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

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

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 …… 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 …… 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 …… 13
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 …… 16

Ⅴ　文献 …… 19

要　約

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの F344/DuCrj（Fischer）ラット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、雌雄とも各 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みられた。被験物質投与の影響は、肝臓（雌雄とも中心性の変性、血液生化学的パラメータの変化等）、腎臓（雌雄とも近位尿細管の壊死と好塩基性変化、血液生化学的パラメータの変化等）、血液系／脾臓（雌雄とも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、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）、小脳（顆粒細胞の変性）、精巣（精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現）及び卵巣（重量低下）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た。体重増加の抑制は、雄では顕著であったが、雌では軽度であった。2500 ppm 群では、ごく軽度の体重増加の抑制が雄にみられた。肝臓と腎臓への影響（雌雄とも肝臓と腎臓の重量増加、雄に腎臓の好酸体の増加）は、雌雄とも本試験の最低用量である 625 ppm まで認められた。また、血液系への影響は、雌雄とも 2500 ppm まで、鼻腔への影響は、雌雄とも 5000 ppm まで、小脳への影響は、雌雄とも 10000 ppm、精巣への影響は 10000 ppm、卵巣への影響は 1250 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、625 ppm（雄；0.050～0.056 g/kg/day、雌；0.052～0.056 g/kg/day）であると考えられた。

また、雌雄とも 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、全投与群で観察された。

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

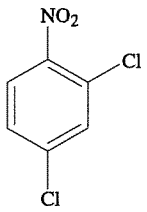
Ⅰ　試験材料

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、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 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 38 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：117～131g、雌：93～101g）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

1999 年 12 月 7 日から 1999 年 12 月 21 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 F344/DuCrj（Fischer）ラット（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、9000 ppm 群では、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、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、ラット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、95.1～99.5%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）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%、冷蔵保管（15 日間）では、200 ppm：104%、10000 ppm：91.0%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 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 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）：22.3±0.3℃）、設定湿度55±15%（実測値（平均±標準偏差）：55.7±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、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。

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、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。

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 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、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 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、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 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。
雄では、全投与群で、黄色尿が全動物に投与期間を通してみられた。5000 ppm以上の群では尿による外陰部周囲の汚染（5000 ppm群：1匹、10000 ppm群：2匹）がみられた。10000 ppm群では糞小粒が1匹、糞少量が4匹にみられた。
雌では、全投与群で、黄色尿が全動物に投与期間を通してみられた。2500 ppm以上の群では、尿による外陰部周囲の汚染（2500 ppm群：1匹、5000 ppm群：3匹、10000 ppm群：4匹）がみられた。10000 ppm群では、糞小粒が2匹にみられた。

Ⅲ－3　体重

体重の推移をTABLE 1, 2、FIGURE 1, 2、APPENDIX B 1, 2に示した。
10000 ppm群では、雌雄とも投与終了日まで体重が減少し、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。5000 ppm群では、雌雄とも投与3日目の体重は投与開始時より減少し、それ以降は増加したものの、全投与期間にわたり低値が認められた。2500 ppm群では、雄で投与14日目にのみ低値がみられ、雌では、対照群とほぼ同様の推移を示した。1250 ppm以下の群では、雌雄とも有意な差はみられなかった。なお、投与最終日の体重は対照群と比較して、雄では、10000 ppm群：46%、5000 ppm群：77%、2500 ppm群：94%、1250 ppm群：96%、625 ppm群：101%、雌では、10000 ppm群：57%、5000 ppm群：90%、2500 ppm群：99%、1250 ppm群：100%、625 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。
雌雄とも、10000 ppmと5000 ppm群では、全投与期間にわたり、対照群と比較して有意な摂餌量の低値を示し、特に10000 ppm群の低下が顕著であった。2500 ppm群では、雄で投与3日目にのみ低値が、雌では、投与3日目と7日目に低値が認められた。1250 ppm

群では、雄では有意な差はみられなかったが、雌では、投与 3 日目にのみ低値が認められた。625 ppm 群では、雌雄とも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、雄では、10000 ppm 群：26～49%、5000 ppm 群：58～85%、2500 ppm 群：87～100%、1250 ppm 群：94～99%、625 ppm 群：98～103%、雌では、10000 ppm 群：32～54%、5000 ppm 群：62～90%、2500 ppm 群：89～96%、1250 ppm 群：91～98%、625 ppm 群：91～96%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、5000 ppm 群までは、ほぼ公比どおりの被験物質摂取量を示したが、10000 ppm 群では、体重増加の抑制と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：0.319～0.673、5000 ppm 群：0.300～0.442、2500 ppm 群：0.204～0.221、1250 ppm 群：0.098～0.109、625 ppm 群：0.050～0.056、雌では、10000 ppm 群：0.379～0.863、5000 ppm 群：0.325～0.448、2500 ppm 群：0.205～0.216、1250 ppm 群：0.108～0.112、625 ppm 群：0.052～0.056 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 群で赤血球数、ヘマトクリット値、メトヘモグロビン濃度及び分葉核好中球比の増加、プロトロンビン時間の延長、並びに MCV、MCH、MCHC 及び血小板数の減少が認められた。MCV の減少とメトヘモグロビン濃度の増加傾向は 5000 ppm 群まで、MCH と MCHC の減少は 2500 ppm 群まで認められた。なお、網赤血球数は 2500 ppm 群で増加し、10000 ppm 群では減少傾向が認められた。

雌では、10000 ppm 群で赤血球数、メトヘモグロビン濃度及び分葉核好中球比の増加、プロトロンビン時間の延長、並びに MCV、MCH、MCHC、血小板数及びリンパ球比の減少、網赤血球数の減少傾向が認められた。メトヘモグロビン濃度の増加と MCV、血小板数の減少は 5000 ppm 群まで、MCH と MCHC の減少は 2500 ppm 群まで認められた。その他、ヘモグロビン濃度の減少が 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、尿素窒素及びクロールの増加、GOT、GPT、LDH及びγ-GTPの上昇、並びに総蛋白、アルブミン、A/G比、グルコース及びカルシウムの減少が認められた。総ビリルビンと総コレステロールの増加、グルコースの減少は5000 ppm群まで認められた。また、総蛋白とアルブミンは、1250 ppm群では増加を示した。その他、CPKの低下が2500 ppm群で、リン脂質の増加が5000 ppm群でみられた。

雌では、10000 ppm群で総ビリルビンとクロールの増加、GOT、GPT、γ-GTPの上昇、並びに総蛋白、A/G 比、グルコース及びカルシウムの減少が認められた。また、総コレステロールの増加が5000 ppm、2500 ppm及び1250 ppm群で、リン脂質の増加が5000 ppm群でみられた。

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。

雌雄とも10000 ppm群の全匹に胸腺の萎縮が観察された。その他、雌で対照群と投与群に肝臓のヘルニアがみられたが、先天奇形であり、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、全臓器とも実重量の低値が認められた。体重比については、胸腺に低値が、副腎、心臓、肺、腎臓、肝臓及び脳に高値が認められた。

5000 ppm群では、肝臓と腎臓に体重比の高値が認められた。また、解剖時体重の低下にともなって、胸腺、心臓、肺及び脾臓に実重量の低値が、脳に体重比の高値が認められた。

2500 ppm群では、肝臓と腎臓に実重量と体重比の高値が認められた。

1250 ppm群では、肝臓に実重量と体重比の高値、腎臓に体重比の高値が認められた。

625 ppm群では、肝臓と腎臓に実重量と体重比の高値が認められた。

雌では、10000 ppm群は肝臓に体重比の高値が認められた。また、解剖時体重が顕著に

低く、肝臓以外の臓器に実重量の低値が認められ、これらの臓器の体重比については胸腺と卵巣に低値が、心臓、肺、腎臓及び脳に高値が示された。

5000 ppm 群では、肝臓と腎臓に実重量と体重比の高値、卵巣に実重量と体重比の低値が認められた。また、脳に体重比の高値が示された。

2500 ppm 群と 1250 ppm 群では肝臓に実重量と体重比の高値、腎臓に実重量の高値、卵巣に実重量と体重比の低値が認められた。

625 ppm 群では肝臓と腎臓に実重量と体重比の高値が認められた。

その他、雌の 2500 ppm 群の脳に実重量の高値が統計学的に示されたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

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、腎臓、脾臓、骨髄、胸腺及び小脳、また、雄では精巣と精巣上体にも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（軽度 5 匹）、嗅腺の萎縮（中等度 5 匹）と管拡張（軽度 4 匹）がみられた。肝臓には中心性の変性（重度 5 匹）、腎臓には近位尿細管の壊死（軽度 1 匹、中等度 3 匹）と好塩基性変化（軽度 2 匹、中等度 2 匹）が観察された。また、脾臓に赤血球充満（中等度 5 匹）とヘモジデリン沈着（軽度 5 匹）、骨髄に造血低下（中等度 5 匹）、胸腺に萎縮（軽度 5 匹）が認められた。さらに、小脳に顆粒細胞の変性（中等度 5 匹）、精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現（軽度 1 匹、中等度 4 匹）が観察された。なお、膀胱の出血（中等度）が 1 匹で観察された。

5000 ppm 群では、鼻腔に嗅腺の萎縮（軽度 2 匹）、肝臓に中心性の変性（中等度 4 匹、重度 1 匹）、脾臓に赤血球充満（軽度 5 匹）、骨髄に造血低下（軽度 4 匹）がみられた。

2500 ppm 以下の群では、625 ppm 群まで全匹の腎臓に中等度から重度の好酸体の出現がみられ、対照群の発生（軽度 2 匹）に比較して増加が認められた。

なお、10000 ppm 群と 1250 ppm 群の各 1 匹に精巣の精原細胞の壊死と精巣上体の精子の減少が観察された。

＜雌＞

10000 ppm 群では、鼻腔に嗅上皮の壊死（軽度 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。肝臓には中心性の変性（中等度 1 匹、重度 4 匹）、腎臓には近位尿細管の壊死（軽度 3 匹）と好塩基性変化（軽度 4 匹）が観察された。また、脾臓に赤血球充満（中等度 5 匹）とヘモジデリン沈着（軽度 5 匹）、骨髄に造血低下（中等度 5 匹）、胸腺に萎縮（軽度 5 匹）が認められた。さらに、小脳に顆粒細胞の変性（中等度 5 匹）がみられた。

5000 ppm 群では、鼻腔の嗅腺の萎縮が 1 匹（軽度）でみられた。肝臓には中心性の変性（軽度 3 匹、中等度 2 匹）、腎臓には近位尿細管の壊死（軽度 4 匹）と好塩基性変化（軽度 1 匹、中等度 3 匹）が観察された。また、脾臓に赤血球充満（軽度 3 匹）、骨髄には造血低下（軽度 5 匹）が認められた。

2500 ppm 以下の群では、対照群と比較して、特記すべき病理組織学的所見はみられなかった。

Ⅳ　考察及びまとめ

2,4-ジクロロ-1-ニトロベンゼンの F344/DuCrj（Fischer）ラット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、雌雄とも糞小粒、尿による外陰部周囲の汚染、糞少量等がみられ、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、剖検と病理組織学的検査では、胸腺の萎縮が全匹に観察された。血液生化学的検査では、雌雄ともグルコース、総蛋白及び A/G 比の減少、雄ではアルブミンの減少もみられ、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／脾臓への影響として、雌雄とも血小板数、網赤血球比、MCV、MCH 及び MCHC の減少、プロトロンビン時間の延長がみられた。これらの変化は、骨髄の造血低下がみられたことから、造血機能の低下を示す変化と推察された。また、雌雄ともに赤血球数が増加し、雄ではヘマトクリット値も増加した。これらは、動物の脱水等による血液濃縮の影響も反映していると考えられる。さらに、雌雄とも脾臓に赤血球の充満とヘモジデリン沈着がみられ、脾臓での赤血球崩壊を示す変化と思われた。また、メトヘモグロビン濃度の増加も認められたが、その程度は雄で 1.7%、雌で 1.5%であった。肝臓への影響として、雌雄とも中心性の変性が全匹にみられ、総ビリルビンの増加と GOT、GPT 及び γ-GTP の上昇も認められた。また、雄では、総コレステロールの増加もみられ、雌では、肝臓重量で体重比が高値を示した。腎臓への影響として、雌雄とも近位尿細管の壊死と好塩基性変化、クロールの増加、雄では、尿素窒素の増加もみられた。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みられた。また、小脳への影響として、雌雄とも顆粒細胞の変性がみられた。その他、雄では、精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現が観察された。また、雌の卵巣に実重量だけでなく体重比でも低値が示された。卵巣では病理組織学的に変化が認められないが、重量低下は投与濃度に対応した変化であり、被験物質投与による卵巣への影響が示唆された。

5000 ppm 群では、雌雄とも摂餌量の減少がみられ、体重増加の抑制は、雄では顕著であったが、雌では軽度であった。摂餌量の減少と体重増加の抑制にともない、雄では、胸腺、心臓、肺及び脾臓の実重量が低下し、グルコースの減少がみられた。血液系／脾臓への影響

として、雌雄ともMCV、MCH及びMCHCの僅かな減少、メトヘモグロビン濃度の増加、脾臓に赤血球充満、骨髄に造血低下、雌では、ヘモグロビン濃度と血小板数の僅かな減少が認められた。肝臓への影響として、雌雄とも中心性の変性が全匹にみられ、肝臓重量は、雄では体重比、雌では実重量と体重比の高値が示された。また、雌雄とも総コレステロールとリン脂質の増加、雄では、総ビリルビンの増加も認められた。腎臓への影響として、雌では近位尿細管の壊死と好塩基性変化及び腎臓重量（実重量と体重比）の高値、雄では体重比の高値が認められた。鼻腔への影響として、雌雄とも嗅腺の萎縮（雄2匹、雌1匹）が観察された。その他、卵巣重量（実重量と体重比）が低値を示した。

2500 ppm群では、雄で僅かな体重増加の抑制が認められた。血液系への影響として、雌雄ともMCHとMCHCの僅かな減少が認められた。肝臓への影響として、雌雄とも肝臓重量（実重量と体重比）が高値を示し、雌では、総コレステロールの増加がみられた。腎臓への影響として、雌雄とも実重量の高値、雄では体重比の高値もみられ、雄では中等度から重度の好酸体の出現が観察された。その他、卵巣重量（実重量と体重比）が低値を示した。

1250 ppm群では、雌雄とも肝臓重量（実重量と体重比）の高値、雌では、総コレステロールの増加がみられた。腎臓では、雄で体重比の高値と好酸体の出現の増加、雌で実重量の高値がみられた。その他、卵巣重量（実重量と体重比）が低値を示した。

625 ppmでは、雌雄ともに肝臓重量（実重量と体重比）と腎臓重量（実重量と体重比）の高値がみられ、雄では、腎臓の好酸体の出現が増加した。

なお、黄色尿が、雌雄とも投与群の全匹に投与期間を通して観察された。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、体重増加の抑制は、雄では2500 ppm、雌では5000 ppmまで認められた。それに加えて、肝臓、腎臓、血液系／脾臓、鼻腔、小脳、精巣及び卵巣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、雌雄とも肝臓重量の増加が認められた625 ppm、2）腎臓への影響は、雌雄とも腎臓重量の増加と雄に好酸体の増加が認められた625 ppm、3）血液系への影響は、雌雄とも赤血球のパラメーターであるMCHとMCHCの減少が認められた2500 ppm、4）鼻腔への影響は、雌雄とも嗅腺の萎縮の発生が認められた5000 ppm、5）小脳への影響は、雌雄とも顆粒細胞の変性がみられた10000 ppm、6）精巣への影響は、精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現がみられた10000 ppm、7）卵巣への影響は、卵巣重量の低下が認められた1250 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 625 ppm（雄；0.050～0.056 g/kg/day、雌；0.052～0.056 g/kg/day）であると考えられた。

(3) 他の文献との比較

625 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 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以下のように設定した。

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、肝臓、腎臓、血液系／脾臓、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。

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. 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