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

試験番号：０４０９

CAS　Ｎｏ．６１１－０６－３

2003年3月31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13週間毒性試験（混餌試験）

試験目的

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの経口投与によるがん原性試験の投与濃度決定のため、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンをラットに13週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン408（亜慢性経口毒性－げっ歯類：90日間試験　1981年5月12日採択）に準拠して実施した。

GLP対応

試験は、昭和63年9月1日付け、労働省告示第76号の「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

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

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

試験番号：０４０９

本　　文

本 文 目 次

頁

要約 …… 1

Ⅰ 試験材料 …… 2

Ⅰ－1 被験物質の性状等 …… 2
Ⅰ－1－1 名称等 …… 2
Ⅰ－1－2 構造式、示性式、分子量 …… 2
Ⅰ－1－3 物理化学的性状等 …… 2

Ⅰ－2 被験物質の使用ロット等 …… 2

Ⅰ－3 被験物質の特性・同一性、安定性 …… 3
Ⅰ－3－1 特性・同一性 …… 3
Ⅰ－3－2 安定性 …… 3

Ⅰ－4 試験動物 …… 3

Ⅱ 試験方法 …… 4

Ⅱ－1 投与 …… 4
Ⅱ－1－1 投与経路 …… 4
Ⅱ－1－2 被験物質の投与方法 …… 4
Ⅱ－1－3 投与期間 …… 4
Ⅱ－1－4 投与濃度 …… 4
Ⅱ－1－5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由 …… 4
Ⅱ－1－6 被験物質混合飼料の調製方法 …… 5
Ⅱ－1－7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性 …… 5
Ⅱ－1－8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性 …… 5
Ⅱ－1－9 被験物質の摂取量 …… 6

Ⅱ－2 動物管理 …… 6
Ⅱ－2－1 各群の使用動物数 …… 6
Ⅱ－2－2 群分け及び個体識別方法 …… 6
Ⅱ－2－3 飼育条件 …… 7

Ⅱ－3　観察・検査項目及び方法 …… 7
Ⅱ－3－1　動物の一般状態の観察 …… 7
Ⅱ－3－2　体重測定 …… 7
Ⅱ－3－3　摂餌量測定 …… 8
Ⅱ－3－4　血液学的検査 …… 8
Ⅱ－3－5　血液生化学的検査 …… 8
Ⅱ－3－6　尿検査 …… 8
Ⅱ－3－7　病理学的検査 …… 9
(1) 剖検 …… 9
(2) 臓器重量 …… 9
(3) 病理組織学的検査 …… 9

Ⅱ－4　数値処理と統計学的方法 …… 9
Ⅱ－4－1　数値の取扱いと表示 …… 9
Ⅱ－4－2　母数の取扱い …… 10
Ⅱ－4－3　統計方法 …… 10

Ⅲ　試験成績 …… 11

Ⅲ－1　生死状況 …… 11
Ⅲ－2　一般状態 …… 11
Ⅲ－3　体重 …… 11
Ⅲ－4　摂餌量 …… 11
Ⅲ－5　被験物質摂取量 …… 12
Ⅲ－6　血液学的検査 …… 12
Ⅲ－7　血液生化学的検査 …… 13
Ⅲ－8　尿検査 …… 13
Ⅲ－9　病理学的検査 …… 13
Ⅲ－9－1　剖検 …… 13
Ⅲ－9－2　臓器重量 …… 13
Ⅲ－9－3　病理組織学的検査 …… 14

Ⅳ　考察及びまとめ …… 15

Ⅴ　文献 …… 19

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）ラットを用いて経口投与による 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 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンを各投与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 500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、3000 ppm 及び 4000 ppm 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。

4000 ppm 群では、雌雄ともに摂餌量の低下傾向と体重増加の抑制がみられたが、最高用量を含む全投与群に死亡はみられなかった。被験物質投与の影響は、肝臓（雄：中心性の肝細胞の肥大、雌雄：肝臓重量の増加と血液生化学的パラメータの変化）、腎臓（雄：好酸体と好塩基性変化の発生増加、雌：近位尿細管に好酸滴の発生、雌雄：腎臓重量の増加）及び血液系／脾臓（雌雄：血液学的パラメータの変化、脾臓の赤血球充満とヘモジデリン沈着の程度の増強、脾臓重量（体重比）の増加）に認められた。

3000 ppm 群では、雌雄ともに肝臓、腎臓及び血液系／脾臓への影響がみられた。しかし、摂餌量と体重への影響はより軽度であった。

肝臓（雌雄：肝臓重量の増加、雌：血漿の総コレステロールとリン脂質の増加）と腎臓（雌雄：腎臓重量の増加、雄：好酸体の程度の増加、好塩基性変化、雌：近位尿細管への好酸滴の出現）への影響は、本試験の最低用量である 500 ppm でも認められた。また、血液系／脾臓への影響は、雄では 1000 ppm まで、雌では 2000 ppm まで認められた。従って、最小毒性量（LOAEL）は、肝臓と腎臓への影響をエンドポイントとして、500 ppm（雄：0.024～0.041 g/kg/day、雌：0.030～0.044 g/kg/day）であると考えられた。

また、雌雄ともに、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの代謝物と考えられる、4-（*N*-アセチルシスチニル）-2-クロロ-1-ニトロベンゼンに起因する黄色尿が、1000 ppm 以上の群で観察された。

以上の結果を考慮し、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンのがん原性試験投与濃度は、雌雄ともに 3000 ppm を最大耐量と考え、以下、1500 ppm、750 ppm（公比 2）に設定した。

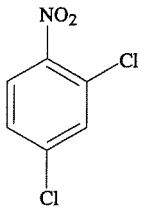
Ⅰ　試験材料

Ⅰ－1　被験物質の性状等

Ⅰ－1－1　名称等

名　　称　：　2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼン（2,4-Dichloro-1-nitrobenzene）
別　　名　：　2,4-ジクロロニトロベンゼン　（2,4-Dichloronitrobenzene）
　　1,5-ジクロロ-2-ニトロベンゼン（1,5-Dichloro-2-nitrobenzene）
IUPAC 名　：　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、分子量（文献 1）



$C_6H_3Cl_2NO_2$

分　子　量　：192.00

Ⅰ－1－3　物理化学的性状等（文献 1）

性　　状：　黄色結晶
比　　重：　1.439（80℃）
融　　点：　33℃
沸　　点：　258.5℃
溶　解　性：　水に難溶
保　存　条　件：　室温で暗所に保存

Ⅰ－2　被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：　CKK5596
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

被験物質の同一性の確認は、使用した 2,4-ジクロロ-1-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、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの文献値と比較することにより行った。なお、使用した被験物質の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、不純物を同定した。

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、赤外吸収スペクトルも文献値（文献 3）と同じ波長にピークが認められ、本被験物質は 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンであることを確認した。なお、ガスクロマトグラムを測定したところ、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンとは異なる 2 つの不純物ピークを認めた。それぞれの不純物は、1,5-ジクロロ-2,3-ジニトロベンゼン（0.03%）と 1,2-ジクロロ-4,5-ジニトロベンゼン（0.05%）であった。

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 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンについて、投与開始前及び投与終了後に、ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 6890）により、ガス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 2,4-ジクロロ-1-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、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー（株）（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795 番地）より購入した F344/DuCrj（Fischer）ラット（SPF）の雌雄を使用した。なお、がん原性試験で使用する動物は、遺伝的に安定していること、腫瘍の自然発生率が低いこと、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていること等の理由から F344/DuCrj(Fischer)ラットを使用することが決定している。

ラット雌雄各 83 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：113～125g、雌：91～101g）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

2000 年 4 月 5 日から 2000 年 7 月 5 日または 7 月 6 日までの 13 週間（92～93 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

500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、3000 ppm 及び 4000 ppm の 5 段階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 2 週間の予備試験（文献 5）の結果をもとに決定した。すなわち、2 週間の予備試験では、6 週齢の F344/DuCrj（Fischer）ラット（SPF）の雌雄（各群 5 匹）に、625 ppm、1250 ppm、2500 ppm、5000 ppm 及び 10000 ppm（公比 2）の濃度の混餌飼料を 2 週間自由摂取させた。その結果、10000 ppm 群では雌雄ともに著しい摂餌量の低下と体重の持続的な減少がみられた。また、血液系／脾臓、肝臓、腎臓、鼻腔、小脳等への影響がみられ、この濃度の 13 週間投与は、死亡を含む重篤な影響をもたらす可能性があると判断した。5000 ppm 群でも雌雄ともに体重増加の抑制（対照群に対して、雄：77%、雌：90%）が認められた。また、雌雄とも骨髄の造血低下や肝臓の中心性の変性、雌では腎臓の近位尿細管の壊死と好塩基性変化がみられ、13 週間試験はこの濃度でも高すぎると推察さ

れた。2500 ppm 以下の群では雌雄とも体重増加の抑制は少なく、臓器重量で腎臓と肝臓の高値がみられたものの、病理組織学的検査ではそれにともなう所見はほとんどみられなかった。従って、ラットにおける 13 週間試験の最高用量は雌雄ともに 5000 ppm よりやや低い 4000 ppm と判断し、以下 2000 ppm、1000 ppm 及び 500 ppm の 4 段階（公比 2）の濃度を設定し、さらにがん原性試験における最大耐量をより細かく検討するために、4000 ppm と 2000 ppm の間に 3000 ppm を加えた合計 5 段階（4000 ppm、3000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm）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 型）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、融解させ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各設定濃度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試験期間中 4 回に分けて（3 週分または 4 週分／回）行い、保管分はビニール袋詰にして密封し、使用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、ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 6890）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、95.4～101%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, L 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、本試験の予備試験（文献 5）において、200 ppm と 10000 ppm の被験物質混合飼料をラット用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管（9 日間）したものと、ビニール袋詰にして密封し、冷蔵保管（15 日間及び 4 週間）したものについて、ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 6890）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（9 日間）では、200 ppm：87.6%、10000 ppm：88.2%、15 日間の冷蔵保管では、200 ppm：104%、10000 ppm：91.0%、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飼

料中の被験物質の安定性は良好に維持されていることを確認した。

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（餌こぼし量で補正）及び設定濃度より被験物質の体重kg当りの1日摂取量（g/kg body weight/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）
500 ppm群	10匹　（1101～1110）	500 ppm群	10匹　（2101～2110）
1000 ppm群	10匹　（1201～1210）	1000 ppm群	10匹　（2201～2210）
2000 ppm群	10匹　（1301～1310）	2000 ppm群	10匹　（2301～2310）
3000 ppm群	10匹　（1401～1410）	3000 ppm群	10匹　（2401～2410）
4000 ppm群	10匹　（1501～1510）	4000 ppm群	10匹　（2501～2510）

Ⅱ－2－2　群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、発育順調で、異常を認めない動物を体重の重い順より各群に1匹づつ割り当て、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-2空調エリア）内の独立した室（雌雄とも208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±2℃（実測値（平均±標準偏差）：23.0±0.4℃）、設定湿度55±15%（実測値（平均±標準偏差）：56.6±3.6%）、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、動物の状態に影響を与えるような大きな環境変化は認められなかった。

動物は単飼ケージ（ステンレス製二連網ケージ、W170×D294×H176mm）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。馴化期間及び投与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。ただし、定期解剖日前日の夕方からは絶食させた。

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、飲料水については（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比較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回行い、一般状態の詳細な観察を毎週1回（投与開始直前及び各週7日目）実施した。

Ⅱ－3－2　体重測定

全動物について、毎週1回（投与開始直前及び各週7日目）体重を測定した。

Ⅱ－3－3　摂餌量測定

全動物について、毎週 1 回、給餌量、残餌量及び餌こぼし量を測定し、その値から摂餌量を算出した。なお、2 週目及び 3 週目に全ての動物で餌こぼしは認められなかったため、4 週目からは餌こぼし量の測定は実施しなかった。

Ⅱ－3－4　血液学的検査

定期解剖時に採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管、ヘパリンリチウム入り採血管（下記※印検査項目）及びクエン酸ナトリウム入り採血管（下記＊印検査項目）に採血し、検査を行った。

なお、検査対象動物は解剖日前日より（18 時間以上）絶食させた。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、※メトヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、血小板数、網赤血球比、＊プロトロンビン時間、＊活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、白血球数、白血球分類

検査方法は APPENDIX M 1 に示した。

Ⅱ－3－5　血液生化学的検査

定期解剖時に採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿を用いて検査を行った。

なお、検査対象動物は解剖日前日より（18 時間以上）絶食させた。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、GOT、GPT、LDH、ALP、γ-GTP、CPK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

検査方法は APPENDIX M 1 に示した。

Ⅱ－3－6　尿検査

投与最終週に全動物について新鮮尿を採取し、検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

検査方法は APPENDIX M 1 に示した。

Ⅱ－3－7　病理学的検査

（1）剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

（2）臓器重量

全動物について、以下に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、湿重量の体重比（臓器重量体重比）、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

（3）病理組織学的検査

全動物の臓器を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、以下に示した臓器を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、リンパ節、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、腟、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

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、残餌量及び餌こぼし量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量から残餌量及び餌こぼし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 当たりの 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/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、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、欠測となったデータに付いては母数より除いた。

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、欠測となったデータ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に行い、検査ができた動物数を母数とした。

剖検データは、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。

病理組織学的検査データは、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

本試験で得られた測定値は原則として、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、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。検定は所見のみられなかった動物をグレード 0 として分類し各グレード毎の動物の度数分布により行った。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。

各検定は 5%の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5%及び 1%の有意水準の表示を行った。

Ⅲ　試験成績

Ⅲ－1　生死状況

生死状況を TABLE 1, 2 に示した。
雌雄とも全ての群に、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。
雌雄ともに、1000 ppm 以上の群で黄色尿が全動物に投与期間を通してみられた。雄では、3000 ppm 以上の群に被毛の着色が全匹にみられた。雌では、1000 ppm 以上の群に被毛の着色（1000 ppm 群：3 匹、2000 ppm 群：8 匹、3000 ppm 群：9 匹、4000 ppm 群：10 匹）がみられた。

Ⅲ－3　体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 1, 2、APPENDIX B 1, 2 に示した。
雄では、3000 ppm 以上の群で全投与期間にわたり、対照群と比較して有意な体重の低値が認められた。2000 ppm 群では 2、4、7、12 及び 13 週目に低値が認められた。1000 ppm 以下の群では、ほぼ対照群と同様の推移を示した。なお、最終計測日（13 週 7 日）の体重は、対照群と比較して、4000 ppm 群：82%、3000 ppm 群：92%、2000 ppm 群：95%、1000 ppm 群：96%、500 ppm 群：97%であった。
雌では、3000 ppm 以上の群で全投与期間にわたり、対照群と比較して有意な体重の低値が認められた。2000 ppm 群では 4～10 週目に低値が認められた。1000 ppm 以下の群では、ほぼ対照群と同様の推移を示した。なお、最終計測日（13 週 7 日）の体重は、対照群と比較して、4000 ppm 群：91%、3000 ppm 群：91%、2000 ppm 群：94%、1000 ppm 群：96%、500 ppm 群：99%であった。

Ⅲ－4　摂餌量

摂餌量を TABLE 3, 4、FIGURE 3, 4、APPENDIX C 1, 2 に示した。
雄では、4000 ppm 群で 1、2 及び 10 週目に対照群と比較して、有意な摂餌量の低値がみられ、2000 ppm と 3000 ppm 群では 1 週目に低値がみられた。1000 ppm 以下の群では、有意な差はみられなかった。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、4000 ppm 群：83～97%、3000 ppm 群：90～99%、2000 ppm 群：92～98%、1000 ppm

群：96～101%、500 ppm 群：92～99%の範囲にあった。

雌では、4000 ppm 群で 1、3、4、5 及び 8 週目に対照群と比較して、有意な摂餌量の低値が、3000 ppm 群では 1、2、3、4 及び 8 週目に低値が、2000 ppm 群では 1、3 及び 5 週目に低値がみられた。1000 ppm 以下の群では、有意な差はみられなかった。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、4000 ppm 群：81～96%、3000 ppm 群：84～97%、2000 ppm 群：89～101%、1000 ppm 群：94～101%、500 ppm 群：98～103%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、全投与群でほぼ投与濃度に対応した、被験物質摂取量を示した。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/day）は、雄では、4000 ppm 群：0.213～0.331、3000 ppm 群：0.151～0.248、2000 ppm 群：0.095～0.159、1000 ppm 群：0.049～0.081、500 ppm 群：0.024～0.041、雌では、4000 ppm 群：0.236～0.328、3000 ppm 群：0.179～0.236、2000 ppm 群：0.122～0.166、1000 ppm 群：0.059～0.086、500 ppm 群：0.030～0.044 の範囲にあった。

Ⅲ－6　血液学的検査

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

雄では、4000 ppm 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCH 及び MCHC の減少、並びに血小板数の増加と網赤血球比の増加傾向が認められた。赤血球数と MCHC の減少は 3000 ppm 群まで、ヘマトクリット値の減少、並びに血小板数と網赤血球比の増加は 2000 ppm 群まで、ヘモグロビン濃度と MCH の減少は 1000 ppm 群まで認められた。その他、MCV の減少が 1000 ppm 群と 2000 ppm 群でみられた。

雌では、4000 ppm 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCH 及び MCHC の減少、並びに血小板数、網赤血球比及びメトヘモグロビン濃度の増加が認められた。赤血球数とヘマトクリット値の減少、並びに網赤血球比の増加は 3000 ppm 群まで、ヘモグロビン濃度の減少と血小板数の増加は 2000 ppm 群まで認められた。その他、MCH の減少が 2000 ppm 群でもみられた。

Ⅲ－7　血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果をTABLE 7, 8、APPENDIX F 1, 2に示した。

雄では、4000 ppm群で総蛋白、アルブミン及びカリウムの増加、並びに総コレステロールの減少、GPTとALPの低下が認められた。GPTの低下は3000 ppm群まで、総蛋白とアルブミンの増加、並びにALPの低下は500 ppm群まで認められた。また、総コレステロールが500 ppm、1000 ppm及び2000 ppm群で増加、リン脂質が1000 ppm群と2000 ppm群で増加した。その他、GOTが3000 ppm群で低下、クロールが2000 ppm群と3000 ppm群で減少、カルシウムが1000 ppm、2000 ppm及び3000 ppm群で増加した。

雌では、4000 ppm群で総蛋白、アルブミン、総コレステロール及びリン脂質の増加、並びにクロールの減少、GOTとALPの低下が認められた。GOTの低下は3000 ppm群まで、ALPの低下は2000 ppm群まで、総コレステロールとリン脂質の増加は500 ppm群まで認められた。その他、トリグリセライドが2000 ppm群と4000 ppm群で増加、グルコースが3000 ppm群で増加した。

Ⅲ－8　尿検査

尿検査の結果をTABLE 9、APPENDIX G 1, 2に示した。

雄では、4000 ppm群でpHの低下が認められた。その他、ケトン体の陽性例の減少が3000 ppm群でみられた。

雌では対照群と比べ、変化は認められなかった。

Ⅲ－9　病理学的検査

Ⅲ－9－1　剖検

解剖時に観察された剖検所見をAPPENDIX H 1, 2に示した。

雌雄とも、対照群と投与群に肝臓のヘルニアがみられたが、被験物質投与による影響は認められなかった。

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 10, 11（実重量、体重比）、APPENDIX I 1, 2（実重量）、APPENDIX J 1, 2（体重比）に示した。

＜雄＞

4000 ppm群では、肝臓の実重量と体重比、腎臓と脾臓の体重比の高値が認められた。

肝臓の実重量と体重比の高値は500 ppm群まで、腎臓の体重比の高値は、500 ppm群まで認められ、1000 ppm、2000 ppm及び3000 ppm群では、実重量の高値もみられた。脾臓の体重比の高値は2000 ppm群まで認められた。その他、解剖時体重の差に伴う、実重量や体重比の統計学的な有意差が、胸腺、精巣、心臓、肺及び脳に示された。

＜雌＞

4000 ppm群では、肝臓と腎臓の実重量と体重比、脾臓の体重比の高値が認められた。

肝臓の実重量と体重比の高値は500 ppm群まで、腎臓の実重量の高値は500 ppm群、体重比は1000 ppm群まで、脾臓の体重比の高値は2000 ppm群まで認められた。その他、解剖時体重の差に伴う、実重量や体重比の統計学的な有意差が、胸腺と脳に示された。

Ⅲ－9－3　病理組織学的検査

定期解剖動物の病理組織学的検査の結果をTABLE 12, 13、APPENDIX K 1, 2に示した。

雄の肝臓、腎臓、脾臓及び心臓、雌の腎臓と脾臓に被験物質投与による影響が観察された。

＜雄＞

4000 ppm群では、肝臓の中心性の肝細胞の肥大が1匹（軽度）でみられた。腎臓では、好酸体（重度10匹）と好塩基性変化（軽度4匹、中等度4匹）の発生が対照群（好酸体：軽度2匹と中等度8匹、好塩基性変化：軽度2匹）に比較して増加した。脾臓には赤血球充満（軽度10匹）がみられ、ヘモジデリン沈着の程度（中等度10匹）も対照群（軽度10匹）に比較して増強した。心臓には空胞変性（軽度4匹、中等度1匹）がみられた。

3000 ppm群と2000 ppm群では、腎臓の好酸体（両群とも重度10匹）と好塩基性変化（両群とも中等度10匹）の発生増加が認められた。脾臓には赤血球充満（両群とも軽度10匹）がみられ、ヘモジデリン沈着の程度（両群とも中等度10匹）も増加した。

1000 ppm群と500 ppm群でも、腎臓の好酸体（500 ppm群：中等度1匹と重度9匹、1000 ppm群：重度10匹）と好塩基性変化（500 ppm群：軽度9匹、1000 ppm群：軽度3匹と中等度7匹）の発生増加が認められた。

＜雌＞

4000 ppm、3000 ppm及び2000 ppm群とも、腎臓の近位尿細管に好酸滴の発生がみられた（各群とも中等度10匹）。また、脾臓には赤血球充満（2000 ppm群：軽度6匹、3000 ppm群と4000 ppm群：軽度10匹）がみられ、ヘモジデリン沈着の程度（各群とも重度10匹）も対照群（中等度10匹）に比較して増加した。

1000 ppm群と500 ppm群でも、腎臓の近位尿細管に好酸滴の発生（500 ppm群：軽度10匹、1000 ppm群：中等度10匹）がみられた。

Ⅳ　考察及びまとめ

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）ラットを用いて経口投与による 2 年間（104 週間）のがん原性試験を実施するに当たり、その投与濃度を検索するために 13 週間試験を実施した。投与は 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンを各投与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 500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、3000 ppm 及び 4000 ppm とした。

(1)　用量－反応関係

4000 ppm 群では、雌雄ともに、摂餌量の低下傾向が投与期間の多くの週でみられ、体重増加の抑制も投与期間を通して認められたが、最高用量を含む全投与群に死亡はみられなかった。肝臓への影響として、雄では中心性の肝細胞の肥大が 1 匹みられ、雌雄ともに肝臓重量（実重量、体重比）の高値がみられた。これらは、肝臓の機能亢進を示す変化と推察された。また、雌雄とも総蛋白とアルブミンの増加、雌で総コレステロールとリン脂質が増加した。しかし、雄では総コレステロールは逆に減少しており、摂餌量の低下に伴う体重増加の抑制に関係する変化と推察された。腎臓への影響として、雄では好酸体と好塩基性変化の発生が増加し、雌では近位尿細管に好酸滴の発生がみられた。また、腎臓重量（雄：体重比、雌：実重量と体重比）の高値がみられた。好塩基性変化は近位尿細管上皮の壊死に対する再生過程でみられ、増殖性反応を示す病理組織所見である。2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンを２週間混餌投与した雄ラットに、近位尿細管の壊死が認められることから（文献 5）、近位尿細管上皮に直接傷害を与え、その結果として好塩基性変化が増加した可能性がある。一方、好塩基性変化の増加がみられた群では、好酸体の程度の増強も認められた。好酸体はα2 マイクログロブリンの近位尿細管上皮内への蓄積を示す変化であり、この過剰は重度な近位尿細管上皮に傷害を与えることが知られている（文献 7）。好塩基性変化の増強は、これらのいずれかの原因、或いは両者に起因して起きた再生過程でみられる増殖性反応を示す変化と考えられる。血液系／脾臓への影響として、雌雄とも赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCH、MCHC の減少、並びに血小板数と網赤血球比の増加、雌ではメトヘモグロビン濃度の僅かな増加がみられ、貧血傾向が示されたが、ごく軽度の変化であった。脾臓では、雌雄とも赤血球充満とヘモジデリン沈着の程度の増強がみられ、脾臓での赤血球崩壊を示す変化と思われた。また、脾臓重量で体重比の高値もみられた。心臓への影響として、雄では空胞変性が 5 匹でみられた。

3000 ppm 群では、雌雄とも軽度の体重増加の抑制が認められた。肝臓への影響として、雌雄とも肝臓重量の高値、雄では総蛋白とアルブミンの増加、雌では総コレステロールとリン脂質の増加がみられた。腎臓への影響として、雄では好酸体と好塩基性変化の発生が増加し、雌では近位尿細管に好酸滴の発生がみられた。また、雌雄とも腎臓重量の高値がみられ

た。血液系／脾臓への影響として、雌雄とも赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少、並びに血小板数と網赤血球比の増加、雄ではMCHとMCHCの減少がみられた。脾臓では、雌雄とも赤血球充満とヘモジデリン沈着の程度の増強、脾臓重量で体重比の高値がみられた。

2000 ppm 群では、雌雄ともごく軽度の体重増加の抑制がみられた。肝臓への影響として、雌雄とも肝臓重量の高値、総コレステロールとリン脂質の増加、雄では総蛋白とアルブミンの増加がみられた。腎臓への影響として、雄では好酸体と好塩基性変化の発生が増加し、雌では近位尿細管に好酸滴の発生がみられた。また、雌雄とも腎臓重量の高値がみられた。血液系／脾臓への影響として、雌雄ともヘモグロビン濃度とMCHの減少、血小板数の増加、雄ではヘマトクリット値の減少と網赤血球比の増加がみられた。脾臓では、雌雄とも赤血球充満とヘモジデリン沈着の程度の増強、脾臓重量で体重比の高値がみられた。

1000 ppm 群では、肝臓への影響として、雌雄とも肝臓重量の高値、総コレステロールとリン脂質の増加、雄で総蛋白とアルブミンの増加がみられた。腎臓への影響として、雄では好酸体と好塩基性変化の発生が増加し、雌では近位尿細管に好酸滴の発生がみられた。また、雌雄とも腎臓重量の高値がみられた。血液系への影響として、雄ではヘモグロビン濃度とMCHの減少がみられた。

500 ppm 群では、肝臓への影響として、雌雄とも肝臓重量の高値、総コレステロールの増加、雄で総蛋白とアルブミンの増加、雌でリン脂質の増加がみられた。腎臓への影響として、雄では好酸体と好塩基性変化の発生が増加し、雌では近位尿細管に好酸滴の発生がみられた。また、腎臓重量の体重比（雄）と実重量（雌）の高値がみられた。

その他、雌雄ともに、一般状態では、被験物質の代謝物と考えられる、4-（*N*-アセチルシスチニル）-2-クロロ-1-ニトロベンゼンに起因する黄色尿（雌雄：1000 ppm 以上の群）及びそれに伴う被毛の着色（雄：3000 ppm 以上の群、雌：1000 ppm 以上の群）が、観察された。

以上のように、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの投与によって、高用量では雌雄ともに摂餌量が低下し、体重増加の抑制が雌雄とも 2000 ppm まで認められた。また、肝臓、腎臓及び血液系／脾臓への影響が雌雄ともに認められ、雄では心臓への影響もみられた。本試験でこれらの毒性影響がみられた最低用量は、雄では、1）肝臓への影響は、肝臓重量の増加が認められた 500 ppm、2）腎臓への影響は、好酸体の程度の増加、好塩基性変化及び腎臓重量（体重比）の増加が認められた 500 ppm、3）血液系への影響は、ヘモグロビン濃度の減少が認められた 1000 ppm、4）心臓への影響は、空胞変性のみられた 4000 ppm であった。

雌では、1）肝臓への影響は、肝臓重量の増加、血漿の総コレステロールとリン脂質の増加が認められた 500 ppm、2）腎臓への影響は、近位尿細管への好酸滴の出現、腎臓重量の増加が認められた 500 ppm、3）血液系／脾臓への影響は、ヘモグロビン濃度の低下、脾臓

でのヘモジデリン沈着の程度の増加と赤血球充満、脾臓重量（体重比）の増加が認められた2000 ppm であった。

(2)　無毒性量（NOAEL）／最小毒性量（LOAEL）

上記の結果より、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの 13 週間混餌投与による最小毒性量は、肝臓と腎臓への影響をエンドポイントとして、500 ppm（雄：0.024～0.041 g/kg/day、雌：0.030～0.044 g/kg/day）であると考えられた。

(3)　他の文献との比較

① 1000 ppm 以上の群で、雌雄ともに黄色尿が観察された。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 8）。また、本被験物質の同族体である 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン混餌経口投与でも同様に黄色尿が観察された。1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与ラットの尿をカラムで分取し、LC-MS/MS 法と ^{1}H-NMR 法によって同定した結果、黄色尿は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンが代謝され、紫外吸収の長波長へのシフト（黄色）を示す代謝物 4-（*N*-アセチルシスチニル）-1-クロロ-2-ニトロベンゼンに変換されることに起因することを確認した（文献 9）。2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンも、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンと同様の代謝を経て、黄色を呈する代謝生成物 4-（*N*-アセチルシスチニル）-2-クロロ-1-ニトロベンゼンとして排泄される結果、尿の黄色化がみられたと考えられる。

② 萩田らの報告（文献 10）によれば、Sprague-Dawley（Crj:CD（SD））ラットを用いた、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験（強制経口投与、投与期間は雄：連続 45 日間、雌：41～46 日間、投与用量：0、8、40、200 mg/kg/day）において、雌の 200 mg/kg 群で体重増加の抑制が、雄の 40 及び 200 mg/kg 群で貧血傾向、総蛋白、アルブミン及びγ-GTP の高値及びクレアチニンの低値、さらに 200 mg/kg 群で総ビリルビン及び A/G の高値、肝臓及び腎臓重量の増加、肝臓または腎臓の肥大が認められた。病理組織学的検査では、雄の 200 mg/kg 群及び雌の 8 mg/kg 以上の投与群で肝臓及び腎臓を中心とした異常所見が認められ、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンにおける標的器官は肝臓及び腎臓と考えられ、無影響量（NOEL）は 8 mg/kg/day 未満であった。

荻田等の報告と本試験を比較すると、経口投与方法（強制経口投与対混餌経口投与）、動物系統差（Sprague-Dawley（Crj:CD（SD））対 F344/DuCrj（Fischer））、投与期間（45 日対 13 週間）および NOEL と LOAEL の相違はあるものの、エンドポイントが主に肝臓と腎臓であること、および NOEL 値（8 mg/kg/day 未満）と LOAEL 値（約 30 mg/kg/day）の値がほぼ一致することが認められた。

③ 本試験では、雌で投与濃度に対応したメトヘモグロビン濃度の増加、血液学的指標値の貧血性変化及び脾臓の赤血球充満とヘモジデリン沈着の増加が認められた。染料等に多用

される芳香族ニトロ化合物に暴露された労働者のメトヘモグロビン血症は、メトヘモグロビン形成と赤血球ハインツ小体を特徴とし、20%以上のメトヘモグロビン濃度で自覚症状が出現し、溶血による貧血をもたらすことが知られている（文献 11）。本試験では赤血球やヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低下がみられ、脾臓ではヘモジデリン沈着の増加が認められることから、赤血球の崩壊が亢進していることが示唆される。しかし、メトヘモグロビン濃度の値は雌 4000 ppm 群でわずか 0.5%であり、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの血液系への影響として、メトヘモグロビン形成による溶血以外の要因も検討する必要があろう。

(4)　がん原性試験の濃度設定

13 週間試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

雄の 4000 ppm 群では、体重増加の抑制（18%）と摂餌量の低下が認められた。被験物質投与による影響として、肝臓、腎臓及び血液系／脾臓への影響が認められた。3000 ppm 群では、体重増加の抑制（8%）は比較的少なく、肝臓、腎臓及び血液系／脾臓への影響が認められたものの、被験物質の毒性により、動物の寿命に影響を及ぼす程度の変化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考え、以下 1500 ppm、750 ppm の 3 段階（公比 2）の濃度を設定した。

雌の 4000 ppm 群と 3000 ppm 群では、体重増加の抑制（9%）は比較的少なく、摂餌量の低下も僅かであった。被験物質投与の影響として、肝臓、腎臓及び血液系／脾臓への影響が認められたものの、被験物質の毒性により、動物の寿命に影響を及ぼす程度の変化ではないと考えられた。従って、雄との試験結果の比較も考慮し、雄と同様、3000 ppm、1500 ppm 及び 750 ppm の 3 段階（公比 2）の濃度を設定した。

V 文献

1. 化学工業日報社（2002）
   14102 の化学商品
   pp.858 - 859, 化学工業日報社, 東京

2. McLafferty F. W.（1994）
   Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition, Entry Number 74218.
   John Wiley and Sons, Inc., U.S.

3. 和光純薬工業（株）提供資料（1999）
   赤外吸収スペクトル

4. Organization for Economic Co-operation and Development（OECD）（1981）
   Guideline for Testing of Chemicals 408 for "Subchronic Oral Toxicity"
   －Rodent: 90-day Study. Paris, OECD

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２週間毒性試験（混餌試験）報告書（試験番号 0405），日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川

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. Alden C. L. and Frith C. H. (1991)
   Urinary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (eds. by Haschek W. M. and Rousseaux C. G.), pp. 315 - 387, Academic Press, New York.

8. Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B.（1974）
   Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. **249**; 7130 - 7139.

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２週間毒性試験（混餌試験）報告書（試験番号 0298），日本バイオアッセイ研究センター，神奈川

10. 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修（1996）
2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼン
化学物質毒性試験報告、第３巻
pp. 333 - 353, 化学物質点検推進連絡協議会，東京

11. 石津澄子（1994）
芳香族ニトロ・アミノ化合物による中毒
現代労働衛生ハンドブック（増補改定第２版・本編）、三浦豊彦、他編、
pp. 855 – 860, （財）労働科学研究所出版部，神奈川