

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

試験番号：0329

CAS No. 89-61-2

2003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

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

試験番号：0329

本 文

本文目次

頁

要約	1
I 試験材料	
I-1 被験物質の性状等	
I-1-1 名称等	4
I-1-2 構造式、示性式、分子量	4
I-1-3 物理化学的性状等	4
I-2 被験物質の使用ロット等	4
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	
I-3-1 特性・同一性	5
I-3-2 安定性	5
I-4 試験動物	5
II 試験方法	
II-1 投与	
II-1-1 投与経路	6
II-1-2 被験物質の投与方法	6
II-1-3 投与期間	6
II-1-4 投与濃度	6
II-1-5 投与方法、投与期間、投与濃度及びその設定理由	6
II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法	7
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	7
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	8

Ⅱ-2 動物管理

Ⅱ-2-1 各群の使用動物数	8
Ⅱ-2-2 群分け及び個体識別方法	8
Ⅱ-2-3 飼育条件	9

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	9
Ⅱ-3-2 体重測定	9
Ⅱ-3-3 摂餌量測定	10
Ⅱ-3-4 血液学的検査	10
Ⅱ-3-5 血液生化学的検査	10
Ⅱ-3-6 尿検査	10
Ⅱ-3-7 病理学的検査	10

Ⅱ-4 数値処理と統計処理

Ⅱ-4-1 数値の取り扱いと表示	11
Ⅱ-4-2 母数の取り扱い	12
Ⅱ-4-3 統計処理	12

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況	14
Ⅲ-2 一般状態	14
Ⅲ-3 体重	14
Ⅲ-4 摂餌量	14
Ⅲ-5 被験物質摂取量	15
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	19

IV	考察及びまとめ	20
IV-1	腫瘍性及び腫瘍関連性病変	20
IV-2	非腫瘍性病変	22
IV-3	無毒性量(NOEL)/最小毒性量(LOEL)及びベンチマーク用量	22
IV-4	他文献との比較等	23
V	結論	23
VI	文献	24

要約

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのがん原性を検索する目的でマウス (Crj:BDF₁) 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、1,4-ジクロロ-2-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、雌雄とも320 ppm、800 ppm、2000 ppm (公比2.5) 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。

試験終了時の生存率は、対照群と比べて、雄の320 ppm群で高値を、雌雄の2000 ppm群で低値を示した。体重は、雄の2000 ppm群の投与期間13~38週と後半及び雌の2000 ppm群の投与期間後半に有意な低下を示した。全ての投与群の摂餌量は、雌雄とも対照群と同様な推移を示した。また、雌雄ともに320ppm群まで、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの代謝物である *N*-アセチル-*S*-(4-クロロ-3-ニトロフェニル)-*L*-システインに起因する黄色尿がみられた。

腫瘍性病変として、雄マウスに肝細胞癌と肝芽腫、雌マウスに肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められた。雄の肝細胞癌の発生率は2000 ppm群、肝芽腫の発生率は320ppm群まで、雌の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生率は800 ppm以上の群で増加した。また、これらの腫瘍発生数は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲より明らかに高い値であった。従って、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与により肝臓に悪性腫瘍を含む腫瘍の明らかな増加があると考察された。これに加えて、雌の2000 ppm群では少数例であったが肝芽腫の発生もみられた。また、前腫瘍性病変の好酸性小増殖巣の発生が雄の800 ppm以上の群で増加した。肝臓腫瘍の発生以外にも、肝臓への影響として中心性の肝細胞の肥大、肝臓重量の増加、血液生化学的検査の変化 (総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質の増加、GOT、GPT、 γ -GTP の上昇等) が観察された。中心性の肝細胞の肥大は雌雄とも320 ppmまでみられた。また、肝細胞肥大は異型性を伴っており肝臓腫瘍の形成に関与することが示唆された。肝臓重量の増加や血液生化学検査の変化は主に腫瘍発生の増加がみられる800 ppm以上の群で示されたが、雌のGPTの上昇は320ppm群まで認められた。その他、鼻腔、血液系及び腎臓に1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による影響を示す変化がみられた。

2年間の経口投与による1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの最小毒性量 (LOAEL) は、雌雄の異型を伴う肝細胞肥大及び雌のGPTの上昇等の肝臓への影響をエンドポイントとして、320 ppm (雄0.028~0.053、雌0.037~0.060 g/kg body weight/day) であると考察された。また、投与用量と異型性の肝細胞肥大との用量-反応関係から、10%ベンチマーク用量 (BMDL₁₀) は59.0 ppmと算出された。

以上のように、Crj:BDF₁ マウスを用いて 1,4-ジクロロ-2-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、雄マウスに肝細胞癌と肝芽腫、雌マウスに肝細胞腺腫と肝細胞癌の顕著な発生増加が認められ、これらの結果は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの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。

1,4-ジクロロ-2-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	320	800	2000	ペト- 検定	コラン- アミテージ 検定
検査動物数			49	50	50	50		
良性腫瘍	肝臓 ハート-腺	肝細胞腺腫 腺腫	17	21	20	16		
			2	8*	0	4		
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌 肝芽腫	15	15	23	31**	↑ ↑	↑ ↑
			1	10**	12**	25**	↑ ↑	↑ ↑
	肝臓	肝細胞癌+肝芽腫 肝細胞腺腫+肝細胞癌+ 肝芽腫	16	23	31**	41**	↑ ↑	↑ ↑
			26	34	41**	45**	↑ ↑	↑ ↑

1,4-ジクロロ-2-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	320	800	2000	ペト- 検定	コラン- アミテージ 検定
検査動物数			50	50	50	50		
良性腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	5	5	17**	16**	↑ ↑	↑ ↑
	全臓器	血管腫	5	3	6	0*		
悪性腫瘍	肝臓	肝細胞癌 肝芽腫	1	3	15**	31**	↑ ↑	↑ ↑
			0	0	0	2		
	肝臓	肝細胞癌+肝芽腫 肝細胞腺腫+肝細胞癌+ 肝芽腫	1	3	15**	33**	↑ ↑	↑ ↑
			6	8	29**	39**	↑ ↑	↑ ↑

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

*: $p \leq 0.05$ で有意

** : $p \leq 0.01$ で有意

(フィッシャー検定)

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加

↑ ↑ : $p \leq 0.01$ で有意増加

(ペト-、コラン-アミテージ 検定)

↓ : $p \leq 0.05$ で有意減少

↓ ↓ : $p \leq 0.01$ で有意減少

(コラン-アミテージ 検定)

a) : 検査動物数 49、他は上段に表示の検査動物数と同じ

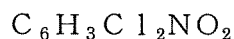
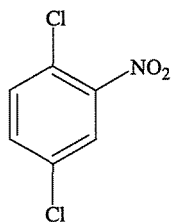
I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (1,4-Dichloro-2-nitrobenzene)
 別 名 : 2,5-ジクロロ-1-ニトロベンゼン (2,5-Dichloro-1-nitrobenzene)
 IUPAC名 : 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (1,4-Dichloro-2-nitrobenzene)
 CAS.No. : 89-61-2

I-1-2 構造式、示性式、分子量 (文献 1)



分子量 : 192.0

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1,2)

外 観 : 淡黄色結晶
 沸 点 : 266℃
 融 点 : 56℃
 溶 解 性 : クロロホルム、ベンゼン、ジエチルエーテルに可溶
 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 : WTR1850
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 グ レード : 和光試薬 1 級
 純 度 : 98.8% (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 1,4-ジクロロ-2-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、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの文献値と比較することにより行った。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値 (文献 3) 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 4) と同じ波長にピークが認められ、被験物質は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンであることを確認した。なお、その結果は、APPENDIX P 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 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンについて、使用開始前及び使用終了後に、赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) により赤外吸収スペクトルを測定し、また、ガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) 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 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは安定であることを確認した。なお、その結果は、APPENDIX P 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：21.4～24.7g、雌：17.5～20.8g) を選別し、試験に供した。

なお、Cj: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(1997年3月6日～1999年3月4,7～10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

最高投与濃度を2000ppmに設定し、以下、800ppm及び320ppm(公比2.5)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、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がん原性試験ガイドライン(文献5)に従い、2年間(104週間)とした。

各群の投与濃度は13週間の予備試験(文献6)の結果をもとに設定した。すなわち、13週間試験では6週齢のCrj:BDF₁マウス(SPF)雌雄に1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンを各投与濃度に調製した混餌を13週間自由摂取させた。1群当たりの動物数は雌雄各10匹とし、被験物質投与群を5群、対照群を1群の6群構成で行った。被験物質投与濃度は、雌雄とも7500ppm、5000ppm、3333ppm、2222ppm、1481ppm(公比1.5)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。

試験の結果、雌雄とも最高用量の7500ppm群で顕著な体重増加の抑制、摂餌量の低下、

死亡(雌雄とも4匹)が認められ、肝臓への強い障害が認められた。5000ppm群、3333ppm群及び2222ppm群では、体重増加の抑制はほとんど認められなかったが、肝臓への影響は顕著であった。1481ppm群では体重増加の抑制及び摂餌量の低下はみられなかった。

上記の結果から、2222ppm以上の濃度では肝臓への影響が顕著であったことから104週間の連続投与に動物は耐えられないと考えた。1481ppm群では体重増加の抑制及び摂餌量の低下はみられず、臓器への重篤な影響も認められなかった。従って、がん原性試験の最大耐量は、1481ppm以上、2222ppm未満の濃度範囲に存在すると考え、最高投与濃度を雌雄とも2000ppmとし、以下、公比2.5で800ppm、320ppmに設定した。

II-1-6 被験物質混合飼料の調製方法

被験物質は、ロータースピードミル(フィリッチェ社製 P-14型)を用いて、粒径0.5mm以下に粉碎し、混合機(関東混合機社製 スパイラルミキサー SS-251型)を用い、粉末飼料と直接混合して5000ppmの被験物質混合飼料を作製した。さらに、この5000ppmの被験物質混合飼料に粉末飼料を加え、混合機(関東混合機社製 スパイラルミキサー SS-251型)により各設定濃度になるように希釈混合した。なお、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2週間を越えない間隔で実施した。調製された被験物質混合飼料は各濃度毎に使用時まで冷蔵保存した。

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

被験物質混合飼料中における被験物質の濃度は、概ね3ヶ月毎に、各投与濃度に調製された混合容器内の被験物質混合飼料を3点サンプリングし、ガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)を用いて分析し、確認した。

分析の結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対し、91.8~99.3%の範囲にあった。また、均一性に関しては、各濃度群内の濃度のばらつきも少なく良好であった。その結果をAPPENDIX P3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

調製された被験物質混合飼料中における被験物質の安定性は、2000ppm及び320ppmの被験物質混合飼料について調製時及び調製後15日目に投与状態(室温放置)と冷蔵保存の被験物質混合飼料中における被験物質濃度をガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)を用いて分析し、その結果を比較することにより確認した。その結果、調製時を100%とすると、調製後15日目には投与状態(室温放置)では320ppm:91.4%、2000ppm:88.5%、冷蔵保存では320ppm:92.5%、2000ppm:87.8%であり、投与状態(室温放置)

及び冷蔵保存の被験物質混合飼料中の被験物質は安定であった。その結果を APPENDIX P 4 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/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)
320 ppm	50 匹 (1101～1150)	320 ppm	50 匹 (2101～2150)
800 ppm	50 匹 (1201～1250)	800 ppm	50 匹 (2201～2250)
2000 ppm	50 匹 (1301～1350)	2000 ppm	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(層別体重平均法：適正層別方式)により実施した(文献 7)。

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-2 空調エリア) 内の独立した室 (雄を 202 室、雌を 204 室) 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 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ (実測値 平均 \pm S.D 202 室： $23.1\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、204 室： $23.0\pm 0.1^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55\pm 10\%$ (実測値 平均 \pm S.D 203 室： $55\pm 1.7\%$ 、204 室： $55\pm 1.7\%$)、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：112W×212D×120H mm)に収容し、ケージ交換は2 週間毎に実施した。

試験に使用した飼料は、検疫期間にはオリエンタル酵母工業(株)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、馴化期間及び投与期間に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。

飲料水は、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、紫外線滅菌し、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)より使用ロット毎の分析データを入手し、保管した。飼料の夾雑物については使用ロット毎の分析データを(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)より入手した。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、毎日 1 回生死及び瀕死の確認を行い、一般状態の詳細な観察は毎週 1 回実施した。

Ⅱ-3-2 体重測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回、体重を測定した。なお、動物の死亡発見時と切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重を測定した。

Ⅱ-3-3 摂餌量測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（但し、104 週にも測定した）、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除した値を 1 日当たりの摂餌量とした。

Ⅱ-3-4 血液学的検査

定期解剖時まで生存し、採血可能な全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、血液学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食(18 時間以上)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、白血球百分率

検査方法は APPENDIX Q 1 に示した。

Ⅱ-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存し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、遠心分離して得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食(18 時間以上)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 Q 1 に示した。

Ⅱ-3-6 尿検査

投与最終週に採尿可能な全動物について新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

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 Q 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

定期解剖時まで生存した動物について、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。

副腎、精巣、卵巢、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、以下に示した臓器及び肉眼的に変化のみられた組織をパラフィン包埋、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、卵巢、子宮、膣、乳腺、脳、脊髓、末梢神経、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨、その他肉眼的に変化のみられた器官・組織

II-4 数値処理と統計処理

II-4-1 数値の取り扱いと表示

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 日当たりの平均摂取量を算出し、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。

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの体重 kg 当りの 1 日摂取量は、摂餌量に 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの設定濃度を乗じ、群毎の平均体重で除した値を 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 2 に示した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、摂水量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、その中から欠測となったデータを除外して母数とした。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象とし、欠測となったデータを除外して母数とした。

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。

なお、雄の対照群に 1 匹、事故による死亡が認められたため、この群の母数は 49 匹とした。

II-4-3 統計処理

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。

予備検定については 5% の有意水準で両側検定を行い、最終検定では 5% 及び 1% で両側検定を行った。

なお、各検査の測定時に複数の群で群内のデータ数が 2 以下であった場合は、まず F 検定により等分散の検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定により、等分散でない場合は Aspin-Welch の t 検定により平均値の差の検定を行った。F 検定については 95% 信頼限界で検定を行い、最終検定については 95% および 99% 信頼限界で両側検定を行った。

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に 1~4 のグレード分けし、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても χ^2 検定を行った。

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 8）、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。

χ^2 検定と Fisher 検定は対照群と各投与群間との検定である。

各群雌雄毎に検査数が 2 以下の項目については検定より除外した。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖例にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死例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／瀕死例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 及び FIGURE 1, 2 に示した。

試験終了時の生存率は、対照群と比べて、雄の 320 ppm 群で高値を、雌雄の 2000 ppm 群では低値を示した。その他の投与群では、雌雄とも対照群とほぼ同様な生存率を示した。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、雄では対照群：27 匹(55%)、320 ppm 群：35 匹(70%)、800 ppm 群：26 匹(52%)、2000 ppm 群：18 匹(36%)、雌では対照群：30 匹(60%)、320 ppm 群：28 匹(56%)、800 ppm 群：29 匹(58%)、2000 ppm 群：24 匹(48%)であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を TABLE 5, 6 に示した。

雌雄とも投与群の全ての動物に、黄色尿が投与直後から投与期間を通して認められた。また、雌雄とも投与群は内部腫瘍を持つ動物が対照群に比べ多かった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 3, 4 及び APPENDIX B 1, 2 に示した。

体重の低値は、雄の 800 ppm 群の 98～104 週と 2000 ppm 群の 13～38 週と 78 週～104 週、雌の 2000 ppm 群の 82 週～104 週に認められた。その他の投与群では、雌雄ともに対照群と比べ、同様な体重推移を示した。

なお、投与終了時の各投与群の体重は、対照群に対して、雄では 320 ppm 群：95%、800 ppm 群：85%、2000 ppm 群：66%であり、雌では 320 ppm 群：100%、800 ppm 群：98%、2000 ppm 群：83%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 3, 4、FIGURE 5, 6 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

投与群の摂餌量は、雌雄とも、全体的には対照群と同様な推移を示した。全投与期間にわたって平均した雄の各群の平均一日摂餌量は、対照群：4.5g(100%)、320 ppm 群：4.5g(100%)、800 ppm 群：4.5g(100%)、2000 ppm 群：4.6g(102%)であった。雌では、対照群：4.4g(100%)、320 ppm 群：4.3g(98%)、800 ppm 群：4.4g(100%)、2000 ppm 群：4.6g(105%)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 D 1, 2 に示した。

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/day) は、雄で 320 ppm 群 : 0.028~0.053、800 ppm 群 : 0.070~0.134、2000 ppm 群 : 0.188~0.337、雌では 320 ppm 群 : 0.037~0.060、800 ppm 群 : 0.097~0.154、2000 ppm 群 : 0.257~0.373 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、2.4~2.7 の範囲にあり、設定用量比 (公比 2.5) に対応していた。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 7, 8 と APPENDIX E 1, 2 に示した。

雄では、MCV の増加が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に、MCHC の減少が 2000 ppm 群に認められた。

雌では、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の増加が 2000 ppm 群に認められた。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 9, 10 と APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、総コレステロールとリン脂質の増加、GOT、GPT、LDH、ALP の上昇が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に認められた。また、総蛋白、総ビリルビン、カルシウム及び無機リンの増加、 γ -GTP と CPK の上昇、並びにグルコースとトリグリセライドの減少が 2000 ppm 群に認められた。すべての投与群で GOT、GPT、ALP の標準偏差値が、対照群に比べて、高値を示した。800 ppm 群と 2000 ppm 群の LDH の標準偏差値も高値を示した。

雌では、GPT の上昇が全投与群に認められた。総コレステロールとリン脂質の増加、並びに GOT と ALP の上昇が 800 ppm 群と 2000 ppm 群に認められた。また、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン及び尿素窒素の増加、LDH、 γ -GTP 及び CPK の上昇、並びにグルコースの減少が 2000 ppm 群に認められた。すべての投与群で GOT、GPT、LDH、ALP の標準偏差値が、対照群に比べて、高値を示した。

Ⅲ－８ 尿検査

尿検査の結果を TABLE 11, 12 と APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄では、蛋白の陽性を示す動物数が 800 ppm 群と 2000 ppm 群で減少した。pH の低下傾向が 2000 ppm 群に認められた。雌では、蛋白の陽性を示す動物数の減少が 2000 ppm 群に認められた。

Ⅲ－９ 病理学的検査

Ⅲ－９－１ 剖検

剖検所見を APPENDIX H 1～6 に示した。

雄では、肝臓の結節が投与用量に対応して増加し、その発生数は、対照群で 24 匹、320 ppm 群で 30 匹、800 ppm 群で 42 匹、2000 ppm 群で 46 匹であった。腹腔の出血が投与群で増加し、その発生数は、対照群で 1 匹、320 ppm 群で 2 匹、800 ppm 群で 2 匹、2000 ppm 群で 6 匹であった。雌では、肝臓の結節が投与用量に対応して増加し、その発生匹数は、対照群で 5 匹、320 ppm 群で 9 匹、800 ppm 群で 27 匹、2000 ppm 群で 40 匹であった。

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 13, 14 と APPENDIX I 1, 2、J 1, 2 に示した。

肝臓の実重量と体重比は、雌雄とも、800 ppm 群と 2000 ppm 群で増加した。なお、雄の 800 ppm 群と 2000 ppm 群では脳の実重量の低値と体重比の高値、並びに、精巣（2000ppm 群のみ）、心臓、肺及び腎臓の体重比の高値が、雌の 2000 ppm 群では脳の実重量の低値と体重比の高値、卵巣の実重量の低値、肺と腎臓の体重比の高値が認められたが、雄の 800 ppm 群と 2000 ppm 群、並びに雌の 2000 ppm 群の解剖時体重は、対照群と比較して低値であり、これに伴って起きた変化と思われる。

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は TABLE 15, 16 に示した。また、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を APPENDIX L 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX M 1, 2 に、統計解析（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定）の結果を APPENDIX N 1, 2 に、転移性病変を APPENDIX O 1～6 に示した。

－腫瘍性病変－

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/総数）を雌雄別にそれぞれ TABLE 18 と 19 に示し、それぞれの投与濃度における腫瘍発生率をヒストリカルコントロールデータの最大発生率と比較した。

<肝臓>

雄では、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 2000ppm 群に増加がみられた。肝細胞癌の 800 ppm 群と 2000 ppm 群における発生(23 匹、46%及び 31 匹、62%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。また、肝芽腫の発生数は、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。肝芽腫の 320 ppm 群、800 ppm 群及び 2000 ppm 群における発生率(10 匹、20%；12 匹、24%及び 25 匹、50%)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。肝細胞腺腫の発生には統計学的に有意差を認めなかった。なお、肝細胞癌と肝芽腫の 2 種の腫瘍を合わせた発生数、並びに肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の 3 種の腫瘍を合わせた発生数は、ともに 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、かつ Fisher 検定で 800 ppm 群と 2000 ppm 群に増加がみられた。これら 2 種の腫瘍の 800 ppm 群と 2000 ppm 群における発生(31 匹、66%及び 41 匹、82%)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。また、肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の 3 種の腫瘍を合わせた腫瘍の 800 ppm 群と 2000 ppm 群における発生（41 匹、82%及び 45 匹、90%）は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。

雌では、肝細胞腺腫の発生数が Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 800 ppm 群と 2000 ppm 群に増加がみられた。両投与群における腺腫発生率（17 匹、34%及び 16 匹、32%）は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。肝細胞癌の発生数は、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 800 ppm 群と 2000 ppm 群に増加がみられた。両投与群における肝細胞癌発生率（15 匹、30%及び 31 匹、62%）は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を超えた。雌の肝芽腫は、2000 ppm 群のみに 2 匹みられた。なお、当センターのヒストリカルコントロールデータで

は雌マウスでの肝芽腫の発生は前例がない。肝細胞癌と肝芽腫を合わせた発生数、並びには肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫を合わせた発生数は、ともに 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 800ppm 群と 2000ppm 群に増加がみられた。これらの群の肝細胞癌と肝芽腫の 2 種の腫瘍を合わせた腫瘍発生率（800 ppm 群：15 匹、30%及び 2000 ppm 群：33 匹、66%）及び肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の 3 種の腫瘍を合わせた腫瘍発生率（320 ppm 群：8 匹、16%; 800 ppm 群：29 匹、58%; 2000 ppm 群：39 匹、78%）は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。なお、320 ppm 群における 3 種の腫瘍を合わせた腫瘍発生率（8 匹、16%）も当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲よりやや高い値であったが、対照群の発生率（6/50 匹、12%）もヒストリカルコントロールデータの上限（14%）に近い値であり、この群の発生率は投与により増加したとは言えない値であると判断した。

<ハーダー腺>

雄の腺腫の 320 ppm 群における発生率（8 匹、16%）は、Fisher 検定で増加を示し、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲を越えた。しかし、800 ppm と 2000 ppm の両群での発生率（それぞれ、0%と 8%）と投与用量の関係から、腫瘍発生は投与用量に対応したものとは言えないと判断した。

<全臓器>

雌の血管腫の発生数は、Fisher 検定で 2000ppm 群に減少がみられた。

—主な非腫瘍性病変—

非腫瘍性病変の結果を TABLE 15, 16、APPENDIX K 1～6 に示した。

<肝臓>

中心性の肝細胞の肥大が、雄では 320ppm 群に 38 匹、800ppm 群に 39 匹、及び 2000ppm 群に 40 匹、雌では 320ppm 群に 15 匹、800ppm 群に 29 匹、2000ppm 群に 35 匹みられた。この所見は雌雄とも対照群には観察されず、雌雄全投与群で増加が示された。この肝細胞肥大の程度は、投与用量とともに増強する傾向を示し、異型、すなわち核の大型化や核形態の不整を伴っていた。

好酸性小増殖巣の発生は、雄の 320 ppm 群に 2 匹、800 ppm 群に 7 匹及び 2000 ppm 群に 11 匹みられ、800 ppm 以上の群で増加した。雌では、対照群の発生が 1 匹であったのに対し、320 ppm 群の 7 匹、800 ppm 群と 2000 ppm 群にそれぞれ 3 匹の発生がみられたが、統計学的な有意差は示されなかった。

その他、炎症性細胞集簇は、雄の 2000 ppm 群で減少した。

<腎臓>

ヘモジデリンの沈着は、雄では対照群の発生が1匹であったのに対し、320 ppm 群と 800 ppm 群のそれぞれ6匹、2000ppm 群の25匹にみられ、2000 ppm 群で増加した。ヘモジデリンの沈着がみられた動物は、多くの匹が肝臓に肝芽腫を伴っていた。また、雌でも 2000 ppm 群で肝芽腫のみられた2匹の腎臓にヘモジデリンの沈着がみられた。

<鼻腔>

雄では、嗅上皮におけるエオジン好性変化が 800 ppm 群で増加した。

雌では、呼吸上皮のエオジン好性変化及び粘膜下組織における腺の呼吸上皮化生の発生増加が 800 ppm 以上の群、嗅上皮の呼吸上皮化生の発生増加が 320ppm 群と 2000ppm 群で認められた。

<骨髓>

雄の 2000ppm 群で赤血球造血の亢進が匹数、程度ともに増加した。

<歯>

雄の 800ppm 以上の群で異形成の発生が減少した。

<副腎>

雌の全投与群で紡錘形細胞増生の程度が減弱した。

<脳>

雌の 800 ppm 群に鉍質沈着の統計的に有意な増加が示されたが、投与用量と 2000 ppm 群を含めた発生率との関係を考慮し、投与用量に対応しないものと判断した。

Ⅲ-9-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 17 に示した。

雌雄とも肝臓の腫瘍が原因と思われる死亡／瀕死動物が投与用量に対応して増加した。

IV 考察及びまとめ

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのマウス2年間混餌経口投与（投与濃度：320 ppm, 800 ppm, 2000 ppm）によって腫瘍性病変、腫瘍関連病変と非腫瘍性病変およ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。生存率は、対照群と比べ、雌雄とも2000ppm群で低下し、その低下は、肝臓腫瘍に起因した。体重の有意な低値は、雄の800ppmと2000ppmの両群及び雌の2000 ppm群にみられた。投与群と対照群との間に有意な摂餌量の差は認められなかった。

IV-1 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雄では、肝臓の悪性腫瘍である肝細胞癌と肝芽腫の発生増加が認められた。これらの腫瘍の発生数は、ともに投与用量に依存して増加傾向を示し、肝細胞癌は2000 ppm群で、肝芽腫はすべての投与群で発生率の増加を示した。また、肝細胞癌の2000 ppm群における発生率（64%）は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲より明らかに高く、800 ppm群の発生率（46%）もその範囲を越えた。さらに、肝芽腫の320 ppm群、800 ppm群及び2000 ppm群の発生率（20%、24%及び50%）は、当センターのヒストリカルコントロールデータの試験単位平均発生率0.5%（総数：1047匹中5匹、試験単位の発生率：最小0%、最大6%）に比較して、顕著に高い値であった。従って、これらの肝臓腫瘍の発生増加は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与によるものと考察される。320 ppm群と800 ppm群における肝細胞腺腫の発生（21匹、42%及び20匹、40%）は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲よりやや高い値であったが、対照群の発生率（17匹、34.7%）も、ヒストリカルコントロールデータの上限（34%）に相当する値である。従って、これらの群における肝細胞腺腫の発生は、投与により増加したとは言えないと判断した。

雌では、肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生数は、増加傾向を示し、800ppm群と2000ppm群で顕著な増加が認められた。両投与群の発生率は、肝細胞腺腫（34%、32%）、肝細胞癌（30%、62%）とも当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲より明らかに高い値であった。従って、これらの腫瘍の発生増加は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与によるものと考察される。また、2000 ppm群には2匹に肝芽腫の発生がみられた。この腫瘍は、統計学的に有意な増加傾向や発生率増加を示さなかったが、当センターの雌マウスのヒストリカルコントロールデータでは前例がない腫瘍であり、また、本試験では雄マウスにも肝芽腫の明らかな増加がみられることから、この腫瘍の発生も1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による可能性があるとし唆される。

以上のように、雌雄ともにみられた肝臓腫瘍の発生増加は、統計検定結果およびヒストリカルコントロールデータとの比較から、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与により惹起され

たと考えられた。また、発生増加がみられた腫瘍の種類は悪性腫瘍である肝細胞癌や肝芽腫であり、腫瘍発生数もヒストリカルコントロールデータの範囲より明らかに高い値であった。従って、これらの結果は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの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られた。また、肝臓腫瘍の発生が観察された濃度は、本試験では、雄では肝芽腫の発生増加が 320 ppm 以上の投与群で、雌では肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が 800 ppm 以上の投与群で認められた。

なお、肝臓の前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣(文献 9)は、雄の 800 ppm と 2000 ppm の両群で有意な増加を示した。

肝臓腫瘍の発生以外にも、肝臓への影響として病理組織学検査で中心性の肝細胞の肥大、肝臓重量の増加、血液生化学検査での変化が観察された。

肝細胞の肥大は、異型、すなわち、核の大型化と核形態の不整化を伴った変化を特徴とした。1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのマウスを用いた 13 週間混餌経口投与試験では、最低投与濃度である 1481 ppm まで肝細胞の巨大細胞化が観察されており(文献 6)、この単純な肝細胞の巨大細胞化が 2 年間投与によって核の大型化と不整化を伴う異型性肝細胞肥大に発展し、肝腫瘍の形成に関与した可能性があると考えられる。肝細胞肥大は、2 年間投与では雌雄とも最低濃度である 320 ppm 群まで発生増加が認められた。

血液生化学的検査では総蛋白や総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質の増加、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP の上昇等が認められた。13 週間試験でも、肝細胞の巨大細胞化、単細胞壊死及び巣状壊死の発生とともに、血液生化学的検査で総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質の増加、GOT、GPT、 γ -GTP の上昇等の肝臓への影響を示す変化が報告されている(文献 6)。2 年間投与で変化が認められた血液生化学的検査の結果の多くは 13 週間投与の結果と類似しており、13 週間試験でみられた肝臓への影響、すなわち 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与による肝細胞の傷害とそれに対する修復性の増殖反応が 2 年の投与期間に持続している可能性を示唆している。

これらの血液生化学的変化が認められた濃度は、主に肝臓腫瘍の発生増加が認められた 800 ppm 以上の群であったが、雌の GPT の上昇は肝臓腫瘍の発生増加がみられない 320 ppm でも認められた。一方、雌雄すべての投与群で GOT、GPT、LDH の標準偏差値の高値がみられた(ただし、雄 320 ppm 群の LDH を除く)ことは注目に値する。本試験の血液生化学的検査結果と肝腫瘍を個別別に調査した結果、標準偏差の高値は、肝腫瘍を担う動物にみられた。また、これらの検査結果に有意な上昇が認められた投与群は、主に 800 ppm と 2000 ppm 群であり、肝臓腫瘍が増加した群に一致している。従って、これらの血液生化学的検査値の変化は、肝臓腫瘍の発生に伴う二次的な変化を示唆している。1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与による肝臓への直接的な影響、または、いずれかあるいは両者によって惹起された可能性を示唆している。

IV-2 非腫瘍性病変

鼻腔、血液系及び腎臓に 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による影響と考えられる変化がみられた。

鼻腔における呼吸上皮のエオジン好性変化（雌の 800 ppm 以上の群）と腺の呼吸上皮化生（雌の 800 ppm 以上の群）の増強および嗅上皮の呼吸上皮化生（雌の 320 ppm 群と 2000ppm 群）の増加がみられた。これらの変化は、投与濃度に対応しており、また、13 週間試験でも雄の高濃度の投与群（7500 ppm 群）にだけではあるが、嗅上皮への影響が認められていることから（文献 6）、投与による影響と考えた。

血液系への影響を示す変化として、2000 ppm 群で、雄に MCV の増加、MCHC の減少及び骨髄での赤血球造血の増加、雌に赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の増加が認められた。一方、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのマウスの 13 週間混餌経口投与試験では、赤血球数とヘモグロビン濃度の減少や脾臓の髄外造血亢進等の貧血性障害が観察されており（文献 6）、2 年間の経口投与の過程で、投与初期にみられた貧血性障害が代償性造血機能の亢進によって修復された可能性が示唆された。

腎臓への影響を示唆する変化として、腎臓の体重比の増加（雄の 800 ppm 以上の群と雌の 2000 ppm 群）及び尿素窒素の増加（雌の 2000ppm 群）が認められた。一方、13 週間試験では雌の 5000 ppm 群に尿素窒素の増加と腎臓の実重量と体重比の増加が認められており（文献 6）、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの投与による腎臓への影響を考慮する必要があると考えられた。しかし、病理組織学的検査では、腎臓におけるヘモジデリン沈着の増加が主に雄の投与群に認められるだけであり、このヘモジデリン沈着は肝芽腫を持つ動物にみられた所見であることから肝芽腫の発生に関連する変化と考えられた。従って、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与による腎臓への影響を否定できないものの、直接的な影響があったとは言えないと考える。

その他、雌雄の 2000ppm 群に CPK の上昇、グルコースの減少、トリグリセライドの減少（雌のみ）が認められ、同群での体重の低下と関連すると考察された。

IV-3 無毒性量 (NOAEL)/最小毒性量 (LOAEL)及びベンチマーク用量

マウスにおける 2 年間の混餌経口投与による 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの最小毒性量は、雌雄の異型を伴う肝細胞の肥大及び雌の GPT の上昇等の肝臓への影響をエンドポイントとして、320ppm（雄：0.028～0.053、雌：0.037～0.060 g/kg body weight/day）であると考察される。

ベンチマーク用量法は、NOAEL/LOAEL 法における若干の問題点を克服する方法として、最近、適用が広がりつつある（文献 10）。異型を伴う肝細胞の肥大の発生率と投与濃度との用量－反応関係に US.EPA NCEA の BMDL ソフトウェア Version 1.3.1（文献 11）を

適用して 10%ベンチマーク用量 (Confidence limit of Benchmark dose yielding the response with 10 % extra risk (BMDL₁₀)) を算出した結果 (Logistic Model, P=0.82, AIC=193)、異型を伴う肝細胞の肥大に対する BMDL₁₀ 値は 59.0 ppm となった。

IV-4 他文献との比較等

- ① 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 12) によれば、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの変異原性は、ネズミチフス菌 (TA100) の代謝活性化による場合で、用量に依存して増加し、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇がみられ、陽性であった。またチャイニーズハムスター株細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験では、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは、代謝活性化による場合に、染色体構造異常が誘発された。これらの結果は、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの代謝物が変異原性を有することを示す。
- ② 代謝：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。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 13)。1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの 2 週間混餌経口投与により、黄色を呈した投与ラットの尿をカラムで分取し、LC-MS/MS 法と ¹H-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 *N*-アセチル-*S*-(4-クロロ-3-ニトロフェニル)-*L*-システインに起因することを確認した (文献 14)。

V 結論

Crj:BDF₁ マウスを用いて 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの 2 年間 (104 週間) にわたる混餌経口投与によるがん原性試験を行った結果、雄マウスに肝細胞癌と肝芽腫、雌マウスに、肝細胞腺腫と肝細胞癌の顕著な発生増加が認められ、これらの結果は 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの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。

VI 文献

1. 化学工業日報社 (2003)
14303 の化学商品
pp.887-888, 化学工業日報社, 東京
2. Buckingham J. and MacDonald F. M. (eds.) (1982)
Dictionary of Organic Compounds
Vol. 2, pp. 1761-1762, Chapman and Hall, New York
3. McLafferty F. W. (1994)
Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition, Entry Number 74222
John Wiley and Sons, Inc. New York
4. 和光純薬工業 (株) 提供資料(1995)
赤外吸収スペクトル
5. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (1981)
451: Carcinogenicity studies. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals
OECD, Paris
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
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
7. 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
8. Peto R., Pike M. C., Day N. E., 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 Carcinogenes: A Critical Appraisal, IARC Monographs Suppl 2, 311-426. IARC, Lyon

9. Popp J. A., and Cattley R. C. (1991)
Hepatobiliary system. In: Handbook of Toxicologic
Pathology (eds. by W. M. Haschek, C. G. Rousseaux). Chap 14, 279 - 314
Academic Press, New York
10. Risk Assessment Forum. U.S. Environmental Protection Agency (1995)
The Use of the Benchmark Dose Approach in Health Risk Assessment
EPA/630/R-94/007. Washington D.C.
11. Risk Assessment Forum. U.S. Environmental Protection Agency (2000)
Benchmark Dose Technical Guidance Document
EPA/630/R-00/001. Washington, D.C.
12. 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 (1996)
日本化学物質安全・情報センター(JETOC) 編集・発行, 東京
13. 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. 240; 7130 – 7139
14. 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
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川