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

試験番号：０４２２

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

2,4-ジクロロ-1-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」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：０４２２

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 …… 21

Ⅳ　考察及びまとめ …… 22
Ⅳ－1 生存率、一般状態、体重、摂餌量 …… 22
Ⅳ－2 腫瘍性及び腫瘍関連病変 …… 22
Ⅳ－3 非腫瘍性病変 …… 23
Ⅳ－4 量－反応関係 …… 23
Ⅳ－5 他文献との比較等 …… 24

Ⅴ　結論 …… 26

Ⅵ　文献 …… 27

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 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、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、雄は 750、1500 及び 3000 ppm（公比 2）、雌は 1500、3000 及び 6000 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。

生存率は、雄では 1500 ppm 以上の群、雌では 3000 ppm 以上の群で低下した。生存率の低下の原因は、雄では肝臓腫瘍、雌では肝臓腫瘍と腹膜腫瘍による死亡の増加であった。体重は雄の 1500 ppm 以上の群と雌の全投与群で投与濃度に対応した増加の抑制を示し、体重増加の抑制が始まった時期も投与濃度に対応して早まっていた。摂餌量は、雄の 3000 ppm 群と雌の 6000 ppm 群で投与初期から中期にかけて摂餌量の低値がみられた。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。

腫瘍の発生増加は雌雄とも肝臓（肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫）と腹膜（血管肉腫）にみられた。これらの腫瘍の転移は、肝芽腫と肝細胞癌が肺などに、血管肉腫が子宮、膀胱などに認められた。 発生増加が認められた濃度は、肝臓腫瘍が最低濃度である雄 750 ppm、雌 1500 ppm から、腹膜腫瘍が雄 3000 ppm、雌 1500 ppm からみられた。また、肝臓の前腫瘍性病変とされている好酸性小増殖巣が、雌の 3000 ppm 以上の群からみられた。

腫瘍以外の影響は、雌雄とも肝臓（肝細胞の小葉中心性肥大）と上部気道（鼻腔：雌雄の色素沈着、腺と嗅上皮の呼吸上皮化生、雌の呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化、鼻咽頭：雌雄のエオジン好性変化）にみられた。肝臓への影響は雄では 750 ppm から、雌は 6000 ppm、上部気道への影響は雄 750 ppm、雌 1500 ppm から認められた。

以上のように、Crj:BDF1 マウスを用いた 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、肝臓腫瘍（肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫）と腹膜腫瘍（血管肉腫）の発生増加が認められ、これらの腫瘍の発生増加は雌雄マウス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。

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（マウス　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	肺	細気管支-肺胞上皮腺種	2	3	7	1		
	肝臓	肝細胞腺腫	18	34 **	30 *	43 **	↑↑	↑↑
		血管腫	3	3	5	1		
	ハーダー腺	腺種	5	2	2	2		
	腹膜	血管腫	0	1	0	0		
悪性腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	7	8	4	4		
	リンパ節	悪性リンパ腫	3	1	3	3		
	肝臓	肝細胞癌	7	7	11	15 *	↑↑	↑
		肝芽腫	1	5	16 **	27 **	↑↑	↑↑
		組織球性肉腫	2	3	3	1		
	膀胱	組織球性肉腫	3	0	1	0		
	精巣上体	組織球性肉腫	0	1	1	4	↑↑	↑
	腹膜	血管肉腫	1	0	2	5	↑↑	↑
	肝臓	肝細胞腺腫＋肝細胞癌＋肝芽腫	19	39 **	41 **	45 **	↑↑	↑↑
	腹膜	血管腫＋血管肉腫	1	1	2	5	↑↑	↑

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（マウス　雌）

	投 与 濃 度 (ppm)		0	1500	3000	6000	Peto 検定	Cochran-Armitage 検定
	検査動物数		49	50	50	50		
良性腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮腺種	0	4	1	1		
	肝臓	肝細胞腺腫	8	25 **	42 **	45 **	↑↑	↑↑
		血管腫	3	2	3	0		
	卵巣	嚢胞腺種	2	4	0	1		
	腹膜	血管腫	0	0	1	0		
悪性腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	2	2	3	2		
	リンパ節	悪性リンパ腫	19	23	11	4 **		↓↓
	脾臓	悪性リンパ腫	0	4	3	1		
	肝臓	肝細胞癌	1	2	11 **	21 **	↑↑	↑↑
		肝芽腫	0	2	7 **	7 **	↑↑	↑↑
		組織球性肉腫	0	0	1	2		
	子宮	組織球性肉腫	13	9	14	6		
	腹膜	血管肉腫	0	3	7 **	17 **	↑↑	↑↑
	肝臓	肝細胞腺腫＋肝細胞癌＋肝芽腫	8	28 **	43 **	48 **	↑↑	↑↑
	腹膜	血管腫＋血管肉腫	0	3	8 **	17 **	↑↑	↑↑

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

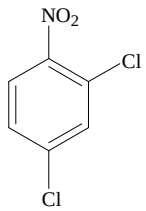
Ⅰ－1　被験物質の性状等

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 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、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：21.6～25.3g、雌：17.7～21.3g）を選別し、試験に供した。

なお、Crj:BDF1 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

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 4 月 18 日～2003 年 4 月 16、17、20、21 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

雄は最高投与濃度を 3000 ppm に設定し、以下、1500 ppm 及び 750 ppm（公比 2）とした。雌は最高投与濃度を 6000 ppm に設定し、以下、3000 ppm 及び 1500 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 Crj:BDF1 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、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、雄は 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。雌は 1000、2000、4000 及び 8000 ppm（公比 2）に 6000 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 88%であり、10%を超える体重増加の抑制がみられた。これに対し、3000 ppm 群では体重増加の抑制（7%）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、剖検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、8000 ppm 群で顕著な体重増加の抑制（26%）と摂餌量の低値が認められた。これに対し、6000 ppm 群では体重増加の抑制（6%）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、剖検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、6000 ppm をがん原性試験の最大耐量と推定し、最高投与濃度を 6000 ppm とし、以下 3000、1500 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 91.7～106%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、マウス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：84.3%、10000 ppm：88.7%、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）	1500 ppm 群	50 匹（2101～2150）
1500 ppm 群	50 匹（1201～1250）	3000 ppm 群	50 匹（2201～2250）
3000 ppm 群	50 匹（1301～1350）	6000 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 : 106 室（2001 年 4 月 4 日～2001 年 12 月 19 日）、雄 : 102 室、雌 : 103 室（2001 年 12 月 19 日～2003 年 4 月 22 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. 106 室 : 23.1±0.2℃、102 室 : 22.8±0.2℃、103 室 : 23.1±0.3℃）、湿度 55±15%（実測値 平均±S.D. 106 室 : 54±1%、102 室 : 54±1%、103 室 : 53±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 : 112（W）×212（D）×120（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、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、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、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、腟、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、小数点以下第 1 位まで計測し、表示した。

摂餌量については g を単位とし、給餌量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 104 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－

1500 ppm 群と 3000 ppm 群の生存率は、対照群と比較して低下した。

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：38 匹（76%）、1500 ppm 群：29 匹（58%）、3000 ppm 群：23 匹（46%）であった。

－雌－

3000 ppm 群と 6000 ppm 群の生存率は、対照群と比較して低下した。

なお、雌の対照群の 1 匹は、投与 75 週目に一般状態観察中の事故により死亡し、試験対象動物より除外した。このため、雌の対照群の有効動物数は 49 匹となった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：28 匹（57%）、1500 ppm 群：28 匹（56%）、3000 ppm 群：18 匹（36%）、6000 ppm 群：19 匹（38%）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。

－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。また、投与群で内部腫瘤の発生動物数が増加した。

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 群では全投与期間にわたり、体重の低値がみられた。投与 14 週までは対照群と比較して 3～9%の体重増加の抑制であったが、それ以降 11～27%の低値を示した。1500 ppm 群でも投与期間の多くの週で低値がみられ、2～10%の低値を示した。750 ppm 群では対照群とほぼ同様の推移を示した。

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、750 ppm 群：100%、1500 ppm 群：90%、3000 ppm 群：73%であった。

－雌－

6000 ppm 群では投与 1 週目に体重が低下（対照群に対して 22%低値）し、2 週目以降増加に転じたものの、全投与期間にわたり体重の低値がみられた。投与 14 週までは対照群と比較して 4～12%の体重増加の抑制であったが、それ以降 16～40%の低値を示した。3000 ppm では投与 22 週以降に 7～24%の低値を示した。1500 ppm 群では僅かな体重増加の抑制（最大 9%）がみられた。

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、1500 ppm 群：92%、3000 ppm 群：76%、6000 ppm 群：60%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－

3000 ppm 群では投与初期から中期にかけ、多くの週で対照群と比較して 5～13%の摂餌量の低値がみられた。1500 ppm 群と 750 ppm 群では、投与中期に摂餌量の低値が散見された。

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：4.5g（100%）、750 ppm 群：4.3g（96%）、1500 ppm 群：4.4g（98%）、3000 ppm 群：4.2g（93%）であった。

－雌－

6000 ppm 群では投与 1 週目に対照群と比較して 25%の摂餌量の低値を示し、投与 2 週目には逆に 32%の高値を示した。投与 3 週目から 50 週目にかけて 3～20%の低値がみられた。3000 ppm 群では投与中期に摂餌量の低値が散見された。1500 ppm 群では、対照群との間に大きな差はみられなかった。

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：4.0g（100%）、1500 ppm 群：3.9g（98%）、3000 ppm 群：3.9g（98%）、6000 ppm 群：3.9g（98%）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：0.064～0.123（平均：0.081）、1500 ppm 群：0.136～0.243（平均：0.171）、3000 ppm 群：0.285～0.476（平均：0.355）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 群に対し

て、1500 ppm 群で 2.1 倍、3000 ppm 群で 4.4 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、1500 ppm 群：0.155～0.266（平均：0.201）、3000 ppm 群：0.336～0.541（平均：0.420）、6000 ppm 群：0.829～1.598（平均：0.981）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、1500 ppm 群の被験物質摂取量に対して、3000 ppm 群で 2.1 倍、6000 ppm で 4.9 倍であった。6000 ppm 群で投与中期以降に体重増加の抑制にともない、被験物質摂取量は設定用量比（公比 2）よりも高い値を示した。

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－

赤血球数とヘモグロビン濃度の減少、MCV の増加が 3000 ppm 群で認められた。また、MCHC の減少が全投与群でみられ、杆状核好中球比が 1500 ppm 以上の群で増加した。

－雌－

分葉核好中球比の増加が 6000 ppm 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、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。

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－

総コレステロールの増加、GOT、GPT 及び ALP の上昇が全投与群で認められた。また、総ビリルビンとリン脂質の増加、LDH と CPK の上昇が 1500 ppm 以上の群で、アルブミンとナトリウムの増加、γ-GTP の上昇、並びに、グルコースとトリグリセライドの減少が 3000 ppm 群でみられた。

－雌－

総コレステロールとリン脂質の増加、LDH、ALP 及び CPK の上昇が全投与群で認められた。また、総蛋白、アルブミン、尿素窒素及びカルシウムの増加、GOT、GPT 及びγ-GTP の上昇が 3000 ppm 以上の群で、総ビリルビンの増加、グルコースとトリグリセライドの減少が 6000 ppm 群でみられた。A/G 比は 1500 ppm 群と 3000 ppm 群で増加した。なお、CPK の 6000 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上昇であった。

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－

蛋白の陽性度の減少が 1500 ppm 以上の群でみられた。その他、pH 値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－

蛋白の陽性度の減少が 3000 ppm 以上の群でみられた。その他、ケトン体の程度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。

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－

肝臓と腹膜の結節が、それぞれ投与濃度に対応して増加した。肝臓結節の発生は、対照群に 20 匹、750 ppm 群に 37 匹、1500 ppm 群に 43 匹、3000 ppm 群に 44 匹であった。腹膜結節の発生は、対照群に 1 匹、1500 ppm 群に 4 匹、3000 ppm 群に 5 匹であった。

－雌－

肝臓と腹膜の結節が、それぞれ投与濃度に対応して増加した。肝臓結節の発生は、対照群に 9 匹、1500 ppm 群に 27 匹、3000 ppm 群に 43 匹、6000 ppm 群に 42 匹であった。腹膜結節の発生は、対照群に 2 匹、1500 ppm 群に 6 匹、3000 ppm 群に 5 匹、6000 ppm 群に 11 匹であった。

雌雄とも、これら肝臓や腹膜に発生した結節は赤色を呈したものが多く、腹腔内に出血をしているものがしばしばみられた。

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－

肝臓の実重量と体重比の高値が 1500 ppm 以上の群で認められた。また、腎臓は体重比の高値が 1500 ppm 以上の群で、脾臓は体重比の高値が 3000 ppm 群でみられた。その他、

副腎、精巣、心臓、肺及び脳で体重比の高値が 1500 ppm あるいは 3000 ppm 群でみられたが、解剖時体重の低値に起因する変化と考えられた。

－雌－

肝臓の実重量と体重比の高値が全投与群で認められた。また、卵巣と脾臓の実重量の低値が 6000 ppm 群でみられた。その他、副腎、心臓、腎臓及び脳で実重量の低値と体重比の高値が、肺で体重比の高値が 3000 ppm あるいは 6000 ppm 群でみられたが、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－

1）腫瘍性病変

＜肝臓＞

肝芽腫の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 1500 ppm 以上の群に増加がみられた。肝芽腫の 750、1500 及び 3000 ppm 群における発生（5 匹、10% ; 16 匹、32%及び 27 匹、54%）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 0.7%）を超えた。従って、こ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、肝細胞癌の発生は、Peto 検定（有病率法、有病率法＋死亡率法）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。肝細胞癌の 3000 ppm 群における発生（15 匹、30%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内（最小 2%～最大 42%、平均発生率 20.5%）であったが、肝細胞腺腫の発生増加があることから、こ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。肝細胞腺腫の発生は、Peto 検定（有病率法、有病率法＋死亡率法）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 750、1500 及び 3000 ppm 群における発生（34 匹、68% ; 30 匹、60%及び 43 匹、86%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 4%～最大 34%、平均発生率 18.2%）を超えた。従って、こ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。

肝細胞腺腫と肝細胞癌は肝細胞に類似した腫瘍細胞で構成されていた。これに対して肝芽腫は、細胞質が極めて乏しく裸核状を呈する低分化の腫瘍細胞が高密度・充実性に増殖するものであった。肝芽腫は肝細胞腺腫や肝細胞癌の内部、あるいはそれらと隣接して存在するものが多く、その境界は明瞭であった。また、肝芽腫には大きな血液貯留腔の形成もみられた。肝芽腫と肝細胞癌は他臓器への転移がみられた。肝芽腫の他臓器への転移は、1500 ppm 群の 2 匹と 3000 ppm 群の 7 匹にみられ、主な転移先は肺であった。肝細胞癌の他臓器への転移は 750 ppm 群の 2 匹、1500 ppm 群の 3 匹及び 3000 ppm 群の 3 匹にみられ、主な転移先は肺であった。

＜腹膜＞

血管肉腫の発生は、Peto 検定（有病率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。血管肉腫の 3000 ppm 群における発生（5 匹、10%）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。従って、こ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。この腫瘍の発生部位は副生殖腺や膀胱周囲の腹膜であった。組織像は、広い血管腔を形成し、腫瘍細胞の異型と重層化が目立った。血管肉腫は肺への転移が対照群の 1 匹に、前立腺への転移が 3000 ppm 群の 1 匹にみられた。

＜精巣上体＞

組織球性肉腫の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。組織球性肉腫の 3000 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 6%、平均発生率 1.3%）を超えた。しかし、組織球由来の腫瘍は諸臓器に発生することから、全臓器での組織球性肉腫の発生をみると、傾向検定による発生の増加傾向も Fisher 検定による発生の増加も示さなかった。従って、この腫瘍の発生増加は、被験物質の投与による影響ではないと判断した。

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みられた。この変化は対照群での発生はなく、750 ppm 群の 7 匹、1500 ppm 群の 22 匹にそれぞれ軽度の変化が、3000 ppm 群では 7 匹に軽度の変化と 22 匹に中等度の変化がみられた。

＜鼻腔＞

色素の沈着が全投与群の多くの動物にみられた。色素は褐色の顆粒であり、沈着部位は(1)鼻腺や嗅腺の腺房、導管の細胞、(2)呼吸上皮細胞、(3)呼吸上皮化生した腺細胞の細胞質内であった。

腺の呼吸上皮化生が全投与群で発生数の増加と程度の増強を示した。腺の呼吸上皮化生は上皮下の腺組織（鼻腺と嗅腺）に呼吸上皮の形態的特徴を有する細胞が現れるもので、病理組織診断に際しては腺腔に面した細胞表面（自由面）に長い線毛の存在を確認して行った。

病変が呼吸部にみられたものを程度に応じて軽度と中等度と判定し、病変が呼吸部のみならず嗅部にまで及んでいたものを重度と判定した。

嗅上皮の呼吸上皮化生が 1500 ppm 以上の群で発生数の増加と程度の増強を示した。嗅上皮の呼吸上皮化生も腺の呼吸上皮化生と同様に、呼吸上皮の形態的特徴を有する細胞が嗅上皮の中に現れるもので、病理組織診断は円柱上皮の自由面に長い線毛の存在を指標にして行った。発生部位は呼吸部の鼻中隔、並びに嗅部の鼻中隔、背側壁及び篩骨甲介にみられた。

＜鼻咽頭＞

エオジン好性変化の発生が 3000 ppm 群で増加した。この変化は鼻咽頭の表層を覆う線毛上皮細胞にエオジン色素に良く染まる物質が貯留する変化であった。

＜骨髄＞

赤血球造血の亢進が 1500 ppm 以上の群で増加した。

＜脾臓＞

髄外造血の亢進が 1500 ppm 以上の群で増加した。この変化は他臓器に大きな腫瘍性病変がある動物にみられた。

＜腎臓＞

近位尿細管へのヘモジデリン沈着の発生が 1500 ppm 以上の群で増加した。ヘモジデリン沈着は肝臓に肝芽腫を有する動物にみられた。

その他、非腫瘍性病変については、歯の異形成の減少が 1500 ppm 以上の群でみられ、1500 ppm 群で病変の程度の減弱が、3000 ppm 群では発生数の減少と病変の程度の減弱がみられた。また、副腎に紡錘形細胞増生の減少が 1500 ppm 以上の群で、精巣に鉱質沈着の減少が 3000 ppm 群でみられた。

なお、リンパ節と脾臓でのヘモジデリン沈着の発生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－

1）腫瘍性病変

＜肝臓＞

肝芽腫の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3000 ppm 以上の群に増加がみられた。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、1500 ppm 群の 2 匹（4%）、3000 ppm 群の 7 匹（14%）及び 6000 ppm 群の 7 匹（14%）に発生した。また、肝細胞癌の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3000 ppm 以上の群に増加がみられた。肝細胞癌の 3000 と 6000 ppm 群における発生（11 匹、22%；21 匹、42%）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 2.5%）を超えた。肝細胞腺腫の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法、有病率法＋死亡率法）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 1500、3000 及び 6000 ppm 群における発生（25 匹、50%；42 匹、84%及び 45 匹、90%）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 12%、平均発生率 5.5%）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。

肝芽腫と肝細胞癌は他臓器への転移がみられ、肝芽腫は、3000 ppm 群の 1 匹が肺に、6000 ppm 群の 1 匹が膵臓にそれぞれ転移していた。また、肝細胞癌の転移は 1500 pm 群の 1 匹、3000 ppm 群の 2 匹及び 6000 ppm 群の 3 匹に肺転移がみられた。

＜腹膜＞

血管肉腫の発生は、Peto 検定（死亡率法、有病率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 3000 ppm 以上の群に増加がみられた。血管肉腫の 1500、3000 及び 6000 ppm 群における発生（3 匹、6%；7 匹、14%及び 17 匹、34%）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 0.4%）を超えた。従って、こ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。この腫瘍は子宮や膀胱周囲の腹膜にみられた。

血管肉腫は、肺、腎臓、胃、膀胱、子宮、膣に転移がみられた。

その他、腫瘍性病変についてはリンパ節に悪性リンパ腫の発生減少がみられた。

2）非腫瘍性病変

＜肝臓＞

好酸性小増殖巣の発生が 3000 ppm 以上の群で増加した。

小葉中心性の肝細胞肥大が 6000 ppm 群で発生が増加した。この変化は 6000 ppm 群では 50 匹の約半数の 23 匹に軽度から中等度の変化（軽度 6 匹、中等度 17 匹）が観察されたが、対照群と 1500 ppm 群には発生がなく、3000 ppm 群の 2 匹に軽度な変化がみられただけであった。

＜鼻腔＞

色素の沈着が全投与群の多くの動物にみられた。

腺と嗅上皮の呼吸上皮化生の発生が全投与群で増加した。

呼吸上皮のエオジン好性変化の発生が全投与群で増加した。呼吸上皮のエオジン好性変化は、呼吸上皮細胞の細胞質内にエオジン色素に良く染まる物質が貯留する変化で、加齢性変化として呼吸部粘膜に良くみられるものであった。

嗅上皮のエオジン好性変化の発生が 3000 ppm 以上の群で増加した。嗅上皮のエオジン好性変化は、嗅上皮を構成する細胞の細胞質内にエオジン色素に良く染まる物質が貯留する変化で、加齢性変化として嗅粘膜上皮によくみられるものであった。3000 ppm 以上の群で

は、発生動物数の増加のみならず、この変化のみられる領域の拡大、すなわち所見のグレードが強くなっていた。

＜鼻咽頭＞

エオジン好性変化の発生が全投与群で増加した。

＜骨髄＞

赤血球造血の亢進が 3000 ppm 以上の群で増加した。

＜脾臓＞

髄外造血の亢進とヘモジデリン沈着の発生が 3000 ppm 以上の群で増加した。

＜腎臓＞

近位尿細管上皮へのヘモジデリン沈着が全投与群でわずかであるが発生がみられた。

その他、非腫瘍性病変については肝臓の肉芽形成の発生が全投与群で減少した。

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－

肝臓腫瘍による死亡が 1500 ppm 群では投与 82 週以降、3000 ppm 群では投与 72 週以降に増加し、特に肝芽腫による死亡が多く認められた。

－雌－

肝臓腫瘍による死亡が 3000 ppm 群では投与 72 週以降、6000 ppm 群では投与 77 週以降に増加し、肝芽腫と肝細胞癌による死亡が多く認められた。また、6000 ppm 群では腹膜腫瘍による死亡が投与 43 週以降に増加し、死因となった腹膜腫瘍は全て血管肉腫であった。

Ⅳ　考察及びまとめ

2,4-ジクロロ-1-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、雄：750 ppm, 1500 ppm, 3000 ppm、雌：1500 ppm, 3000 ppm, 6000 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

生存率の低下が雄の 1500 ppm 以上の群と雌の 3000 ppm 以上の群で顕著であった。この生存率の低下は、雄では 1500 ppm 群で投与 82 週以降、3000 ppm 群で投与 72 週以降に増加した肝臓腫瘍による死亡、雌では 3000 ppm 群で投与 72 週以降、6000 ppm 群で投与 77 週以降に増加した肝臓腫瘍と投与 43 週以降に増加した腹膜腫瘍によるものであった。

体重は、雄の 750 ppm 群は対照群とほぼ同様に推移したものの、1500 ppm 以上の群と雌の全投与群で投与濃度に対応した増加の抑制を示した。

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、雄の 3000 ppm 群と雌の 6000 ppm 群で投与初期から中期にかけて摂餌量の低値がみられた。

Ⅳ－2　腫瘍性及び腫瘍関連病変

雌雄とも肝臓と腹膜に腫瘍の発生増加がみられた。

＜肝臓腫瘍＞

雄では、肝芽腫と肝細胞腺腫の顕著な発生増加が認められ、肝細胞癌の発生増加もみられた。雌では、肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫の顕著な発生増加が認められた。肝芽腫と肝細胞癌は悪性腫瘍に分類される腫瘍であり、雌雄とも他臓器への転移がみられた。従って、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。肝臓腫瘍の発生増加は、雌雄とも最低濃度（雄 750 ppm、雌 1500 ppm）からみられた。

雌では、前腫瘍性病変とされている好酸性小増殖巣（文献 8）の発生増加が 3000 ppm 以上の群で認められた。

その他、肝臓実重量の増加が雄では 1500 ppm 以上の群、雌では全投与群で認められた。定期解剖時まで生存した動物は、雌雄とも投与濃度に対応して明らかに肝臓腫瘍を持った動物数が増加した。また、剖検観察でみられた肝臓結節の数やその大きさも増加した。定期解剖時に肝細胞腺腫、肝細胞癌、肝芽腫のいずれの肝臓腫瘍の発生がなかった動物の各群の肝臓重量平均値に大きな差はみられなかった。従って、肝臓実重量の増加は、肝臓腫瘍の発生増加とその数及び大きさに対応した変化であったと考えられた。

＜腹膜腫瘍＞

雌雄とも、血管肉腫の発生増加が認められた。血管肉腫は悪性腫瘍に分類される腫瘍であり、他臓器への転移が雄では肺と前立腺に、雌では肺、腎臓、胃、膀胱、子宮、膣にみられた。従って、腹膜の血管肉腫の発生増加は、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。

Ⅳ－3　非腫瘍性病変

雌雄とも肝臓と上部気道（鼻腔と鼻咽頭）への影響がみられた。

肝臓への影響として、小葉中心性の肝細胞肥大が雄の全投与群と雌の 6000 ppm 群で発生が増加した。中心性の肝細胞肥大は、2 週間試験（文献 9）では雌雄とも 5000 ppm 以上の群にみられ、13 週間試験（文献 5）でも雄の 3000 ppm 以上の群と雌の 4000 ppm 以上の群に認められた。

鼻腔への影響として、色素の沈着（H&E 染色で褐色）が呼吸上皮細胞や鼻腔の腺組織の細胞に雌雄とも投与群に限ってみられた。この変化は 13 週間試験ではみられず、当センターで過去に実施した試験でも非常にまれな変化であった。さらに、腺の呼吸上皮化生が雌雄とも全投与群で増加し、この変化は呼吸部のみならず嗅部にまで及んでいた。また、嗅上皮の呼吸上皮化生（雌雄の 1500 ppm 以上の群）、呼吸上皮のエオジン好性変化（雌の全投与群）及び嗅上皮のエオジン好性変化（雌の 3000 ppm 以上の群）の発生増加がみられ、鼻咽頭の上皮にもエオジン好性変化（雄の 3000 ppm 群、雌の全投与群）の発生増加がみられた。以上のように、本試験では経口投与であるにもかかわらず、被験物質の投与による影響が鼻腔から鼻咽頭にかけての上部気道に限ってみられた。

その他、雄では骨髄での赤血球造血の亢進、脾臓の髄外造血の亢進が 1500 ppm 以上の群でみられた。雌では骨髄での赤血球造血の亢進、脾臓の髄外造血の亢進とヘモジデリン沈着が 3000 ppm 以上の群でみられた。以上の所見は、腫瘍発生に対応した二次的な変化による可能性が強いと考えられる。また、雌雄とも、腎臓の近位尿細管にヘモジデリン沈着が肝芽腫の発生に伴ってみられた。

なお、血液生化学検査で雌雄ともに GOT、GPT、LDH、ALP 及びγ-GTP の上昇、総ビリルビン、リン脂質の増加等がみられたが、雌雄とも最低濃度から肝臓腫瘍と腹膜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、その他の毒性影響であるか区別できなかった。

Ⅳ－4　量－反応関係

腫瘍の発生増加は雌雄とも肝臓と腹膜にみられた。これらの腫瘍の発生増加は、肝臓腫瘍が最低濃度である雄 750 ppm、雌 1500 ppm から、また腹膜腫瘍が雄 3000 ppm、雌 1500 ppm からみられた。

腫瘍以外の影響は雌雄とも肝臓と上部気道（鼻腔と鼻咽頭）にみられた。肝臓への影響

（肝細胞の小葉中心性肥大）がみられた濃度は、雄では 750 ppm から、雌は 6000 ppm であった。上部気道への影響（鼻腔：雌雄の色素沈着と腺の呼吸上皮化生、雌の嗅上皮の呼吸上皮化生と呼吸上皮のエオジン好性変化、鼻咽頭：雌のエオジン好性変化）は最低濃度である雄 750 ppm、雌 1500 ppm からみられた。

Ⅳ－5　他文献との比較等

①　がん原性試験

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンのマウス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-ニトロベンゼンのマウスを用いたがん原性試験（投与濃度：雌雄とも 320、800 及び 2000 ppm）（文献 10）を、本試験と同様の方法で実施した。その結果、雄マウスに肝細胞癌（発生率：800 ppm 群 46%、2000 ppm 群 62%）と肝芽腫（発生率：320 ppm 群 20%、800 ppm 群 24%、2000 ppm 群 50%）、雌マウスに肝細胞腺腫（発生率：800 ppm 群 34%、2000 ppm 群 32%）と肝細胞癌（発生率：800 ppm 群 30%、2000 ppm 群 62%）の顕著な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。

本試験でも、投与濃度が異なるものの、雌雄ともに肝細胞癌と肝芽腫の発生増加が認められ、より高率に発生した。さらに、雌雄とも腹膜の血管肉腫の発生増加が認められた。

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-ニトロベンゼンの位置異性体である 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

1) 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。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が確認された（当センター内部資料）。従って、マウスで観察された黄色尿も、ラットと同様の代謝を経て、排泄されたと推察される。

2) 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンと構造が類似した物質の鼻腔での薬物代謝動態について報告が幾つかなされている。C^{14} でラベルしたクロロベンゼンを腹腔内投与したマウス鼻腔での C^{14} 局在を調べた報告では、高濃度の C^{14} 代謝物が鼻腔背側の鼻腺に検出され（文献 12）、この部位は本試験でみられた鼻腺の呼吸上皮化生が現れた部位と一致した。また、鼻腺の呼吸上皮化生は、本試験に先立って実施した 13 週間試験でも雄 2000 ppm 以上の群、雌 3000 ppm 以上の群でみられた（文献 5）。今回の試験結果と、これまでに知られている鼻腔での P450 系とグルタチオン S-転移酵素等の薬物代謝に関する知見（文献 13, 14）から、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの代謝が肝臓のみならず、鼻腔でも行われ、反応性の高い代謝物の産生によって鼻腔での傷害が引き起こされている可能性が示唆された。

V　結論

Crj:BDF$_1$マウスを用いて 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、肝臓腫瘍（肝芽腫、肝細胞癌及び肝細胞腺腫）と腹膜腫瘍（血管肉腫）の発生増加が認められ、これらの腫瘍の発生増加は雌雄マウス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。

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.

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. 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.

9. 日本バイオアッセイ研究センター．2003．2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンのマウスを用いた経口投与による 2 週間毒性試験（混餌試験）報告書．神奈川：中央労働災害防止協会　日本バイオアッセイ研究センター.

10. 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.

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. Brittebo E, Brandt I. 1984. Metabolism of chlorobenzene in the mucosa of the murine respiratory tract. Lung 162：79−88.

13. Gervasi PG, Longo V, Ursino F, Panattoni G. 1989. Drug metabolizing enzymes in respiratory mucosa of humans. Comparison with rats. In: Cytochrome P−450, Biochemistry and Biophysics (Schuster I, ed). London：Taylor & Francis, 97−100.

14. Bond JA. 1994. Metabolism of xenobiotics by the respiratory tract. In：Toxicology of the Lung, 2nd ed. (Gardner DE, Crapo JD, McClellan RO, eds). New York, NY：Raven Press, 187−215.