# 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

試験番号：０３９５

CAS　Ｎｏ．６１１－０６－３

2003年2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

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

試験番号：０３９５

# 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　病理学的検査 …… 8
(1) 剖検 …… 8
(2) 臓器重量 …… 8
(3) 病理組織学的検査 …… 8

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 …… 9
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 …… 12
Ⅲ－8　病理学的検査 …… 13
Ⅲ－8－1　剖検 …… 13
Ⅲ－8－2　臓器重量 …… 13
Ⅲ－8－3　病理組織学的検査 …… 14

Ⅳ　考察及びまとめ …… 15

Ⅴ　文献 …… 18

# 要　約

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの Crj:BDF$_1$ マウスを用いた経口投与による 2 年間（104 週間）のがん原性試験のための予備試験である 13 週間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 2 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 5 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 625 ppm、1250 ppm、2500 ppm、5000 ppm、10000 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、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

2 週間試験の結果、雌雄とも全ての群で死亡はみられなかった。10000 ppm 群では、主として著しい摂餌量の低下と体重の減少に伴った消耗性変化、それに加えて、被験物質投与による毒性影響が認められた。被験物質投与の影響は、肝臓（雌雄とも中心性の肝細胞の肥大、血液生化学的パラメータの変化等）、血液系（雌雄とも血液学的パラメータの変化、骨髄の造血低下等）、鼻腔（嗅上皮の壊死、嗅腺の萎縮と管拡張）に認められた。5000 ppm 群では、雌雄とも摂餌量の減少がみられ、雄では体重の減少が認められたが、雌では投与最終日には、対照群との間に差はみられなかった。肝臓（雄：肝臓の重量増加と総コレステロールの増加、雌：総コレステロールとリン脂質の増加）と血液系／脾臓（雌雄：脾臓に赤血球充満、髄外造血の増加及びヘモジデリン沈着）への影響は雌雄とも 2500ppm まで認められた。また、鼻腔への影響は、雄では 5000 ppm、雌では 2500 ppm まで認められた。従って、無毒性量（NOAEL）は、肝臓と血液系／脾臓への影響をエンドポイントとして 1250 ppm（雄：0.195～0.212 g/kg/day、雌：0.225～0.243 g/kg/day）であると考えられた。

また、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（雄：2500 ppm 以上の群、雌：625 ppm 以上の群）が観察された。

以上の結果を考慮し、2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの 13 週間試験投与濃度は、雄では、最高用量を 4000 ppm と考え、以下、3000 ppm、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm に設定した。雌では、最高用量を 8000 ppm と考え、以下、6000 ppm、4000 ppm、2000 ppm、1000 ppm に設定した。

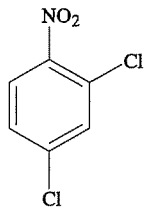
# Ⅰ　試験材料

## 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（0.06%）であった。

それらの結果については、APPENDIX K 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 K 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 Crj:$BDF_1$ マウス（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、Crj:$BDF_1$ マウスを使用することが決定している。

マウス雌雄各 37 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 30 匹（投与開始時体重範囲、雄：22.4～24.7g、雌：18.3～20.4g）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

1999 年 10 月 1 日から 1999 年 10 月 15 日までの 2 週間、定期解剖直前まで連続投与した。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

625 ppm、1250 ppm、2500 ppm、5000 ppm 及び 10000 ppm の 5 段階（公比 2）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予備試験である、13 週間試験に使用する投与濃度を決定するために 2 週間とした。

各群の投与濃度は予備検討試験の結果を参考に決定した。予備検討試験では、6 週齢の Crj:BDF$_1$ マウス（SPF）の雌雄（3 用量と対照群、各群 3 匹）に、1000 ppm、3000 ppm、9000 ppm の 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼン混餌飼料を 8 日間自由摂取させ、体重（群構成時、2、5、8 日目）と摂餌量（2、5、8 日目）を測定した。その結果、1000 ppm 群と 3000 ppm 群では、雌雄とも体重、摂餌量で対照群との間に大きな差はみられなかった。9000 ppm 群では、雌雄とも大幅な摂餌量の低値がみられ、体重も継続して減少した。しかし、摂餌量は 5 日目以降、増加傾向がみられ、体重も 5 日目以降は減少しているものの、減少率が少なくなったことより、9000 ppm は 2 週間の投与に耐え得る濃度であると判断した。上記の

結果を考慮し、雌雄ともに、10000 ppm を最高用量とし、以下、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm 及び 625 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－1－6　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CS-20、HP20M）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、5000 ppm と 10000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この 10000 ppm 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 625 ppm、1250 ppm、2500 ppm 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投与開始日前日に 1 回行った。調製した被験物質混合飼料は、半量を投与 1 週目用とし、マウス用餌箱に充填して翌日の投与開始まで室温で保管した。残りの半量は投与 2 週目用とし、ビニール袋詰にして密封し、翌週まで冷蔵保管した。

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、91.9～96.6%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 K 3, K 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、200 ppm と 10000 ppm の被験物質混合飼料をマウス用餌箱に充填し、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）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：84.3%、10000 ppm：88.7%、冷蔵保管（15 日間）で、200 ppm：104%、10000 ppm：91.0%であった。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 K 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 5 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 | 5 匹　（1001～1005） | 対　照　群 | 5 匹　（2001～2005） |
| 625 ppm 群 | 5 匹　（1101～1105） | 625 ppm 群 | 5 匹　（2101～2105） |
| 1250 ppm 群 | 5 匹　（1201～1205） | 1250 ppm 群 | 5 匹　（2201～2205） |
| 2500 ppm 群 | 5 匹　（1301～1305） | 2500 ppm 群 | 5 匹　（2301～2305） |
| 5000 ppm 群 | 5 匹　（1401～1405） | 5000 ppm 群 | 5 匹　（2401～2405） |
| 10000 ppm 群 | 5 匹　（1501～1505） | 10000 ppm 群 | 5 匹　（2501～2505） |

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 4）。

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 204 室及び 203 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）：23.1±0.2℃）、設定湿度55±15%（実測値（平均±標準偏差）：53.6±1.4%）、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、W112×D212×H120mm）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。

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、投与開始直前（群構成時）、投与開始後3日目（1週3日）、7日目（1週7日）、10日目（2週3日）、14日目（2週7日）に行った。

### Ⅱ－3－2　体重測定

全動物について、投与開始直前（群構成時）、投与開始後3日目（1週3日）、7日目（1週7日）、10日目（2週3日）、14日目（2週7日）に体重を測定した。

Ⅱ－3－3　摂餌量測定

全動物について、週 2 回給餌量（0、3、7、10 日目）、残餌量及び餌こぼし量（3、7、10、14 日目）を測定し、その値から摂餌量を算出した。

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に採血し、検査を行った。

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

検査方法は APPENDIX L 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。

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、リン脂質、GOT、GPT、LDH、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

検査方法は APPENDIX L 1 に示した。

Ⅱ－3－6　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、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、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、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、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 M 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、全動物を対象に計測した。

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。

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。

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、2500 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。雌では、1250 ppm群と625 ppm群でも、10日目以降に黄色尿（625 ppm：4匹、1250 ppm：5匹）が認められた。10000 ppm群では、糞小粒と糞少量（雌雄とも5匹）、立毛（雄3匹、雌4匹）、円背位（雄2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、5000 ppm以上の群は投与終了日まで体重が減少し、対照群と比較して有意な体重の低値あるいは低値傾向が認められた。2500 ppm以下の群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。なお、投与最終日の体重は対照群と比較して、10000 ppm群：56%、5000 ppm群：80%、2500 ppm群：100%、1250 ppm群：101%、625 ppm群：102%であった。
雌では、10000 ppm群は投与終了日まで体重が減少し、対照群と比較して有意な体重の低値あるいは低値傾向が認められた。5000 ppm群では、投与3日目に体重の低下がみられたが、それ以降は増加し、投与終了日には有意な差は認められなかった。2500 ppm以下の群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。なお、投与最終日の体重は対照群と比較して、10000 ppm群：67%、5000 ppm群：101%、2500 ppm群：105%、1250 ppm群：104%、625 ppm群：101%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、5000 ppm以上の群で、全投与期間にわたり摂餌量の著しい低値がみられた。2500 ppm群では、投与3日目に有意な低値を示したが、7日目以降は対照群とほぼ同様の推移を示した。1250 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、10000 ppm群：21～47%、5000 ppm群：44～79%、

2500 ppm 群：87～105%、1250 ppm 群：100～105%、625 ppm 群：97～108%の範囲にあった。

雌では、10000 ppm 群で、全投与期間にわたり摂餌量の著しい低値がみられた。5000 ppm 群では投与 3 日目に有意な低値を示し、7 日目と 14 日目も低値傾向を示した。2500 ppm 群では投与 3 日目にやや低い値を示したが、7 日目以降は対照群とほぼ同様の推移を示した。1250 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、10000 ppm 群：28～65%、5000 ppm 群：44～100%、2500 ppm 群：78～100%、1250 ppm 群：100～112%、625 ppm 群：94～100%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、2500 ppm 群までは、ほぼ公比通りの被験物質摂取量を示したが、5000 ppm 以上の群では、摂餌量の低値にともない、やや低い値を示した。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 10000 ppm 群：0.440～1.296、 5000 ppm 群：0.408～0.717、 2500 ppm 群：0.360～0.402、 1250 ppm 群：0.195～0.212、 625 ppm 群：0.095～0.107、雌では 10000 ppm 群：0.673～1.743、5000 ppm 群：0.464～0.831、 2500 ppm 群：0.368～0.428、 1250 ppm 群：0.225～0.243 、625 ppm 群：0.104～0.111 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 APPENDIX E 1, 2 に示した。

雄では、10000 ppm 群で MCV の減少と白血球数及びリンパ球比の減少傾向、並びに杆状核好中球比と分葉核好中球比の増加傾向が認められた。MCV の減少は 5000 ppm 群まで認められた。その他、MCH と MCHC の増加、ヘマトクリット値の減少が 5000 ppm 群でみられた。

雌では、10000 ppm 群でヘマトクリット値、MCV、白血球数及びリンパ球比の減少、並びに血小板数、分葉核好中球比の増加と杆状核好中球比の増加傾向が認められた。ヘマトクリット値の減少は、5000 ppm 群まで認められた。その他、MCH と MCHC の増加、赤血球数の減少が 5000 ppm 群でみられた。

Ⅲ－7　血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、10000 ppm 群で総ビリルビン、総コレステロール、尿素窒素及びナトリウムの

増加、GOT、GPT、LDH、γ-GTP 及び CPK の上昇、並びにグルコースとカルシウムの減少が認められた。総ビリルビンの増加とグルコースの減少は 5000 ppm 群まで、総コレステロールの増加は 2500 ppm 群まで認められた。その他、アルブミンと A/G 比の増加が 5000 ppm 群でみられた。

雌では、10000 ppm 群で総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質及びカリウムの増加、GPT とγ-GTP の上昇、GOT、LDH 及び CPK の上昇傾向、並びにグルコースの減少が認められた。総ビリルビンの増加は 5000 ppm 群まで、総コレステロールとリン脂質の増加は 2500 ppm 群まで認められた。

Ⅲ－8　病理学的検査

Ⅲ－8－1　剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄では、10000 ppm 群と 5000 ppm 群で、胸腺の萎縮（両群とも 5 匹）と肝臓の暗色化（10000 ppm 群：3 匹、5000 ppm 群：4 匹）が観察された。2500 ppm 以下の群では、対照群で脾臓の黒色斑がみられたが、投与による影響は認められなかった。

雌では、10000 ppm 群で、胸腺の萎縮が 5 匹、5000ppm 群では、胸腺の萎縮と肝臓の暗色化が各 1 匹に観察された。その他、投与群で脾臓の黒色斑と腎臓の水腎症がみられたが、本被験物質投与による影響とは考えなかった。

Ⅲ－8－2　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 APPENDIX H 1, 2（実重量）、APPENDIX I 1, 2（体重比）に示した。

雄では、10000 ppm 群は解剖時体重が顕著に低く、全臓器に実重量の低値あるいは低値傾向がみられ、体重比は、胸腺に低値、精巣、心臓、肺、肝臓及び脳に高値が認められた。

5000 ppm 群では、脾臓に体重比の高値がみられた。胸腺には実重量と体重比の低値、心臓、肝臓及び腎臓に実重量の低値、肺と脳に体重比の高値が認められた。

2500 ppm 群では、肝臓に実重量と体重比の高値がみられた。

1250 ppm 以下の群では、有意な差は認められなかった。

雌では、10000 ppm 群で肝臓に体重比の高値がみられた。また、解剖時体重が低く、胸腺、副腎、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓及び脳に実重量の低値あるいは低値傾向がみられ、体重比は、胸腺に低値、心臓、肺及び脳に高値が認められた。

5000 ppm 群では、脾臓に実重量と体重比の高値、肝臓に体重比の高値が認められた。

2500 ppm 以下の群では、有意な差は認められなかった。

Ⅲ－8－3　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APPENDIX J 1, 2に示した。

雌雄とも鼻腔、肝臓、脾臓、骨髄及び胸腺に投与による影響を示す所見が観察された。

＜雄＞

10000 ppm群では、鼻腔に嗅上皮の壊死（中等度5匹）、嗅腺の萎縮（軽度1匹、中等度4匹）と管拡張（軽度2匹、中等度3匹）がみられた。肝臓には中心性の肝細胞の肥大（中等度3匹、重度2匹）が観察された。また、脾臓と胸腺に萎縮（脾臓：軽度1匹と中等度4匹、胸腺：重度5匹）、骨髄に造血低下（軽度5匹）が認められた。なお、筋肉の鉱質沈着が2匹（軽度）、前胃の潰瘍が1匹（軽度）で観察された。

5000 ppm群では、鼻腔に嗅上皮の壊死と嗅腺の管拡張（それぞれ軽度5匹）がみられた。肝臓には中心性の肝細胞の肥大（中等度3匹、重度2匹）が観察された。また、胸腺の萎縮が2匹（軽度）でみられた。脾臓には赤血球充満（軽度3匹、中等度2匹）、髄外造血の増加（軽度1匹、中等度3匹）及びヘモジデリン沈着（軽度5匹）、骨髄には赤血球造血の増加（軽度4匹）が認められた。

2500 ppm群では、鼻腔に嗅上皮の壊死と嗅腺の管拡張がそれぞれ1匹（軽度）でみられた。脾臓には赤血球充満（軽度4匹）、髄外造血の増加（軽度1匹、中等度4匹）及びヘモジデリン沈着（軽度5匹）が認められた。

1250 ppm以下の群では、対照群との間に病理組織学的変化を認めなかった。

＜雌＞

10000 ppm群では、鼻腔に嗅上皮の壊死（中等度5匹）、嗅腺の萎縮（中等度5匹）と管拡張（軽度5匹）がみられた。肝臓には中心性の肝細胞の肥大（軽度2匹、中等度3匹）が観察された。また、脾臓と胸腺に萎縮（脾臓：軽度3匹と中等度2匹、胸腺：重度5匹）、骨髄に造血低下（軽度1匹）が認められた。

5000 ppm群では、鼻腔に嗅上皮の壊死（軽度5匹）と嗅腺の管拡張（軽度4匹）がみられた。肝臓には中心性の肝細胞の肥大（軽度4匹、中等度1匹）が観察された。また、胸腺の萎縮が1匹（軽度）でみられた。脾臓には赤血球充満（軽度1匹、中等度4匹）、髄外造血の増加（軽度1匹、中等度4匹）及びヘモジデリン沈着（軽度5匹）、骨髄には赤血球造血の増加（軽度5匹）が認められた。

2500 ppm群では、鼻腔に嗅上皮の壊死（軽度4匹）と嗅腺の管拡張（軽度1匹）がみられた。脾臓には赤血球充満（軽度2匹）、髄外造血の増加（中等度5匹）及びヘモジデリン沈着（軽度5匹）が認められた。

1250 ppm群では、鼻腔に嗅上皮の壊死が1匹（軽度）に観察された。

625 ppm群では、対照群との間に病理組織学的変化を認めなかった。

## Ⅳ　考察及びまとめ

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの Crj:BDF$_1$ マウスを用いた経口投与による 2 年間（104 週間）のがん原性試験のための予備試験である 13 週間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 2 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 5 匹の動物を用いた。投与濃度は、雌雄とも 625 ppm、1250 ppm、2500 ppm、5000 ppm、10000 ppm（公比 2）とした。

### (1) 用量－反応関係

10000 ppm 群では、雌雄とも、摂餌量の著しい減少がみられ、体重も投与期間を通して減少したが、最高用量を含む全投与群に死亡はみられなかった。体重の著しい減少や摂餌量の低下に伴った動物の消耗状態による変化として、一般状態では、糞小粒、糞少量及び立毛等がみられ、臓器重量では、雄の全臓器と雌の肝臓以外の臓器で実重量の低値がみられた。また、雌雄ともに剖検で胸腺の萎縮、病理組織学的検査でも胸腺と脾臓の萎縮が観察された。血液生化学的検査では、雌雄ともグルコースの減少がみられ、これらの変化は摂餌量の低下に起因するものと考えられた。血液系への影響として、雌雄とも MCV、白血球数及びリンパ球比の減少、杆状核好中球比と分葉核好中球比の増加、雌ではヘマトクリット値の減少と血小板数の増加もみられ、雌雄とも骨髄の造血低下が認められた。白血球数の減少はリンパ球数の減少にともなった変化と考えられ、その結果、杆状核好中球比と分葉核好中球比が相対的に増加したと考えられる。肝臓への影響として、雌雄とも中心性の肝細胞の肥大、総ビリルビンと総コレステロールの増加、GOT、GPT、γ-GTP 及び LDH の上昇、雌ではリン脂質の増加もみられた。鼻腔への影響として、雌雄とも嗅上皮の壊死、嗅腺の萎縮と管拡張が観察された。その他、血漿の CPK が雌雄とも上昇し、筋肉の鉱質沈着が雄の 2 匹、前胃の潰瘍が雄の 1 匹にみられた。

5000 ppm 群では、雌雄とも摂餌量の減少がみられ、雄では投与期間を通して体重が減少したが、雌では投与終了時には対照群との間に差はみられなかった。体重の減少や動物の消耗状態による変化として、雄では、胸腺、心臓、肝臓及び腎臓に実重量の低値、グルコースの減少、剖検と病理組織学的検査で胸腺の萎縮がみられたが、雌では、剖検と病理組織学的検査で胸腺の萎縮が 1 匹にみられただけであった。血液系／脾臓への影響として、雌雄ともヘマトクリット値の減少、MCH と MCHC の増加、雄では MCV の減少、雌では赤血球数の減少がみられた。脾臓では、雌雄とも赤血球充満、ヘモジデリン沈着及び髄外造血の増加、雌で実重量と体重比の高値がみられた。また、骨髄では、雌雄とも赤血球造血の増加が認められた。これらの血液や造血器での変化は、被験物質の投与による赤血球の溶血及び補償性の造血亢進を示すものと考えられた。肝臓への影響として、雌雄とも中心性の肝細胞の肥大、総ビリルビンと総コレステロールの増加、雌ではリン脂質の増加、肝臓重量に体重比

の高値もみられた。鼻腔への影響として、雌雄とも嗅上皮の壊死と嗅腺の管拡張がみられた。

2500 ppm 群では、血液系／脾臓への影響として、雌雄とも脾臓に赤血球充満、ヘモジデリン沈着及び髄外造血の増加がみられた。肝臓への影響として、雌雄とも総コレステロールの増加、雌ではリン脂質も増加し、雄では肝臓重量（実重量と体重比）が高値を示した。鼻腔への影響として、雌雄とも嗅上皮の壊死（雄 1 匹、雌 4 匹）と嗅腺の管拡張（雄 1 匹、雌 1 匹）がみられた。

1250 ppm 群と 625 ppm 群では、被験物質投与による明らかな影響は認められなかった。

なお、黄色尿が、雄では 2500 ppm まで、雌では 625 ppm まで観察された。この黄色尿は 2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの代謝物である 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と考えられる。

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、高用量では摂餌量の低下と体重の減少に伴った消耗性の変化がみられ、体重の減少や増加の抑制は、雄では 5000 ppm まで、雌では 10000 ppm で認められた。それに加えて、肝臓、血液系／脾臓、鼻腔への影響が認められた。本試験でこれらの毒性影響がみられた最低用量は、1）肝臓への影響は、雄に肝臓の重量増加と血漿の総コレステロール増加、雌に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 2500 ppm、2）血液系／脾臓への影響は、雌雄とも脾臓に赤血球充満、髄外造血の増加及びヘモジデリン沈着が認められた 2500 ppm、3）鼻腔への影響は、雄に嗅上皮の壊死と嗅腺の管拡張の明らかな増加がみられた 5000 ppm、雌に嗅上皮の壊死の明らかな増加がみられた 2500 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 2 週間混餌投与による無毒性量は、肝臓と血液系／脾臓への影響をエンドポイントとして、1250 ppm（雄：0.195～0.212 g/kg/day、雌 0.225～0.243 g/kg/day）であると考えられた。

（3）他の文献との比較

雄では 2500 ppm 以上の群、雌では 625 ppm 以上の群で、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 5）。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 6）。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。

（4）13 週間試験の濃度設定

2 週間試験の結果より、13 週間試験の投与濃度を下記のように設定した。

雄では、最高用量の 10000 ppm 群では著しい摂餌量の低下にともない、体重は投与終了時まで継続して減少した。また、肝臓、血液系／脾臓及び鼻腔への影響がみられ、この濃度での 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 群でも摂餌量の低下と体重の減少（対照群に対して 80%）がみられ、13 週間試験の濃度としてはやや高すぎると考えられた。これに対し、2500 ppm 群では肝臓と血液系／脾臓への影響がみられるものの、体重増加の抑制や摂餌量の低値は認められなかった。以上の結果から、雄における 13 週間試験の最高用量は 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。

雌では、最高用量の 10000 ppm 群では著しい摂餌量の低下にともない、体重は投与終了時まで継続して減少した。また、肝臓、血液系／脾臓及び鼻腔への影響がみられ、この濃度での 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。これに対し、5000 ppm 群では、肝臓、血液系／脾臓及び鼻腔への影響がみられるものの、投与終了時における体重は対照群との間に差が認められず、摂餌量への影響も少なかった。以上の結果から、雌における 13 週間試験の最高用量は 10000 ppm よりやや低い 8000 ppm と判断し、以下 4000 ppm、2000 ppm 及び 1000 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、8000 ppm と 4000 ppm の間に 6000 ppm を加えた合計 5 段階（8000 ppm、6000 ppm、4000 ppm、2000 ppm、1000 ppm）の濃度を設定した。

## Ⅵ 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. 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

5. 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.

6. 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