

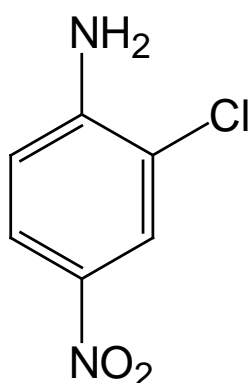
# 2-Chloro-4-nitro-aniline (Aniline, 2-chloro-4-nitro-)

2-クロロ-4-ニトロアニリン

[CAS No. 121-87-9]

Molecular formula: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight: 172.57



## ABSTRACT

### 1. Material and method

Purity	: 99.0%
Test species/strain	: Rat/CrI:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 10, 30, 100 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 100 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 12 (5 for recovery) ; Females, 12 Satellite females, 5
Vehicle	: Olive oil
Administration period	: Males, 42 days Females, from 14 days before mating to day 4 of lactation Females (satellite), 42 days
Recovery period	: Males, 14 days Females (satellite), 14 days
Terminal killing	: Males, day 43 of treatment and 15 of recovery Females, day 5 of lactation Females (satellite), day 15 of recovery Offspring, day 4 after birth
GLP	: Yes

## 2. Results

### Repeated dose toxicity

No change in clinical observations, functional observations, body weight or food consumption was observed in any dosed group of either sex.

No compound-related abnormality on urinary, hematological or blood biochemical parameters was observed in any dosed group of either sex.

Liver weight was increased in the females given 100 mg/kg. In males, no organ weight was recognized in any dosed group. No histopathological lesion was recognized in any dosed group of either sex.

### Reproductive and developmental toxicity

No compound-related effects on estrous cycle, copulation, fertility, delivery or lactation, and development of pups were noted in any dosed group.

## 3. Evaluation

### No observed effect level (NOEL)

For the repeated dose toxicity, no effect was recognized in the 100 mg/kg-dose group of males, and the endpoint for a NOEL was increased liver weight in females given 100 mg/kg. For the reproductive and developmental toxicity, there was no effect in the 100 mg/kg-dosed group of either sex or their offspring.

It was concluded that a NOEL for the repeated dose toxicity of 2-chloro-4-nitro-aniline was 100 mg/kg/day for males and 30 mg/kg/day for females, and that a NOEL for the reproductive/developmental toxicity was 100 mg/kg/day.

### No observed adverse effect level (NOAEL)

For the repeated dose toxicity, no adverse effect was recognized in the 100 mg/kg-dosed group of either sex. For the reproductive and /developmental toxicity, there was no adverse effect in the 100 mg/kg-dosed group of either sex or their offspring.

It was concluded that a NOAEL for the repeated dose toxicity of 2-chloro-4-nitro-aniline was 100 mg/kg/day for males and females, and that a NOAEL for the reproductive/developmental toxicity was 100 mg/kg/day.

## 2-クロロ-4-ニトロアニリンの ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

### Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-Chloro-4-nitro-aniline by Oral Administration in Rats

#### 要約

2-クロロ-4-ニトロアニリンの反復投与毒性および生殖発生毒性を検討するために、OECD テストガイドライン 422 に基づき、試験を実施した。

本試験では、2-クロロ-4-ニトロアニリンを 0 (媒体対照, オリーブ油), 10, 30 および 100 mg/kg の用量で、CrI:CD(SD)ラットの雌雄 (12 匹/群, 10 週齢) に、雄では 42 日間、雌では哺育 4 日までの 41~45 日間、毎日、強制経口投与し、雌雄動物に対する反復投与の影響、ならびに親動物の生殖および哺育 4 日までの児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。対照群と 100 mg/kg 投与群については、雄では交配に供した 12 匹のうち 5 匹を、雌では交配に供した動物とは別にサテライト雌 5 匹を用意し、42 日間の反復投与終了後、2 週間の回復期間を設けた。結果は以下のように要約される。

#### 1. 反復投与毒性

雌雄の一般状態、行動機能、体重、摂餌量、尿検査、血液学検査および血液生化学検査の結果に投与の影響は認められなかった。

100 mg/kg 群の雌に肝臓重量の増加が認められた。雄の器官重量に投与の影響は認められなかった。雌雄の病理組織学検査結果に投与の影響を示唆する病変は認められなかった。

#### 2. 生殖発生毒性

性周期、交配能力、妊娠および分娩の状態に投与の影響は認められなかった。また、着床率、児動物の発生・発育にも投与の影響は認められなかった。

#### 3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

反復投与毒性に関して、雄では 100 mg/kg の用量で投与の影響は認められなかった。また、雌では 100 mg/kg の用量で肝臓重量の増加がみられたことから、これを NOEL 決定のエンドポイントとした。生殖発生毒性に関しては、100 mg/kg の用量で雌雄親動物および児動物への影響は認められなかった。

したがって、本試験における 2-クロロ-4-ニトロアニリンの NOEL は、反復投与毒性に関しては雄では 100 mg/kg/day、雌では 30 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては 100 mg/kg/day であると結論される。

#### 4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

反復投与毒性に関して、雌雄ともに 100 mg/kg の用量で有害影響は認められなかった。生殖発生毒性に関しても、100 mg/kg の用量で雌雄親動物および児動物への有害影響は認められなかった。

したがって、本試験における 2-クロロ-4-ニトロアニリンの NOAEL は、反復投与毒性に関しては雌雄ともに 100 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しても 100 mg/kg/day であると結論される。

#### 方法

##### 1. 被験物質および投与検体の調製法

被験物質の 2-クロロ-4-ニトロアニリンは、購入 (ロット番号: QV3MC) したもので、純度 99.0% の黄色針状晶粉末である。被験物質は入手後、使用時まで冷蔵で暗所に保管した。被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定し、文献値と比較することにより確認した。また、被験物質の安定性は、使用開始前および使用終了後にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

媒体として選択したオリーブ油 (日本薬局方) は丸石製薬から購入 (ロット番号: 6309) し、使用時まで室温で暗所に保管した。投与検体 (溶液) は、被験物質をオリーブ油と混和して、各用量の 1 回の投与液量が 5 mL/kg 体重になるように調製した。投与検体は 8 日間の安定性試験の結果に基づき、1 週に 1 回の頻度で調製し、冷蔵で暗所に保管して調製 7 日以内に使用した。投与検体中の被験物質の濃度および均一性は、初回調製時に高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) を用いて測定し、確認した。

##### 2. 使用動物および飼育方法

日本チャールス・リバー (厚木飼育センター) の CrI:CD(SD) ラット (SPF) の雌雄を 8 週齢で購入した。導入日を含む 7 日間を検疫と馴化を兼ねて飼育し、投与前の雌の性周期を観察するために、さらに 8 日間の予備飼育を行った。これらの飼育期間中に状態の変化や異常な性周期がみられなかった動物から、投与開始日の体重の中央値に近い雄 48 匹と雌 58 匹 (投与開始時体重範囲、雄: 353~419g, 雌: 215~251g) を選定し、試験に用

いた。

群分けは、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合計体重を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることで、群間の体重の偏りを小さくする方法（適正層別方式）により実施した。

動物は、温度； $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度； $55 \pm 15\%$ 、換気回数；15～17 回／時、明暗サイクル；12 時間点灯（8:00～20:00）／12 時間消灯（20:00～8:00）に制御された飼育室でステンレス製網ケージに個別に収容して飼育した。ただし、妊娠 18 日以降の母動物は、床敷（ALPHA-dri™：Shepherd Specialty Papers）をいれたステンレス製分娩用ケージに収容した。飼料（CRF-1 固型、30KGy- $\gamma$ 線照射滅菌：オリエンタル酵母工業）と飲料水（秦野市水道局供給の水道水をフィルターろ過した後、紫外線照射）は自由摂取としたが、解剖前日の夕方からは絶食させた。

### 3. 投与量の設定および投与方法

投与量は用量設定試験の結果に基づいて設定した。用量設定試験では 1000 mg/kg を最高用量とし、以下、300 mg/kg、100 mg/kg、30 mg/kg に設定した。10 週齢の Crl:CD(SD) ラット、1 群あたり雌雄各 5 匹に、2-クロロ-4-ニトロアニリンを 14 日間、毎日、強制経口投与し、投与終了翌日に剖検した。その結果、1) 1000 mg/kg 群の雌雄に外部生殖器周囲の尿による汚染が観察され、摂餌量と体重には著しい低下がみられて 2 例の雄が死亡した。2) 赤血球数とヘモグロビン濃度の減少が雄では 1000 mg/kg 群に、雌では 300 mg/kg 群からみられ、網赤血球比の増加が雄では 300 mg/kg 群から、雌では 100 mg/kg 群から認められた。3) ALT の増加が 1000 mg/kg 群の雌雄にみられ、総ビリルビンの増加が雄では 1000 mg/kg 群に、雌では 300 mg/kg 群から認められた。4) 肝臓重量の増加が雌雄の 100 mg/kg 群から認められた。また、腎臓重量の増加が雄では 100 mg/kg 群から、雌では 1000 mg/kg 群にみられ、脾臓重量の増加が 1000 mg/kg 群の雌雄に認められた。5) 30 mg/kg 群では雌雄ともに投与の影響は認められなかった。以上の結果から、本試験の高用量は雌で網赤血球比の増加がみられた 100 mg/kg とし、以下、中用量を 30 mg/kg、低用量を 10 mg/kg に設定した。

本試験では対照群 1 群と投与群 3 群の計 4 群を設け、1 群あたり雌雄各 12 匹の動物を用いた。なお、対照群と 100 mg/kg 群については、雄では 12 匹のうち各群 5 匹を回復動物とし、雌では交配をさせないサテライト動物（回復動物）として、各群 5 匹の雌を追加した。

各用量の投与検体は、雄には交配前 14 日間、交配期間 14 日間および交配期間終了後 14 日間の 42 日間、雌には交配前 14 日間、交配期間（交尾成立まで）、妊娠期間および哺育 4 日までの計 41～45 日間、サテライト雌には 42 日間、毎日午後に投与した。ただし、分娩中および午前中に分娩が確認された雌にはその日の投与はしなかった。

対照群と 100 mg/kg 群の雌雄の回復動物については、投与期間終了後 14 日間の回復期間を設けた。

### 4. 観察および検査（反復投与毒性）

#### 1) 一般状態の観察

投与期間は毎日 2 回（投与前・後）、回復期間は毎日 1 回、一般状態を観察した。

#### 2) 行動機能の観察

##### (1) 詳細観察

投与期間に週 1 回の頻度で行動機能に関する詳細観察を行った。ただし、雌の投与 6 週の観察は、分娩および哺育時の動物への負荷を考慮してサテライト動物のみ行った。

詳細観察は、ケージから動物を取り出す際、ケージから動物を取り出した後および作業台上で実施した。ケージから動物を取り出す際には、接触反応・発声・取り出し易さを、ケージから動物を取り出した後には、扱い易さ・体温・被毛状態・皮膚の色・眼の状態・流涎の有無を、作業台上では、姿勢・活動性・警戒/探索行動・歩行状態・常同行動・呼吸・振戦/攣縮/痙攣の有無を観察し、1 分間における排尿数・排糞数・身繕い数・洗顔数の計数も行った。

##### (2) 反応性検査、握力測定および自発運動量測定

反応性検査、握力測定および自発運動量測定とともに、雄は全例について投与 6 週に行った。雌は群毎に同一分娩日または分娩日の近い動物 5 匹を選定し、解剖前日（分娩 4 日後）に行った。

反応性検査は、視覚・聴覚・痛覚・瞳孔反射・空中正向反射について行った。

握力測定は握力測定装置（MK-380CM：室町機械）を用いて行った。測定は前肢・後肢ともに 2 回行い、平均値をその個体の値とした。

自発運動量測定は自発運動量測定装置（SCANET MV-10：メルクエスト）を用いて行った。測定時間は 60 分間とした。

#### 3) 体重測定

雄は投与 1・8・15・22・29・36・42 日および回復 1・8・14 日に体重を測定した。

雌は交配前の投与 1・8・15 日、妊娠 0・7・14・20 日および分娩日（哺育 0 日）と分娩 4 日後（哺育 4 日）に体重を測定した。サテライト雌は投与 1・8・15・22・29・36 日および回復 1・8・14 日に測定した。

解剖日には絶食後の体重（解剖時体重）を測定した。

#### 4) 摂餌量測定

摂餌量は各測定期間に給餌量と残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日あたりの摂餌量を算出した。

雄の摂餌量は投与 1～8・8～15・29～36・36～42 日および回復 1～8・8～14 日に測定した。

雌の摂餌量は交配前の投与 1～8・8～15 日、妊娠 0～

7・7～14・14～20 日および哺育 0～4 日に測定した。サテライト雌は投与 1～8・8～15・29～36・36～43 日および回復 1～8・8～14 日に測定した。

#### 5) 尿検査

投与 6 週に雄とサテライト雌の新鮮尿を採取し、尿試験紙 (マルチスティックス: バイエル) を用いて、pH・蛋白・グルコース・ケトン体・ビリルビン・潜血・ウロビリノーゲンを検査した。

#### 6) 剖検

雄は最終投与日 (投与 42 日) の翌日と回復 14 日の翌日に剖検した。分娩した雌は分娩 5 日後、分娩しなかった雌は妊娠 26 日相当日に、サテライト雌は回復 14 日の翌日に剖検した。

#### 7) 血液学検査

解剖時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およびクエン酸ナトリウム入り採血管 (凝固検査用) に採血した血液を用いて血液学検査を行った。赤血球数・血小板数・網赤血球比・平均赤血球容積(MCV)・白血球数 (以上、光学的散乱法)、ヘモグロビン濃度 (シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値・平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)・平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC) (以上、計算による) は総合血液学検査装置 (ADVIA 120: バイエル) を用いて、白血球分類 (ライト染色による) は血液細胞自動分類装置 (MICROX HEG-120NA: オムロン) を用いて、プロトロンビン時間(PT) (Quick 一段法) と活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT) (エラジン酸活性化法) は全自動血液凝固測定装置 (Sysmex CA-5000: シスメックス) を用いて検査した。

#### 8) 血液生化学検査

解剖時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た血液を遠心分離し、得られた血漿について、総蛋白 (ビウレット法)、アルブミン (BCG 法)、A/G 比 (計算による)、総ビリルビン (アゾビリルビン法)、グルコース (GlcK-G-6-PDH 法)、総コレステロール (CE・COD・POD 法)、トリグリセリド (MGLP・GK・GPO・POD 法)、リン脂質 (PLD・ChOD・POD 法)、AST・ALT・ $\gamma$ -GTP・CK (以上、JSCC 法)、LDH (SFBC 法)、ALP (GSCC 法)、BUN (ウレアーゼ・GLDH 法)、クレアチニン (Jaffé 法)、ナトリウム・カリウム・クロール (以上、イオン選択電極法)、カルシウム (OCPC 法) および無機リン (PNP・XOD・POD 法) を自動分析装置 (日立 7080: 日立製作所) を用いて検査した。

#### 9) 器官重量

胸腺・副腎・心臓・腎臓・脾臓・肝臓・脳・精巣・精巣上体の湿重量 (絶対重量) を測定した。また、各器官の絶対重量の解剖時体重に対する百分率 (相対重量) を

算出した。

#### 10) 病理組織学検査

雄の精巣・精巣上体・精囊・凝固腺・前立腺 (腹葉) および雌の卵巣は全動物で検査した。また、雌雄の各群 5 匹 (動物番号の小さい順) および回復動物については、気管・肺・骨髄 (大腿骨)・リンパ節 (腋窩・鼠径等)・胸腺・脾臓・心臓・胃・小腸・大腸・肝臓・腎臓・膀胱・下垂体・甲状腺・上皮小体・副腎・子宮 (回復動物)・腔・乳腺・脳・脊髄・末梢神経 (坐骨神経)・筋肉・骨 (大腿骨) を検査した。上記の組織を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液またはブアン溶液 (精巣・精巣上体のみ) で固定後、パラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した標本について光学顕微鏡で観察した。

#### 5. 観察および検査 (生殖発生毒性)

##### 1) 性周期の観察

投与開始日から交配開始日までの毎朝、雌動物 (サテライト動物は除く) の腔垢を採取・塗抹し、ギムザ染色した標本について観察した。

性周期は発情前期、発情期および発情休止期に分類し、発情期が 4 日から 6 日の間隔で回帰される例を正常とした。また、性周期の観察期間に 2 回以上の性周期が得られた動物について平均性周期を算出した。

##### 2) 交配

交配は投与 15 日の夕方から交尾が確認されるまで、14 日間を限度として、同一群内の雌雄 1 匹ずつを同居させる方法で行った。交尾の確認は毎朝、腔内の腔栓または腔垢中の精子の存在を調べるにより行い、これらが確認された日を妊娠 0 日と規定した。

交配の結果から、交尾所要日数 (交配開始から交尾成立までに要した日数) と交尾率 [ (交尾成立ペア数 / 交配ペア数)  $\times$  100] を算出した。

##### 3) 分娩

分娩の確認は、妊娠 20 日から 25 日を限度に 1 日 2 回行い、16 時の時点で分娩が終了していた動物についてはその日を分娩日 (哺育 0 日) と規定した。分娩中の動物については分娩状態を観察した。

これらの結果から、妊娠期間 (妊娠日から分娩日までの日数)・受胎率 [ (受胎動物数 / 交尾成立ペア数)  $\times$  100]・出産率 [ (生児出産動物数 / 受胎動物数)  $\times$  100] を算出した。

##### 4) 妊娠黄体数および着床痕数

解剖時に卵巣を摘出して実体顕微鏡により妊娠黄体を計数した。また、子宮は摘出して 10% 硫化アンモニウム溶液で染色し、翌日に着床痕を計数した。

これらの結果から、着床率 [ (着床痕数 / 妊娠黄体数)  $\times$  100] を算出した。

分娩しなかった雌で着床痕がみられなかった場合は

不妊とした。

## 5) 児動物の観察・検査

### (1) 数、性、外表および一般状態の観察

出生時（哺育 0 日）に、産児（生存児・死亡児）の計数、性別確認および外表観察を行った。その後、哺育 4 日まで毎日、一般状態観察と児動物数の確認を行った。

これらの結果から、分娩率〔（産児数／着床痕数）×100〕・出生率〔（哺育 0 日の生存児数／着床痕数）×100〕・哺育 0 日の生存率〔（哺育 0 日の生存児数／産児数）×100〕・哺育 4 日の生存率〔（哺育 4 日の生存児数／哺育 0 日の生存児数）×100〕および性比（雄の児数／雌雄の児数）を算出した。

### (2) 体重

哺育 0 日と哺育 4 日に、母動物（腹）毎に雌雄単位でまとめた体重を測定し、児動物 1 匹あたりの平均値を算出した。

### (3) 剖検

全ての児動物を剖検した。哺育 4 日まで生存した児動物は、エーテル麻酔下で開腹後、腹大動脈切断により放血死させた。死亡児は死亡発見日に剖検した。

## 6. 統計解析

交尾率・受胎率・出産率および尿検査と病理組織学検査で得られた数値データは、対照群と各投与群間で  $\chi^2$  検定を行った。

その他の検査で得られた数値データは、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。回復動物における数値データは、まず、F 検定を行い、分布の違いが認められなかった場合は Student の  $t$  検定を、分布の違いが認められた場合は Aspin-Welch の  $t$  検定を用いて統計処理を行った。

各検定は 5% および 1% の有意水準で両側検定を行った。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### (1) 一般状態

雌雄の一般状態に投与の影響は認められなかった。

100 mg/kg 群の雌 1 例に局所性の脱毛が観察されたが、1 例にみられた軽微な変化であることから投与の影響と判断しなかった。

### 2) 行動機能観察

#### (1) 詳細観察

雌雄の行動機能に関する詳細観察結果に投与の影響は認められなかった。

#### (2) 反応性検査

雌雄の反応性に投与の影響は認められなかった。

#### (3) 握力 (Table 1)

雌雄の握力に投与の影響は認められなかった。

#### (4) 自発運動量 (Table 2)

雌雄の自発運動量に投与の影響は認められなかった。

### 3) 体重 (Fig. 1~3)

雌雄の体重に投与の影響は認められなかった。

### 4) 摂餌量 (Fig. 4~6)

回復期間に 100 mg/kg 群のサテライト雌で摂餌量の増加が認められた。

雄および雌の 10 mg/kg 群と 30 mg/kg 群の摂餌量に投与の影響は認められなかった。

### 5) 尿検査 (Table 3)

雌雄の尿検査結果に投与の影響は認められなかった。

### 6) 血液学検査 (Table 4)

雌雄の血液学検査結果に投与の影響は認められなかった。

回復期間終了時の検査で 100 mg/kg 群のサテライト雌に MCV の減少がみられたが、投与期間終了時の検査ではみられなかった軽微な変化であることから投与の影響と判断しなかった。

### 7) 血液生化学検査 (Table 5)

雌雄の血液生化学検査結果に投与の影響は認められなかった。

30 mg/kg 群の雄にアルブミン、A/G 比およびクロールの減少とクレアチニンの増加がみられたが、100 mg/kg 群にはみられず、投与量に対応していないことから投与の影響と判断しなかった。

### 8) 病理学検査

#### (1) 剖検所見

雌雄ともに肉眼病変は観察されなかった。

#### (2) 器官重量 (Table 6)

100 mg/kg 群の雌に肝臓の相対重量の増加が認められた。回復期間終了時の検査では 100 mg/kg 群のサテライト雌に肝臓の絶対重量の増加が認められた。

雄および 10 mg/kg 群と 30 mg/kg 群の雌の器官重量に投与の影響は認められなかった。

雄では 10 mg/kg 群に精巣と精巣上体の相対重量の減

少がみられ、30 mg/kg 群に精巣上体の相対重量の減少がみられたが、これらの所見は 100 mg/kg 群にはみられず、投与量に対応していないことから投与の影響と判断しなかった。

### (3) 病理組織学検査 (Table 7)

雌雄の病理組織学検査結果に投与の影響を示唆する病変は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 性周期 (Table 8)

性周期に投与の影響は認められなかった。

### 2) 交配成績 (Table 8)

交尾率、交尾所要日数および受胎率に投与の影響は認められなかった。

100 mg/kg 群の 1 例は 14 日間の交配期間中に交尾が成立しなかった。また、30 mg/kg 群の 1 例は妊娠 25 日相当日になっても分娩がみられなかったため、その翌日に解剖した結果、妊娠黄体と着床痕が認められなかったことから不妊動物とした。これらの 2 例には性周期の異常や卵巣病変はなく、交配相手の雄の精巣・精巣上体等にも異常病変はないことから不妊は偶発的な結果であると判断した。

### 3) 妊娠および分娩 (Table 8, 9)

妊娠中および分娩中の母動物の状態、妊娠期間および出産率に投与の影響は認められなかった。

### 4) 妊娠黄体数および着床痕数 (Table 9)

妊娠黄体数、着床痕数および着床率に投与の影響は認められなかった。

### 5) 児動物および哺育 (Table 9)

#### (1) 出生日

産児数、分娩率、生存児数、出生率、生存率、性比および体重に投与の影響は認められなかった。また、投与の影響が示唆される外表異常は認められなかった。

#### (2) 哺育期間

母動物の哺育状況、児の一般状態、哺育 4 日の生存児数、生存率、性比および体重に投与の影響は認められなかった。

100 mg/kg 群で 1 腹（母動物）の全児が一時的な瘦削を呈したが、哺育 4 日までに回復したことから投与の影響と判断しなかった。

#### (3) 剖検

投与の影響が示唆される肉眼所見は児動物には認められなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

アニリンおよびその誘導体には、メトヘモグロ빈を生成させて貧血を誘発する化合物がある<sup>1)</sup>。2-クロロ-4-ニトロアニリンは、14 日間の用量設定試験（投与量：30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg, 1000 mg/kg）で溶血性貧血を示唆する所見が認められた。網赤血球比の増加が雄では 300 mg/kg から、雌では 100 mg/kg からみられ、赤血球数とヘモグロ빈濃度の減少および総ビリルビン<sup>2)</sup>の増加が雄では 1000 mg/kg、雌では 300 mg/kg から認められた。メトヘモグロ빈血症を疑う蒼白などの状態異常は観察されなかった。雌の 100 mg/kg でみられた網赤血球比の増加は、本試験の高用量群である 100 mg/kg 群では認められず、溶血性貧血を示唆する所見は雌雄ともに観察されなかった。本試験では妊娠・出産した雌を検査していることから、これによる生理的な貧血状態により対照群を含めて網赤血球比が高くなり、また、個体差も大きいために網赤血球比の増加が検出しにくくなった結果と考える。このように 2-クロロ-4-ニトロアニリンの 100 mg/kg の用量は、本試験では有害影響を示さなかったが、用量設定試験の結果から、その毒性について十分に考慮すべき用量であると考えられる。

雌の 100 mg/kg 群に肝臓重量の増加が認められた。ただし投与期間終了時は相対重量のみ、回復期間終了時は絶対重量のみの増加であり、両所見ともに軽微な変化であった。また、血液生化学検査や病理組織学検査で肝臓の重量増加を示唆する変化は認められなかった。肝臓重量の増加は、用量設定試験では雌雄ともに 100 mg/kg から認められ、肝臓の薬物代謝酵素誘導が示唆される血中の総コレステロールの増加<sup>2)</sup>を伴っていた。薬物代謝酵素誘導作用は適応性の変化と考えられる<sup>3)</sup>。以上の結果から、本試験の雌の 100 mg/kg 群にみられた肝臓重量の増加は、NOAEL の根拠となる有害影響とは判断しなかった。

100 mg/kg 群のサテライト雌で回復期間の摂餌量が対照群よりも高値で推移したが、この理由については不明であった。この変化は投与期間の雌雄にはみられなかったことから投与の影響と判断しなかった。

以上のように、2-クロロ-4-ニトロアニリンは、用量設定試験の結果も考慮して赤血球と肝臓に影響を及ぼす化合物であると考えられる。

### 2. 生殖発生毒性

アニリンおよびその誘導体の生殖・発生毒性試験で、メトヘモグロ빈血症が生じる投与量でも親動物の生殖・発生に及ぼす強い影響はみられないとの報告がある。一方、4-クロロ-3-ニトロアニリンの高用量投与ではラットに精巣萎縮がみられ、4-ニトロアニリン、2-ニトロアニリン、2,4-ジニトロアニリンの高用量投与では胚・胎児の死亡がみられるとの報告もある<sup>1)</sup>。本試験では、雌雄親動物の生殖および児動物の発生・発育に投与の影響は認められなかった。また、用量設定試験で精巣の病理

組織学検査を追加実施したが、投与の影響を示唆する病変は認められなかった。

### 3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

反復投与毒性に関して、雄では 100 mg/kg の用量で投与の影響は認められなかった。また、雌では 100 mg/kg の用量で肝臓重量の増加がみられたことから、これを NOEL 決定のエンドポイントとした。生殖発生毒性に関しては、100 mg/kg の用量で雌雄親動物および児動物への影響は認められなかった。

したがって、本試験における 2-クロロ-4-ニトロアニリンの NOEL は、反復投与毒性に関しては雄では 100 mg/kg/day、雌では 30 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては 100 mg/kg/day であると結論される。

### 4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

反復投与毒性に関して、雌雄ともに 100 mg/kg の用量で有害影響は認められなかった。生殖発生毒性に関しても、100 mg/kg の用量で雌雄親動物および児動物への有害影響は認められなかった。

したがって、本試験における 2-クロロ-4-ニトロアニリンの NOAEL は、反復投与毒性に関しては雌雄ともに 100 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しても 100 mg/kg/day であると結論される。

## 文献

- 1) EPA. Environmental Protection Agency. 1988. Testing consent orders on aniline and seven substituted anilines. Federal Register 53: 31804-31813
- 2) Kiyosawa N, Tanaka K, Hirao J. 2004. Molecular mechanism investigation of Phenobarbital-induced serum cholesterol elevation in rat livers by microarray analysis. Arch Toxicol 78:435-442
- 3) Popp JA, Cattley RC. 1991. Hepatobiliary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (Hszech WM, Rousseaux CG, eds). San Diego, CA: Academic Press, 279-314.

## 連絡先

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

〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445

Tel 0463-82-3911 Fax 0463-82-3860

## Correspondence

Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety and Health Association

2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015, Japan

Tel +81-0463-82-3911 Fax +81-0463-82-3860

本報告書は、平成 20 年度ハザードデータ評価委員会（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）で評価後、修正・加筆された。



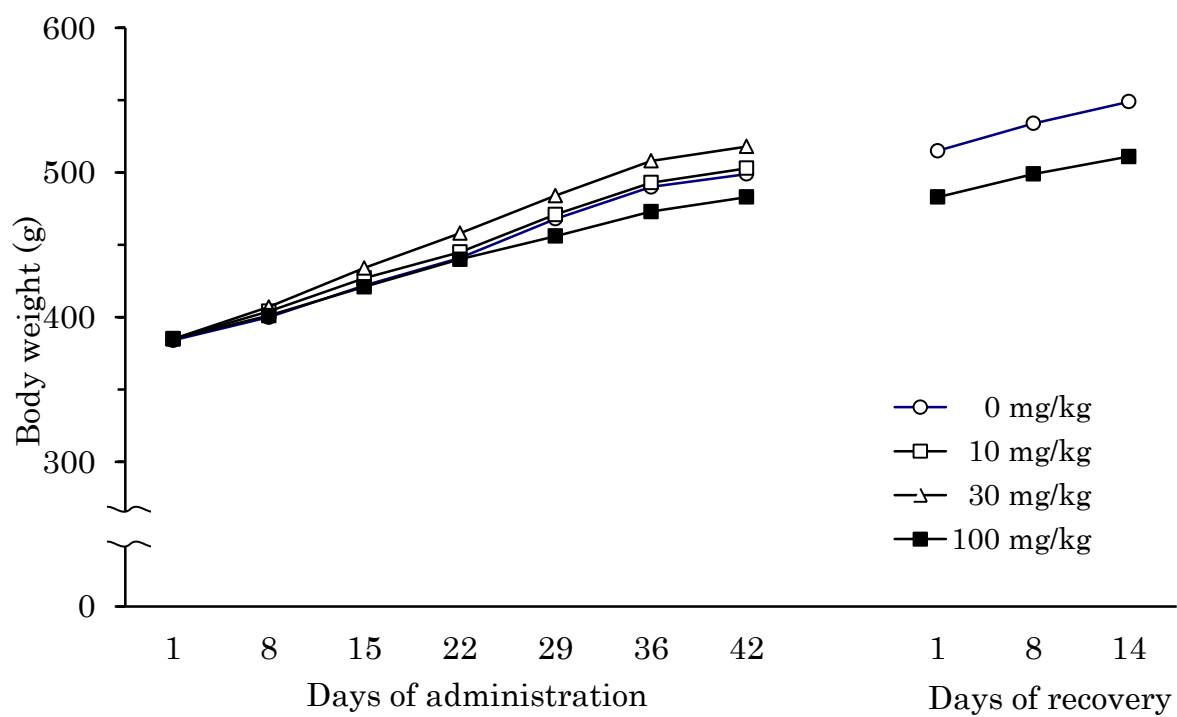


Figure 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

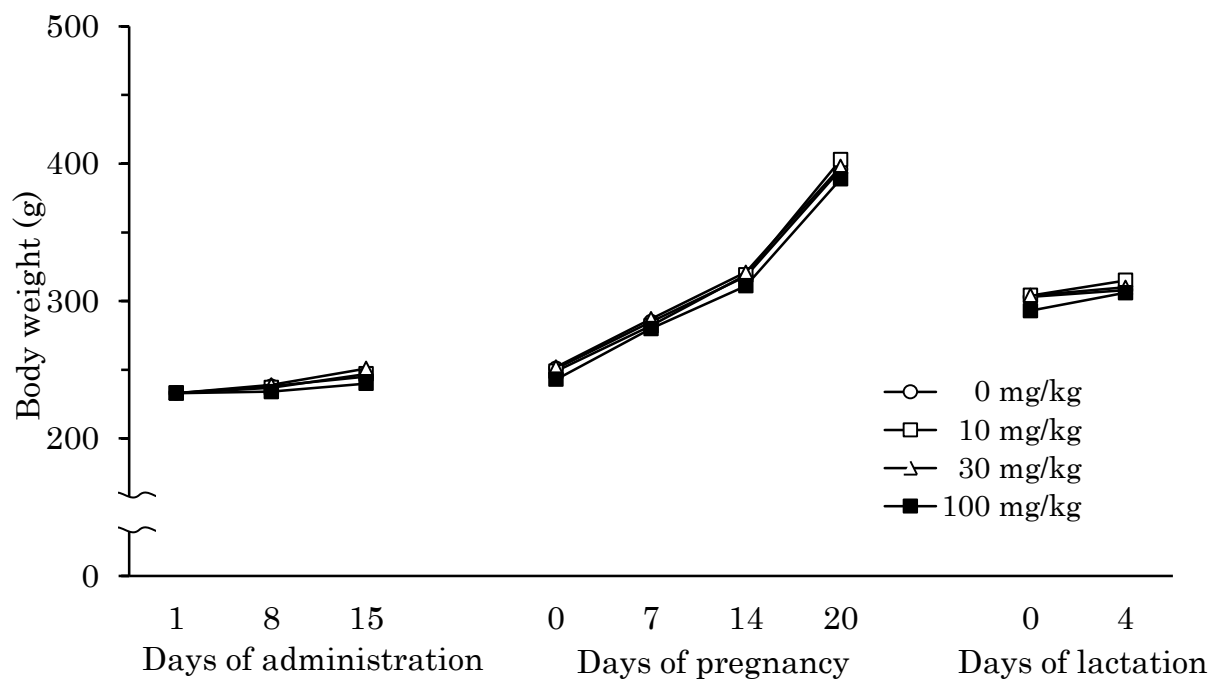


Figure 2 Body weight changes of female rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

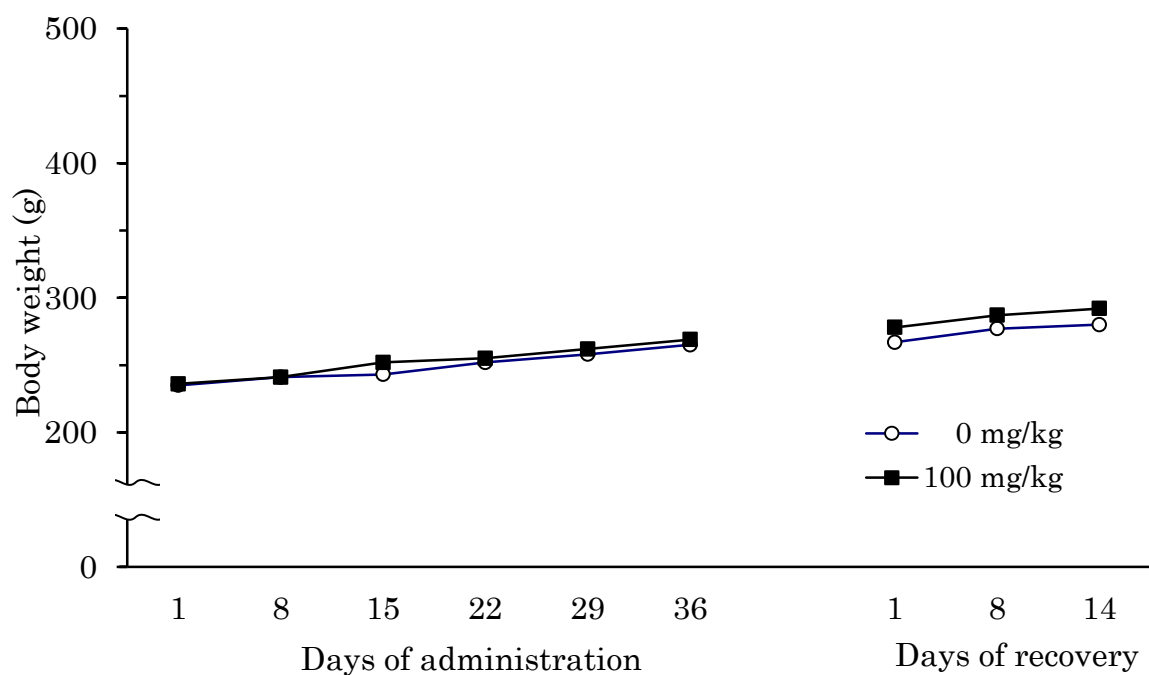


Figure 3 Body weight changes of satellite female rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

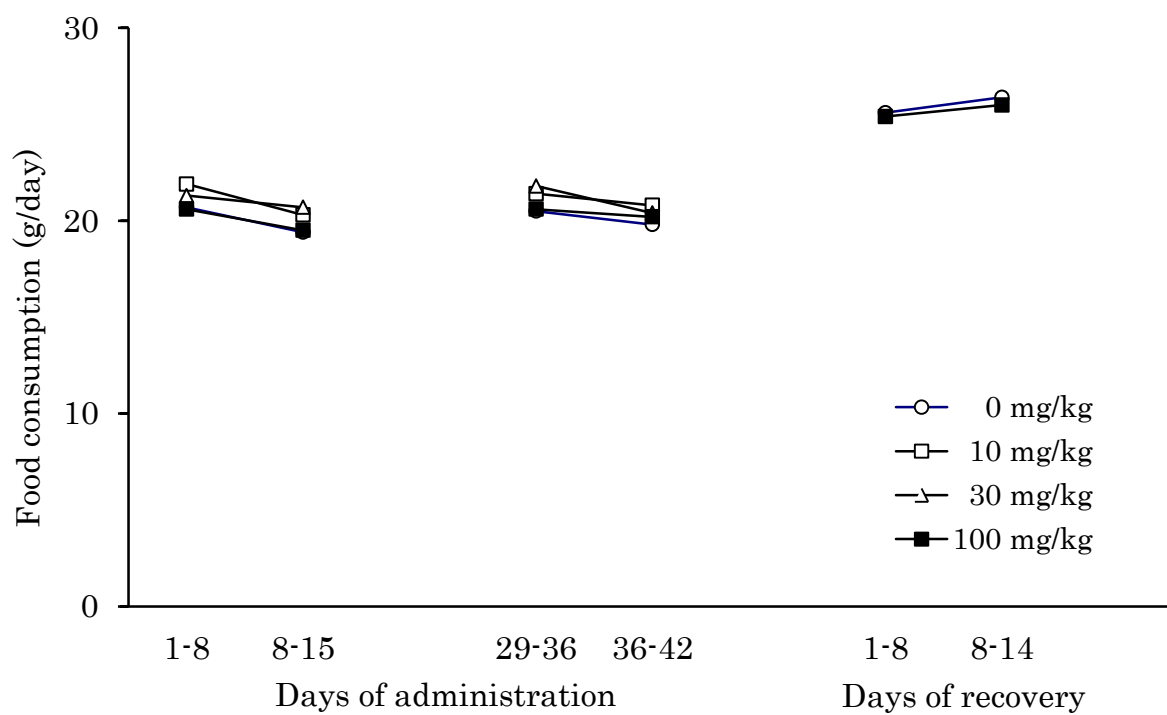


Figure 4 Food consumption changes of male rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

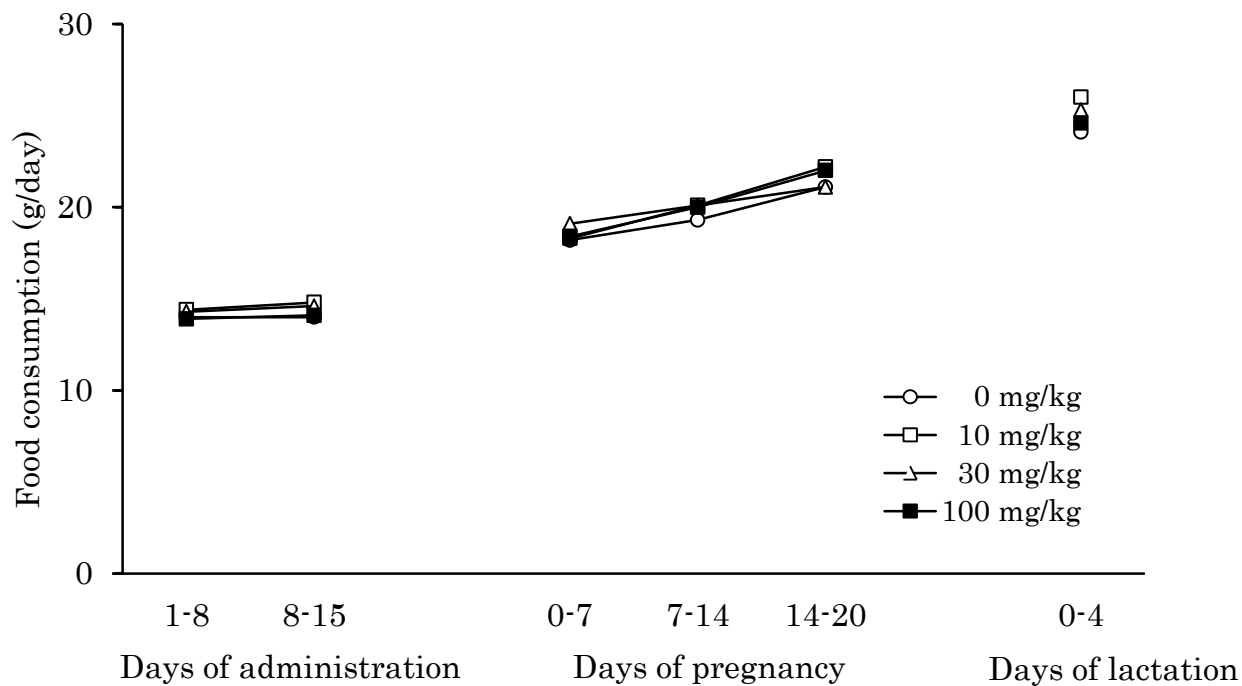


Figure 5 Food consumption changes of female rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

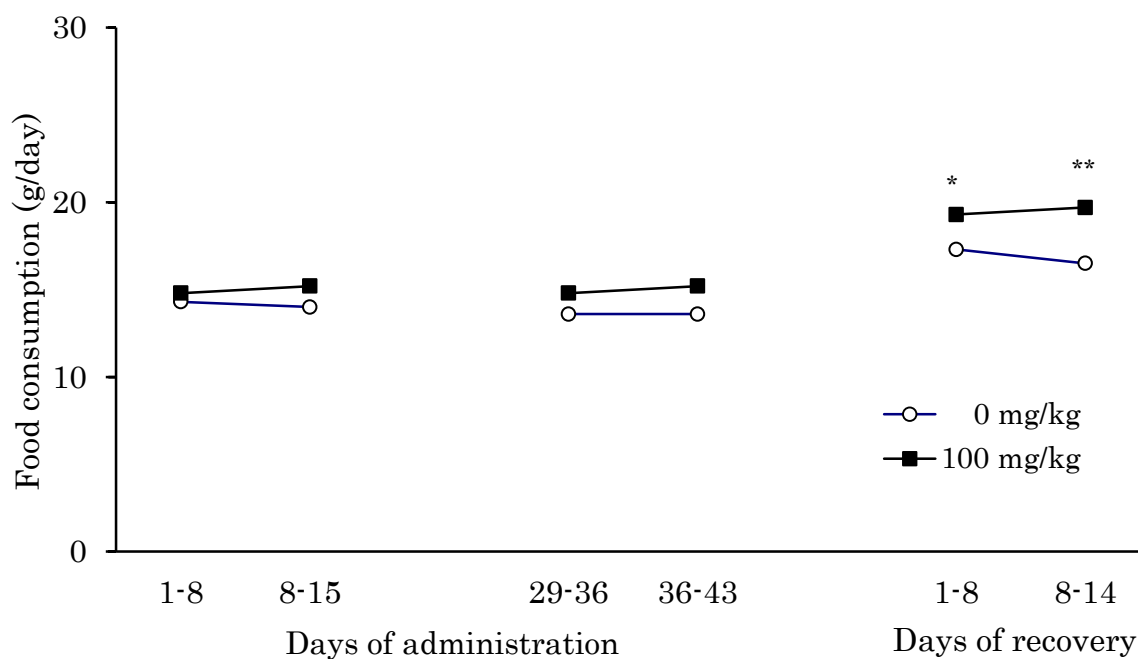


Figure 6 Food consumption changes of satellite female rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test  
Significant difference from the control group, \*  $p \leq 0.05$  and \*\*  $p \leq 0.01$ .

Table 1 Grip strength of rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	10	30	100
Male				
No. of animals examined	12	12	12	12
Forelimb grip strength (g)	549 $\pm$ 93	494 $\pm$ 81	501 $\pm$ 99	503 $\pm$ 77
Hindlimb grip strength (g)	159 $\pm$ 36	143 $\pm$ 30	153 $\pm$ 33	142 $\pm$ 19
Female (dam)				
No. of animals examined	5	5	5	5
Forelimb grip strength (g)	315 $\pm$ 32	350 $\pm$ 107	303 $\pm$ 59	369 $\pm$ 90
Hindlimb grip strength (g)	144 $\pm$ 44	177 $\pm$ 28	132 $\pm$ 32	127 $\pm$ 40

Data represent mean  $\pm$  S.D.

Table 2 Locomotor activity of rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	10	30	100
<b>Male</b>				
No. of animals examined	12	12	12	12
Interval count				
0 – 10 (min)	2550 ± 945	3071 ± 973	2304 ± 1128	2781 ± 647
10 – 20 (min)	1531 ± 869	1951 ± 777	1329 ± 952	1723 ± 683
20 – 30 (min)	1081 ± 632	1449 ± 892	944 ± 781	915 ± 754
30 – 40 (min)	623 ± 537	876 ± 792	814 ± 715	673 ± 835
40 – 50 (min)	607 ± 690	831 ± 735	565 ± 586	510 ± 575
50 – 60 (min)	458 ± 525	848 ± 1053	351 ± 456	665 ± 910
Total count				
0 – 60 (min)	6850 ± 2922	9026 ± 3935	6307 ± 3675	7267 ± 2797
<b>Female (dam)</b>				
No. of animals examined	5	5	5	5
Interval count				
0 – 10 (min)	2004 ± 666	2003 ± 573	2031 ± 1566	1866 ± 1581
10 – 20 (min)	1956 ± 768	652 ± 558	1629 ± 961	679 ± 624
20 – 30 (min)	940 ± 889	679 ± 717	317 ± 492	259 ± 487
30 – 40 (min)	723 ± 676	728 ± 797	55 ± 56	9 ± 4
40 – 50 (min)	736 ± 990	1177 ± 1496	185 ± 279	33 ± 30
50 – 60 (min)	899 ± 858	428 ± 501	453 ± 708	5 ± 5
Total count				
0 – 60 (min)	7257 ± 4082	5667 ± 2327	4670 ± 3264	2850 ± 2166

Data represent mean ± S.D.

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	10	30	100
Male					
No. of animals examined		12	12	12	12
pH	7.5	1	1	0	0
	8.0	0	1	2	2
	8.5	11	10	10	10
Protein	—	0	0	0	0
	±	0	0	0	0
	+	4	3	3	5
	2+	8	9	8	7
	3+	0	0	1	0
Glucose	—	12	12	12	12
Ketone body	—	1	2	2	1
	±	9	6	9	10
	+	2	4	1	1
Bilirubin	—	12	12	12	12
Occult blood	—	12	12	12	12
Urobilinogen	±	12	12	12	12
Satellite female					
No. of animals examined		5	-	-	5
pH	7.5	2	-	-	0
	8.0	1	-	-	2
	8.5	2	-	-	3
Protein	—	0	-	-	0
	±	0	-	-	0
	+	2	-	-	3
	2+	3	-	-	2
Glucose	—	5	-	-	5
Ketone body	—	4	-	-	4
	±	1	-	-	1
Bilirubin	—	5	-	-	5
Occult blood	—	5	-	-	5
Urobilinogen	±	5	-	-	5

Grade: —: negative, ±: trace, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

Table 4 Hematology of rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	10	30	100	0	100
<b>Male</b>						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.45 $\pm$ 0.37	8.48 $\pm$ 0.31	8.48 $\pm$ 0.18	8.40 $\pm$ 0.27	8.56 $\pm$ 0.22	8.34 $\pm$ 0.27
Hemoglobin (g/dL)	15.7 $\pm$ 0.5	15.7 $\pm$ 0.5	15.4 $\pm$ 0.4	15.4 $\pm$ 0.5	15.5 $\pm$ 0.3	15.4 $\pm$ 0.7
Hematocrit (%)	42.8 $\pm$ 1.7	42.4 $\pm$ 1.4	42.2 $\pm$ 1.3	41.8 $\pm$ 1.5	41.4 $\pm$ 0.8	41.0 $\pm$ 1.9
MCV (fL)	50.7 $\pm$ 1.4	50.0 $\pm$ 1.4	49.7 $\pm$ 1.7	49.8 $\pm$ 1.5	48.3 $\pm$ 1.1	49.2 $\pm$ 1.0
MCH (pg)	18.6 $\pm$ 0.5	18.5 $\pm$ 0.4	18.2 $\pm$ 0.5	18.3 $\pm$ 0.5	18.1 $\pm$ 0.2	18.5 $\pm$ 0.4
MCHC (g/dL)	36.6 $\pm$ 0.4	37.1 $\pm$ 0.6	36.6 $\pm$ 0.5	36.8 $\pm$ 0.4	37.5 $\pm$ 0.7	37.6 $\pm$ 0.6
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	999 $\pm$ 89	1031 $\pm$ 100	1051 $\pm$ 110	973 $\pm$ 160	946 $\pm$ 54	1049 $\pm$ 109
Reticulocyte (%)	2.1 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.4
PT (sec)	15.6 $\pm$ 2.7	13.8 $\pm$ 1.5	15.0 $\pm$ 2.0	16.0 $\pm$ 2.3	15.9 $\pm$ 2.3	13.9 $\pm$ 1.7
APTT (sec)	24.3 $\pm$ 1.9	22.2 $\pm$ 2.2	23.3 $\pm$ 1.7	24.8 $\pm$ 2.8	24.3 $\pm$ 2.3	22.1 $\pm$ 2.1
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	13.26 $\pm$ 5.19	12.23 $\pm$ 1.87	13.66 $\pm$ 3.98	13.40 $\pm$ 3.65	9.27 $\pm$ 3.78	8.97 $\pm$ 1.00
Differential WBC (%)						
Neutrophil, band	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0
Neutrophil, segment	16 $\pm$ 6	17 $\pm$ 5	17 $\pm$ 5	15 $\pm$ 7	13 $\pm$ 3	17 $\pm$ 5
Eosinophil	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
Lymphocyte	79 $\pm$ 6	79 $\pm$ 5	78 $\pm$ 6	80 $\pm$ 8	81 $\pm$ 4	76 $\pm$ 5
Others	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
<b>Female (dam)</b>						
No. of animals examined	12	12	11	11	5	5
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6.60 $\pm$ 0.28	6.46 $\pm$ 0.34	6.14 $\pm$ 0.92	6.62 $\pm$ 0.28	7.99 $\pm$ 0.21	8.01 $\pm$ 0.16
Hemoglobin (g/dL)	13.0 $\pm$ 0.4	12.8 $\pm$ 0.3	12.4 $\pm$ 1.4	12.9 $\pm$ 0.5	15.7 $\pm$ 0.8	15.2 $\pm$ 0.4
Hematocrit (%)	35.3 $\pm$ 1.2	34.9 $\pm$ 0.9	34.3 $\pm$ 3.4	35.3 $\pm$ 1.3	40.9 $\pm$ 1.8	39.4 $\pm$ 1.0
MCV (fL)	53.5 $\pm$ 1.9	54.0 $\pm$ 2.0	56.5 $\pm$ 5.1	53.3 $\pm$ 1.8	51.2 $\pm$ 1.3	49.2 $\pm$ 0.9 *
MCH (pg)	19.7 $\pm$ 0.6	19.8 $\pm$ 0.7	20.4 $\pm$ 1.4	19.5 $\pm$ 0.7	19.6 $\pm$ 0.6	19.1 $\pm$ 0.4
MCHC (g/dL)	36.7 $\pm$ 0.4	36.7 $\pm$ 0.3	36.2 $\pm$ 1.0	36.6 $\pm$ 0.6	38.4 $\pm$ 0.8	38.7 $\pm$ 0.2
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1285 $\pm$ 182	1309 $\pm$ 147	1375 $\pm$ 185	1325 $\pm$ 223	1151 $\pm$ 111	1089 $\pm$ 114
Reticulocyte (%)	7.0 $\pm$ 1.6	7.0 $\pm$ 1.7	9.1 $\pm$ 4.7	7.4 $\pm$ 1.7	1.7 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.3
PT (sec)	12.5 $\pm$ 0.3	12.3 $\pm$ 0.4	12.5 $\pm$ 0.5	12.2 $\pm$ 0.3	11.2 $\pm$ 0.6	11.4 $\pm$ 0.7
APTT (sec)	18.2 $\pm$ 2.1	17.3 $\pm$ 2.0	18.5 $\pm$ 0.5	17.0 $\pm$ 1.6	18.1 $\pm$ 0.9	22.6 $\pm$ 5.3
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	12.96 $\pm$ 4.53	10.29 $\pm$ 2.55	13.40 $\pm$ 3.38	11.72 $\pm$ 4.10	5.19 $\pm$ 1.54	6.58 $\pm$ 1.72
Differential WBC (%)						
Neutrophil, band	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0
Neutrophil, segment	30 $\pm$ 6	28 $\pm$ 11	29 $\pm$ 7	32 $\pm$ 11	16 $\pm$ 8	17 $\pm$ 5
Eosinophil	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
Lymphocyte	64 $\pm$ 7	65 $\pm$ 11	65 $\pm$ 7	61 $\pm$ 11	78 $\pm$ 8	75 $\pm$ 7
Others	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1

Data represent mean  $\pm$  S.D.

Significant difference from the control group, \*  $p \leq 0.05$ .



Table 5 Biochemistry of rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	10	30	100	0	100
<b>Male</b>						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
Total protein (g/dL)	6.0 ± 0.1	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.3	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.1 *	3.6 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.5 ± 0.2
A/G ratio	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1 **	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.1
Total bilirubin (mg/dL)	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	170 ± 18	173 ± 21	186 ± 29	183 ± 23	167 ± 14	153 ± 15
Total cholesterol (mg/dL)	50 ± 8	61 ± 9	55 ± 11	59 ± 7	57 ± 10	61 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	44 ± 18	35 ± 16	37 ± 14	43 ± 20	45 ± 13	64 ± 48
Phospholipid (mg/dL)	87 ± 7	102 ± 13	92 ± 15	101 ± 9	93 ± 10	103 ± 18
AST (IU/L)	64 ± 9	60 ± 7	71 ± 24	61 ± 5	68 ± 9	66 ± 7
ALT (IU/L)	28 ± 5	23 ± 3	30 ± 16	24 ± 3	27 ± 5	28 ± 5
LDH (IU/L)	116 ± 33	124 ± 74	115 ± 28	98 ± 35	203 ± 59	179 ± 64
ALP (IU/L)	227 ± 37	261 ± 40	232 ± 30	218 ± 36	202 ± 50	242 ± 54
γ-GTP (IU/L)	2 ± 0	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 1
CK (IU/L)	82 ± 12	79 ± 18	82 ± 13	72 ± 12	121 ± 22	101 ± 14
BUN (mg/dL)	10.9 ± 1.5	11.9 ± 1.4	11.0 ± 1.4	10.7 ± 1.2	13.7 ± 0.8	12.6 ± 1.6
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1 *	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Na (mEq/L)	145 ± 1	145 ± 1	144 ± 1	144 ± 1	144 ± 1	144 ± 2
K (mEq/L)	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.4	3.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.1
Cl (mEq/L)	108 ± 1	108 ± 1	106 ± 1 *	106 ± 1	107 ± 2	108 ± 2
Ca (mg/dL)	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.2	9.9 ± 0.2	9.9 ± 0.3
IP (mg/dL)	6.4 ± 0.4	6.8 ± 0.3	6.9 ± 0.7	6.9 ± 0.4	5.7 ± 0.3	5.6 ± 0.5
<b>Female (dam)</b>						
No. of animals examined	12	12	11	11	5	5
Total protein (g/dL)	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.5	6.1 ± 0.2	6.7 ± 0.3	6.8 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.3	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2
A/G ratio	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1
Total bilirubin (mg/dL)	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	153 ± 12	158 ± 12	153 ± 16	157 ± 14	152 ± 13	149 ± 18
Total cholesterol (mg/dL)	58 ± 12	60 ± 8	58 ± 12	65 ± 12	69 ± 13	76 ± 12
Triglyceride (mg/dL)	69 ± 59	58 ± 21	64 ± 26	51 ± 25	17 ± 7	20 ± 6
Phospholipid (mg/dL)	123 ± 21	125 ± 14	123 ± 23	124 ± 21	129 ± 17	146 ± 24
AST (IU/L)	82 ± 11	83 ± 11	84 ± 9	89 ± 14	78 ± 27	234 ± 368
ALT (IU/L)	49 ± 9	51 ± 13	51 ± 11	62 ± 16	33 ± 12	85 ± 116
LDH (IU/L)	210 ± 91	154 ± 33	164 ± 51	156 ± 39	166 ± 67	406 ± 603
ALP (IU/L)	221 ± 67	214 ± 102	215 ± 84	215 ± 78	103 ± 35	86 ± 23
γ-GTP (IU/L)	1 ± 0	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
CK (IU/L)	99 ± 35	78 ± 12	79 ± 14	78 ± 12	92 ± 40	86 ± 22
BUN (mg/dL)	21.6 ± 3.2	23.3 ± 2.9	22.7 ± 2.6	26.5 ± 8.3	17.4 ± 2.0	16.0 ± 2.0
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
Na (mEq/L)	144 ± 1	144 ± 1	144 ± 1	143 ± 1	143 ± 0	143 ± 1
K (mEq/L)	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.4	3.4 ± 0.5	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.1	3.2 ± 0.2
Cl (mEq/L)	106 ± 1	106 ± 2	107 ± 2	105 ± 2	108 ± 1	108 ± 1
Ca (mg/dL)	10.8 ± 0.3	10.9 ± 0.3	10.6 ± 0.7	10.9 ± 0.3	9.9 ± 0.2	10.0 ± 0.3
IP (mg/dL)	7.6 ± 1.0	8.6 ± 0.9	8.0 ± 1.0	8.2 ± 0.9	3.2 ± 0.7	3.3 ± 0.6

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, \*  $p \leq 0.05$  and \*\*  $p \leq 0.01$ .

Table 6 Organ weights of rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	10	30	100	0	100
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
Body weight (g)	462 ± 28	481 ± 36	494 ± 38	457 ± 30	518 ± 48	485 ± 54
Thymus (g)	0.402 ± 0.052	0.418 ± 0.083	0.447 ± 0.090	0.408 ± 0.146	0.418 ± 0.100	0.422 ± 0.115
(%)	0.087 ± 0.011	0.087 ± 0.015	0.090 ± 0.014	0.089 ± 0.031	0.080 ± 0.012	0.086 ± 0.016
Adrenals (g)	0.066 ± 0.008	0.065 ± 0.011	0.061 ± 0.007	0.066 ± 0.009	0.067 ± 0.008	0.065 ± 0.010
(%)	0.014 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.015 ± 0.003	0.013 ± 0.001	0.014 ± 0.002
Heart (g)	1.449 ± 0.135	1.452 ± 0.149	1.489 ± 0.106	1.400 ± 0.069	1.483 ± 0.127	1.424 ± 0.167
(%)	0.313 ± 0.019	0.302 ± 0.019	0.302 ± 0.020	0.307 ± 0.012	0.287 ± 0.015	0.294 ± 0.020
Kidneys (g)	2.923 ± 0.170	2.972 ± 0.341	2.979 ± 0.188	2.988 ± 0.195	3.332 ± 0.323	2.952 ± 0.210
(%)	0.634 ± 0.045	0.618 ± 0.055	0.604 ± 0.030	0.655 ± 0.040	0.643 ± 0.022	0.614 ± 0.069
Spleen (g)	0.690 ± 0.133	0.677 ± 0.087	0.728 ± 0.147	0.653 ± 0.094	0.763 ± 0.147	0.689 ± 0.083
(%)	0.149 ± 0.022	0.141 ± 0.014	0.147 ± 0.024	0.143 ± 0.015	0.147 ± 0.019	0.143 ± 0.017
Liver (g)	11.99 ± 1.610	12.841 ± 2.148	13.106 ± 1.521	12.719 ± 1.541	13.476 ± 2.761	12.597 ± 2.052
(%)	2.590 ± 0.209	2.657 ± 0.252	2.648 ± 0.169	2.782 ± 0.283	2.581 ± 0.277	2.586 ± 0.165
Brain (g)	2.081 ± 0.078	2.081 ± 0.098	2.110 ± 0.088	2.102 ± 0.096	2.180 ± 0.093	2.100 ± 0.057
(%)	0.452 ± 0.028	0.435 ± 0.032	0.429 ± 0.037	0.461 ± 0.027	0.424 ± 0.043	0.436 ± 0.039
Testes (g)	3.451 ± 0.297	3.069 ± 0.454	3.341 ± 0.286	3.554 ± 0.300	3.313 ± 0.312	3.238 ± 0.281
(%)	0.749 ± 0.070	0.643 ± 0.110 *	0.679 ± 0.070	0.781 ± 0.088	0.640 ± 0.036	0.669 ± 0.032
Epididymides (g)	1.268 ± 0.126	1.147 ± 0.154	1.184 ± 0.085	1.201 ± 0.067	1.232 ± 0.101	1.215 ± 0.070
(%)	0.275 ± 0.024	0.240 ± 0.035 *	0.241 ± 0.021 *	0.264 ± 0.028	0.238 ± 0.015	0.252 ± 0.023
Female (dam)						
No. of animals examined	12	12	11	11	Satellite female 5	5
Body weight (g)	293 ± 16	292 ± 19	292 ± 22	283 ± 25	260 ± 14	271 ± 9
Thymus (g)	0.240 ± 0.067	0.233 ± 0.076	0.243 ± 0.070	0.227 ± 0.091	0.295 ± 0.080	0.334 ± 0.080
(%)	0.081 ± 0.019	0.079 ± 0.023	0.082 ± 0.021	0.079 ± 0.030	0.113 ± 0.028	0.123 ± 0.029
Adrenals (g)	0.072 ± 0.011	0.077 ± 0.009	0.073 ± 0.009	0.074 ± 0.011	0.074 ± 0.008	0.081 ± 0.010
(%)	0.025 ± 0.004	0.027 ± 0.003	0.025 ± 0.002	0.026 ± 0.005	0.028 ± 0.003	0.030 ± 0.004
Heart (g)	1.007 ± 0.084	1.006 ± 0.092	1.032 ± 0.097	0.960 ± 0.118	0.896 ± 0.089	0.896 ± 0.039
(%)	0.344 ± 0.024	0.345 ± 0.031	0.354 ± 0.034	0.339 ± 0.026	0.345 ± 0.030	0.330 ± 0.013
Kidneys (g)	1.775 ± 0.150	1.846 ± 0.147	1.906 ± 0.198	1.839 ± 0.187	1.635 ± 0.135	1.834 ± 0.181
(%)	0.606 ± 0.038	0.633 ± 0.044	0.652 ± 0.046	0.652 ± 0.065	0.628 ± 0.030	0.676 ± 0.062
Spleen (g)	0.669 ± 0.105	0.623 ± 0.101	0.775 ± 0.283	0.633 ± 0.156	0.453 ± 0.038	0.462 ± 0.041
(%)	0.229 ± 0.035	0.213 ± 0.028	0.264 ± 0.089	0.222 ± 0.044	0.174 ± 0.014	0.171 ± 0.019
Liver (g)	9.888 ± 0.612	10.324 ± 0.785	10.189 ± 0.669	10.535 ± 1.134	6.544 ± 0.231	7.193 ± 0.456 *
(%)	3.381 ± 0.174	3.541 ± 0.231	3.494 ± 0.198	3.716 ± 0.168 **	2.520 ± 0.098	2.650 ± 0.132
Brain (g)	1.930 ± 0.059	1.956 ± 0.067	1.915 ± 0.065	1.919 ± 0.065	1.941 ± 0.109	1.942 ± 0.063
(%)	0.661 ± 0.029	0.672 ± 0.046	0.658 ± 0.052	0.682 ± 0.062	0.747 ± 0.032	0.716 ± 0.038

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, \*  $p \leq 0.05$  and \*\*  $p \leq 0.01$ .

Table 7 Histopathological findings of rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		Male						Female					
		At the end of administration period				At the end of recovery period		At the end of administration period				At the end of recovery period	
		0	10	30	100	0	100	0	10	30	100	0	100
No. of animals examined		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
(Liver)	(Grade)												
vacuolic change: central	2+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
vacuolic change: peripheral	+	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
necrosis: focal	+	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
(Heart)													
inflammatory cell nest	+	1	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1
(Spleen)													
deposit of hemosiderin	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
(Thyroid)													
ultimobranchial body remanet	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
(Pituitary)													
Rathke pouch	+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
No. of animals examined		<7>	<12>	<12>	<7>	<5>	<5>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>
(Testis)													
tubular atrophy	+	0	1	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
	3+	0	1	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
(Epididymis)													
debris of spermatic elements	+	0	2	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
(Prostate)													
inflammation	+	2	3	5	3	3	0	—	—	—	—	—	—
	2+	0	2	1	0	1	1	—	—	—	—	—	—

Grade; +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

Table 8 Estrous cycle and reproductive performance of rats treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	10	30	100
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Normal <sup>1), 3)</sup>	12	12	12	12
Abnormal <sup>1)</sup>	0	0	0	0
Cycles (days) <sup>2)</sup>	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.4	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1
Reproductive performance				
No. of mated pairs	12	12	12	12
No. of copulated pairs	12	12	12	11
Copulation index (%)	100	100	100	91.7
No. of pregnant females	12	12	11	11
Fertility index (%)	100	100	91.7	100
Pairing days until copulation <sup>2)</sup>	2.6 ± 1.2	2.3 ± 1.3	1.8 ± 0.9	2.0 ± 1.3
Parturition and nursing <sup>1)</sup>				
No abnormalities detected	12	12	11	11

<sup>1)</sup> Data represent the number of animals.

<sup>2)</sup> Data represent mean ± S.D.

<sup>3)</sup> 4 to 6 days cycle

Copulation index = (No. of copulated pairs / No. of mated pairs) × 100.

Fertility index = (No. of pregnant females / No. of copulated pairs) × 100.

Table 9 Summary of development of pups from dams treated orally with 2-chloro-4-nitroaniline in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		10		30		100	
No. of pregnant females	12		12		11		11	
No. of pregnant females with live pups	12		12		11		11	
Gestation index (%)	100		100		100		100	
Gestation length (days)	22.0 ± 0.0	(12)	21.9 ± 0.3	(12)	22.0 ± 0.0	(11)	21.8 ± 0.4	(11)
No. of corpora lutea	15.3 ± 1.4	(12)	15.9 ± 0.9	(12)	14.7 ± 0.9	(11)	15.0 ± 1.5	(11)
No. of implantations	14.6 ± 1.4	(12)	15.5 ± 1.2	(12)	14.1 ± 0.9	(11)	14.6 ± 1.6	(11)
Implantation index (%)	95.2 ± 4.8	(12)	97.3 ± 4.1	(12)	95.8 ± 5.4	(11)	97.5 ± 3.5	(11)
No. of pups born	13.4 ± 1.7	(12)	14.7 ± 1.2	(12)	13.3 ± 1.2	(11)	14.0 ± 1.4	(11)
Delivery index (%)	92.2 ± 9.0	(12)	94.7 ± 5.1	(12)	94.2 ± 5.2	(11)	95.8 ± 5.0	(11)
Day 0 of lactation								
No. of live pups	13.3 ± 1.5	(12)	14.6 ± 1.1	(12)	13.3 ± 1.2	(11)	13.9 ± 1.4	(11)
Birth index (%)	91.7 ± 8.7	(12)	94.3 ± 5.9	(12)	94.2 ± 5.2	(11)	95.2 ± 5.7	(11)
Live birth index (%)	99.5 ± 1.7	(12)	99.5 ± 1.8	(12)	100.0 ± 0.0	(11)	99.4 ± 2.1	(11)
Pups weight (g)								
Male	6.8 ± 0.4	(12)	6.7 ± 0.5	(12)	6.8 ± 0.4	(11)	6.5 ± 0.5	(11)
Female	6.4 ± 0.3	(12)	6.4 ± 0.5	(12)	6.3 ± 0.5	(11)	6.1 ± 0.5	(11)
Day 4 of lactation								
No. of live pups	13.3 ± 1.5	(12)	14.6 ± 1.1	(12)	13.2 ± 1.3	(11)	13.7 ± 1.4	(11)
Viability index (%)	99.4 ± 2.2	(12)	100.0 ± 0.0	(12)	99.3 ± 2.3	(11)	98.8 ± 4.0	(11)
Pups weight (g)								
Male	10.6 ± 0.8	(12)	10.3 ± 0.9	(12)	10.9 ± 0.8	(11)	9.7 ± 1.5	(11)
Female	10.2 ± 0.9	(12)	9.9 ± 0.9	(12)	10.4 ± 0.9	(11)	9.3 ± 1.4	(11)
Sex ratio on day 0								
Total no. of pups born <sup>1)</sup>	161	(12)	176	(12)	146	(11)	154	(11)
Total no. of male pups born <sup>1)</sup>	73	(12)	73	(12)	75	(11)	81	(11)
Sex ratio of pups <sup>1)</sup>	0.46 ± 0.11	(12)	0.42 ± 0.11	(12)	0.51 ± 0.10	(11)	0.53 ± 0.17	(11)
Total no. of live pups	160	(12)	175	(12)	146	(11)	153	(11)
Total no. of live male pups	73	(12)	73	(12)	75	(11)	81	(11)
Sex ratio of live pups	0.46 ± 0.11	(12)	0.42 ± 0.11	(12)	0.51 ± 0.10	(11)	0.53 ± 0.17	(11)
Sex ratio on day 4								
Total no. of live pups	159	(12)	175	(12)	145	(11)	151	(11)
Total no. of live male pups	73	(12)	73	(12)	74	(11)	79	(11)
Sex ratio of live pups	0.46 ± 0.12	(12)	0.42 ± 0.11	(12)	0.51 ± 0.10	(11)	0.53 ± 0.17	(11)

Data represent mean ± S.D.

Parentheses represent the number of litters examined.

Gestation index = (No. of pregnant females with live pups / No. of pregnant females) × 100.

Implantation index = (No. of implantations / No. of corpora lutea) × 100.

Delivery index = (No. of pups born / No. of implantations) × 100.

Birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of implantations) × 100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of pups born) × 100.

Viability index = (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0) × 100.

Sex ratio = No. of male pups / No. of male and female pups.

<sup>1)</sup> Excepting pups of undetermined sex.