ジニトロベンゼンと 1,2-ジクロロ-4,5-ジニトロベンゼンが確認された。不純物含有量は、1,5-ジクロロ-2,3-ジニトロベンゼンが 0.018%、1,2-ジクロロ-4,5-ジニトロベンゼンが 0.014%であった。

それらの結果については、APPENDIX A 1 に示した。

Ⅰ－3－2　安定性

被験物質の安定性は、投与開始前及び投与終了後に、ガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 6890）により測定し、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、投与開始前と投与終了後の測定結果に差はみられず、被験物質は投与期間中安定であることを確認した。

それらの結果については、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 番地）の F344/DuCrj（Fischer）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、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、体重の中央値に近い雌雄各 200 匹（投与開始時体重範囲、雄：120～136g、雌：94～107g）を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj（Fischer）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

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。

Ⅱ－1－3　投与期間

投与期間は 104 週間とし､定期解剖日の前日まで連続投与した(2001 年 3 月 28 日～2003 年 3 月 26、27、30 日、4 月 1 日）。なお、被験物質混合飼料の交換は 7 日毎に実施した。

Ⅱ－1－4　投与濃度

雌雄とも最高投与濃度を 3000 ppm に設定し、以下、1500 ppm 及び 750 ppm（公比 2）とした。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

Ⅱ－1－5　投与の方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は常温で固体であり、かつ、水に難溶であるため混餌による経口投与とした。

投与期間は、OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験）（文献 4）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 5）の結果をもとに設定した。

試験には F344/DuCrj（Fischer）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、2,4-ジクロロ-1-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 500、1000、2000 及び 4000 ppm（公比 2）に 3000 ppm を加えた 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、雄の 4000 ppm 群では、最終計測時の体重が対照群に対し 82%であり、10%を超える体重増加の抑制が認められた。これに対し、3000 ppm 群では体重増加の抑制（8%）は比較的少なく、一般状態、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量及び病理組織学的検査の結果に投与による変化がみられたものの、動物の寿命に影響を及ぼす程度ではないと考えられた。従って、3000 ppm をがん原性試験の最大耐量と推定し、最高投与濃度を 3000 ppm とし、以下 1500、750 ppm の 3 段階（公比 2）の濃度を設定した。

雌では、4000 ppm 群と 3000 ppm 群の体重増加の抑制（9%）は比較的少なく、一般状態、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量及び病理組織学的検査の結果に投与による変化がみられたものの、動物の寿命に影響を及ぼす程度ではないと考えられたが、雄との試験結果の比較も考慮し、雄と同様、3000、1500 及び 750 ppm の 3 段階（公比 2）の濃度を設定した。

Ⅱ－1－6　被験物質混合飼料の調製方法

粉末飼料（オリエンタル酵母工業（株）製 CRF-1）を粉末飼料混合機（関東混合機工業（株）製スパイラルミキサーSS-251）で攪拌しながら、あらかじめ恒温水槽（（株）井内盛栄堂製 TR-2）で加温し、溶かした被験物質を添加して、15000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この混合飼料をさらに粉末飼料と攪拌混合することによって、各設定濃度の被験物質混合飼料を調製した。また、被験物質混合飼料の調製は 3 週間を超えない間隔で行い、調製した被験物質混合飼料は使用時まで冷蔵で保管（最長 2 週間）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、クロマトグラムをガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 6890）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 92.0～106%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、本試験の 2 週間予備試験において、200 ppm と 10000 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（9 日間）したものと、ビニール袋詰にして密封し、冷蔵保管（4 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ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 6890）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（9 日間）では、200 ppm：87.6%、10000 ppm：88.2%、4 週間の冷蔵保管で 200 ppm：102%、10000 ppm：91.7%であり、給餌期間中における被験物質混合飼料中の被験物質はほぼ安定であった。

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 当たりの一日摂取量（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、雌雄各群 50 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	50 匹（1001～1050）	対　照　群	50 匹（2001～2050）
750 ppm 群	50 匹（1101～1150）	750 ppm 群	50 匹（2101～2150）
1500 ppm 群	50 匹（1201～1250）	1500 ppm 群	50 匹（2201～2250）
3000 ppm 群	50 匹（1301～1350）	3000 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、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 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では色素塗布により識別した。投与期間で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（雄雌：107 室（2001 年 3 月 14 日～2001 年 12 月 19 日）、雄：101 室、雌：105 室（2001 年 12 月 19 日～2003 年 4 月 2 日））にそれぞれ収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

Ⅱ－2－3　飼育条件

動物は、飼育期間を通して、温度 23±2℃（実測値 平均±S.D. 107 室：22.8±0.3℃、101 室：22.7±0.3℃、105 室：22.9±0.3℃）、湿度 55±15%（実測値 平均±S.D. 107 室：58±1%、101 室：56±2%、105 室：56±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/時の環境下で飼育した。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（ステンレス製二連型網ケージ：170（W）×294（D）×176（H）mm）に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。

飼料は、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（30KGy-γ線照射滅菌飼料）固形または粉末飼料を使用した。検疫期間については CRF-1 固形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、定期解剖日前日の夕方からは給餌しなかった。

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）から分析データを使用ロット毎に入手し、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毎に入手し、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 3 ヶ月毎に分析を委託し、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、その記録を保管した。

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 回行った。また、一般状態の詳細な観察は、検疫開始日（導入時）、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）に行い、投与期間中は週 1 回行った。

Ⅱ－3－2　体重測定

体重測定は、検疫開始日（導入時）、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）に行い、投与期間中は、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

全動物について、投与開始後 14 週間までは週 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、その差を給餌日数で除した値を 1 日当りの摂餌量とした。

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、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、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

Ⅱ－3－6　尿検査

投与 103 週まで生存した動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス、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、各臓器の湿重量の定期解剖時の体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

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 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定し、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（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

数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

体重については g を単位とし、整数値の 1 の位まで計測し、表示した。

摂餌量については g を単位とし、給餌量及び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。

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの体重 kg 当りの 1 日摂取量は、摂餌量に 2,4-ジクロロ-1-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 位を四捨五入して小数点以下第 3 位まで表示した。

臓器実重量については 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 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　母数の取り扱い

体重及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、計測した動物数を母数とした。

尿検査は、投与 103 週まで生存した動物を対象に行い、採尿した動物数を母数とした。

血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の計測は、定期解剖時まで生存した全動物を対象とし、検査動物数または計測動物数を母数とした。

剖検は、各群の有効動物数（供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数）を母数とした。

病理組織学的検査は、臓器別に検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

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間との χ^2 検定を行った。

なお、予備検定は 5%の有意水準で両側検定を行った。最終検定では 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。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定（文献 7）、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。

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、直接死因に関わっていた腫瘍

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－

全投与群の生存率は、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：39 匹（78%）、750 ppm 群：42 匹（84%）、1500 ppm 群：40 匹（80%）、3000 ppm 群：40 匹（80%）であった。

－雌－

750 ppm 群と 3000 ppm 群の生存率は、対照群と比較してやや高かった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：35 匹（70%）、750 ppm 群：44 匹（88%）、1500 ppm 群：38 匹（76%）、3000 ppm 群：43 匹（86%）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－

黄色尿が投与群の全ての動物に全投与期間にわたり認められた。被毛の着色が 3000 ppm 群の全動物に、1500 ppm 群と 750 ppm 群でも数匹の動物にみられた。

－雌－

黄色尿が投与群の全ての動物に全投与期間にわたり認められた。被毛の着色が投与群の多くの動物にみられた。

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－

3000 ppm 群で全投与期間にわたり、対照群と比較して 6～15%の体重の低値がみられた。1500 ppm 群では、投与 38 週まで 2～6%、投与 66 週以降に 3～11%の低値を示した。750 ppm 群では、投与 18 週まで 2～4%、投与 78 週目以降 4～7%の低値を示した。

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、750 ppm 群：93%、1500 ppm 群：89%、3000 ppm 群：85%であった。

－雌－

3000 ppm 群と 1500 ppm 群で全投与期間にわたり、体重の低値がみられ、その程度は 3000 ppm 群で 4～15%、1500 ppm 群で 2～8%であった。750 ppm 群では対照群との間に

大きな差はみられなかった。

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、750 ppm 群：98%、1500 ppm 群：92%、3000 ppm 群：86%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－

全投与群で投与初期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：15.8g（100%）、750 ppm 群：15.7g（99%）、1500 ppm 群：16.0g（101%）、3000 ppm 群：15.6g（99%）であった。

－雌－

全投与群で投与初期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：11.2g（100%）、750 ppm 群：11.1g（99%）、1500 ppm 群：11.2g（100%）、3000 ppm 群：10.9g（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、750 ppm 群：0.030～0.063（平均：0.036）、1500 ppm 群：0.060～0.126（平均：0.075）、3000 ppm 群：0.122～0.251（平均：0.153）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、750 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1500 ppm 群で 2.1 倍、3000 ppm 群で 4.3 倍であり、設定用量比（公比 2）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、750 ppm 群：0.037～0.063（平均：0.043）、1500 ppm 群：0.079～0.126（平均：0.090）、3000 ppm 群：0.155～0.250（平均：0.183）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、750 ppm 群の被験物質摂取量に対して、1500 ppm 群で 2.1 倍、3000 ppm 群で 4.3 倍であり、設定用量比（公比 2）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－

MCV、MCH 及び MCHC に軽度な変化がみられたが、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値には変化がみられなかったことから、毒性学的意義はないものと判断した。

－雌－

血小板数の増加が 1500 ppm 以上の群で認められた。

MCV、MCH 及び MCHC に軽度な変化がみられたが、赤血球数には投与濃度に対応した変化はみられず、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値には変化がみられなかったことから、毒性学的意義はないものと判断した。また、白血球数に変化が認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。杆状核好中球比にも対照群との差がみられたが、軽度な変化であった。

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－

総コレステロール、リン脂質、尿素窒素、クレアチニン及びカリウムの増加、γ-GTP の上昇、並びに、アルブミンと A/G 比の減少、GOT と GPT の低下が全投与群で認められた。また、トリグリセライドと無機リンの増加、ALP の低下が 1500 ppm 以上の群でみられ、総蛋白が 3000 ppm 群で減少した。その他、クロールとカルシウムに変化がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

－雌－

総コレステロールとリン脂質の増加、並びに GOT と LDH の低下が全投与群で認められた。また、尿素窒素と総蛋白の増加、並びに、A/G 比の減少、GPT と ALP の低下が 1500 ppm 以上の群でみられ、グルコースが 3000 ppm 群で増加した。その他、γ-GTP、カリウム、クロールにも変化がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。なお、尿素窒素の 1500 ppm 群と 3000 ppm 群の平均値は対照群よりも低値であったが、対照群に高値を示した動物が含まれていたためであり、統計学的には有意な増加であった。

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－

pH の低下が全投与群でみられた。

－雌－

ケトン体の陽性例の減少が全投与群でみられた。

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－

投与群の腎臓に結節の発生がみられ、その発生数は、1500 ppm 群で 2 匹、3000 ppm 群で 30 匹であった。また、腎臓表面が顆粒状を呈した動物も増加し、その発生数は、対照群で 4 匹、750 ppm 群で 15 匹、1500 ppm 群で 23 匹、3000 ppm 群で 18 匹であった。

－雌－

投与群の腎臓に結節の発生がみられ、その発生数は、750 ppm 群で 1 匹、1500 ppm 群で 2 匹、3000 ppm 群で 16 匹であった。なお、腎臓表面が顆粒状を呈した動物は、750 ppm 群で 2 匹、1500 ppm 群で 3 匹、3000 ppm で群 2 匹であった。

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－

腎臓、肝臓及び精巣の実重量と体重比の高値が全投与群で認められた。また、肺は実重量の高値が 3000 ppm 群で、体重比の高値が全投与群でみられた。その他、脾臓、脳、副腎及び心臓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－

腎臓の実重量の高値が全投与群で、体重比の高値が 1500 ppm 以上の群で認められた。肝臓は実重量と体重比の高値が 1500 ppm 以上の群でみられた。その他、副腎、卵巣、心臓、肺、脾臓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

＜腎臓＞

腎細胞癌の発生は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3000 ppm 群に増加がみられた。腎細胞癌の 3000 ppm 群における発生（23 匹、46%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 0%～最大 4%、平均発生率 0.2%）を超えた。また、1500 ppm 群にも腎細胞癌の発生が 2 匹にみられた。腎細胞腺腫の発生は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3000 ppm 群に増加がみられた。腎細胞腺腫の 1500 ppm 群と 3000 ppm 群における発生（3 匹、6%及び 26 匹、52%）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 0.2%）を超えた。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。1500 ppm 群の腎細胞癌の発生はヒストリカルコントロールデータの範囲内であったが、高濃度群に腎細胞癌の増加があることから、被験物質の投与によるものと考えた。また、腎細胞癌と腎細胞腺腫を合わせた発生は、Fisher 検定で 1500 ppm 以上の群に増加がみられた。

腎細胞癌、腎細胞腺腫は、いずれも腎皮質で発生がみられ、淡明で大型の細胞質を持つ細胞が尿細管の構築を超えて胞巣状に増生する組織像を呈していた。その中で、腫瘍の最大径が 3mm を超えるもの、あるいは腫瘍塊の中心に壊死巣がみられるものを腎細胞癌と診断した。腎細胞癌の他臓器への転移はみられなかった。腎臓腫瘍の多くは定期解剖動物に認められた。

＜包皮腺＞

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 3000 ppm 群に増加がみられた。腺腫の 3000 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 12%、平均発生率 2.7%）を超えており、この腫瘍の発生増加は被験物質の投与による可能性があると判断した。

＜精巣＞

間細胞腫の発生は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 1500 ppm 群と 3000 ppm 群に増加がみられた。しかし、精巣の間細胞腫は、ラットにきわめて高率に自然発生する腫瘍（最小 56%～最大 98%、平均発生率 85.2%）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。

＜肺＞

細気管支-肺胞上皮腺腫の発生は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。しかし、細気管支-肺胞上皮腺腫の 3000 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内（最小 0%～最大 10%、平均発生率 3.5%）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。

その他、腫瘍性病変については下垂体の腺腫と甲状腺の C-細胞腺腫の発生が減少した。

2）非腫瘍性病変

＜腎臓＞

異型尿細管過形成の発生が全投与群のほとんどの動物にみられ、投与濃度に対応して程度が増強した。異型尿細管過形成は、尿細管内における尿細管上皮細胞の増生で、主に近位尿細管にみられ、核密度の増加や細胞質の好塩基性が高まるものが多くみられた。

乳頭の鉱質沈着、腎盂上皮の過形成及び近位尿細管の好酸滴の発生増加が全投与群でみられた。また、慢性腎症の程度の増強が全投与群に認められた。

＜脾臓＞

ヘモジデリン沈着の発生が全投与群で増加した。

その他、非腫瘍性病変については、肝臓の胆管増生の程度が全投与群で減弱し、鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化が 3000 ppm 群で減少した。

なお、肝臓の好酸性小増殖巣と眼の白内障の発生に統計学的な有意差が示されたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

－雌－

1）腫瘍性病変

＜腎臓＞

腎細胞癌の発生は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3000 ppm 群に増加がみられた。腎細胞癌の 3000 ppm 群における発生（12 匹、24%）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%）を超えた。また、腎細胞腺腫の発生は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3000 ppm 群に増加がみられた。腎細胞腺腫の 1500

ppm 群と 3000 ppm 群における発生（3 匹、6%及び 26 匹、52%）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。腎細胞癌の他臓器への転移はみられなかった。腎臓腫瘍の多くは定期解剖動物に認められた。

その他、腫瘍性病変については脾臓の単核球性白血病の発生が減少した。

2）非腫瘍性病変

＜腎臓＞

異型尿細管過形成の発生が全投与群の多くの動物にみられ、投与濃度に対応して程度が増強した。

近位尿細管の好酸滴の発生が全投与群で増加した。また、慢性腎症の発生は 750 ppm 群と 1500 ppm 群で増加し、3000 ppm 群の発生も多くみられた。乳頭の鉱質沈着も 3000 ppm 群での発生が多くみられた。

＜脾臓＞

ヘモジデリン沈着の発生が 750 ppm 群と 3000 ppm 群で増加し、1500 ppm 群での発生も多くみられた。

その他、非腫瘍性病変については、肝臓の好塩基性小増殖巣の発生が全投与群で減少し、鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化の程度が 1500 ppm 以上の群で減弱した。

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－

慢性腎症による死亡が 1500 ppm 群と 3000 ppm 群の各 2 匹でみられた他、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。

－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。なお、投与 42 週に死亡した 1500 ppm 群の 1 匹は自然発生性の腎芽腫による死亡と判断した。

Ⅳ　考察及びまとめ

2,4-ジクロロ-1-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：750 ppm, 1500 ppm, 3000 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

雌雄とも被験物質の投与による生存率の低下は認められなかった。

体重は、投与濃度に対応した増加の抑制を示した。104 週目の雌雄 3000 ppm 群の体重抑制率は、対照群と比較して、それぞれ 14%と 15%にとどまった。

一般状態の観察では、雌雄とも 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの代謝物に起因する黄色尿が、投与群の全ての動物に投与期間を通して観察された。

摂餌量は、雌雄とも投与群で投与開始初期に僅かな低値が散見された。

Ⅳ－2　腫瘍性及び腫瘍関連病変

雌雄の腎臓と包皮腺に腫瘍の発生増加がみられた。

＜腎臓腫瘍＞

雌雄とも、腎細胞癌と腎細胞腺腫の顕著な発生増加が認められた。腎細胞癌は悪性腫瘍に分類される腫瘍であり、腎臓腫瘍（腎細胞癌、腎細胞腺腫）の発生増加は、雌雄ラットに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えた。腎臓腫瘍の発生増加がみられた濃度は、雌雄とも 1500 ppm 以上であった。

また、腎臓腫瘍の前腫瘍病変である異型尿細管過形成（文献 8）の発生が認められた。異型尿細管過形成は、雌雄とも最低濃度の 750 ppm から顕著な発生増加がみられた。

13 週間試験（文献 5）で雄ラットに腎臓での好酸体が増加し、近位尿細管上皮細胞への α_{2u}-グロブリン蓄積と α_{2u}-グロブリン腎症が示唆された。しかし、本試験では、雌ラットにも腎臓腫瘍が認められたことから、α_{2u}-グロブリン腎症の関与は否定される。さらに、後述するように、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンは、代謝活性化を用いた場合に変異原性が陽性となり、かつ、代謝物が腎毒性物質であることから、本被験物質による腎臓腫瘍は、代謝物の近位尿細管への遺伝子傷害作用と腎臓毒性作用によって引き起こされる可能性が考えられた。

＜包皮腺腫瘍＞

雄に包皮腺の腺腫の発生増加がみられた。包皮腺腺腫は良性腫瘍に分類される腫瘍であり、また、その発生もヒストリカルコントロールデータをわずかに超えただけであった。従って、包皮腺腫瘍の発生増加は、雄ラットに対するがん原性を示唆する証拠と考えた。

Ⅳ－3　非腫瘍性病変

雌雄とも腎臓に影響がみられた。

慢性腎症の発生は、雌雄とも対照群にも多くみられたが、雄の投与群でその程度が増強し、雌の投与群で発生数が増加した。また、13 週間試験に発生はなかったことから加齢性病変が被験物質の投与によって増強されたものと考えられた。慢性腎症の程度は、雌に比べて雄の方が強く、その発生数も多かった。また、投与群の雌雄で血漿尿素窒素の増加と腎重量の増加もみられ、これらの変化は慢性腎症の増強と腫瘍性病変の発生が要因となったと考えられた。

その他、雌雄とも近位尿細管の好酸滴の発生が 750 ppm から、雄では乳頭の鉱質沈着と腎盂上皮の過形成の発生が 750 ppm からみられた。

Ⅳ－4　量－反応関係

腫瘍の発生増加は腎臓と包皮腺にみられた。これらの腫瘍の発生増加が認められた濃度は、腎臓腫瘍が雌雄とも 1500 ppm 以上、包皮腺腫瘍が雄の 3000 ppm であった。また、腎臓腫瘍の前腫瘍性病変である異型尿細管過形成は、雌雄とも最低濃度の 750 ppm からみられた。

腫瘍以外の影響は雌雄とも腎臓にみられた。腎臓への影響（雄で慢性腎症、近位尿細管の好酸滴、腎乳頭の鉱質沈着及び腎盂上皮の過形成、雌では慢性腎症と近位尿細管の好酸滴）がみられた濃度は、雌雄とも最低濃度の 750 ppm であった。

Ⅳ－5　他文献との比較等

①　がん原性試験

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンのラットを用いたがん原性試験の報告はない。

日本バイオアッセイ研究センターで、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの異性体である 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのラットを用いたがん原性試験（文献 9）を、本試験と同様の方法で実施した。その結果、雄ラットの肝臓に肝細胞腺腫（発生率：2000 ppm 群 12%）及び肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた（発生率：2000 ppm 群 16%）発生の増加、並びに耳道腺腺腫（発生率：2000 ppm 群 8%）の発生増加が認められ、雄ラットに対するがん原性を示す証拠であると結論づけられた。また、雄ラットに腎臓腫瘍（発生率：腎細胞腺腫 2000 ppm 群 4%、腎細胞癌 320 ppm 群と 2000 ppm 群でそれぞれ 2%）も増加し、雄ラットの発育期に肝臓で生産され、腎臓の近位尿細管に蓄積する α_{2u}-グロブリンによる腎症が腫瘍発生要因として考えられた。芳香族及び脂肪族塩化炭化水素等の非遺伝子毒性物質による α_{2u}-グロブリン腎症を介した発がん機序の仮説が提唱されている（文献 10）。しかし、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは遺伝子毒性物質であり、また、腎臓 β-リアーゼによるグルタチオン代謝物が腎毒性物質として作用する可能性があることから、α_{2u}-グロブリン腎症以外の遺伝子毒性を有する腎毒性物質が腎臓腫瘍の発生機序として関与していることも考

えられる。本試験で、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの異性体である 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの投与によって、雌雄とも腎細胞癌と腎細胞腺腫の発生増加が認められたことは、本被験物質を含めた塩化ニトロベンゼンの発がん機序を考える上で、重要な知見である。

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、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの変異原性は、代謝活性化を用いる場合にのみ陽性の結果を示した。微生物を用いる変異原性試験では、ネズミチフス菌 TA98 及び TA100 菌株において、ともにラット肝 S9 mix を添加した場合にのみ、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた（mg 当りの比活性値の最大値；TA98：141、TA100：4810）。また、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では、チャイニーズハムスター株細胞（CHL/IU）を用い、ラット肝 S9 mix を添加した場合にのみ、染色体異常の誘発率が陽性の判定基準である 10%以上を示した（D_{20} 値：0.076mg/mL）。2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンはラット肝 S9 mix による代謝活性化により変異原性能を獲得すると考えられる。なお、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの異性体である 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンも当センターで変異原性試験が実施されているので（文献 11）、その結果を比較した。2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの変異原性は、代謝活性化を用いる場合にのみ陽性の結果を示したが、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンでは代謝活性化を用いない場合でも変異原性を示した[微生物を用いる変異原性試験の TA100(-S9)で陽性]。微生物を用いる変異原性試験の最大比変異原活性値（revertants/mg）は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンで 3480 [TA100 -S9]、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンで 4810 [TA100 +S9]であり、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの方が若干強い変異原性を示した。染色体異常試験の D_{20} 値（mg/mL）は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンで 0.35 [+S9]、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンで 0.076 [+S9]であり、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの方がより強い変異原性を示した。

③ 代謝

本試験では、黄色尿が全ての投与群に投与期間を通して観察された。ジクロロニトロベンゼン系化合物は、肝臓でグルタチオンを経由したメルカプツール酸に代謝されることが知られている（文献 12）。2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンをラットに強制経口投与し、代謝ケージで集めた尿をカラムで分取して、^{1}H-NMR の NOE 法と LC-MS/MS 法によって同定した結果、黄色尿は 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンが代謝され、紫外吸収の長波長へのシフト（黄色）を示す代謝物 *N*-アセチル-*S*-(5-クロロ-2-ニトロフェニル)-*L*-システインに起因することを確認した（当センター内部資料）。1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与でも、ラットで黄色を呈した尿が観察され、上記と同様の方法で同定した結果、黄色尿は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンが代謝された、*N*-アセチル-*S*-(4-クロロ-3-ニトロフェニ

ル)-*L*-システインに起因することが報告されている（文献 13)。

V　結論

F344/DuCrj ラットを用いて 2,4-ジクロロ-1-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、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、雄では包皮腺の腺腫の発生増加もみられた。

VI　文献

1. 化学工業日報社．2004．14504 の化学商品．東京：化学工業日報社，901.

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)．1999．2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼン，赤外吸収スペクトル.

4. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies", Paris：Organisation for Economic Co-operation and Development.

5. 日本バイオアッセイ研究センター．2003．2,4-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 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.

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. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance test 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.

8. 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.

9. 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.

10. Swenberg JA, Lehman-McKeeman LD. 1999. α_2-Urinary globulin-associated nephropathy as a mechanism of renal tubule cell carcinogenesis in male rats. In：Species Differences in Thyroid, Kidney and Urinary Bladder Carcinogenesis (Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds). Lyon：IARC. IARC Scientific Publication 147：95-118.

11. 労働省　労働基準局　安全衛生部　化学物質調査課．1996．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.

12. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 240：7130-7139.

13. Ohnishi M, Yamazaki K, Yamamoto S, Matsushima T. 2004. Characterization of *N*-acetylcysteine conjugate in yellow urine by oral administration of 1,4-dichloro-2-nitrobenzene in rats. J Health Sci 50：319-322.