

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2週間毒性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0299

CAS No. 89-61-2

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

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 2 週間毒性試験(混餌試験)報告書

試験番号：0299

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	5
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	6
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	7
II-3-5	血液生化学的検査	8
II-3-6	病理学的検査	8
II-4	数値処理と統計方法	
II-4-1	数値の取り扱いと表示	9
II-4-2	母数の取り扱い	9
II-4-3	統計方法	9
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	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	17

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Crj:BDF₁マウスを用いて経口投与による2年間(104週間)の試験を実施するに当たり、その予備試験である13週間試験の投与濃度を決定するために本試験(2週間試験)を実施した。投与は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10000 ppm、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、625 ppmとした。観察、検査項目として、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、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、最高用量の10000 ppm群では、顕著な体重増加の抑制と摂餌量の低下が認められ、雄に2匹、雌に6匹の死亡がみられた。肝臓への影響として、肝臓の重量増加、肝細胞の中心性肥大、GOT、GPT、LDH及びγ-GTPの上昇が認められた。腎臓への影響として、尿素窒素の増加が認められた。血液系への影響としては貧血を示唆する変化として赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少が認められた。また、白血球数の減少傾向(特にリンパ球比の減少)から造血機能の低下が示唆された。その他、消耗性変化として胸腺の萎縮とCPKの上昇及び栄養不良を示唆する変化としてグルコースの減少が認められた。

5000 ppm以下の投与群では体重増加の抑制と摂餌量の減少及び死亡動物は認められず、その他の検査でもすぐに動物の生死に影響を及ぼす変化は観察されなかった。

投与群で観察された黄色尿は、投与ラット尿のLC-MS/MS法と¹H-NMR法による同定の結果、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*-システインであると考えられる。また、2週間混餌投与による最小毒性量(LOAEL)は肝臓への影響をエンドポイントとして625 ppm(雄:105~139 mg/kg body weight/day、雌:115~135 mg/kg body weight/day)であると考察される。

これらの結果から、10000 ppmの濃度では13週間の連続投与には耐えられないと考え、5000 ppm以上10000 ppm未満の濃度が13週間試験の最大投与濃度であると考えた。従って、13週間試験の投与濃度は、雌雄とも最高用量を7500 ppmとし、以下5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm(公比1.5)に設定した。

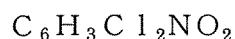
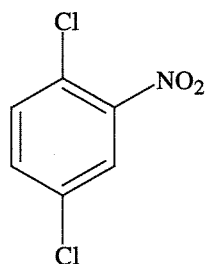
I 試験材料

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 : 室温で暗所に保存した。

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : CAN1112
 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%以上 (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、被験物質として試験に使用した 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装置 (Hewlett Packard 5989B Mass Spectrometer)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 Infrared Spectrometer)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 K 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質として使用した 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンについて、投与開始前及び投与終了後に、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC Infrared Spectrometer)により測定し、また、ガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph) により測定し、それぞれのデータを比較した。

その結果、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 K 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) (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 75 匹を生後 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、体重の中央値に近い雌雄各 60 匹 (投与開始時体重範囲、雄: 18.6 ~ 21.3g、雌: 16.1 ~ 18.3g) 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、理由から Crj:BDF₁ マウス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、Crj:BDF₁ マウスを使用することにした。

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

1995年11月2日～1995年11月16日までの2週間、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餌重量の測定頻度に合わせ最長4日間とした。

Ⅱ-1-4 投与濃度

10000 ppm、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm 及び 625 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、水に不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決定（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試験の結果をもとに設定した。すなわち、予備試験では6週齢のCrj:BDF₁マウス(SPF)雌雄に10000 ppmと50000 ppmの濃度の混餌飼料を動物に1週間自由摂取させた。その結果、低用量の10000 ppmでは雌雄とも正常な摂餌量、体重増加を示した。高用量の50000 ppmでは、雌雄とも餌をほとんど摂取せず、体重は大幅に減少し、雄では2匹中1匹が、雌では2匹中2匹が死亡した。以上のことから2週間試験の投与濃度は、雌雄ともに最高投与濃度を10000 ppmに設定し、以下、5000 ppm、2500 ppm、1250 ppm、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

10000 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、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、2500 ppm、1250 ppm、625 ppm の被験物質混合飼料については、10000ppm に調製された被験物質混合飼料を中間体として、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 回実施し、作製された被験物質混合飼料は冷蔵保存し、試験終了まで使用した。

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、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 Gas Chromatograph）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、93.0～98.9%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 K 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、各設定濃度に調製された被験物質混合飼料を 4 日間動物飼育室内に放置し、調製時及び調製後 4 日目にガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph）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、4 日後には 85.9～94.5%であった。その結果を APPENDIX K 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、各設定濃度に調製された被験物質混合飼料を 25 日間冷蔵保存し、調製時及び冷蔵保存後にガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph）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、25 日間冷蔵保存後には 93.3～114%であった。その結果を APPENDIX K 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 1 日摂取量（g/kg/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)
625 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	625 ppm 群	10 匹 (2101~2110)
1250 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	1250 ppm 群	10 匹 (2201~2210)
2500 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	2500 ppm 群	10 匹 (2301~2310)
5000 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	5000 ppm 群	10 匹 (2401~2410)
10000 ppm 群	10 匹 (1501~1510)	10000 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、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 5)。

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、動物はバリア区域内の独立した室に収容し、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、設定温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (実測値 平均 \pm 標準偏差: $23.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$)、設定湿度 $55 \pm 10\%$ (実測値 平均 \pm 標準偏差: $54 \pm 1\%$)、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 \times 212D \times 120H mm)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)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)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、一般状態の観察を投与開始後 1、4、7、11 及び 14 日に行った。

Ⅱ-3-2 体重測定

0 日目(投与開始直前)、1 日目(1 週 1 日)、4 日目(1 週 4 日)、7 日目(1 週 7 日)、11 日目(2 週 4 日)及び 14 日目(2 週 7 日)に体重を測定した。なお、動物の死亡発見時にも体重を測定した。

Ⅱ-3-3 摂餌量測定

週 2 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 EDTA-2 カリウム入り採血管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、雌雄とも各群 5 匹の動物（雌の 10000ppm 群のみ 3 匹）について、血液学的検査を行った。

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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、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 L1 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雌雄とも各群 5 匹の動物（10000ppm 群については雄 4 匹、雌 3 匹）について血液生化学的検査を行った。

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 L1 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

定期解剖時まで生存した雌雄各群とも 5 匹（雄の 2500、5000ppm 及び雌の 10000ppm 群については 4 匹）の動物について、定期解剖時に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

定期解剖時まで生存した動物のうち雌雄各群とも 2 匹について、また最高用量の 10000ppm 群の死亡動物では雌雄とも 1 匹について、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、卵巣、子宮、陰、乳腺、脳、脊髄、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、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当たりの摂取量は摂餌量に 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 BW/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 M1 に示した精度により表示した。A/G 比はアルブミン/(総蛋白-アルブミン)による計算で求め、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。

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ついては母数より除いた。

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については母数より除いた。

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。

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。

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、APPENDIX A 1, 2 に示した。

最高用量の 10000 ppm 群の雄では、投与開始後 11 日目（2 週 4 日）に 1 匹、13 日目（2 週 6 日）に 1 匹の計 2 匹、雌では 12 日目（2 週 5 日）に 2 匹、投与終了時（2 週 7 日）に 4 匹の計 6 匹の死亡が認められた。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に示した。

雄では最低用量の 625 ppm 群以外の投与群の動物に投与開始翌日（1 週 1 日）より投与終了（2 週 7 日）まで黄色尿が観察された。また、最高用量の 10000 ppm 群に 4 日目（1 週 4 日）より立毛が観察され、投与終了時（2 週 7 日）まで認められた。

雌では全投与群に投与開始翌日（1 週 1 日）より投与終了（2 週 7 日）まで黄色尿が観察された。また、最高用量の 10000 ppm 群では投与開始後 11 日目（2 週 4 日）より立毛が全動物に観察され、投与終了時（2 週 7 日）まで認められた。

Ⅲ-3 体重

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

雌雄とも最高用量の 10000 ppm 群に体重増加の抑制が認められた。また、雌雄とも 5000 ppm 群では投与期間途中に増加抑制が認められたが、投与終了時（2 週 7 日）には対照群と同様な体重値を示した。

なお、最終計測日（2 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 10000 ppm 群：57%、5000 ppm 群：98%、2500 ppm 群：101%、1250 ppm 群：101%、625 ppm 群：101%、雌では 10000 ppm 群：58%、5000 ppm 群：102%、2500 ppm 群：99%、1250 ppm 群：99%、625 ppm 群：98%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。

雌雄とも最高用量の 10000 ppm 群に摂餌量の低値が認められた。5000 ppm 以下の投与群では対照群と同様な摂餌量を示した。

投与期間中の投与群の摂餌量は対照群に対して雄では 10000 ppm：40～70%、5000 ppm

群：89～107%、2500 ppm 群：97～110%、1250 ppm 群：97～111%、625 ppm 群：98～105%、雌では 10000 ppm 群：38～75%、5000 ppm 群：94～113%、2500 ppm 群：86～89%、1250 ppm 群：88～93%、625 ppm 群：88～95%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。

雌雄とも 5000 ppm 以下の投与群ではほぼ公比どおりの被験物質摂取量を示したが、最高用量の 10000 ppm 群では公比どおりの被験物質摂取量を示さなかった。すなわち、設定濃度は雌雄とも 10000、5000、2500、1250、625 ppm（公比 2）であるのに対し、全投与期間の被験物質摂取量は雄で 10000 ppm 群：1.164～1.677g/kg、5000 ppm 群：0.830～1.152g/kg、2500 ppm 群：0.437～0.590g/kg、1250 ppm 群：0.211～0.313g/kg、625 ppm 群：0.105～0.139g/kg、雌では 10000 ppm 群：1.250～2.174g/kg、5000 ppm 群：0.939～1.386g/kg、2500 ppm 群：0.432～0.542g/kg、1250 ppm 群：0.221～0.279g/kg、625 ppm 群：0.115～0.135g/kg であった。

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 2500 ppm 以上の投与群でヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の減少、5000 ppm 群以上の投与群で赤血球数の減少、10000 ppm 群で MCHC、血小板数及び分葉核好中球比の増加ならびに MCV、MCH 及びリンパ球比の減少、白血球数の減少傾向が認められた。

雌では 5000 ppm 以上の投与群でヘマトクリット値の減少、10000 ppm 群で MCHC の増加、血小板数の増加傾向ならびに MCV とリンパ球比の減少、白血球数の減少傾向が認められた。その他、5000 ppm 群で MCV と MCH の増加ならびに赤血球数とヘモグロビン濃度の減少が認められた。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では 2500 ppm 以上の投与群でアルブミンと総コレステロールの増加ならびに GPT の上昇、5000 ppm 以上の投与群で総蛋白の増加、2500 ppm 群と 5000 ppm 群でリン脂質の増加、10000 ppm 群で総ビリルビン、尿素窒素及びナトリウムの増加、グルコースの減少、ならびに GOT、LDH 及び CPK の上昇が認められた。その他、5000 ppm 群でカルシウムの増加が認められたが、投与量に対応したものではなく、わずかな変化であった。

雌では全投与群で総コレステロールの増加、10000 ppm 群を除く投与群でリン脂質の増加、5000 ppm 以上の投与群で総蛋白の増加、ならびに GOT と GPT の上昇、10000 ppm 群で総ビリルビンとナトリウム増加、グルコースの減少ならびに γ -GTP の上昇が認められた。

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 (全動物)、APPENDIX G 3, 4 (死亡動物)、APPENDIX G 5, 6 (定期解剖動物) に示した。

雌雄とも死亡動物全匹 (10000 ppm 群 雄: 2 匹、雌: 6 匹) に胸腺の萎縮が観察された。また、定期解剖動物 (生存動物) の最高用量の 10000 ppm 群の全匹 (雄: 8 匹、雌: 4 匹) にも胸腺の萎縮が観察された。

その他には、投与群に特徴的な所見は認められなかった。

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)、I 1, 2 (体重比) に示した。

雄では肝臓は 1250 ppm、2500 ppm 及び 5000 ppm 群で実重量及び体重比の高値を示し、最高用量の 10000 ppm 群では実重量の低値と体重比の高値を示した。脾臓は、2500 ppm 群で体重比の高値と 5000 ppm 群で実重量と体重比の高値、最高用量の 10000 ppm 群で実重量と体重比の低値を示した。なお、胸腺と精巣は、最高用量の 10000 ppm 群で実重量と体重比の低値を示し、両臓器の萎縮を示した。

その他、体重増加の抑制に伴ったと思われる相対的な変化として、最高用量の 10000 ppm 群で副腎、心臓、肺及び腎臓の実重量の低値ならびに脳の実重量の低値と体重比の高値が認められた。

雌では肝臓は 1250 ppm 群、2500 ppm 群及び 5000 ppm 群で実重量と体重比の高値、最高用量の 10000 ppm 群では実重量の低値と体重比の高値を示した。脾臓は 5000 ppm 群で実重量と体重比の高値、最高用量の 10000 ppm 群では実重量と体重比の低値を示した。なお、胸腺は最高用量の 10000 ppm 群で実重量と体重比の低値を示し、萎縮を示した。

その他、体重増加の抑制に伴ったと思われる相対的な変化として、最高用量の 10000 ppm 群で心臓の実重量の低値、肺の体重比の高値、腎臓と脳の実重量の低値と体重比の高値が認められた。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

全動物を APPENDIX J 1, 2、死亡動物（10000 ppm 群雌雄各 1 匹）を APPENDIX J 3, 4、定期解剖動物（雌雄とも各群 2 匹）の病理組織学的所見を APPENDIX J 5, 6 に示した。

10000 ppm 群の死亡動物は雌雄ともに肺の鬱血、胸腺の萎縮及び脾臓の萎縮が認められた。さらに、肝臓の中心性の肝細胞の肥大が雌のみに認められた。

定期解剖動物（生存動物）の雄では、全投与群で肝臓の中心性の肝細胞の肥大（各群 2 匹）、5000 ppm 以上の群で精巣の精原細胞壊死（各群 2 匹）と精巣上体の精子の減少（各群 2 匹）、最高用量の 10000 ppm 群で胸腺の萎縮（2 匹）、脾臓の萎縮（2 匹）、前胃の糜爛（2 匹）、前胃の過形成（1 匹）が認められた。その他、2500 ppm 群と 5000 ppm 群で脾臓の髓外造血（各群 2 匹）、5000 ppm 群にのみ精巣上体の精上皮系細胞の残屑（2 匹）が認められた。

定期解剖動物（生存動物）の雌では、全投与群で肝臓の中心性の肝細胞の肥大（625 ppm 群のみ 1 匹、他群は 2 匹）、最高用量の 10000 ppm 群で胸腺の萎縮（2 匹）、脾臓の萎縮（2 匹）、前胃の糜爛（1 匹）、前胃の過形成（1 匹）及び脳の出血（1 匹）が認められた。その他、5000 ppm 群で前胃の過形成（2 匹）、2500 ppm 群と 5000 ppm 群で脾臓の髓外造血（各群 2 匹）と肝臓の細胞分裂像増加（各群 2 匹）が認められた。

IV 考察及びまとめ

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 Crj:BDF₁ マウスを用いて経口（混餌）投与による2年間（104週間）の試験を実施するに当たり、その予備試験である13週間試験の投与濃度を決定するために本試験（2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。用量は、雌雄とも10000、5000、2500、1250、625 ppmと設定した。

試験の結果、最高用量の10000 ppm群では、雌雄とも顕著な体重増加の抑制（最終計測時 雄：57%、雌：58%）、黄色尿の出現、大幅な摂餌量の低下（雄：40～70%、雌：38～75%）が認められ、雄に2匹、雌に6匹の死亡動物が認められた。剖検では、死亡動物、生存動物ともに胸腺の萎縮（消耗性変化）が認められた。血液学的検査では、軽度の貧血を示唆する変化として、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及び血小板数の増加ないし増加傾向、赤血球恒数（MCV、MCH、MCHC）の変化が認められた。また、白血球数の減少傾向が認められ、特にリンパ球比の減少から造血機能の低下が示唆された。血液生化学的検査では、雌雄ともに肝臓への影響を示唆する総蛋白、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、GOT、GPT及びLDH及び γ -GTPの上昇、腎障害を示唆する尿素窒素の増加、栄養不良を示唆するグルコースの減少が認められた。また、CPKの上昇が認められ、骨格筋等の消耗が考えられた。剖検では消耗性変化を示唆する胸腺の萎縮が雌雄ともに観察された。臓器重量では雌雄ともに肝臓の体重比の高値が認められた。病理組織学的検査では、雌雄の死亡、生存例ともに肝細胞の中心性肥大、脾臓と胸腺の萎縮が認められた。生存例にのみ、雌雄に前胃の糜爛と過形成、雄に精巣の精原細胞の壊死、雌に脳の出血が認められた。

5000 ppm群では、雌雄ともに体重増加の抑制、摂餌量の低下及び死亡動物は認められず、黄色尿の出現が認められた。血液学的検査では、雌雄ともわずかな貧血を示唆する変化が認められた。血液生化学的検査では、雌雄とも肝臓への影響を示唆する変化が認められた。臓器重量では、雌雄とも肝臓と脾臓の実重量と体重比の高値が認められた。病理組織学的検査では、雌雄ともに肝細胞の中心性肥大と分裂像の増加及び脾臓の髓外造血、雄に精巣の精原細胞壊死、精巣上体の精子減少と精上皮細胞の残屑、雌に前胃の過形成が認められた。

2500 ppm群では、雌雄とも体重増加の抑制、摂餌量の低下及び死亡動物は認められず、黄色尿の出現が認められた。血液学的検査では、雄にわずかな貧血を示唆する変化が認められるのみであった。血液生化学的検査では、雌雄ともにわずかな肝臓への影響を示唆する変化が認められた。臓器重量では、雌雄ともに肝臓の実重量と体重比の高値、雄に脾臓の体重比の高値が認められた。病理組織学的検査では、雌雄ともに肝細胞の中心性肥大と分裂像の増加及び脾臓の髓外造血が認められた。

1250 ppm群では、雌雄ともに黄色尿の出現、血液生化学的検査で雌にのみ肝臓への影響

を示唆する変化、臓器重量で雌雄ともに肝臓の実重量と体重比の高値、病理組織学的検査で雌雄とも肝臓の肝細胞の中心性肥大が認められた。

625 ppm 群では、雌にのみ黄色尿の出現、血液生化学的検査で雌にのみ肝臓への影響を示唆する変化、病理組織学的検査で、肝臓の肝細胞の中心性肥大が認められた。

雄の 1250 ppm 以上の投与群及び雌の全投与群で観察された黄色尿は、投与ラット尿の LC-MS/MS 法と ^1H -NMR 法による同定の結果、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*-システインであると考えられる(文献 6, 7)。

また、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの 2 週間混餌投与による最小毒性量 (LOAEL) は肝臓への影響をエンドポイントとして 625 ppm (雄 : 105~139 mg/kg body weight/day、雌 : 115~135 mg/kg body weight/day) であると考察される。

以上のように、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの 2 週間投与により、最高用量の 10000 ppm 群で雌雄ともに動物の死亡と顕著な体重増加の抑制と摂餌量の低下、肝臓、腎臓、血液系への影響が認められるため、10000 ppm の濃度では 13 週間の連続投与に動物は耐えられないと考えた。5000 ppm 群では、体重増加の抑制と摂餌量の減少は認められず、その他の検査でもすぐに動物の生死に影響を及ぼす変化は観察されなかったことから、5000 ppm 以上 10000 ppm 未満の濃度が 13 週間試験の最大投与濃度であると考えた。従って、13 週間試験の投与濃度は、雌雄とも最高用量を 7500 ppm とし、以下、5000 ppm、3333 ppm、2222 ppm、1481 ppm (公比 1.5) 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. Heller S. R. and Milne, G. W. A. (1978)
EPA/NIH Mass Spectral Data Base Vol.1, p.882
U. S. Government Printing Office, Washington
4. 和光純薬工業 (株) 提供資料 (1995)
赤外吸収スペクトル
5. 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
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. 日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
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. 240; 7130 - 7139