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

試験番号：０４１０

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）

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-ニトロベンゼンをマウスに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

試験番号：０４１０

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 …… 6
　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 …… 7
　Ⅱ－2－3　飼育条件 …… 7

Ⅱ－3　観察・検査項目及び方法 …… 8
Ⅱ－3－1　動物の一般状態の観察 …… 8
Ⅱ－3－2　体重測定 …… 8
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 …… 9
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 …… 12
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 …… 14
Ⅲ－9－3　病理組織学的検査 …… 14

Ⅳ　考察及びまとめ …… 16

Ⅴ　文献 …… 20

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:BDF_1 マウス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、雄では、500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、3000 ppm及び4000 ppmとし、雌では1000 ppm、2000 ppm、4000 ppm、6000 ppm及び8000 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。

最高用量である雄の4000 ppm群と雌の8000 ppm群では、雌雄ともに、摂餌量の低下と体重増加の抑制がみられ、特に、雌の8000ppm群では顕著であった。しかし、最高用量を含む全ての投与群で死亡はみられなかった。被験物質投与の影響は、肝臓（中心性の肝細胞の肥大とヘモジデリン沈着、分裂像の増加（雌の8000 ppmのみ）、肝臓重量の増加、血液生化学的パラメータの変化）、血液系／脾臓（血液学的パラメータの変化、脾臓のヘモジデリン沈着と髄外造血、脾臓重量の増加（雄4000 ppmのみ））、鼻腔（嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、腺の呼吸上皮化生、呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化）、鼻咽頭（エオジン好性変化）及び心臓（空胞変性）に認められた。

雄の3000 ppm群と雌の6000 ppm群では、肝臓、血液系／脾臓、鼻腔、鼻咽頭及び心臓（雄の3000 ppmのみ）にほぼ同様の変化がみられた。しかし、摂餌量の低下が雄の3000 ppm群でみられたものの、体重への影響はいずれも軽度であった。

肝臓と鼻腔への影響は、雌雄とも1000 ppmまで、血液系／脾臓への影響は、雄では500 ppm、雌では2000 ppmまで、鼻咽頭への影響は、雄では2000 ppm、雌では1000 ppmまで、心臓への影響は、雄では3000 ppmまで、雌では8000ppmで認められた。従って、最小毒性量（LOAEL）は、雄の血液系への影響（ヘモグロビン濃度の低下）をエンドポイントとして、500 ppm（雄：0.061～0.079 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、雄では3000 ppmを最大耐量と考え、以下、1500 ppm、750 ppm（公比2）に、また、雌では6000 ppmを最大耐量と考え、以下、3000 ppm、1500 ppm（公比2）にそれぞれ設定した。

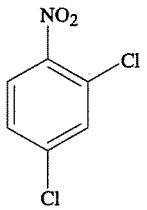
Ⅰ　試験材料

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 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 75 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かった動物から、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：21.5～24.1g、雌：17.5～19.8g）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 12 日から 2000 年 7 月 12 日または 7 月 13 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

雄では、500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、3000 ppm 及び 4000 ppm、雌では 1000 ppm、2000 ppm、4000 ppm、6000 ppm 及び 8000 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 Crj:BDF$_1$ マウス（SPF）の雌雄（各群 5 匹）に、625 ppm、1250 ppm、2500 ppm、5000 ppm 及び 10000 ppm（公比 2.0）の濃度の混餌飼料を 2 週間自由摂取させた。その結果、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、血液系／脾臓及び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伴い、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。

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：84.3%、10000 ppm：88.7%、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）	1000 ppm 群	10 匹　（2101～2110）
1000 ppm 群	10 匹　（1201～1210）	2000 ppm 群	10 匹　（2201～2210）
2000 ppm 群	10 匹　（1301～1310）	4000 ppm 群	10 匹　（2301～2310）
3000 ppm 群	10 匹　（1401～1410）	6000 ppm 群	10 匹　（2401～2410）
4000 ppm 群	10 匹　（1501～1510）	8000 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 209 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）：51.5±2.2%）、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。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。

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。

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、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 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、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 M1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、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、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、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 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。
雌雄ともすべての群に、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、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。雌では、8000 ppm 群では、糞少量が全動物で 1 週目にのみみられた。また、雄の 1000 ppm 群と雌の 2000 ppm 群で、各 1 匹に内部腫瘤が 7 週目以降みられた。

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、4000 ppm 群で 1 週目に投与開始時に比べて減少したが、2 週目以降は増加した。しかし 1、2、3、9、10、12 及び 13 週目に対照群と比較して有意な体重の低値が認められ、それ以外の週でも有意ではないものの、低下傾向が認められた。3000 ppm 群では 1 週目に減少したが、2 週目以降は増加し、ほぼ対照群と同様の推移を示した。2000 ppm 以下の濃度では、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：88%、3000 ppm 群：93%、2000 ppm 群：99%、1000 ppm 群：98%、500 ppm 群：100%であった。
雌では、8000 ppm 群で 1 週目に投与開始時に比べて減少したが、2 週目以降は増加した。しかし全投与期間をにわたり、著しい低値が認められた。6000 ppm 群では 1 週目に減少したが、2 週目以降は増加し、1、2、8、11 及び 12 週目に低値が認められた。4000 ppm 群では 1 週目に減少したが、2 週目以降は増加し、ほぼ対照群と同様の推移を示した。それ以下の濃度では、2000 ppm 群で 4 週目に有意な低値がみられた以外、対照群とほぼ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、8000 ppm 群：74%、6000 ppm 群：94%、4000 ppm 群：98%、2000 ppm 群：99%、1000 ppm 群：102%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、3、6～10、12及び13週目に対照群と比較して有意な摂餌量の低値がみられた。3000 ppm群では1週目と12週目に低値がみられたが、それ以外の週では対照群とほぼ同様の推移を示した。2000 ppm以下の濃度では、対照群との間に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：62～100%、3000 ppm群：81～106%、2000 ppm群：97～103%、1000 ppm群：95～115%、500 ppm群：92～109%の範囲にあった。

雌では、8000 ppm群で全投与期間を通し、摂餌量の著しい低値がみられた。6000 ppm群では2週目以外の週で低値が、4000 ppm群では2、5及び8週目以外の週で低値が、2000 ppm群では2週と4週目に低値が、5週目に高値がみられたが、それ以外の週ではほぼ対照群と同様の推移を示した。1000 ppm群では対照群との間に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、8000 ppm群：36～76%、6000 ppm群：55～88%、4000 ppm群：73～97%、2000 ppm群：74～109%、1000 ppm群：94～106%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。

雄では、全投与群とも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、4000 ppm群：0.453～0.592、3000 ppm群：0.369～0.442、2000 ppm群：0.232～0.309、1000 ppm群：0.128～0.155、500 ppm群：0.061～0.079の範囲にあった。

雌では、4000 ppm群まではほぼ投与濃度に対応した被験物質摂取量を示したが、6000 ppm以上の群では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、8000 ppm群：0.730～1.414、6000 ppm群：0.684～0.976、4000 ppm群：0.556～0.650、2000 ppm群：0.276～0.349、1000 ppm群：0.157～0.172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、ヘマトクリット値及び好酸球比の減少が認められた。赤血球数の減少は2000 ppm群まで、ヘモグロビン濃度の減少は500 ppm群まで認められ、ヘマトクリット値の減少は2000 ppm群でも認められた。その他、

MCV の増加が 2000 ppm と 3000 ppm 群で、MCH の増加が 3000 ppm 群でみられた。

雌では、8000 ppm 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少が認められた。赤血球数とヘモグロビン濃度の減少は 6000 ppm 群まで認められた。その他、MCV の増加が 4000 ppm と 6000 ppm 群で、MCHC の減少が 2000 ppm、4000 ppm 及び 6000 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 TABLE 7, 8、APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、4000 ppm 群でアルブミン、総コレステロール及びリン脂質の増加と CPK の上昇が認められた。リン脂質の増加は 2000 ppm 群まで、総コレステロールの増加は 1000 ppm 群まで認められた。

雌では、8000 ppm 群で総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素及び無機リンの増加と GPT、LDH、ALP 及び CPK の上昇、並びにグルコースとクロールの減少が認められた。総蛋白と A/G 比の増加は 6000 ppm 群まで、アルブミンと尿素窒素の増加は 4000 ppm 群まで、総コレステロールの増加は 2000 ppm 群まで、リン脂質の増加は 1000 ppm 群まで認められた。

Ⅲ－8　尿検査

尿検査の結果を TABLE 9, 10、APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄では、4000 ppm 群で蛋白の陽性度の減少が認められた。

雌では、8000 ppm 群で蛋白の陽性度の減少とケトン体の陽性例の減少がみられ、これらの変化は 4000 ppm 群まで認められた。

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。

雄では、4000 ppm、3000 ppm 及び 2000 ppm 群の全匹に肝臓と脾臓の暗色化が観察された。その他、精巣の萎縮が 4000 ppm 群の 1 匹に、腎臓の水腎症と脾臓の黒色斑が 1000 ppm 群の各 1 匹にみられた。500 ppm 以下の群には変化を認めなかった。

雌では、8000 ppm 群と 6000 ppm 群の全匹に肝臓と脾臓の暗色化が観察された。その他、脾臓の黒色斑が 4000 ppm、1000ppm 及び対照群の各 1 匹に、腎臓の水腎症が 2000 ppm 群の 1 匹にみられた以外、変化を認めなかった。

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 11, 12（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、肝臓と脾臓の実重量と体重比、腎臓の体重比の高値が認められた。腎臓の体重比の高値は 3000 ppm 群まで、脾臓の実重量と体重比の高値は 2000 ppm 群まで、肝臓の実重量と体重比の高値は 1000 ppm 群まで認められた。その他、解剖時体重の差に伴う、体重比の統計学的な有意差が肺と脳に示された。

＜雌＞

8000 ppm 群では、肝臓の実重量と体重比の高値が認められた。これらの高値は 2000 ppm 群までみられた。6000 ppm 群では、脾臓の実重量と体重比の高値が認められた。これらの高値は 4000 ppm 群までみられた。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、副腎、卵巣、心臓、肺、腎臓及び脳に示された。

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 13, 14、APPENDIX K 1, 2 に示した。

雌雄とも、鼻腔、鼻咽頭、肝臓、脾臓及び心臓に被験物質投与による影響が観察された。

＜雄＞

4000 ppm 群と 3000 ppm 群では、鼻腔に嗅上皮の萎縮（4000 ppm 群：軽度 7 匹、3000 ppm 群：軽度 8 匹）と呼吸上皮化生（4000 ppm 群：軽度 9 匹、3000 ppm 群：軽度 5 匹）、腺の呼吸上皮化生（4000 ppm 群：軽度 8 匹、3000 ppm 群：軽度 5 匹）、呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化（4000 ppm 群：呼吸上皮、嗅上皮とも軽度 10 匹、3000 ppm 群：呼吸上皮；軽度 9 匹と中等度 1 匹、嗅上皮；軽度 9 匹）がみられた。また、鼻咽頭にもエオジン好性変化（4000 ppm 群：中等度 10 匹、3000 ppm 群：軽度 6 匹と中等度 4 匹）が観察された。肝臓には中心性の肝細胞の肥大（4000 ppm 群：軽度 2 匹と中等度 8 匹、3000 ppm 群：軽度 9 匹と中等度 1 匹）とヘモジデリン沈着（両群とも軽度 10 匹）が認められた。脾臓のヘモジデリン沈着（4000 ppm 群：中等度 8 匹と重度 2 匹、3000 ppm 群：中等度 10 匹）と髄外造血（両群とも中等度 10 匹）の程度は対照群（両所見とも軽度 10 匹）に比較して増強した。また、心臓の空胞変性が両群とも各 2 匹（軽度）に観察された。

2000 ppm 群では、鼻腔に嗅上皮の萎縮（軽度 4 匹）、及び呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化（呼吸上皮：軽度 8 匹と中等度 1 匹、嗅上皮：軽度 2 匹）がみられた。また、鼻咽頭にもエオジン好性変化（軽度 3 匹）がみられた。脾臓のヘモジデリン沈着と髄外造血（両所見とも軽度 1 匹、中等度 9 匹）の程度も増強した。

1000 ppm 群では、鼻腔に呼吸上皮のエオジン好性変化が 2 匹（軽度）でみられた。

500 ppm 群では、対照群と比較して、特記すべき病理組織学的所見の変化はみられなかった。

＜雌＞

8000 ppm 群では、鼻腔に嗅上皮の萎縮（中等度 10 匹）と呼吸上皮化生（軽度 10 匹）、腺の呼吸上皮化生（中等度 10 匹）、及び嗅上皮のエオジン好性変化（中等度 4 匹、重度 6 匹）がみられ、呼吸上皮のエオジン好性変化の発生（軽度 5 匹）も対照群（軽度 1 匹）に比較して増加した。また、鼻咽頭にもエオジン好性変化（中等度 3 匹、重度 7 匹）がみられた。肝臓には中心性の肝細胞の肥大（中等度 10 匹）とヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）が認められ、分裂像の増加（軽度）も 3 匹で観察された。脾臓のヘモジデリン沈着（重度 10 匹）と髄外造血（中等度 10 匹）の程度は対照群（両所見とも軽度 10 匹）に比較して増強した。また、心臓の空胞変性が 1 匹（中等度）に観察された。

6000 ppm 群と 4000 ppm 群でも、鼻腔に嗅上皮の萎縮（6000 ppm 群：中等度 10 匹、4000 ppm 群：軽度 10 匹）と呼吸上皮化生（6000 ppm 群：軽度 10 匹、4000 ppm 群：軽度 9 匹と中等度 1 匹）、腺の呼吸上皮化生（6000 ppm 群：中等度 10 匹、4000 ppm 群：軽度 4 匹と中等度 6 匹）、及び嗅上皮のエオジン好性変化（6000 ppm 群：中等度 10 匹、4000 ppm 群：軽度 6 匹と中等度 4 匹）がみられ、呼吸上皮のエオジン好性変化の発生（6000 ppm 群：軽度 9 匹と中等度 1 匹、4000 ppm 群：軽度 3 匹と中等度 7 匹）も増加した。また、鼻咽頭にもエオジン好性変化（6000 ppm 群：中等度 5 匹と重度 5 匹、4000 ppm 群：中等度 9 匹と重度 1 匹）がみられた。肝臓では中心性の肝細胞の肥大（6000 ppm 群：軽度 1 匹と中等度 9 匹、4000 ppm 群：軽度 9 匹）とヘモジデリン沈着（両群とも軽度 10 匹）が認められ、6000 ppm 群の 1 匹には分裂像の増加（軽度）が観察された。脾臓のヘモジデリン沈着（6000 ppm 群：重度 10 匹、4000 ppm 群：中等度 8 匹と重度 2 匹、）と髄外造血（両群とも中等度 10 匹）の程度も増強した。

2000 ppm 群では、鼻腔に嗅上皮の萎縮（軽度 8 匹）と嗅上皮のエオジン好性変化（軽度 6 匹）の発生、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度 4 匹、中等度 6 匹）の増加が認められ、また、嗅上皮の呼吸上皮化生が 1 匹（軽度）、嗅腺の呼吸上皮化生が 2 匹（軽度）で観察された。鼻咽頭にはエオジン好性変化（軽度 4 匹、中等度 4 匹）がみられた。脾臓のヘモジデリン沈着（中等度 10 匹）の程度も増強した。

1000 ppm 群にも鼻腔の呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度 8 匹、中等度 1 匹）の増加が認められた。また、鼻咽頭にはエオジン好性変化が 1 匹（軽度）で観察された。

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 Crj:BDF_1 マウス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、雄では、500 ppm、1000 ppm、2000 ppm、3000 ppm 及び 4000 ppm とし、雌では 1000 ppm、2000 ppm、4000 ppm、6000 ppm 及び 8000 ppm とした。

（1）用量－反応関係

＜雄＞

4000 ppm 群では、摂餌量の低下と体重増加の抑制が、投与期間の多くの週で認められたが、最高用量を含む全投与群で死亡はみられなかった。肝臓への影響として、中心性の肝細胞の肥大とヘモジデリン沈着がみられ、肝臓重量の高値及び総コレステロール、リン脂質及びアルブミンの増加が認められた。血液系／脾臓への影響として、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少がみられ、貧血が示唆された。脾臓では、脾臓重量の高値、ヘモジデリン沈着と髄外造血の程度の増強がみられ、これらの増強と脾臓重量の高値は、脾臓での赤血球崩壊と貧血に対する補償性反応の亢進を反映していると考えられた。鼻腔への影響として、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、腺の呼吸上皮化生、呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化がみられた。鼻咽頭にもエオジン好性変化が観察された。心臓への影響として、心筋線維の空胞変性が 2 匹であるが認められ、CPK の上昇がみられた。

3000 ppm 群では、摂餌量の低下がみられたが、体重への影響はごく軽度であった。肝臓への影響として、中心性の肝細胞の肥大とヘモジデリン沈着、肝臓重量の高値、総コレステロールとリン脂質の増加がみられた。血液系／脾臓への影響として、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、脾臓でヘモジデリン沈着と髄外造血の程度の増強、脾臓重量の高値がみられた。鼻腔では、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、腺の呼吸上皮化生、呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化がみられた。鼻咽頭にもエオジン好性変化が観察された。心臓では、心筋線維の空胞変性が 2 匹認められた。

2000 ppm 群では、肝臓で重量の高値、総コレステロールとリン脂質の増加が、血液系／脾臓で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少、脾臓でヘモジデリン沈着と髄外造血の程度の増強と脾臓重量の高値が、鼻腔で嗅上皮の萎縮、呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化が、鼻咽頭でエオジン好性変化が観察された。

1000 ppm 群では、肝臓で重量の高値と総コレステロールの増加が、血液系でヘモグロビン濃度の減少が、鼻腔で呼吸上皮のエオジン好性変化（2 匹）が認められた。なお、一般状態の観察で、内部腫瘤が 7 週目以降 1 匹に観察されたが、剖検及び病理組織学的検査より、

水腎症によるものであった。

500 ppm 群では、ヘモグロビン濃度の減少が認められた。

<雌>

8000 ppm 群では、摂餌量の著しい低下と体重増加の抑制が投与期間を通してみられたが、最高用量を含む全投与群で死亡はみられなかった。肝臓への影響として、中心性の肝細胞の肥大とヘモジデリン沈着、分裂像の増加（3 匹）及び肝臓重量（実重量と体重比）の高値がみられた。また、総コレステロール、リン脂質、アルブミン、総蛋白、総ビリルビン及び A/G 比の増加、GPT、LDH、ALP の上昇がみられた。血液系／脾臓への影響として、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少がみられ、脾臓では、ヘモジデリン沈着と髄外造血の程度の増強がみられた。鼻腔への影響として、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、腺の呼吸上皮化生、嗅上皮のエオジン好性変化がみられ、呼吸上皮のエオジン好性変化の発生も対照群に比較して増加した。鼻咽頭にもエオジン好性変化が観察された。心臓への影響として、心筋線維の空胞変性が 1 匹であるが認められ、CPK の上昇がみられた。腎臓への影響を示唆する変化として、尿素窒素と無機リンの増加、クロールの減少がみられた。その他、グルコースの減少がみられたが、摂餌量の減少による変化と推察された。

6000 ppm 群では、摂餌量の低下が多くの週でみられたが、体重への影響はごく軽度であった。肝臓では、中心性の肝細胞の肥大とヘモジデリン沈着、分裂像の増加（1 匹）、肝臓重量の高値、総コレステロール、リン脂質、アルブミン、総蛋白及び A/G 比が増加がみられた。血液系／脾臓では、赤血球数とヘモグロビン濃度の減少、脾臓でヘモジデリン沈着と髄外造血の程度の増強、脾臓重量の高値がみられた。鼻腔では、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、腺の呼吸上皮化生、嗅上皮と呼吸上皮のエオジン好性変化がみられた。鼻咽頭にもエオジン好性変化が観察された。その他、尿素窒素の増加がみられた。

4000 ppm 群では、摂餌量の低下が認められた。肝臓で中心性の肝細胞の肥大とヘモジデリン沈着、肝臓重量の高値、総コレステロール、リン脂質及びアルブミンの増加が、脾臓でヘモジデリン沈着と髄外造血の程度の増強、脾臓重量の高値が、鼻腔で嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、腺の呼吸上皮化生、嗅上皮と呼吸上皮のエオジン好性変化が、鼻咽頭でエオジン好性変化が観察された。その他、尿素窒素の増加がみられた。

2000 ppm 群では、肝臓で重量の高値、総コレステロールとリン脂質の増加が、脾臓でヘモジデリン沈着の程度の増強が、鼻腔で嗅上皮の萎縮とエオジン好性変化、呼吸上皮のエオジン好性変化、嗅上皮の呼吸上皮化生（1 匹）、腺の呼吸上皮化生（2 匹）が、鼻咽頭でエオジン好性変化が観察された。また、内部腫瘤が 7 週目以降 1 匹に観察されたが、剖検及び病理組織学的検査より、水腎症によるものであった。

1000 ppm 群では、リン脂質の増加、鼻腔で呼吸上皮のエオジン好性変化、鼻咽頭にもエオジン好性変化（1 匹）が認められた。

また、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が、1000 ppm 以上の群で、投与

期間を通して観察された。

その他、定期解剖時の剖検観察で、雄では2000 ppm以上の群、雌では6000 ppm以上の群の全匹に肝臓と脾臓の暗色化が観察された。本試験と同時に実施したメトヘモグロビン濃度測定検討試験（試験番号：3074（マウスでの採血量が少ないため、本試験における血液学的検査での検査項目としては実施せず、本試験の余剰動物を用いた））において、メトヘモグロビン濃度の増加傾向（雄；対照群：0.3%、500 ppm群：0.3%、1000 ppm群：0.3%、2000 ppm群：0.4%、3000 ppm群：0.5%、4000 ppm群：1.0%；2000 ppmと3000 ppm群はn=3匹、その他の群はn=2匹、　雌；対照群：0.3%、1000 ppm群：0.3%、2000 ppm群：0.3%、4000 ppm群：0.7%、6000 ppm群：0.9%、8000 ppm群：1.1%；6000 ppmと8000 ppm群はn=3匹、その他の群はn=2匹）が認められた。肝臓と脾臓の暗色化は、メトヘモグロビン濃度の増加と関係すると推察された。

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、体重増加の抑制が雄では4000 ppm、雌では8000 ppmで認められた。また、雌雄ともに、肝臓、血液系／脾臓、鼻腔、鼻咽頭及び心臓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、雄では、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の増加が認められた1000 ppm、2）血液系への影響は、ヘモグロビン濃度の低下が認められた500 ppm、3）鼻腔への影響は、呼吸上皮のエオジン好性変化が認められた1000 ppm、4）鼻咽頭への影響は、エオジン好性変化が認められた2000 ppm、5）心臓への影響は、空胞変性が認められた3000 ppmであった。

雌では、1）肝臓への影響は、血漿のリン脂質の増加が認められた1000 ppm、2）血液系／脾臓への影響は、脾臓でのヘモジデリン沈着の増加が認められた2000 ppm、3）鼻腔への影響は、呼吸上皮のエオジン好性変化が認められた1000 ppm、4）鼻咽頭への影響は、エオジン好性変化が認められた 1000 ppm、 5）心臓への影響は、空胞変性が認められた8000 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、雄の血液系への影響をエンドポイントとして、500 ppm（雄：0.061～0.079 g/kg/day）であると考えられた。

（3）他の文献との比較

① 1000ppm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 7）。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 8）。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 本試験と同時に実施したメトヘモグロビン濃度測定検討試験（試験番号 3074）では、投与濃度に対応したメトヘモグロビン濃度の増加傾向が認められ、本試験でも血液学的指標値の貧血性変化及び脾臓のヘモジデリン沈着と髄外造血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 9）。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 8000 ppm 群でわずか 1.1%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。

雄では最高投与群の 4000 ppm 群では、体重増加の抑制（12%）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、血液系／脾臓、鼻腔、鼻咽頭及び心臓への影響が認められた。3000 ppm 群では体重への影響はごく軽度であり、肝臓、血液系／脾臓、鼻腔、鼻咽頭及び心臓に投与による影響がみられたものの、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。

雌では、8000 ppm 群では、顕著な体重増加の抑制（26%）と摂餌量の低下が認められた。被験物質投与の影響として、肝臓、血液系／脾臓、鼻腔、鼻咽頭及び心臓への影響が認められた。6000 ppm 群では体重への影響はごく軽度であり、肝臓、血液系／脾臓、鼻腔及び鼻咽頭に投与による影響がみられたものの、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、6000 ppm をがん原性試験の最大耐量と考え、以下、3000 ppm、1500 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），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. 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.

8. 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

9. 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