

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13週間毒性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0301

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-ニトロベンゼンのラットを用いた  
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：0301

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	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	
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	
II-1 投与	
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、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	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	
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	
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	7
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	8
Ⅱ-3-7 病理学的検査	8
Ⅱ-4 数値処理と統計処理	
Ⅱ-4-1 数値の取り扱いと表示	9
Ⅱ-4-2 母数の取り扱い	10
Ⅱ-4-3 統計方法	10
Ⅲ 試験成績	
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 尿検査	13
Ⅲ-9 病理学的検査	13
Ⅲ-9-1 剖検	12
Ⅲ-9-2 臓器重量	13
Ⅲ-9-3 病理組織学的検査	14
Ⅳ 考察及びまとめ	16
Ⅴ 文献	19

## 要約

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、F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いて 2 年間の経口投与試験を実施するに当たり、投与濃度を設定するための予備試験 (13 週間試験) を実施した。投与は、被験物質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。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。投与濃度は、雌雄とも 7500 ppm、5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm (公比 1.5) に設定した。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、臓器重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

試験の結果、動物の死亡は認められなかったが、摂餌量の低下を伴った体重増加の抑制が雌雄ともに 2222 ppm 以上の群でみられた。被験物質による毒性の標的臓器は、肝臓、腎臓、血液系/脾臓及び精巣であった。これらの臓器への影響は、肝臓 (中心性の腫脹、肝臓重量の増加、血漿の総コレステロールやリン脂質の増加) と腎臓 (腎臓重量の増加、雄では好酸体の程度の増強、好塩基性変化、尿細管上皮の剥離、血漿の尿素窒素の増加、雌では近位尿細管への好酸滴の出現) への影響は雌雄とも 1481 ppm 群まで認められた。血液系/脾臓への影響 (ヘモグロビン濃度の低下、脾臓でのヘモジデリン沈着等) は、雄では 2222 ppm 以上の群で、雌では 1481 ppm 群までみられた。精巣への影響 (精原細胞の壊死、精巣重量の低下、精巣上体における精上皮系細胞の残屑の出現) は 2222 ppm 以上の群でみられた。従って、13 週間の混餌投与による最小毒性量 (LOAEL) は、雌雄の肝臓と腎臓、雌の血液系/脾臓への影響をエンドポイントとして 1481 ppm (雄 ; 0.093 g/kg body weight/day、雌 ; 0.106 g/kg body weight/day) と考えられる。なお、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雌雄とも全ての投与群でみられた。

2 年間混餌投与によるラットのがん原性試験における被験物質の投与濃度は、体重、肝臓、腎臓、血液系への影響をもとに、雌雄とも最大耐量と推定される 2000 ppm を最高投与濃度とし、以下、公比 2.5 で 800 ppm、320 ppm に設定した。

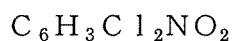
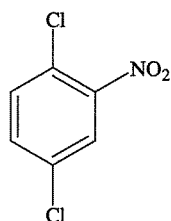
## I 試験材料

## I-1 被験物質の性状等

## I-1-1 名称等

名 称 : 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 : SKG1643  
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 : 100.0% (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、それらの結果は、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 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、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) により測定し、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、使用開始前及び使用終了後の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 L 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 F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。

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い動物から、体重の中央値に近い雌雄各 60 匹 (投与開始時体重範囲、雄：113～126g、雌：92～102g) を選別し、試験に供した。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。当試験はがん原性試験の予備試験であるため、F344/DuCrj(Fischer)ラットを使用した。

## 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

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(1995年2月8日～1995年5月9、12日：92～95日間)とし、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、餌重量の測定頻度に合わせ7日間に一回とした。

#### Ⅱ-1-4 投与濃度

最高投与濃度を7500 ppmに設定し、以下、5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm(公比1.5)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、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5)。

各群の投与濃度は2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、2週間試験では、6週齢の雌雄F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)に10000 ppm、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、625 ppm(公比2)の濃度の混餌飼料を2週間自由摂取させた。その結果、10000 ppm群では、死亡、顕著な摂餌量の低下と体重の減少、肝臓、腎臓及び血液系への障害が認められた。5000 ppm群では摂餌量の減少と体重増加の抑制が認められたが、病理組織学的に重篤な毒性所見は認められなかった。

以上の結果から、13週間試験の投与濃度を10000 ppmに設定すると、被験物質の毒性により動物は死亡し、かつ5000 ppmでは毒性影響はほとんど見られないと推察される。従



って、13 週間試験の投与濃度は雌雄ともに最高投与濃度を 7500 ppm に設定し、以下、5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm（公比 1.5）とした。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

#### Ⅱ－1－6 被験物質混合飼料の調製方法

7500 ppm と 5000 ppm の被験物質混合飼料については、混合機（スパイラルミキサー：関東混合機社 SS-251 型）を用い、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 0.5 mm 以下に粉碎した 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンと粉末飼料を直接混合して調製した。また、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm の被験物質混合飼料については、まず、混合機（スパイラルミキサー：関東混合機社 CS-20 型）を用い、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンと粉末飼料を直接混合して 10000 ppm の被験物質混合飼料を調製し、さらに粉末飼料を加え、混合機（スパイラルミキサー：関東混合機社 SS-251 型）により希釈混合することによって調製した。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、投与開始直前に 1 回、投与期間中に 2 回の計 3 回実施した。調製された被験物質混合飼料は冷蔵保存し、1 回の調製分につき最長 7 週間使用した。

#### 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

各投与濃度に調製された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、各濃度毎に混合容器内の被験物質混合飼料を 7 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、99.3～101.0 % 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 L 3 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投与状態での安定性は、試験に先立ち 10000 ppm 及び 625 ppm の被験物質混合飼料について調製時及び調製後 7 日目に室温放置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、測定結果を比較することにより確認した。その結果、調製時を 100% とすると、調製後 7 日目には 94.9～96.7 % であり、測定濃度に差はみられず、投与状態（室温放置）での被験物質混合飼料中の被験物質は安定であることを確認した。

その結果を APPENDIX L 4 に示した。

また、調製された被験物質混合飼料中における被験物質の冷蔵状態での安定性は、10000 ppm 及び 625 ppm の被験物質混合飼料について調製時及び調製後 14 週目に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、測定結果を比較することにより確認した。その結果、調製時を 100 % とすると、14 週間冷蔵保存後には 89.3～96.5 % であり、冷蔵状態での混合飼料中の被験物質は安定であることを確認した。

その結果を APPENDIX L 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 当たり一日の摂取量 (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)
1481 ppm 群	10 匹 (1101～1110)	1481 ppm 群	10 匹 (2101～2110)
2222 ppm 群	10 匹 (1201～1210)	2222 ppm 群	10 匹 (2201～2210)
3333 ppm 群	10 匹 (1301～1310)	3333 ppm 群	10 匹 (2301～2310)
5000 ppm 群	10 匹 (1401～1410)	5000 ppm 群	10 匹 (2401～2410)
7500 ppm 群	10 匹 (1501～1510)	7500 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 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、またケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物はバリア区域 (AC-2、空調エリア) 内の独立した室 (雌雄とも 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区別した。

## Ⅱ-2-3 飼育条件

動物は、全飼育期間を通して、温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  (実測値 平均 $\pm$ 標準偏差： $23.1\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ )、湿度  $55\pm 10\%$  (実測値 平均 $\pm$ 標準偏差： $57\pm 2\%$ )、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。

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(ステンレス製二連型網ケージ：170W×294D×176H mm)に収容し、ケージ交換は2週間毎に実施した。

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- $\gamma$ 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ついてはオリエンタル酵母工業(株)の CRF-1 粉末飼料(30KGy- $\gamma$ 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)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 番 1 号)の分析データを使用ロット毎に入手し、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、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

全動物について、毎週 1 回(投与開始直前及び各週 7 日目)に体重を測定した。なお、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

週 1 回、摂餌量を個体別に測定した。

### 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、クエン酸ナトリウム入り採血管(下記\*印検査項目)及びヘパリンリチウム入り採血管(下記#印検査項目)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、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、#メトヘモグロビン濃度

検査方法は APPENDIX M 1 に示した。

### Ⅱ-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存し、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、 $\gamma$ -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 M 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、ビリルビン、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

定期解剖時に全動物について、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、精囊、前立腺、卵巣、子宮、陰、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、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、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量値から残餌量値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。

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの体重 kg 当たり一日摂取量は、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、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 N 1 に示した単位及び桁数により表示した。

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、欠測となったデータについては母数より除いた。

血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量は、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については母数より除いた。

尿検査は、投与最終週に実施し、検査ができた動物数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査データは、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。ただし、非腫瘍性病変については有効臓器数（供試臓器数から欠損臓器を除いた臓器数）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、対照群を基準として、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には、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、対照群と各投与群の 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  $\chi^2$  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  $\chi^2$  検定を行った。

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。

なお、予備検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、最終検定では、5% 及び 1% 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、死亡動物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。

雌雄ともに全ての投与群に投与開始翌週（1 週 7 日）より、投与終了（13 週 7 日）まで黄色尿が観察された。

#### Ⅲ-3 体重

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

雄の 1481 ppm 群を除いた雌雄の投与群の体重は、ほぼ全期間を通し、投与濃度に対応した増加抑制が認められた。

最終計測日（13 週 7 日）における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 7500 ppm 群：51 %、5000 ppm 群：75 %、3333 ppm 群：88 %、2222 ppm 群：94 %、1481 ppm 群：99 %、雌では 7500 ppm 群：72 %、5000 ppm 群：81 %、3333 ppm 群：84 %、2222 ppm 群：87 %、1481 ppm 群：95 %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。

雄の 1481 ppm 群を除いた雌雄の投与群の摂餌量は、全投与期間を通し、投与濃度に対応した摂餌量の低値が認められた。

投与期間中の投与群の摂餌量は、対照群に対して、雄では 7500 ppm 群：49～71 %、5000 ppm 群：75～88 %、3333 ppm 群：87～96 %、2222 ppm 群：91～96 %、1481 ppm 群：96～103 %、雌では 7500 ppm 群：57～69 %、5000 ppm 群：78～86 %、3333 ppm 群：85～91 %、2222 ppm 群：88～97 %、1481 ppm 群：93～98 %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 D 1, 2 に示した。

投与群の被験物質摂取量は、設定濃度の公比にほぼ対応していた。全投与期間における各群の1日当たりの平均被験物質摂取量 (g/kg body weight/day) は、雄で 7500 ppm 群 : 0.474、5000 ppm 群 : 0.316、3333 ppm 群 : 0.207、2222 ppm 群 : 0.135、1481 ppm 群 : 0.093、雌では 7500 ppm 群 : 0.458、5000 ppm 群 : 0.342、3333 ppm 群 : 0.238、2222 ppm 群 : 0.162、1481 ppm 群 : 0.106 であった。

### 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 :

ヘモグロビン濃度の低下が 2222 ppm 以上の群で認められた。ヘマトクリット値の低下が 5000 ppm 群を除く 2222 ppm 以上の群で示され、5000 ppm 群では有意ではないが、対照群より低い値であった。また、赤血球数の減少が 3333 ppm 以上の群、APTT の短縮が 3333 ppm 群と 7500 ppm 群、MCV と網赤血球比の増加及び血小板数の減少が 5000 ppm 以上の群、メトヘモグロビン濃度の増加と MCHC の減少が 7500 ppm 群で認められた。その他、1481 ppm 群で MCV の減少が認められた。

雌 :

ヘモグロビン濃度の低下が全投与群、赤血球数、ヘマトクリット値及び血小板数の低下が 3333 ppm 以上の群、網赤血球比の増加が 5000 ppm 以上の群、MCV の増加、MCHC と白血球数の低下ならびにプロトロンビン時間の延長が 7500 ppm 群で認められた。また、メトヘモグロビン濃度の増加が 5000 ppm 群に示された。

### 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 :

総コレステロールとリン脂質の増加が全投与群、総蛋白、アルブミン及びカルシウムの増加が 7500 ppm 群を除く全ての投与群、総ビリルビンの増加が 3333 ppm 以上の群、 $\gamma$ -GTP の上昇とナトリウムの低下が 5000 ppm 以上の群、A/G 比と無機リンの増加、GPT の上昇、グルコースとトリグリセライド及びクレアチニンの低下が 7500 ppm 群で認められた。なお、GPT の上昇は統計学的に有意ではないが、5000 ppm 群でもみられた。また、GOT の低下が 3333 ppm 群、尿素窒素の増加が 1481 ppm、2222 ppm 及び 3333 ppm 群、クロールの低下が 1481 ppm、3333 ppm 及び 5000 ppm 群で認められた。

雌：

アルブミン、総コレステロール及びリン脂質の増加が全投与群、総蛋白の増加が 7500 ppm 群を除く全ての投与群、クレアチニンの減少が 2222 ppm 以上の群、 $\gamma$ -GTP の上昇が 3333 ppm 以上の群、総ビリルビンの増加とナトリウムの減少が 5000 ppm 以上の群、尿素窒素とカリウムの増加が 7500 ppm 群で認められた。その他、グルコースの増加が 3333 ppm 群を除く 2222 ppm 以上の群で、ALP が 3333 ppm 群では低下、7500 ppm 群では上昇、カルシウムの増加が 2222 ppm 群と 5000 ppm 群で認められた。

### Ⅲ-8 尿検査

投与期間の最終週に行った尿検査の結果を TABLE 9, 10、APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄： 全投与群でケトン体陽性度の減少が認められた。

雌： 検査項目に変化は認められなかった。

### Ⅲ-9 病理学的検査

#### Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を APPENDIX H 1, 2 に示した。

雄： 肝臓の肝小葉像明瞭化が 5000 ppm 群に 3 匹、7500 ppm 群に 10 匹、認められた。

雌： 高い発生率を示した所見は認められなかった。

#### 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 と APPENDIX I 1, 2（実重量）、APPENDIX J 1, 2（体重比）に示した。

雄：

肝臓は、実重量の高値が 1481 ppm 群から 5000 ppm 群までみられ、3333 ppm 以上の群に体重比の高値が示された。

腎臓は、実重量の高値が最低用量の 1481 ppm 群から 3333 ppm 群までみられ、体重比の高値が 3333 ppm 以上の群に示された。なお、7500 ppm 群では体重の低下に伴い実重量が低下していた。

精巣は、実重量と体重比の低値が 2222 ppm 以上の群に認められた。

脾臓は、体重比が 3333 ppm 以上の 3 群で高値を、実重量が 5000 ppm 群と 7500 ppm 群で低値を示した。

雌：

肝臓は、実重量と体重比の高値が全ての投与群で認められた。

腎臓は、体重比の高値が全ての投与群で、実重量の高値が 1481 ppm 群のみに認められた。

その他、投与群の臓器実重量や体重比の有意差が、雄の胸腺、副腎、心臓、肺及び脳、雌の胸腺、副腎、卵巣、心臓、肺、脾臓及び脳に認められたが、これらの変化は解剖時の体重低下にともなう変化と考えられた。

### Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE 13, 14 と APPENDIX K 1, 2 (全動物) に示した。

雄の肝臓、腎臓、脾臓、精巣及び精巣上体、ならびに雌の肝臓、腎臓及び脾臓に投与による影響を示す所見が観察された。

雄：

7500 ppm 群では、肝臓に中心性の腫脹（軽度 8 匹）と空胞変性（軽度 2 匹、中等度 8 匹）、脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）と髄外造血の増加（軽度 10 匹）、精巣に精原細胞の壊死（重度 10 匹）、精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現（軽度 10 匹）と精子の消失（重度 10 匹）が認められた。なお、腎臓の好酸体の発生（軽度 5 匹、中等度 4 匹）は対照群（中等度 8 匹、重度 2 匹）に比較して減少した。

5000 ppm 群では、肝臓に中心性の腫脹（軽度 9 匹）と空胞変性（軽度 7 匹、中等度 3 匹）、腎臓の好酸体の増加（重度 10 匹）、脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）と髄外造血の増加（軽度 9 匹）、精巣に精原細胞の壊死（重度 10 匹）、精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現（軽度 10 匹）と精子の消失（重度 10 匹）が認められた。

3333 ppm 群では、肝臓に中心性の腫脹（軽度 10 匹）と空胞変性（軽度 6 匹）、腎臓の好酸体の増加（重度 10 匹）と好塩基性変化（軽度 10 匹）及び尿細管上皮の剥離（軽度 2 匹、中等度 8 匹）、脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）と髄外造血の増加傾向（軽度 4 匹）、精巣に精原細胞の壊死（中等度 9 匹、重度 1 匹）、精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現（軽度 10 匹）と精子の消失（重度 10 匹）が認められた。

2222 ppm 群では、肝臓に中心性の腫脹（軽度 10 匹）、腎臓の好塩基性変化（軽度 10 匹）と好酸体の増加（重度 10 匹）及び尿細管上皮の剥離（軽度 3 匹、中等度 7 匹）、脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）、精巣に精原細胞の壊死（軽度 6 匹）、精巣上体に精上皮系細胞の残屑の出現（軽度 6 匹）が認められた。

1481 ppm 群では、肝臓に中心性の腫脹（軽度 6 匹）、腎臓に好塩基性変化（軽度 10 匹）、好酸体の増加（重度 10 匹）及び尿細管上皮の剥離（軽度 4 匹、中等度 6 匹）が認められた。

雌：

7500 ppm 群では、肝臓に中心性の腫脹（軽度 10 匹）と空胞変性（軽度 8 匹）、腎臓に近位尿細管への好酸滴の出現（軽度 3 匹、中等度 1 匹）、脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 9 匹）と髄外造血の増加（軽度 9 匹）が認められた。近位尿細管の好酸滴は、雄にみられた好酸体に比べ褐色を帯び、好酸体に比べ小型で球状を呈していた。

5000 ppm 群でも、肝臓に中心性の腫脹（軽度 10 匹）、腎臓に近位尿細管への好酸滴の出現（軽度 2 匹、中等度 8 匹）、脾臓にヘモジデリン沈着（軽度 10 匹）と髄外造血の増加（軽度 8 匹）が認められた。

3333 ppm、2222 ppm と 1481 ppm の 3 群では、肝臓に中心性の腫脹（各群とも軽度 10 匹）、腎臓に近位尿細管への好酸滴の出現（1481 ppm 群：軽度 2 匹と中等度 8 匹、2222 ppm 群：軽度 3 匹と中等度 7 匹、3333 ppm 群：中等度 10 匹）、脾臓にヘモジデリン沈着（1481 ppm 群：軽度 8 匹、2222 ppm 群と 3333 ppm 群：軽度 10 匹、）が認められた。

なお、骨髓の肉芽形成は 3333 ppm 以上の群で発生がみられず、対照群（軽度 3 匹、中等度 2 匹）に比較して減少した。

#### IV 考察及びまとめ

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの混餌経口投与によるがん原性試験の投与濃度を設定するために、F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いて 13 週間試験を実施した。被験物質投与群を 5 群、対照群を 1 群の 6 群構成で雌雄とも 1 群各 10 匹を用いて試験を行った。投与用量は、雌雄とも 7500 ppm、5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm とした。

##### (1) 用量－反応関係

7500 ppm 群では、雌雄ともに顕著な体重減少と摂餌量低下が認められたが、この最高用量を含め全ての投与群で死亡はみられなかった。肝臓への影響として、アルブミン、総コレステロール、リン脂質及び総ビリルビンの増加、 $\gamma$ -GTP の上昇、肝小葉像明瞭化（雄のみ）、肝臓重量の高値及び肝臓の中心性の腫脹と空胞変性が認められた。腎臓への影響として、雄に腎臓の好酸体の低下が認められた。血液系への影響として、雌雄ともに赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血小板数、MCHC の減少、網赤血球比の増加及び雌雄ともに脾臓のヘモジデリン沈着と髄外造血増加が認められた。生殖器への影響として、精巣に精原細胞壊死、精巣上体に精上皮細胞の残屑の出現と精子の消失が認められた。

5000 ppm 群では、雌雄ともに体重増加の抑制と摂餌量の低下が認められた。肝臓への影響として、雌雄ともに総蛋白、アルブミン、総コレステロール、リン脂質及び総ビリルビンの増加、ならびに $\gamma$ -GTP の上昇、肝臓の肝小葉像明瞭化、肝臓重量の高値と肝臓の中心性の腫脹と空胞変性（雄のみ）が認められた。腎臓への影響として、雄に好酸体の増加、雌に近位尿細管の好酸滴の発生増加が認められた。血液系への影響として、雌雄ともに赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び血小板数の減少、網赤血球比の増加及び雌雄ともに脾臓のヘモジデリン沈着と髄外造血増加が認められた。生殖器への影響として、精巣の精原細胞壊死、精巣上体に精上皮細胞の残屑の出現と精子の消失が認められた。

3333 ppm 群では、雌雄ともに体重増加の抑制と摂餌量の低下が認められた。肝臓への影響として、総蛋白、アルブミン、総コレステロール及びリン脂質の増加、雄のみに総ビリルビンの増加及び $\gamma$ -GTP のわずかな上昇（雌のみ）、雌雄ともに肝重量の高値と雄のみに肝臓の中心性腫脹が認められた。腎臓への影響として、雄の腎臓に好塩基性変化と尿細管上皮の剥離及び好酸体の増加、雌の腎臓に近位尿細管への好酸滴の出現が認められた。血液系への影響として、雌雄ともに赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少、雌のみで血小板数の減少及び雌雄ともに脾臓にヘモジデリン沈着が認められた。生殖器への影響として、精巣に精原細胞壊死、精巣上体に精上皮細胞の残屑の出現と精子の消失が認められた。

2222 ppm 群では、雌雄ともにわずかな体重増加の抑制と摂餌量の低下が認められた。肝臓への影響として、雌雄ともに総蛋白、アルブミン、総コレステロール及びリン脂質の増加、肝臓重量の増加及び肝臓の中心性腫脹、雌にのみ体重比の増加が認められた。腎臓へ

の影響として、雄にのみ腎臓の好塩基性変化と尿細管上皮の剥離及び好酸体の増加、雌にのみ腎臓の近位尿細管の好酸滴の発生が認められた。血液系への影響として、雌雄ともにヘモグロビン濃度の減少、雄にのみヘマトクリット値の減少及び雌雄ともに脾臓にヘモジデリン沈着が認められた。生殖器への影響として、精巣の精原細胞壊死、精巣上体の精上皮細胞の残屑の出現が認められた。

1481 ppm 群では、雌雄ともに体重増加の抑制や摂餌量の低下はほとんどみられなかった。肝臓への影響として、雌雄ともに、総蛋白、アルブミン、総コレステロール及びリン脂質の増加、肝臓実重量の増加及び肝臓に中心性の腫脹が認められた。腎臓への影響として、雄にのみ腎臓に好塩基性変化と尿細管上皮の剥離及び好酸体、雌にのみ腎臓の近位尿細管の好酸滴が認められた。血液系への影響として雌にヘモグロビン濃度のわずかな減少、脾臓にはヘモジデリン沈着が認められた。

雌雄ともに全投与群に黄色尿が全投与期間にわたって観察された。

被験物質の 13 週間混餌投与によるラットの毒性影響は、下記のように概括される。被験物質の投与による動物の死亡は認められなかったが、摂餌量の低下を伴った体重増加の抑制が雌雄ともに 2222 ppm 以上の群でみられた。被験物質による毒性の主要標的臓器は、肝臓、腎臓、脾臓、血液系及び生殖器（雄のみ）であった。これらの臓器への影響は、肝臓と腎臓では 1481 ppm 以上の群、生殖器では 2222 ppm 以上の群で見られた。血液系と脾臓への影響は、雄では 2222 ppm 以上の群で、雌では 1481 ppm 以上の群でみられた。

## (2) 無毒性量 (NOEL) / 最小毒性量 (LOEL)

従って、13 週間の混餌投与による最小毒性量は、雌雄の肝臓と腎臓、雌の血液系/脾臓への影響をエンドポイントとして 1481 ppm (雄; 0.093 g/kg body weight/day、雌; 0.106 g/kg body weight/day) と考えられる。

## (3) 他文献との比較等

- ① 黄色尿が全ての投与群で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 8)。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  $^1\text{H-NMR}$  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 *N*-アセチル-*S*-(4-クロロ-3-ニトロフェニル)-*L*-システインに変換されることに起因することを確認した (文献 6)。
- ② 和田らの、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン強制経口投与による Crj:CD(SD)ラットの簡易生殖毒性試験報告によれば (文献 9)、60 mg/kg 以上を反復投与した親動物に、一般状態 (流涎、黄褐色尿)、200 mg/kg 群で雌雄の一般状態 (自発運動の低下、後肢の進展など) 及び体重に影響がみられ、雄の臓器重量、剖検及び病理組織学的検査 (精巣、精巣上体) に異常所見が得られ、雄では死亡例もみられた。我々の試験結果と比較

して、黄色尿の出現と精巣への影響の点については一致する。和田らは肝臓と腎臓の病理組織学的変化を報告していないが、我々は肝臓と腎臓がこの被験物質に対する最も鋭敏な標的臓器であることを見出した。

- ③ 雄の投与群（7500 ppm 群を除く）に好酸体の程度の増強が認められた。好酸体は  $\alpha$ -2-マイクログロブリンが尿細管上皮内に蓄積する所見で、雄ラットに特有な病変であり、重度の沈着によって尿細管上皮が傷害されることが知られている（文献 10）。また雄ラットのみに好塩基性変化と尿細管上皮の剥離も出現しており、好酸体の増強、すなわち  $\alpha$ -2-マイクログロブリンの蓄積による尿細管上皮の傷害が 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン投与によって亢進されることを示唆している。尿細管上皮傷害を反映した血液生化学的变化として尿素窒素の増加が認められた。
- ④ 投与濃度に対応したメトヘモグロビン濃度の増加、血液学的指標値の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נט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 11）。本試験では血液学的指標値の変化として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、赤血球の溶血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わずか 0.4 %であり、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの血液系への影響の成因として、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る。

#### (4) がん原性試験の最大耐量

被験物質の2年間混餌投与によるラットのがん原性試験における投与濃度は、上記の13週間試験結果を考慮して、下記のように設定した。3333 ppm 群と2222 ppm 群では、雌雄ともに肝臓と血液系への影響が、雄には腎臓に尿細管上皮の剥離が認められ、2222 ppm 以上の濃度では104週間の連続投与に動物は耐えられないと考えた。1481 ppm 群では、肝臓、腎臓、血液系への影響が認められたが、その程度は軽度であり、がん原性試験の最大耐量は、1481 ppm 以上で2222 ppm 未満の濃度範囲に存在すると考えた。従って、がん原性試験の最高投与濃度を、雌雄ともに、2000 ppm とし、以下、公比 2.5 で 800 ppm、320 ppm に設定した。



V 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. (U.S.)
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 Co-operation and Development (OECD) (1981)  
Guideline for Testing of Chemicals 408 for "Subchronic Oral Toxicity"  
—Rodent: 90-day Study. 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
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. 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.

9. 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修 (1996)  
1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン  
化学物質毒性試験報告、第3巻  
pp.111-137, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京
10. Alden, C. L. and Frith, C. H. (1991)  
Urinary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (eds. by Haschek, W. M.  
and Rousseaux, C. G.), pp. 315 – 387, Academic Press, New York.
11. 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