

# N, N-di (2-chloroethyl)-4-methyl-2, 6-dinitroaniline

## の 毒 性 に 関 す る 研 究

### I. 亜急性毒性について

宮 尾 陟・石 黒 茂  
河 野 猪三郎・安 田 宣 紘

(昭和50年8月29日 受理)

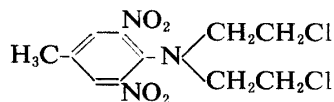
### Studies on the Toxicity of N, N-di (2-chloroethyl)-4-methyl-2, 6-dinitroaniline

#### I. On the Subacute Toxicity

Noboru MIYAO, Shigeru ISHIGURO,  
(Laboratory of Veterinary Pharmacology)

Isaburo KONO and Nobuhiro YASUDA  
(Laboratory of Veterinary Pathology)

N, N-di (2-chloroethyl)-4-methyl-2, 6-dinitroaniline (通称 Torpedo) は、下記のような構造の黄色結晶性粉末で、ラットに対する急性経口 LD<sub>50</sub> が 2,200mg/kg, 急性経皮 LD<sub>50</sub> が 1,640 mg/kg とされている、きわめて毒性の低い化合物である。



その毒性の低いことから、某社が除草剤として開発しようとしたものであるが、著者らがその亜急性毒性を検討した結果、マウス雄（以下♂）のみに著しい毒性を示し、マウス雌（以下♀）、ラットに対しては、それほど毒性を示さないという、きわめて特異な興味ある所見を得たので報告する。

#### 材料ならびに方法

供試動物：Wistar 系ラット（6週令，試験開始時の体重 ♂ 130~160 g, ♀ 100~120 g）, ddN 系マウス（6週令，♂ 25~28 g, ♀ 22~24 g）, 試験開始前10日間予備飼育した。

薬物濃度と供試動物数：薬物の投与方法は混飼により，供試動物数は全群♂，♀とも20匹ずつで，各群の薬物濃度は，ラットではⅠ群 0 ppm (対照)，Ⅱ群 60 ppm, Ⅲ群 180 ppm, Ⅳ群 540 ppm, Ⅴ群 1,620 ppm, マウスではⅠ群 0 ppm (対照)，以下Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ，Ⅴ群をそれぞれ 20, 60, 180, 540 ppm とした。

なおマウスにおいては，♂のみにきわめて特異な所見が現れたので，薬物濃度 5 ppm のⅥ群（♂ 20, ♀ 20）を追加実施した。このときのマウスの初体重はⅤ群までのものよりやや軽く，♂ 20~21 g, ♀ 19~20 g であった。

観察期間：13週。

飼養条件：1ケージに4匹を収容し，餌はⅠ群では日本クレア CE-2 を，その他の群では，上記濃度になるように CE-2 で特別に調製した固形飼料（日本クレアに依頼）を用いた。なお各薬物濃度の実際の分析値は，20, 60, 180, 540, 1,620, 5 ppm の理論値に対して，それぞれ 14.6, 42.8, 136.2, 409.5, 1,195.3, 4.6 ppm であった。

飼料は冷蔵庫に保管し，1週2回交換した。すなわちバスケットに飼料を入れて重量を測定し，3ないし4日後に残量を測定，減量を動物の摂取量とし，2回ぶんを合計して1週間の摂取量とした。飲水についても同様の方法で1週間ぶんの飲水量を算出した。

体重は各週の1ないし2日目に測定，2回の平均をその週の体重とした。

剖検：13週観察後の生存動物は，腹腔内に 0.1% ヘパリンを，ラットには 0.3 ml, マウスには 0.05 ml を注入，約20分後にネブタール麻酔を実施した。麻酔後開胸して心臓より採血し，血球計算用試料，血漿分析用試料を採取した。採血後直ちに剖検して，臓器重量を測定，以後臓器，死骸とも10%ホルマリン固定して，組織検索の材料とした。



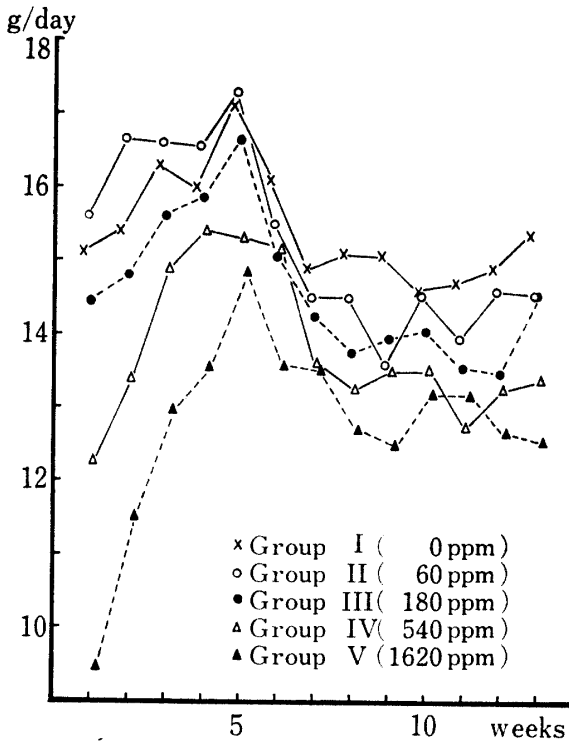


Fig. 1. Daily feed intake in male rats.

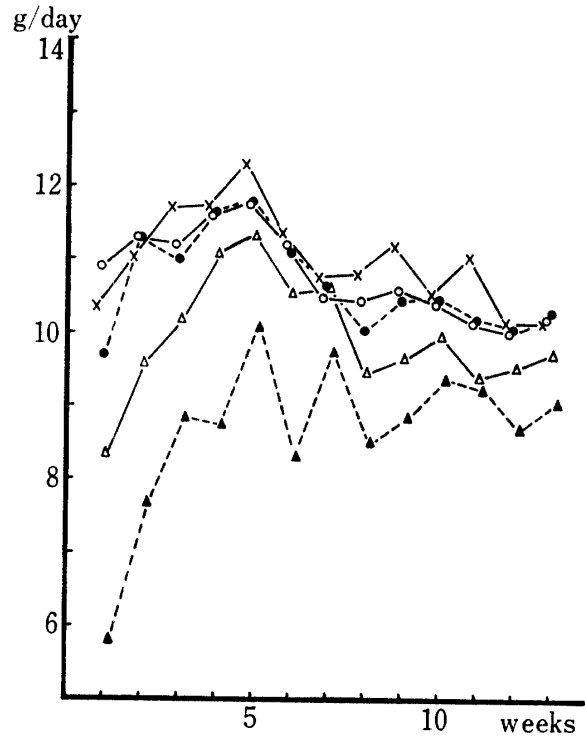


Fig. 2. Daily feed intake in female rats.

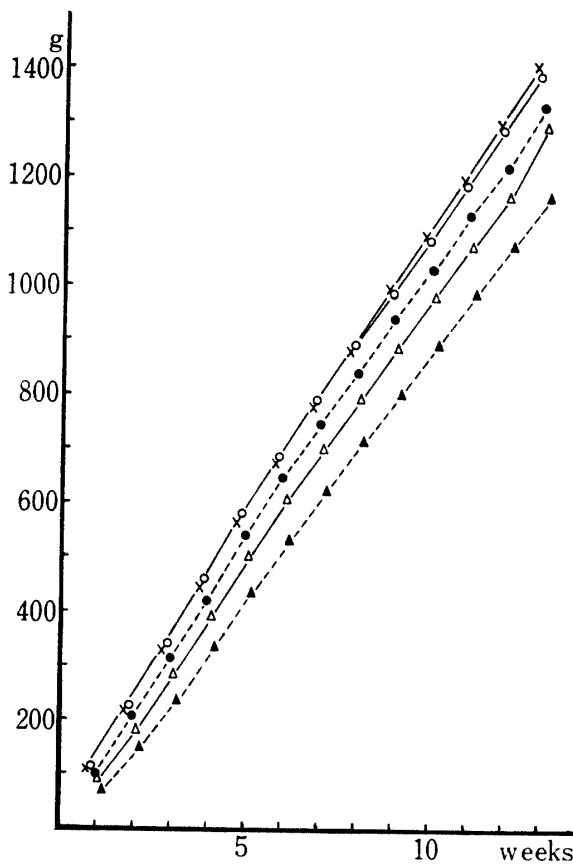


Fig. 3. Cumulative feed intake in male rats.

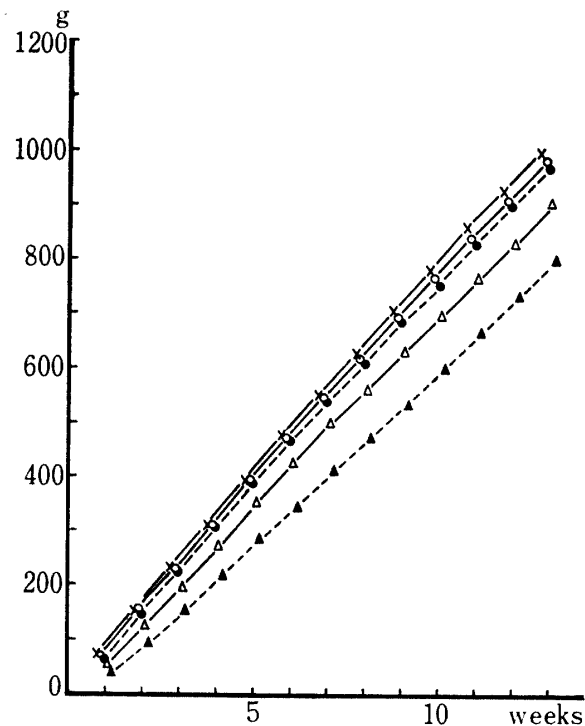


Fig. 4. Cumulative feed intake in female rats.

摂取量を把握することがむずかしいことに帰因するものであろう。累積摂取量 (Fig. 7, 8) をみると、♂

では9週頃から、♀では2週頃から最高濃度 (540 ppm) のV群、追加実施のVI群 (5 ppm) の摂取量が高くなっている。V群♂の場合生き残ったものは1匹のみであり、このマウスは本薬物に対して特異体質的に抵抗性をもっていたことが考えられ、しかも餌の摂

取量は多いにもかかわらず、体重の増加率 (Fig. 23) は、他の群に比べて悪いという特異な現象を示している。V群♀の場合は17匹が生き残っており、餌の摂取量は多いが、体重の増加率は他の群に比べて悪く (Fig. 24), 本当に摂取量が高かったとは必ずしもい

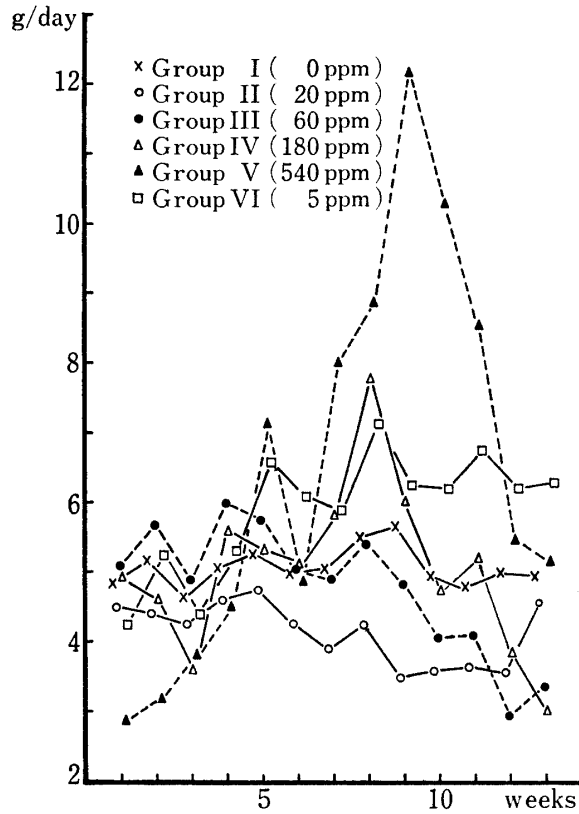


Fig. 5. Daily feed intake in male mice.

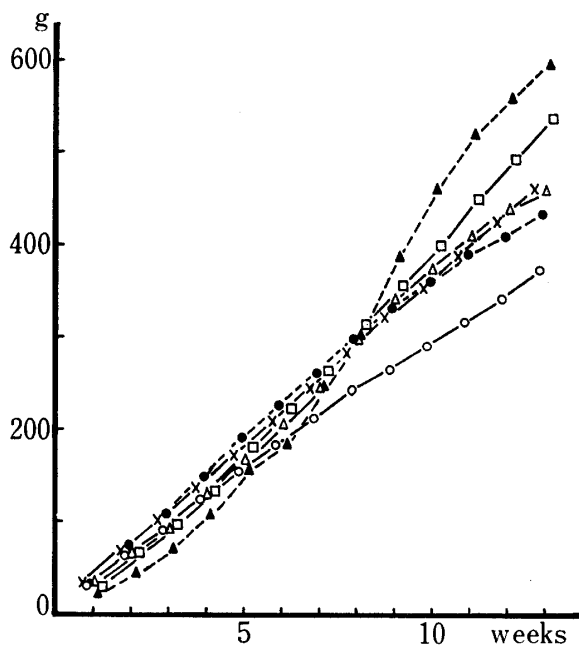


Fig. 7. Cumulative feed intake in male mice.

えないのではないかとと思われる。VI群 (5 ppm) はV群までのマウスより週令も若く、餌の食い込み量も多かったことが考えられる。マウスの場合は前述のように餌の散らかしかたもひどく、薬物濃度と摂取量との関係が、ラットにおけるようにはっきりしないといえよう。

### 3) 飲水摂取状況

ラットの日量は♂でおよそ 22~33 g, ♀では 19~25 g であるが (Fig. 9, 10), ♂, ♀ともV群が上記

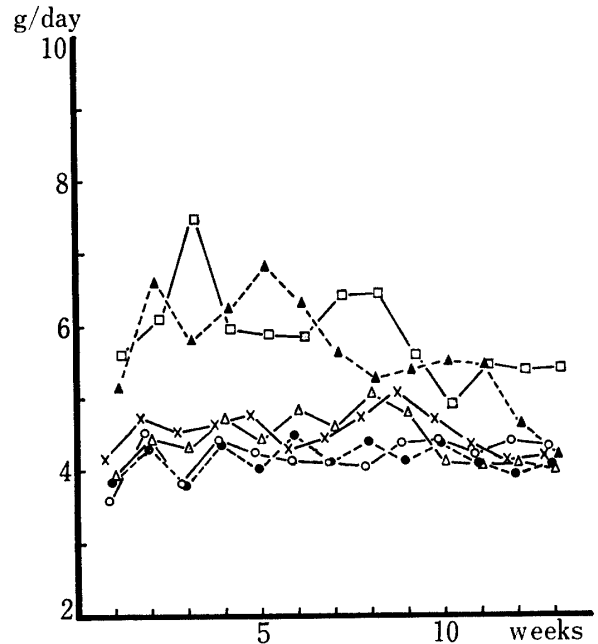


Fig. 6. Daily feed intake in female mice.

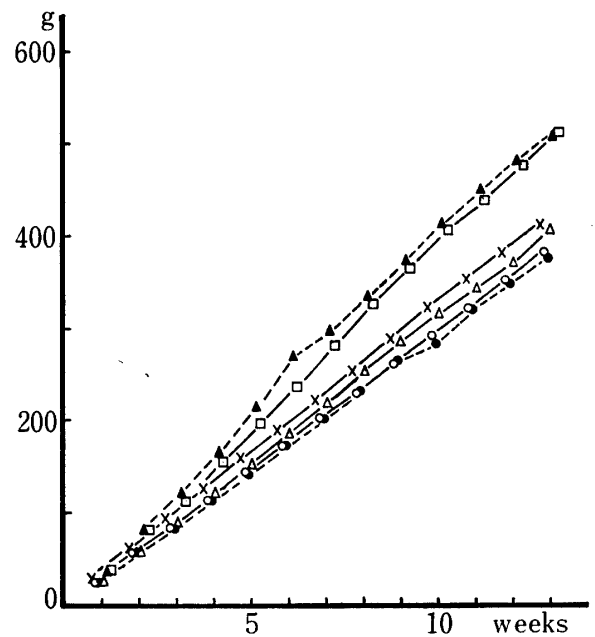


Fig. 8. Cumulative feed intake in female mice.

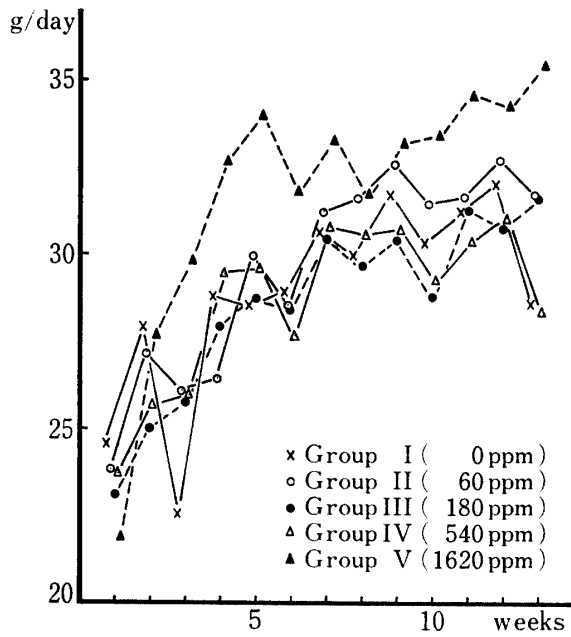


Fig. 9. Daily drinking water intake in male rats.

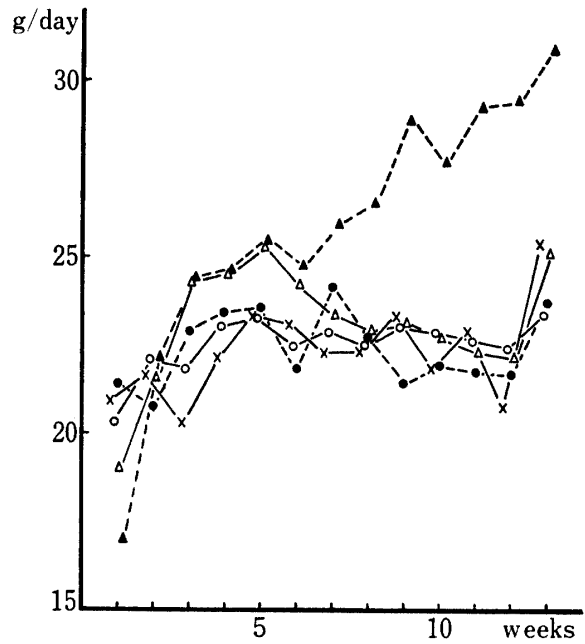


Fig. 10. Daily drinking water intake in female rats.

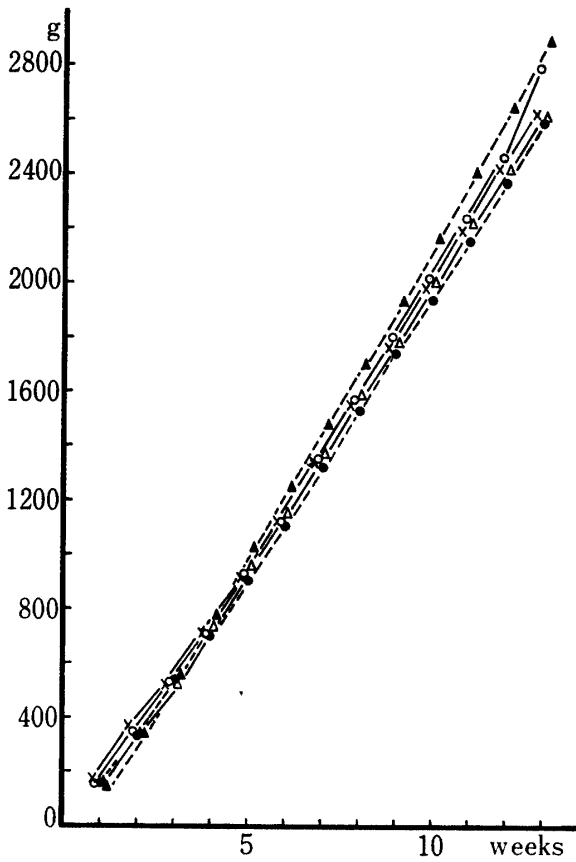


Fig. 11. Cumulative intake of drinking water in male rats.

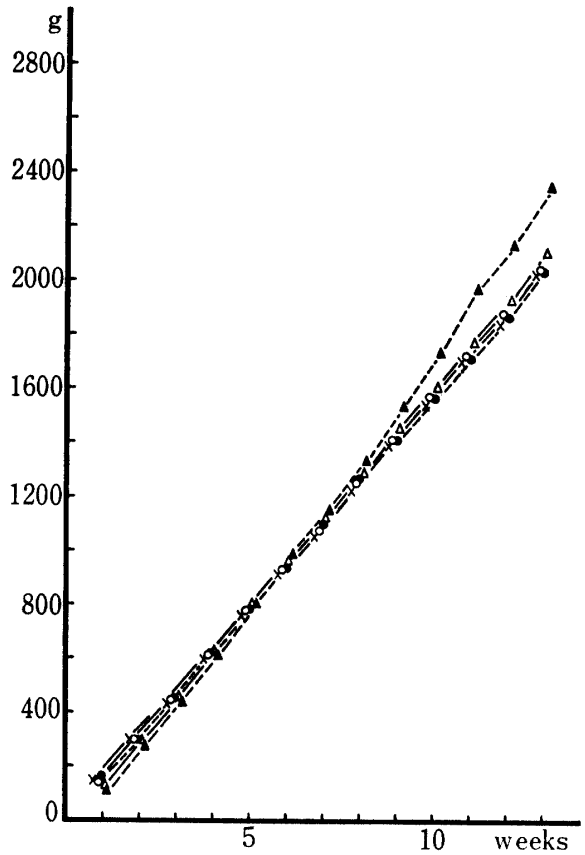


Fig. 12. Cumulative intake of drinking water in female rats.

範囲をとびぬけて高くなっている。したがって累積摂取量も、9週頃から他の群に比べて高いことを示して

いる (Fig. 11, 12)。

マウスでは相当の変動があるが (Fig. 13, 14), ♂

の日量は 4~7 g, ♀のそれは 4~6 g がもっとも多く, これからはずれて高いのが, ♂, ♀ともⅥ群, 低いのが♂でⅢ群, ♀ではⅤ群である. 累積摂取量(Fig. 15, 16)では, 対照のⅠ群より高いのが 5 ppm のⅥ群のみであり, 20 ppm 以上の群はすべて対照より低

くなっている. ラットにおけるように薬物濃度の高いⅤ群で, とくに摂取量が多いという傾向はみられず, マウスではむしろ薬物濃度の高い方が, 飲水量が少ないことを示しており, ラットとマウスとで飲水量と薬物濃度との関係には, 逆の傾向がみられたが, この理

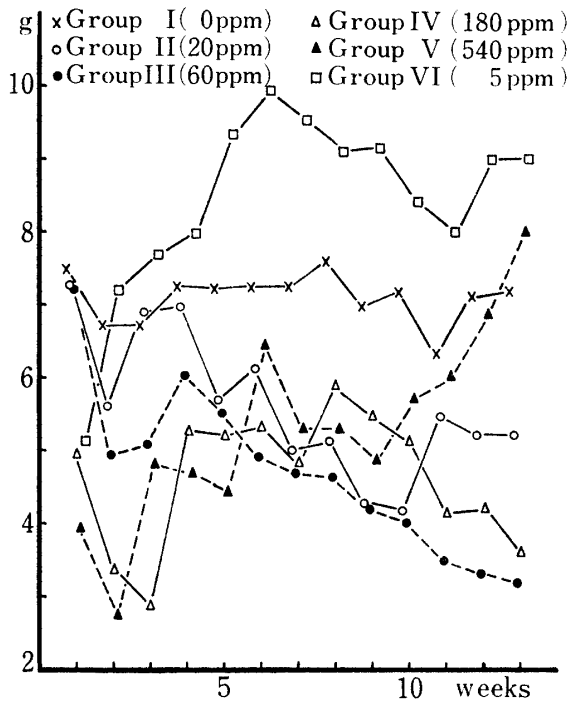


Fig. 13. Daily drinking water intake in male mice.

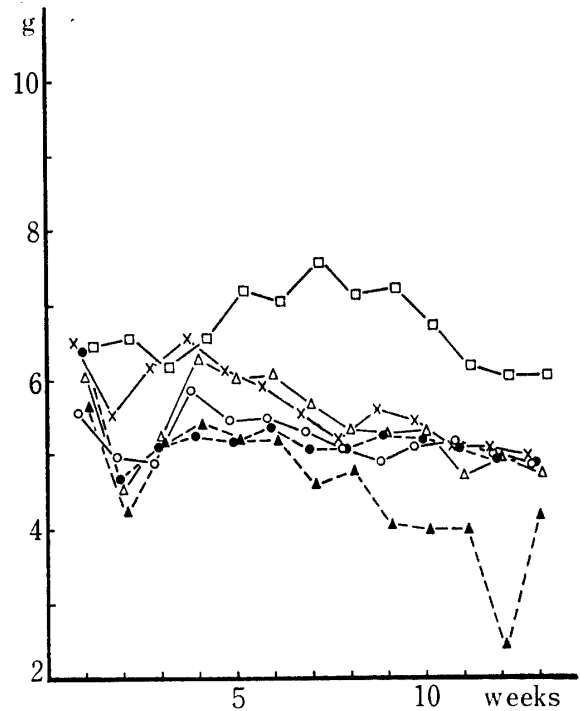


Fig. 14. Daily drinking water intake in female mice.

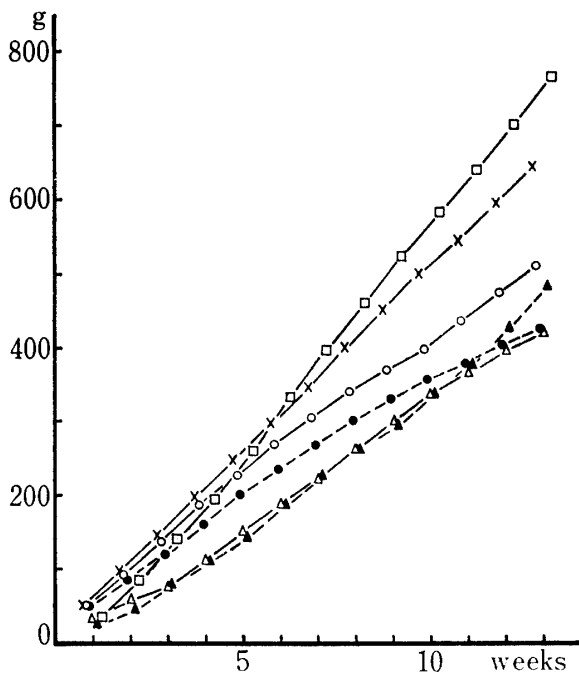


Fig. 15. Cumulative intake of drinking water in male mice.

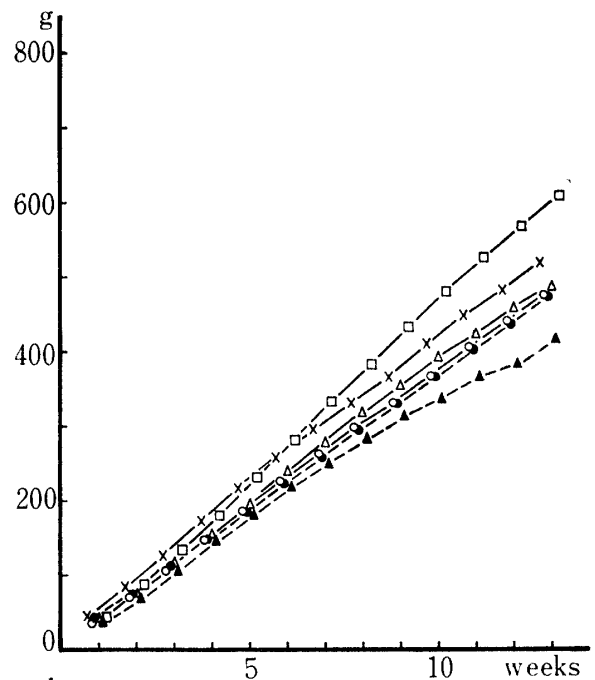


Fig. 16. Cumulative intake of drinking water in female mice.

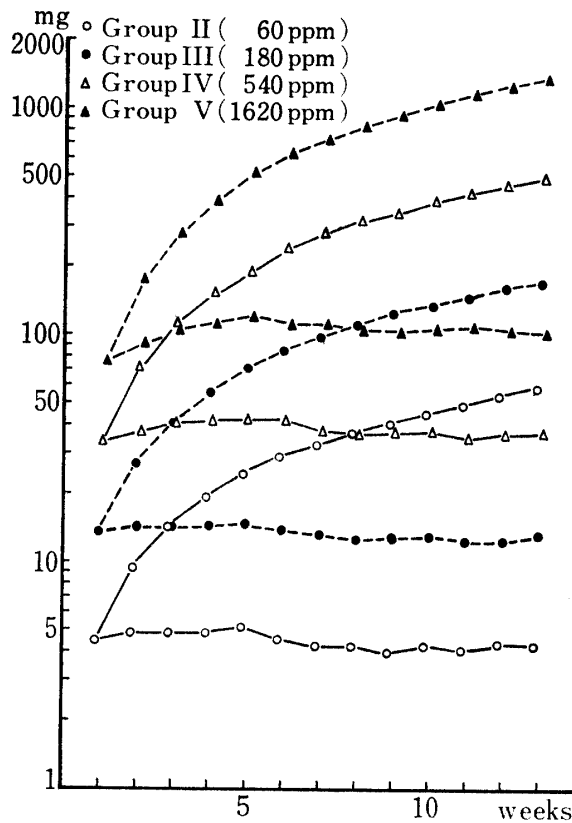


Fig. 17. Weekly and cumulative intake of Torpedo in male rats.

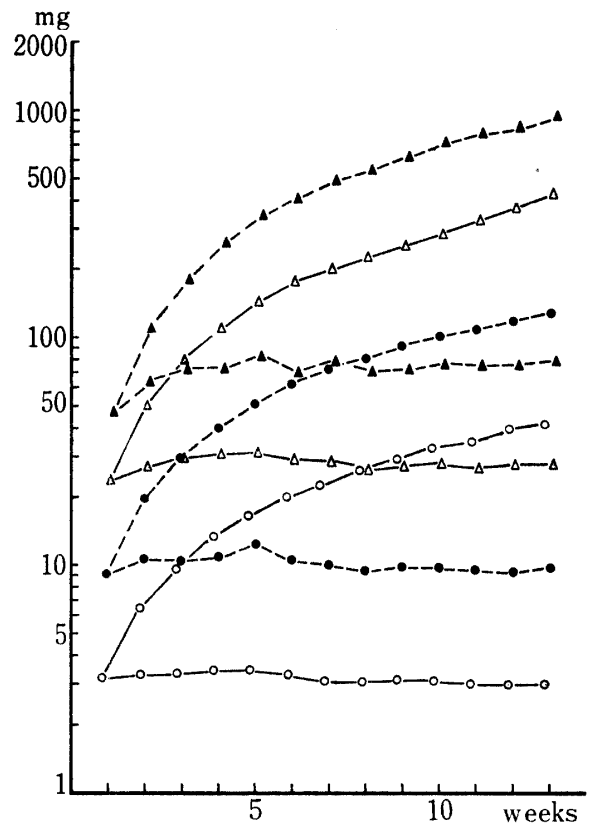


Fig. 18. Weekly and cumulative intake of Torpedo in female rats.

由についてはなんともいえない。

4) 薬物摂取量

Fig. 17~18 (ラット), 19~20 (マウス) に, 飼料摂取量から求めた1匹当たりの薬物摂取量の週量と累積摂取量を, 対数グラフで示した。なお薬物量は分析値に基づいて計算した。

ラットでは摂取週量, 累積摂取量とも, ♂と♀ではほぼ同じ傾向であるが, ♀は♂に比べてやや低い。日量は各週を通じて, II群♂ 0.6~0.7, ♀ 0.4~0.5 mg, III群♂ 1.8~2.2, ♀ 1.3~1.6 mg, IV群♂ 5.0~6.3, ♀ 3.4~4.6 mg, V群♂ 13.8~16.2, ♀ 9.1~10.8 mg 程度ではほぼ同じであるが, mg/kg 単位の日量は, 摂取量の均一性に比べて, 体重が増加しているため週の経過とともに低下した。

マウスの場合は, 飼料摂取量にある程度変動があるため, 摂取薬物量もラットに比べて変動が大きい。週量, 累積摂取量は, ラットとほぼ同じ傾向を示している。薬物摂取日量は, 各週を通じてII群♂, ♀とも 0.05~0.06 mg, III群♂ 0.17~0.25, ♀ 0.16~0.18 mg, IV群♂ 0.50~0.79, ♀ 0.54~0.65 mg, V群♂ 1.83~3.62, ♀ 1.89~2.70 mg, VI群♂, ♀とも

0.02~0.03 mg であって, ラットと同様, 週ごとの日量の変動はなかったが, 異なる点は摂取量が♂と♀でそれほどの差がないこと, 体重増加率が低いため週の経過による差異がないことである。

5) 体重に及ぼす影響

各週の平均体重の, 試験開始直前の平均体重に対する比率(体重比)を縦軸にした各週の体重増加率は, Fig. 21, 22 (ラット), 23, 24 (マウス) のとおりである。

ラット♂ではIII群(180 ppm)は対照とほとんど変わらず, II群(60 ppm)は対照よりむしろよい。IV群(540 ppm)は9週頃より対照に比べて悪くなり, V群(1,620 ppm)は早い時期から, 相当低い増加率であった。♀はII, III群は対照とほとんど変わらず, IV群は8週頃から, V群は最初から相当増加率が低下した。したがってV群ではごく早い時期から, IV群では試験期間の後半において影響を及ぼしていることが考えられるが, IV群の後半, V群の各週ごとの飼料効率(体重増加率と飼料摂取量との比)をみると, 対照とあまり変わらず, 体重増加率と飼料効率が対応していないが, この理由についてはなんともいえない。

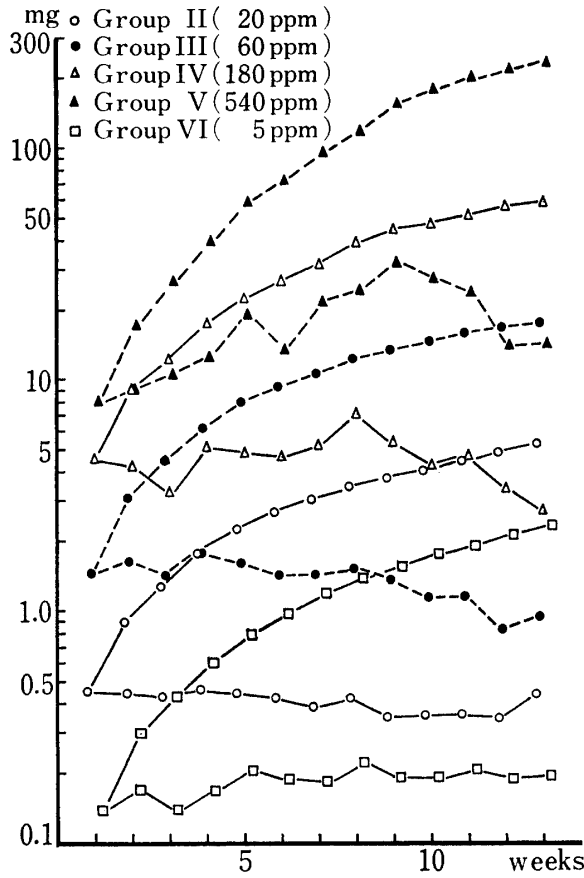


Fig. 19. Weekly and cumulative intake of Torpedo in male mice.

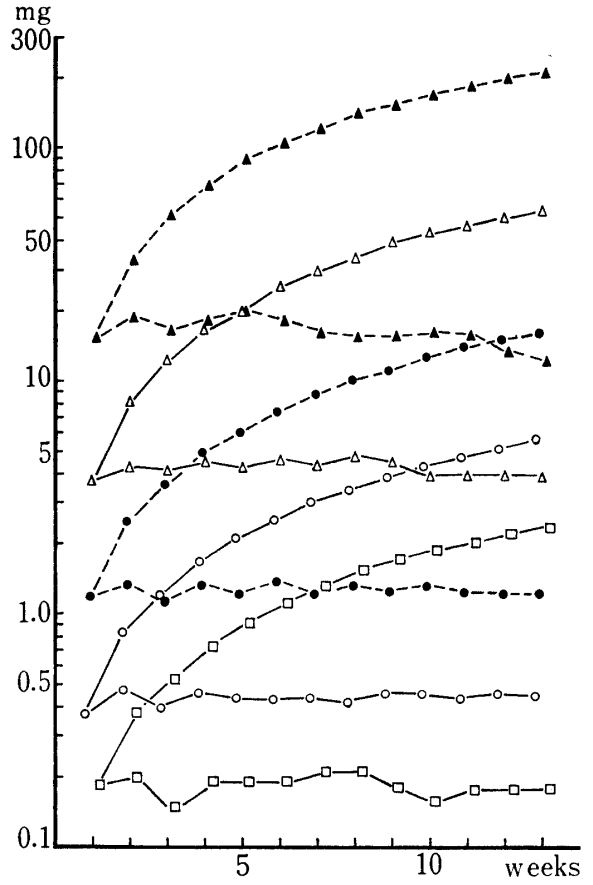


Fig. 20. Weekly and cumulative intake of Torpedo in female mice.

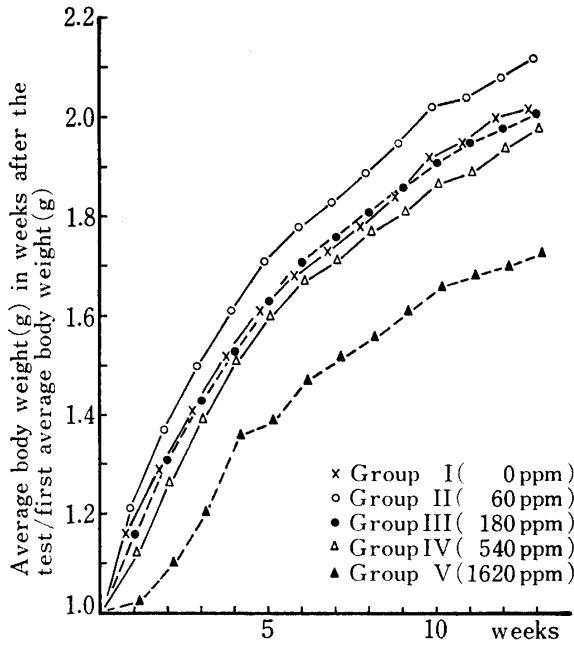


Fig. 21. The rate of body weight increase in male rats.

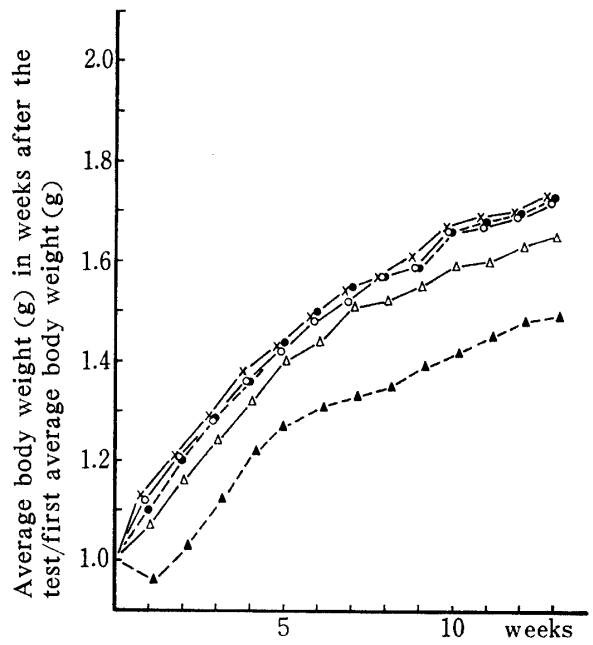


Fig. 22. The rate of body weight increase in female rats.

マウスではⅡ群 (20 ppm) の♀, Ⅳ群 (5 ppm) の♂, ♀を除いて, 対照より増加率は悪くなっている。

♂ではⅡ群以上の全群が影響をうけているようであり, ♀ではⅣ群 (180 ppm), Ⅴ群 (540 ppm) が影響



をうけているものと考えられる。Ⅶ群のみが対照より増加率が高いが、この群は実施時期、週令が異なるので、必ずしも対照より増加率がよいと断定はできない。しかし体重に影響を及ぼしていないということはできよう。飼料効率の面からみると、マウスの場合にはラットに比べて、対照でもあまりよくなかったが、♂ではⅢ群以降、♀ではⅣ、Ⅴ群に負の効率を示すものが相当あり、体重増加率と対応する面がみられた。Ⅶ群の飼料効率も対照よりよかった。

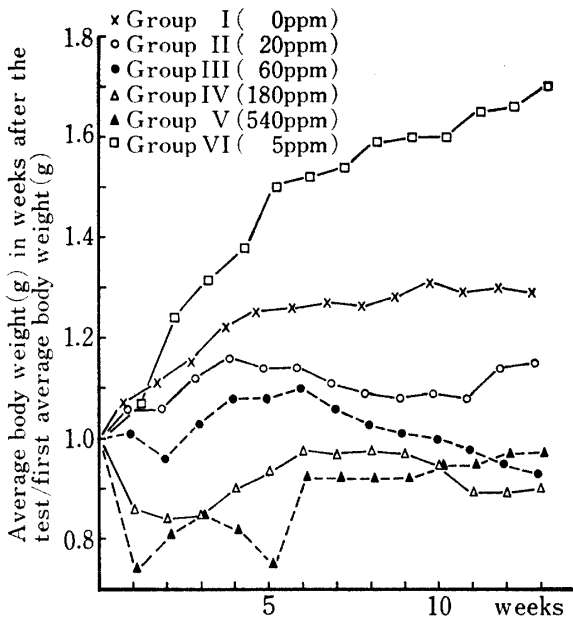


Fig. 23. The rate of body weight increase in male mice.

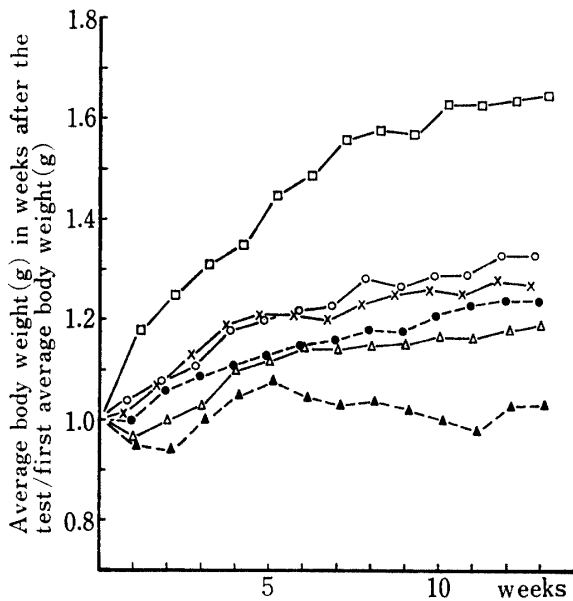


Fig. 24. The rate of body weight increase in female mice.

### 6) 血液検査結果

Table 2 に赤血球、白血球数、血色素量、Ht 値の各群の平均値のみを示した。赤・白血球数は個体差が相当あるので、すべてⅠ群(対照)の平均値を100として、各群平均値の相対比を求めたが、ラットではとくに注目値する変動はないものと思われる。マウスの場合には、♂のⅣ、Ⅴ群では死亡数が多く、とくにⅤ群のごとき、生存したものは1例のみであるので、相対比をみても対照と比較うんぬんするのは無理であるが、少なくともⅡ、Ⅲ群、それと追加実験のⅦ群とも、とくに薬物の影響と思われる変化はないようである。♀の場合もとくに影響を思わせる変化はないようであるが、Ⅴ群のみやや低下の傾向をみせている。しかし総合的にみて赤血球数、それに血色素量、Ht 値に対しては、影響を与えていないものと考えられる。

ラット白血球数は、対照に比べて投与群の方が減少し、とくに♀の減少が大きい傾向をみせている。白血球像 (Table 3. 細胞型別百分率は個体によって著しく異なるので、全例の結果を表示すべきであるが、膨大な量になるので平均値のみにとどめた) では、リンパ球が減少し、好中球が増加する傾向を示しているが、これは肺炎などによる炎症性の現象であって、薬物によるものではないと思われる。また白血球数の減少も、骨髄の病理組織学的検索では、とくに病変は認められないので、この減少はあくまで流血中の減少であり、薬物による影響とは断定できない。

マウスではラットにおけるような減少の傾向がはっきりせず、Ⅴ群の1例は例外として、Ⅳ群♀の平均値はある程度減少しているが、Ⅴ群♀は逆に増加を示しており、リンパ球の減少傾向も認められず、結論的に影響はうけていないものといえよう。

### 7) 血漿分析結果

Table 4 にラット、マウス各群の平均値を示した。マウスでは十分量の分析試料が得られないので、A/G比とChE活性値は、ラットのみについて実施した。

ラット血漿のA/G比は、♂、♀のⅠ群のそれを100とした場合、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ群の相対比は、それぞれ♂で92.6、97.8、91.9、93.3、♀で95.1、100.6、99.2、91.8であり、♀のⅡ群を除いて、いずれもやや低下しているが、薬物濃度とは平行しておらず、とくに薬物の影響を思わせる低下とはいえない。

尿素-Nは腎機能障害のほか、体組織の崩壊、脱水、ショック、消化管出血、循環不全などに病的増量が認められるものであるが<sup>2)</sup>、このような障害を思わ

Table 2. Some blood values in animals sacrificed in thirteen weeks after the test.

Animal	Group	Sex	Number of animals	Erythrocyte count (10 <sup>4</sup> )		Leukocyte count (10 <sup>3</sup> )		Hemoglobin (g/dl)		Hematocrit value (%)	
Rat	I	♂	19	806±141* 100**		61± 24* 100**		12.6±0.85* 100**		43.2±2.45* 100**	
		♀	20	749± 58 100		70± 25 100		11.7±0.75 100		38.6±2.73 100	
	II	♂	20	775±127 96.2		56± 17 91.8		12.3±0.57 97.6		41.9±2.17 97.0	
		♀	20	792± 99 105.7		65± 23 92.9		11.3±0.83 96.6		38.3±2.58 99.9	
	III	♂	20	892±101 110.7		63± 14 103.3		12.5±0.40 99.2		43.4±1.36 100.5	
		♀	19	801± 87 106.9		53± 20 75.7		11.3±0.27 96.6		39.9±1.95 103.4	
	IV	♂	19	811±106 100.6		55± 15 90.2		12.0±0.59 95.2		42.0±1.63 97.2	
		♀	19	734± 95 98.0		49± 16 70.0		10.9±0.45 93.2		38.4±1.81 99.5	
	V	♂	19	882± 44 109.6		56± 15 91.8		11.7±0.57 92.9		41.6±2.04 96.3	
		♀	19	794±106 106.0		54± 5 77.1		10.8±0.78 92.3		38.5±3.58 99.7	
Mouse	I	♂	17	802±129 100		81± 28 100		10.0±2.54 100		35.5±5.91 100	
		♀	20	875±128 100		108± 23 100		10.9±1.83 100		38.4±4.12 100	
	II	♂	17	849±188 105.9		80± 32 98.8		9.7±2.13 97.0		36.6±5.26 103.1	
		♀	20	861±148 98.4		100± 33 92.6		11.4±1.68 104.6		37.3±4.68 97.1	
	III	♂	15	829±158 103.4		84± 66 103.7		10.3±1.56 103.0		36.6±2.05 103.1	
		♀	20	855±174 97.7		92± 42 85.2		10.8±1.83 99.1		37.5±5.18 97.7	
	IV	♂	4	809±140 100.9		75± 42 92.6		10.0±1.09 100.0		36.0±2.05 101.4	
		♀	20	828±154 94.6		64± 23 59.3		10.5±1.68 96.3		36.3±4.63 94.5	
	V	♂	1	663 82.7		12 14.8		10.3 103.0		28.3 79.7	
		♀	16	826±120 94.4		118± 95 109.3		9.8±1.76 89.9		35.5±5.46 92.4	
	VI	♂	13	940±208 117.2		76± 19 93.8		11.2±1.41 112.0		35.7±6.49 100.6	
		♀	20	900±226 102.9		84± 20 77.8		12.3±1.27 112.8		37.4±2.92 97.4	

\* Mean and standard deviation.

\*\* Relative ratio to Group I.

Table 3. Differential leukocyte count in percentage in animals sacrificed in thirteen weeks after the test.

Animal	Group	Sex	Number of animals	Basophil	Eosinophil	Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte
Rat	I	♂	20	0.0	0.79±0.97	13.00± 7.10	84.80± 7.19	1.37±1.21
		♀	20	0.03±0.11	1.71±1.82	10.88± 5.50	85.74± 6.71	1.64±1.24
	II	♂	18	0.0	1.86±1.88	15.25± 5.91	81.03± 5.89	1.47±1.11
		♀	19	0.0	1.59±2.11	13.22± 6.74	84.03± 6.86	1.15±0.80
	III	♂	20	0.0	1.38±1.61	16.16± 5.54	81.36± 5.35	1.11±1.16
		♀	19	0.0	1.59±1.49	14.61± 8.20	82.99± 8.33	0.81±0.62
	IV	♂	19	0.0	1.62±1.75	25.73± 9.20	71.63± 0.08	1.03±1.01
		♀	19	0.0	1.20±1.20	21.08±11.47	76.03± 8.35	1.69±1.43
	V	♂	18	0.0	1.02±1.58	36.79±14.24	60.46±12.84	1.46±1.34
		♀	16	0.0	1.71±2.07	27.82±14.01	68.82±14.80	1.65±1.63
Mouse	I	♂	17	0.0	1.35±0.93	14.17± 8.86	82.65± 9.39	1.84±1.26
		♀	19	0.0	0.95±0.97	8.76± 4.09	89.24± 4.73	1.11±0.94
	II	♂	14	0.0	1.36±0.97	12.97± 9.11	84.38± 9.96	1.29±0.88
		♀	20	0.0	0.68±0.73	6.21± 3.84	92.26± 4.28	0.86±0.75
	III	♂	12	0.0	1.13±1.69	23.67±22.24	73.75±22.62	1.46±1.26
		♀	19	0.0	0.66±0.58	10.16± 5.07	88.14± 5.22	1.04±0.96
	IV	♂	4	0.0	1.73±0.84	24.90±13.60	71.90±14.10	1.50±0.36
		♀	20	0.0	1.00±0.84	11.04± 5.57	86.55± 6.14	1.42±0.91
	V	♂	1	0.0	2.70	68.90	23.00	5.40
		♀	12	0.0	0.89±1.65	14.58±11.75	83.63±11.61	0.92±0.73
	VI	♂	9	0.0	1.60±0.78	17.70± 7.46	80.20± 6.80	0.40±0.67
		♀	12	0.02±0.14	2.00±1.22	9.50± 6.08	87.30± 5.50	1.20±1.23

Table 4. Some plasma analyses in animals sacrificed in thirteen weeks after the test.

Group	Sex	Number of samples	Rat					Number of samples	Mouse		
			Albumin-globulin ratio	Urea nitrogen (mg/dl)	GOT**	GPT**	Cholinesterase ( $\Delta pH$ )		Urea nitrogen (mg/dl)	GOT**	GPT**
I	♂	10	1.35±0.49*	18.7±2.67	56.2±26.6	41.2±20.9	0.06±0.04	8	29.6±6.31	121±69	41±13
	♀	10	1.22±0.30	21.0±3.04	35.3±15.8	25.2±12.5	0.23±0.06	10	24.8±10.55	137±65	50±15
II	♂	10	1.25±0.35	17.4±1.75	77.3±29.2	39.2±8.0	0.08±0.01	8	27.8±4.49	215±115	55±19
	♀	10	1.16±0.37	19.5±2.62	43.7±31.4	24.4±5.8	0.22±0.07	10	23.6±6.52	264±184	41±17
III	♂	10	1.32±0.31	17.5±2.04	83.9±26.7	38.9±8.0	0.07±0.03	7	29.3±12.3	418±154	26±10
	♀	10	1.30±0.36	19.1±3.46	49.5±38.2	18.2±8.4	0.20±0.07	10	27.0±8.35	217±87	50±16
IV	♂	10	1.24±0.48	16.5±1.38	66.5±42.0	38.4±14.6	0.08±0.01	3	18.3	225±177	20
	♀	10	1.21±0.36	18.9±3.66	45.4±24.6	21.1±14.6	0.21±0.06	10	23.4±3.01	158±144	48±11
V	♂	10	1.26±0.42	16.2±2.63	79.3±28.2	39.9±11.9	0.08±0.02	1		242	64
	♀	10	1.12±0.52	21.1±6.05	46.3±24.4	26.7±15.4	0.15±0.04	10	28.2±5.16	263±147	59±4
VI	♂	10						10	37.3±12.70	65±31	12±6
	♀	10						10	28.7±3.01	49±25	15±4

\* Mean and standard deviation

\*\* Mizobe unit.

せる増量は認められない。

血清 GOT, GPT は肝疾患, 心筋梗塞, 筋疾患, 悪性腫瘍などで高値を示すといわれるが<sup>8,9)</sup>, ヒトの場合でも正常値の幅が著しく (Karmen 単位で 0~50, 0~45), 本例のラット, マウスの場合も, 偏差が相当大きくて明確なことはいえない。一応の傾向として, ラット, マウスとも GOT は投与群の方が有意の差で活性が高く, GPT は逆に投与群の方がやや低いが, 有意差は認められないということがいえる。ただ追加実施のマウス VI 群の場合のみは, GOT, GPT とも I 群に比べて著しく活性が低いが, これは実施時期, 動物週令の違いなどによるものであり, 5 ppm 群なので薬物の影響によるものとは考えられない。いずれにしろ GOT, GPT とも肝, 心などの障害によって臓器中から血中に逸脱してくるものであるから, 本薬物がこれら臓器を障害するとすれば, 当然投与群の方が対照より高い活性値を示すことが考えられる。GOT については増量が認められるが, GPT では認められず, また GOT/GPT が 1.0 以下のものも認められないこと, さらに後述のように投与群の肝病変は対照にも認められるものであることを考慮すると, 本薬物が血中のこれらの酵素の活性値に影響するほどの効果を, 臓器とくに肝細胞に与えてはいないものと思われる。

ラットの ChE 活性値は, ♂ と ♀ では ♀ の方が高

く, また両者ともヒトの正常値に比べると  $\Delta pH$  が相当低くなっている。一般的に♂では投与群の方が高く, ♀では逆に低い傾向を示しているが, いずれも有意の差は認められない。したがってラットにおける ChE 活性は, 性による活性値の違いについては今後追求を要する問題であるが, 本薬物は ChE 活性にはほとんど影響を及ぼしていないものと考えたい。

#### 8) 臓器重量

Table 5 に殺時の各種臓器の重量を, 体重との比率で示した。

ラットでは♂, ♀とも, 高濃度群で体重比が増加している臓器は肝, 脳であり, 減少している臓器は胸腺である。その他♂では精巣が IV, V 群で, 腎が IV 群で増加を示し, その他の臓器はとくにはっきりした変動を示していない。♀では卵巣が IV, V 群で対照に比べて高いが, II 群がもっとも高いので必ずしも薬物のためとはいえない。

マウスでも, 肝, 脳の増加傾向, 胸腺の減少傾向 (♂の IV 群を除いて) は, ラットの場合と同様であり, これらの変化はある程度薬物による影響と思われる。精巣はラットと異なり, 著明な減少を示している。これは後述の病理所見からもわかるように, 本薬物のマウス精巣に対する著明な効果の結果と考えられる。卵巣はラットの場合と異なって逆に減少しているが, 後述の病理組織所見でも卵胞の萎縮がみられるの

Table 5. The weights of various organs of animals

Animal	Sex	Group	Body weight when killed (g)	Brain	Heart	Lung
Rat	♂	I	294±15	0.610±0.041	0.274±0.007	0.472±0.063
		II	316±13	0.573±0.041	0.263±0.010	0.449±0.037
		III	304±16	0.581±0.043	0.271±0.020	0.433±0.024
		IV	273±20	0.656±0.049	0.288±0.033	0.467±0.022
		V	259±20	0.688±0.051	0.291±0.020	0.443±0.035
	♀	I	196±9	0.881±0.044	0.307±0.026	0.534±0.051
		II	195±11	0.859±0.062	0.308±0.024	0.537±0.041
		III	192±10	0.882±0.074	0.299±0.024	0.518±0.026
		IV	183±11	0.889±0.090	0.316±0.020	0.542±0.073
		V	157±7	1.024±0.049	0.321±0.017	0.560±0.036
Mouse	♂	I	35.2±4.36	1.156±0.128	0.408±0.048	0.561±0.088
		II	30.1±4.25	1.304±0.237	0.410±0.035	0.595±0.094
		III	24.1±3.91	1.647±0.298	0.437±0.129	0.979±0.309
		IV	22.8±4.64	1.714±0.170	0.452±0.057	0.859±0.268
		V				
		VI	35.2±1.98	1.225±0.044	0.474±0.096	0.633±0.081
	♀	I	29.4±3.07	1.423±0.124	0.401±0.045	0.663±0.095
		II	31.2±2.59	1.388±0.096	0.391±0.045	0.596±0.087
		III	28.9±2.35	1.460±0.120	0.405±0.052	0.655±0.153
		IV	27.6±3.46	1.460±0.258	0.383±0.054	0.658±0.114
		V	24.7±3.30	1.568±0.251	0.391±0.021	0.649±0.115
		VI	32.2±1.98	1.406±0.147	0.441±0.032	0.686±0.117

\* The weight of organ is expressed as a ratio of organ-weight (g) to body-weight (g) when killed. Values given are for mean and standard deviation.

で、これも薬物の影響であろう。その他腎が♂、♀とも減少しているが、ラットではむしろ増加しているか、あるいは変動がないので、薬物の効果とは必ずしもいえない。

結局本薬物の臓器重量からみたもっとも特徴的な効果は、マウスの精巣に対するものといえよう。

#### 9) 病理組織学的所見

ラット、マウスとも、肉眼的剖検所見によって変状の認められるものは比較的少なく、ラットではI群(対照)で肺点状斑(♂1例)、卵巣と小腸の腫瘍(♂1例)、III群(180 ppm)で無気肺(♂1例)、肝辺縁の出血(♂2例)、マウスではI群で肺炎(♂1、♀1)、肺結節(♂1、♀1)、肝小葉脂肪変性(♀1)、II群(20 ppm)で肺炎(♂2)、肺出血(♀1)、III群(60 ppm)で腎出血(♂1)、肺炎(♂2)、無気肺(♂1)、IV群(180 ppm)で無気肺あるいは肺炎(♀1)、肝炎(♀1)、V群(540 ppm)で肺炎(♀1)、肺出血(♀1)、脳膿瘍・軟化・エ死(♀1)の程度であった。

Table 6はラットにみられた病変である。ラットでは途中死亡例がほとんどなかったため、全例13週の試験終了後のものである。まずI群(対照)では、肝、肺の病変が♂、♀ともに認められ、腎の硝子滴変

性が♀に多くみられた。また♀にのみ尿石が認められたが、これらの病変はいずれも飼料および系統特有のものと思われる。II群における♂の硝子滴変性も同様であり、また肝、肺の病変も対照にも認められるもので正常像と思われる。心のエ死は陳旧のもので、試験前の病変であろう。II群♀の肝、肺の病変ならびに腎結石も対照にも認められ、やはり飼料性のもので薬物による病変ではない。その他III、IV、V群にみられる病変も、I、II群に認められる病変で、いずれも薬物によると思われる病変ではない。以上ラットにおける病変は、腎の硝子滴変性、尿石(♀のみ)、肺の気管支周囲炎、血管周囲リンパ球浸潤などがその主なものであるが、いずれも薬物によるものではなく、病理組織学的にみて本薬物のラットに及ぼす影響は、1,620 ppm群においてもほとんどないものと考えられる。

マウスにおける病変はTable 7(♂)、8(♀)のとおりである。まず対照にみられる病変は、一般正常と思われるマウスにもよくみられるもので、飼養あるいはマウスの系統によるものであろう。なお♂の場合は途中死亡例が相当多く、各群の途中死亡例の病変も表示したが、V群♀の途中死亡の3例のうち、2例は自家融解(autolysis)が強くてはつきりせず、1例は肺炎で感染症によるものであり、腎の病変も同様と

sacrificed in thirteen weeks after the test\*.

Liver	Spleen	Kidney	Thymus	Adrenal	Testis or ovary
3.073±0.102	0.185±0.003	0.661±0.026	0.091±0.024	0.014±0.002	0.948±0.051
3.064±0.122	0.177±0.017	0.645±0.031	0.100±0.017	0.014±0.005	0.897±0.028
3.093±0.174	0.173±0.010	0.656±0.026	0.082±0.007	0.015±0.003	0.925±0.048
3.245±0.242	0.175±0.020	0.719±0.117	0.072±0.022	0.018±0.002	1.020±0.081
3.384±0.172	0.166±0.014	0.692±0.033	0.078±0.007	0.017±0.003	1.042±0.091
3.360±0.146	0.256±0.020	0.669±0.017	0.135±0.014	0.026±0.002	0.046±0.014
3.372±0.178	0.244±0.022	0.692±0.083	0.129±0.014	0.027±0.001	0.055±0.009
3.246±0.252	0.233±0.013	0.686±0.038	0.136±0.033	0.027±0.001	0.050±0.014
3.282±0.238	0.236±0.020	0.687±0.037	0.133±0.003	0.030±0.004	0.052±0.017
3.874±0.490	0.208±0.054	0.811±0.143	0.105±0.050	0.027±0.004	0.053±0.011
5.451±0.547	0.401±0.171	1.568±0.167	0.061±0.017	0.028±0.014	0.544±0.136
5.533±0.616	0.319±0.106	1.417±0.165	0.074±0.035	0.030±0.007	0.333±0.187
5.424±0.500	0.445±0.223	1.314±0.109	0.077±0.017	0.034±0.009	0.218±0.068
6.409±0.125	0.325±0.091	1.292±0.032	0.199±0.194	0.028±0.014	0.300±0.155
5.010±0.511	0.391±0.134	1.718±0.150	0.102±0.035	0.035±0.004	0.524±0.159
5.660±0.663	0.418±0.125	1.220±0.143	0.163±0.075	0.039±0.009	0.058±0.020
5.532±0.682	0.378±0.093	1.135±0.046	0.150±0.078	0.040±0.007	0.048±0.014
5.477±0.592	0.398±0.036	1.151±0.095	0.133±0.032	0.035±0.008	0.042±0.017
5.411±0.655	0.397±0.126	1.096±0.113	0.143±0.051	0.036±0.015	0.035±0.014
6.649±0.157	0.467±0.153	1.166±0.173	0.114±0.071	0.033±0.007	0.034±0.002
4.995±0.283	0.438±0.195	1.291±0.086	0.151±0.057	0.049±0.015	0.099±0.032

考えられる。

Ⅱ群の生存例の肺、肝の病変は対照にもみられたもので、一般的にマウスによく認められる病変である。全例にみられた間質細胞の増殖、精細胞のエ死、無精子の状態は薬物による病変である (Plate 2)。途中死亡3例のうち、2例は化膿性肺炎で、試験後期に死亡していることからみて、感染症による化膿性肺炎が死亡の主因であり、薬物とは無関係と思われる。なお1例は autolysis が強く死因は不明であった。♀における肝、肺の病変も前述と同様であり、腎盂炎は細菌性のもので薬物による病変ではない。

Ⅲ群の生存例の肝、肺の病変は対照と同様である。大腸内寄生虫は一種の Nematoda であり、脾の脾細胞増殖は感染症による反応と思われる。精巣の病変は全例に認められ、薬物によるものである (Plate 3, 4)。なお途中死亡例の主なもの肺炎 (2例)、肺、大脳の充出血 (1例) で、2例は autolysis のため不明である。肺、大脳の充出血は薬物によるものと思われる。肺炎は感染性のものである。♀ではとくに薬物によると思われる病変は認められない。

Ⅳ群生存マウス2例の精巣病変は、明らかに薬物によるものであるが、腎の間質性腎炎は感染性であり、肝の病変と同様、薬物とは無関係である。途中死亡例

のうち、死因の主なものは肺の充出血 (Plate 5)、脳の充出血で、薬物による急性ないし亜急性の中毒死と考えられる。精巣の病変は比較的少ない。肝、腎に白色結節が認められたのは膿瘍であり、細菌性のもので死因の副因と考えられる。♀の場合はとくに薬物による病変は認められなかった。

Ⅴ群はわずかに1匹のみ、肺炎を感染しながらも生存したが、これは前述のように、むしろ本薬物に対して特異体質的素質を有していたと考えるべきであろう。精巣における病変は重度で、薬物によることは明らかである (Plate 1)。途中死亡の19例は、いずれも発見まである程度時間が経過したため、autolysis が著明であったが、それでも肺の充出血、肝うっ血、腹水増量、肝腫瘍などが認められた。死因と思われるものは肺の充出血、脳の充出血 (Plate 6) で、薬物投与後1週間前後のものが多いことは、薬物による急性中毒死と考えられる。精巣における病変の発現は、わずかに1例に軽度で認められたにすぎない。♀では卵巣の卵胞萎縮は薬物によるものと思われるが、その他の病変はやはり感染性、細菌性のものであろう。

追加実施のⅥ群の病変も大同小異であるが、♂1例の精細胞エ死、♀副腎における髄質と皮質の中間網状帯ないし束状帯にかけての中性脂肪の沈着は、薬物に

Table 6 Main histopathological changes in rats sacrificed in thirteen weeks after the test.

Group	Sex	Number of animals examined	Tissue	Findings	Incidence	Average grade
I	♂	5	Liver Kidney Lung	Congestion Hyaline droplets degeneration Peribronchitis Perivascular round cell infiltration	2 1 1 2	+ + # +
	♀	5	Liver Kidney Lung	Congestion Urinary calculi Hyaline droplets degeneration Peribronchitis Perivascular round cell infiltration	2 4 3 1 4	+ + + + +
II	♂	5	Liver Kidney Lung  Heart	Congestion Hyaline droplets degeneration Peribronchitis Perivascular round cell infiltration Necrosis	2 1 1 1 1	+ # # + +
	♀	5	Liver Kidney  Lung	Congestion Urinary calculi Hyaline droplets degeneration Perivascular cell infiltration	2 4 3 4	+ + + +
III	♂	5	Liver Kidney Lung  Heart	Congestion Hyaline droplets degeneration Peribronchitis Perivascular round cell infiltration Necrosis	2 1 1 1 1	+ + # + +
	♀	5	Liver Kidney  Lung	Congestion Urinary calculi Hyaline droplets degeneration Perivascular round cell infiltration	2 3 1 1	+ + + +
IV	♂	5	Liver Kidney Lung	Congestion Hyaline droplets degeneration Perivascular round cell infiltration	3 2 2	+ + +
	♀	5	Liver Kidney  Lung	Congestion Urinary calculi Hyaline droplets degeneration Perivascular round cell infiltration	2 2 2 4	+ + + +
V	♂	5	Liver Kidney Heart	Congestion Hyaline droplets degeneration Production of granulation	1 2 1	+ + +
	♀	5	Liver Kidney  Lung	Congestion Urinary calculi Hyaline droplets degeneration Peribronchitis Perivascular round cell infiltration	1 4 2 1 2	+ + + + +

よるものと考えられる。

以上本薬物は、マウス♀にはあまり影響を与えないが、♂精巣には間質細胞増殖、精細胞の融解・エ死、無精子など著しい影響を及ぼすのが特徴である。無精子症の原因については、中毒、細菌、熱性疾患あるいはホルモンの不均衡などがあげられているが、本例の場合精上皮細胞の萎縮、精細胞（精祖、精母、精娘細胞）の融解、精子のエ死などから、薬物によって直接

精巣に効果があったものと考えられる。

また薬物濃度が高くなるにしたがい、マウス♂では死亡率が著明に増加するのに対し、マウス♀、ラットに対しては高濃度でもほとんど影響を与えないことは、きわめて興味あるところである。180 ppm 以上のマウス♂で、試験開始初期ないし中期で死亡するのは、肺、脳、肝の充出血からみて急性ないし亜急性中毒死と考えられるが、♂のみにみられたことについては、

Table 7. Main histopathological changes in male mice died in the course of the test and survived.

Group		Number of animals examined	Tissue	Findings	Incidence	Average grade
I	Survival	10	Liver	Swelling of hepatic cell Perivascular round cell infiltration Peribronchial follicle swelling Parasite	5	+
			Lung		2	+
			Large intestine		4	+
II	Survival	5	Liver	Swelling of hepatic cell Perivascular round cell infiltration Interstitial cell proliferation Necrosis of seminiferous epithelium Spermocytosis	2	+
			Lung		3	+
	Dead	3	Lung	Prulent pneumonia	2	+
III	Survival	4	Liver	Swelling of hepatic cell Perivascular round cell infiltration Parasite Interstitial cell proliferation Necrosis of seminiferous epithelium Spermocytosis	3	+
			Lung		2	+
			Large intestine		2	+
			Testis		4	++~+++
		Dead	4	Spleen	Splenocytes proliferation	1
	Dead	4	Lung	Pneumonia	2	*
			Cerebrum	Hyperemia Hyperemia and hemorrhage	1 1	
IV	Survival	2	Liver	Swelling of hepatic cell Interstitial nephritis Interstitial cell proliferation Necrosis of seminiferous epithelium Spermocytosis	1	+
			Kidney		1	+
	Dead	6	Liver	Abscess Abscess Hyperemia and hemorrhage Hyperemia and hemorrhage Disappearance of interstitial cells of Leydig Necrosis of seminiferous epithelium Spermocytosis	4	++~+++
			Kidney		1	+
			Lung		3	++
			Cerebrum		4	++
			Testis		2	++
V	Survival	1	Lung	Pneumonia Interstitial cell proliferation Necrosis of seminiferous epithelium Spermocytosis	1	++
			Testis		1	+++
	Dead	7	Liver	Congestion Hyperemia and hemorrhage Hyperemia Interstitial cell proliferation Spermocytosis	3	++
			Lung		7	++~+++
			Cerebrum		6	++
			Testis		1	+
VI	Survival	13	Liver	Swelling of hepatic cell Nodular cell infiltration Nephritis Nephrosis Perivascular round cell infiltration Swelling of bronchial lymph follicle Interstitial cell proliferation Necrosis of seminiferous epithelium	5	++
			Kidney		1	++
					2	+
					1	+
					5	++
					3	++
					2	++
	1	++				

\* The grade is not clear for a striking autolysis.

180 ppm では肺、肝の病変と同時に精巣に病変がみられるから、精巣病変が生体に有毒成分として再吸収

され、生体に有害に作用して死の転帰をとったとも考えられる。540 ppm 群ではほとんど死亡したが、

Table 8. Main histopathological changes in female mice sacrificed in thirteen weeks after the test.

Group	Number of animals examined	Tissue	Findings	Incidence	Average grade
I	5	Liver	Swelling of hepatic cell	3	+
			Nodular cell infiltration	1	+
		Kidney	Pyelitis	2	+
		Lung	Swelling of peribronchial lymph follicle	2	+
			Perivascular round cell infiltration	1	+
II	5	Liver	Swelling of hepatic cell	1	+
			Fat infiltration	1	+
		Kidney	Pyelitis	2	+
		Lung	Swelling of peribronchial lymph follicle	4	+
			Perivascular round cell infiltration	2	+
III	5	Liver	Swelling of hepatic cell	1	+
			Nodular cell infiltration	3	+
		Kidney	Nephrosis	2	±
		Lung	Perivascular round cell infiltration	3	+
IV	5	Liver	Swelling of hepatic cell	2	+
		Kidney	Nephrosis	1	±
		Lung	Swelling of peribronchial lymph follicle	2	+
			Perivascular round cell infiltration	2	+
V	4	Liver	Swelling of hepatic cell	1	±
			Nodular cell infiltration	1	+
		Lung	Prulent pneumonia	1	+
			Perivascular round cell infiltration	1	+
			Swelling of peribronchial lymph follicle	1	+
		Ovary	Atrophy of ovum	3	++
VI	20	Liver	Nodular cell infiltration	5	+
		Kidney	Nephritis	3	+
		Lung	Perivascular round cell infiltration	8	+
			Pneumonia	1	+
			Cancer	1	+
		Adrenal	Fat deposition	11	+

これは前述のように1週間前後で肺, 脳, 肝のみに病変がみられるので本薬物による急性中毒死と考えられ, しかも精巣にはまだ病変がみられないから, 薬物そのものによる急性死と見なされる. しかし同濃度群の♀がほとんど死亡していないのは奇異に感ぜられる. この原因についての考察は困難であるが, 前述のように♂と♀とで, 薬物摂取量には差がないから, 精巣の著しい病変からみても, 精巣がこの原因に対してなんらかの形で役割を演じているものと思われる.

一般に♂の生殖機能に毒性を示す物質としては, Zn, Cd などある種の無機物, 6-azauracil など栄養障害, 代謝障害に由来するもの, アルキル化剤, nitrofuran 誘導体など抗精子形成剤, 抗アンドロゲンなどのホルモン平衡を変える物質, busulfan など Leydig 細胞あるいは下垂体に作用する精巣毒が知られている<sup>9)</sup>. 本薬物がどのような機作をもつ薬物であるかについては, その後いささか知見を得ており, 次

回に報告する.

### 要 約

N, N-di (2-chloroethyl)-4-methyl-2, 6-dinitroaniline を, ラットでは0 (I群), 60 (II群), 180 (III群), 540 (IV群), 1,620 (V群) ppm の割合で, マウスでは0 (I群), 20 (II群), 60 (III群), 180 (IV群), 540 (V群), 5 (VI群) ppm の割合で餌に混合したもので13週飼養し, その毒性を対照と比較検討した.

1. 動物の途中死亡数は, 各群♂, ♀各20のうち, ラットではV群♀の1匹のみ, マウス♀ではV群の3匹のみであったが, マウス♂ではII群3, III群5, IV群15, V群19, VI群7匹であった.

2. 飼料の摂取状況は, ラットでは高濃度群ほど悪い傾向が認められたが, マウスでは一定の傾向はみられなかった.



3. 飲水摂取量は、ラットではV群がとくに多かったが、マウスではむしろ高濃度群の方が少ない傾向を示した。

4. 薬物摂取量は、ラットでは♀は♂よりやや少なかったが、マウスでは♂と♀とでほぼ同様であった。

5. 体重増加率は、ラットではIV群が試験の後半から、V群は比較的早い時期から低下した。マウスではVI群とII群の♀以外は、すべての群で増加率の低下を示した。

6. 血液学的検査では、とくに薬物による影響と思われる変化は認められなかった。また血漿 A/G 比、尿素-N, GOT, GPT, ChE においても、薬物によると断定できるほどの変動はみられなかった。

7. 臓器重量では、二三増減のみられる臓器もあったが、もっとも著しい変化はマウス精巣の低下であった。

8. ラットにおける病変の主なものは、肝のうっ血、腎の硝子滴変性、尿石(♀のみ)、肺の気管支周囲炎、血管周囲リンパ球浸潤などであるが、いずれも中毒病変ではない。

マウスでは、肝細胞腫大、肺炎、肺充出血、血管周囲リンパ球浸潤、気管支周囲濾胞腫大、精巣の間質細胞増殖、精細胞エ死、無精子などが主な病変であったが、このうち精巣病変が本薬物のもっとも特徴的所見である。

以上本薬物は毒性的にみて、きわめて興味ある化合物であり、ラット♂、♀、マウス♀に対しては、とく

に問題となるほどの毒性を示さない。体重増加率、臓器重量、病理組織学的所見などからみて、ラットに対しては飼料中 540 ppm, マウス♀に対しては 180 ppm が、最小中毒量とみられぬこともないが、最高濃度のラット 1,620 ppm, マウス♀ 540 ppm でも、必ずしも確実中毒量とはいえない位の作用しか示さない。ところがマウス♂に対してのみ強烈的な作用を示し、とくに精巣に対しては著しい影響を与える化合物と考えられる。すなわち飼料中 5 ppm でも必ずしも最大安全量と断定することはできず、20 ppm はすでに確実中毒量とみなすべき結果が得られた。

## 文 献

- 1) 宮尾 陟・石黒 茂・河野猪三郎・安田宣絃：鹿大農学術報告，**22**，131-144 (1972)
- 2) 小川恕人：臨床病理増刊，**11**，46-67 (1966)
- 3) 紫田 進・佐々木匡秀：超微量定量法，228-238，金芳堂，京都 (1969)
- 4) ————：同上，276-280，金芳堂，京都 (1969)
- 5) ————：同上，239-245，金芳堂，京都 (1969)
- 6) 高橋日出彦：くすりの毒性，305-312，南江堂，東京 (1973)
- 7) 土屋俊夫・河野均也：簡易臨床検査と診断のすすめ方，111-112，金原出版 K.K.，東京 (1967)
- 8) ————：同上，106-107，金原出版 K.K.，東京 (1967)
- 9) 山村雄一・勝沼信彦・藤井節郎：臨床酵素学必携，382，南江堂 (1966)

## Summary

Rats and mice of both male and female were fed thirteen weeks on a diet mixed with N, N-di (2-chloroethyl)-4-methyl-2, 6-dinitroaniline. The concentration of the drug in the diet was 0 ppm to rats and mice in group I, 60 ppm to rats and 20 ppm to mice in group II, 180 and 60 ppm in group III, 540 and 180 ppm in group IV, and 1620 and 540 ppm in group V, respectively.

Besides these, as some striking effects were observed in male mice, the diet containing 5 ppm was given to mice in group VI.

1. In the course of the test, only one female died in group V in rats, and only three in female mice in group V, but in male, three died in group II, five in group III, fifteen in group IV, nineteen in group V, and seven in group VI, respectively.

2. While a dietary intake tended to be lower in groups of the higher drug concentration in rats, this tendency was not found in mice.

3. Although a drinking-water-intake was significantly high, in group V, in the rat, it tended to become less, in groups of the higher drug concentration, in the mouse.

4. Female rats showed a little less drug-intake than male ones, but a similar intake was observed between male and female mice.

5. While the rate of body-weight-increase has been falling during the latter half of the test in group IV, and in a comparatively early period in group V, in the rat, it fell in every group, excepting females of group II and VI in the mice.

6. No hematologic changes considered to be due to the effect of the drug, were recognized in both animals. Changes caused by the drug were not found in plasma albumin-globulin ratio, urea nitrogen, GOT, GPT, and in cholinesterase activities, either.

7. As to the organ-weights after the test, some organs showed lighter or heavier weights in animals, fed on the diets containing the higher concentration of the drug than in control ones, but the most characteristic and significant change was noted to be a reduction of testis-weight in male mouse given the drug.

8. Main histopathologic changes in rats were liver-congestion, hyaline droplets-degeneration of kidney, urinary calculi found in the female alone, lung-peribronchitis, -perivascular round-cell-infiltration, and so on.

All of these changes, however, were not the ones caused by the drug.

In mice were found swelling of hepatic cells, pneumonia, lung-hyperemia and hemorrhage, perivascular-round-cell-infiltration, peribronchial-follicle-swelling, testis-interstitial-tissue-production, necrosis of seminiferous epithelium, spermacrasia, and others.

Of these changes, those found in testis are the most prominent ones caused by this drug.

In conclusion, toxicologically this drug is a very interesting compound which shows no noteworthy toxicity to the rat and female mouse; but shows a fatal poisoning to the male mouse even in a little dose. Judging from the effects of this drug on the rate of body-weight-increase, changes of organ weights, histopathologic findings, and so forth, the concentration of 540 *ppm* in diet to the rat and 180 *ppm* to female mouse may be regarded as a minimum toxicological dose. On the other hand it is not always possible for us to decide that the concentration of 1620 *ppm* in diet to rat, or 540 *ppm* to female mouse is a sure toxicological dose.

This drug is, however, considered to be a compound which exhibits such a striking action to the male mouse; especially, to the testis, that in the male mouse, even the concentration of 5 *ppm* in diet is not always to be concluded to be a maximum safty-dose, but that of 20 *ppm* should be regarded as a sure toxicological dose.

#### Explanation of plates

Micrographs are from sections with hematoxylin and eosin except plate 4.

Plate 1. Testis in the mouse in group V.

Plate 2. Testis in the mouse in group II.

Plate 3. Testis in the mouse in group III.

Plate 4. Testis in the mouse in group IV. (Azan stain)

Plate 1 to 4 shows necrosis and dissolution of the germinal cell living in the seminiferous tube as well as proliferation of interstitial cells.

Plate 5. Hyperemia and edema of lung in mice died in the course of the test in group IV.

Plate 6. Hyperemia of cerebrum in mice died in the course of the test in group V.

