

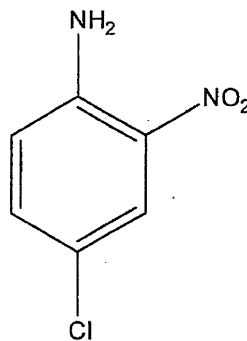
# 4-Chloro-2-nitroaniline

## 4-クロロ-2-ニトロアニリン

[CAS No. 89-63-4]

Molecular formula:  $C_6H_5ClN_2O_2$

Molecular weight: 172.57



### ABSTRACT

#### 1. Material and method

Purity	: 99.9%
Test species/strain	: Rat/CrI:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 10, 60, 300 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 300 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 12 (5 for recovery) ; females, 12; satellite females, 5
Vehicle	: 0.1w/v% Tween 80 + 0.5w/v% Sodium carboxymethylcellulose solution
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 day 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

4-Chloro-2-nitroaniline was studied for oral toxicity in rats in accordance with the OECD guideline on combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test at dosages of 0, 10, 60, and 300 mg/kg/day.

No deaths occurred in any of the treated groups. In the 300 mg/kg group, salivation was noted in both sexes sporadically. Histopathological examination revealed hyaline droplet of proximal tubular epithelium in the kidney in males of the 300 mg/kg group and extramedullary hematopoiesis of erythrocytic in the spleen in females of the 60 mg/kg group and higher. In addition, a decrease in hematocrit value in males of the 60 mg/kg group and higher was noted. Almost all the changes disappeared after a 14-day recovery period.

### Reproductive and developmental toxicity

The compound had no effects on reproductive parameters such as the estrous cycle, mating index, fertility index, number of corpora lutea or implantations, implantation index, delivery index, gestation index, gestation length, or parturition or maternal behavior. On examination of neonates, there were no significant differences in the number of offspring or live offspring, sex ratio, live birth index, or viability index on day 4. No abnormal findings ascribable to the compound were found for external features, clinical signs, body weights or necropsy of the offspring.

## 3. Evaluation

It was concluded from the above results that NOEL and NOAEL for the repeated dose toxicity of 4-Chloro-2-nitroaniline were 10 mg/kg/day for both sexes, and that the NOEL and NOAEL for the reproductive/developmental toxicity were 300 mg/kg/day for parental animals and offspring.

# 4-クロロ-2-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 4-Chloro-2-nitroaniline by Oral Administration in Rats

### 要約

4-クロロ-2-ニトロアニリンは、製造者の化学物質等安全データシート<sup>1)</sup>によればラットの経口投与によるLD<sub>50</sub>値が400 mg/kg、皮膚、眼、粘膜に対して刺激性を有することが報告されている。しかし、反復投与および生殖発生毒性についての知見はない。

4-クロロ-2-ニトロアニリンを10、60および300 mg/kg/dayの用量でSD系ラット（1群雌雄各12匹、雌はサテライト動物として対照群および300 mg/kg群に各5匹を追加）に交配前14日から交配を経て、雄は42日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育4日、雌サテライト動物は雄と同様に42日間までそれぞれ経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。本試験はOECD TG422に従い実施したものである。

### 1. 反復投与毒性

一般毒性学的な主要な変化として、流涎が300 mg/kg群の雌雄で散見された。病理学的検査の結果では、腎臓で近位尿細管上皮の硝子滴が300 mg/kg群の雄、脾臓で髄外造血の亢進が60 mg/kg以上の群の雌で認められた。ヘマトクリット値の低値が60 mg/kg以上の群の雄で認められた。これらの変化は2週間の回復期間により回復した。

### 2. 生殖発生毒性

親動物に対し性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩および哺育行動、新生児に対しては出産児数、出生率、性比、新生児の4日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上のように、4-クロロ-2-ニトロアニリンの本試験条件下における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は次のように判断される。すなわち、反復投与毒性に関するNOELおよびNOAELは、雄動物ではヘマトクリット値の低値が60 mg/kg以上の群、雌動物では脾臓の髄外造血の亢進が60 mg/kg以上の群で認められたことから、雌雄とも10 mg/kg/dayと考えられる。生殖発生毒性に関し、雌雄の親動物およびF1児動物に対するNOELおよびNOAELは、変化が認められなかったことから300 mg/kg/dayと考えられる。

### 方法

#### 1. 被験物質

4-クロロ-2-ニトロアニリン（ロットGJ01、純度99.9%、融点117.2℃、発火点518℃）はエーテル、酢酸に可溶で、メタノールには微溶、水には不溶な橙色結晶性粉末である。被験物質は冷蔵、暗所、密栓容器にて保存し、試験期間中安定であることを確認した。投与液の調製には、被験物質を用量毎に所定量秤量し、媒体（0.1w/v% Tween80 添加 0.5w/v% CMC-Na、Tween80：関東化学、CMC-Na：和光純薬）を加えながら懸濁した。投与液中の被験物質の安定性を、0.1および100 mg/mLの濃度で投与開始前に調製後8日間安定であることを確認した。投与液は投与に供するまで冷蔵・暗所・密栓保存条件下で保存し、調製後8日以内に使用した。また、投与開始前日に投与液中の被験物質濃度が設定濃度±10%以内、C.V.値が10%以内（上層、中層、下層）であることを確認した。

#### 2. 試験動物

日本チャールス・リバー（厚木生産所）から入手した雌雄のSD系ラット（Crj:CD(SD),SPF）を5日間検疫・馴化した。その後も馴化を継続し、一般状態に異常のない動物を試験に供した。投与開始前日に体重層別化無作為抽出法により、1群あたり雌雄各12匹に振り分けた。さらに、雌サテライト動物（回復動物）として対照群および300 mg/kg群に各5匹の雌を追加した。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄314~370g、雌が195~230gであった。検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度22±3℃、相対湿度55±20%、換気約6~20回/時、照明12時間/日（7:00-19:00）に自動調節した飼育室を使用した。動物飼育には、妊娠・哺育期間を除く期間はステンレス製つり下げ式金網製ケージを、妊娠・哺育期間は実験動物用床敷（ベータチップ：日本チャールス・リバー）を敷いたポリカーボネート製ケージを使用した。交配期間は雌雄各1匹、哺育期間は1腹、検疫・馴化期間を含むその他の期間は1匹ずつ収容した。動物には、放射線滅菌した実験動物用固型飼料（CRF-1：オリエンタル酵母工業）と、5μmのフィルタ一濾過後、紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。

#### 3. 投与量および投与方法

被験物質の毒性情報として、ラット経口投与によるLD<sub>50</sub>値が400 mg/kg、皮膚、眼、粘膜に対して刺激性を

有することが報告[1]されている．これを参考に 14 日間反復投与毒性試験の用量を設定し，実験を行った．すなわち被験物質を 0, 10, 30, 100 および 300 mg/kg の用量で，1 群雌雄各 3 匹の SD 系ラットに 14 日間反復経口投与した．その結果，一般状態では着色尿（オレンジ色）が 30 mg/kg 以上の群で散見された．血液生化学検査では総コレステロールの高値が 300 mg/kg 群の雌雄，総ビリルビンおよび総蛋白の高値が同群の雌で認められた．器官重量では肝臓重量の高値が 300 mg/kg 群の雌雄で認められた．その他，体重，摂餌量，血液学検査および剖検所見では被験物質に起因する変化は認められなかった．

これらの結果および本試験の投与期間を考慮し，高用量は明らかな毒性発現が予想される 300 mg/kg とし，以下公比約 5 で減じ中用量は 60 mg/kg，低用量は 10 mg/kg の 3 用量を設定した．また，媒体のみを投与する対照群を設けた．

投与経路は経口とした．投与期間は雄で交配前 14 日間および交配期間を経て剖検前日までの計 42 日間，雌では交配前 14 日間，交配期間，妊娠期間および分娩を経て哺育 4 日までとした．ただし，分娩しなかった雌は剖検前日までとした．なお，雌サテライト動物は交配は行わず雄と同様に 42 日間投与した．また，対照群と 300 mg/kg 群の雄各 5 匹および同群の雌サテライト動物各 5 匹は，投与期間終了後 14 日間の回復期間を設けた．

投与の際はラット用胃ゾンデを用いて 1 日 1 回，午前中に強制経口投与した．投与量は 10 mL/kg とし，至近日に測定した体重に基づいて算出した．

#### 4. 反復投与毒性に関する観察・検査項目

##### 1) 一般状態

全例について，生死，外観，行動等を投与前および投与後に毎日観察した．回復動物は 1 日 1 回午前中に観察した．

##### 2) 行動検査

雌雄全例について，詳細な症状観察（ホームケージ内，ハンドリング時，オープンフィールドでの観察）を，投与開始前日に 1 回，投与期間中は 1 回/週，いずれも午後に行った．雌雄とも各群 5 匹を選抜し，機能検査（刺激に対する反応性，握力）および自発運動の測定を，投与第 6 週の午後に 1 回行った．握力はデジタルフォースゲージ（DPS-5：イマダ），自発運動量には SUPERMEX（室町機械）を用いて測定した．投与期間中の自発運動量の検査において，測定開始 30 分～40 分の運動量が 300 mg/kg 群の雄で対照群と比べ低値を示したため，回復動物の雄について第 8 週に自発運動量を測定した．

##### 3) 体重および摂餌量

雄では第 1, 8, 15, 22, 29, 36, 42 および 43 日，さらに回復動物では第 50 および 56 日に測定した．雌では第 1, 8 および 15 日，交尾した雌は妊娠 0, 7, 14 お

よび 20 日，分娩した雌は哺育 0 および 4 日に測定した．雌サテライト動物は雄と同様の頻度で測定した．摂餌量は，交配期間を除き体重測定日に測定し，各測定日間の 1 匹あたりの 1 日平均摂餌量を算出した．

#### 4) 血液学検査

雄では第 42 日，雄回復動物および雌サテライト動物では第 56 日，雌では哺育 4 日に，全生存動物を 16 時間以上絶食させた．測定対象動物（採血動物）は，雄は 5 例，雄回復動物および雌サテライト動物は全例，雌は分娩日の早い順に 5 例とした．これらの動物は，ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で，後大静脈より採血した．採取した血液を用いて以下に示す項目を測定した．

EDTA-2K により抗凝固処理し，赤血球数（球状化処理二次元レーザー FCM 法），ヘモグロビン濃度（シアメントヘモグロビン法），ヘマトクリット値（球状化処理二次元レーザー FCM 法），網赤血球数（RNA 染色によるレーザー FCM 法），血小板数（球状化処理二次元レーザー FCM 法），白血球数（酸性界面活性剤によるレーザー FCM 法）を多項目自動血球分析装置（ADVIA120：パイエル メディカル），白血球百分率（Wright 染色塗抹標本）を血液細胞自動分析装置（MICROX HEG-50，HEG-50V：オムロン）を用いて測定した．また，検査結果から平均赤血球容積（MCV），平均赤血球色素量（MCH），平均赤血球色素濃度（MCHC）を算出した．血液の一部を 3.2w/v% クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理し，遠心分離して得られた血漿からプロトロンビン時間（PT）および活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）（光散乱検出方式）を血液凝固自動分析装置（CA-510：シスメックス）を用いて測定した．

#### 5) 血液生化学検査

計画解剖日に採取した血液の一部を室温・遮光下で約 30 分間静置後遠心分離し，得られた血清を用いて以下の項目を測定した．

ASAT および ALAT（UV-rate 法（JSCC 改良法））， $\gamma$ -GT（ $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法（SSCC 改良法）），ALP（p-ニトロフェニルリン酸基質法（JSCC 改良法）），総ビリルビン（酵素法（BOD 法）），尿素窒素（酵素-UV 法（Urease-LEDH 法）），クレアチニン（酵素法（Creatininase-POD 法）），グルコース（酵素-UV 法（HK-G6PDH 法）），総コレステロール（酵素法（CO-HMMPS 法）），トリグリセライド（酵素法（GPO-HMMPS 法，グリセリン消去法）），総蛋白（Biuret 法），アルブミン（BCG 法），A/G 比（総蛋白およびアルブミンより算出），カルシウム（OCPC 法），無機リン（酵素法（PNP-XOD-POD 法）），ナトリウム，カリウムおよびクロール（イオン選択電極法）を自動分析装置（TBA-200FR：東芝）を用いて測定した．

## 6) 雄の尿検査

雄について、第40日の投与前に各用量群5匹の新鮮尿を採取し、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血およびウロビリノーゲン（試験紙法、マルティスティックス：パイエル メディカル）を自動尿分析器（クリニテック 100：パイエル メディカル）により測定した。被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため、尿沈渣、蓄積尿を用いた検査、回復動物の尿検査は行わなかった。

## 7) 病理学検査

雌雄全例について、解剖日にペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で、腹大動脈の切断・放血により安楽死させて解剖した。また、分娩しなかった雌は交尾確認後26日に上記方法で安楽死させた後、同様に解剖した。計画解剖動物のうち、血液学検査の対象動物と同じ雌雄5匹（回復・サテライト動物は全例）の脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。ただし、精巣および精巣上体は雄全例について測定した。また、解剖日の体重を基に相対重量（対体重比）を算出した。さらに雌雄全例については上記の器官に加えて、下垂体、リンパ節（下顎・腸間膜）、気管、肺、胃、腸管（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）、甲状腺・上皮小体、膀胱、精のう、前立腺腹葉、卵巣、子宮、膈、骨髓（大腿骨）、坐骨神経、脊髄および肉眼的異常部位を採取し、10v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液で固定後、保存した。病理組織学検査は、対照群と300 mg/kg群の投与後解剖動物のうち、雌雄各5例（血液学検査および器官重量測定対象動物と同様）の上記器官、対照群を含む全動物の肉眼的異常部位および非妊娠雌の卵巣について、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検した。

その結果、300 mg/kg群の投与後解剖動物において、雄の腎臓および雌の脾臓で被験物質に起因する変化が認められた。このため追加検査として、投与後解剖動物では10および60 mg/kg群の雌雄とも上記と同様の各5例を選抜、さらに回復期間終了後解剖動物では対照群および300 mg/kg群の全例について当該器官を検査した。また、300 mg/kg群の雄の腎臓で認められた近位尿細管の硝子滴の性質を確認するため、代表例（動物番号00401）の腎臓について、2U グロブリンに対する免疫組織化学染色を実施し、鏡検した。

## 5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

### 1) 生殖機能検査

投与開始日から交配開始日まで雌の膈垢を毎日午前中に採取、性周期を検査し、平均性周期日数および異常性周期動物の発現率を算出した。交配前の投与期間終了後、各群内で雄1雌1の交配对を設け、投与第15日（交配開始日）の16:00頃から最大4日間昼夜同居させた。交尾確認は毎日午前中に行い、膈栓形成あるいは膈垢標

本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交配した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数（交配開始後、交尾成立までに要した日数）、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率 $[(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100]$ 、受胎率 $[(\text{受胎動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100]$ を算出した。

### 2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。なお、午後4時の時点で分娩が完了した動物は翌日に哺育0日の観察を行った。交尾確認後25日を経ても分娩しない場合は、非分娩雌とした。分娩した動物は新生児を生後4日（哺育4日）まで哺育させ、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。母動物は剖検時に卵巣および子宮を摘出し、黄体数および着床数を検査した。これらの結果から、妊娠期間（妊娠0日から分娩完了日までの期間）、出産率 $(\text{生児出産雌数} / \text{受胎雌数}) \times 100$ 、着床率 $[(\text{着床数} / \text{黄体数}) \times 100]$ 、分娩率 $[(\text{総出産児数} / \text{着床数}) \times 100]$ を算出した。

### 3) 新生児の観察・検査

#### (1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数（出産生児数、死産児数）、性別および外表異常の有無を検査した。その後は、一般状態、死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率 $[(\text{出産生児数} / \text{総出産児数}) \times 100]$ 、新生児の4日の生存率 $[(\text{哺育4日生児数} / \text{出産生児数}) \times 100]$ を算出した。

#### (2) 体重

生後0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。

#### (3) 剖検

生後4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後、親動物と同様に安楽死させ、剖検した。死亡児については10v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬、固定した後、実体顕微鏡下で剖検した。ただし、食殺で検査に耐えられないものを除いた。

## 6. 統計解析

計量データについて、パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が等しい場合は一元配置分散分析を行った。分散が等しくない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意差が認められた場合はDunnnett法またはDunnnett型の多重比較を行った。計数データのうち尿検査はKruskal-Wallisの検定を行い、有意差が認められた場合はDunnnett型の多重比較を、病理組織所見はWilcoxonの順位と検定で対照群との2群間比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。回復動物の2群間（対照群と300 mg/kg群）の計量データはF検定により等分散性の検定

を行い、分散が等しい場合は Student の t 検定、分散が等しくない場合は Welch の t 検定を行った。計数データは Wilcoxon の順位和検定で対照群との 2 群間比較を行った。各検定の有意水準は 5%とした。新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

雌雄とも死亡は認められなかった。

流涎が 300 mg/kg 群の雌雄で散見された。また、被験物質の色調に由来すると考えられる着色尿（オレンジ色）が 60 および 300 mg/kg 群の雌雄で散見された。これらの症状は投与を中止することにより消失した。

#### 2) 行動検査

詳細な症状観察および機能検査では被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

自発運動量の測定では、投与第 6 週の検査で、測定開始 30 分～40 分の運動量が 300 mg/kg 群の雄で対照群と比べ有意な低値を示した。回復期間の第 8 週の検査ではいずれの測定においても有意差は認められなかった。なお、投与第 6 週の検査で、測定開始 20 分～30 分の運動量が 10 mg/kg 群の雌で有意な高値を示したが、用量との関連がないことから、偶発的な変化と判断した。

動物を新しい環境に置いた場合、それを探索しようと周囲を偵察するように嗅いだり触ったりしながら歩き回り、測定初期は運動量が多いが、その後は安定し減少する運動パターンをとる。300 mg/kg 群でも正常な運動パターンを示しているものと判断されたことから、この自発運動量の低下は毒性学的意義に乏しい変化と考えられる。

#### 3) 体重

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

#### 4) 摂餌量

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

300 mg/kg 群の回復雌動物で回復期間中の摂餌量が高値傾向を示したが、一過性の変化であることから偶発的な変化と判断した。

#### 5) 血液学検査 (Table 1)

投与期間終了後の検査では、ヘマトクリット値の低値が 60 および 300 mg/kg 群の雄、網赤血球数の高値が 300 mg/kg 群の雌で認められた。なお、活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が 60 および 300 mg/kg 群の雌でみられたが、わずかな変化であること、さらに毒性学的

に重要な延長でないことから、毒性学的に意義のない変化と判断した。

回復期間終了後の検査では、赤血球数の低値が 300 mg/kg 群の雌でみられたが、投与期間終了後の検査では認められず、偶発的な変化と判断した。

#### 6) 血液生化学検査 (Table 2)

投与期間終了後の検査では、総ビリルビンの高値が 300 mg/kg 群の雌で認められた。なお、トリグリセライドの低値が 10 mg/kg 群の雌でみられたが、用量との関連がないことから、偶発的な変化と判断した。

回復期間終了後の検査で、雌雄ともいくつかの変化がみられたが、投与期間終了後の検査で変化が認められていないことから、いずれも偶発的な変化と判断した。

#### 7) 雄の尿検査

被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

#### 8) 器官重量 (Table 3)

投与期間終了後の検査では、肝臓および腎臓の相対重量の高値が 300 mg/kg 群の雌雄、回復期間終了後の検査では、肝臓の実重量および相対重量の高値が雌雄、腎臓の実重量の高値が雄で認められた。

その他、いくつかの変化が認められたが用量との関連がないことから、被験物質と関連のない変化と考えられる。

#### 9) 剖検所見

投与後解剖動物では、精巣および精巣上体の小型が 10 mg/kg 群の雄、精巣上体の結節が 300 mg/kg 群の雄、子宮の結節が 60 mg/kg 群の雌、回復後解剖動物では精巣および精巣上体の小型が 300 mg/kg 群の雄で、いずれも 1 例に認められた。これら雄性生殖器の変化はいずれも片側性の変化であり、発現状況に明らかな群差は認められなかった。

#### 10) 病理組織所見 (Table 4)

被験物質の影響と考えられる変化が雄の腎臓および雌の脾臓で認められた。

雄の腎臓では、近位尿細管上皮の硝子滴が 300 mg/kg 群の 5 例で認められた。2U に対する免疫組織化学染色を実施した代表例 1 例（動物番号 00401）では、近位尿細管上皮の硝子滴は陽性を示した。雌の脾臓では、髄外造血の亢進が 60 mg/kg 群の 1 例、300 mg/kg 群の 3 例で認められた。60 mg/kg 群の変化は 1 例だけに認められたものであったが、300 mg/kg 群の変化と同程度であったこと、血液学検査でも網状赤血球数が高値を示しており組織変化と対応していることから、被験物質に起因する変化と考えられる。

回復後解剖動物では上述の変化は認められなかった。

剖検時に認められた異常所見は組織学的に、精巣は精細管の萎縮、精巣上体は精子の減少あるいは肉芽種、子

宮では嚢胞が認められた。これらの所見はいずれも片側性の変化で被験物質に起因する変化の可能性は少ないと考えられる。また、これらを示した動物はいずれも交尾し、受胎していることから生殖機能に影響を及ぼすものではなかった。

生殖器系の変化も含め種々の組織変化が投与後および回復後解剖動物の対照群を含む各群で認められたが、それらはラットでは非特異的に発現する変化であり、その発現状況に明らかな群差がみられないことから、被験物質とは関連のない変化と判断した。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 生殖機能 (Table 5)

性周期検査では、各群の平均性周期日数に変化はなく、被験物質による性周期の延長あるいは短縮はみられず、異常性周期を示す動物も認められなかった。

交配の結果、交配对全例が交尾し、交尾率、交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数、ならびに受胎率のいずれにも被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 2) 分娩・哺育状態 (Table 6)

妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率のいずれにも被験物質の影響と考えられる変化は認められず、母動物の分娩および哺育行動に関する異常も認められなかった。

### 3) 新生児に及ぼす影響

#### (1) 新生児の観察 (Table 6)

出産児数、出生児数、出生率、新生児の4日生存率、一般状態のいずれにも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

なお、60 mg/kg 群で性比に差が認められたが、300 mg/kg 群で変化ないことから偶発的な変化と判断した。新生児の外表面検査では、無尾が10 mg/kg 群の1例に認められた。本変化は母動物による咬傷とは異なり先天性の変化と考えられるが、1例のみの発現で用量との関連がないことから、自然発生性の変化と考えられる。

#### (2) 体重 (Table 6)

雌雄の体重および体重増加量とも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

#### (3) 剖検

生後4日の生存児の剖検および死亡児の剖検では、被験物質に起因する異常所見は認められなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

雌雄とも死亡は認められなかった。流涎が300 mg/kg 群の雌雄で散見されたが、投与を中止することにより消失した。

病理学的検査の結果、腎臓で近位尿細管上皮の硝子滴

が300 mg/kg 群の雄5例、脾臓で髓外造血の亢進が60 mg/kg 群の雌1例、300 mg/kg 群の雌3例で認められた。腎臓の近位尿細管上皮における硝子滴は、蛋白質が尿細管上皮に再吸収されることで発現し、特に雄ラットでは2U グロブリンを含む硝子滴の発現が種々の化学物質によって増強することが知られている<sup>2)</sup>。本試験で投与後解剖動物の雄に認められた硝子滴も、免疫組織化学染色の結果から2U グロブリンを含むと考えられる。脾臓の赤血球系髓外造血の亢進は、失血や運動負荷、溶血の際に認められる<sup>3)</sup>。血液学検査および血液生化学検査でも、網赤血球数および総ビリルビンの高値が300 mg/kg 群の雌でみられ、軽度ではあるが溶血を示唆する変化が認められている。また、雄ではヘマトクリット値の低値が60および300 mg/kg 群で認められた。回復後解剖動物ではこれらの変化は消失しており、投与を中止することにより回復するものと考えられる。

器官重量では、300 mg/kg 群の雌雄において投与期間終了後では肝臓および腎臓重量の増加、回復期間終了後では肝臓重量の増加が認められた。腎臓では重量増加に対応する組織学的変化は雄にだけみられ、雌では認められなかったが、被験物質に起因する変化と考えられる。肝臓では重量増加を反映するような血液生化学的变化や組織学的変化は認められず、重量増加の要因は不明であった。また、回復動物においても肝臓の重量増加を示し、2週間の回復期間では変化は認められなかった。この肝臓の重量増加については、投与終了後および回復終了後ともに毒性変化がなかったことから、その毒性学的意義は明らかではなかった。

回復後解剖動物では、肝臓の重量増加を除き上述の変化は消失しており、投与を中止することにより回復傾向を示すものと考えられる。

この他、体重、摂餌量および雄の尿検査では被験物質に起因する変化は認められなかった。

被験物質が属する芳香族ニトロ化合物の代表的な毒性はメトヘモグロビン血症を誘発させる<sup>4)</sup>。その変化の過程としては、メトヘモグロビンを生成し、赤血球系の変化として溶血が生じ、臓器では脾臓重量の増加、組織学的には脾臓のヘモジデリン沈着など一連の反応を示す。本試験でも類似の毒性として溶血を示唆する変化が認められており、同様な作用を有する可能性が考えられる。

### 2. 生殖発生毒性

性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩状態および哺育の観察において、被験物質に起因する変化は認められなかった。新生児の検査において、出産児数、出生児数、性比、出生率および新生児の4日生存率、さらに一般状態、外表面検査、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、被験物質は次世代の発生および発育へ影響を及ぼすものではないと考えられる。

被験物質の類似物質である 2-ニトロアニリンは変異原性を有せず、300 および 600 mg/kg で母体毒性が認められたが、胚致死、胚・胎児の発育抑制および催奇形作用はないとの報告<sup>4)</sup>があり、被験物質も同様な結果の可能性が高い。さらに、被験物質が属する芳香族ニトロ化合物のうち、ニトロベンゼンや 1,3-ジニトロベンゼンは強力な精巣毒性物質である<sup>4)</sup>。ニトロベンゼンは 300 mg/kg を 1 回経口投与しただけで、精細管内で第一次および第二次精母細胞に壊死が生じ、投与後 3 日には精巣上体に壊死細胞片と精子数の減少がみられる<sup>4)</sup>。1,3-ジニトロベンゼンも 16 または 24 mg/kg を 1 回経口投与しただけで、精子の形態変化と運動性低下が認められている。また、1,3-ジニトロベンゼンは 50 mg/kg を 1 回経口投与するだけで、12 時間後に精巣障害を認め、24 時間後には第一次精母細胞の広範な変性がみられ、支持細胞が障害を受けるとの報告がある<sup>4)</sup>。これと比べ本試験条件下では、被験物質に起因すると考えられる精巣および精巣上体の組織学的な変化、交尾および受胎に関する変化は認められなかった。病理組織学的検査のうちステージングなどの詳細な検査は実施していないが、被験物質は生殖系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上のように、4-クロロ-2-ニトロアニリンの本試験条件下における無影響量 (NOEL) および無毒性量 (NOAEL) は次のように判断される。すなわち、反復投与毒性に関する NOEL および NOAEL は、雄動物ではヘマトクリット値の低値が 60 mg/kg 以上の群、雌動物では脾臓の髄外造血の亢進が 60 mg/kg 以上の群で認められたことから、雌雄とも 10 mg/kg/day と考えられる。生殖発生毒性に関し、雌雄の親動物および F1 児動物に対する NOEL および NOAEL は、変化が認められなかったことから 300 mg/kg/day と考えられる。

#### 文献

- 1) 化学物質等安全データシート、4-クロロ-2-ニトロアニリン、東京化成工業株式会社、2000.
- 2) Greaves P. Urinary system. Kidney. Hyaline droplets. In: Greaves P editor. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2000. p. 575-9.
- 3) 大滝サチ. 造血器. 非腫瘍性病変. 造血の亢進. In: 前川昭彦 責任編集. 毒性病理組織学. 名古屋: 日本毒性病理学会: 2000. p.393-4
- 4) 化学物質毒性ハンドブック第Ⅱ巻, 丸善株式会社, 東京, 1999, p 2-21

#### 連絡先

試験責任者:

試験担当者:

㈱三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

#### Correspondence

Authors:

Kashima Laboratory  
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki, 314-0255,  
Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax+81-479-46-2874

本報告書は、平成 19 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。



Table 1 Hematological examination in rats treated orally with 4-Chloro-2-nitroaniline in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
Male							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )		8.914 $\pm$ 0.254	8.456 $\pm$ 0.138	8.464 $\pm$ 0.465	8.502 $\pm$ 0.575	8.504 $\pm$ 0.126	8.640 $\pm$ 0.229
Hemoglobin(g/dL)		15.70 $\pm$ 0.48	15.50 $\pm$ 0.54	15.14 $\pm$ 0.33	14.94 $\pm$ 0.49	15.20 $\pm$ 0.37	15.20 $\pm$ 0.20
Hematocrit(%)		46.18 $\pm$ 1.32	44.72 $\pm$ 1.31	43.78 $\pm$ 1.18*	43.56 $\pm$ 1.52*	44.42 $\pm$ 1.13	44.40 $\pm$ 0.91
Reticulocyte(%)		2.72 $\pm$ 0.58	2.66 $\pm$ 0.30	2.82 $\pm$ 0.44	3.36 $\pm$ 0.96	3.00 $\pm$ 0.38	2.90 $\pm$ 0.54
MCV(fL)		51.78 $\pm$ 1.99	52.88 $\pm$ 2.19	51.80 $\pm$ 1.67	51.36 $\pm$ 2.67	52.24 $\pm$ 1.85	51.42 $\pm$ 1.20
MCH(pg)		17.62 $\pm$ 0.64	18.32 $\pm$ 0.89	17.92 $\pm$ 0.72	17.64 $\pm$ 1.05	17.86 $\pm$ 0.59	17.58 $\pm$ 0.45
MCHC(%)		34.02 $\pm$ 0.11	34.60 $\pm$ 0.41	34.56 $\pm$ 0.47	34.32 $\pm$ 0.35	34.22 $\pm$ 0.33	34.18 $\pm$ 0.51
Platelet( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )		1129.2 $\pm$ 169.7	1032.2 $\pm$ 77.1	1049.8 $\pm$ 88.5	1092.4 $\pm$ 106.6	1036.6 $\pm$ 44.3	1100.4 $\pm$ 155.8
PT(sec)		20.60 $\pm$ 3.84	19.48 $\pm$ 2.34	24.34 $\pm$ 6.10	23.12 $\pm$ 6.65	19.38 $\pm$ 3.09	20.70 $\pm$ 3.58
APTT(sec)		21.04 $\pm$ 1.62	20.44 $\pm$ 1.99	21.58 $\pm$ 2.23	21.84 $\pm$ 3.17	18.92 $\pm$ 1.04	19.88 $\pm$ 1.38
WBC( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )		10.106 $\pm$ 1.353	9.324 $\pm$ 2.545	9.294 $\pm$ 1.333	9.704 $\pm$ 1.803	8.824 $\pm$ 2.842	10.768 $\pm$ 3.744
Differential leukocyte counts (%)							
Lymphocyte		89.52 $\pm$ 5.94	85.38 $\pm$ 6.42	88.90 $\pm$ 4.86	88.52 $\pm$ 5.26	81.94 $\pm$ 4.90	82.44 $\pm$ 3.69
Neutrophilic Segmented		8.68 $\pm$ 5.72	12.02 $\pm$ 6.43	9.10 $\pm$ 4.11	9.68 $\pm$ 5.63	14.86 $\pm$ 5.41	13.72 $\pm$ 2.23
Neutrophilic Band		0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Eosinophil		0.20 $\pm$ 0.45	1.00 $\pm$ 1.41	1.20 $\pm$ 0.84	0.80 $\pm$ 0.84	1.20 $\pm$ 0.84	0.60 $\pm$ 0.89
Basophil		0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Monocyte		1.60 $\pm$ 0.89	1.60 $\pm$ 0.89	0.80 $\pm$ 0.84	1.00 $\pm$ 1.22	2.00 $\pm$ 0.71	3.24 $\pm$ 1.84
Female							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )		7.142 $\pm$ 0.230	7.010 $\pm$ 0.210	6.852 $\pm$ 0.517	6.928 $\pm$ 0.188	8.092 $\pm$ 0.125	7.742 $\pm$ 0.243*
Hemoglobin(g/dL)		13.64 $\pm$ 0.42	13.62 $\pm$ 0.64	13.50 $\pm$ 0.82	13.90 $\pm$ 0.24	15.40 $\pm$ 0.19	15.00 $\pm$ 0.47
Hematocrit(%)		39.66 $\pm$ 1.34	40.08 $\pm$ 1.24	39.44 $\pm$ 2.19	40.50 $\pm$ 0.51	44.04 $\pm$ 0.84	43.62 $\pm$ 1.97
Reticulocyte(%)		5.36 $\pm$ 0.19	7.42 $\pm$ 2.06	7.40 $\pm$ 2.77	8.16 $\pm$ 1.86*	2.52 $\pm$ 0.40	2.86 $\pm$ 1.11
MCV(fL)		55.56 $\pm$ 1.86	57.16 $\pm$ 0.92	57.70 $\pm$ 2.13	58.44 $\pm$ 1.83	54.44 $\pm$ 1.50	56.34 $\pm$ 1.58
MCH(pg)		19.12 $\pm$ 0.59	19.40 $\pm$ 0.54	19.72 $\pm$ 0.69	20.08 $\pm$ 0.68	19.06 $\pm$ 0.41	19.36 $\pm$ 0.48
MCHC(%)		34.38 $\pm$ 0.18	33.98 $\pm$ 0.54	34.20 $\pm$ 0.31	34.38 $\pm$ 0.25	34.98 $\pm$ 0.57	34.40 $\pm$ 0.58
Platelet( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )		1125.8 $\pm$ 102.5	1178.4 $\pm$ 112.1	1161.8 $\pm$ 114.7	1206.0 $\pm$ 109.1	1083.8 $\pm$ 104.4	1072.8 $\pm$ 133.8
PT(sec)		17.46 $\pm$ 0.47	17.04 $\pm$ 0.38	17.50 $\pm$ 0.24	17.78 $\pm$ 0.60	15.34 $\pm$ 0.79	15.12 $\pm$ 0.73
APTT(sec)		15.92 $\pm$ 1.02	15.08 $\pm$ 0.71	14.18 $\pm$ 1.03*	14.38 $\pm$ 0.91*	13.98 $\pm$ 0.74	13.18 $\pm$ 0.59
WBC( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )		9.840 $\pm$ 1.840	9.416 $\pm$ 1.674	8.840 $\pm$ 1.673	8.486 $\pm$ 0.874	6.070 $\pm$ 1.043	7.428 $\pm$ 1.782
Differential leukocyte counts (%)							
Lymphocyte		67.00 $\pm$ 10.93	76.58 $\pm$ 8.25	70.12 $\pm$ 8.10	71.18 $\pm$ 4.99	85.92 $\pm$ 2.97	86.52 $\pm$ 4.99
Neutrophilic Segmented		28.80 $\pm$ 10.52	21.42 $\pm$ 7.59	27.88 $\pm$ 8.55	24.40 $\pm$ 4.06	11.06 $\pm$ 2.07	10.04 $\pm$ 6.60
Neutrophilic Band		0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.45	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Eosinophil		0.80 $\pm$ 1.10	0.40 $\pm$ 0.89	0.20 $\pm$ 0.45	0.40 $\pm$ 0.55	0.80 $\pm$ 0.45	1.02 $\pm$ 1.45
Basophil		0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Monocyte		3.40 $\pm$ 1.52	1.60 $\pm$ 1.82	1.80 $\pm$ 1.92	3.82 $\pm$ 2.18	2.22 $\pm$ 2.62	2.42 $\pm$ 1.85

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 2 Blood chemical examination in rats treated orally with 4-Chloro-2-nitroaniline in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	ASAT(U/L)	86.8 ± 7.6	85.0 ± 12.1	121.0 ± 87.0	84.0 ± 23.7	87.2 ± 7.4	88.4 ± 4.4
	ALAT(U/L)	27.0 ± 3.0	27.2 ± 5.0	40.6 ± 35.0	28.2 ± 7.3	24.2 ± 4.3	29.6 ± 2.6*
	GT(U/L)	1.0 ± 0.7	1.6 ± 1.1	1.8 ± 0.8	2.2 ± 0.8	1.2 ± 0.8	1.4 ± 0.5
	ALP(U/L)	339.2 ± 56.2	396.2 ± 55.0	369.2 ± 71.9	328.4 ± 66.4	335.4 ± 70.2	310.0 ± 75.4
	Total bilirubin(mg/dL)	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.05	0.06 ± 0.09	0.10 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Urea nitrogen(mg/dL)	12.98 ± 0.45	14.16 ± 2.07	13.04 ± 1.10	13.54 ± 2.62	14.28 ± 1.19	14.42 ± 1.50
	Creatinine(mg/dL)	0.26 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.30 ± 0.00	0.28 ± 0.04
	Glucose(mg/dL)	126.6 ± 18.0	135.6 ± 16.3	118.0 ± 10.4	136.6 ± 11.8	126.6 ± 8.8	148.2 ± 13.1*
	Total chol.(mg/dL)	47.0 ± 10.1	52.4 ± 5.4	57.0 ± 14.0	67.6 ± 21.8	54.0 ± 12.4	56.6 ± 5.8
	Triglyceride(mg/dL)	18.6 ± 13.2	13.4 ± 5.9	20.8 ± 13.5	20.8 ± 10.8	26.0 ± 13.7	42.4 ± 16.1
	Total protein(g/dL)	6.82 ± 0.18	6.60 ± 0.29	6.74 ± 0.25	7.04 ± 0.24	6.48 ± 0.19	6.76 ± 0.33
	Albumin(g/dL)	3.02 ± 0.08	2.94 ± 0.15	3.00 ± 0.10	3.20 ± 0.10	2.82 ± 0.13	3.00 ± 0.19
	A/G ratio	0.796 ± 0.021	0.806 ± 0.030	0.802 ± 0.048	0.836 ± 0.026	0.774 ± 0.044	0.798 ± 0.040
	Calcium(mg/dL)	10.16 ± 0.29	9.94 ± 0.15	10.26 ± 0.22	10.26 ± 0.17	10.26 ± 0.23	10.20 ± 0.24
	Inorganic phos.(mg/dL)	7.72 ± 0.72	8.20 ± 0.47	8.46 ± 0.63	7.98 ± 0.55	8.06 ± 0.44	8.10 ± 0.43
	Na(mmol/L)	147.8 ± 0.8	147.8 ± 0.8	148.0 ± 0.7	147.4 ± 0.5	146.2 ± 0.4	146.2 ± 1.1
	K(mmol/L)	4.46 ± 0.30	4.50 ± 0.12	4.52 ± 0.22	4.52 ± 0.19	4.52 ± 0.23	4.60 ± 0.14
	Cl(mmol/L)	105.2 ± 1.3	106.2 ± 0.8	105.8 ± 0.8	105.0 ± 0.7	105.0 ± 0.7	103.8 ± 0.8*
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	ASAT(U/L)	106.2 ± 17.3	119.4 ± 35.8	106.2 ± 19.6	102.2 ± 16.6	96.0 ± 18.1	107.6 ± 40.8
	ALAT(U/L)	45.8 ± 6.0	43.6 ± 14.4	60.8 ± 9.5	58.0 ± 15.5	22.0 ± 7.8	36.6 ± 16.9
	GT(U/L)	1.8 ± 0.8	1.6 ± 0.9	1.6 ± 0.9	2.0 ± 0.0	2.2 ± 0.8	2.0 ± 0.7
	ALP(U/L)	216.6 ± 49.7	243.8 ± 59.7	342.8 ± 156.9	356.2 ± 204.4	155.4 ± 19.6	156.0 ± 47.3
	Total bilirubin(mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.05	0.14 ± 0.05**	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.05
	Urea nitrogen(mg/dL)	19.44 ± 2.92	20.28 ± 2.28	21.86 ± 3.51	25.68 ± 5.11	15.14 ± 1.77	16.54 ± 1.28
	Creatinine(mg/dL)	0.34 ± 0.05	0.34 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.04
	Glucose(mg/dL)	129.4 ± 10.5	126.2 ± 15.0	130.2 ± 11.5	120.8 ± 17.3	122.4 ± 13.7	138.8 ± 9.3
	Total chol.(mg/dL)	65.2 ± 8.5	62.0 ± 18.8	74.0 ± 14.8	84.6 ± 10.0	64.4 ± 8.0	93.6 ± 15.1**
	Triglyceride(mg/dL)	52.2 ± 18.3	21.6 ± 3.2**	44.8 ± 16.0	37.4 ± 7.5	8.2 ± 2.3	12.8 ± 3.3*
	Total protein(g/dL)	6.94 ± 0.18	6.96 ± 0.43	6.92 ± 0.24	7.28 ± 0.18	6.96 ± 0.40	7.60 ± 0.20*
	Albumin(g/dL)	3.12 ± 0.16	3.08 ± 0.19	3.14 ± 0.11	3.34 ± 0.11	3.04 ± 0.23	3.52 ± 0.19**
	A/G ratio	0.820 ± 0.053	0.784 ± 0.025	0.836 ± 0.029	0.842 ± 0.018	0.790 ± 0.036	0.866 ± 0.047*
	Calcium(mg/dL)	11.38 ± 0.34	11.34 ± 0.13	11.18 ± 0.16	11.34 ± 0.34	10.38 ± 0.37	10.64 ± 0.17
	Inorganic phos.(mg/dL)	9.78 ± 0.92	10.32 ± 0.80	10.40 ± 0.63	10.16 ± 1.22	7.58 ± 0.38	7.28 ± 0.51
	Na(mmol/L)	144.6 ± 1.3	146.2 ± 0.8	145.4 ± 0.9	145.2 ± 1.1	146.2 ± 0.4	145.8 ± 0.8
	K(mmol/L)	4.50 ± 0.22	4.50 ± 0.31	4.58 ± 0.04	4.56 ± 0.21	4.30 ± 0.33	4.42 ± 0.23
	Cl(mmol/L)	103.6 ± 1.9	104.2 ± 1.3	103.2 ± 1.9	101.2 ± 1.5	107.0 ± 0.7	106.2 ± 1.6

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 4-Chloro-2-nitroaniline in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
Male							
Number of animals	5	5	5	5	5	5	
Final body weight(g)	469.9 ± 43.2(7) <sup>a)</sup>	456.7 ± 35.4(12)	454.1 ± 37.6(12)	425.1 ± 42.4(7)	505.0 ± 40.8	518.8 ± 31.9	
Absolute organ weight							
Brain(g)	2.106 ± 0.068	2.122 ± 0.089	2.170 ± 0.063	2.094 ± 0.045	2.096 ± 0.090	2.108 ± 0.093	
Thymus(mg)	414.6 ± 128.1	297.0 ± 24.9	381.8 ± 68.8	342.2 ± 73.8	374.2 ± 77.6	317.8 ± 58.0	
Heart(g)	1.516 ± 0.083	1.640 ± 0.237	1.476 ± 0.175	1.692 ± 0.227	1.762 ± 0.164	1.736 ± 0.136	
Liver(g)	12.140 ± 1.784	11.564 ± 1.146	11.668 ± 0.780	13.454 ± 1.553	12.650 ± 0.908	14.988 ± 1.074**	
Spleen(g)	0.946 ± 0.182	0.790 ± 0.084	0.882 ± 0.071	0.914 ± 0.212	0.900 ± 0.133	0.976 ± 0.034	
Kidneys(g)	3.154 ± 0.278	3.012 ± 0.213	3.106 ± 0.221	3.416 ± 0.315	3.098 ± 0.158	3.506 ± 0.307*	
Adrenals(mg)	63.02 ± 3.52	67.40 ± 12.92	70.34 ± 12.78	80.10 ± 16.63	67.38 ± 9.76	71.26 ± 3.41	
Testes(g)	3.469 ± 0.191(7)	3.431 ± 0.381(12)	3.573 ± 0.207(12)	3.564 ± 0.197(7)	3.520 ± 0.326	3.336 ± 0.229	
Epididymides(g)	1.293 ± 0.039(7)	1.328 ± 0.129(12)	1.333 ± 0.077(12)	1.336 ± 0.094(7)	1.308 ± 0.121	1.350 ± 0.178	
Relative organ weight							
Brain(g%)	0.460 ± 0.047	0.496 ± 0.024	0.502 ± 0.032	0.502 ± 0.040	0.414 ± 0.018	0.408 ± 0.033	
Thymus(mg%)	89.40 ± 24.53	69.48 ± 6.47	87.88 ± 13.98	81.18 ± 13.02	73.74 ± 12.79	61.22 ± 10.09	
Heart(g%)	0.328 ± 0.024	0.382 ± 0.049*	0.340 ± 0.016	0.402 ± 0.029**	0.352 ± 0.044	0.336 ± 0.033	
Liver(g%)	2.626 ± 0.201	2.698 ± 0.136	2.688 ± 0.077	3.204 ± 0.098**	2.508 ± 0.088	2.890 ± 0.154**	
Spleen(g%)	0.208 ± 0.045	0.186 ± 0.021	0.202 ± 0.018	0.216 ± 0.032	0.180 ± 0.026	0.188 ± 0.015	
Kidneys(g%)	0.688 ± 0.062	0.704 ± 0.023	0.716 ± 0.026	0.814 ± 0.047**	0.616 ± 0.048	0.676 ± 0.041	
Adrenals(mg%)	13.78 ± 1.67	15.74 ± 2.77	16.26 ± 2.96	19.08 ± 3.06*	13.36 ± 1.86	13.82 ± 1.41	
Testes(g%)	0.739 ± 0.047(7)	0.755 ± 0.097(12)	0.792 ± 0.066(12)	0.846 ± 0.106(7)	0.700 ± 0.087	0.646 ± 0.062	
Epididymides(g%)	0.276 ± 0.023(7)	0.293 ± 0.025(12)	0.296 ± 0.025(12)	0.319 ± 0.046(7)	0.262 ± 0.036	0.260 ± 0.043	
Female							
Number of animals	5	5	5	5	5	5	
Final body weight(g)	320.6 ± 21.6	287.4 ± 16.3*	288.0 ± 16.2*	286.4 ± 9.3*	288.6 ± 11.0	286.0 ± 20.2	
Absolute organ weight							
Brain(g)	1.974 ± 0.085	1.962 ± 0.016	1.966 ± 0.088	1.896 ± 0.086	1.980 ± 0.047	1.906 ± 0.077	
Thymus(mg)	258.8 ± 34.2	327.6 ± 76.4	267.2 ± 59.8	233.6 ± 90.2	342.4 ± 77.4	323.0 ± 54.6	
Heart(g)	1.076 ± 0.103	1.084 ± 0.090	0.982 ± 0.076	1.054 ± 0.087	0.990 ± 0.077	1.016 ± 0.124	
Liver(g)	10.994 ± 0.613	10.288 ± 1.163	10.870 ± 1.204	12.246 ± 0.829	7.332 ± 0.665	8.572 ± 0.844*	
Spleen(g)	0.744 ± 0.106	0.746 ± 0.047	0.850 ± 0.131	0.760 ± 0.121	0.622 ± 0.108	0.632 ± 0.078	
Kidneys(g)	2.222 ± 0.179	2.104 ± 0.145	2.048 ± 0.217	2.202 ± 0.172	1.980 ± 0.185	1.968 ± 0.172	
Adrenals(mg)	90.42 ± 11.39	95.50 ± 15.48	82.34 ± 9.57	79.04 ± 9.78	79.44 ± 12.15	76.66 ± 6.65	
Relative organ weight							
Brain(g%)	0.618 ± 0.061	0.684 ± 0.043	0.684 ± 0.030	0.662 ± 0.022	0.688 ± 0.039	0.668 ± 0.040	
Thymus(mg%)	80.58 ± 7.30	114.12 ± 25.85	93.10 ± 21.91	81.66 ± 32.18	118.60 ± 25.82	113.36 ± 19.50	
Heart(g%)	0.334 ± 0.015	0.376 ± 0.018**	0.340 ± 0.012	0.370 ± 0.023*	0.346 ± 0.022	0.354 ± 0.032	
Liver(g%)	3.436 ± 0.162	3.572 ± 0.264	3.770 ± 0.286	4.278 ± 0.268**	2.540 ± 0.187	2.998 ± 0.154**	
Spleen(g%)	0.232 ± 0.029	0.260 ± 0.021	0.296 ± 0.038*	0.266 ± 0.038	0.218 ± 0.048	0.220 ± 0.023	
Kidneys(g%)	0.692 ± 0.026	0.734 ± 0.040	0.712 ± 0.045	0.766 ± 0.040*	0.684 ± 0.042	0.686 ± 0.021	
Adrenals(mg%)	28.34 ± 4.25	33.32 ± 5.79	28.58 ± 3.07	27.62 ± 3.28	27.52 ± 4.02	26.78 ± 0.77	

a) Number of animals examined.

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 4 Histopathological findings in rats treated orally with 4-Chloro-2-nitroaniline in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	10	60	300	0	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male			(Grade)					
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Degeneration, myocardium	1+	1			0		
	Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lymph node, mesenteric		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Spleen		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Bone marrow, femur		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lung (and bronchus)		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Hemorrhage	1+	3			1		
	Mineralization, arterial wall	1+	0			1		
	Stomach		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, duodenum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Liver		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1+	0			2		
	Kidney		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
	Basophilic tubule, proximal tubule	1+	3	2	2	4	3	1
	Cast, hyaline	1+	2	0	0	1	1	0
	Cell infiltration, inflammatory, interstitium	1+	2	0	1	0	1	0
	Cyst	1+	1	0	0	0	1	0
	Fibrosis, focal	1+	1	1	0	0	1	0
	Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	1+	0	0	0	4	0	0
		2+	0	0	0	1	0	0
	Mineralization, medulla	1+	0	1	1	0	0	0
	Urinary bladder		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cell infiltration, lymphocyte, lamina propria, focal	1+	1			1		
	Testis		<5>	<1>	<0>	<5>	<0>	<1>
	Atrophy, seminiferous tubule	2+	0	1		0		1
	Epididymis		<5>	<1>	<0>	<5>	<0>	<1>
	Decrease, sperm, duct	1+	0	1		0		1
	Granuloma, spermatoc	1+	0	0		1		0
	Seminal vesicle		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>

<> : Number of animals examined.

Grade; 1+ : slight, 2+ : moderate, 3+ : severe, total : total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 4 ( Continued )

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	10	60	300	0	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male			(Grade)					
	Prostate		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cell infiltration, lymphocyte, interstitium	1+	2			0		
	Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cyst, anterior lobe	1+	0			1		
	Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Ectopic thymic tissue	1+	0			1		
	Ultimobranchial remnant	1+	0			1		
	Parathyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Adrenal		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Brain		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>

< > : Number of animals examined.

Grade; 1+ : slight, 2+ : moderate, 3+ : severe, total : total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 4 (Continued)

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	10	60	300	0	300
	Finding	Number of animals	11	12	12	12	5	5
Female		(Grade)						
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Degeneration, myocardium	1+	1			0		
	Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lymph node, mesenteric		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Spleen		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
	Increase, extramedullary hematopoiesis, erythrocytic	1+	0	0	1	3	0	0
	Bone marrow, femur		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lung (and bronchus)		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Accumulation, foam cell, alveolus	1+	2			2		
	Hemorrhage	1+	1			2		
	Metaplasia, osseous	1+	1			0		
	Stomach		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, duodenum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Liver		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1+	0			1		
	Kidney		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Basophilic tubule, proximal tubule	1+	2			1		
	Cell infiltration, inflammatory, interstitium	1+	0			1		
	Cyst	1+	0			1		
	Mineralization, medulla	1+	1			2		
	Urinary bladder		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Ovary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cyst	1+	0			1		
	Uterus		<5>	<0>	<1>	<5>	<0>	<0>
	Cyst, focal	1+	0		1	0		
	Vagina		<5>	<0>	<0>	<5>		
	Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>

&lt;&gt; : Number of animals examined.

Grade; 1+ : slight, 2+ : moderate, 3+ : severe, total : total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 4 ( Continued )

Sex		Administration period				Recovery period	
Organ	Dose level (mg/kg)	0	10	60	300	0	300
Finding	Number of animals	11	12	12	12	5	5
Female		(Grade)					
Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Ectopic thymic tissue	1+	0			1		
Ultimobranchial remnant	1+	2			3		
Parathyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Adrenal		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Cell infiltration, inflammatory, reticular zone	1+	2			1		
Brain		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>

< > : Number of animals examined.

Grade; 1+ : slight, 2+ : moderate, 3+ : severe, total : total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 5 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 4-Chloro-2-nitroaniline in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level(mg/kg)	Administration period			
	0	10	60	300
Number of pairs examined	12	12	12	12
Estrous cycle	4.08 ± 0.29	4.08 ± 0.29	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
Irregular estrous cycle	0/12	0/12	0/12	0/12
Number of pairs with successful mating	12	12	12	12
Mating index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	11	12	12	12
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	91.7	100.0	100.0	100.0
Pairing days until mating	2.1 ± 1.2	1.8 ± 1.2	2.6 ± 1.1	2.0 ± 1.0
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined)×100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating)×100

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$



Table 6 Delivery and litter data in rats treated orally with 4-Chloro-2-nitroaniline inner salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level(mg/kg)	Administration period			
	0	10	60	300
Number of females examined	11	12	12	12
Number of females with live pups	11	12	12	12
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days)	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.8 ± 0.4
Number of corpora lutea	16.2 ± 1.3	16.8 ± 2.4	16.3 ± 2.8	16.8 ± 2.6
Number of implantation sites	15.0 ± 1.7	15.8 ± 2.2	15.1 ± 2.8	15.8 ± 2.6
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	92.70 ± 8.81	94.13 ± 4.75	92.73 ± 5.58	94.49 ± 5.85
Delivery index (%) <sup>c)</sup>	93.64 ± 6.24	95.15 ± 5.42	95.33 ± 5.73	90.06 ± 10.30
Number of pups delivered	14.0 ± 1.5	14.9 ± 1.7	14.3 ± 2.6	14.3 ± 2.8
Number of live pups on day 0	13.9 ± 1.4	14.8 ± 1.6	14.0 ± 2.4	13.6 ± 2.7
Live birth index (%) <sup>d)</sup>	99.44 ± 1.87	99.51 ± 1.70	98.04 ± 6.78	95.68 ± 8.62
Sex ratio (male/female)	1.00(77/77)	1.01(90/89)	0.61(65/107)*	1.00(85/85)
Number of live pups on day 4	13.8 ± 1.5	14.8 ± 1.7	14.0 ± 2.4	13.4 ± 2.8
Viability index on day 4 (%) <sup>e)</sup>	99.35 ± 2.14	99.41 ± 2.05	100.00 ± 0.00	98.52 ± 3.59
Body weight of pups (g)				
on day 0 male	7.1 ± 0.6	6.9 ± 0.6	6.9 ± 0.6	6.7 ± 0.4
female	6.7 ± 0.6	6.7 ± 0.5	6.5 ± 0.6	6.4 ± 0.4
on day 4 male	11.7 ± 1.2	11.1 ± 1.0	11.1 ± 1.1	10.7 ± 1.3
female	11.1 ± 1.1	10.9 ± 0.9	10.5 ± 1.0	10.1 ± 1.2

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females)×100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea)×100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites)×100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered)×100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0)×100

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$