

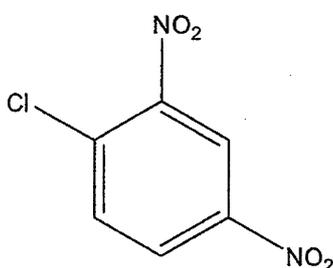
# 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

## 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン

[CAS No. 97-00-7]

Molecular formula: C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

Molecular weight: 202.55



### ABSTRACT

#### 1. Material and method

Purity	: 99.9%
Test species/strain	: Rat/Crl:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 1, 6, 30 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 30 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 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

1-Chloro-2,4-dinitrobenzene 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, 1, 6, and 30 mg/kg/day.

No deaths occurred in any of the treated groups. In the 30 mg/kg group, necropsy revealed thickening in the forestomach wall of both sexes, histopathological examination revealed squamous hyperplasia in the forestomach, inflammatory cell infiltration and erosion in the forestomach. In addition, squamous hyperplasia in the forestomach was noted in both sexes of the 6 mg/kg group. For the other changes in the 30 mg/kg group, a low value in MCHC, high value in white blood cell count, and high value in spleen weight in the female animals, and a low value in thymus weight in the male animals were 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 estrous cycle, mating index, fertility index, number of corpora lutea or implantations, implantation index, delivery index, gestation index, gestation length, 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 in 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 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene were 1 mg/kg/day for both sexes, and that the NOEL and NOAEL for the reproductive/developmental toxicity were 30 mg/kg/day for parental animals and offspring.

# 1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼ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 1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene by Oral Administration in Rats

### 要約

1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼンは、染料および爆発物の製造、ピリジン化合物・エチレンジアミン・ジエチレントリアミン・トリエチレントラミン検出用発色試薬、殺菌剤に用いられている<sup>1)</sup>。製造者の製品安全データシート<sup>2)</sup>によればラットの経口投与によるLD<sub>50</sub>値が640 mg/kg、局所的には皮膚および眼に対して刺激性を有し、皮膚接触により感作を引き起こす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。

1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼンを1, 6 および30 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30 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、剖検で前胃壁の肥厚が30 mg/kg群の雌雄、組織学的には前胃の扁平上皮の過形成、炎症性細胞浸潤およびびらんが認められた。さらに6 mg/kg群の雌雄でも前胃扁平上皮の過形成が認められた。この他、30 mg/kg群では平均赤血球血色素濃度の低値、白血球数の高値および脾臓重量の高値が雌、胸腺重量の低値が雄に認められた。これらの変化は2週間の回復期間により消失あるいは回復傾向を示した。

### 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、1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼンの本試験条件下における無影響量(NOEL)および無毒性量(NOAE)は次のように判断される。すなわち、反復投与毒性に関し、雌雄の動物に対するNOELおよびNOAEは、前胃扁平上皮の過形成が6 mg/kg以上の群で認められたことから1 mg/kg/dayと考えられる。生殖発生毒性に関し、雌雄の親動物ならびにF1児動物に対

するNOELおよびNOAEは、変化が認められなかったことから30 mg/kg/dayと考えられる。

### 方法

#### 1. 被験物質

1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン [ ] 純度99.9%, 沸点315°C, 融点51.7°C) はクロロホルムに易溶で、アルコール、エーテル、ベンゼン、四塩化炭素および二硫化炭素には可溶、水には不溶(8 mg/L 15°C)でアーモンド臭を有する黄色結晶の物質である。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、被験物質を所定量秤量した後、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、0.6 および3 mg/mL 投与液を調製した。その後、0.1 mg/mL 投与液は0.6 mg/mL 投与液より希釈調製した。投与液中の被験物質の安定性は、0.4 および100 mg/mLの濃度で16日間安定性あることを確認した。よって、0.6 および3 mg/mL 投与液は10日間に1回の頻度で、0.1 mg/mL 投与液は用時に調製した。0.6 および3 mg/mL 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14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30 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311~353g、雌が209~244g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°C、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(ペータチップ: 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，5 $\mu$ m のフィルター濾過後，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

投与用量は 14 日間反復投与毒性試験の結果を参考に決定した。すなわち被験物質を 0, 30, 100, 300 および 600 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，被験物質に起因すると考えられる変化が多数認められ，その詳細を次に示す。

死亡が 600 mg/kg 群で投与 4 日までに雄 1 例，雌 2 例，300 mg/kg 群では投与 14 日までに雄 2 例に認められた。600 mg/kg 群の生存動物は，状態悪化がみられたことおよび用量設定試験の目的を考慮し，投与 4 日に瀕死期解剖に処した。一般状態では，流涎あるいは着色尿が 30 mg/kg 以上の群で散見され，自発運動の低下，貧血様，鼻周囲あるいは下腹部の汚れが 100 および 300 mg/kg 群で認められた。流涎は投与後 30 分には消失するものであった。体重および摂餌量では，30 mg/kg 以上の群の雄，300 mg/kg 群の雌で低値が認められた。

血液学検査では，赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低値，血小板数および網状赤血球数の高値が 100 mg/kg 以上の群の雌雄，MCV の高値が 300 mg/kg 群の雌，MCH および MCHC の低値が 100 mg/kg 群の雄，300 mg/kg 群の雌に認められた。また，白血球百分率では好酸球比の低値が 100 mg/kg 群の雄，300 mg/kg 群の雌，リンパ球比の低値および好中球比の高値が 300 mg/kg 群の雌で認められた。血液生化学検査では，ALP の低値が 100 mg/kg 群の雄，総蛋白，アルブミン，A/G 比の低値が 300 mg/kg 群の雌，ナトリウムの高値が 30 mg/kg 以上の群の雄，カリウムおよびクロールの高値が 100 mg/kg 群の雄で認められた。また，ASAT および ALAT の顕著な高値が 30 mg/kg 群の雄 1 例に認められた。

器官重量では，胸腺重量の低値，肝臓，脾臓および副腎重量の高値が 300 mg/kg 群の雌，脾臓重量の高値が 100 mg/kg 群の雄で認められた。生存動物の剖検所見では，脾臓の腫大，腺胃粘膜のびらん/潰瘍が 100 および 300 mg/kg 群の雌雄，前胃壁の肥厚が 30 mg/kg 以上の群の雌雄で認められた。

これらの結果および本試験の投与期間を考慮し，本試験の高用量は明らかな毒性発現が予想される 30 mg/kg とし，以下公比約 5 で減じ中用量は 6 mg/kg，低用量は 1 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。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 30 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，いずれも午後に行なった。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。投与期間中の検査で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，回復期間の検査は行わなかった。

#### 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（シアノメトヘモグロビン法），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)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(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( $\gamma$ -グルタミン-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38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。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、骨髄(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30mg/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・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。その結果、被験物質との関連性が疑われる変化が雌雄の胃に認められたため、1および6mg/kg群の雌雄各5例、回復期間終了後の解剖動物全例の当該器官について、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、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12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[(交尾動物数/同居動物数)×100]、受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×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。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[(生児出産雌数/受胎雌数)×100]、着床率[(着床数/黄体数)×100]、分娩率[(総出産児数/着床数)×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(出產生児数、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[(出產生児数/総出産児数)×100]、新生児の4日の生存率[(哺育4日生児数/出產生児数)×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 Dunnett 法または Dunnett 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 Dunnett 型の多重比較を、病理組織所見は Wilcoxon の順位和検定で対照群との 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 30 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。

投与後症状として、被験物質の色調に由来する着色尿が 30 mg/kg 群の雄 6 例、雌 4 例に認められた。その他、対照群の雌サテライト動物 1 例に歯の欠損がみられたが、6 日後には回復した。

#### 2) 行動検査

詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定のいずれ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) 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。

なお、30 mg/kg 群の雄で第 8 日の摂餌量が低値を示したが、一過性の変化であった。

### 5) 血液学検査 (Table 1)

投与期間終了後の検査では、平均赤血球血色素濃度の

低値および白血球数の高値が 30 mg/kg 群の雌に認められた。

なお、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値が 6 mg/kg 群の雌で認められたが、30 mg/kg 群ではみられていないことから、偶発的な変化と判断した。

### 6) 血液生化学検査 (Table 2)

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。

### 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、胸腺の相対重量の低値および実重量の低値傾向が 30 mg/kg 群の雄、脾臓の実重量および相対重量の高値が 30 mg/kg 群の雌に認められた。

回復期間終了後の検査で、肝臓の相対重量の低値が 30 mg/kg 群の雌で認められたが、投与期間終了後の検査で差がないことから、偶発的な変化と判断した。

### 9) 剖検所見

投与後解剖動物で、前胃壁の肥厚が 30 mg/kg 群の雄 6 例、雌 11 例で認められた。その他、脾臓の腫大が 30 mg/kg 群の雄 1 例、肝臓の分葉異常が 30 mg/kg 群の雌 1 例、精巣上体の小型が 1 mg/kg 群の 1 例に認められた。回復後解剖動物では、精巣上体の結節が対照群の 1 例で認められた。

なお、肝臓の分葉異常はラットでは自然発生的に認められる変化であり、1 例のみであることから偶発所見と判断した。

### 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雌雄の胃で認められた。

投与後解剖動物において、前胃扁平上皮の過形成が 6 および 30 mg/kg 群の雌雄で認められた。その程度としては、境界縁に限局した軽微な変化から、び漫性に認められる軽度～重度な変化が用量に相関して認められた。すなわち、6 mg/kg 群では軽微から中等度の変化、30 mg/kg 群では中等度または重度の変化であった。投与後解剖動物で前胃扁平上皮の過形成が認められた動物のうち、6 mg/kg 群の雌 1 例、30 mg/kg 群の雄 2 例、雌 6 例では前胃の粘膜固有層または粘膜下組織における炎症性細胞浸潤が認められた。さらにこれらの動物のうち、6 mg/kg 群の雌 1 例および 30 mg/kg 群の雌 1 例では前胃のびらんが認められた。

回復後解剖動物では、前胃扁平上皮の過形成が 30 mg/kg 群の雌雄において認められ、その程度は軽微または軽度であった。投与後解剖動物で認められた前胃の炎症性細胞浸潤およびびらんは、回復後解剖動物では認められず、回復傾向を示していると考えられた。

投与後解剖動物の雄で胸腺重量の低下傾向が、雌で脾臓重量の増加傾向が認められたが、いずれも対応する組織変化は認められなかった。

この他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認められなかった。なお、異常性周期を示す動物が 30 mg/kg 群の 1 例に認められたが、雄との同居により交尾した。

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、性比、出生率、新生児の 4 日生存率、一般状態および外表検査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、尾の欠落が対照群および 30 mg/kg 群の雄各 1 例、咬創が 6 mg/kg 群の雌 1 例に認められたが、用量との関連がないことから母動物の咬傷による変化と考えられ、被験物質に起因するものではないと判断した。

#### (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

病理学検査の結果、剖検で前胃壁の肥厚が 30 mg/kg 群の雌雄、組織学的には前胃の扁平上皮の過形成、炎症性細胞浸潤およびびらんが認められた。さらに 6 mg/kg 群の雌雄にも前胃扁平上皮の過形成が認められた。前胃扁平上皮の過形成は種々の化学物質の経口投与によって誘発され、境界縁に限局して、またはび漫性に認められる<sup>3)</sup>。また、炎症性細胞浸潤やびらんを伴うこともあ

り、投与を中止することにより回復することが報告されている<sup>4)</sup>。製造者の製品安全データシート<sup>2)</sup>によれば、皮膚および眼に対し刺激性を有することが知られており、被験物質が有する刺激作用が異常所見の発生要因の一つと考えられた。また、本試験では 2 週間の回復期間により、前胃扁平上皮の過形成はその程度が軽減し、前胃の炎症性細胞浸潤およびびらんも認められなかった。このことから、これらの変化は 2 週間の回復期間により消失あるいは回復傾向を示すものと考えられる。

30 mg/kg 群の雌では平均赤血球色素濃度の低値および脾臓重量の高値を示したが、脾臓には組織学的な変化は認められず、毒性学的な意義は明らかではなかった。被験物質は強力な感作性物質であり、アレルギー性接触皮膚炎の陽性対照物質として利用されており<sup>1)</sup>、免疫系の異常を誘発することが懸念された。しかし、免疫系への異常を示唆する変化としては、胸腺重量の低値が 30 mg/kg 群の雄にみられただけで、組織学的な変化は認められなかった。血液学検査で白血球数の高値が 30 mg/kg 群の雌にみられたが、雄では同様な変化が認められずその詳細は明らかではなかった。

この他、行動検査、体重、摂餌量、雄の尿検査、血液生化学検査の結果、被験物質に起因する変化は認められなかった。なお、一般状態において着色尿(黄色)が観察され被験物質の色調に由来するものと思われたが、代謝排泄物の可能性も考えられ、その詳細は不明であった。

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>1)</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。用量設定試験においては 100 mg/kg 以上の群の雄、300 mg/kg 群の雌で赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低値、血小板数および網状赤血球数の高値、脾臓重量の高値、脾臓の腫大が認められており、メトヘモグロビン血症を疑わせる一連の反応を示唆する変化が認められた。本試験条件下における高用量 30 mg/kg 投与では、雌で平均赤血球色素濃度の低値および脾臓重量の高値を示し、メトヘモグロビン血症を疑わせる変化を示したが、脾臓には病理組織学的な病変は認められず、明確な変化を捉えることができなかった。このことから、メトヘモグロビン血症を誘発する用量域は 30 mg/kg/day 以上の投与が必要と考えられる。

### 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、本試験条件下において、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>1)</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>1)</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回経口投与しただけで、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>1)</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、被験物質は生殖器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、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼ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、反復投与毒性に関し、雌雄の動物に対する NOEL および NOAEL は、前胃扁平上皮の過形成が6 mg/kg以上の群で認められたことから1 mg/kg/dayと考えられる。生殖発生毒性に関し、雌雄の親動物ならびに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30 mg/kg/dayと考えられる。

#### 文献

- 1) 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.2-37.
- 2) 製品安全データシート, 2,4-ジニトロクロロベンゼン, 東京化成工業株式会社, 2005.

- 3) 真鍋淳, 松沼尚史, 高橋道人, 立松正衛, 西川秋佳. 消化管. 増殖性および腫瘍性病変. 3-3. 食道および前胃. 扁平上皮過形成. 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 160.
- 4) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ. The alimentary system and pancreas. Stomach. In: Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ, editors. Atlas of experimental toxicological pathology. Lancaster: MTP Press; 1987. p.64-5.

#### 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 1-Chloo-2,4-dinitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	1	6	30	0	30
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.704 $\pm$ 0.378	8.792 $\pm$ 0.416	8.570 $\pm$ 0.324	8.590 $\pm$ 0.238	8.744 $\pm$ 0.203	8.904 $\pm$ 0.461
	Hemoglobin(g/dL)	15.58 $\pm$ 0.64	15.98 $\pm$ 0.41	15.54 $\pm$ 0.62	15.84 $\pm$ 0.25	15.38 $\pm$ 0.45	15.74 $\pm$ 0.46
	Hematocrit(%)	46.28 $\pm$ 2.03	46.68 $\pm$ 0.92	45.34 $\pm$ 1.86	47.08 $\pm$ 1.06	45.42 $\pm$ 1.63	46.64 $\pm$ 1.95
	Reticulocyte(%)	2.64 $\pm$ 0.54	2.36 $\pm$ 0.17	2.58 $\pm$ 0.26	2.90 $\pm$ 0.43	2.36 $\pm$ 0.11	2.22 $\pm$ 0.24
	MCV(fL)	53.24 $\pm$ 3.08	53.12 $\pm$ 1.57	52.96 $\pm$ 1.40	54.80 $\pm$ 0.90	51.92 $\pm$ 1.34	52.44 $\pm$ 1.69
	MCH(pg)	17.92 $\pm$ 1.04	18.20 $\pm$ 0.61	18.12 $\pm$ 0.51	18.46 $\pm$ 0.34	17.58 $\pm$ 0.37	17.70 $\pm$ 0.57
	MCHC(%)	33.68 $\pm$ 0.40	34.24 $\pm$ 0.40	34.24 $\pm$ 0.34	33.68 $\pm$ 0.31	33.86 $\pm$ 0.25	33.74 $\pm$ 0.51
	Platelet( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1103.4 $\pm$ 90.5	1063.0 $\pm$ 51.3	1166.4 $\pm$ 163.2	1177.2 $\pm$ 77.7	1114.6 $\pm$ 87.2	1076.0 $\pm$ 40.0
	PT(sec)	24.00 $\pm$ 4.45	24.22 $\pm$ 5.14	21.14 $\pm$ 2.48	20.66 $\pm$ 4.35	20.32 $\pm$ 3.73	20.72 $\pm$ 1.93
	APTT(sec)	21.34 $\pm$ 2.37	21.94 $\pm$ 2.15	19.60 $\pm$ 1.43	20.80 $\pm$ 1.46	19.70 $\pm$ 2.01	21.54 $\pm$ 2.23
	WBC( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	10.134 $\pm$ 1.245	8.244 $\pm$ 2.146	8.290 $\pm$ 1.874	7.652 $\pm$ 1.297	8.696 $\pm$ 0.952	10.288 $\pm$ 2.840
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocyte	87.36 $\pm$ 8.03	82.10 $\pm$ 13.42	81.74 $\pm$ 5.82	84.70 $\pm$ 3.66	83.20 $\pm$ 2.86	86.94 $\pm$ 2.61
	Neutrophilic Segmented	11.24 $\pm$ 7.60	14.70 $\pm$ 13.16	16.26 $\pm$ 5.57	12.10 $\pm$ 3.11	14.60 $\pm$ 3.21	10.46 $\pm$ 4.57
	Neutrophilic Band	0.20 $\pm$ 0.45	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	0.60 $\pm$ 0.89	1.60 $\pm$ 0.89	0.40 $\pm$ 0.55	0.40 $\pm$ 0.55	0.80 $\pm$ 0.45	1.00 $\pm$ 0.71
	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	0.60 $\pm$ 0.89	1.60 $\pm$ 1.82	1.60 $\pm$ 1.34	2.80 $\pm$ 1.79	1.40 $\pm$ 1.52	1.60 $\pm$ 1.52
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7.258 $\pm$ 0.204	7.290 $\pm$ 0.325	6.856 $\pm$ 0.178	7.026 $\pm$ 0.386	8.196 $\pm$ 0.244	8.228 $\pm$ 0.184
	Hemoglobin(g/dL)	14.04 $\pm$ 0.42	13.96 $\pm$ 0.27	13.26 $\pm$ 0.21*	13.72 $\pm$ 0.51	15.42 $\pm$ 0.46	15.26 $\pm$ 0.46
	Hematocrit(%)	41.38 $\pm$ 1.41	41.38 $\pm$ 0.86	39.26 $\pm$ 0.62*	41.50 $\pm$ 1.44	44.50 $\pm$ 1.75	44.14 $\pm$ 1.49
	Reticulocyte(%)	6.26 $\pm$ 0.85	5.68 $\pm$ 1.79	6.54 $\pm$ 1.93	6.20 $\pm$ 1.09	2.60 $\pm$ 0.86	2.34 $\pm$ 0.40
	MCV(fL)	57.02 $\pm$ 1.67	56.80 $\pm$ 1.78	57.30 $\pm$ 1.03	59.12 $\pm$ 2.17	54.32 $\pm$ 1.52	53.62 $\pm$ 1.71
	MCH(pg)	19.32 $\pm$ 0.50	19.12 $\pm$ 0.67	19.38 $\pm$ 0.45	19.58 $\pm$ 0.68	18.80 $\pm$ 0.32	18.54 $\pm$ 0.53
	MCHC(%)	33.88 $\pm$ 0.22	33.68 $\pm$ 0.30	33.80 $\pm$ 0.41	33.10 $\pm$ 0.46**	34.64 $\pm$ 0.50	34.60 $\pm$ 0.20
	Platelet( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1260.6 $\pm$ 107.8	1334.8 $\pm$ 288.1	1133.4 $\pm$ 139.8	1307.6 $\pm$ 61.1	1046.0 $\pm$ 67.4	1129.6 $\pm$ 125.0
	PT(sec)	16.70 $\pm$ 0.83	16.94 $\pm$ 0.47	16.32 $\pm$ 0.65	17.00 $\pm$ 0.37	14.86 $\pm$ 0.59	14.64 $\pm$ 0.51
	APTT(sec)	14.82 $\pm$ 0.70	15.12 $\pm$ 0.59	14.84 $\pm$ 0.60	15.38 $\pm$ 0.68	15.04 $\pm$ 1.08	14.90 $\pm$ 1.37
	WBC( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9.912 $\pm$ 1.961	12.324 $\pm$ 2.513	9.422 $\pm$ 1.172	14.482 $\pm$ 3.168*	6.732 $\pm$ 0.399	6.700 $\pm$ 2.527
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocyte	66.96 $\pm$ 11.53	68.80 $\pm$ 8.07	69.84 $\pm$ 6.63	65.76 $\pm$ 14.93	88.50 $\pm$ 6.31	92.60 $\pm$ 2.51
	Neutrophilic Segmented	30.22 $\pm$ 10.81	29.00 $\pm$ 7.65	27.56 $\pm$ 4.95	32.24 $\pm$ 13.83	10.10 $\pm$ 5.95	6.20 $\pm$ 2.59
	Neutrophilic Band	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.55	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	Eosinophil	0.60 $\pm$ 0.55	0.60 $\pm$ 0.55	0.60 $\pm$ 0.55	0.60 $\pm$ 0.89	0.80 $\pm$ 0.45	0.60 $\pm$ 0.55
	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	2.22 $\pm$ 1.32	1.60 $\pm$ 0.55	1.60 $\pm$ 2.07	1.40 $\pm$ 1.14	0.60 $\pm$ 0.55	0.60 $\pm$ 0.55

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 1-Chloo-2,4-dinitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	1	6	30	0	30
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	ASAT(U/L)	90.2 ± 10.2	73.4 ± 3.4	108.4 ± 34.7	91.0 ± 13.0	80.6 ± 10.8	79.4 ± 10.0
	ALAT(U/L)	28.8 ± 2.2	24.6 ± 3.3	35.0 ± 17.7	23.4 ± 3.6	26.6 ± 4.4	22.6 ± 3.8
	GT(U/L)	0.8 ± 1.1	1.2 ± 0.8	0.8 ± 0.8	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4
	ALP(U/L)	374.0 ± 62.5	325.4 ± 20.3	343.0 ± 30.1	300.2 ± 30.6	314.0 ± 24.2	315.0 ± 44.9
	Total bilirubin(mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Urea nitrogen(mg/dL)	12.88 ± 1.03	13.10 ± 1.43	13.10 ± 1.36	17.74 ± 1.25	14.66 ± 1.23	15.00 ± 1.52
	Creatinine(mg/dL)	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.30 ± 0.00
	Glucose(mg/dL)	131.0 ± 8.8	130.0 ± 16.5	116.8 ± 17.5	122.4 ± 18.0	137.0 ± 4.6	131.8 ± 8.3
	Total chol.(mg/dL)	50.4 ± 6.7	55.2 ± 8.9	64.0 ± 12.6	56.4 ± 8.6	57.8 ± 4.0	51.6 ± 7.1
	Triglyceride(mg/dL)	18.8 ± 7.8	14.6 ± 3.2	10.4 ± 4.3	18.2 ± 8.6	32.4 ± 16.4	33.2 ± 19.9
	Total protein(g/dL)	6.68 ± 0.27	6.38 ± 0.22	6.52 ± 0.22	6.52 ± 0.11	6.86 ± 0.36	6.52 ± 0.51
	Albumin(g/dL)	2.80 ± 0.12	2.78 ± 0.15	2.72 ± 0.11	2.86 ± 0.09	2.92 ± 0.11	2.82 ± 0.18
	A/G ratio	0.726 ± 0.048	0.782 ± 0.043	0.722 ± 0.023	0.768 ± 0.022	0.756 ± 0.084	0.768 ± 0.043
	Calcium(mg/dL)	9.82 ± 0.24	9.56 ± 0.15	9.62 ± 0.29	9.94 ± 0.23	10.26 ± 0.21	10.12 ± 0.32
	Inorganic phos.(mg/dL)	7.84 ± 0.53	7.96 ± 0.58	7.78 ± 0.41	7.98 ± 0.82	8.08 ± 0.74	8.32 ± 0.49
	Na(mmol/L)	146.6 ± 0.5	147.0 ± 0.7	147.2 ± 0.8	147.0 ± 0.7	146.2 ± 0.4	146.8 ± 1.3
	K(mmol/L)	4.60 ± 0.25	4.62 ± 0.15	4.54 ± 0.11	4.46 ± 0.31	4.52 ± 0.40	4.62 ± 0.23
	Cl(mmol/L)	104.8 ± 1.3	104.8 ± 0.8	106.0 ± 2.0	105.6 ± 0.5	103.8 ± 1.5	105.8 ± 1.5
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	ASAT(U/L)	107.4 ± 27.4	130.8 ± 27.1	116.6 ± 28.3	135.8 ± 24.5	90.2 ± 10.4	77.0 ± 10.2
	ALAT(U/L)	41.0 ± 3.5	52.0 ± 9.4	45.2 ± 5.9	50.4 ± 7.8	24.6 ± 8.4	20.4 ± 7.0
	GT(U/L)	2.4 ± 0.5	1.4 ± 0.9	1.4 ± 0.9	1.2 ± 0.8	0.4 ± 0.5	0.8 ± 0.4
	ALP(U/L)	288.0 ± 61.7	222.8 ± 25.9	210.2 ± 48.6	259.0 ± 76.6	140.6 ± 21.2	140.6 ± 16.6
	Total bilirubin(mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.05	0.08 ± 0.04
	Urea nitrogen(mg/dL)	18.54 ± 1.25	19.90 ± 3.21	20.24 ± 3.36	20.98 ± 1.84	15.38 ± 1.78	14.62 ± 1.38
	Creatinine(mg/dL)	0.30 ± 0.00	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.40 ± 0.00
	Glucose(mg/dL)	127.2 ± 16.1	119.6 ± 8.8	133.0 ± 5.9	130.0 ± 12.3	118.8 ± 15.0	135.8 ± 13.7
	Total chol.(mg/dL)	59.0 ± 13.3	56.8 ± 14.4	70.4 ± 10.5	56.0 ± 7.3	78.0 ± 15.2	83.2 ± 10.3
	Triglyceride(mg/dL)	32.6 ± 7.5	45.4 ± 38.0	32.6 ± 11.7	50.0 ± 23.1	12.8 ± 5.7	14.8 ± 4.6
	Total protein(g/dL)	6.62 ± 0.15	6.92 ± 0.26	6.76 ± 0.25	6.56 ± 0.47	7.48 ± 0.24	7.26 ± 0.40
	Albumin(g/dL)	2.96 ± 0.18	3.10 ± 0.16	2.96 ± 0.17	2.98 ± 0.16	3.34 ± 0.09	3.30 ± 0.23
	A/G ratio	0.820 ± 0.081	0.810 ± 0.035	0.788 ± 0.051	0.822 ± 0.034	0.802 ± 0.015	0.842 ± 0.054
	Calcium(mg/dL)	10.78 ± 0.41	10.80 ± 0.47	10.40 ± 0.41	11.00 ± 0.60	10.40 ± 0.31	10.28 ± 0.26
	Inorganic phos.(mg/dL)	9.72 ± 0.89	9.58 ± 0.55	8.74 ± 0.90	10.68 ± 1.21	7.10 ± 0.52	6.48 ± 1.15
	Na(mmol/L)	144.4 ± 1.7	145.6 ± 1.1	144.4 ± 1.7	145.6 ± 0.5	146.2 ± 0.8	145.8 ± 0.8
	K(mmol/L)	4.48 ± 0.16	4.70 ± 0.37	4.50 ± 0.32	4.68 ± 0.11	4.18 ± 0.48	4.22 ± 0.34
	Cl(mmol/L)	104.4 ± 2.1	104.2 ± 1.6	105.4 ± 1.5	105.4 ± 0.5	106.2 ± 0.4	106.6 ± 1.5

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 1-Chloo-2,4-dinitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	1	6	30	0	30
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	Final body weight(g)	465.1 ± 35.9(7) <sup>a)</sup>	450.6 ± 24.7(12)	445.0 ± 25.7(12)	453.4 ± 15.6(7)	497.2 ± 39.6	484.4 ± 48.3
	Absolute organ weight						
	Brain(g)	2.108 ± 0.087	2.118 ± 0.098	2.146 ± 0.090	2.088 ± 0.054	2.128 ± 0.095	2.140 ± 0.071
	Thymus(mg)	401.6 ± 46.2	325.8 ± 53.0	320.4 ± 73.5	292.2 ± 77.5	346.8 ± 73.0	373.6 ± 90.2
	Heart(g)	1.628 ± 0.210	1.600 ± 0.242	1.614 ± 0.121	1.644 ± 0.239	1.664 ± 0.262	1.800 ± 0.225
	Liver(g)	11.596 ± 1.043	11.496 ± 1.437	11.638 ± 1.256	11.920 ± 0.784	13.516 ± 1.731	12.906 ± 2.077
	Spleen(g)	0.810 ± 0.063	0.720 ± 0.069	0.868 ± 0.101	0.824 ± 0.116	0.894 ± 0.066	0.930 ± 0.092
	Kidneys(g)	3.196 ± 0.154	3.094 ± 0.288	3.262 ± 0.168	3.162 ± 0.254	3.370 ± 0.376	3.152 ± 0.254
	Adrenals(mg)	61.44 ± 8.17	65.82 ± 7.48	65.50 ± 14.35	70.24 ± 11.87	67.58 ± 8.42	64.76 ± 11.97
	Testes(g)	3.323 ± 0.306(7)	3.174 ± 0.315(12)	3.467 ± 0.201(12)	3.429 ± 0.214(7)	3.412 ± 0.200	3.482 ± 0.170
	Epididymides(g)	1.223 ± 0.102(7)	1.211 ± 0.169(12)	1.284 ± 0.087(12)	1.267 ± 0.055(7)	1.478 ± 0.218	1.432 ± 0.147
	Relative organ weight						
	Brain(g%)	0.466 ± 0.042	0.476 ± 0.032	0.458 ± 0.033	0.458 ± 0.016	0.430 ± 0.022	0.444 ± 0.035
	Thymus(mg%)	89.18 ± 13.94	72.64 ± 7.75	67.88 ± 13.57	64.22 ± 16.71*	69.84 ± 14.80	77.72 ± 18.86
	Heart(g%)	0.360 ± 0.042	0.356 ± 0.036	0.346 ± 0.038	0.362 ± 0.049	0.334 ± 0.043	0.370 ± 0.012
	Liver(g%)	2.556 ± 0.075	2.566 ± 0.125	2.476 ± 0.171	2.622 ± 0.163	2.710 ± 0.183	2.654 ± 0.198
	Spleen(g%)	0.178 ± 0.008	0.162 ± 0.008	0.182 ± 0.013	0.180 ± 0.023	0.180 ± 0.021	0.192 ± 0.016
	Kidneys(g%)	0.706 ± 0.025	0.692 ± 0.019	0.698 ± 0.058	0.698 ± 0.045	0.676 ± 0.034	0.654 ± 0.047
	Adrenals(mg%)	13.54 ± 1.47	14.84 ± 2.12	13.92 ± 2.73	15.40 ± 2.35	13.60 ± 1.23	13.58 ± 3.37
	Testes(g%)	0.716 ± 0.041(7)	0.708 ± 0.078(12)	0.781 ± 0.058(12)	0.757 ± 0.057(7)	0.690 ± 0.067	0.724 ± 0.077
	Epididymides(g%)	0.263 ± 0.010(7)	0.269 ± 0.043(12)	0.289 ± 0.026(12)	0.283 ± 0.021(7)	0.296 ± 0.036	0.296 ± 0.027
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	Final body weight(g)	307.8 ± 20.0	313.0 ± 23.2	325.0 ± 13.9	315.0 ± 25.3	283.2 ± 15.4	303.2 ± 20.6
	Absolute organ weight						
	Brain(g)	1.944 ± 0.059	2.024 ± 0.083	1.958 ± 0.044	1.978 ± 0.068	1.958 ± 0.104	1.966 ± 0.075
	Thymus(mg)	304.6 ± 37.3	276.2 ± 24.0	325.4 ± 75.3	311.2 ± 74.6	331.2 ± 69.2	330.2 ± 104.2
	Heart(g)	1.034 ± 0.065	1.092 ± 0.061	1.112 ± 0.091	1.096 ± 0.077	1.054 ± 0.122	1.050 ± 0.127
	Liver(g)	10.396 ± 1.116	10.514 ± 0.761	11.252 ± 0.310	11.340 ± 0.657	8.086 ± 0.591	7.948 ± 0.724
	Spleen(g)	0.694 ± 0.114	0.708 ± 0.130	0.832 ± 0.173	0.928 ± 0.043*	0.650 ± 0.093	0.602 ± 0.101
	Kidneys(g)	2.150 ± 0.143	2.154 ± 0.176	2.218 ± 0.101	2.176 ± 0.065	1.996 ± 0.212	1.898 ± 0.168
	Adrenals(mg)	83.24 ± 5.18	83.20 ± 7.98	84.78 ± 10.94	87.18 ± 13.24	88.34 ± 12.71	79.60 ± 10.20
	Relative organ weight						
	Brain(g%)	0.630 ± 0.029	0.648 ± 0.046	0.602 ± 0.018	0.630 ± 0.040	0.694 ± 0.030	0.652 ± 0.040
	Thymus(mg%)	99.04 ± 11.58	88.82 ± 12.20	99.66 ± 19.97	99.46 ± 26.86	116.56 ± 21.30	108.68 ± 31.66
	Heart(g%)	0.336 ± 0.011	0.352 ± 0.030	0.342 ± 0.018	0.350 ± 0.014	0.372 ± 0.023	0.344 ± 0.025
	Liver(g%)	3.372 ± 0.215	3.362 ± 0.148	3.464 ± 0.123	3.610 ± 0.222	2.854 ± 0.104	2.620 ± 0.116**
	Spleen(g%)	0.224 ± 0.034	0.226 ± 0.038	0.256 ± 0.051	0.296 ± 0.025*	0.228 ± 0.022	0.198 ± 0.031
	Kidneys(g%)	0.698 ± 0.016	0.692 ± 0.081	0.682 ± 0.029	0.694 ± 0.042	0.702 ± 0.057	0.628 ± 0.048
	Adrenals(mg%)	27.14 ± 2.25	26.68 ± 3.11	26.16 ± 3.96	27.58 ± 2.91	31.10 ± 3.23	26.34 ± 3.76

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 1-Chloo-2,4-dinitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	1	6	30	0	30
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)						
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Degeneration, myocardium	1+	0			1		
	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>	<6>	<0>	<0>
	Hyperplasia, lymph follicle	1+	0			1		
	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+	1			2		
	Hemorrhage	1+	1			0		
	Stomach		<5>	<5>	<5>	<6>	<5>	<5>
	Cell infiltration, inflammatory, forestomach	1+	0	0	0	2	0	0
	Hyperplasia, squamous, forestomach	1+	0	0	5	0	0	0
		2+	0	0	0	0	0	5
		3+	0	0	0	4	0	0
		4+	0	0	0	2	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+	1			1		
	Kidney		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Basophilic tubule, proximal tubule	1+	1			3		
	Cast, proteinous	1+	1			0		
	Cell infiltration, inflammatory, interstitium	1+	1			0		
	Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	1+	2			5		
	Mineralization, medulla	1+	1			0		
	Urinary bladder		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Testis		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Epididymis		<5>	<1>	<0>	<5>	<1>	<0>
	Decrease, sperm	1+	0	1		0	0	
	Granuloma, spermatic	1+	0	0		0	1	
	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	1	6	30	0	30
	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			2		
	Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Aberrant craniopharyngeal tissue	1+	0			1		
	Cyst, anterior lobe	1+	1			0		
	Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Ultimobranchial remnant	1+	0			2		
	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	1	6	30	0	30
	Finding	Number of animals	12	12	12	12	5	5
Female		(Grade)						
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<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>
	Accumulation, foam cell, alveolus	1+	0			2		
	Stomach		<5>	<5>	<5>	<11>	<5>	<5>
	Cell infiltration, inflammatory, forestomach	1+	0	0	1	6	0	0
	Erosion, forestomach	1+	0	0	1	1	0	0
	Hyperplasia, squamous, forestomach	1+	0	0	1	0	0	1
		2+	0	0	0	0	0	4
		3+	0	0	1	6	0	0
		4+	0	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		
	Cell infiltration, macrophage	1+	1			0		
	Necrosis, hepatocyte, focal	1+	0			2		
	Kidney		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Basophilic tubule, proximal tubule	1+	1			0		
	Mineralization, medulla	1+	1			1		
	Urinary bladder		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Ovary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Uterus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Vagina		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Ectopic thymic tissue	1+	0			1	<0>	<0>
	Ultimobranchial remnant	1+	2			2		

<> : 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	1	6	30	0	30
	Finding	Number of animals	12	12	12	12	5	5
Female		(Grade)						
	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 5 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 1-Chloo-2,4-dinitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level(mg/kg)	Administration period			
	0	1	6	30
Number of pairs examined	12	12	12	12
Estrous cycle	4.00 ± 0.00	4.08 ± 0.29	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
Irregular estrous cycle	0/12	0/12	0/12	1/12
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	12	12	12	12
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until mating	4.1 ± 3.0	2.8 ± 1.3	2.8 ± 1.1	2.3 ± 1.1
Number of estrous stages without mating	0.1 ± 0.3	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 1-Chloo-2,4-dinitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level(mg/kg)	Administration period			
	0	1	6	30
Number of females examined	12	12	12	12
Number of females with live pups	12	12	12	12
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days)	22.3 ± 0.5	22.4 ± 0.5	22.4 ± 0.5	22.4 ± 0.5
Number of corpora lutea	17.8 ± 2.0	16.8 ± 3.5	17.0 ± 2.5	17.7 ± 2.1
Number of implantation sites	16.6 ± 1.7	15.6 ± 3.6	16.2 ± 1.9	16.1 ± 1.7
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	93.17 ± 5.46	92.03 ± 7.36	95.54 ± 5.25	91.38 ± 6.30
Delivery index (%) <sup>c)</sup>	96.78 ± 4.32	93.20 ± 6.90	95.43 ± 5.86	95.16 ± 2.96
Number of pups delivered	16.1 ± 2.1	14.7 ± 3.8	15.4 ± 2.0	15.3 ± 2.0
Number of live pups on day 0	16.1 ± 2.1	14.7 ± 3.8	15.3 ± 1.9	15.3 ± 2.0
Live birth index (%) <sup>d)</sup>	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	99.51 ± 1.70	99.48 ± 1.79
Sex ratio (male/female)	0.77(84/109)	0.96(86/90)	0.93(89/96)	0.90(87/97)
Number of live pups on day 4	15.8 ± 2.0	14.4 ± 3.7	15.3 ± 1.9	15.1 ± 1.9
Viability index on day 4 (%) <sup>e)</sup>	98.06 ± 2.88	98.53 ± 2.67	100.00 ± 0.00	98.92 ± 2.58
Body weight of pups (g)				
on day 0 male	6.8 ± 0.7	6.9 ± 0.7	7.0 ± 0.6	6.8 ± 0.6
female	6.3 ± 0.7	6.6 ± 0.9	6.6 ± 0.5	6.5 ± 0.6
on day 4 male	10.8 ± 1.1	11.2 ± 1.7	11.3 ± 1.1	10.8 ± 1.2
female	10.2 ± 1.0	10.8 ± 2.0	10.7 ± 1.0	10.5 ± 1.1

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; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$