

1 - クロロ - 2,4 - ジニトロベンゼンのラット及びマウスを用いた  
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号

2 週 間     : ラット/0081 ; マウス/0081

1 3 週 間   : ラット/0087 ; マウス/0088

がん原性 : ラット/0095 ; マウス/0096

CAS   No. 97-00-7

平成4年8月19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-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンのラット及びマウスを用いた  
経口投与によるがん原性試験（混餌試験）報告書

試験番号

2週間 : ラット/0081 ; マウス/0081

13週間 : ラット/0087 ; マウス/0088

がん原性 : ラット/0095 ; マウス/0096

本 文

## 目 次

要 旨	1
C D N B について	2
I 試 験 材 料	
I - 1 被 験 物 質 の 使 用 ロ ッ ト 等	5
I - 2 被 験 物 質 の 同 一 性 ・ 安 定 性	5
I - 2 - 1 同 一 性	5
I - 2 - 2 安 定 性	5
I - 3 試 験 動 物	6
II 試 験 方 法	
II - 1 投 与	
II - 1 - 1 投 与 経 路、投 与 方 法 及 び 投 与 期 間	7
II - 1 - 2 投 与 量 または 投 与 濃 度 及 び そ の 設 定 の 理 由	7
II - 1 - 3 被 験 物 質 の 濃 度 調 整	9
II - 1 - 4 調 製 時 に お け る 濃 度 測 定	9
II - 1 - 5 投 与 条 件 下 に お け る 被 験 物 質 の 安 定 性	9
II - 1 - 6 被 験 物 質 の 摂 取 量	9
II - 2 動 物 管 理	
II - 2 - 1 群 分 け 及 び 個 体 識 別 方 法	10
II - 2 - 2 飼 育 条 件	10
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	11
II - 3 - 2 体 重 測 定	11
II - 3 - 3 摂 餌 量 測 定	11
II - 3 - 4 血 液 学 的 検 査	11
II - 3 - 5 血 液 生 化 学 的 検 査	11
II - 3 - 6 尿 検 査	12
II - 3 - 7 病 理 学 的 検 査	12
II - 4 数 値 処 理 と 統 計 学 的 方 法	12
II - 5 試 資 料 の 保 管	14

## III 試験成績

## III-1 ラットを用いた試験

## III-1-1 2週間試験

(1) 動物の状態観察 .....	15
(2) 血液学的検査・血液生化学的検査 .....	16
(3) 病理学的検査 .....	16

## III-1-2 13週間試験

(1) 動物の状態観察 .....	17
(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 .....	18
(3) 病理学的検査 .....	19

## III-1-3 がん原性試験

(1) 動物の状態観察 .....	21
(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 .....	22
(3) 病理学的検査 .....	22

## III-2 マウスを用いた試験

## III-2-1 2週間試験

(1) 動物の状態観察 .....	25
(2) 血液学的検査・血液生化学的検査 .....	26
(3) 病理学的検査 .....	26

## III-2-2 13週間試験

(1) 動物の状態観察 .....	27
(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 .....	28
(3) 病理学的検査 .....	29

## III-2-3 がん原性試験

(1) 動物の状態観察 .....	31
(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 .....	32
(3) 病理学的検査 .....	32

IV 考察 .....	35
-------------	----

V 結論 .....	39
------------	----

VI 文献 .....	40
-------------	----

## TABLES

- TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS  
IN THE FEED (OR GAVAGE) STUDIES OF 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE
- TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT  
(TWO-WEEK STUDIES)
- TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT  
(TWO-WEEK STUDIES)
- TABLE 4 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT(TWO-WEEK STUDIES)
- TABLE 5 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT(TWO-WEEK STUDIES)
- TABLE 6 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- TABLE 7 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- TABLE 8 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- TABLE 9 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT(THIRTEEN-WEEK STUDIES)

## TABLES (CONTINUED)

- TABLE 10 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT  
(TWO-YEAR STUDIES)
- TABLE 11 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT  
(TWO-YEAR STUDIES)
- TABLE 12 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT(TWO-YEAR STUDIES)
- TABLE 13 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT(TWO-YEAR STUDIES)
- TABLE 14 CLINICAL OBSERVATION (104W-SUMARY) - RAT:TWO-YEAR STUDIES -
- TABLE 15 NEOPLASTIC LESIONS (KIDNEY)  
INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS :RAT :MALE
- TABLE 16 NEOPLASTIC LESIONS (PREPITUAL GLAND)  
INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS :RAT :MALE
- TABLE 17 NEOPLASTIC LESIONS (MAMMARY GRAND)  
INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS :RAT :FEMALE
- TABLE 18 CAUSE OF DEATH : RAT

## TABLES (CONTINUED)

- TABLE 19 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE  
(TWO-WEEK STUDIES)
- TABLE 20 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE  
(TWO-WEEK STUDIES)
- TABLE 21 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE(TWO-WEEK STUDIES)
- TABLE 22 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE(TWO-WEEK STUDIES)
- TABLE 23 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- TABLE 24 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- TABLE 25 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- TABLE 26 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- TABLE 27 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE  
(TWO-YEAR STUDIES)
- TABLE 28 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE  
(TWO-YEAR STUDIES)
- TABLE 29 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE(TWO-YEAR STUDIES)
- TABLE 30 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE(TWO-YEAR STUDIES)
- TABLE 31 CLINICAL OBSERVATION (104W-SUMMARY) -MOUSE:TWO-YEAR STUDIES-
- TABLE 32 CAUSE OF DEATH : MOUSE



## F I G U R E S

FIGURE 1 METABOLIC PATHWAY OF 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE

FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE : RAT:MALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 3 SURVIVAL ANIMAL RATE : RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:MALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 5 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 6 FOOD CONSUMPTION : RAT:MALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION : RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 8 SURVIVAL ANIMAL RATE : MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 9 SURVIVAL ANIMAL RATE : MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 10 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 11 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 12 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDIES)

FIGURE 13 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDIES)



## P H O T O G R A P H S

- PHOTOGRAPH 1 MAMMARY GLAND, ADENOCARCINOMA  
104-WEEK STUDY, RAT, FEMALE, 2000ppm, ANIMAL No.0095-2350  
(H.E., X60)
- PHOTOGRAPH 2 KIDNEY, RENAL CELL ADENOMA:A  
104-WEEK STUDY, RAT, MALE, 2000ppm, ANIMAL No.0095-1315  
(H.E., X150)
- PHOTOGRAPH 3 KIDNEY, EOSINOPHILIC DROPLET;PROXIMAL TUBULE:A  
104-WEEK STUDY, RAT, MALE, 2000ppm, ANIMAL No.0095-1331  
(H.E., X300)
- PHOTOGRAPH 4 SPLEEN, EXTRAMEDULLARY HEMATOPOIESIS:A  
DEPOSIT OF HEMOSIDERIN(MODERATE):B  
104-WEEK STUDY, RAT, MALE, 800ppm, ANIMAL No.0095-1242  
(H.E., X150) WHITE PULP:C
- PHOTOGRAPH 5 STOMACH, HYPERPLASIA;FORESTOMACH:A  
104-WEEK STUDY, RAT, MALE, 2000ppm, ANIMAL No.0095-1309  
(H.E., X60)
- PHOTOGRAPH 6 THYROID, DEPOSIT OF PIGMENT:A  
104-WEEK STUDY, MOUSE, MALE, 2000ppm, ANIMAL No.0096-1304  
(H.E., X150)
- PHOTOGRAPH 7 STOMACH, HYPERPLASIA;FORESTOMACH:A  
104-WEEK STUDY, MOUSE, MALE, 2000ppm, ANIMAL No.0096-1316  
(H.E., X60)

## APPENDIXES

- APPENDIX A 1-1 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX A 1-2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 1-3 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 1-4 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX A 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX A 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 4-1 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX A 4-2 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 4-3 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 4-4 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX A 5-1 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX A 5-2 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 5-3 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 5-4 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 6-1 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX A 6-2 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 6-3 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 6-4 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 7-1 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 7-2 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 7-3 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 7-4 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 7-5 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 7-6 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 7-7 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 7-8 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX A 8-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 8-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 8-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 8-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 8-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 8-6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 8-7 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 8-8 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 9-1 IDENTITY AND PURITY OF CDNB  
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY  
(TWO-WEEK STUDIES)
- APPENDIX A 9-2 STABILITY OF CDNB  
AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY  
(TWO-WEEK STUDIES)
- APPENDIX A 9-3 RESULTS OF ANALYSIS AND STABILITY OF FORMULATED FIETS  
IN THE TWO-WEEK STUDIES OF CDNB

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX B 1-1 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX B 1-2 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 1-3 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 1-4 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX B 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX B 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 4-1 CHEMICAL INTAKE CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX B 4-2 CHEMICAL INTAKE CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 4-3 CHEMICAL INTAKE CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 4-4 CHEMICAL INTAKE CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 5-1 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE

APPENDIX B 5-2 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE

APPENDIX B 5-3 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE

APPENDIX B 5-4 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 6-1 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE

APPENDIX B 6-2 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE

APPENDIX B 6-3 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE

APPENDIX B 6-4 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 7-1 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE

APPENDIX B 7-2 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE

APPENDIX B 7-3 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE

APPENDIX B 7-4 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX B 8-1 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 8-2 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 8-3 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 8-4 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 8-5 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 8-6 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 9-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE  
RAT:MALE
- APPENDIX B 9-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE  
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 9-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE  
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 9-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 10-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), RELATIVE  
RAT:MALE
- APPENDIX B 10-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), RELATIVE  
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 10-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), RELATIVE  
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 10-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY), RELATIVE  
MOUSE:FEMALE



## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX B 11-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 11-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 11-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 11-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 11-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 11-6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES:SUMMARY) MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 12-1 IDENTITY AND PURITY OF CDNB  
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- APPENDIX B 12-2 STABILITY OF CDNB  
AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY  
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)
- APPENDIX B 12-3 RESULTS OF ANALYSIS AND STABILITY OF FORMULATED DIETS  
IN THE THIRTEEN-WEEK STUDIES OF CDNB

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX C 1 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX C 2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 3 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 4 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX D 1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX D 2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX D 3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX D 4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX E 1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX E 2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX E 3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX E 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX F 1 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX F 2 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX F 3 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX F 4 CHEMICAL INTAKE CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX G 1 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX G 2 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX G 3 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX G 4 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX H 1 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX H 2 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX H 3 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX H 4 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX I 1 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE
- APPENDIX I 2 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE
- APPENDIX I 3 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE
- APPENDIX I 4 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX J 1 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX J 2 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX J 3 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX J 4 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX J 5 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX J 6 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX J 7 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX J 8 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX K 1 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE  
RAT:MALE
- APPENDIX K 2 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE  
RAT:FEMALE
- APPENDIX K 3 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE  
MOUSE:MALE
- APPENDIX K 4 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), ABSOLUTE  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX L 1 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), RELATIVE  
RAT:MALE
- APPENDIX L 2 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), RELATIVE  
RAT:FEMALE
- APPENDIX L 3 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), RELATIVE  
MOUSE:MALE
- APPENDIX L 4 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY), RELATIVE  
MOUSE:FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX M 1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX M 2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX M 3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX M 4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX M 5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX M 6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS
- APPENDIX M 7 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX M 8 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDIES:SUMMARY)  
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX N 1 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED  
RAT:MALE
- APPENDIX N 2 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED  
RAT:FEMALE
- APPENDIX N 3 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED  
MOUSE:MALE
- APPENDIX N 4 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED  
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX O 1 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND TIME OF TUMOR OCCURRENCE  
RAT:MALE
- APPENDIX O 2 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND TIME OF TUMOR OCCURRENCE  
RAT:FEMALE
- APPENDIX O 3 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND TIME OF TUMOR OCCURRENCE  
MOUSE:MALE
- APPENDIX O 4 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND TIME OF TUMOR OCCURRENCE  
MOUSE:FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX P 1    NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS  
                 RAT:MALE
- APPENDIX P 2    NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS  
                 RAT:FEMALE
- APPENDIX P 3    NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS  
                 MOSE:MALE
- APPENDIX P 4    NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS  
                 MOUSE:FEMALE
- APPENDIX Q 1    IDENTITY AND PURITY OF CDNB  
                 PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY  
                 (TWO-YEAR STUDIES)
- APPENDIX Q 2    STABILITY OF CDNB AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY  
                 (TWO-YEAR STUDIES)
- APPENDIX Q 3    RESULTS OF ANALYSIS AND STABILITY OF FORMULATED DIETS  
                 IN THE TWO-YEAR STUDIES OF CDNB
- APPENDIX R 1    NUTRIENTS IN RAT AND MOUSE FEED
- APPENDIX R 2    CONTAMINANTS IN RAT AND MOUSE FEED
- APPENDIX S 1    METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS
- APPENDIX S 2    UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

## 要旨

1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)の投与によるがん原性を検索する目的で、ラットとマウスを用いて経口投与による2年間(104週間)の試験を実施した。試験に使用した動物はF344/DuCrj(Fischer)ラットとCrj:BDF<sub>1</sub>マウスで雌雄各群とも50匹とし、被験物質投与群を3群、対照群1群の計4群の構成で行った。投与濃度は雌雄のラット及びマウスとも2000ppm、800ppm、320ppmとしCDNBを混合した粉末飼料の自由摂取で、104週間投与した。観察、検査項目は一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、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。

生死状況については雌雄のラット及びマウスとも生存率は投与群と対照群との間に差がみられず、CDNBの投与による影響は認められなかった。

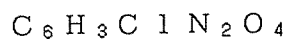
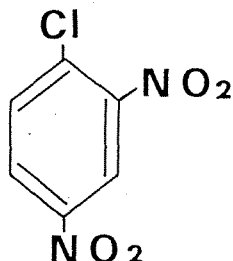
腫瘍性病変についてはラットの雄では腎細胞腺腫、雌では乳腺の腺癌の発生増加が認められ、CDNBのF344/DuCrj(Fischer)ラットに対する明かながん原性が証明された。また、その腫瘍発生濃度は2000ppmであった。

しかし、CDNBのCrj:BDF<sub>1</sub>マウスに対するがん原性は示されなかった。



C D N B について

<構造式、分子量>



分子量 : 202.5

CAS.No. : 97-00-7

<名称と別名>

名 称 : 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene(1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン)

別 名 : DNCB

2,4-Dinitrochlorobenzene(2,4-ジニトロクロロベンゼン)

4-Chloro-1,3-dinitrobenzene(4-クロロ-1,3-ジニトロベンゼン)

6-Chloro-1,3-dinitrobenzene(6-クロロ-1,3-ジニトロベンゼン)

<物理化学的性状等>

性 状 : 黄色、リョウ状結晶

沸 点 : 315℃

融 点 : 51℃

比 重 :  $d^{22}_4$  1.697

溶 解 性 : 水に不溶

エーテル、ベンゼン、二硫化炭素、温エタノールに可溶

保存条件 : 火気のない冷所に保存

### <用途>

染料(サルファブラック)・染料中間体及び有機合成に使用される他、分析用試薬として用いられている。(文献 1,2)

### <生産量>

日本では、1978年には3,016トンの生産されたが、最近の生産量は400トン程度となっている。(文献 1,3)

### <許容濃度>

各国とも未設定である。

### <法的規制>

労働安全衛生法上の規制はされていない。

### <人への影響>

一般的毒性は低いとされているが、接触性皮膚炎を起こし、かゆみ、水泡形成、皮膚の剥離などを生じる。さらに非常に強い感作性を持ち、数分間の接触で60%以上の人に感作する。(文献 4)

がん患者にCDNB感作処置を施した後、患部にCDNB投与を行なうとがんが縮小、回復する例が報告されている。(文献 4,5)

近年CDNBは円形脱毛症の治療に用いられている。(文献 6)

### <代謝>

CDNBはラットにおいて、メルカプツール酸抱合体として代謝され、尿中から排泄されることが当センターで確認された。

CDNBは肝でグルタチオン-S-トランスフェラーゼによってグルタチオン抱合体となることはよく知られている。グルタチオン抱合体に関しては腎の $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼによりグルタミン酸が切れ、さらにアミノペプチダーゼによってグリシンが切れ、システイン抱合体となり、最終的にN-アセチルトランスフェラーゼによってメルカプツール酸となることが知られている。(Figure 1)(文献 7,8,9)

### <変異原性>

微生物を用いた試験ではSummerらによると、代謝活性化を行わない場合でTA100,TA98,TA1538に強い変異原性が認められている。(文献 10)

Kratkaらによると、CDNBは代謝活性化を用いない場合の方が用いた場合に比べ低い濃度で変異原性が認められた。またCDNBを経皮投与した動物から得たS9は変異原性に影響を示さなかった。(文献 6)

動物細胞を用いた変異原性試験の開発に関する研究(1985)によると、培養細胞CHL(チャイニーズハムスターの肺細胞)を用いた染色体異常試験で直接法及びS9法いずれの場合にも $1.25\mu\text{g/ml}$ という低濃度で倍数体及び構造異常を持つ細胞が有意に増加し陽性と判定している。(文献 11)

### <動物試験>

Smythらによると急性試験ではLD<sub>50</sub>値がラットの経口投与で1070mg/kg、ウサギの経皮投与では130mg/kgとの報告がある。(文献 12)

長期試験では、E.K.Weisburgerらによるがん原性試験の報告がある。この試験は雄のラットと雌雄のマウスにCDNBを混餌により18ヶ月間投与した後、24ヶ月目で解剖した試験で、その高用量群の濃度は途中二度変更されており、ラットの雄が2000ppm:2ヶ月、500ppm:3ヶ月、1000ppm:13ヶ月の計18ヶ月、マウスの雄が6000ppm:4ヶ月、1000ppm:2ヶ月、3000ppm:12ヶ月の計18ヶ月、マウスの雌が3000ppm:4ヶ月、750ppm:2ヶ月、3000ppm:12ヶ月の計18ヶ月である。その結果ラット、マウスとも腫瘍の有意な発生増加はみられなかったとしている。(文献 13)

## I 試験材料

## I - 1 被験物質の使用ロット等

## 使用ロット番号

2 週間 試験 : DCN1805

13 週間 試験 : TLM5643

がん原性試験 : TLL7807

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

グ レ ー ド : 特級

純 度 : 99.8%以上

## I - 2 被験物質の同一性・安定性

## I - 2 - 1 同一性

被験物質として使用するCDNBを各ロット毎にマススペクトルを測定し、同一であることを確認した。なお、それらの結果について、2週間試験は Appendix A 9-1、13週間試験は Appendix B 12-1、がん原性試験は Appendix Q 1 に示した。

## I - 2 - 2 安定性

被験物質として使用するCDNBを各ロット毎に受領時及びその使用終了時に、赤外吸収スペクトル、紫外吸収スペクトル、ガスクロマトグラム、融点を測定し、安定であることを確認した。なお、それらの結果について、2週間試験は Appendix A 9-2、13週間試験は Appendix B 12-2、がん原性試験は Appendix Q 2 に示した。

## I - 3 試験動物

動物は2週間試験、13週間試験及びがん原性試験ともに日本チャールス・リバー(株)のF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)及びCrj:BDF<sub>1</sub>マウス(SPF)の雌雄を使用した。

2週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各72匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見に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、ラット雄:120~135g、雌:101~113g/マウス雄:18.1~21.7g、雌:15.9~19.0g)を選別し、試験に供した。

13週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各72匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見に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、ラット雄:125~138g、雌:98~109g/マウス雄:17.5~24.4g、雌:18.1~20.1g)を選別し、試験に供した。

がん原性試験では、ラット、マウスとも雌雄各240匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見に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200匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:115~131g、雌:97~108g/マウス雄:14.6~20.1g、雌:13.5~17.3g)を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF<sub>1</sub>マウスを選択した理由は、以下のとおりである。

- ① 遺伝的に安定している。
- ② 腫瘍の自然発生率が低い。
- ③ 過去にがん原性試験のデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られている。

## II 試験方法

### II-1 投与

#### II-1-1 投与経路、投与方法及び投与期間

2週間試験、13週間試験及びがん原性試験については、CDNBを混合した粉末飼料の自由摂取で、2週間試験では14日間連続、13週間試験では92～94日間、がん原性試験では104週間連続投与した。

#### II-1-2 投与量または投与濃度及びその設定の理由

##### 2週間試験

2週間試験では、ラットの最高投与濃度を10000ppmに設定し、それ以下、2500ppm、625ppm、156ppm、40ppm(公比4.0)とした。マウスでは、最高投与濃度を18000ppmに設定し、それ以下、6000ppm、2000ppm、667ppm、222ppm(公比3.0)とした。

ラットの2週間試験の最高投与濃度はLD<sub>50</sub>値の1070mg/kg(文献12)を1日の摂餌量中で摂取するように設定し10000ppmとした。以下の投与濃度は、最高投与濃度の10000ppmから公比4.0で下げ、計5濃度を設定した。マウスではLD<sub>50</sub>値の文献がないため、ラットのLD<sub>50</sub>値及び類似物質であるパラクロロニトロベンゼン(p-CNB)の当センターで過去に実施したLD<sub>50</sub>値(文献14)を参考にして決定した。p-CNBのLD<sub>50</sub>値はラットで680～860mg/kg、マウスではラットのおよそ1.8～2.0倍の1400～1560mg/kgであったことからCDNBのマウスのLD<sub>50</sub>値はラットのLD<sub>50</sub>値1070mg/kgの1.8倍の1926mg/kgと推定した。このことからマウスの最高投与濃度もラットと同様に考え、LD<sub>50</sub>値の1926mg/kgを1日の摂餌量中で摂取するように設定し18000ppmとした。以下の投与濃度は、最高投与濃度の10000ppmから公比4.0で下げ、計5濃度を設定した。

### 13週間試験

13週間試験では、ラット、マウスともに最高投与濃度を4000ppmに設定し、それ以下、1600ppm、640ppm、250ppm、100ppm(公比2.5)とした。

ラットの2週間試験の最高投与濃度の10000ppm群では全例死亡した。2500ppm群では、10%程度の体重抑制、脾臓のうっ血及び貧血等の毒性影響がみられた程度であった。このことから13週間試験の最高投与濃度は、10000ppmと2500ppmの間にあると考え、動物の生存率に影響を与えなくて毒性を発現すると思われる4000ppmとした。最低投与濃度は156ppm群にはほとんど毒性影響がみられないことから、無作用量は156ppm以下と予測して100ppmとした。

マウスの2週間試験の最高投与濃度の18000ppm群では、全例死亡した。6000ppm群ではほとんどの動物が死亡し、生存例にも体重抑制等の重篤な毒性影響がみられた。2000ppm群では、体重抑制はみられないが、脾臓の腫大及び骨髄の赤血球造血の亢進等の毒性影響がみられた程度であった。以上のことからラットと同様に13週間試験の最高投与濃度は4000ppm、最低投与濃度は100ppmとした。

### がん原性試験

がん原性試験では、ラット、マウスともに最高投与濃度を2000ppmに設定し、それ以下、800ppm、320ppm(公比2.5)とした。

ラットの13週間試験では、最高投与濃度の4000ppm群は毒性影響と考えられる臓器重量の増加、貧血、脾臓のうっ血の発生増加及び顕著な体重抑制がみられた。一方1600ppm群では臓器重量の増加、貧血及び脾臓のうっ血の発生増加等の毒性影響がみられたが体重抑制は僅かであった。以上のことから、ラットのがん原性試験の最高投与濃度は1600ppmよりやや高濃度の2000ppmとした。以下、最高投与濃度の2000ppmから公比2.5で下げ、中間濃度を800ppm、最低投与濃度を320ppmとした。

マウスは最高投与濃度の4000ppm群で死亡等の重篤な毒性影響がみられた。一方1600ppm群では脾臓の重量増加、血液・生化学的検査の変化及び脾臓の髄外造血等の毒性影響がみられたが、体重抑制が僅かであった。これよりマウスのがん原性試験の最高投与濃度はラットと同様に1600ppmよりやや高濃度の2000ppmとした。以下、最高投与濃度の2000ppmから公比2.5で下げ、中間濃度を800ppm、最低投与濃度を320ppmとした。



## II - 1 - 3 被験物質の濃度調製

2週間、13週間、がん原性の各試験とも、CDNBと粉末飼料を混合して予め所定の濃度に調製し、さらに、各設定濃度になるように粉末飼料を加え希釈調製した。なお、各試験における濃度の表示は%値、ppm値ともに、重量対重量比とした。また、調製頻度は餌の交換にあわせて週1回とした。

## II - 1 - 4 調製時における濃度測定

投与したCDNBの混合飼料の濃度は、2週間、13週間試験では試験開始後に、がん原性試験では試験開始後3ヶ月毎にガスクロマトグラフ法によって測定し、設定濃度に対し、2週間試験では84.7~108.6%、13週間試験では94.7~98.3%、がん原性試験では71.1~111.2%の範囲に各々調製されていることを確認した。

なお、それらの結果について、2週間試験はAppendix A 9-3、13週間試験はAppendix B 12-3、がん原性試験はAppendix Q 3に示した。

## II - 1 - 5 投与条件下における被験物質の安定性

粉末飼料と混合調製したCDNBの安定性については、その濃度をガスクロマトグラフ法により測定し、7日間の安定性を確認した。

なお、それらの結果について、2週間試験はAppendix A-4、13週間試験はAppendix B 12-4、がん原性試験はAppendix Q 4に示した。

## II - 1 - 6 被験物質の摂取量

2週間、13週間、がん原性試験のCDNBの摂取量は、体重と摂餌量の測定値及び設定濃度から算出した。

なお、それらの結果について、2週間試験はAppendix A 4-1~4、13週間試験はAppendix B 4-1~4、がん原性試験はAppendix F 1~4に示した。

## II - 2 動物管理

### II - 2 - 1 群分け及び個体識別方法

供試動物の各投与群への割り当ては、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 15)。

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、ラットとマウスは、バリア区域内の独立した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、他試験と区別した。

### II - 2 - 2 飼育条件

動物は、各試験ともに、全飼育期間を通して、温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、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。

動物のケージへの収容は、がん原性試験の検疫期間のみ、1ケージ当り5匹の群飼(ステンレス製網ケージ、ラット:340W×294D×176H mm、マウス:224W×212D×120H mm)、その他は全て単飼(ステンレス製二連網ケージ、ラット:170W×294D×176H mm、マウス:112W×212D×120H mm)とし、ケージ交換は2週間毎に実施した。なお、馴化期間及び投与期間においては、被験物質の飛散防止の為に、動物は排気型キャビネット(ドラフト形式)内で飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)のCRF-1を使用し、検疫期間はCRF-1固型飼料(3Mrad- $\gamma$ 線照射滅菌飼料)を固型飼料給餌器により、また馴化期間及び投与期間はCRF-1粉末飼料(3Mrad- $\gamma$ 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。

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、紫外線滅菌し、自動給水により自由摂取させた。

なお、がん原性試験における使用飼料の品質管理は、栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)の分析データ資料を、夾雑物については、(財)日本食品分析センターの分析データ資料を使用ロットごとに入手し、試験使用に支障のないことを確認した。(Appendix R 1, 2)

## 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

各試験とも、毎日1回、動物の一般状態の観察を行った。

### II - 3 - 2 体重測定

2週間試験では、0日(投与開始直前)、1日(1週1日)、2日(1週2日)、4日(1週4日)、7日(1週7日)、11日(2週4日)及び14日(2週7日)、13週間試験では週1回、がん原性試験では14週間までは週1回、それ以降は2週に1回、体重を測定した。

### II - 3 - 3 摂餌量測定

2週間試験及び13週間試験では週1回、がん原性試験では14週までは週1回、それ以降は2週に1回、摂餌量を測定した。

### II - 3 - 4 血液学的検査

各試験とも定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血したEDTA-2K加血液を用いて血液学的検査を行った。

なお、13週間試験及びがん原性試験の検査対象動物は解剖日前日より(18時間以上)絶食させた。

検査項目は Table 1、検査方法は Appendix S 1 に示した。

### II - 3 - 5 血液生化学的検査

各試験とも定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血したヘパリンリチウム加血液を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、13週間試験及びがん原性試験の検査対象動物は解剖日前日より絶食(18時間以上)させた。

検査項目は Table 1、検査方法は Appendix S 1 に示した。

## II - 3 - 6 尿検査

13週間試験及びがん原性試験の投与最終週まで生存した動物について、新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

検査項目は Table 1、検査方法は Appendix S 1 に示した。

## II - 3 - 7 病理学的検査

各試験とも解剖時に全動物について肉眼的に観察を行った。2週間試験では雌雄各群の 2~7例の動物の臓器を、13週間試験とがん原性試験では全動物の臓器を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、Table 1 に示した臓器及び肉眼的に変化のみられた臓器を、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。なお、鼻腔については切歯の後端(レベル1)、切歯乳頭(レベル2)、第一臼歯の前端(レベル3)の3カ所で切り出し(横断)、検査した。

臓器重量は13週間試験及びがん原性試験の定期解剖時まで生存した動物についてTable 1 に示した臓器の湿重量を測定した。

腫瘍性病変についてはPeto検定に用いるコンテックス(0:定期解剖例に発見された腫瘍、1:死亡/瀕死例に発見された腫瘍で、かつ、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/瀕死例に発見された腫瘍で、直接死因に関係する腫瘍)を付与した。(文献 16)

## II - 4 数値処理と統計学的方法

### (1) 数値の取扱いと表示

各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、ラットでは小数点以下第1位を四捨五入して整数値で、マウスでは小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

摂餌量についてはgを単位とし、1週間(7日)を通しての摂餌量を小数点以下第1位まで計測し、この値を7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。

C D N B の摂取量は摂餌量にC D N B の設定濃度を乗じ体重で除した値をmg/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 S 2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った。

## (2) 母数の取扱いと表示

各種統計検定における群内動物数(母数)は総括表に示した。

体重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、欠測となったデータについては「-」で表示し、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「-」で表示し、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、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器を除いたものを母数とした。

### (3) 統計方法

本試験で得られた測定値は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、病理組織学的検査のうち13週試験及びがん原性試験では非腫瘍性病変について、死亡/瀕死例、定期解剖例に分け、所見のみられなかった動物をグレード0として $\chi^2$ 検定を行った。また、尿検査についても $\chi^2$ 検定を行った。なお $\chi^2$ 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。

腫瘍性病変については、各臓器、腫瘍ごとに、各群いずれかの発生率が5%を越える腫瘍について、Peto検定、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(II-3-7 病理学的検査を参照)を用いて、死亡率法<Standard rates>(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<Prevalence rates>(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<Combined rates>(コンテックス0~4の総計で検定)を行った。Fisher検定は対照群と各投与群間の検定を行った。

### II-5 試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、被験物質、その他本試験に係る資料は日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書にしたがって、試資料保管施設に保管する。保管期間は最終報告書提出後10年間とする。

### Ⅲ 試験成績

#### Ⅲ-1 ラットを用いた試験

##### Ⅲ-1-1 2週間試験（試験番号：0081）

###### （1）動物の状態観察

生死状況を Table 2, 3 に示した。

動物の死亡及び切迫屠殺は、雌雄の 10000ppm群において、CDNB投与開始後、雄では6～9日の間に、雌では6～8日の間に全例認められた。

一般状態の観察結果を Appendix A 1-1, 2 に示した。

投与期間中の一般状態の観察において、雌雄の死亡動物では、立毛、軟便、円背位、瘦削が認められ、さらに自発運動量減少、体温低下及び貧血等の所見が加わり死に至った。生存動物では、雌の 2500ppm群において、尿による外陰部周囲の汚染及び汚染部の着色（被毛が黄色に着色）等の所見が認められたが、雄の 2500ppm群においては立毛のみ認められた。その他、625ppm以下の群においては雌雄ともにCDNBの投与と関連があると思われる所見は認められなかった。

体重の推移を Table 2, 3, Appendix A 2-1, 2 に示した。

雌雄の 10000ppm群においては、投与開始以降、体重は継続して低下した。雌雄の 2500ppm群では投与期間を通し、体重増加の抑制が対照群と比較して認められ、その抑制率は雄では11～14%、雌では6～12%であった。一方、625ppm以下の群の体重推移は、雌雄ともに対照群との間に顕著な差は認められなかった。

14日の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 2500ppm群：88%、625ppm群：99%、156ppm群：99%、40ppm群：101%、雌では 2500ppm群：94%、625ppm群：99%、156ppm群：99%、40ppm群：99%であった。

摂餌量を Table 4, 5, Appendix A 3-1, 2 に示した。

雄の 2500ppm以上の群において、1週の摂餌量の低下が対照群と比較して認められ、その低下率は、10000ppm群：55%、2500ppm群：25%であった。一方、雄の 625ppm以下の群及び雌の全群の摂餌量は対照群との間に顕著な差は認められなかった。



## (2) 血液学的検査・血液生化学的検査

### 血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix A 5-1,2 に示した。

雄では、2500ppm群で血小板数及びリンパ球比の減少が認められた。

雌では、2500ppm群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、M C V 及び M C H の減少が認められた。

### 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix A 6-1,2 に示した。

雄では、156ppm以上の群で G P T 活性の低下が認められ、625ppm以上の群で総コレステロール量の増加が認められた。

雌でも、625ppm以上の群で G P T 活性の低下及び総コレステロール量の増加が認められた。

## (3) 病理学的検査

### 剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix A 7-1~4 に示した。

死亡動物では、雌雄とも膀胱の赤色尿貯留が多数例にみられ、一部の例に胃の赤色液貯留、前胃の潰瘍、及び腺胃の赤色～黒色斑や黒色液貯留が観察された。

定期解剖動物では、雌雄とも毛の黄色化が 2500ppm群の多数例に観察された。

### 病理組織学的検査

病理組織学的所見を Appendix A 8-1~4 に示した。

#### 雄

死亡動物に骨髓のうっ血、胸腺の萎縮、脾臓の萎縮とうっ血、前胃の糜爛と過形成、腺胃の糜爛、及び腎臓の硝子滴と尿細管壊死が観察された。

定期解剖動物では腎臓の好酸体の発生増加が 156ppm以上の群で、脾臓の

うっ血と前胃の過形成が 2500ppm群で観察された。

雌

死亡動物に骨髓のうっ血、胸腺の萎縮、脾臓の萎縮とうっ血、前胃の糜爛と過形成、腺胃の糜爛、腎臓の硝子滴と尿細管壊死、及び副腎の出血が観察された。

定期解剖動物では脾臓のうっ血と前胃の過形成が 2500ppm群で観察された。

なお、死亡例の腎臓に観察された硝子滴と定期解剖動物の雄の好酸体は両者とも近位尿細管の曲部に出現し、HE染色でエオジンに好染する滴状物質であった。また、両者ともPAS染色に陰性であった。しかし、エオジン好染性は死亡例の硝子滴が定期解剖動物の好酸体に比べて強く、形状も死亡例の硝子滴が大きさが揃った小顆粒状であったに対し、定期解剖動物の好酸体は大小不同な滴状であった。

### Ⅲ - 1 - 2 13週間試験（試験番号：0087）

#### （1）動物の状態観察

生死状況を Table 6, 7 に示した。

動物の死亡は、雌雄ともに全ての群で認められなかった。

一般状態の観察結果を Appendix B 1-1, 2 に示した。

投与期間中の一般状態の観察において、雌雄の 4000ppm群に立毛が認められ、さらに雌の 4000ppm群及び 1600ppm群では尿による外陰部周囲の汚染が認められた。その他、雄の 1600ppm群及び他の群においては雌雄ともに C D N B の投与と関連があると思われる所見は認められなかった。

体重の推移を Table 6, 7, Appendix B 2-1, 2 に示した。

雌雄の 4000ppm群においては、全投与期間（1～13週）に、体重増加の抑制が対照群と比較して認められ、その抑制率は雄では20～28%、雌では11～17%であった。一方、1600ppm以下の群の体重推移は雌雄ともに対照群との間に顕著な差は認められなかった。

13週の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 4000ppm群:80%、1600ppm群:96%、640ppm群:100%、250ppm群:96%、100ppm群:98%、雌では 4000ppm群:85%、1600ppm群:95%、640ppm群:95%、250ppm群:97%、100ppm群:97%であった。

摂餌量を Table 8, 9, Appendix B 3-1, 2 に示した。

雌雄の 4000ppm群において投与後2週以降のほぼ全投与期間に、摂餌量の低下が対照群と比較して認められ、その低下率は雄では 15~28%、雌では 10~15%であった。一方、1600ppm以下の群の摂餌量は、雌雄の 1600ppm群の1週に低下がみられた他は対照群との間に顕著な差は認められなかった。

## (2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

### 血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix B 5-1, 2 に示した。

雄では、1600ppm以上の群で赤血球数及びヘモグロビン濃度の減少が認められ、4000ppm群でヘマトクリット値の減少、MCV、MCH及び血小板数の増加が認められた。

雌では、640ppm以上の群で血小板数の増加、1600ppm以上の群で赤血球数、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、4000ppm群でMCVの増加及びMCHCの減少が認められた。

### 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix B 6-1, 2 に示した。

雄では、1600ppm以上の群で総コレステロール及びリン脂質量の増加、ALP活性の低下が認められ、4000ppm群で総蛋白量の減少及びA/G比の増加、GPT活性の低下が認められた。

雌では、4000ppm群で総蛋白、グルコース及びトリグリセライド量の減少、GPT活性の低下、尿素窒素量の増加が認められた。

## 尿検査

尿検査の結果を Appendix B 7-1,2 に示した。

雄では、4000ppm群でウロビリノーゲンの陽性度の増加が認められた。

雌では、640ppm以上の群で蛋白の陽性度の減少、4000ppm群でpH値の低下及びウロビリノーゲンの陽性度の増加傾向が認められた。

その他、雄の640ppm群で蛋白の陽性度の減少がみられたが、投与量に相关した変化ではなかった。

## (3) 病理学的検査

### 剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix B 8-1,2 に示した。

雌雄とも外陰部周囲の毛の黄色化が1600ppm以上の群の多数例に観察された。

### 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 B 9-1,2、B 10-1,2 に示した。

雄では脾臓の実重量の高値が4000ppm群、体重比の高値が1600ppm以上の群でみられた。また、解剖時体重の低下(4000ppm群)に伴って、腎臓と肝臓の体重比の高値が1600ppm以上の群、胸腺、心臓、肺、腎臓及び脳の実重量の低値と副腎、精巣、肺及び脳の体重比の高値が4000ppm群でみられた。

雌では脾臓の実重量の高値が1600ppm以上の群、体重比の高値が640ppm以上の群でみられた。また、解剖時体重の低下(4000ppm群)に伴って、心臓の体重比の高値が全投与群、腎臓の体重比の高値が640ppm以上の群、肝臓の体重比の高値が1600ppm以上の群、胸腺と心臓の実重量の低値と卵巣、肺及び脳の体重比の高値が4000ppm群でみられた。

## 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix B 11-1, 2 に示した。

## 雄

腎臓の好酸体の発生増加が 640ppm以上の群で、脾臓のうっ血の発生増加が 1600ppm以上の群で、脾臓の髄外造血、唾液腺(顎下腺)のエオジン好性顆粒の減少と腺房細胞の腫脹、及び前胃の過形成の発生増加が 4000ppm群で認められた。

## 雌

腎臓の好酸滴の発生増加が全投与群でみられた。この好酸滴は近位尿管の曲部に出現し、HE染色ではエオジンに好染し、やや黄色を帯びる大小不同の滴状物質であり、この変化は雄のラットで程度の増強が認められた好酸体と類似していた。しかし、好酸体がPAS染色に陰性であったのに対し、好酸滴はPAS染色に陽性であった。また、脾臓のうっ血の発生増加が 1600ppm以上の群で、脾臓の髄外造血の、唾液腺(顎下腺)のエオジン好性顆粒の減少と腺房細胞の腫脹、及び前胃の過形成の発生増加が 4000ppm群で認められた。

## Ⅲ - 1 - 3 がん原性試験 (試験番号: 0095)

## (1) 動物の状態観察

生死状況を Table 10, 11及び Figure 2, 3 に示した。

動物の生存率は、雌雄ともに全ての群で対照群に比較して顕著な差は認められなかった。

各群の104週における生存動物数(生存率)は、雄では 2000ppm群:39/50例(78%)、800ppm群:42/50例(84%)、320ppm群:35/50例(70%)、対照群:36/50例(72%)、雌では 2000ppm群:35/50例(70%)、800ppm群:44/50例(88%)、320ppm群:43/50例(86%)、対照群:42/50例(84%)であった。

一般状態の観察結果を Appendix C 1, 2 に示した。また投与期間中の一般状態の観察においてCDNB投与との関連性が示唆された主な所見及び外部腫瘍を Table 14 に示した。

雌雄とも投与期間後期より、黄色尿及び着色(黄色尿による外陰部周囲の着色)が 320ppm以上の群で、尿による外陰部周囲の汚染及び円背位が雄では 2000ppm群で、雌では 800ppm以上の群で認められた。

外部腫瘍の保有動物数は、雌雄ともに各投与群と対照群の間に顕著な差は認められなかった。

体重の推移を Table 10, 11, Figure 4, 5及び Appendix D 1, 2 に示した。

体重は、雌雄の 2000ppm群の全投与期間に、さらに雌では 800ppm群の2週以降及び 320ppm群の16週以降92週までの間において、対照群と比較して増加抑制が認められ、その抑制率は雄では 2000ppm群:3~10%、雌では 2000ppm群:6~18%、800ppm群:2~11%、320ppm群:3~6%であった。一方、雄の 800ppm以下の群の体重推移は対照群との間に顕著な差は認められなかった。

摂餌量を Table 12, 13, Figure 6, 7及び Appendix E 1, 2 に示した。

摂餌量は、雄の 2000ppm群のほぼ全投与期間、雌の 2000ppm群の1~70週及び雌の 800ppm群の投与初期(1~6週)に、摂餌量の低下が対照群と比較して認められ、その低下率は雄では 2000ppm群:3~21%、雌では 2000ppm群:4~12%、800ppm群:3~6%であった。一方、雄の 800ppm以下の群及び雌の 320ppm群の摂餌量は対照群との間に顕著な差は認められなかった。

## (2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

### 血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix G 1,2 に示した。

雄では、800ppm以上の群でMCVの減少、2000ppm群でMCHの減少、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少傾向が認められた。

雌では、全投与群でMCV及びMCHの減少、800ppm以上の群でヘモグロビン濃度の減少及び減少傾向が認められた。その他、2000ppm群で単球比の減少、800ppm群で血小板数の増加がみられたが、単球比の減少はごく僅かなものであり、血小板数の増加も投与量に related したものではなかった。

### 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix H 1,2 に示した。

雄では、2000ppm群でGPT活性の低下が認められた。

雌では、800ppm以上の群で尿素窒素量の増加、2000ppm群でGOT活性の上昇が認められた。

### 尿検査

尿検査の結果を Appendix I 1,2 に示した。

蛋白の陽性度の減少が雌の全投与群及び雄の2000ppm群に認められた。

また、雌の2000ppm群でケトン体の陽性例の減少が認められた。

## (3) 病理学的検査

### 剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix K 1~4 に示した。対照群と比較して投与群に特徴的な所見はみられなかった。

## 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 K 1,2、L 1,2 に示した。

雄の2000ppm群の副腎で実重量の高値を示した。2000ppm群の心臓、肺、腎臓、脳および800ppm以上の群の肝臓に体重比の高値がみられこの体重比の高値は解剖時体重の低値によるものと思われた。

雌では2000ppm群の副腎と心臓に実重量の低値がみられ、体重比では変化がみられなかった。これは同群の解剖時体重の低値によるものと思われた。

この他2000ppm群の肺、腎臓、脳および800ppm以上の群の肝臓の体重比に高値がみられたが、これらも解剖時体重の低値によるものと思われた。

## 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を Appendix M 1~4 に示した。腫瘍性病変の結果は担腫瘍動物数を Appendix N 1,2 に、発生率を解剖時期とともに Appendix O 1,2 に、統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)の結果を Appendix P 1,2 にそれぞれ示した。

## 腎臓

雄の腎細胞腺腫の増加傾向がPeto検定およびCochran-Armitage検定で示され、Fisher検定で2000ppm群に有意な増加が示された(Table 15)。腎臓の非腫瘍性病変については近位尿細管での好酸滴出現の有意な増加が雌雄の320ppm以上の群の定期解剖例及び雌の800ppm以上の群の死亡/瀕死例にみられた。また慢性腎症の有意な減少が雌の2000ppm群の定期解剖例にみられた。

## 包皮腺

雄の腺腫の増加傾向がPeto検定とCochran-Armitage検定で示され、またFisher検定で2000ppm群に有意な増加がみられた。(Table 16)

## 乳腺

雌の腺癌の増加傾向がPeto検定とCochran-Armitage検定で示された。(Table 17)



### 脾臓

ヘモジデリン沈着と髄外造血の有意な増加が雌の800ppm以上の群の定期解剖例にみられた。

### 前胃

過形成の有意な増加が雌雄の2000ppm群の定期解剖例にみられた。

その他、肝臓の海綿状変化、肉芽形成および雄の胆管増生、雄の甲状腺のC-細胞増生、雌の副腎のペリオースス類似病変などの所見の有意な増加または減少が一部の群で示されたが投与濃度と対応した変化ではなかった。

### 死因

病理学的にみた死亡/瀕死例の死因を Table 18 に示した。

死亡/瀕死例として試験途中で解剖された例の死因は 雄では皮下腫瘍、下垂体腫瘍、雌では白血病、下垂体腫瘍、乳腺腫瘍とされた例が多く、群間に差はみられなかった。

## Ⅲ-2 マウスを用いた試験

### Ⅲ-2-1 2週間試験（試験番号：0082）

#### （1）動物の状態観察

生死状況を Table 19, 20 に示した。

動物の死亡及び切迫屠殺は、雌雄の 18000ppm群において、CDNB投与開始後、雄では3～5日の間に、雌では4～6日の間に全例認められた。また、6000ppm群において、雄では4～13日の間に9/10例、雌では5～13日の間に8/10例認められた。

一般状態の観察結果を Appendix A 1-3, 4 に示した。

投与期間中の一般状態の観察において、雌雄の18000ppm群の死亡動物では、立毛、円背位が認められ、急性的に死亡した。6000ppm群の死亡動物では、雌雄ともに自発運動量減少、立毛、円背位、汚染等の症状に加え不整呼吸、呼吸緩徐、貧血、体温低下が認められ死に至った。この群の生存動物では、雌雄ともに立毛、円背位、汚染、貧血等が認められた。その他、2000ppm以下の群においては雌雄ともにCDNBの投与と関連があると思われる所見は認められなかった。

体重の推移を Table 19, 20、Appendix A 2-3, 4 に示した。

雌雄の 18000ppm群及び 6000ppm群においては、投与開始以降、体重は継続して低下した。雌雄の 2000ppm群では、投与開始後、雄では1～4日、雌では1～2日に体重増加の抑制が対照群と比較して認められ、その抑制率は雄では11～15%、雌では6～9%であった。一方、667ppm以下の群の体重推移は雌雄ともに対照群との間に顕著な差は認められなかった。

14日の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 6000ppm群：56%、2000ppm群：94%、667ppm群：97%、222ppm群：96%、雌では 6000ppm群：74%、2000ppm群：104%、667ppm群：105%、222ppm群：102%であった。

摂餌量を Table 21, 22、Appendix A 3-3, 4 に示した。

雌雄の 6000ppm群において、1週の摂餌量の低下が対照群と比較して認められ、その低下率は雄では67%、雌では47%であった。雌の 2000ppm群では、1週の摂餌量の増加が対照群と比較して認められ、その増加率は41%であつ

た。一方、雌の 6000ppm群、雄の 2000ppm群及び他の群の雌雄の摂餌量は対照群との間に顕著な差は認められなかった。

## (2) 血液学的検査・血液生化学的検査

### 血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix A 5-3, 4 に示した。

雄では、2000ppm群で赤血球数及びヘマトクリット値の減少、MCV、MCH及びMCHCの増加が認められた。

雌でも、2000ppm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、MCV、MCH及びMCHCの増加が認められた。

その他、雄の 222ppm群で白血球数の減少、雌の 222ppm群で血小板数の減少がみられたが、投与量に相関した変化ではなかった。

また、雌雄の 6000ppm群に関しては、生存数が少ない(雄 1 匹、雌 2 匹)ため成績の対象から除外した。

### 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix A 6-3, 4 に示した。

雄では、2000ppm群でカリウム量の増加が認められた。

雌では、2000ppm群で総ビリルビン、総コレステロール及びカリウム量の増加、GPT活性の低下が認められた。

また、雌雄の 6000ppm群に関しては、生存数が少ない(雄 1 匹、雌 2 匹)ため成績の対象から除外した。

## (3) 病理学的検査

### 剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix A 7-5~8 に示した。

死亡動物では、雌雄とも肺の赤色化や赤色斑、胃、小腸及び大腸の黒色液貯留が観察された。

定期解剖動物では、脾臓の腫大と黒色化が雌雄の 2000ppm以上の群の多数例にみられ、肝臓の暗色化が雄の 667ppm以上群と雌の 2000ppm以上の群

に少数例ではあるが観察された。なお、肝臓の萎縮が雌雄の 6000ppm群に、また前胃の潰瘍が雌の 6000ppm群に観察された。

#### 病理組織学的検査

病理組織学的所見を Appendix A 8-5~8 に示した。

##### 雄

死亡動物に胸腺と脾臓の萎縮、心臓の血栓、唾液腺(顎下腺)のエオジン好性顆粒の減少、前胃の潰瘍と過形成、及び肝臓の中心性変性が観察された。

定期解剖動物では骨髓の赤血球造血の亢進、脾臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)と髓外造血、及び前胃の過形成が 2000ppm以上の群で、胸腺の萎縮、唾液腺(顎下腺)のエオジン好性顆粒の減少、肝臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)、及び腎臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)が 6000ppm群で観察された。また、前胃の潰瘍が 2000ppm群にのみ観察された。

##### 雌

死亡動物に胸腺と脾臓の萎縮、及び前胃の潰瘍と過形成が観察された。

定期解剖動物では脾臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)と髓外造血が 667ppm以上の群で、骨髓の赤血球造血の亢進と前胃の過形成が 2000ppm以上の群で、胸腺の萎縮、脾臓のうっ血、前胃の糜爛、及び肝臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)が 6000ppm群で観察された。

なお、脾臓と肝臓にみられた褐色～黄色の色素、及び腎臓の褐色の色素は鉄染色陽性であり、ヘモジデリン沈着と診断された。

#### Ⅲ-2-2 13週間試験(試験番号:0088)

##### (1) 動物の状態観察

生死状況を Table 23, 24 に示した。

動物の死亡は、雌雄の 4000ppm群において C D N B 投与開始後、雄では 2~6週の間には 3/10例、雌では 1~3週の間には 2/10例認められた。

一般状態の観察結果を Appendix B 1-3, 4 に示した。

投与期間中の一般状態の観察において、雌雄の 4000ppm群の死亡動物では、立毛、円背位、汚染、振戦、瘦削、自発運動量減少、異常呼吸、体温低下等が認められ死に至った。

生存動物では、雌雄の 4000ppm群において、少数例は死亡動物と同様の重篤な症状を示したが、多くは立毛、円背位等の症状が認められた。その他、1600ppm以下の群においては雌雄ともにCDNBの投与と関連があると思われる所見は認められなかった。

体重の推移をTable 23, 24, Appendix B 2-3, 4 に示した。

雌雄の 4000ppm群においては、ほぼ全投与期間に、体重増加の抑制が対照群と比較して認められ、その抑制率は雄では32~38%、雌では16~29%であった。一方、1600ppm以下の群の体重推移は雌雄ともに対照群との間に顕著な差は認められなかった。

13週の最終計測時における各投与群の体重は、対照群と比較して、雄では 4000ppm群:62%、1600ppm群:96%、640ppm群:97%、250ppm群:105%、100ppm群:101%、雌では 4000ppm群:84%、1600ppm群:95%、640ppm群:100%、250ppm群:107%、100ppm群:109%であった。

摂餌量を Table 25, 26, Appendix B 3-3, 4 に示した。

全投与群において、雌雄ともに対照群とほぼ同様の摂餌量の推移を示した。

## (2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

### 血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix B 5-3, 4 に示した。

雄では、250ppm群と 1600ppm以上の群でヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、1600ppm以上の群で赤血球数の減少が認められた。また、4000ppm群で分葉核好中球比の増加、リンパ球比の減少が認められた。

雌では、1600ppm以上の群で赤血球数及びヘマトクリット値の減少、4000ppm群でヘモグロビン濃度の減少が認められた。

その他、雄のMCH、MCHC、雌のMCH、血小板数に変化がみられたが、僅かな変化であり、投与量との相関性も明確ではなかった。

### 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix B 6-3,4 に示した。

雄では、4000ppm群でALP及びCPK活性の上昇、GOT及びGPT活性の上昇傾向、A/G比の増加及び総蛋白量の減少傾向、尿素窒素量の増加、グルコース及びトリグリセライド量の減少がそれぞれ認められた。

雌では、640ppm以上の群でALP活性の上昇、1600ppm以上の群でLDH活性の上昇、4000ppm群でGOT及びCPK活性の上昇、尿素窒素、カリウム及び無機リン量の増加、グルコース量の減少傾向がそれぞれ認められた。

## 尿検査

尿検査の結果を Appendix B 7-3,4 に示した。

ウロビリノーゲンの陽性度の増加が雄の4000ppm群及び雌の1600ppm以上の群に認められた。

## (3) 病理学的検査

### 剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix B 8-3~6 に示した。

雄の死亡動物では肺の赤色化、脾臓の萎縮、前胃の潰瘍、小腸の黒色液貯留、及び胆嚢の拡張が観察された。雌の死亡動物では肺の赤色化と前胃の潰瘍が観察された。

定期解剖動物では、脾臓の黒色化が雌雄の1600ppm以上の群、肝臓と甲状腺の暗色化が雌雄の4000ppm群、外陰部周囲の毛の黄色化が雄の1600ppm以上の群と雌の4000ppm群で多数例に観察された。

### 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 B 9-3,4, B 10-3,4 に示した。

雄では脾臓の体重比の高値が1600ppm以上の群、胸腺の実重量の低値が4000ppm群でみられた。また、解剖時体重の低下(4000ppm群)に伴って、心臓の体重比の高値が1600ppm以上の群、副腎、肺及び腎臓の実重量の低値と精巣、肺、腎臓、肝臓及び脳の体重比の高値が4000ppm群でみられた。

雌では脾臓の実重量の高値が4000ppm群、体重比の高値が1600ppm以上

の群でみられた。また、解剖時体重の低下(4000ppm群)に伴って、肺と脳の実重量の低値と心臓、腎臓、肝臓及び脳の体重比の高値が4000ppm群でみられた。

#### 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix B 11-3,4 に示した。

##### 雄

死亡動物に胸腺と脾臓の萎縮、心臓の血栓、舌の糜爛、唾液腺(顎下腺)のエオジン好性顆粒の減少と腺房細胞の腫脹、及び前胃の過形成が観察された。

定期解剖動物では、脾臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)の発生増加が250ppm以上の群で、脾臓の髓外造血と甲状腺の色素沈着の発生増加が1600ppm以上の群で、唾液腺(顎下腺)のエオジン好性顆粒の減少と腺房細胞の腫脹、前胃の過形成、肝臓の色素沈着、及び腎臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)の発生増加が4000ppm群で認められた。

##### 雌

死亡動物に胸腺と脾臓の萎縮、前胃の過形成、及び鼻腔の炎症が観察された。

定期解剖動物では、脾臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)の程度の増加が640ppm以上の群で、脾臓の髓外造血の程度の増加と甲状腺の色素沈着の発生増加が1600ppm以上の群で、前胃の過形成、肝臓の色素沈着、及び腎臓の色素沈着(ヘモジデリン沈着)の発生増加が4000ppm群で認められた。

なお、脾臓の褐色～黄色色素と腎臓の褐色色素は鉄染色陽性であり、ヘモジデリン沈着と診断された。これに対し、甲状腺に観察された色素は褐色を呈し脾臓や腎臓にみられたヘモジデリン沈着に類似していたが、鉄染色に陰性であり、ヘモジデリン(鉄染色陽性)とは異なる色素であった。また、肝臓に観察された色素は褐色～黄色を呈し、鉄染色では陽性色素と陰性色素の両者が観察され、ヘモジデリンとそれとは異なる色素が混在しているものと考えられた。

## Ⅲ - 2 - 3 がん原性試験 (試験番号: 0096)

## (1) 動物の状態観察

生死状況を Table 27, 28 及び Figure 8, 9 に示した。

動物の生存率は、雌雄ともに全ての群で対照群に比較して顕著な差は認められなかった。

各群の104週における生存動物数(生存率)は、雄では 2000ppm群:40/50例(80%)、800ppm群:40/50例(80%)、320ppm群:43/50例(86%)、対照群:36/50例(72%)、雌では 2000ppm群:35/50例(70%)、800ppm群:35/50例(70%)、320ppm群:30/50例(60%)、対照群:31/50例(62%)であった。

一般状態の観察結果を Appendix C 3, 4 に示した。また投与期間中の一般状態の観察においてCDNB投与との関連性が示唆された主な所見及び外部腫瘤を Table 31 に示した。

雌雄とも 75週以降、320ppm以上の群で黄色尿及び着色(黄色尿による外陰部周囲の着色)が認められた。

外部腫瘤の保有動物数は、雌雄ともに各投与群と対照群の間に顕著な差は認められなかった。

体重の推移を Table 27, 28、Figure 10, 11 及び Appendix D 3, 4 に示した。

体重は、2000ppm群において雄では投与期間前半に、雌ではほぼ全投与期間に対照群と比較して増加抑制が認められ、その抑制率は雄では4~12%、雌では3~13%であった。一方、800ppm以下の群の体重推移は雌雄ともに対照群との間に顕著な差は認められなかった。

摂餌量を Table 29, 30、Figure 12, 13 及び Appendix E 3, 4 に示した。

摂餌量は、雌雄とも 2000ppm群において体重増加の抑制がみられたのとはほぼ同時期に、対照群と比較して低下が認められ、その低下率は雄では2~12%、雌では5~19%であった。800ppm群において雌雄とも全投与期間を通し、摂餌量の低下を示す週が対照群と比較して散見された。また、その低下率は雄では2~13%、雌では4~15%であった。一方、320ppm群の摂餌量は雌雄とも対照群との間に顕著な差はみられなかった。



## (2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

### 血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix G 3,4 に示した。

雌の 2000ppm群でヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及びMCHの減少、血小板数の増加が認められた。

### 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix H 3,4 に示した。

雄では、2000ppm群でGOT、LDH及びCPK活性の上昇、総蛋白量の減少が認められた。

雌では、2000ppm群でGOT活性の上昇及びクロール量の増加が認められた。

### 尿検査

尿検査の結果を Appendix I 3,4 に示した。

雄では、2000ppm群で蛋白の陽性度の減少が認められた。

雌では、全投与群でケトン体の陽性例の減少、800ppm以上の群で蛋白の陽性度の減少、2000ppm群でpH値の上昇が認められた。

## (3) 病理学的検査

### 剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix K 5~8 に示した。投与群に特徴的な所見として 定期解剖例で雌雄の2000ppm群の甲状腺が暗色を呈しているのがみられた。

### 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 L 3,4、M 3,4 に示した。

対照群と比較して投与群に特徴的な臓器重量の変化はみられなかった。

雄の2000ppm群の脾臓で体重比に有意な高値がみられたが実重量では有意な変化とはならなかった。

雌では2000ppm群の脳で実重量が有意な低値を示したが、体重比に有意な差はみられなかった。また同群の心臓は実重量に変化がみられず、体重比で有意な増加がみられた。これらはこの群の解剖時体重の低値によるものと思われた。

#### 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を Appendix M 5～8 に示した。腫瘍性病変の結果は担腫瘍動物数を Appendix N 3, 4 に、発生率を解剖時期とともに Appendix O 3, 4 に、統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)の結果を Appendix P 3, 4 にそれぞれ示した。

#### 脾臓

雄ではヘモジデリン沈着と髄外造血の有意な増加が2000ppm群の定期解剖例で示され、雌ではヘモジデリン沈着の有意な増加が2000ppm群の定期解剖及び死亡/瀕死例で示された。

#### 甲状腺

色素沈着の有意な増加が雌雄の800ppm以上の群の定期解剖例及び死亡/瀕死例で示された。

#### 胃

前胃の過形成の有意な増加が雄の2000ppm群の定期解剖例で示され、腺胃の過形成の有意な減少が雌の800ppm以上の群の定期解剖例で示された。

その他、肝臓の肉芽形成、脳のカルシウム沈着、鼻腺の呼吸上皮化生、副腎の紡錘形細胞過形成などの所見の有意な増加または減少が一部の群で示されたが投与濃度と対応した変化ではなかった。

なお、検索した臓器のなかに血管内皮腫がみられた例について傾向検定をおこなった。その結果、Peto検定で雌に血管内皮腫の発生増加傾向が示された。しかし、その発生例数は 2000ppm:4/50, 800ppm:4/50, 320ppm:0/50, 対照群:1/50例と比較的少なく、対照群にも発生がみられている。また血管内皮腫の臓器別発生例数は 2000ppm群を例にとると脾臓 2例、肝臓 1例、腎臓 1例であって血管内皮腫の全身での多中心性の発生や好発臓器が示されなかった。これら2点から我々は雌で血管内皮腫の発生に増加傾向があるという検定結果を否定した。

#### 死因

病理学的にみた死亡/瀕死例の死因をTable 32 に示した。

死亡/瀕死例として試験途中で解剖された例の死因は雄では悪性リンパ腫や肝臓腫瘍、雌では悪性リンパ腫と子宮の組織球性肉腫とされた例が多く、群間に差はみられなかった。

## IV 考察

C D N B を F344 ラット 及び BDF<sub>1</sub> マウス に 104 週間 混餌 投与 し (ラット、マウス とも 0、320、800、2000ppm)、C D N B の が ん 原 性 を 検 討 し た。が ん 原 性 試 験 の 投 与 濃 度 は 2 週 間 試 験 (ラット 0、40、156、625、2500、10000 ppm、マウス 0、222、667、2000、6000、18000ppm) 及 び 13 週 間 試 験 (ラット、マウス とも 0、100、250、640、1600、4000ppm) の 結 果 か ら 決 定 し た。

## 《がん原性予備試験》

## &lt;2週間試験&gt;

ラットでは、雌雄の最高投与濃度の 10000ppm で全例死亡し、2500ppm 群でも 10% 程度の体重抑制、脾臓のうっ血、前胃の過形成の発生増加及び貧血等の毒性影響がみられた。この結果をもとに、13週間試験の最高投与濃度は雌雄とも 10000ppm と 2500ppm の間の 4000ppm と決定した。なお、雄の 156ppm 以上で腎臓の好酸体の発生増加が認められた。

マウスでは、雌雄の最高投与濃度の 18000ppm で全例死亡した。6000ppm では雄で 9 例、雌で 8 例死亡し、生存例にも体重抑制等の重篤な毒性影響がみられた。2000ppm 群では体重抑制はみられなかったが、脾臓の腫大、骨髓の赤血球造血の亢進及び前胃の過形成の発生増加等の毒性影響がみられた。この結果から、13週間試験の最高投与濃度はラットと同様に雌雄とも 6000ppm と 2000ppm の間の 4000ppm と決定した。

## &lt;13週間試験&gt;

ラットでは、雌雄の最高投与濃度の 4000ppm で毒性影響と考えられる貧血、脾臓の重量増加とうっ血、前胃の過形成の発生増加及び顕著な体重抑制がみられた。一方 1600ppm 群では貧血及び脾臓の重量増加とうっ血等の毒性影響がみられたが体重抑制は僅かであった。この結果をもとに、がん原性試験の最高投与濃度は雌雄とも 1600ppm よりやや高濃度の 2000ppm と決定した。なお、腎臓の好酸体の発生増加が雄の 640ppm 以上、好酸滴の発生増加が雌の全投与群に認められた。

マウスでは、雌雄の最高投与濃度の 4000ppm で雄 3 例、雌 2 例の死亡と生存例にも体重抑制等の重篤な毒性影響や前胃の過形成の発生増加がみられた。一方、1600ppm 群では血液・生化学的検査の変化及び脾臓の重量増加と髄外造血等の毒性影響がみられたが、体重抑制は僅かであった。この結果から、がん原性試験の最高投与濃度はラットと同様に雌雄とも 1600ppm よりやや高濃度の 2000ppm と決定した。

## 《がん原性試験》

### ＜生死状況＞

がん原性試験では、ラット及びマウスとも雌雄の最高投与群の 2000ppm で体重増加の抑制が対照群と比較してみられたものの、生存率は投与群と対照群との間に差がみられず、CDNBの投与による影響は認められなかった。

### ＜被験物質と腫瘍発生の関係について＞

#### ラット

今回のがん原性試験で観察された腫瘍のうち、傾向検定において増加傾向を示した腫瘍は、雄の腎臓の腎細胞腺腫、包皮腺の腺腫及び雌の乳腺の腺癌であった。その発生時期はいずれも投与開始後 86週以降であった。

雄の腎臓の腎細胞腺腫(対照群:0/50、320ppm:1/50、800ppm:1/50、2000ppm:6/50)及び雌の乳腺の腺癌(対照群:1/50、320ppm:1/50、800ppm:1/50、2000ppm:5/50)は、Peto検定及びCochran-Armitage検定で有意な増加傾向を示した。これらの腫瘍は低い発生率であるが、当センターの過去の試験の対照群にはほとんど発生がみられていないことからCDNBの投与による影響でその発生が増加したと考えられた。また、雄の腎臓の腎細胞腺腫の腫瘍発生濃度はFisher検定から 2000ppmと考えられた。

雄の包皮腺の腺腫(対照群:0/50、320ppm:1/50、800ppm:2/50、2000ppm:5/50)については、Peto検定及びCochran-Armitage検定で有意な増加傾向を、Fisher検定で 2000ppm群に有意な増加を示したが、当センターの過去の試験の対照群における雄の包皮腺の腺腫発生率は 0/50～4/50であり、2000ppm群の発生率が5/50で特に高い値とは言えず、CDNBの投与によってこの腫瘍が増加したとは断定できなかった。

#### マウス

今回のがん原性試験ではCDNBの投与による影響と考えられる腫瘍の発生増加はみられなかった。

### ＜被験物質と非腫瘍性病変等との関係について＞

#### ラット

腎臓において近位尿細管の好酸滴出現の増加が雌雄の全投与群でみられた。この所見は、13週間試験においても雌の全投与群でみられた。

がん原性試験での好酸滴の出現は対照群が少数例であるのに対し投与群は全群に多数例みられ、さらに13週間試験ではその出現の程度に濃度相関がみられたことからこれらの所見は明らかにCDNBの投与によるものであると考えられた。また、雄に比べて雌の方が早期に出現(13週)し、その

程度、例数においても雌の方が強くて多かった。腎細胞腺腫との関わりについては、腫瘍が雄にのみ発生増加しているのに対して好酸滴は雌雄にみられ、腫瘍の発生していない雌にも出現していることから、好酸滴が腎腫瘍の発生に直接関係しているとは考え難かった。

また、腎臓の同部位への好酸体の出現が2週間試験の雄の 156ppm以上の群、13週間試験においても雄の 640ppm以上の群でみられ、CDNBの投与との関連性が示唆された。

脾臓のヘモジデリン沈着と髄外造血の増加が雌の 800ppm以上の群でみられ、血液学的検査でみられた貧血と対応し、CDNBの投与との関連性が示唆された。

前胃の過形成の増加が雌雄の 2000ppm群の定期解剖例でみられた。また、この変化については13週間試験の雌雄の 4000ppm群でもみられ、CDNBの投与との関連性が示唆されたが、腫瘍の発生には至らなかった。

#### マウス

脾臓のヘモジデリン沈着の増加が雌雄の 2000ppm群で、髄外造血の増加が雄の 2000ppm群でみられ、血液学的検査でみられた雌の貧血と対応し、CDNBの投与との関連性が示唆された。

前胃の過形成の増加が雄の 2000ppm群の定期解剖例でみられた。また、この変化については13週間試験の雌雄の 4000ppm群でもみられ、CDNBの投与との関連性が示唆されたが、腫瘍の発生には至らなかった。

甲状腺の色素沈着の増加が雌雄の 800ppm以上の群でみられCDNBの投与との関連性が示唆された。

#### <乳腺の腺癌について>

ラットのがん原性試験において、雌の乳腺の腺癌の発生が増加傾向を示し、CDNBの投与による影響と考えられた。

化学物質がホルモンなどの内分泌系等に影響を及ぼし、生体にがん化しやすい条件をつくり、その結果としてがんの発生が増加するものはnon-genotoxicな作用、これに対し化学物質が遺伝子に直接作用して細胞をがん化させるものはgenotoxicな作用と分類されている。ホルモンの変化を介した発がんの場合には、乳腺の悪性である腺癌の発生に先だって良性の腺腫の発生についても増加傾向を示すはずである。しかし、今回の試験では、腺癌の発生のみが増加傾向を示し、腺腫の発生については増加傾向を示さなかった。また、CDNBの変異原性について、エームス試験ではTA100、

TA98、TA1538に強い復帰突然変異を示すことが、培養細胞を用いた試験では低濃度より染色体異常を誘発することが報告されている。(文献 10,11) これらのことから、今回の試験で観察されたCDNBによる乳腺の腺癌の発生増加は、CDNBが遺伝子に直接作用して細胞をがん化させるもの、すなわちgenotoxicな作用と考えるべきであろう。

#### <腎細胞腺腫について>

ラットのがん原性試験において、腎臓に雄の腎細胞腺腫の発生増加がみられ、CDNBの投与による影響と考えられた。

腎臓におけるこの腎細胞腺腫と非腫瘍性病変との関わりについては、前述の様に好酸滴は本腫瘍の発生に関係しているとは考え難かった。一方、ラットの2週間及び13週間試験の雄において好酸体の出現がみられた。この好酸体と腫瘍との関連性について検討された文献がいくつかあるものの、現在のところ結論にまでは至っていない(文献17~20)。我々の試験でも上記の様に短期の試験で雄の高濃度群に好酸体の出現がみられたことから腫瘍との関連性について検討したが、CDNBでは腎細胞腺腫の発生と好酸滴以外には腎臓の病変、特に前癌病変と思われる病変が認められなかったこと、変異原性が陽性であることからgenotoxicな作用によって腫瘍が発生した可能性があり、好酸滴と同様に好酸体が腎腫瘍の発生に直接関係しているとは考え難かった。

#### <他のがん原性試験データとの比較>

E.K.Weisburgerら(文献 13)は、雄のCD(SD)ラット(2000-500ppm、1000-250ppm)とCD-1マウス(雄:6000-1000ppm、3000-500ppm、雌:3000-750ppm、1500-375ppm)を用いて、18ヵ月間CDNBの混餌投与による試験を実施した。その結果、ラット、マウスとも腫瘍の発生増加はみられなかったと報告している。当センターで行った今回のがん原性試験では前述したごとく、ラットでは雄に腎臓の腎細胞腺腫及び雌に乳腺の腺癌の増加がみられ、E.K.Weisburgerらの結果とは異なった成績が得られた。この差異は、使用動物の系統、投与用量等が異なる為に生じたと考えられた。特に投与用量について、我々は最高投与濃度が2000ppmで24ヵ月間投与したのに対し、E.K.Weisburgerらは同じ2000ppmで投与したのは試験最初の2ヶ月間だけであり、それ以降は我々の投与濃度より低かった。また、投与期間も18ヵ月間と短く、全体の投与用量は我々よりも低かったことが大きな要因として考えられた。

マウスでは我々の試験結果においても腫瘍の発生増加はなく、結果としては類似した。

## V 結論

F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF1マウスを用いてC D N Bの2年間(104週間)わたる経口投与(混餌)によるがん原性試験を行った。

ラットでは雄の腎臓の腎細胞腺腫及び雌の乳腺の腺癌の発生増加が認められC D N BのF344/DuCrj(Fischer)ラットに対するがん原性が証明された。その腫瘍発生濃度は2000ppmであった。

今回の試験ではC D N BのCrj:BDF1マウスに対するがん原性は示されなかった。



## VI 文献

1. 化学工業日報社(1980)  
7680の化学商品  
pp.657-658,化学工業日報社, 東京.
2. 化学工業日報社(1990)  
11290の化学商品  
pp.679,化学工業日報社, 東京.
3. Japan Chemical week(ed)(1991)  
Speciality Chemical Handbook(Fourth ed.)  
pp.170,化学工業日報社, 東京.
4. Bodney,R.B. and Joseph,T.N.(1982)  
Aromatic nitro and amino compaunds.  
In:Clayton,G.D. and Clayton,F.E.(eds),  
Patty's Industrial Hygiene and Toxicology,Vol 2B,  
pp.2413-2489,John Wiley and Sons,New York,N.Y.
5. Levis,W.R., Kraemer,K.H., Klinger,W.G., Peck,G.L.  
and Terry,W.D.(1973)  
Topical immungraphy of basal cell carcinomas with  
dinitrochlorobenzene.  
Cancer Research,33,3036-3042.
6. Kratka,J.,Georz,G.,Vizethum,W. and Strobel,R.(1979)  
Dinitrochlorobenzene:influence on the cytochrome P-450  
system and mutagenic effects.  
Arch.Dermatol.Res.,266,315-318.
7. Chasseaud,L.F.(1976)  
Conjugation with glutathione and mercapturic acid excretion  
In:Arias,I.M. and Jacoby,W.B.(eds.)  
Gluththione:Metabolism and Function.pp.77-114.  
Raven Press,N.Y.

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. Duffel, M. W. and Jacoby, W. B. (1981)  
Cyseine S-conjugate N-acetyltransferase from rat kidney  
microsomes.  
Mol. Pharmacol., 21, 444-448.
10. Summer, K. H. and Goggelmann, W. (1980)  
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene depletes glutathione in rat  
skin and is mutagenic in *Salmonella typhimurium*.  
Mutation Research, 77, 91-93.
11. 日本化学物質安全・情報センター(1985)  
動物細胞を用いた変異原性試験の開発に関する研究  
pp.109-112, 日本化学物質安全・情報センター, 東京.
12. Smyth, H. F. Jr., Carpenter, C. P., Weil, C. S., Pozzani, U. C.,  
and Striegel, J. A. (1962)  
Range-finding Toxicity data: list 4.  
American Ind. Hyg. Assoc. J., 23, 95-107.
13. Weisburger, E. K., Russfield, A. B., Homburger, F.,  
Weisburger, J. H., Boger, E., Van Dongen, C. G. and Chu, K. C. (1978)  
Testing of twenty-one environmental aromatic amines or  
derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity.  
Journal of Environmental Pathology and Toxicology, 2, 325-356.
14. 日本バイオアッセイ研究センター(1991)  
P-クロロニトロベンゼンのラット及びマウスを用いた経口投与  
(混餌)によるがん原性試験報告書  
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川.
15. 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.

16. Peto, R., Pike, M. C., Day, N. E., Gray, R. G., Lee, P. N., Parish, S., Peto, J., Richrds, S. and Wahrendorf, J. (1980)  
Guidlines 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, pp. 311-426,  
International Agency for Research on Cancer, Lyon.
17. National Institute of Health (1983)  
Carcinogenesis Bioassay of Pentachloroethane in F344/N Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice. (Gavage Studies)  
NTP Technical Report 232.  
U.S. Department of Health and Human Services.  
Reserch Triangle Park. N.C.
18. National Institute of Health (1987)  
Toxicology and Carcinogenesis Studies of Dimethyl Metylphosphonate in F344/N Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice. (Gavage Studies)  
NTP Technical Report 323.  
U.S. Department of Health and Human Services.  
Reserch Triangle Park. N.C.
19. National Institute of Health (1987)  
Toxicology and Carcinogenesis Studies of 1,4-Dichlorobenzene in F344/N Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice. (Gavage Studies)  
NTP Technical Report 319.  
U.S. Department of Health and Human Services.  
Reserch Triangle Park. N.C.
20. National Institute of Health (1990)  
Toxicology and Carcinogenesis Studies of d-Limonene in F344/N Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice. (Gavage Studies)  
NTP Technical Report 347.  
U.S. Department of Health and Human Services.  
Reserch Triangle Park. N.C.