

---

1, 4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (CAS No. 89-61-2) のラットにおける  
経口投与による簡易生殖毒性試験

---

最 終 報 告 書

株式会社日本バイオリサーチセンター  
羽島研究所

NBR-1

# 目 次

	頁
要 約 .....	1
緒 言 .....	3
試験材料および試験方法	
1. 被験物質および媒体 .....	3
2. 投与検体および濃度確認 .....	3
3. 使用動物および飼育条件 .....	4
4. 投与経路、投与方法、群構成および投与量 .....	5
5. 観察および検査項目 .....	6
6. 統計学的方法 .....	9
試験成績	
I. 反復投与毒性	
1. 雄 (P) に及ぼす影響 .....	10
2. 雌 (P) に及ぼす影響 .....	11
II. 生殖発生毒性	
1. 親動物 (P) の生殖発生に及ぼす影響 .....	14
2. 新生児 (F <sub>1</sub> ) に及ぼす影響 .....	15
考 察 .....	16
資 料 .....	19
Table (1-1~15) .....	23
Fig. (1~5) .....	47

Table 1-1~1-2	General sign of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	23~24
Table 2	Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	25
Table 3	Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	26
Table 4	Necropsy finding of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	27
Table 5	Organ weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	28
Table 6	Histopathological finding of testis and epididymis of survival male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	29
Table 7-1	General sign of female rats (P) during pre-mating and mating periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	30
Table 7-2	General sign of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	31
Table 7-3	General sign of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	32
Table 8-1	Body weight of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	33

Table 8-2	Body weight of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	34
Table 8-3	Body weight of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	35
Table 9-1	Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	36
Table 9-2	Food consumption of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	37
Table 9-3	Food consumption of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	38
Table 10-1	Necropsy finding of survival dams (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	39
Table 10-2	Necropsy finding of dead dams (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	40
Table 11-1	Histopathological finding of survival dams (P) on day 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	41
Table 11-2	Histopathological finding of dead dams (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	42
Table 12	Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	43
Table 13	Observation of pups (F <sub>1</sub> ) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	44
Table 14	Body weight of pups (F <sub>1</sub> ) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	45

Table 15 Necropsy finding of pups (F <sub>1</sub> ) on day 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	46
Fig. 1 Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	47
Fig. 2 Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	48
Fig. 3-1 Body weight of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	49
Fig. 3-2 Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	50
Fig. 4-1 Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	51
Fig. 4-2 Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	52
Fig. 5 Body weight of pups (F <sub>1</sub> ) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration .....	53

## 要 約

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのラットにおける経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与段階は、0（媒体）、6、20、60 および 200 mg/kgとした。

### I. 反復投与毒性

#### 1. 雄（P）に及ぼす影響

一般状態：60 および 200 mg/kg群では、黄褐色尿および流涎が投与初期から最終投与日あるいは剖検日まで少数例～全例にみられた。その他に、200 mg/kg群では下腹部の被毛の汚れ、自発運動の低下、後肢の伸展などの症状が少数例～全例にみられた。

体重：200 mg/kg群では、投与期間の初期から有意な増加抑制が認められた。

摂餌量：各投与群とも対照群とほぼ同様の推移を示した。

剖検所見：200 mg/kg群では、精巣の小型・軟化が全例にみられた。

器官重量：200 mg/kg群では、精巣および精巣上体の絶対重量ならびに相対重量がともに有意な低値を示した。

病理組織学的検査：200 mg/kg群では、精巣の精細管上皮の変性を主体とする変化が全例にみられた。また、精巣上体では管腔内の残屑がみられた。

#### 2. 雌（P）に及ぼす影響

一般状態：60 および 200 mg/kg群では、黄褐色尿および流涎が投与初期から最終投与日あるいは剖検日まで少数例～全例にみられた。また、200 mg/kg群では下腹部の被毛の汚れ、自発運動の低下、よろめき歩行、腹臥あるいは横臥、呼吸緩徐、後肢の伸展、斜頸などの症状がみられ、妊娠期間中に 1 例（死亡胎児 13 例確認）、分娩途中に 1 例（死亡胎児 9 例確認）、哺育期間中に 4 例が死亡した。

体重：200 mg/kg群では、妊娠後期および哺育 4 日に、有意な増加抑制が認められた。

摂餌量：200 mg/kg群では、哺育期間に有意な低値が認められた。

剖検所見：生存例では、200 mg/kg群で胸腺および脾臓が小型化を示した。死亡例では、胸腺の小型化・暗赤色化、肺および肝臓の暗赤色化、脾臓の小型化、腺胃粘膜の暗赤色斑などの変化がみられた。

病理組織学的検査：対照群および200 mg/kg群の卵巣に、著変はみられなかった。200 mg/kg群の生存例では胸腺の萎縮、脾臓で白脾髄の細胞数減少が、死亡例では胸腺の萎縮・出血、脾臓のリンパ性萎縮・白脾髄辺縁帯の細胞数減少、肺および肝臓のうっ血、腺胃粘膜の潰瘍などの変化がみられた。

## II. 生殖発生毒性

### 1. 親動物 (P) の生殖発生に及ぼす影響

発情回数、交尾率および受胎率：雄側の交尾率および授胎率、雌側の交配開始前の発情回数、交尾率ならびに受胎率は、各投与群とも対照群と同程度であった。

妊娠期間、分娩状態および哺育行動：妊娠期間は、各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。分娩状態は対照群および 20 mg/kg以下の投与群では異常はみられなかった。一方、60 mg/kg群の 1 例では死産児のみの出産であった。また、200 mg/kg群では 1 例は妊娠 20 日に、1 例は分娩途中で死亡した。その他に、同群では 7 例で哺育行動の不良が観察された。

黄体数、着床痕数、着床率：各投与群とも対照群との有意差は認められなかった。

新生児出産雌数および出産率：各投与群とも対照群との有意差は認められなかった。

### 2. 新生児 (F<sub>1</sub>) に及ぼす影響

総出産児数、分娩率、死産児数、新生児数、出生率、性比、児の産出率：各投与群とも対照群との有意差は認められなかった。

哺育 4 日の生存児数：60 mg/kg以下の投与群は対照群とほぼ同程度であった。200 mg/kg群では有意差は認められなかったものの、低値であった。

外表観察：対照群および各投与群とも異常はみられなかった。

一般状態：200 mg/kg群の 7 例（哺育行動の不良がみられた母動物）の新生児では、表皮温下降が観察された。

哺育 4 日の生存率：60 mg/kg 以下の投与群では対照群とほぼ同程度であった。一方、200 mg/kg群では哺育期間中の新生児死亡数が多く、生存率は低値であり、有意差が認められた。

哺育 4 日の剖検所見：対照群および各投与群とも異常はみられなかった。

体重：200 mg/kg群では雌雄ともに哺育 0 ならびに 4 日とも低値であり、雄では両日とも有意差が認められた。

以上により、生殖発生毒性学的には 60 mg/kg以上の群で周産期（分娩）の母動物に、さらに 200 mg/kg群で授乳期（哺育行動）の母動物に影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、200 mg/kg群では新生児の発育に対する影響がうかがわれた。したがって、当試験条件下における生殖発生毒性学的な無影響量は、雄の生殖に関しては 200 mg/kg、雌の生殖に関しては 20 mg/kg、児動物の発生に関しては 60 mg/kgと推測された。

## 緒 言

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (CAS No. 89-61-2) が人に継続的に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS、Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test<sup>1)</sup> に従って、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンを雌雄ラットに 1 日 1 回、41~49 日間経口投与した簡易生殖毒性試験を実施し、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検討した。

なお、当物質の構造類縁化合物であるクロロニトロベンゼンにはメトヘモグロビン血症を惹起することが、ニトロベンゼン、ジニトロベンゼンおよびトリニトロベンゼンにはそれに加えて精巣毒性、中枢および末梢神経に対する作用、肝毒性などが知られている<sup>2, 3, 4, 5)</sup>。したがって、本物質も同様の毒性を有する可能性が考えられた。

## 試験材料および試験方法

### 1. 被験物質および媒体

被験物質の 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (CAS No. 89-61-2) は、分子量：192.0、融点：55 °C、沸点：267 °C で油溶性の固体である。当試験には、平成 5 年 9 月 8 日から提供されたものを用いた (Lot No. 純度：99.5 % 以上)。入手後は、遮光・気密条件下で試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温下で保管した。なお、投与終了後に残余被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は 99.5 % 以上であり、使用期間中は安定であったことが確認された。

媒体として、コーンオイルを用いた。コーンオイル (Lot No. 9360 および 1448、平成 5 年 10 月 8 日および平成 6 年 2 月 1 日購入、片山化学工業株式会社) は、入手後は試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温下で保管した。

### 2. 投与検体および濃度確認

被験物質を秤取し、コーンオイルに溶解して必要濃度の投与検体を調製した。なお、被験物質は純度換算しないで投与量は原体重量で表示した。

投与開始前および投与期間終了前の 2 回、試験施設内で液体クロマトグラフィーにより各投与検体液中の被験物質濃度を測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃度の 96.6~

102.6 %であり、設定した適正範囲（表示濃度の± 10 %）内の値を示した（Attached table 1、2）。

コーンオイル中の 2、20 および 200 mg/ml濃度の被験物質は、調製後冷蔵・遮光下で 7 日間、さらに室温・遮光下で 4 時間保存において安定であることが確認されている（Attached table 3）。そこで、当濃度範囲内の投与検体液の調製は 1 週間に 1 回以上とし、1 日分毎に分割して冷蔵・遮光下で保存し、用時室温に戻して投与に用いた。当濃度範囲外の濃度の投与検体液は用時調製とし、調製後は速やかに投与に用いた。なお、投与後の残余検体液は廃棄した。

### 3. 使用動物および飼育条件

#### 1) 動物種および系統

試験には、一般毒性試験および生殖・発生毒性試験に汎用され、自然発生奇形等の成績に関する知見が多く得られている Sprague-Dawley 系雌雄ラット [Crj: CD (SD)、(SPF)] を用いた。ラットは、平成 6 年 1 月 5 日に日本チャールス・リバー株式会社（日野飼育センター）から 8 週齢で雌雄各 73 匹を購入した。入手後 2 日の体重範囲は、雄で 303～347 g、雌で 176～215 gであった。

#### 2) 検疫および馴化、群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、5 日間の検疫期間およびその後 6 日間の馴化期間を設けた。この間に、3 回の体重測定および毎日一般状態の観察を、さらに雌は検疫・馴化期間中に 7 日間の性周期観察を行った。一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められない動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように、投与開始日の前日に行った。群分け後の残余動物は、初回投与日にエーテルで麻酔死させた後に廃棄処分した。

動物は、検疫・馴化期間中は動物入手日に油性インクおよび色素による染毛法を用いて、群分け後は色素による染毛法および耳パンチ法を併用して識別した。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日、性別および馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、投与量、性別および動物番号を記入し、群毎に色分けしたラベルを取り付けた。

#### 3) 動物飼育環境条件および飼育管理

動物は、室温 20～24 °C、湿度 40～70 %、明暗各 12 時間（照明：午前 6 時～午後 6 時）、換気回数 12 回/時（フィルターにより除菌した新鮮空気）に設定した飼育室（E 棟 1 号室）で飼育した。

検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージ（W：240×D：380×H：200 mm）を用いて

1 ケージあたり 4 匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ（W：755×D：210×H：170 mm）を用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。また、母動物は妊娠 18 日にオートクレーブ処理した床敷（サンフレック、日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチック製ケージ（W：310×D：360×H：175 mm）に個別に移し、自然分娩および哺育させた。ケージの受け皿、給水瓶およびプラスチック製ケージの交換は 1 週間に 2 回以上行い、ステンレス製懸垂式ケージ・五連ケージおよび給餌器の交換は 2 週間に 1 回以上行った。なお、動物飼育室の清掃（床の掃き掃除）および 500 倍希釈次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。

床敷の微量金属および汚染物質の分析結果は、ほぼ半年毎に財団法人日本食品分析センターで実施した成績を、日本チャールス・リバー株式会社から入手した。その結果、分析成績は当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

#### 4) 飼料および飲料水

飼料は、入手後 3 カ月以内の固型飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）を給餌器に入れ、自由に摂取させた。飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ 3 カ月毎に財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の検査の結果、いずれも試験成績は当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

### 4. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

#### 1) 投与経路および投与方法

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは、継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて強制経口投与した。投与液量は、雄では投与日に最も近い測定時の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日に最も近い測定時の体重を、妊娠期間中は妊娠 0、7、14 および 21 日の体重を、哺育期間中は哺育 0 日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。投与回数は 1 日 1 回とした。投与時刻は、午前 9 時 12 分～11 時 57 分の間であった。

#### 2) 群構成および投与量

群構成は、以下の表の如くとした。なお、一群の動物数は雌雄各 12 匹とした。

投与量設定の理由：雄ラットを用いた投与量設定のための 2 週間経口投与による予備試

験（投与段階：0、62.5、125、250、500 および 1000 mg/kg、一群 5 匹）の結果を参考として決定した。すなわち、1000 mg/kg 群では投与 4 日までに、500 mg/kg 群では投与 6 日までに全例が死亡した。250 mg/kg 群では、投与 3～9 日以降に流涎、尿の黄褐色化、下腹部（外部泌尿器周囲）の被毛の汚れなどの症状がみられ、体重は増加抑制傾向で剖検日には有意差が認められた。さらに、投与 14 日には 1 例が死亡し、剖検では精巣の小型化がみられた。また、125 mg/kg 群でも投与 4 日以降には流涎および尿の黄褐色化がみられた<sup>6)</sup>。

そこで、今回の試験では投与期間を考慮して、予備試験で一般状態、体重および剖検に影響がみられた 250 mg/kg をやや下まわる 200 mg/kg を最高用量とし、以下公比約 3 で 60、20 および 6 mg/kg 群を設定した。なお、対照として媒体（コーンオイル）投与群を設けた。

群	試験群	投与量 (濃度)	雄 (動物番号)	雌 (動物番号)
第 1 群	対照 (コーンオイル)	0 mg/kg (0 %)	12 (001～012)	12 (051～062)
第 2 群	1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン	6 mg/kg (0.12 %)	12 (101～112)	12 (151～162)
第 3 群	1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン	20 mg/kg (0.4 %)	12 (201～212)	12 (251～262)
第 4 群	1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン	60 mg/kg (1.2 %)	12 (301～312)	12 (351～362)
第 5 群	1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン	200 mg/kg (4 %)	12 (401～412)	12 (451～462)

### 3) 投与期間

投与期間は、OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test に従って、雄では交配前 14 日間およびその後 35 日間（合計 49 日間）、雌では交配前 14 日間、交配期間中（最長 6 日間）、妊娠期間中および哺育 4 日の剖検の前日（41～46 日間）までとした。

## 5. 観察および検査項目

### 1) 雄 (P)

#### (1) 一般状態および死亡の有無の観察

一般状態および死亡の有無を、投与期間中は毎日投与前・後の 2 回（ただし、剖検日は剖検前 1 回）観察した。

#### (2) 体重測定

体重は、毎週 2 回（投与初日を 1 日とし、投与 1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、43、46 日）および剖検日（50 日）に測定した。

#### (3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前 14 日間および交配期間終了後から毎週 2 回、連続 2 日間量を測定し、1 日量に換算した。なお、測定開始日に給餌量を、終了日には残量を測定し、摂

餌量の表示は残量の測定日（3、6、10、13、24、27、31、34、38、41、45、48 日）とした。

#### (4) 剖 検

投与期間（49 日間）終了の翌日に、エーテル麻酔下で腹大動脈の切断により放血致死させた後に剖検した。剖検時に、精巣および精巣上体を摘出して重量を測定し、ブアン液に固定し、保存した。

#### (5) 病理組織学的検査

精巣および精巣上体は、全例について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。なお、最高用量群の精巣および精巣上体には被験物質の投与に起因すると思われる組織変化が観察されたため、全例の H-E 染色組織標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

### 2) 雌（P）

#### (1) 一般状態および死亡の有無の観察

一般状態および死亡の有無を、投与期間中は毎日投与前・後の 2 回（ただし、剖検日は剖検前 1 回）観察した。死亡例（No. 453、455、458、459、461、462）は発見後速やかに剖検して着床痕数および黄体数を数え、子宮および卵巣ならびに異常の認められた器官・組織、および胎児は 10 % 中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (2) 性周期観察

性周期を、投与開始日から交尾確認日まで毎日 1 回観察した。なお、発情期が連続 2 日間にわたって観察される場合は 1 回と計数した。

#### (3) 体重測定

体重を、交配開始前 14 日間および交配期間中は毎週 2 回（投与初日を 1 日とし、投与 1、4、8、11、15 および 18 日）、妊娠期間中は妊娠 0、7、14 および 21 日に、哺育期間は哺育 0 および 4 日にそれぞれ測定した。

#### (4) 摂餌量測定

摂餌量を、交配開始前 14 日間までは毎週 2 回、連続 2 日間量を測定（3、6、10 および 13 日）して 1 日量に換算した。また、妊娠期間中は妊娠 0、7、14 および 19 日からの連続 2 日間量を、哺育期間中は哺育 0～4 日の累積量を測定し、それぞれ 1 日量に換算した。なお、測定開始日には給餌量を、終了日には残量を測定し、摂餌量の表示は残量の測定日とした。

#### (5) 分娩状態の観察

母動物は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前 10 時まで毎日行った。午前 10 時までに分娩が終了していた場合、その日を哺育 0 日とした。

#### (6) 交尾確認後 25 日の午前 10 時までに分娩しない動物の処置

交尾確認後 25 日の午前 10 時までに分娩がみられなかった動物は、エーテル麻酔下で腹大動脈の切断により放血致死させた後に剖検し、妊娠の成否を確認した。着床がみられなかった雌（No. 053、256、460）は、不妊動物とした。当例では子宮および卵巣を摘出して、10 % 中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (7) 哺育状態の観察および剖検

哺育状態を哺育 4 日まで毎日観察し、哺育 4 日にエーテル麻酔下で腹大動脈の切断により放血致死させた後に剖検し、着床痕数および黄体数を数えた。子宮、卵巣および剖検で異常の認められた器官・組織を摘出して、10 %中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (8) 全新生児が死亡した母動物の処置

全新生児が死亡した母動物 (No. 155、454、457) は、発見後速やかにエーテル麻酔下で腹大動脈の切断により放血致死させた後に剖検し、着床痕数および黄体数を数えた。子宮および卵巣を摘出して、10 %中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (9) 病理組織学的検査

卵巣は、全例について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。その後、対照群および 200 mg/kg群については H-E 染色組織標本を作製し、病理組織学的検査を行った。さらに、剖検時に異常が認められた器官・組織 (胸腺、肺、肝臓、脾臓、胃) の代表例についても同様に観察した。

### 3) 親動物 (P) の生殖行動に及ぼす影響

14 日間にわたって被験物質を投与し、ほぼ 12 週齢の同一群内の雌雄を 1 対 1 の組み合わせで、同居交配した。交配期間は 14 日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配としたが、同居開始後 6 日までに全例の交尾が確認された。

なお、交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、膣垢内に精子または膣栓を確認した雌を交尾動物として、その日を妊娠 0 日として起算した。

### 4) 新生児 (F<sub>1</sub>)

#### (1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。死産児は、10 %中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (2) 新生児の観察

新生児は、一般状態および死亡の有無を生存期間中毎日 1 回観察した。死亡児および母動物が死亡した場合 (No. 455: 分娩途中、No. 453、459、461、462: 哺育期間中) の全新生児は、剖検後に 10 %中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (3) 体重

体重を、哺育 0 (出生日) および 4 日に測定した。

#### (4) 剖検

哺育 4 日の観察終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後、剖検した。

## 6. 統計学的方法

測定値の統計学的方法は下記の検定法を用い、有意差検定は対照群と 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの各投与群との間で行った。いずれの検定の場合も危険率 5 %未満を有意とし、5 %未満 ( $p < 0.05$ ) と 1 %未満 ( $p < 0.01$ ) とに分けて表示した。不妊動物 (No. 053、256、460) については、交尾後の体重および摂餌量は集計から除外した。また、分娩途中で死亡した母動物 (No. 455) の新生児については、集計から除外した。なお、新生児は一腹の平均を一単位とした。

### 1) 多重比較検定

Bartlett 法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較は Dunnett 法 (例数が等しい場合) または Scheffé 法 (例数が等しくない場合) により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析 (Kruskal-Wallis の検定) を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用した Dunnett 法 (例数が等しい場合) または Scheffé 法 (例数が等しくない場合) を用いて行った。

体重 (親動物、新生児)、摂餌量、発情回数、同居日数、妊娠期間 = [分娩日 (哺育 0 日) - 交尾確認日]、着床痕数、総出産児数 = (新生児数 + 死産児数)、新生児数、死産児数、分娩率 = [(総出産児数 / 着床痕数) × 100]、児の産出率 = [(哺育 0 日の新生児数 / 着床痕数) × 100]、黄体数、着床率 = [(着床痕数 / 黄体数) × 100]、出生率 = [(哺育 0 日の新生児数 / 総出産児数) × 100]、哺育 4 日の生存率 = [(哺育 4 日の新生児数 / 哺育 0 日の新生児数) × 100]、性比 = (雄 / 雄 + 雌)、外表異常出現率 = [(外表異常児数 / 新生児数) × 100]、器官重量 (相対重量を含む)。

### 2) $\chi^2$ 検定

交尾率 = [(交尾成立動物数 / 同居動物数) × 100]、受胎率 = [(妊娠雌数 / 交尾成立動物数) × 100]、出産率 = [(新生児出産雌数 / 妊娠雌数) × 100]。

## 試 験 成 績

### I. 反復投与毒性

#### 1. 雄 (P) に及ぼす影響

##### 1) 一般状態 (Table 1-1~1-2、Appendix 1-1~1-10)

対照群および 20 mg/kg以下の投与群では、観察期間を通じて異常症状は観察されなかった。

60 mg/kg 群では、黄褐色尿が投与 11 日の投与前から少数例にみられた。黄褐色尿を示す例数は投与の継続により徐々に増加し、投与 16 日からは剖検日まで全例にみられた。また、流涎が投与 11 日の投与直後には少数例に、その後は最終投与日まで少数例~過半数例にみられた。なお、流涎は翌日の投与前には消失していた。

200 mg/kg群では、60 mg/kg 群でみられた黄褐色尿および流涎の他に、下腹部の被毛の汚れ、後肢の伸展、自発運動の低下がみられた。黄褐色尿は、投与 2 日の投与前から剖検日まで全例にみられた。流涎は初回投与直後には少数例に、投与 2 日には投与直後にほぼ全例に、投与 3 日からは最終投与日まで投与直後に全例でみられた。なお、流涎は翌日の投与前には消失していた。下腹部の被毛の汚れは投与 10 日には少数例に、その後は投与の継続により例数が徐々に増加し、投与 26 日からは剖検日まで全例にみられた。後肢の伸展は投与 19 日から 25 日にかけて、当日の投与前から投与後にかけて少数例にみられた。自発運動の低下は、投与 34 日から最終投与日まで投与後に少数例~ほぼ全例でみられた。その他には、異常症状は観察されなかった。

##### 2) 体 重 (Table 2、Fig. 1、Appendix 2-1~2-5)

200 mg/kg群では投与期間の初期から対照群に比して体重増加抑制がみられ、投与 8 日から剖検日まで有意差が認められた。同群では、ほぼ全例で投与 15 日から剖検日にかけて前回測定値に比して体重減少を示す日が 1~6 回みられた。一方、60 mg/kg 以下の投与群は対照群とほぼ同様の推移を示した。

### 3) 摂餌量 (Table 3、Fig. 2、Appendix 3-1~3-5)

各投与群とも摂餌量は対照群とほぼ同程度であり、いずれの測定日にも有意差は認められなかった。しかしながら、個別的には 200 mg/kg群に対照群の値のほぼ半量に留まる例が、投与期間の中期以降に散見された。

### 4) 剖検所見 (Table 4、Appendix 4-1~4-5)

200 mg/kg群では、両側の精巣の小型化および軟化が全例にみられた。20 mg/kg群の 1 例 (No. 206) でも同様の所見が得られた他に、対照群の 1 例 (No. 003) では両側の精巣および精巣上体の軟化がみられた。その他の投与群では、著変はみられなかった。

### 5) 器官重量 (Table 5、Appendix 5-1~5-5)

200 mg/kg群では、対照群に比して精巣および精巣上体の絶対重量ならびに相対重量がともに有意な低値を示した。60 mg/kg以下の投与群では、対照群とほぼ同程度であり有意差は認められなかった。なお、個別的には剖検で精巣に異常がみられた対照群および 20 mg/kg群の各 1 例で、精巣および精巣上体重量が同群の他の例に比して低値であった。

### 6) 病理組織学的検査 (Table 6、Appendix 6-1~6-5)

精巣：軽度～中等度の精細管上皮の変性およびごく軽度～軽度の間質の水腫が、200 mg/kg群の全例にみられた。これらの内、ほぼ全例はごく軽度～軽度の間細胞増生を、半数例は精細管内にごく軽度～軽度の巨細胞形成を伴っていた (Photo. 1)。なお、対照群の 1 例では中等度の精細管上皮の変性、ごく軽度の間質の水腫およびごく軽度の間細胞増生が、20 mg/kg 群の 1 例では高度の精細管上皮の変性、軽度の間質の水腫および軽度の間細胞増生がみられた。6 および 60 mg/kg群では、著変はみられなかった。

精巣上体：管腔内における軽度～中等度の残屑が 200 mg/kg群の過半数例にみられた。対照群および 20 mg/kg群の各 1 例では、管腔内における高度の精子消失がみられた。また、6 mg/kg群の 1 例では軽度の精子肉芽腫がみられた。60 mg/kg群では、著変はみられなかった。

## 2. 雌 (P) に及ぼす影響

### 1) 一般状態

#### (1) 交配開始前および交配期間中 (Table 7-1、Appendix 7-1~7-5)

対照群および 20 mg/kg以下の投与群では、交配開始前および交配期間中を通じて異常症状は観察されなかった。

60 mg/kg群では、黄褐色尿が投与 11 日の投与前から交配終了日まで約半数例～全例にみられた。また、流涎が投与 11 日の投与直後から交配開始日まで少数例にみられた。なお、流涎は翌日の投与前には消失していた。

200 mg/kg群では、60 mg/kg群で観察された黄褐色尿および流涎の他に、下腹部の被毛の汚れがみられた。黄褐色尿は、投与 2 日の投与前から交配終了日まで全例にみられた。流涎は、投与初日の投与直後には少数例に、その後は交配終了日まで過半数例～全例にみられた。なお、流涎は翌日の投与前には消失していた。下腹部の被毛の汚れは、交配期間中に半数例～全例でみられた。

(2) 妊娠期間中 (Table 7-2, Appendix 8-1~8-5)

対照群および 20 mg/kg以下の投与群では、妊娠期間中に異常症状は観察されなかった。60 mg/kg群では、交配開始前および交配期間中にみられた症状が引き続いて観察された。すなわち、黄褐色尿が全例に、流涎が投与直後から少数例～約半数例にみられた。なお、流涎は翌日の投与前には消失していた。

200 mg/kg群では、妊娠 20 日および妊娠 22 日 (分娩途中) に各 1 例が死亡した。当群では、交配開始前および交配期間中にみられた症状に加えて自発運動の低下、よろめき歩行、腹臥あるいは横臥、呼吸緩徐、後肢の伸展、斜頸などがみられ、死亡発現もあった。黄褐色尿は、全例にみられた。流涎は投与直後から全例にみられたが、翌日の投与前には消失していた。下腹部の被毛の汚れは、少数例～全例にみられた。これらの症状以外に、1 例 (No. 458) では妊娠 18 および 19 日には投与前から自発運動の低下がみられ、妊娠 20 日の投与前に死亡していた。また、他の 1 例 (No. 455) では妊娠 22 日には投与前から自発運動の低下、後肢の伸展、斜頸が、投与後にはさらに腹臥、呼吸緩徐もみられ、妊娠 23 日 (分娩途中) の投与前に死亡していた。1 例 (No. 462) は、妊娠 21 日には投与前から自発運動の低下、よろめき歩行、斜頸がみられ、投与後にはよろめき歩行および自発運動の低下に代わって腹臥および呼吸緩徐がみられた。

(3) 哺育期間中 (Table 7-3, Appendix 9-1~9-5)

対照群および 20 mg/kg以下の投与群では、哺育期間を通じて異常症状は観察されなかった。

60 mg/kg群では、黄褐色尿が哺育 4 日の剖検日まで全例にみられた。また、流涎が投与直後に哺育 2 日まで少数例にみられたが、翌日の投与前には消失していた。1 例 (No. 356) では出産児は死産児のみで新生児が得られなかったため、哺育 0 日に剖検した。

200 mg/kg群では、哺育期間中に 4 例が死亡した。当群では、妊娠期間中と同様の症状が観察された。すなわち、黄褐色尿は剖検日まで全例にみられた。流涎は投与直後にほぼ全例にみられたが、翌日の投与前には消失していた。下腹部の被毛の汚れは、剖検日まで約半数例～少数例にみられた。妊娠期間中から腹臥、呼吸緩徐などの症状を示した 1 例 (No. 462) では、哺育 0 日の投与前から横臥、呼吸緩徐、表皮温下降が、投与後も同様の症状が引き続いてみられ、午後の観察時には死亡していた。1 例 (No. 459) は、哺育 0 日には投与前から自発運動の低下がみられ、哺育 1 日には死亡していた。1 例 (No. 461) では、哺育 0 日の投与前から自発運動の低下が、投与後には腹臥、呼吸緩徐がみられ、哺育 1 日には死亡していた。1 例 (No. 453) では、哺育 0 日の投与前から自発運動の低下が、哺育 1 日の投与前にはさらによろめき歩行、呼吸緩徐、後肢の伸展が、投与後には自発運動の低下およびよろめき歩行に代わって腹臥がみられ、哺育 2 日には死亡していた。その

他に、哺育完了例 (No. 451、452、456) でよろめき歩行、自発運動の低下などが、哺育 1～3 日の投与前から哺育 4 日の剖検前まで 1～3 例にみられた。また、2 例 (No. 454、457) では哺育 0～2 日あるいは哺育 1～3 日に自発運動の低下、よろめき歩行などがみられ、前者は哺育 2 日に、後者は哺育 3 日に、いずれも新生児の全例が死亡したため、母動物を剖検した。

## 2) 体重 (Table 8-1～8-3、Fig. 3-1～3-2、Appendix 10-1～10-5、11-1～11-5、12-1～12-5)

交配前の投与期間中では、各投与群とも対照群とほぼ同様の推移を示した。一方、妊娠期間以降では 200 mg/kg群は増加抑制傾向であり、妊娠 14 および 21 日ならびに哺育 4 日には対照群に比して有意差が認められた。同群では、哺育 4 日の体重は生存した 3 例とも、哺育 0 日の体重よりも減少した。60 mg/kg 以下の投与群では、妊娠期間中および哺育期間中とも対照群とほぼ同様の推移を示した。

## 3) 摂餌量 (Table 9-1～9-3、Fig. 4-1～4-2、Appendix 13-1～13-5、14-1～14-5、15-1～15-5)

交配前および妊娠期間中の摂餌量は、各投与群とも対照群とほぼ同様の推移を示した。一方、哺育期間中では 20 および 60 mg/kg群はやや高値、200 mg/kg群は低値であり、200 mg/kg群では対照群に比して有意差が認められた。なお、個別的には 200 mg/kg群で妊娠 21 日では 1 例 (No. 462) の摂餌量は対照群の値のほぼ半量であり、哺育期間中では 1 例 (No. 452) でほとんど摂餌が認められなかった。

## 4) 剖検所見

### (1) 生存例 (Table 10-1、Appendix 16-1～16-5)

200 mg/kg群 (6 例) では胸腺の小型化が 5 例にみられ、その内の 1 例は脾臓の小型化を伴った。また、60 mg/kg 群の 1 例 (No. 356、死産児のみの出産例) では肝臓の白色化がみられた。対照群および 20 mg/kg以下の投与群では、著変はみらなかった。

### (2) 死亡例 (Table 10-2、Appendix 16-5)

200 mg/kg群の 6 例中 5 例では、胸腺の小型化、暗赤色化、肺の暗赤色化、肝臓の暗赤色化、脾臓の小型化および腺胃粘膜の暗赤色斑などの変化がみられた。なお、妊娠 20 日の死亡例では著変は見られなかった。

## 5) 病理組織学的検査

### (1) 生存例 (Table 11-1、Appendix 17-1～17-2)

卵巣：対照群および 200 mg/kg群のいずれの例とも著変はみられなかった。

胸腺：剖検で小型化を示した 2 例で、軽度～中等度の萎縮がみられた (Photo. 2)。

脾臓：剖検で小型化を示した 1 例では、中等度の白脾髄の細胞数減少がみられた。

## (2) 死亡例 (Table 11-2、Appendix 17-2)

卵巣：200 mg/kg群のいずれの例とも著変はみられなかった。

胸腺：剖検で小型化および暗赤色化を示した 1 例では、中等度の萎縮と軽度の出血がみられた。

脾臓：剖検で小型化を示した 2 例では、1 例で中等度のリンパ性萎縮が、1 例で白脾髄辺縁帯の軽度の細胞数減少がみられた。

肺：剖検で暗赤色化を示した 1 例では、中等度のうっ血がみられた。

肝臓：剖検で暗赤色を示した 1 例では、軽度のうっ血がみられた。

胃：剖検で腺胃粘膜の暗赤色斑がみられた 1 例では、腺胃粘膜の軽度の潰瘍がみられた (Photo. 3)。

その他に、死亡例では各器官・組織に死後変化が観察された。

## II. 生殖発生毒性

### 1. 親動物 (P) の生殖発生に及ぼす影響 (Table 12、Appendix 18-1~18-5、Table 13-1~13-2、Appendix 19-1~19-15)

#### 1) 発情回数

発情回数は、検疫・馴化期間の内の 7 日間および投与期間中ともに各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

#### 2) 交尾率および受胎率

対照群を含む各群の動物とも、同居開始後 6 日までに全例で交尾が確認された。交尾率は、対照群および各投与群とも 100 %であった。交尾成立までの平均日数には、対照群と各投与群の間に有意差は認められなかった。

受胎雌数は、対照群、20 および 200 mg/kg群では 12 例中 11 例であり、6 および 60 mg/kg群では 12 例中 12 例であった。したがって、受胎率は対照群、20 および 200 mg/kg群では 91.7 %であり、6 および 60 mg/kg群では 100 %であり、各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 3) 妊娠期間、分娩状態および哺育行動

妊娠期間は各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、対照群との間に有意差は認められなかった。

なお、前述の如く妊娠 20 日には 200 mg/kg群の 1 例 (No. 458) が死亡した。また、同群の他の 1 例 (No. 455) は分娩途中で死亡した。

母動物の哺育状況の観察では、20 および 60 mg/kg群では異常はみられなかった。一方、6 mg/kg群の 1 例 (No. 155) では哺育 1~2 日に、200 mg/kg群の 2 例 (No. 454、457) で

は哺育 1~2 日あるいは哺育 1~3 日に乳頭の発達不良、巣作り不良および授乳姿勢不良などの哺育行動の不良がみられ、これらの例では哺育 3 日までに新生児の全例が死亡した。なお、対照群の 1 例 (No. 051) では哺育 0 日に、200 mg/kg 群の 1 例 (No. 452) では哺育 1~4 日に哺育行動の不良が観察されたが、新生児の全例死亡には至らなかった。さらに、200 mg/kg 群の 4 例 (No. 453、459、461、462) でも哺育 0 日あるいは哺育 1 日に哺育行動の不良がみられ、いずれの母動物とも哺育 2 日までに死亡した。また、60 mg/kg 群の 1 例 (No. 356) では新生児はみられず、全例 (7 例) が死産児であった。

#### 4) 黄体数、着床痕数および着床率

黄体数は対照群が 16.9 に対して各投与群では 16.2~18.3 であった。着床痕数は、対照群が 15.3 に対して各投与群では 15.2~16.2 であった。着床率は、対照群が 90.5 % に対して各投与群では 85.0~94.3 % であった。いずれの指標とも各投与群で明確な用量依存性はみられず、対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 5) 新生児出産雌数および出産率

新生児出産雌数は、対照群および 20 mg/kg 群は 11 例中 11 例、6 mg/kg 群は 12 例中 12 例で、出産率はいずれも 100 % であった。60 mg/kg 群では、12 例中 11 例で 91.7 % であった。また、200 mg/kg 群は受胎雌数は 12 例中 11 例であったが、その内の 1 例は妊娠 20 日に死亡し、1 例は分娩途中で死亡したため、新生児出産雌数は 9 例中 9 例で出産率は 100 % であった。

## 2. 新生児 (F<sub>1</sub>) に及ぼす影響 (Table 13、14、15、Fig. 5、Appendix 19-1~19-15、Appendix 20-1~20-5)

### 1) 総出産児数、分娩率、死産児数、新生児数および出生率

総出産児数は、対照群が 13.8 に対して各投与群では 13.6~15.0 であった。また、分娩率は対照群が 90.7 % に対して各投与群では 84.4~92.9 % であった。死産児数は対照群が 0.5 に対して各投与群では 0.3~1.3 であった。新生児数は対照群が 13.4 に対して各投与群では 12.6~14.7 であった。また、出産児数に対する哺育 0 日の新生児数を示す出生率は、対照群が 96.5 % に対して各投与群では 88.9~98.3 % であった。いずれの指標とも対照群との間に有意差は認められず、また明確な用量依存性はみられなかった。

### 2) 性比、児の産出率および外表異常の観察

性比は、対照群が 0.52 に対して各投与群では 0.48~0.61 であった。着床痕数に対する哺育 0 日の新生児数を示す児の産出率は、対照群が 87.5 % に対して各投与群では 78.2~91.2 % であった。いずれの指標とも対照群との間に有意差は認められなかった。また、新生児の外表観察では、いずれの例も異常はみられなかった。

### 3) 新生児の一般状態、哺育 4 日の生存率および剖検所見

新生児の一般状態観察では、対照群、20 および 60 mg/kg群では、いずれも異常はみられなかった。対照群以外で哺育行動の不良が認められた母動物、すなわち 6 mg/kg群の 1 例 (No.155)、200 mg/kg群の 7 例 (No.452、453、454、457、459、461、462) の新生児では、哺育 0 日、哺育 1 日、哺育 0~1 日、哺育 1~2 日、あるいは哺育 1~4 日に表皮温下降が観察された。

哺育 4 日の剖検日までに、対照群では 1 母動物で 1 例 (雄)、6 mg/kg群では 4 母動物で 12 例 (雄 7 例、雌 5 例)、20 mg/kg 群では 2 母動物で 2 例 (雄)、60 mg/kg 群では 2 母動物で 2 例 (雄) の新生児が死亡した。また、200 mg/kg群では新生児を出産した母動物は 9 例であり、その内で哺育期間中に生存した母動物は 5 例であった。しかしながら、その内の 2 例 (No.454、457) では新生児の全例が哺育期間中に死亡したため、哺育 4 日まで新生児を哺育した母動物は 3 例 (No.451、452、456) のみであった。同群では哺育 4 日の剖検日までに哺育期間中に生存した 5 母動物 (No.451、452、454、456、457) で 42 例 (雄 25 例、雌 17 例) の新生児が死亡した。したがって、哺育 4 日の生存率は対照群が 99.5 %であり、60 mg/kg 以下の投与群では 89.4~98.8 %とほぼ同程度であった。一方、200 mg/kg群では 34.4 %で、有意な低値を示した。なお、哺育 4 日の新生児数は対照群が 13.3、60 mg/kg以下の投与群が 11.8~14.5 に対して、200 mg/kg群では 4.0 と低値であったが、有意差は認められなかった。

哺育 4 日の剖検では、いずれの生存児にも著変はみられなかった。

### 4) 新生児の体重

60 mg/kg 以下の投与群の新生児の体重は、哺育 0 日および 4 日ともに、雌雄とも対照群とほぼ同程度であった。一方、200 mg/kg群では雌雄とも両日ともに低値であり、雄では哺育 0 日および 4 日ともに対照群に比して有意差が認められた。

### 5) 未分娩胎児

前述の如く、200 mg/kg群では妊娠 20 日に 1 例 (No.458) および分娩途中に 1 例 (No.455) が死亡した。剖検により、前者では雄 7 例と雌 6 例の死亡胎児が確認された。また、後者では雄 4 例と雌 3 例の新生児出産後に母動物が死亡したため、剖検したところ雄 5 例と雌 4 例の死亡胎児が確認された。

## 考 察

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンのラットを用いた簡易生殖毒性試験を実施した。投与段階は 200 mg/kgを最高用量とし、以下 60、20 および 6 mg/kgとした。

雄（P）に対しては、一般状態、体重、剖検および病理組織学的検査に変化が認められた。一般状態では、60 mg/kg以上の投与群で投与後に流涎がみられたが、翌日の投与前には消失しており、一過性の症状であった。60 mg/kg以上の投与群でみられた黄褐色尿は、被験物質あるいはその代謝物の尿からの排泄に関連した変化と推察された。下腹部の被毛の汚れは、黄褐色尿の繰り返しの排泄に伴った変化と思われた。また、投与後にみられた自発運動の低下は翌日の投与前には消失しており、一過性の影響と思われた。さらに、後肢の伸展が200 mg/kg群の少数例で投与期間の中期にみられたが、後肢の麻痺までは至らず、投与の継続により発現例数が増加することはなかった。体重は、200 mg/kg群では投与2週から有意な低値が認められた。対照群および60 mg/kg以下の投与群では投与期間中に前回測定値に比して体重が減少する例はほとんどみられないのに対して、200 mg/kg群ではほぼ全例で投与3週以降に体重減少を示す日があった。摂餌量は、各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかったものの、200 mg/kg群では対照群のほぼ半量の例が散見されることから、体重の増加抑制あるいは減少は、摂餌量の低値が一因と考えられた。器官重量では200 mg/kg群で精巣および精巣上体重量が低値であり、剖検では精巣の小型化および軟化が、病理組織学的検査では精巣の精細管上皮の変性を主体とする変化と精巣上体で精巣の変性に伴った変化と思われる管腔内の残屑がみられた。精巣および精巣上体に対する変化は最高用量群の全例にみられており、ニトロベンゼン系化合物に共通してみられる精巣毒性の影響と考えられた<sup>2, 3, 4)</sup>。

雌（P）に対しては、雄の同量投与群の場合とほぼ同様に60 mg/kg以上の投与群で流涎、黄褐色尿、200 mg/kg群で下腹部の被毛の汚れ、後肢の伸展、自発運動の低下がみられ、その他によるめき歩行、腹臥または横臥、呼吸緩徐、斜頸などの症状がみられた。これらの症状のいくつかは、ニトロベンゼン系化合物にみられる眼振、麻痺、振せん、正向反射消失、昏睡などの中枢および末梢神経に及ぼす影響に関連した作用の可能性が推察された<sup>2, 3)</sup>。さらに、200 mg/kg群では妊娠20日～哺育2日の間に6例が死亡した。体重は妊娠期間の後期以降は有意な低値であり、雄の場合と同様に摂餌量の低値が一因と考えられた。病理組織学的検査では、死亡例の1例のみではあるが腺胃の潰瘍が観察された。したがって、妊娠期間以降の摂餌量の低値、体重増加抑制あるいは減少は、消化管障害が関与している可能性が推察された。

以上のように、一般毒性学的には60 mg/kg以上の投与群で雌雄の一般状態（流涎）、さらに200 mg/kg群では雌雄の一般状態（自発運動の低下、後肢の伸展）および体重に影響がみられ、雄の器官重量、剖検および病理組織学的検査（精巣、精巣上体）に異常所見が得られ、雌では死亡例もみられた。

親動物（P）の生殖発生に関しては、雄側の交尾率および授胎率、雌側の発情回数、交尾率、受胎率、妊娠期間、着床痕数および出産率は、各投与群で被験物質投与の影響はみられなかった。

雄動物では、前述の如く200 mg/kg群の全例で精巣の組織変化が観察されたものの、生

殖機能に関しては 12 例全例で交尾が成立し、その内の 11 例で授胎能が確認されたことから、交尾成立までの 15~20 日間の投与では雄の生殖機能への影響は発現しないと思われた。なお、対照群および 20 mg/kg群の各 1 例でも精巣および精巣上体に最高用量群と同様の組織変化がみられた。当該例では、交尾能は確認されたものの授胎能は認められず、不妊の原因はいずれも雄側にあると考えられた。60 mg/kg 群では全例で精巣への影響は重量的にも組織学的にも認められていないことから、20 mg/kg 群の精巣の変化は被験物質投与との関連性のない偶発所見の可能性が高いと思われた。

雌動物では、妊娠 20 日には 200 mg/kg群の 1 母動物が死亡した。当動物では、上記のような摂餌量の低値に加えて妊娠による負荷が死亡原因と推測された。当例を含む 200 mg/kg群の胸腺、脾臓などにみられた組織変化も、被験物質投与に加えて妊娠の負荷による影響に起因するものと思われた。妊娠 22 日および分娩途中の死亡例の剖検では死亡胎児が合計 22 例認められたが、早期あるいは後期吸収胚はみられなかった。また、哺育期間中に 4 例の母動物が死亡した。さらに、3 母動物で哺育行動不良がみられ、この内の 2 母動物では新生児の全例が死亡した。すなわち、200 mg/kg群では 12 例中で受胎雌数は 11 例、新生児出産雌数は 9 例であり、その内で哺育 4 日までの哺育完了動物数は 3 例のみであった。これらの結果から、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは周産期（分娩）および授乳期（哺育行動）の母動物に対して影響を及ぼしていると考えられた。また、60 mg/kg 群の 1 母動物では出産児は死産児のみであった。当群では、200 mg/kg群でみられたような母動物の死亡はないものの、死産児のみで新生児がみられなかったことは、当動物でも周産期（分娩）の母動物に対して影響を及ぼした結果と推測された。一方、6 mg/kg群の 1 母動物で新生児の全例が死亡したが、20 mg/kg 群では同様の変化はみられず、また母動物の死亡、あるいは死産児のみで新生児が得られないなどの影響がみられないことから、6 mg/kg群の新生児の死亡は被験物質投与との関連性のない所見と考えられた。

新生児に対しては、出産児数、分娩率、死産児数、新生児数、出生率、性比、児の産出率に投与の影響はみられなかった。また、哺育 4 日の剖検では異常はみられなかった。一方、新生児の一般状態では 200 mg/kg群で新生児の多くが死亡し、哺育 4 日の生存率は有意な低値を示した。また、体重は雌雄ともに低値であり、雄では有意差が認められた。したがって、被験物質は新生児の発育に対して影響を及ぼしていると考えられた。

以上のように、生殖発生毒性学的には 60 mg/kg以上で周産期（分娩）の、さらに 200 mg/kgでは授乳期（哺育行動）の母動物に対して影響を及ぼした可能性が考えられた。また、200 mg/kg群では新生児の死亡数が多く、哺育 4 日の生存率が低値であり、哺育 4 日の雌雄の生存児の体重が低値であった。したがって、当試験条件下における生殖発生毒性学的な無影響量は、雄の生殖に関しては 200 mg/kg、雌の生殖に関しては 20 mg/kg、児動物の発生に関しては 60 mg/kgと推測された。

資料および文献

- 1) OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test (厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室から提供された資料)
- 2) R. O. Beauchamp, Jr. et al. : A Critical Review of the Literature on Nitrobenzene Toxicity, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 11 (2), 33~84 (1983)
- 3) T. E. Cody et al. : 1,3-Dinitrobenzene : Toxic Effects *in vivo* and *in vitro*, *J. Toxicol. Environ. Health*, 7, 829~847 (1981)
- 4) B. S. Levine et al. : Subchronic Toxicity of Trinitrotoluene in Fischer 344 Rats, *Toxicol.*, 32, 253~265 (1984)
- 5) T. Watanabe et al. : Toxicity of and Biological Monitoring for 1,3-Diamino-2,4,6-trinitrobenzene and Other Nitro-amino Derivatives of Benzene and Chlorobenzene, *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.*, 37, 157~168 (1976)
- 6) 「1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (CAS No. 89-61-2) のラットにおける経口投与による簡易生殖毒性試験の予備試験」の最終報告書 (試験番号 : 0933P) (株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所、平成 6 年 9 月 7 日)

Table 1-1. General sign of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general sign	Days of administration																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1,4-Dichloro-2-nitrobenzene	6	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	20	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	60	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	6	10	10	9	9	10	8	7	7	7	6	7	6	6
		Yellowish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7	8	10	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	200	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation		3	10	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Perigenital soil		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	3	3	7	8	8	8	8	8	9	10	10	10	11	
Yellowish brown urine		0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Extension of hindlimbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	1	2		

\*: Commencement of pairing.

Table 1-2. General sign of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general sign	Days of administration																								
			26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50#
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1,4-Dichloro-2-nitrobenzene	6	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	20	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	60	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Salivation	6	8	5	6	5	6	7	5	7	6	7	6	7	6	7	7	5	6	5	5	6	6	7	6	0
	Yellowish brown urine	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	200	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decrease in locomotor activity		0	0	0	0	0	0	0	0	4	6	6	6	7	6	8	9	11	9	9	11	9	10	9	10	0	
Salivation		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	
Perigenital soil		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Yellowish brown urine	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		

#: The day of necropsy.

Table 2. Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene				
	0		6	20	60	200	
Number of males	12		12	12	12	12	
Days of administration							
1	383.2 ± 10.5		384.9 ± 9.1	386.6 ± 11.6	385.0 ± 9.0	384.6 ± 9.1	
4	402.0 ± 15.0		397.9 ± 10.3	403.6 ± 11.6	399.8 ± 10.7	392.7 ± 10.9	
8	419.7 ± 16.7		413.2 ± 11.7	420.6 ± 14.6	418.7 ± 14.4	404.2 ± 12.8*	
11	433.7 ± 20.7		427.2 ± 13.5	435.7 ± 16.9	430.4 ± 16.2	412.4 ± 12.5**	
15	450.9 ± 24.2		442.1 ± 15.6	451.7 ± 18.8	445.5 ± 19.9	418.1 ± 17.0**	
18	455.3 ± 22.4		445.6 ± 18.7	460.0 ± 18.0	455.3 ± 20.5	424.9 ± 15.8**	
22	470.5 ± 24.6		462.4 ± 20.5	475.1 ± 17.5	473.2 ± 23.5	424.2 ± 28.3**	
25	481.2 ± 23.7		472.4 ± 24.0	485.0 ± 18.1	484.4 ± 24.1	425.9 ± 30.1**	
29	497.6 ± 24.7		485.2 ± 28.7	497.6 ± 18.1	496.8 ± 25.9	430.7 ± 29.4**	
32	507.7 ± 26.1		493.8 ± 28.7	507.4 ± 17.4	508.0 ± 28.9	430.5 ± 35.0**	
36	518.0 ± 26.3		505.4 ± 31.6	517.6 ± 18.4	520.2 ± 30.9	429.2 ± 38.2**	
39	526.9 ± 29.9		509.7 ± 34.1	524.9 ± 16.7	526.6 ± 31.5	433.9 ± 37.8**	
43	537.1 ± 31.1		519.3 ± 36.5	533.4 ± 18.6	536.7 ± 34.4	442.6 ± 34.2**	
46	545.8 ± 33.6		524.4 ± 37.9	540.3 ± 18.9	541.7 ± 35.3	443.2 ± 35.2**	
50	553.2 ± 34.8		531.1 ± 38.7	547.6 ± 19.5	549.6 ± 35.4	440.7 ± 34.9**	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control (\*: P<0.05, \*\*: P<0.01).

Table 3. Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene							
	0		6		20		60		200	
Number of males	12		12		12		12		12	
Days of administration										
3	25.9 ± 1.4		26.6 ± 1.4		26.1 ± 1.4		26.2 ± 1.4		24.6 ± 1.7	
6	23.9 ± 1.4		25.3 ± 1.6		24.3 ± 1.5		25.6 ± 1.9		22.3 ± 2.0	
10	23.1 ± 2.0		24.9 ± 2.2		23.6 ± 2.2		25.2 ± 1.7		23.5 ± 2.0	
13	23.5 ± 1.9		23.7 ± 2.1		23.7 ± 1.7		24.7 ± 2.0		24.2 ± 1.9	
24	22.9 ± 1.2		23.2 ± 2.6		23.6 ± 1.8		25.8 ± 3.0		21.5 ± 3.8	
27	23.7 ± 2.0		23.8 ± 3.1		23.0 ± 1.6		24.7 ± 2.8		21.5 ± 4.6	
31	23.5 ± 1.6		23.7 ± 3.0		24.2 ± 1.8		25.5 ± 2.7		22.6 ± 3.3	
34	22.9 ± 1.7		23.2 ± 3.1		23.6 ± 1.5		25.6 ± 2.5		18.8 ± 4.9	
38	23.8 ± 1.8		23.4 ± 2.6		23.6 ± 1.2		25.2 ± 2.5		21.1 ± 4.7	
41	23.5 ± 1.4		22.6 ± 2.9		23.0 ± 1.5		24.7 ± 3.0		23.8 ± 3.6	
45	22.7 ± 2.1		22.6 ± 2.6		23.2 ± 2.1		23.8 ± 3.7		21.7 ± 4.5	
48	22.2 ± 1.6		22.0 ± 2.5		21.8 ± 2.0		22.6 ± 3.6		20.2 ± 4.7	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 4. Necropsy finding of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1,4-Dichloro-2-nitrobenzene			
	0	6	20	60	200
Number of males	12	12	12	12	12
Normal Testis(bilateral)	11	12	11	12	0
Small	0	0	1	0	12
Softening	1	0	1	0	12
Epididymis(bilateral)					
Softening	1	0	0	0	0

Table 5. Organ weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene							
	0		6		20		60		200	
Number of males	12		12		12		12		12	
Body weight (g)	553.2 ± 34.8	531.1 ± 38.7	547.6 ± 19.5	549.6 ± 35.4	440.7 ± 34.9**					
Testes (g)	3.337 ± 0.522	3.459 ± 0.336	3.217 ± 0.675	3.448 ± 0.230	1.187 ± 0.102**					
(g%)	0.605 ± 0.098	0.657 ± 0.103	0.590 ± 0.132	0.631 ± 0.065	0.271 ± 0.024**					
Epididymides (g)	1.232 ± 0.216	1.276 ± 0.112	1.172 ± 0.163	1.242 ± 0.069	0.809 ± 0.074**					
(g%)	0.225 ± 0.043	0.240 ± 0.032	0.213 ± 0.034	0.227 ± 0.023	0.184 ± 0.019**					

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*\*: P<0.01).

Table 6. Histopathological finding of testis and epididymis of survival male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control					1,4-Dichloro-2-nitrobenzene				
	0	6	20	60	200					
Number of males	12	12	12	12	12					
Findings	Grade	- ± + † ‡	- ± + † ‡	- ± + † ‡	- ± + † ‡	- ± + † ‡				
Testis										
Degeneration of seminiferous epithelium		11 0 0 1 0	12 0 0 0 0	11 0 0 0 1	12 0 0 0 0	0 0 9 3 0				
Giant cell formation of seminiferous tubules		12 0 0 0 0	12 0 0 0 0	12 0 0 0 0	12 0 0 0 0	6 5 1 0 0				
Proliferation of interstitial cell		11 1 0 0 0	12 0 0 0 0	11 0 1 0 0	12 0 0 0 0	1 7 4 0 0				
Interstitial edema		11 1 0 0 0	12 0 0 0 0	11 0 1 0 0	12 0 0 0 0	0 5 7 0 0				
Epididymis										
Loss of sperm in duct		11 0 0 0 1	12 0 0 0 0	11 0 0 0 1	12 0 0 0 0	12 0 0 0 0				
Debris in duct		12 0 0 0 0	12 0 0 0 0	12 0 0 0 0	12 0 0 0 0	4 0 7 1 0				
Spermatogenic granuloma		12 0 0 0 0	11 0 1 0 0	12 0 0 0 0	12 0 0 0 0	12 0 0 0 0				

Grade of histopathological finding: -: No abnormal detect (NAD), ±: Slight, +: Mild, †: Moderate, ‡: Marked.

Table 7-1. General sign of female rats (P) during pre-mating and mating periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Number of females and general sign	Days of administration																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18	19	20	
Control	0	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	6	3	-	-	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	6	3	-	-	
1,4-Dichloro-2-nitrobenzene	6	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	5	1	1	1	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	5	1	1	1	
	20	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	5	2	-	-	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	5	2	-	-	
	60	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	3	1	-	-	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	4	2	0	0	0	0	-	-	-	
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	4	3	0	0	-	-
		Yellowish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	8	10	12	12	7	3	1	-	-
	200	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	2	1	-	-	
		Normal	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	
Salivation		1	7	10	9	9	10	10	11	12	10	11	8	11	11	12	6	2	1	-	-	
Perigenital soil		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	-	-		
	Yellowish brown urine	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	2	1	-	-		

\*: Commencement of pairing.

Table 7-2. General sign of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Number of dams and general sign	Days of pregnancy																								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Control	0	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	4	-	
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	4	-	
1,4-Dichloro-2-nitrobenzene	6	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	-	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	-	
	20	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	2	-	
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	2	-	
	60	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	-	
		Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
		Salivation	3	3	4	3	2	1	1	1	3	4	2	4	5	2	3	2	2	2	1	3	4	2	2	-
	200	Yellowish brown urine	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	-	
		Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	1	1
		Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
		Staggering gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Prone position or Lateral position		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
Salivation		11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	10	1	0
Perigenital soil		3	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	5	5	1	0	
Yellowish brown urine		11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	10	1	0	
Bradypnea		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
Extension of hindlimbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
Wryneck	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0		
Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	

Table 7-3. General sign of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Number of dams and general sign	Days of lactation				
		0	1	2	3	4*
Control	0 Number of dams Normal	11	11	11	11	11
		11	11	11	11	11
1,4-Dichloro-2-nitrobenzene	6 Number of dams Normal	12	12	12	11	11
		12	12	12	11	11
	20 Number of dams Normal	11	11	11	11	11
		11	11	11	11	11
	60 Number of dams Normal Salivation Yellowish brown urine	12	11	11	11	11
		0	0	0	0	0
		2	2	3	0	0
	200 Number of dams Normal Decrease in locomotor activity Staggering gait Prone position or Lateral position Salivation Perigenital soil Descending skin temperature Yellowish brown urine Bradypnea Extension of hindlimbs Death	12	11	11	11	11
		9	8	6	4	3
		0	0	0	0	0
		6	5	5	4	3
		0	2	3	2	1
		2	1	0	0	0
		9	6	4	3	0
5		2	1	1	1	
1		0	0	0	0	
9		6	5	4	3	
2		1	0	0	0	
0	1	0	0	0		
1	2	1	0	0		

\*: The day of necropsy.

Table 8-1. Body weight of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene			
	0		6	20	60	200
Number of females	12		12	12	12	12
Days of administration						
1	216.7 ± 9.6		215.5 ± 10.0	217.8 ± 8.7	216.9 ± 8.9	216.4 ± 8.4
4	222.2 ± 10.7		221.9 ± 9.7	221.9 ± 9.0	218.9 ± 7.0	220.5 ± 9.1
8	229.0 ± 12.1		229.7 ± 9.8	229.5 ± 9.4	224.7 ± 7.8	225.1 ± 11.9
11	235.8 ± 12.8		236.2 ± 10.7	235.6 ± 11.2	232.3 ± 9.1	230.4 ± 13.5
15	239.2 ± 13.6		239.2 ± 11.5	238.9 ± 9.6	236.0 ± 10.3	234.0 ± 14.8

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 3-2. Body weight of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene			
	0	6	20	60	200	
Number of dams	11	12	11	12	11	
Days of pregnancy						
0	249.1 ± 17.2	245.7 ± 11.5	248.5 ± 11.6	244.1 ± 9.3	237.5 ± 16.1	
7	277.2 ± 19.8	275.8 ± 17.5	273.5 ± 10.1	272.4 ± 12.1	262.5 ± 17.3	
14	312.0 ± 21.9	306.8 ± 20.1	304.0 ± 14.7	300.8 ± 16.1	286.3 ± 19.2*	
21	393.3 ± 27.5	387.9 ± 30.7	394.1 ± 22.7	381.5 ± 26.3	352.0 ± 27.9* (10)	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (\*: P<0.05).

Table 8-3. Body weight of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene			
	0	6	20	60	200	
Number of dams	11	12	11	12	9	
Days of lactation						
0	282.1 ± 15.7	282.8 ± 25.2	279.0 ± 21.8	272.5 ± 23.7	253.8 ± 24.4	
4	293.3 ± 12.2	288.8 ± 16.4 (11)	295.5 ± 13.4	294.3 ± 17.8 (11)	236.3 ± 38.7** (3)	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (\*\*: P<0.01).

Table 9-1. Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene									
	0		6		20		60		200			
Number of females	12		12		12		12		12			
Days of administration												
3	14.9 ± 1.7		15.9 ± 2.0		15.7 ± 2.2		15.6 ± 1.5		15.4 ± 2.1			
6	15.3 ± 1.9		14.8 ± 1.9		15.2 ± 2.1		15.3 ± 1.4		14.8 ± 1.6			
10	15.8 ± 2.2		14.2 ± 1.9		15.6 ± 2.4		15.0 ± 1.8		15.4 ± 2.2			
13	15.5 ± 2.4		15.2 ± 1.1		15.7 ± 2.1		14.8 ± 1.5		15.5 ± 2.5			

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 4-2. Food consumption of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene							
	0		6		20		60		200	
Number of dams	11		12		11		12		11	
Days of pregnancy										
2	19.0 ±	2.0	19.6 ±	2.0	18.9 ±	2.8	19.7 ±	2.1	19.1 ±	2.5
9	20.9 ±	2.7	21.2 ±	2.5	20.5 ±	3.8	20.2 ±	2.6	21.0 ±	3.4
16	20.5 ±	2.6	20.8 ±	3.8	21.5 ±	3.3	20.4 ±	2.0	21.0 ±	2.8
21	20.2 ±	2.6	19.1 ±	2.9	18.2 ±	2.9	18.5 ±	1.2	16.2 ±	3.1 (10)

Each value shows mean (g/day) ± S.D.  
 Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 7-3. Food consumption of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene			
	0		6	20	60	200
Number of dams	11		11	11	11	3
Days of lactation	4	22.5 ± 3.4	21.6 ± 3.9	28.0 ± 3.0	27.3 ± 4.3	11.0 ± 8.9**

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control (\*\*: P<0.01).

Table 10-1. Necropsy finding of survival dams (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1,4-Dichloro-2-nitrobenzene			
	0	6	20	60	200
Number of dams	12	12	12	12	6
Normal	12	12	12	11	1
Thymus					
Small	0	0	0	0	5
Liver					
White	0	0	0	1	0
Spleen					
Small	0	0	0	0	1

Table 10-2. Necropsy finding of dead dams (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1,4-Dichloro-2-nitrobenzene			
	0	6	20	60	200
Number of dams	0	0	0	0	6
Normal	-	-	-	-	1
Thymus					
Small	-	-	-	-	1
Dark red	-	-	-	-	1
Lung					
Dark red	-	-	-	-	1
Liver					
Dark red	-	-	-	-	1
Spleen					
Small	-	-	-	-	4
Stomach(glandular)					
Dark red spot in the mucosa	-	-	-	-	1

Table 11-1. Histopathological finding of survival dams (P) on day 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control					1,4-Dichloro-2-nitrobenzene																					
	0					6					20					60					200						
Number of dams	12					12					12					12					6						
Findings	Grade	-	±	+	##	##	-	±	+	##	##	-	±	+	##	##	-	±	+	##	##	-	±	+	##	##	
Ovary		12	0	0	0	0	NE					NE					NE					6	0	0	0	0	0
Thymus*																											
Atrophy																							0	0	1	1	0
Spleen*																											
Decreased cellularity of white pulp																							0	0	0	1	0

Grade of histopathological finding: -: No abnormal detect (NAD), ±: Slight, +: Mild, ##: Moderate, ###: Marked.

NE: Not examined.

\*: Gross abnormality examined.

Table 11-2. Histopathological finding of dead dams (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene																		
	0	6	20			60			200												
Number of dams	0	0	0			0			6												
Findings	Grade	-	±	+	##	##	-	±	+	##	##	-	±	+	##	##	-	±	+	##	##
Ovary																	6	0	0	0	0
Spleen*																					
Lymphoid atrophy																	0	0	0	1	0
Decreased cellularity of marginal zone																	0	0	1	0	0
Lung**																					
Congestion																	0	0	0	1	0
Liver**																					
Congestion																	0	0	1	0	0
Stomach**																					
Ulcer of glandular stomach																	0	0	1	0	0
Thymus**																					
Atrophy																	0	0	0	1	0
Hemorrhage																	0	0	1	0	0

Grade of histopathological finding: -: NAD, ±: Slight, +: Mild, ##: Moderate, ###: Marked.

\*, \*\*: Gross abnormality examined.

\*\*: The same case.

The postmortal change was observed in any case.

Table 12. Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1,4-Dichloro-2-nitrobenzene			
	0	6	20	60	200
Number of females	12	12	12	12	12
Number of estrous cases before administration (7 days) Mean ± S.D.	1.7 ± 0.5	1.4 ± 0.5	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.5	1.8 ± 0.5
Number of estrous cases before mating (14 days) Mean ± S.D.	3.3 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.3 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.2 ± 0.7
Number of pairs	12	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation Copulation index (%) a)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of days till copulation Mean ± S.D.	2.6 ± 1.1	2.5 ± 1.3	2.3 ± 1.1	1.9 ± 1.0	1.8 ± 1.0
Number of pregnant females Fertility index (%) b)	11 91.7	12 100.0	11 91.7	12 100.0	11 91.7

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs) × 100.

b): (Number of pregnant animals / number of pairs with successful copulation) × 100.

Table 13. Observation of pups (F1) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene		
	0	6	20	60	200
Number of dams	11	12	11	12	9
Length of gestation (days)					
Mean $\pm$ S.D. per dam	22.36 $\pm$ 0.50	22.17 $\pm$ 0.39	22.18 $\pm$ 0.40	22.50 $\pm$ 0.52	22.00 $\pm$ 0.00
Number of corpora lutea					
Total	186	194	190	214	201(11)
Mean $\pm$ S.D. per dam	16.9 $\pm$ 2.4	16.2 $\pm$ 1.7	17.3 $\pm$ 2.0	17.8 $\pm$ 1.9	18.3 $\pm$ 2.9(11)
Number of implantation scars					
Total	168	183	178	193	168(11)
Mean $\pm$ S.D. per dam	15.3 $\pm$ 2.9	15.3 $\pm$ 1.9	16.2 $\pm$ 1.7	16.1 $\pm$ 0.8	15.3 $\pm$ 1.2(11)
Implantation index a)					
Mean% $\pm$ S.D. per dam	90.5 $\pm$ 12.6	94.3 $\pm$ 6.7	93.8 $\pm$ 4.5	90.8 $\pm$ 8.5	85.0 $\pm$ 11.1(11)
Gestation index (%) b)	100.0	100	100.0	91.7	100.0
Number of live pups born					
Male	77	84	98	72	62
Female	70	69	64	79	51
Total	147	153	162	151	113
Mean $\pm$ S.D. per dam	13.4 $\pm$ 2.8	12.8 $\pm$ 3.3	14.7 $\pm$ 1.6	12.6 $\pm$ 4.3	12.6 $\pm$ 2.4
Sex ratio c)					
Mean $\pm$ S.D. per dam	0.52 $\pm$ 0.10	0.55 $\pm$ 0.15	0.61 $\pm$ 0.12	0.48 $\pm$ 0.11	0.56 $\pm$ 0.13
Birth index d)					
Mean% $\pm$ S.D. per dam	87.5 $\pm$ 10.0	83.7 $\pm$ 18.5	91.2 $\pm$ 8.4	78.2 $\pm$ 26.7	81.6 $\pm$ 15.7
Number of dead pups on day 0 of lactation					
Total	5	11	3	12	12
Mean $\pm$ S.D. per dam	0.5 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 2.3	0.3 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 2.0	1.3 $\pm$ 2.1
Number of pups born					
Total	152	164	165	163	125
Mean $\pm$ S.D. per dam	13.8 $\pm$ 2.8	13.7 $\pm$ 2.9	15.0 $\pm$ 1.7	13.6 $\pm$ 2.7	13.9 $\pm$ 1.5
Delivery index e)					
Mean% $\pm$ S.D. per dam	90.7 $\pm$ 10.1	89.2 $\pm$ 13.6	92.9 $\pm$ 7.0	84.4 $\pm$ 16.3	90.2 $\pm$ 10.3
Live birth index f)					
Mean% $\pm$ S.D. per dam	96.5 $\pm$ 5.0	93.8 $\pm$ 14.3	98.3 $\pm$ 3.0	88.9 $\pm$ 28.5	90.4 $\pm$ 14.6
Number of live pups on day 4 of lactation					
Male	76	77	96	70(11)	10(5)
Female	70	64	64	79(11)	10(5)
Total	146	141	160	149(11)	20(5)
Mean $\pm$ S.D. per dam	13.3 $\pm$ 2.7	11.8 $\pm$ 4.6	14.5 $\pm$ 1.5	13.5 $\pm$ 1.8(11)	4.0 $\pm$ 4.9(5)
Viability index g)					
Mean% $\pm$ S.D. per dam	99.5 $\pm$ 1.8	89.4 $\pm$ 28.5	98.8 $\pm$ 2.6	98.7 $\pm$ 2.9(11)	34.4 $\pm$ 38.7** (5)
Number of external anomalies	0	0	0	0(11)	0
Mean% $\pm$ S.D. per dam	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0(11)	0.0 $\pm$ 0.0

a): (Number of implantation scars / number of corpora lutea) X 100.

c): Number of male pups / number of live pups.

e): (Number of pups born / number of implantation scars) X 100.

g): (Number of live pups on day 4 / number of live pups born) X 100.

Significantly different from control (\*\*: p<0.01)

Figures in parentheses indicate number of dams.

b): (Number of females with live pups / number of pregnant females) X 100.

d): (Number of live pups born / number of implantation scars) X 100.

f): (Number of live pups born / number of pups born) X 100.

Table 14. Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	1,4-Dichloro-2-nitrobenzene				
	Control	6	20	60	200
Number of dams	11	12	11	11	9
Male					
Days of lactation 0	6.63 ± 0.78	6.37 ± 0.59	6.20 ± 0.43	6.55 ± 0.33	5.48 ± 0.75**
4	10.53 ± 1.72	10.50 ± 1.61 (11)	10.08 ± 0.82	10.75 ± 0.92	7.03 ± 1.51** (3)
Number of dams	11	12	11	11	9
Female					
Days of lactation 0	6.26 ± 0.68	6.12 ± 0.73	5.91 ± 0.38	6.22 ± 0.29	5.26 ± 0.84
4	10.12 ± 1.61	10.18 ± 1.86 (11)	9.55 ± 0.70	10.36 ± 0.90	6.90 ± 1.66 (3)

Each value shows mean (g) ± S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (\*\*: P<0.01).

Table 15. Necropsy finding of pups (F1) on day 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1,4-Dichloro-2-nitrobenzene							
	0		6		20		60		200	
Number of pups	Male	Famale	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
	76	70	77	64	96	64	70	79	10	10
Necropsy finding	No remarkable changes									

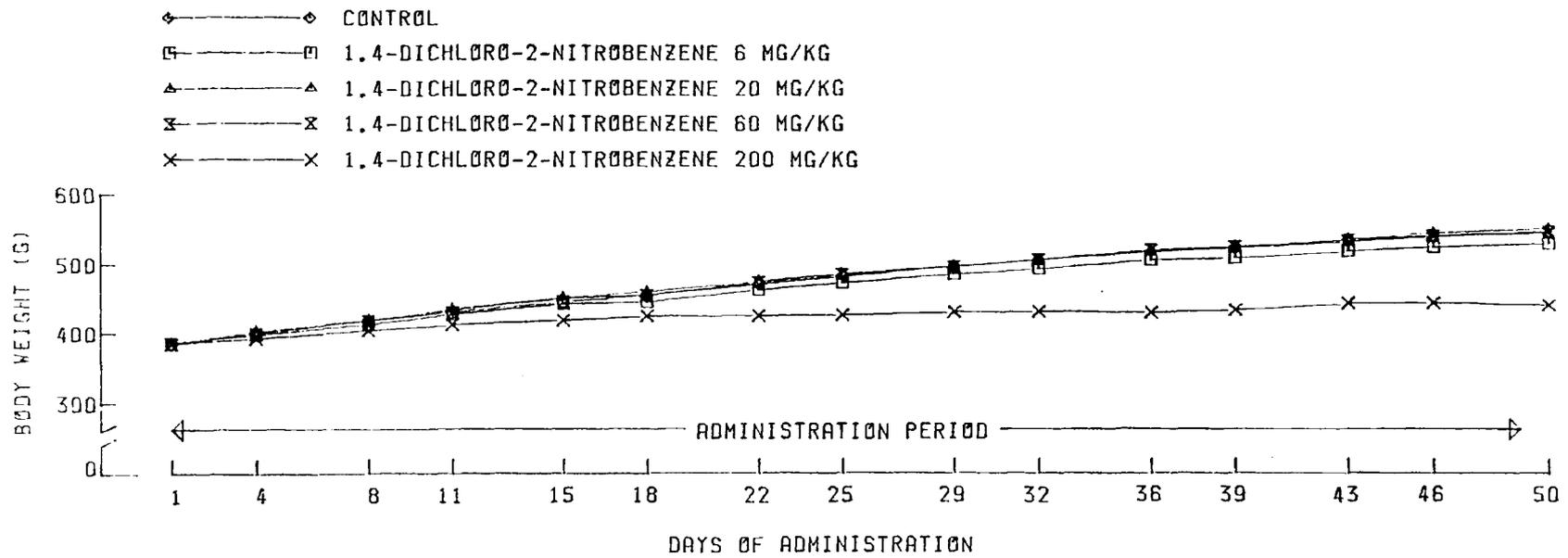


Fig. 1. Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration.

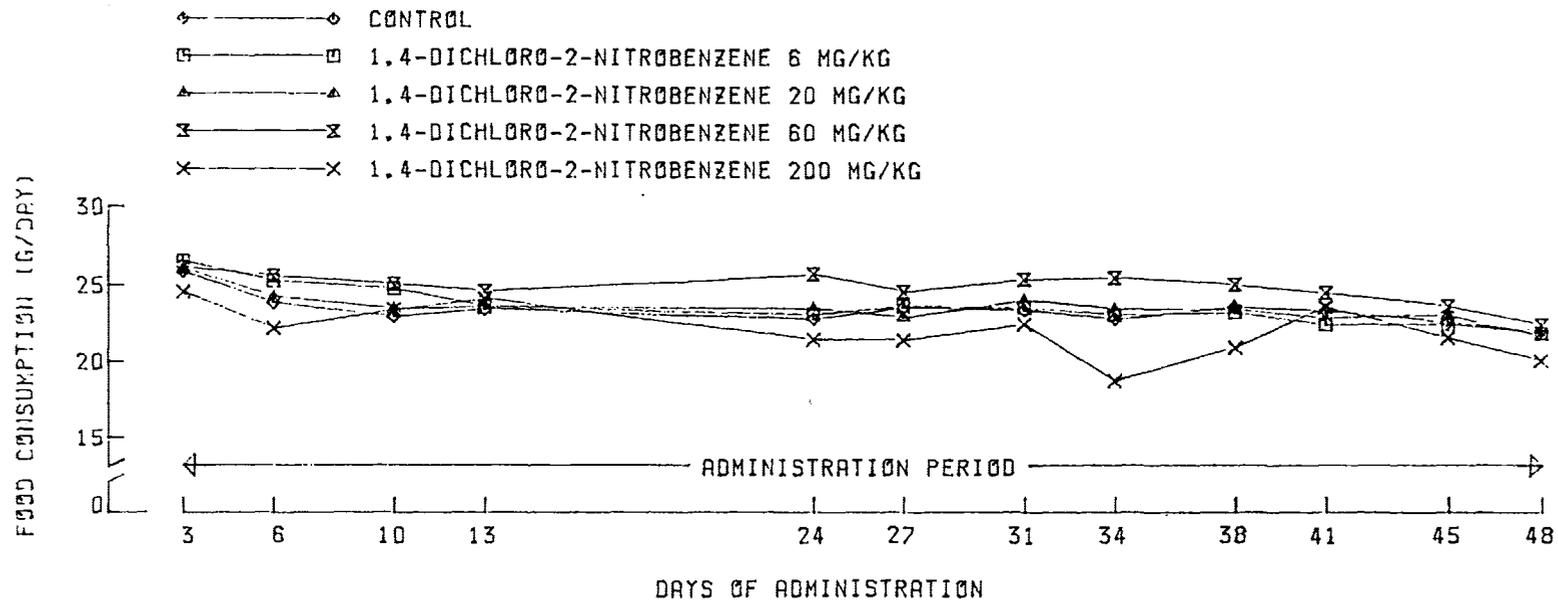


Fig. 2. Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration.

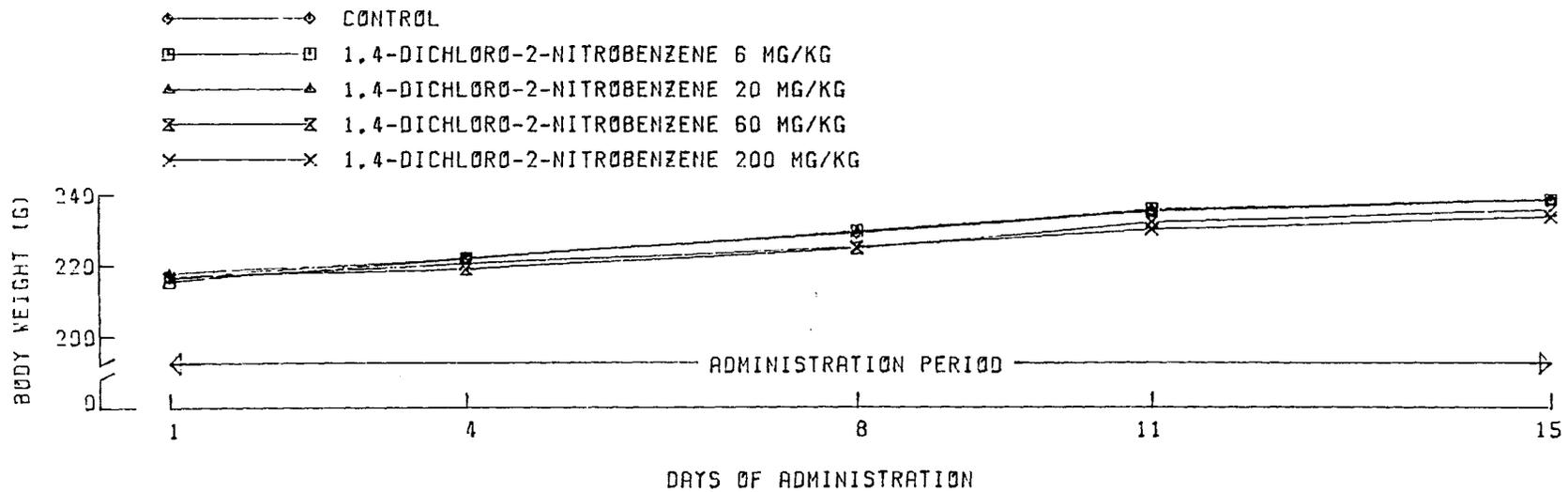


Fig. 3-1. Body weight of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration.

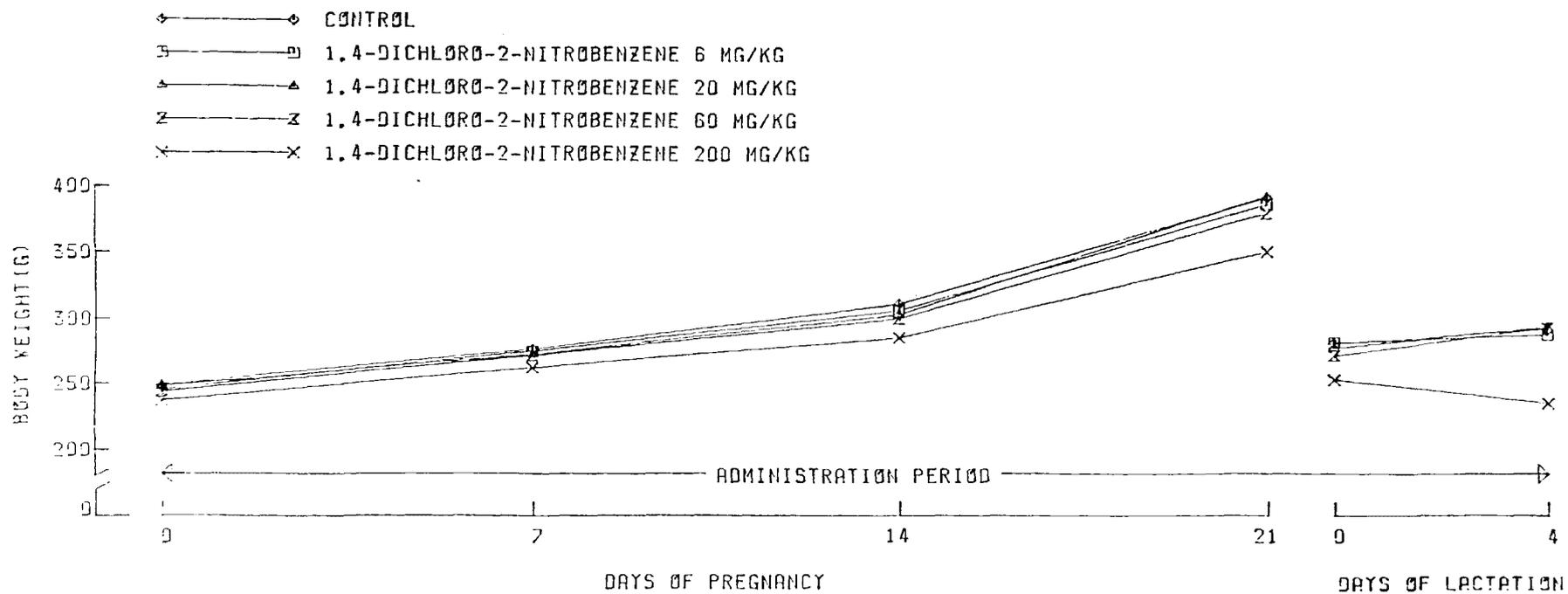


Fig. 3-2. Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration.

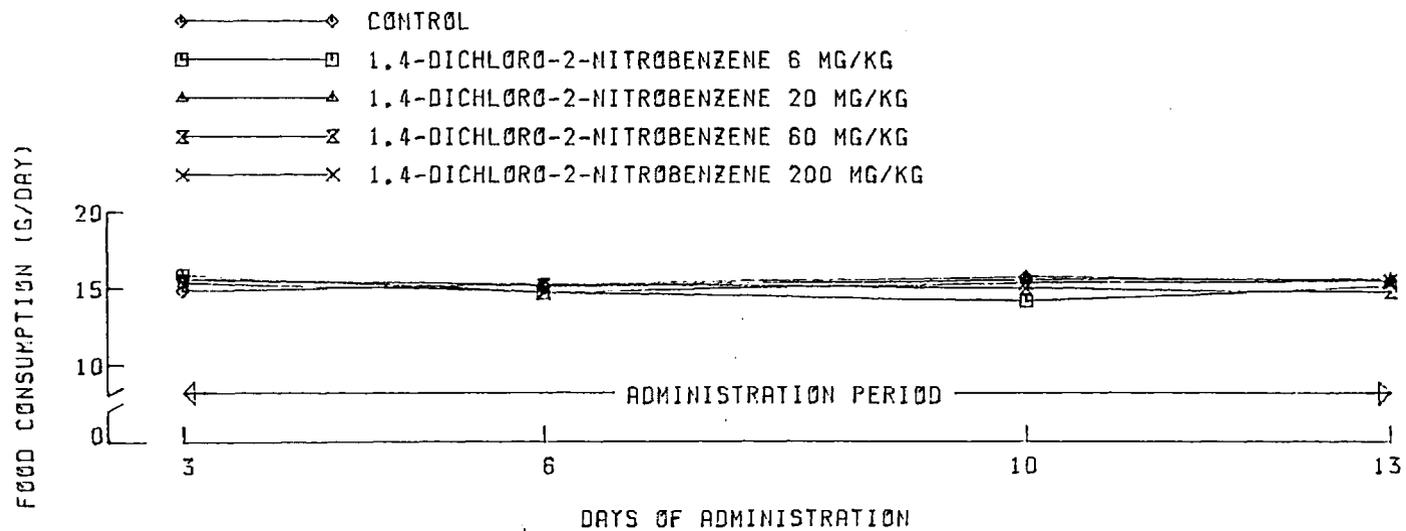


Fig. 4-1. Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration.

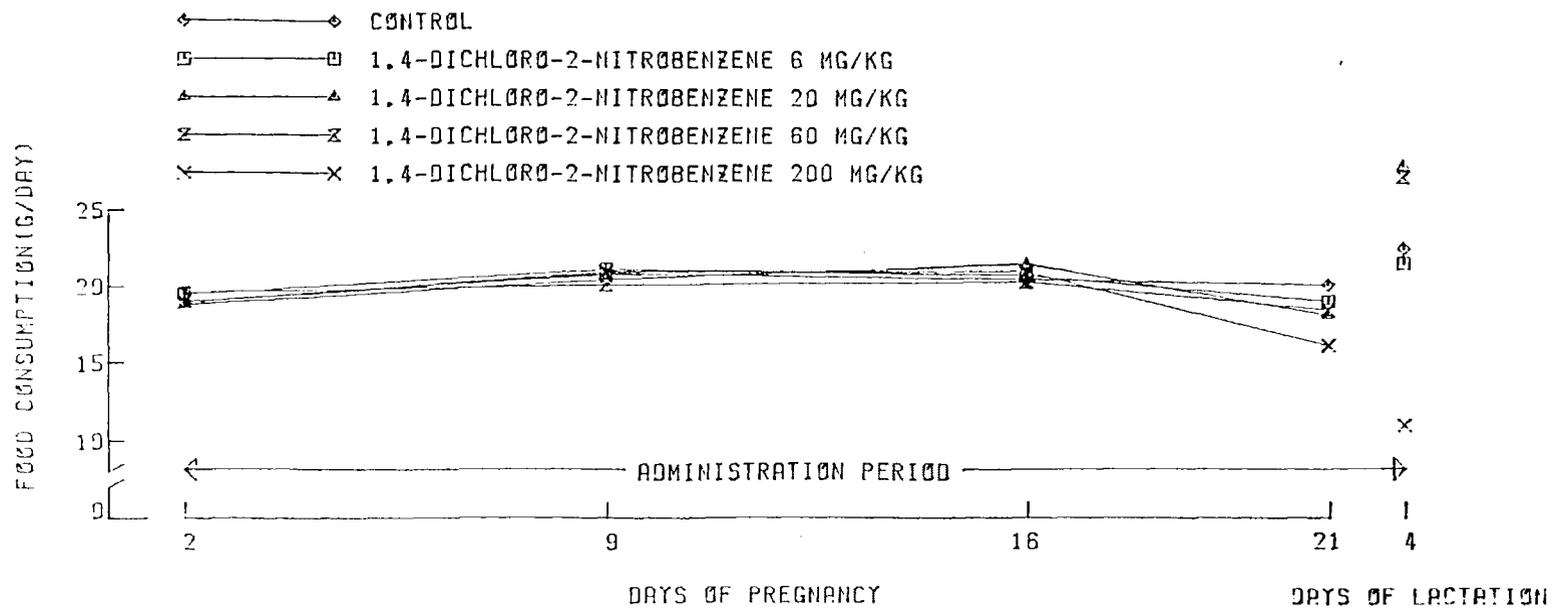


Fig. 4-2. Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration.

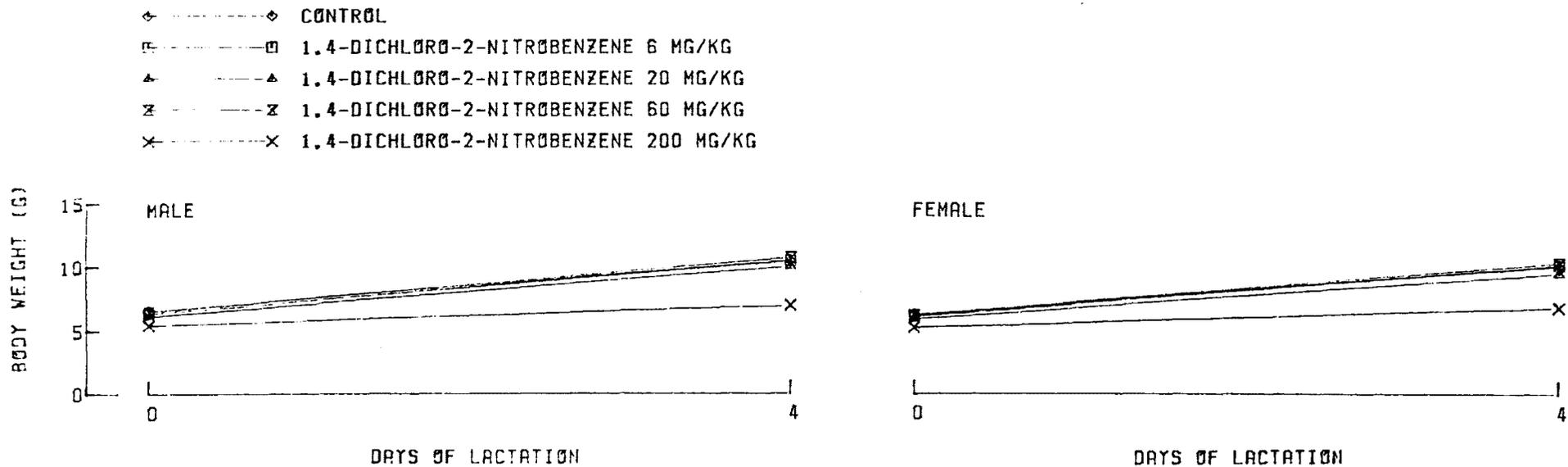


Fig. 5. Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 1,4-Dichloro-2-nitrobenzene by oral administration.