

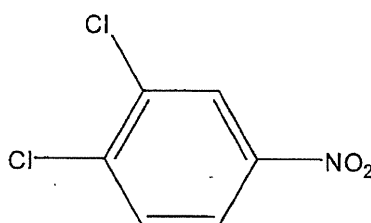
1,2-Dichloro-4-nitrobenzene

1,2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン

[CAS No. 99-54-7]

Molecular formula: $C_6H_3Cl_2NO_2$

Molecular weight: 192.00



ABSTRACT

1. Material and method

Purity	: 93.7% *
Test species/strain	: Rat/Crl:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 4, 20, 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

*: Purity compensating rate (multiplication of 1.067)

2. Results

Repeated dose toxicity

1,2-Dichloro-4-nitrobenzene 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, 4, 20, and 100 mg/kg/day.

Death occurred in 1 dam of the 100 mg/kg group. In this group, salivation in both sexes was noted as post-dose symptoms. Low body weight and low food consumption were noted. Histopathological examination revealed increases in extramedullary hematopoiesis of erythrocytic and congestion in the spleen in both sexes of the 100 mg/kg group, and an increase in hemosiderin pigment in males of the 100 mg/kg group and in females of the 4 mg/kg group and higher. In the liver, increases in extramedullary hematopoiesis in females of the 20 mg/kg group and higher, hemosiderin deposition of kupffer cell in females of the 20 mg/kg group and higher and in males of the 100 mg/kg group were noted. As reflections of these changes, hematological examination revealed low value in red blood cell count, hemoglobin concentration, and hematocrit value, and high value in reticulocyte count, organ weight measurement revealed increases in the spleen and liver weights in both sexes of the 100 mg/kg group, and blood chemistry examination revealed high value in total bilirubin concentration in females of the 100 mg/kg group. In other findings, hypertrophy of centrilobular hepatocytes in the liver in both sexes of the 100 mg/kg group, an increase in hyaline droplet of proximal tubular epithelium in males of the 20 mg/kg group and higher and vacuolation of proximal tubular epithelium in females of the 100 mg/kg group 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 1,2-Dichloro-4-nitrobenzene were 4 mg/kg/day for males, less than 4 mg/kg/day for females, and that the NOEL and NOAEL for the reproductive/developmental toxicity were 100 mg/kg/day for parental animals and offspring.

1, 2-ジクロロ-4-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, 2-Dichloro-4-nitrobenzene by Oral Administration in Rats

要約

1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼンは、製造者の製品安全データシート¹⁾によればラットの経口投与による LD₅₀ 値が 953 mg/kg、局所的には皮膚、眼、粘膜に対し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。

1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼンを 4, 20 および 100 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 100 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

100 mg/kg 群の雌 1 例が妊娠 23 日に死亡した。同群では雌雄とも投与後の流産が散見され、体重および摂餌量が低値で推移した。病理学検査の結果、脾臓では赤血球系髄外造血の充進およびうっ血が 100 mg/kg 群の雌雄、ヘモジリン色素の増加が 100 mg/kg 群の雄と 4 mg/kg 以上の群の雌、肝臓では赤血球系髄外造血が 20 mg/kg 以上の群の雌、クッパー細胞のヘモジリン沈着が 20 mg/kg 以上の群の雌と 100 mg/kg 群の雄に認められた。これらを反映する変化として、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、ならびに網赤血球数の高値、器官重量では脾臓および肝臓重量の増加が 100 mg/kg 群の雌雄、血液生化学検査では総ビリルビンの高値が同群の雌で認められた。この他、肝臓では小葉中心性肝細胞肥大が 100 mg/kg 群の雌雄、腎臓では近位尿細管の硝子滴沈着の増強が 20 mg/kg 以上の群の雄、近位尿細管上皮の空胞化が 100 mg/kg 群の雌で認められた。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, 2-ジクロロ-4-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、反復投与毒性に関する NOEL および NOAEL は、雄動物では腎臓における近位尿細管の硝子滴沈着の増強が 20 mg/kg 以上の群で認められたことから 4 mg/kg/day、雌動物では脾臓におけるヘモジリン色素の増加が 4 mg/kg 以上の群で認められたことから 4 mg/kg/day 未満と考えられる。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 100 mg/kg/day と考えられる。

方法

1. 被験物質

1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン（XXXXXXXXXXロット FFW01）は純度 93.7%、融点 37.0°C の黄色結晶塊である。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。投与液の調製は、高用量群の投与液調製後、段階希釈により中、低用量群の投与液を調製した。すなわち、予め融解させた被験物質を純度補正係数 1.607 ($100/93.7 \approx 1.067$) を乗じた量を秤量し、媒体（日本薬局方オリブ油：オリエンタル薬品工業）で溶解して 20 mg/mL 投与液を調製した。その後段階希釈により 4 および 0.8 mg/mL の投与液を調製した。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 11 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 7 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 $\pm 10\%$ 以内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 100 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 310~357g、雌が 182~234g であった。検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 20\%$ 、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、5 μ 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, 100, 300, 600 および 1000 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 300, 600 および 1000 mg/kg の約半数例（雌雄 8/18 例）で投与 3 日から 6 日の間に認められた。300 mg/kg 以上の群の生存動物では状態の悪化が認められたため、投与 7 日に瀕死期解剖に処した。死亡および瀕死期解剖動物では、一般状態で腹臥位、自発運動低下、呼吸不整、緩徐呼吸、易刺激性、歩行異常、間代性痙攣、強直性痙攣、貧血様、鼻、下腹および被毛の汚れ、ならびに着色尿などがみられ、剖検では主な変化として、胸部大動脈周囲組織および胸腺の暗赤色化、脾臓および腎臓の黒色化、肺の褪色、胸腺の小型が認められた。

100 mg/kg 群の変化として一般状態では着色尿、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、網赤血球数の高値が雌雄、好酸球比の低値が雄、MCV の高値、MCHC および単球比の低値が雌で認められた。器官重量では肝臓あるいは腎臓重量の高値、剖検では脾臓の腫大が雌雄で認められた。なお、100 mg/kg 群の体重、摂餌量および血液生化学検査では明確な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、本試験の高用量は明らかな毒性発現が予想される 100 mg/kg とし、以下公比 5 で減じ中用量は 20 mg/kg、低用量は 4 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 100 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、13:00 までに強制経口投与した。投与量は 5 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 10 分～20 分の運動量および総運動量が 100 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。交尾しなかった雌は雄と同様に剖検前日まで測定した。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：バイエル 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)), -GT (γ-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 39 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: バイエル メディカル) を自動尿分析器 (クリニテック 100: バイエル 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、交尾しなかった雌は雄と同時期に、分娩しなかった雌は交尾確認後 26 日に同様の方法で解剖した。死亡動物は速やかに解剖した。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, 膣, 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て保存した。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 100 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、100 mg/kg 群の投与終了後検査動物において、雌雄の肝臓, 脾臓, 腎臓および腸間膜リンパ節, 雌の骨髄, 胃および小脳に異常所見が認められた。また、肝臓, 脾臓および腸間膜リンパ節では褐色色素の沈着がみられ、ヘモジデリンである可能性が疑われた。よって追加検査として、対照群および 100 mg/kg 群の投与終了後検査動物の雌雄ならびに死亡動物の肝臓, 脾臓および腸間膜リンパ節についてベルリンブルー染色標本作製し、鏡検した。また、回復期間終了時の剖検動物ならびに 4 および 20 mg/kg 群の雌雄各 5 例を選抜し、肝臓, 脾臓および腸間膜リンパ節はヘマトキシリン・エオジン染色とベルリンブルー染色標本作製, 雌雄の腎臓, 雌の骨髄, 胃および小脳はヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検した。

その他、100 mg/kg 群の雄および雌死亡動物 (動物番号 50404) 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、同群の雄の代表例 (動物番号 00402) および雌死亡動物の腎臓について、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膣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 14 日間昼夜同居させた。交尾確認は毎日午前中に行い、膣栓形成あるいは膣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。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 [(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（出産児数，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〔（出産児数／総出産児数）×100〕，新生児の4日の生存率〔（哺育4日生児数／出産児数）×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100 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

死亡が100 mg/kg群の雌1例に認められた．本動物は妊娠21日に流産，翌日には貧血様の症状および下腹部の汚れを示し，妊娠23日に死亡した．投与後の症状として流産が100 mg/kg群の雌雄で散見された．なお，着色尿（黄色）が100 mg/kg群で散見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．

4 mg/kg群の雌1例では妊娠23日を経過しても分娩の徴候がみられず，妊娠24日より腔口出血および貧血

様の症状を示したが，分娩には至らなかった．その他，腫瘍（腹部）の形成が4 mg/kg群，歯の欠損が対照群でそれぞれ雌1例に認められた．

回復動物では，投与期間中に認められた流涎および着色尿は，休薬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10分～20分の運動量ならびに総運動量が100 mg/kg群のいずれも雄で対照群と比べ有意な低値を示した．回復期間中の第8週の検査においても，測定開始0分～10分の運動量ならびに総運動量が同群の雄で対照群と比べ有意な低値を示した．

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．100 mg/kg群の雄では有意な低値が認められたものの，極端な低値を示したものではなく，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，毒性学的意義に乏しい変化と考えられる．

3) 体重

100 mg/kg群では，投与期間中の体重が雌雄とも低値で推移し，雌では投与第8日から哺育4日まで有意差が認められた．雌サテライト動物でも投与第36日および42日に有意な低値を示した．

4) 摂餌量

100 mg/kg群では投与初期に対照群と比べ低値を示し，雄では投与第8日，雌では投与第8日，15日および妊娠7日に有意差が認められた．20 mg/kg群の雌では投与第15日および妊娠7日に有意な低値が認められた．

なお，100 mg/kg群の雄で投与第39日に有意な高値を示したが，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，ヘモグロビン濃度および平均赤血球血色素濃度の低値が100 mg/kg群の雌雄，赤血球数およびヘマトクリット値の低値が同群の雌で認められた．また，網赤血球数の高値が20および100 mg/kg群の雄，平均赤血球容積，平均赤血球血色素量および網赤血球数の高値が100 mg/kg群の雌で認められた．

回復期間終了後の検査では，平均赤血球血色素濃度の低値が100 mg/kg群の雄，ヘマトクリット値，平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の高値が同群の雌で認められた．また，血小板数の高値が雌，好中球比率の高値が雄にみられたが，投与期間終了後の検査では認められなかったことから，偶発的な変化と判断した．

6) 血液生化学検査 (Table 2)

投与期間終了後の検査では、総ビリルビンの高値が100 mg/kg 群の雌雄で認められた。その他、100 mg/kg 群で尿素窒素およびクロールの低値が雄、総コレステロールの高値が雄、ナトリウムの高値が雌で認められた。

回復期間終了後の検査で、無機リン、ナトリウムおよびクロールの高値が雄、ASAT (GOT) の低値が雌で認められたが、これらの変化と関連する他のパラメータに変化がないこと、あるいは毒性学的に意義のない低値であることから、いずれも偶発的な変化と考えられる。

7) 雄の尿検査

尿蛋白およびケトン体の陰性例の増加が100 mg/kg 群で認められたが、毒性変化と考えられる陽性例の増加でないことから、偶発的な変化と考えられる。

8) 器官重量 (Table 3)

投与期間終了後の検査では、肝臓および脾臓の実重量と相対重量の高値が100 mg/kg 群の雌雄に認められた。回復期間終了後の検査では、肝臓の実重量と相対重量の高値が雌、脾臓の相対重量の高値が雄に認められた。

なお、心臓の相対重量の高値が雌でみられたが、実重量に変化はなく体重の差に起因した変化と考えられた。

9) 剖検所見

投与後解剖動物で脾臓の腫大が100 mg/kg 群の雄2例、雌9例に認められた。

100 mg/kg 群の死亡動物の剖検では、腎臓の皮髄境界部の白色化、胸腺の小型化、赤色胸水の増加、胃および小腸内に異常内容物が認められた。子宮内には浸軟胎児が2匹、胎盤遺残が4個、娩出痕が10箇所認められ、分娩途中に死亡したものと考えられる。

4 mg/kg 群の非分娩動物では、心臓の白色化および心室内血栓、腎臓の白色斑、膀胱の膨満、尿管の拡張、肝臓の白色斑および赤色斑、胸腺の小型化、小腸内に異常内容物が認められた。剖検時には、1匹の死亡胎児が膈（尿道開口部）に位置しており、尿道開口部を閉塞していた。また、子宮内には死亡胎児が15匹残存していた。

その他、投与後および回復後解剖動物でいくつかの肉眼的変化が認められたが、用量群に関係なく散発的な発現であることから、被験物質とは関連のない変化と判断した。また、雌雄の生殖器官に被験物質に起因する変化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雌雄の脾臓、肝臓、腎臓で認められた。

脾臓では、軽微ないし軽度の赤血球系髄外造血の亢進が100 mg/kg 群の雄1例、雌全例、軽微ないし軽度なうっ血が100 mg/kg 群の雄全例、雌7例、軽微なヘモジリン色素の増加が4 mg/kg 群の雌2例、20 mg/kg 群の雌3例、100 mg/kg 群の雄4例、雌7例に認められた。4 mg/kg 群の雌2例における軽微なヘモジリン沈着は、

脾臓およびその他の臓器に関連する変化は認められていないが、20および100 mg/kg 群と同程度の変化であったことから、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、軽微な赤血球系髄外造血の亢進が100 mg/kg 群の雄1例、軽微なヘモジリン色素の増加が100 mg/kg 群の雌雄全例に認められた。

肝臓では、軽微な赤血球系髄外造血が20 mg/kg 群の雌1例、100 mg/kg 群の雌全例、軽微ないし軽度なクッパー細胞のヘモジリン沈着が20 mg/kg 群の雌1例、100 mg/kg 群の雌雄全例、軽微な小葉中心性肝細胞肥大が100 mg/kg 群の雌雄全例に認められた。回復後解剖動物では、軽微なクッパー細胞のヘモジリン沈着が100 mg/kg 群の雌雄全例に認められた。

腎臓では、雄の変化として、軽微ないし軽度な近位尿細管の硝子滴沈着が全群に様々な発現頻度と程度で認められ、20 mg/kg 群の1例、100 mg/kg 群の全例で軽度な変化が発現しており、対照群でみられた変化よりその程度が強かった。代表例として2U グロブリンに対する免疫組織化学染色を実施した100 mg/kg 群の1例（動物番号00402）では、近位尿細管の硝子滴が陽性を示した。回復後解剖動物では、近位尿細管の硝子滴沈着が100 mg/kg 群の雄4例に認められたが、いずれも軽微な変化であり回復性を示しているものと考えられる。雌の変化として、軽微な近位尿細管上皮の空胞化が100 mg/kg 群の4例に認められた。空胞化細胞は近位尿細管において孤立性に認められた。回復後解剖動物では、この変化は認められなかった。

100 mg/kg 群の死亡動物では、脾臓でヘモジリン色素の増加、肝臓でクッパー細胞のヘモジリン沈着、腎臓で尿細管の壊死および近位尿細管の硝子滴沈着が認められた。2U グロブリンに対する免疫組織化学染色を実施した結果、近位尿細管の硝子滴は陰性であった。その他に、肝臓では肝細胞のびまん性萎縮、子宮では血栓、副腎では皮質の出血および束状帯皮質細胞の肥大、肺では出血および血栓、脾臓では白脾髄の萎縮、下顎リンパ節および腸間膜リンパ節では濾胞の萎縮、胸腺では急性萎縮が認められた。

4 mg/kg 群の非分娩動物では、心臓に血栓と限局性炎症性細胞浸潤、腎臓で限局性炎症性細胞浸潤、好塩基性尿細管、尿細管の拡張および硝子円柱、肝臓で髄外造血、限局性肝細胞壊死、小葉中心性の肝細胞の単細胞壊死および限局性炎症性細胞浸潤、胸腺では急性萎縮、空腸および回腸では粘膜上皮の単細胞壊死が認められた。非分娩動物の変化は、前述の脾臓、肝臓および腎臓の異常所見とは異なり本動物だけの特異的な変化であること、用量との関連もないことから、分娩障害あるいは衰弱に伴う変化と思われる、被験物質と関連のない偶発的なものと考えられる。

投与後解剖動物の4 mg/kg 群の雌1例（動物番号50205）の皮下に認められた腫瘍は、組織学的には乳腺の限局性炎症性細胞浸潤であった。本変化は用量との関連がなく1例だけの発現であることから、被験物質と関連のない偶発変化と考えられる。

被験物質に起因した前述の変化の他に、追加検査を実施した胃および小脳について、胃では腺胃粘膜上皮の単細胞壊死が軽度な変化として対照群で1例、軽微な変化が20mg/kg群で1例、100 mg/kg群で2例に認められた。小脳では顆粒層神経細胞の壊死が100 mg/kg群の雌1例に認められた。しかし、これらの変化はその発現状況に群差が認められなかったこと、あるいは1例のみの発現であることから、被験物質と関連のない変化と考えられる。その他、腸間膜リンパ節では黄色色素の沈着、および骨髄では大腿骨における赤血球系造血細胞の増加を疑う変化がみられた。しかし、腸間膜リンパ節の色素はペルリンブルー陰性であったこと、これらの変化は対照群を含むすべての群で散見されたことから正常範囲の変化と考えられ、所見として採用しなかった。

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。なお、生殖器および免疫系に被験物質に起因すると考えられる変化は認められなかった。

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ともに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。受胎率が20 mg/kg群で低値傾向を示したが、100 mg/kg群では全例の受胎がみられていることから、被験物質と関連のない偶発的な変化と考えられる。

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。

100 mg/kg群の死亡動物では、妊娠22日より分娩が開始したが、翌日、分娩が完了する前に死亡した。娩出された児は胎盤が付着したまま（母動物による胎盤摂取不能）死亡している児も観察されたが、生存児および死亡児とも肉眼的な異常は認められなかった。分娩未了の動物が4 mg/kg群の雌1例で認められた。本動物は妊娠23日を経過しても分娩の徴候がみられず、妊娠24日より腔口出血および貧血様の症状を示したが、分娩には至らなかった。妊娠26日に剖検し、子宮内には死亡胎児が15匹遺残していた。20および100 mg/kg群では分娩未了の動物は認められず、偶発的な変化と考えられる。

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異常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。

(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

100 mg/kg群の雌1例が妊娠23日に死亡した。本動物は妊娠21日に流産、翌日には分娩を開始したが貧血様の症状および下腹部の汚れを示し、分娩が完了する前に死亡した。病理学検査の結果、後述する被験物質に起因する変化の他に、肝臓では肝細胞のびまん性萎縮、子宮では血栓、副腎では皮質の出血および束状帯皮質細胞の肥大、肺では出血および血栓、脾臓では白脾髄の萎縮、下顎リンパ節および腸間膜リンパ節では濾胞の萎縮、胸腺では急性萎縮などの変化が認められた。子宮および肺については血栓を示し播種性血管内凝固（DIC）様の变化が疑われ、さらに状態悪化を示唆するような萎縮性的変化が観察されている。妊娠末期にはしばしばDICを起こし、死亡あるいは状態悪化を示すことがあり、本動物もその可能性が考えられる。なお、被験物質との関連については少なからず影響しているものと思われるが、100 mg/kg群で本動物以外に状態悪化を示す動物、DICを疑うような動物が認められていないことから、被験物質に起因する死亡が否か明らかではなかった。その他、同群では雌雄とも投与後の流産が散見され、体重および摂餌量が低値で推移した。

病理学検査の結果、被験物質に起因する変化が雌雄の脾臓、肝臓、腎臓に認められた。脾臓における赤血球系髄外造血の亢進およびうっ血が100 mg/kg群の雌雄、ヘモジデリン色素の増加が100 mg/kg群の雄と4 mg/kg以上の群の雌、肝臓における赤血球系髄外造血が20 mg/kg以上の群の雌、クッパー細胞のヘモジデリン沈着が20 mg/kg以上の群の雌と100 mg/kg群の雄に認められた。これらの変化は赤血球の破壊に伴って認められ^{2, 3)}、さらに脾臓のヘモジデリン沈着は、溶血性貧血の際にしばしば認められる⁴⁾変化であり、被験物質により溶血性貧血を起こしている可能性が示唆される。この組織学検査結果を裏付ける変化として、血液学検査における赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低値ならびに網赤血球数の高値、血液生化学検査における総ビリルビンの高値が認められている。また、脾臓および肝臓では重量増加もみられ、血液学検査および器官重量とも病理組織変化を反映すると考えられる変化が認められた。回復後解剖動物では、上述の組織学的変化の程度が軽減したものの、その影響は完全には消失す

るものでなかった。

肝臓における小葉中心性肝細胞肥大が 100 mg/kg 群の雌雄全例に認められた。本所見は種々の化学物質の投与によってしばしば発現する変化で、一般に薬物代謝酵素誘導による生体の適応性変化と考えられている^{5,6)}。この変化は投薬を中止することで軽減するとされている⁶⁾。本試験の回復後解剖動物でこの変化は認められず、回復を示した。血液生化学検査においても肝機能障害に関連する項目に変化がないことなどから、本試験で認められた小葉中心性肝細胞肥大は適応性変化の可能性が高いと考えられる。

腎臓における近位尿細管の硝子滴沈着の増強が 20 mg/kg 以上の群の雄で認められた。硝子滴は、蛋白様物質が尿細管上皮に再吸収されることで発現する変化であり、雄ラットでは種々の化学物質投与によって α 2U グロブリンを含む硝子滴の発現が増強するとされている⁷⁾。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、 α 2U を含むものと考えられる。また、回復期間を経ることでその発現が軽減していることから、回復傾向を示したものと考えられる。一方、雌ラットでは、近位尿細管上皮の空胞化が 100 mg/kg 群、尿細管上皮の壊死と硝子滴沈着が死亡動物に認められたことから、被験物質による尿細管への障害性が示唆される。

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、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⁸⁾。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⁸⁾。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⁸⁾。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、1, 2-ジクロロ-4-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、反復投与毒性に関する NOEL および NOAEL は、雄動物では腎臓における近位尿細管の硝子滴沈着の増強が 20 mg/kg 以上の群で認められたことから 4 mg/kg/day、雌動物では脾臓におけるヘモジデリン色素の増加が 4 mg/kg 以上の群で認められたことから 4 mg/kg/day 未満と考えられる。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 100 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, 3, 4-ジクロロニトロベンゼン (Cas No.99-54-7), 東京化成工業株式会社, 2000.
- 2) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ. The lymphoid system. Spleen. In: Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ, editors. Atlas of experimental toxicological pathology. Lancaster: MTP press; 1987. p.130-1.
- 3) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ. The liver. Morphological lesions in the liver. Pigmentation. In: Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ, editors. Atlas of experimental toxicological pathology. Lancaster: MTP press; 1987. p.49-53.
- 4) 大滝サチ. 造血器. 非腫瘍性病変. 造血臓器の色素沈着. 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.393-5.
- 5) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ. The liver. Morphological lesions in the liver. Hypertrophy. In: Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ, editors. Atlas of experimental toxicological pathology. Lancaster: MTP press; 1987. p.53.
- 6) Greaves P. Digestive system 2. Liver. Hepatocellular hypertrophy and hyperplasia. In: Greaves P, editor. Histopathology of preclinical toxicity studies. 2nd. ed. Amsterdam: Elsevier; 2000. p.445-52.
- 7) Greaves P. Urinary system, Kidney. Hyaline droplets. In: Greaves P. editor. Histopathology of preclinical toxicity studies. 2nd.ed. Amsterdam: Elsevier; 2000. p.575-9.
- 8) 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

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

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

Correspondence

Authors :



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。

Kashima Laboratory

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

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	4	20	100	0	100
Male							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)		8.596 \pm 0.575	8.774 \pm 0.354	8.680 \pm 0.490	8.032 \pm 0.339	8.638 \pm 0.310	7.414 \pm 1.898
Hemoglobin(g/dL)		15.98 \pm 0.57	15.94 \pm 0.27	15.76 \pm 0.61	14.96 \pm 0.29**	15.46 \pm 0.54	13.54 \pm 3.59
Hematocrit(%)		47.04 \pm 1.92	47.62 \pm 0.65	46.64 \pm 2.02	45.58 \pm 0.90	44.56 \pm 1.88	40.24 \pm 10.27
Reticulocyte(%)		2.54 \pm 0.13	2.80 \pm 0.10	3.50 \pm 0.50*	5.12 \pm 0.79**	2.86 \pm 0.35	5.70 \pm 4.20
MCV(fL)		54.84 \pm 1.68	54.34 \pm 2.18	53.76 \pm 1.89	56.76 \pm 1.36	51.64 \pm 2.25	54.32 \pm 1.63
MCH(pg)		18.64 \pm 0.63	18.18 \pm 0.81	18.20 \pm 0.75	18.60 \pm 0.52	17.94 \pm 0.74	18.20 \pm 0.52
MCHC(%)		34.00 \pm 0.45	33.44 \pm 0.36	33.80 \pm 0.51	32.82 \pm 0.29**	34.70 \pm 0.42	33.48 \pm 0.65**
Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)		1288.2 \pm 314.7	1069.2 \pm 99.7	1221.4 \pm 102.8	1128.8 \pm 52.0	1078.8 \pm 123.3	1095.8 \pm 58.2
PT(sec)		19.08 \pm 3.71	22.14 \pm 4.76	20.78 \pm 1.76	16.74 \pm 1.97	18.52 \pm 1.39	20.80 \pm 2.57
APTT(sec)		19.56 \pm 1.56	19.66 \pm 1.69	18.94 \pm 1.42	17.70 \pm 1.47	19.72 \pm 1.48	20.16 \pm 2.23
WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)		9.326 \pm 1.997	9.344 \pm 1.725	9.432 \pm 2.784	12.014 \pm 2.128	7.272 \pm 1.658	9.750 \pm 3.286
Differential leukocyte counts (%)							
Lymphocyte		85.00 \pm 6.32	86.98 \pm 3.65	86.32 \pm 10.11	83.14 \pm 8.54	86.72 \pm 2.80	74.78 \pm 10.44
Neutrophilic Segmented		12.40 \pm 4.83	10.22 \pm 4.31	10.88 \pm 9.96	13.66 \pm 7.76	12.08 \pm 2.76	21.58 \pm 8.51*
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	0.82 \pm 1.83
Eosinophil		0.20 \pm 0.45	1.00 \pm 0.71	1.20 \pm 1.10	0.40 \pm 0.55	0.60 \pm 0.89	0.82 \pm 0.87
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		2.40 \pm 2.30	1.80 \pm 1.64	1.60 \pm 0.89	2.80 \pm 1.10	0.60 \pm 0.89	2.00 \pm 1.41
Female							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)		6.992 \pm 0.302	7.232 \pm 0.504	6.778 \pm 0.507	5.310 \pm 0.285**	7.958 \pm 0.295	7.570 \pm 0.267
Hemoglobin(g/dL)		13.54 \pm 0.47	13.92 \pm 0.54	13.18 \pm 0.52	11.40 \pm 0.32**	14.92 \pm 0.66	15.30 \pm 0.35
Hematocrit(%)		40.18 \pm 1.28	41.32 \pm 1.73	39.94 \pm 1.60	36.40 \pm 0.86**	41.80 \pm 1.30	43.50 \pm 0.47*
Reticulocyte(%)		7.02 \pm 0.87	6.78 \pm 2.33	8.02 \pm 2.73	18.76 \pm 2.69**	2.20 \pm 0.41	2.18 \pm 0.54
MCV(fL)		57.46 \pm 0.71	57.20 \pm 1.69	59.10 \pm 3.08	68.76 \pm 3.16**	52.54 \pm 0.93	57.48 \pm 1.51**
MCH(pg)		19.38 \pm 0.26	19.24 \pm 0.64	19.52 \pm 0.77	21.54 \pm 0.95**	18.76 \pm 0.31	20.22 \pm 0.41**
MCHC(%)		33.74 \pm 0.33	33.68 \pm 0.39	33.04 \pm 0.68	31.32 \pm 0.36**	35.72 \pm 0.52	35.20 \pm 0.60
Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)		1243.8 \pm 198.4	1378.6 \pm 143.2	1330.4 \pm 95.1	1157.8 \pm 86.5	1058.8 \pm 44.1	1182.6 \pm 86.8*
PT(sec)		16.62 \pm 0.87	16.34 \pm 0.61	17.04 \pm 0.59	16.48 \pm 0.44	15.40 \pm 0.44	16.02 \pm 0.48
APTT(sec)		15.38 \pm 0.69	14.82 \pm 0.82	14.78 \pm 0.61	14.56 \pm 0.34	15.02 \pm 0.88	15.86 \pm 0.86
WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)		10.066 \pm 1.978	9.486 \pm 1.839	11.482 \pm 1.884	11.826 \pm 1.889	4.614 \pm 1.310	4.386 \pm 0.937
Differential leukocyte counts (%)							
Lymphocyte		65.68 \pm 8.72	68.74 \pm 14.48	72.46 \pm 4.36	68.52 \pm 9.87	87.18 \pm 3.36	86.98 \pm 2.03
Neutrophilic Segmented		30.32 \pm 6.38	26.00 \pm 10.93	22.92 \pm 4.92	27.04 \pm 7.16	11.42 \pm 3.21	11.42 \pm 2.44
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		0.20 \pm 0.45	0.82 \pm 1.35	1.00 \pm 0.71	0.40 \pm 0.89	0.40 \pm 0.55	0.80 \pm 0.45
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		3.60 \pm 2.19	4.44 \pm 3.42	3.62 \pm 2.31	4.04 \pm 3.82	1.00 \pm 1.41	0.80 \pm 1.79

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

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	4	20	100	0	100
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	ASAT(U/L)	96.6 ± 25.3	83.0 ± 9.7	95.8 ± 29.8	93.0 ± 35.1	80.6 ± 5.0	113.8 ± 43.0
	ALAT(U/L)	22.0 ± 4.9	23.4 ± 6.3	60.8 ± 86.3	35.8 ± 34.3	26.4 ± 3.4	37.6 ± 20.2
	GT(U/L)	1.4 ± 1.1	2.0 ± 0.7	1.6 ± 0.5	2.4 ± 0.9	1.2 ± 0.8	1.4 ± 0.5
	ALP(U/L)	382.6 ± 120.3	393.8 ± 94.3	363.0 ± 43.7	340.2 ± 76.6	353.8 ± 84.6	305.2 ± 53.4
	Total bilirubin(mg/dL)	0.04 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Urea nitrogen(mg/dL)	11.78 ± 0.79	11.82 ± 1.28	11.10 ± 0.94	9.94 ± 0.89*	12.18 ± 2.06	11.00 ± 1.69
	Creatinine(mg/dL)	0.26 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.04
	Glucose(mg/dL)	138.6 ± 5.6	144.8 ± 16.2	142.4 ± 14.7	146.2 ± 5.0	142.2 ± 17.7	143.4 ± 21.2
	Total chol.(mg/dL)	50.0 ± 6.3	57.0 ± 16.2	54.0 ± 5.0	76.0 ± 22.4*	63.0 ± 9.2	64.6 ± 15.3
	Triglyceride(mg/dL)	21.4 ± 12.5	22.6 ± 3.8	19.4 ± 7.6	25.8 ± 7.6	40.4 ± 22.1	34.0 ± 12.1
	Total protein(g/dL)	6.74 ± 0.23	6.68 ± 0.28	6.80 ± 0.33	6.84 ± 0.44	6.72 ± 0.26	6.96 ± 0.29
	Albumin(g/dL)	3.02 ± 0.15	2.92 ± 0.13	3.06 ± 0.19	3.00 ± 0.14	2.92 ± 0.11	2.96 ± 0.15
	A/G ratio	0.808 ± 0.064	0.782 ± 0.043	0.820 ± 0.035	0.786 ± 0.032	0.776 ± 0.030	0.758 ± 0.125
	Calcium(mg/dL)	9.90 ± 0.25	9.90 ± 0.28	10.00 ± 0.16	10.26 ± 0.23	9.84 ± 0.30	10.00 ± 0.27
	Inorganic phos.(mg/dL)	7.76 ± 0.67	7.96 ± 0.62	7.70 ± 0.40	8.26 ± 0.34	7.14 ± 0.27	7.92 ± 0.38**
	Na(mmol/L)	147.4 ± 0.9	147.4 ± 0.9	147.2 ± 0.4	146.6 ± 0.5	146.2 ± 0.4	147.4 ± 0.5**
	K(mmol/L)	4.78 ± 0.30	4.42 ± 0.13	4.70 ± 0.16	4.72 ± 0.20	4.52 ± 0.11	4.64 ± 0.21
	Cl(mmol/L)	105.4 ± 0.5	105.4 ± 1.1	104.6 ± 0.9	103.0 ± 1.4**	104.0 ± 0.7	105.8 ± 1.1*
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	ASAT(U/L)	105.0 ± 20.7	90.4 ± 7.1	101.2 ± 11.1	116.8 ± 33.2	90.6 ± 16.9	69.0 ± 11.1*
	ALAT(U/L)	44.8 ± 16.5	33.0 ± 3.0	40.0 ± 5.8	42.2 ± 6.3	27.2 ± 12.4	21.0 ± 2.2
	GT(U/L)	1.6 ± 0.5	1.8 ± 0.8	2.0 ± 0.7	2.4 ± 0.5	1.6 ± 0.5	1.8 ± 0.8
	ALP(U/L)	260.2 ± 42.7	230.0 ± 63.0	259.2 ± 30.5	262.6 ± 63.2	207.4 ± 72.3	169.4 ± 53.7
	Total bilirubin(mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.04**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Urea nitrogen(mg/dL)	19.84 ± 2.01	17.10 ± 3.99	17.92 ± 1.10	20.10 ± 2.91	17.14 ± 1.98	16.54 ± 2.63
	Creatinine(mg/dL)	0.36 ± 0.09	0.34 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.32 ± 0.04
	Glucose(mg/dL)	120.8 ± 7.8	129.6 ± 4.8	119.6 ± 6.9	129.2 ± 12.5	129.2 ± 21.2	124.8 ± 16.3
	Total chol.(mg/dL)	70.2 ± 11.7	61.2 ± 6.2	59.2 ± 6.4	75.4 ± 7.7	74.8 ± 12.4	84.2 ± 23.7
	Triglyceride(mg/dL)	51.4 ± 23.1	41.2 ± 11.4	36.6 ± 26.7	47.2 ± 11.9	13.8 ± 4.8	17.4 ± 2.8
	Total protein(g/dL)	6.78 ± 0.48	6.98 ± 0.19	6.62 ± 0.13	6.62 ± 0.33	7.34 ± 0.29	7.66 ± 0.63
	Albumin(g/dL)	2.98 ± 0.33	3.24 ± 0.09	2.98 ± 0.11	3.04 ± 0.15	3.40 ± 0.19	3.52 ± 0.45
	A/G ratio	0.786 ± 0.065	0.860 ± 0.043	0.824 ± 0.034	0.842 ± 0.049	0.86 ± 0.037	0.846 ± 0.075
	Calcium(mg/dL)	10.86 ± 0.55	10.94 ± 0.38	10.90 ± 0.37	11.02 ± 0.16	9.90 ± 0.35	10.04 ± 0.24
	Inorganic phos.(mg/dL)	10.06 ± 1.26	9.78 ± 0.74	10.50 ± 1.35	10.00 ± 1.40	6.14 ± 0.59	6.44 ± 1.11
	Na(mmol/L)	144.0 ± 0.7	144.6 ± 0.5	144.8 ± 1.3	146.4 ± 0.9**	146.2 ± 1.3	145.6 ± 0.5
	K(mmol/L)	4.42 ± 0.08	4.64 ± 0.44	4.64 ± 0.05	4.32 ± 0.27	4.12 ± 0.16	4.30 ± 0.16
	Cl(mmol/L)	103.4 ± 1.1	102.6 ± 1.8	104.4 ± 0.5	102.2 ± 1.3	108.0 ± 0.7	106.4 ± 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 1,2-Dichloro-4-nitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level(mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	4	20	100	0	100
Male							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
Final body weight(g)		484.7 ± 53.0(7) ^{a)}	475.5 ± 37.1(12)	463.4 ± 36.3(12)	443.0 ± 25.9(7)	489.6 ± 46.8	485.6 ± 42.6
Absolute organ weight							
Brain(g)		2.126 ± 0.048	2.152 ± 0.080	2.126 ± 0.060	2.118 ± 0.111	2.150 ± 0.088	2.166 ± 0.107
Thymus(mg)		300.6 ± 88.0	415.2 ± 114.5	353.0 ± 76.4	312.6 ± 76.2	416.4 ± 116.5	339.6 ± 54.6
Heart(g)		1.590 ± 0.156	1.666 ± 0.203	1.510 ± 0.241	1.494 ± 0.108	1.698 ± 0.185	1.778 ± 0.125
Liver(g)		12.502 ± 2.161	12.920 ± 1.961	13.074 ± 1.346	14.502 ± 1.255	13.116 ± 1.455	13.190 ± 0.802
Spleen(g)		0.836 ± 0.089	0.864 ± 0.046	0.812 ± 0.187	1.060 ± 0.126*	0.822 ± 0.085	0.956 ± 0.117
Kidneys(g)		3.222 ± 0.224	3.130 ± 0.282	3.274 ± 0.243	3.422 ± 0.427	3.344 ± 0.209	3.392 ± 0.248
Adrenals(mg)		81.00 ± 7.03	71.92 ± 5.51	70.20 ± 14.34	66.84 ± 5.17	63.70 ± 2.39	65.24 ± 4.48
Testes(g)		3.424 ± 0.395(7)	3.453 ± 0.307(12)	3.288 ± 0.401(12)	3.467 ± 0.347(7)	3.446 ± 0.174	3.436 ± 0.437
Epididymides(g)		1.361 ± 0.132(7)	1.352 ± 0.133(12)	1.277 ± 0.156(12)	1.309 ± 0.085(7)	1.414 ± 0.086	1.374 ± 0.142
Relative organ weight							
Brain(g%)		0.456 ± 0.054	0.468 ± 0.057	0.480 ± 0.014	0.482 ± 0.034	0.442 ± 0.026	0.448 ± 0.033
Thymus(mg%)		63.62 ± 15.18	92.40 ± 33.49	79.50 ± 15.60	71.10 ± 18.68	84.36 ± 20.09	69.66 ± 6.30
Heart(g%)		0.340 ± 0.016	0.364 ± 0.053	0.338 ± 0.033	0.336 ± 0.013	0.348 ± 0.015	0.368 ± 0.025
Liver(g%)		2.654 ± 0.257	2.798 ± 0.269	2.948 ± 0.191	3.284 ± 0.067**	2.676 ± 0.118	2.722 ± 0.099
Spleen(g%)		0.180 ± 0.025	0.190 ± 0.025	0.182 ± 0.039	0.242 ± 0.034*	0.168 ± 0.013	0.198 ± 0.019*
Kidneys(g%)		0.692 ± 0.058	0.680 ± 0.058	0.738 ± 0.029	0.778 ± 0.111	0.690 ± 0.063	0.700 ± 0.062
Adrenals(mg%)		17.32 ± 1.47	15.62 ± 1.10	15.82 ± 2.82	15.18 ± 0.77	13.10 ± 1.11	13.48 ± 1.30
Testes(g%)		0.719 ± 0.134(7)	0.730 ± 0.094(12)	0.711 ± 0.089(12)	0.786 ± 0.101(7)	0.710 ± 0.067	0.712 ± 0.125
Epididymides(g%)		0.283 ± 0.033(7)	0.287 ± 0.040(12)	0.275 ± 0.031(12)	0.296 ± 0.029(7)	0.290 ± 0.022	0.284 ± 0.040
Female							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
Final body weight(g)		307.4 ± 14.5	299.6 ± 8.8	289.6 ± 13.7	288.0 ± 20.1	280.0 ± 17.0	277.0 ± 6.9
Absolute organ weight							
Brain(g)		2.000 ± 0.047	1.966 ± 0.071	1.954 ± 0.048	1.970 ± 0.019	1.994 ± 0.036	1.962 ± 0.039
Thymus(mg)		337.4 ± 128.6	292.4 ± 34.0	293.0 ± 68.5	268.6 ± 37.9	312.2 ± 30.3	366.0 ± 48.5
Heart(g)		1.052 ± 0.059	1.074 ± 0.080	1.026 ± 0.045	1.130 ± 0.111	0.986 ± 0.078	0.970 ± 0.045
Liver(g)		10.844 ± 0.990	10.572 ± 0.214	10.800 ± 0.852	11.808 ± 0.762	7.380 ± 0.382	8.034 ± 0.469*
Spleen(g)		0.784 ± 0.047	0.736 ± 0.062	0.826 ± 0.064	1.802 ± 0.353*	0.572 ± 0.063	0.588 ± 0.085
Kidneys(g)		2.042 ± 0.151	2.076 ± 0.092	2.034 ± 0.076	2.126 ± 0.119	1.880 ± 0.117	2.002 ± 0.154
Adrenals(mg)		75.90 ± 13.50	85.42 ± 15.43	81.94 ± 10.11	78.56 ± 6.39	69.78 ± 6.22	67.32 ± 8.86
Relative organ weight							
Brain(g%)		0.652 ± 0.035	0.654 ± 0.031	0.674 ± 0.015	0.686 ± 0.049	0.714 ± 0.047	0.708 ± 0.008
Thymus(mg%)		109.22 ± 39.70	97.60 ± 10.62	100.94 ± 22.56	93.56 ± 14.37	112.12 ± 15.62	132.00 ± 15.97
Heart(g%)		0.344 ± 0.017	0.360 ± 0.029	0.352 ± 0.011	0.394 ± 0.030**	0.354 ± 0.034	0.350 ± 0.019
Liver(g%)		3.528 ± 0.297	3.532 ± 0.117	3.728 ± 0.194	4.104 ± 0.150**	2.638 ± 0.113	2.902 ± 0.178*
Spleen(g%)		0.256 ± 0.021	0.246 ± 0.018	0.286 ± 0.023	0.622 ± 0.090*	0.206 ± 0.030	0.210 ± 0.028
Kidneys(g%)		0.668 ± 0.059	0.694 ± 0.024	0.702 ± 0.038	0.738 ± 0.050	0.672 ± 0.027	0.722 ± 0.065
Adrenals(mg%)		24.66 ± 4.04	28.54 ± 5.42	28.22 ± 2.26	27.36 ± 2.52	24.96 ± 2.24	24.32 ± 3.23

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

Sex		Administration period				Recovery period	
Organ	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	0	100
Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)					
Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Degeneration, myocardium, focal	1+	3			1		
Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Lymph node, mesenteric		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Spleen		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Congestion	1+	0	0	0	5	0	0
Increase, extramedullary hematopoiesis, erythrocytic	1+	0	0	0	1	0	1
Increase, hemosiderin pigment	1+	0	0	0	4	0	5
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		
Mineralization, arterial wall	1+	1			0		
Stomach		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Acinar cell like cell, glandular stomach	1+	0			1		
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>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Cell infiltration, inflammatory, focal	1+	3	4	2	0	4	2
Hemosiderin deposition, kupffer cell	1+	0	0	0	5	0	5
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	1+	0	0	0	5	0	0
Vacuolation, hepatocyte, perilobular	1+	0	1	0	0	0	0
Kidney		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Basophilic tubule, proximal tubule	1+	4	2	4	4	2	4
Cast, hyaline	1+	0	0	1	0	0	0
Cell infiltration, lymphocyte, interstitium	1+	1	0	3	1	0	1
Cell infiltration, lymphocyte, pelvis	1+	0	0	0	1	0	0
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	1+	1	2	3	0	0	4
	2+	0	0	1	5	0	0
Mineralization, medulla	1+	2	3	1	1	2	2
Urinary bladder		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Testis		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Degeneration, seminiferous tubular epithelium	1+	0			1		

<> : 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	4	20	100	0	100
Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)					
Epididymis		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<1>
Cell debris, duct	1+	0			1		1
Cell infiltration, lymphocyte, interstitium	1+	1			2		0
Granuloma, spermatic	1+	1			1		1
Seminal vesicle		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Prostate		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Cell infiltration, lymphocyte, interstitium	1+	5			2		
Coagulating gland		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
Ultimobranchial remnant	1+	2			3		
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		Death
			0	4	20	100	0	100	100
	Finding	Number of animals	12	11	8	11	5	5	1
Female			(Grade)						
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Degeneration, myocardium, focal	2+	1			1			0
	Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Atrophy, lymph follicle	1+	0			0			1
	Lymph node, mesenteric		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>
	Atrophy, lymph follicle	1+	0	0	0	0	0	0	1
	Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Atrophy, acute	2+	0			0			1
	Spleen		<5>	<5>	<5>	<9>	<5>	<5>	<1>
	Atrophy, white pulp	1+	0	0	0	0	0	0	1
	Congestion	1+	0	0	0	4	0	0	0
		2+	0	0	0	3	0	0	0
	Increase, extramedullary hematopoiesis, erythrocytic	1+	0	0	0	0	0	0	0
		2+	0	0	0	9	0	0	0
	Increase, hemosiderin pigment	1+	0	2	3	7	0	5	1
						**		**	
	Bone marrow, femur		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<0>
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Lung (and bronchus)		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Accumulation, foam cell, alveolus	1+	2			0			0
	Hemorrhage	1+	0			0			1
	Metaplasia, osseous	1+	0			1			0
	Thrombus	1+	0			0			1
	Stomach		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>
	Dilatation, fundic gland	1+	1	0	0	0	0	0	0
	Single cell necrosis, mucosa, glandular stomach	1+	0	0	1	2	0	0	0
		2+	1	0	0	0	0	0	0
	Small intestine, duodenum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>
	Small intestine, jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>
	Small intestine, ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>
	Large intestine, cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>
	Large intestine, colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Large intestine, rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Liver		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>
	Atrophy, hepatocyte, diffuse	1+	0	0	0	0	0	0	1
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1+	0	1	2	2	0	2	0
	Extramedullary hematopoiesis	1+	0	0	1	5	0	0	0
	Hemosiderin deposition, Kupffer cell	1+	0	0	1	3	0	5	1
		2+	0	0	0	2	0	0	0
	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	1+	0	0	0	5	0	0	0
	Necrosis, hepatocyte, focal	1+	0	0	0	1	0	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		Administration period				Recovery period		Death
Organ	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	0	100	100
Finding	Number of animals	12	11	8	11	5	5	1
Female		(Grade)						
Kidney		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>
Basophilic tubule, proximal tubule	1+	1	1	2	2	2	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0	0
	3+	1	0	0	0	0	0	0
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	2+	0	0	0	0	0	0	1
Mineralization, medulla	1+	1	3	2	1	4	3	0
Necrosis, tubule	4+	0	0	0	0	0	0	1
Vacuolation, proximal tubular epithelium	1+	0	0	0	4	*	0	0
Urinary bladder		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Ovary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Mineralization, focal	1+	0			1			0
Uterus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Thrombus	3+	0			0			1
Vagina		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Mammary gland		<0>	<1>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>
Cell infiltration, inflammatory, focal	1+		1					
Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Ectopic thymic tissue	1+	2			0			0
Ultimobranchial remnant	1+	4			3			0
Parathyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Adrenal		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Cell infiltration, inflammatory, reticular zone	1+	2			2			0
Hemorrhage, cortex	1+	0			0			1
Hypertrophy, cortical cell, fascicular zone	2+	0			0			1
Brain		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>
Necrosis, cerebellum	1+	0	0	0	1	0	0	0
Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>

<> : 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 1,2-Dichloro-4-nitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level(mg/kg)	Administration period			
	0	4	20	100
Number of pairs examined	12	12	12	12
Estrous cycle	4.00 ± 0.00	4.04 ± 0.14	4.03 ± 0.09	4.04 ± 0.14
Irregular estrous cycle	0/12	0/12	0/12	0/12
Number of pairs with successful mating	12	12	12	12
Mating index (%) ^{a)}	100.0	100.0	91.7	100.0
Number of pregnant females	12	12	8	12
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	72.7	100.0
Pairing days until mating	3.2 ± 2.0	2.5 ± 1.4	2.0 ± 1.2	3.3 ± 1.3
Number of estrous stages without mating	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.9	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 1,2-Dichloro-4-nitrobenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level(mg/kg)	Administration period			
	0	4	20	100
Number of females examined	12	12	8	11 ^{g)}
Number of females with live pups	12	11 ^{f)}	8	11
Gestation index (%) ^{a)}	100.0	91.7	100.0	100.0
Gestation length (days)	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.0 ± 0.0	22.3 ± 0.5
Number of corpora lutea	16.4 ± 1.5	16.1 ± 1.6	17.0 ± 1.4	15.3 ± 1.4
Number of implantation sites	15.7 ± 1.2	15.3 ± 1.3	15.6 ± 1.9	14.3 ± 1.3
Implantation index (%) ^{b)}	95.61 ± 4.23	95.07 ± 4.16	91.74 ± 6.62	93.61 ± 4.59
Delivery index (%) ^{c)}	92.12 ± 7.72	92.14 ± 5.77	96.19 ± 5.58	94.77 ± 10.03
Number of pups delivered	14.4 ± 1.5	13.9 ± 1.5	15.0 ± 1.9	13.5 ± 2.0
Number of live pups on day 0	14.4 ± 1.5	13.8 ± 1.4	15.0 ± 1.9	13.5 ± 2.0
Live birth index (%) ^{d)}	100.00 ± 0.00	99.44 ± 1.87	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
Sex ratio (male/female)	1.28(97/76)	1.47(91/62)	1.31(68/52)	1.08(77/71)
Number of live pups on day 4	14.2 ± 1.6	13.6 ± 1.5	14.8 ± 1.7	13.3 ± 1.8
Viability index on day 4 (%) ^{e)}	98.20 ± 3.29	98.64 ± 3.05	98.46 ± 2.86	98.83 ± 2.61
Body weight of pups (g)				
on day 0 male	6.6 ± 0.6	7.1 ± 0.6	6.5 ± 0.4	6.4 ± 0.7
female	6.2 ± 0.5	6.7 ± 0.6	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.7
on day 4 male	10.4 ± 0.8	11.5 ± 1.5	10.2 ± 0.6	10.0 ± 1.3
female	10.0 ± 0.8	10.8 ± 1.4	9.8 ± 0.7	9.5 ± 1.3

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

f) Incomplete delivery (one dam)

g) Death (one dam, Day 23 of gestation)

Values are expressed as Mean±S.D.

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