

最 終 報 告 書

試験表題：*p*-ジブロモベンゼンの
ラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-1076

試験期間：2010 年 11 月 29 日~2011 年 3 月 30 日

試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1. 目次	3
3. 要約	10
3.1 反復投与毒性	10
3.2 生殖発生毒性	10
4. 緒言	11
5. 試験材料及び方法	12
5.1 被験物質及び媒体	12
5.1.1 被験物質	12
5.1.2 媒体	13
5.2 投与液の調製及び保存方法	13
5.2.1 対照群投与液の採取及び保存	13
5.2.2 被験液の調製及び保存	13
5.2.3 被験液の安定性	14
5.2.4 被験液の濃度確認	14
5.3 試験動物種及び系統の選択理由	16
5.4 試験動物	17
5.5 飼育条件	17
5.6 動物の識別	18
5.7 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	18

5.8	投与方法	18
5.9	投与量及び群構成	18
5.10	投与量の設定根拠	19
5.11	観察及び検査の方法	19
5.11.1	一般状態の観察	20
5.11.2	体重測定	20
5.11.3	摂餌量測定	20
5.11.4	腔垢検査	20
5.11.5	交配方法	20
5.11.6	分娩及び哺育観察	21
5.11.7	病理学検査	21
5.12	統計解析	22
5.12.1	パラメータの算出	22
5.12.2	検定	23
6.	試験結果	24
6.1	一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)	24
6.2	体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)	24
6.3	摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)	24
6.4	器官重量 (Table 4、Appendix 4-1~4-4)	24
6.5	剖検所見 (Table 5-1~5-5、Appendix 5-1~5-96)	24
6.6	病理組織学検査 (Table 6-1~6-5、Appendix 5-1~5-96)	25
6.7	性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)	26
6.8	交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)	26
6.9	分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)	26
6.10	出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)	26
6.11	出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)	26
6.12	出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)	26
6.13	出生児の生後4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)	26
7.	考察	27
7.1	反復投与毒性	27
7.2	生殖発生毒性	27
8.	文献	29

図

Fig. 1、2	体重
Fig. 3、4	摂餌量

表

Table 1-1~1-4	一般状態
Table 2-1~2-4	体重
Table 3-1~3-4	摂餌量
Table 4	器官重量
Table 5-1~5-5	剖検所見
Table 6-1~6-5	病理組織学検査
Table 7	性周期
Table 8	交配成績
Table 9	分娩成績
Table 10	出生児の性比及び外表観察
Table 11	出生児の生存率
Table 12	出生児の体重
Table 13	出生児の生後 4 日剖検所見

3. 要約

p-ジブロモベンゼンの 0（対照群：ゴマ油）、4、20 及び 100 mg/kg/day を、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄には交配前 14 日間に加え交配期間を通して剖検前日まで（42 日間）、雌には交配前 14 日間に加え交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日まで（41~46 日間）強制経口投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性の概略について検討した。

3.1 反復投与毒性

100 mg/kg 投与群では、一般状態、体重、摂餌量及び器官重量に被験物質投与の影響は認められなかったが、雄で肉眼的に肝臓の大型化、組織学的に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大がみられた。

4 及び 20 mg/kg 投与群では被験物質投与の影響はみられなかった。

3.2 生殖発生毒性

100 mg/kg 投与群で死産児率の高値傾向、出生児数及び出生率の低値傾向、雌雄出生児の生後 0 及び 4 日の体重並びに生後 0~4 日の間の体重増加量に低値又は低値傾向が認められ、1 母体で授乳 1 日までに全哺育児が死亡した。しかし、性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に加え出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数及び着床率には被験物質投与の影響は認められなかった。

4 及び 20 mg/kg 投与群では被験物質投与の影響はみられなかった。

これらの結果から、本試験条件下において、本被験物質の反復投与による無影響量及び無毒性量は雄で 20 mg/kg、雌で 100 mg/kg 以上、生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量は雄親動物でいずれも 100 mg/kg 以上、母動物と児動物ではいずれも 20 mg/kg と判断した。

4. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託により、*p*-ジブロモベンゼンのラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドライン等に準拠して、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。

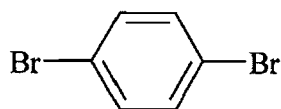
5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び媒体

5.1.1 被験物質

p-ジブロモベンゼンは 以下の情報とともに購入した。また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている（試験番号：A-2349、添付資料1）。

名称	:	<i>p</i> -ジブロモベンゼン
	:	(別名：1,4-ジブロモベンゼン)
英語名称	:	<i>p</i> -Dibromobenzene
CAS 番号	:	106-37-6
官報公示整理番号	:	3-52
構造式又は示性式	:	



分子式	:	C ₆ H ₄ Br ₂
分子量	:	235.90
常温における性状	:	白色~わずかにうすい黄色結晶
臭い	:	キシレン臭
沸点	:	219°C
蒸気圧	:	7.7Pa/25°C
蒸気密度 (空気=1.0)	:	8.1
溶解性	:	易溶；エーテル、アセトン 可溶；メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、 クロロホルム、二硫化炭素 不溶；水 (20 mg/L 25°C)
オクタノール/水分配係数	:	3.79
純度 (GC)	:	99.5%
不純物	:	不明
融点	:	88.8°C
入手量	:	425 g
保存方法	:	密栓、冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内 (許容値：1~10°C、 実測値：3~6°C) に保存した〕

保存場所	:	御殿場研究所被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
安定性	:	投与期間終了後に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所にて、残余被験物質の赤外吸収スペクトルを確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトルとほぼ同様であり安定性に問題はなかった。（添付資料 2）。
残量の処理	:	被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質保存室に保存した。動物試験及び分析終了後の残量はすべて焼却処分した。

5.1.2 媒体

名称	:	ゴマ油
製造者	:	和光純薬工業株式会社
規格	:	和光一級
ロット番号	:	KWE1533
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所第 1 研究棟被験物質調製室

なお、媒体については、「1, 4-ジブロモベンゼンのラットを用いた経口投与による 28 日間反復投与毒性試験（財団法人畜産生物科学安全研究所、試験番号：92-047）」において投与液の媒体として用いられていることからゴマ油を選択した。

5.2 投与液の調製及び保存方法

5.2.1 対照群投与液の採取及び保存

被験液調製当日の被験物質を取り扱う前に、対照群投与液として、必要量の媒体を褐色ガラス瓶に貼付したラベルを確認しながら分注し、投与に使用するまで被験液と同様に保存した。

5.2.2 被験液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に秤取した。ビーカーに規定量の約 5 割の媒体を採取した後、スターラーで攪拌しながら秤取した被験物質を加え溶解させた。完全に溶解したことを確認後、溶解液をメスシリンダーに移すとともに、ビーカーを少量の媒体で数回洗い、その液もメスシリンダーに加えた。更に媒体をメスシリンダーに加え規定量にメスアップし、所定の濃度液を調製した。調製は最大 7 日分を一括して行い、調製した被験液は褐色ガラス瓶に入れて冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10℃、実

測値：3~6°C) に保存し、安定性の確認された範囲内で投与に使用した。残液はポリ瓶に回収又はペーパータオル等に吸着させて焼却処分した。

5.2.3 被験液の安定性

ゴマ油を媒体とする本被験物質の 0.80~100 mg/mL は均一に溶解し、また冷所遮光下(4°C)で少なくとも7日間は安定である¹⁾。また、本被験物質の 0.800 及び 200 mg/mL 溶液(媒体：ゴマ油)は、褐色ガラス瓶に入れ冷所(冷蔵庫内、許容値：1~10°C)で7日間、その後室温で24時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている(株式会社ボゾリサーチセンター試験番号：A-2349)。

5.2.4 被験液の濃度確認

雄の投与1週と投与6週の2回、投与に用いる各濃度の被験液について、投与に使用する前に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所でHPLC法により濃度確認を実施した。その結果、各濃度液における表示値に対する被験物質の割合は97.3~105.0%、であり、いずれも許容範囲内(濃度：表示値に対する割合；100.0±10.0%)であった(添付資料4、5)ことから、被験液の調製に問題はなかったと考えられた。分析法の概略を以下に示す。

[標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

名称	:	p-ジプロモベンゼン
ロット番号	:	F5ZIB
保存方法	:	密栓、冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内(許容値：1~10°C、実測値：2~8°C)に保存〕
保存場所	:	御殿場研究所被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

[試薬]

試薬名	等級	メーカー
アセトニトリル	HPLC 用	Thermo Fisher Scientific, Inc.
エタノール	試薬特級	和光純薬工業株式会社
精製水	Milli-Q 水製造システム	

[使用機器]

1) HPLC システム

機器名及び型式		メーカー
HPLC	2690 セパレーションモジュール	Waters Corporation
検出器	2487 デュアルλ UV/VIS 検出器	
データ処理装置	ミレニアム ³² クロマトグラフィーマネジャー	

2) 天秤

機器名及び型式	メーカー
分析用上皿電子天秤 AE240	Mettler-Toledo AG

3) その他の機器

機器名及び型式	メーカー
Milli-Q 水製造システム Milli-Q Advantage A10	Millipore Corporation

[HPLC 移動相〔アセトニトリル／精製水（7/3、v/v）〕の調製]

アセトニトリル 350 mL 及び精製水 150 mL を混合した。本試液は調製日の翌日まで
に使用した（使用期限；調製後 1 箇月以内）。

[標準原液の調製]

以下に示すように、標準原液を n=1 で用時調製した。

調製試料	採取試料	採取量 (g)	定容量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
標準原液	標準物質	0.0100	100	100

溶媒：エタノール

[標準溶液の調製]

以下に示すように、標準溶液を n=1 で用時調製した。

調製試料	採取試料	採取量 (mL)	定容量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
標準溶液	標準原液	2	10	20.0

溶媒：エタノール

[測定実測試料の調製]

各測定試料を以下の表に従って n=1 で採取し、溶媒を加えて希釈をして測定実測試
料を用時調製した。

測定試料 (mg/mL)	1 次希釈		2 次希釈		希釈率
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	採取量 (mL)	定容量 (mL)	
0.8	1	50	—	—	50
4	0.5	100	—	—	200
20	0.5	50	1	10	1000

溶媒：エタノール

[HPLC 測定条件]

カラム : L-column (5 μm 、4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm、一般財団法人
化学物質評価研究機構)

カラム恒温槽設定温度
: 40°C

HPLC 移動相 : アセトニトリル／精製水 (7/3、v/v)
 流量 : 1.0 mL/min
 検出 : UV (測定波長 254 nm)
 試料注入量 : 20 µL
 オートサンプラー内設定温度 : 10°C
 注入順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液
2	各 1	測定実測試料

標準溶液及び測定実測試料の測定は、注入後 24 時間以内に実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内における 24 時間後の安定性が確認されている。

[測定システム適合性]

測定開始時に標準溶液を 3 回連続注入し、*p*-ジブロモベンゼンの保持時間及びピーク面積の再現性を確認した。評価基準は保持時間及びピーク面積の相対標準偏差が 5% 以下とした。その結果、ピーク面積の相対標準偏差は 0.3% 以下、保持時間の相対標準偏差は 0.0% であり、すべて判定基準を満たす結果であったことから、本測定の妥当性が確認された。

[被験液中 *p*-ジブロモベンゼン濃度の算出]

システム適合性で 3 回注入された標準溶液の *p*-ジブロモベンゼンのピーク面積の平均値 (Q_s) を求めた。別に測定実測試料を 1 回注入して *p*-ジブロモベンゼンのピーク面積 (Q_t) を求め、以下の式により被験液中の *p*-ジブロモベンゼン濃度を求めた。また、得られた被験液濃度を用いて表示値 (100.0%) に対する割合を算出した。

$$\text{被験液中 } p\text{-ジブロモベンゼン濃度 (mg/mL)} = \frac{Q_t}{Q_s} \times A \times F \times \frac{1}{1000}$$

Q_t : 測定実測試料の *p*-ジブロモベンゼンのピーク面積

Q_s : 標準溶液の *p*-ジブロモベンゼンの平均ピーク面積

A : 標準溶液中の *p*-ジブロモベンゼン濃度 (µg/mL)

F : 希釈率

5.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされていることからラットを選択し、また、この試験に使用された系統のラットは一般毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、その特性がよく知られており、背景資料が豊富であることから選択した。

5.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] の雌雄各 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手^{注)}し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含む 20 日間の馴化飼育を行った。その間、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (馴化 1、3、9、16 及び 20 日の 5 回) 及び腔垢検査 (馴化 4 から 17 日の 14 日間) を実施し、それらの結果を基に、性周期異常の雌 4 例 (耳標番号: 673、678、713 及び 720) を除き、一般状態及び性周期にそれぞれ異常がなく、体重増加が良好な雌雄各 48 匹をそれぞれ選択し、10 週齢で投与に使用した。なお、性周期については、腔垢像を発情前期、発情期、発情後期及び発情休止期に分類し、それらの周期が 4~5 日ごとに繰り返されない場合を性周期異常とした。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量 (検疫初回の体重~群分け時の体重) により選別後、群分け当日 (投与開始の前日) の体重により、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた) で行った。投与開始時の体重範囲は雄で 391~461g (平均体重: 418 g)、雌は 229~273 g (平均体重: 247 g) であった。群分けから除外された動物のうち、雄 14 匹と性周期異常の雌 4 匹は投与開始後 4 日に試験から除外し、有効利用を目的として動物管理責任者に移管した。残りの雌 10 匹は無処置動物として継続飼育した。なお、継続飼育した無処置動物の雌は、試験群で死亡などにより交配すべき相手がいない動物は認められず、交配に用いなかったため、交配期間終了後に試験から除外し、有効利用を目的として動物管理責任者に移管した。

注) : 試験計画書に従い、動物発注数は雌雄各 60 匹であったが、実際には雌雄各 62 匹が納入された。

5.5 飼育条件

動物は、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測値: $21\sim 23^{\circ}\text{C}$)、相対湿度 $50\pm 20\%$ (実測値: $33\sim 65\%$)、換気回数 10~15 回/h、照明 12 時間/日 (07:00~19:00) の動物飼育室 (飼育室番号: 302 号室) でブラケット式金属製網ケージ (W250×D350×H200 mm: 日本ケージ株式会社) に個別に、交配中は雌雄各 1 匹の計 2 匹を収容した。なお、妊娠 17 日から授乳 4 日までは、床敷 (ホワイトフレーク: 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エコンケージ (W340×D400×H185 mm: 日本クレア株式会社) に 1 腹単位で収容した。飼料は NMF 固形 (放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号: 101018) をステンレス製給餌器により自由に摂取させた。飲料水は水道水 (御殿場市営水道水: 給水瓶使用) を自由に摂取させた。飼料及び床敷中の混入物質等に関しては、供試飼料の全ロットについて、Eurofins Scientific Analytice で実施した分析結果を入手し、床敷については、Eurofins Scientific Analytice で定期的 (年 6 回) に実施した分析結果を入手した。飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を芝浦セムテック株式会社に定期的 (年 4 回) に依頼し、結果を入手した。これらのデータ

により飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないことを確認し、分析報告書の写しを保存した。

5.6 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に小動物用耳標（雄：601~662、雌：663~724）をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと（対照群、低、中及び高用量の順）に4桁の番号をつけた。なお、1000の位は群、100の位は性（0番を雄、1番を雌）、10と1の位は個体番号とした。飼育ケージに投与量（群）ごとに色分けしたケージラベルを付け、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日（雄）、交尾成立日（雌雄）及び分娩日（雌）を明記した。

5.7 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄では42日間（交配前14日間、交配期間14日間、その後14日間）、雌では41~46日間（交配前14日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳4日まで）、不妊であった動物（Nos. 4106、4111）については53日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1回/日（7回/週）とした。

5.8 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与に際して一般的な強制経口投与とした。投与容量は5 mL/kg体重とし、フレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を1日1回、08:45~12:05の間に強制経口投与した。ただし、投与時に分娩中であった動物は分娩終了を待って、14:14~15:08の間に投与した。対照群には媒体（ゴマ油）のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量（表示単位：0.1 mL、小数第二位を四捨五入）は直近の体重を基準に算出した。

5.9 投与量及び群構成

投与量は4、20及び100 mg/kg/dayの3用量とし、媒体を投与する対照群を加え4群構成とした。1群当たりの動物数は雌雄各12匹とした。群構成表をText table 1.に示した。

Text table 1.群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対 照 群	0	0	5	雄	12	1001~1012
				雌	12	1101~1112
低用量群	4	0.8	5	雄	12	2001~2012
				雌	12	2101~2112
中用量群	20	4	5	雄	12	3001~3012
				雌	12	3101~3112
高用量群	100	20	5	雄	12	4001~4012
				雌	12	4101~4112

5.10 投与量の設定根拠

本試験の投与量は、先に実施された「1、4-ジプロモベンゼンのラットを用いた経口投与による28日間反復投与毒性試験、財団法人 畜産生物科学安全研究所、投与量：4、20、100及び500 mg/kg」¹⁾の結果を参考に設定した。4 mg/kg 群では、被験物質投与の影響はみられなかった。20 mg/kg 群では、腎臓において近位尿細管に好酸体や硝子滴の出現及び傷害された尿細管の再生像が雄に、血液プロトロンビン時間の短縮が雌に認められた。100 mg/kg 群では、更に、雄の腎臓重量が増加し、雌の腎臓には雄とは異なる糸球体毛細血管の拡張が認められ、雌雄とも血清塩素量が増加した。また、雌雄の肝臓には肝細胞の腫大が認められ、雄では肝重量の増加並びに血清総コレステロール及び総ビリルビン量の増加と血糖値の減少が認められた。これらの変化に加えて、100 mg/kg 群の雌雄に副腎皮質、特に束状帯細胞の空胞化例も認められた。500 mg/kg 群では、100 mg/kg 群で認められた変化がより明らかとなり、雌雄とも肝臓及び腎臓重量は増加し、雄では副腎重量も増加した。また、雌雄の小腸粘膜には脂質の蓄積による上皮の空胞化が認められ、空回腸は肉眼的にも白色化していた。更に、胃の腺胃部粘膜にびらんを認める例があった。以上の変化に加えて、500 mg/kg 群では、血清総たん白、総コレステロール及びトリグリセライド量の増加、血糖値の減少及び血液活性化部分トロンボプラスチン時間の延長ないし延長傾向が雌雄に、 γ -GTP 活性並びに尿素窒素及び無機リン量の増加が雄に、GPT 活性及びカルシウム量の増加が雌に認められた。また、雌雄とも摂餌量は投与初期に減少傾向を、その後は逆に増加傾向を示し、雄には死亡例も認められた。無影響量は雌雄ともに4 mg/kg/dayと推定された。したがって、簡易生殖毒性試験における投与量は明らかな被験物質投与の影響が予想される100 mg/kgを高用量とし、以下公比5で除して20及び4 mg/kgをそれぞれ中及び低用量に設定した。

5.11 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与1日、投与1日から7日を投与1週、交尾成立日を妊娠0日、分娩終了日を授乳0日、出産日（出生日）を哺育0日（生後0日）とし、以下に示す項目について、それぞれ記載の時期に観察及び検査を実施した。

5.11.1 一般状態の観察

全個体について、検疫・馴化期間中は毎日1回、投与期間中は毎日3回（投与前、投与直後及び投与1~3時間後）、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態における異常の有無を観察した。なお、妊娠期間中の動物を手にとっての定期的な観察は、妊娠0、7、14及び20日に行った。

5.11.2 体重測定

全個体について、馴化1、3、9、16及び20日に体重を測定した。雄は投与1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42日及び剖検日に、雌は投与1、4、8、11、15日（未交尾動物は交配期間中の投与18、22及び25日）、妊娠0、4、7、11、14、17及び20日、授乳0及び4日並びに剖検日（データは参考値とし帳票には記載しなかった）に体重を測定した。なお、午後の分娩観察時に分娩の終了が確認された個体の授乳0日の体重測定（13:41~16:53）を除き、08:26~10:57の間に体重測定を行った。剖検日には相対器官重量算出に備えて、全個体の体重を08:02~08:52の間に測定した。妊娠25日未分娩動物及び授乳期間中に全哺育児が死亡した母動物については、搬出前に測定した（ただし、データは参考値とし帳票には記載しなかった）。

5.11.3 摂餌量測定

全個体について、雄は投与1、4、8、11、15、32、36、39及び42日に、雌は投与1、4、8、11及び15日、妊娠1、4、7、11、14、17及び20日並びに授乳2及び4日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差から1匹当たりの1日摂餌量を算出した。給餌量及び残餌量の測定は08:24~12:04の間に行った。

5.11.4 膣垢検査

雌の全個体について、馴化期間中の14日間及び投与開始翌日から交尾が認められるまで、毎日膣垢を採取した。馴化期間中の標本については性周期異常の有無について調べた。交配前投与期間中の標本については、多数の角化上皮細胞から成る膣垢像を発情の指標とし、発情期像発現回数及び発情期から次の発情期までの日数（性周期）を調べた。交配期間中は膣垢内の精子の有無を調べた。

5.11.5 交配方法

交配前投与期間終了後、同じ投与群の雌雄を1:1で終夜同居させ、翌朝、膣栓形成あるいは膣垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交配開始日を0日と起算して交尾までに要した日数を調べた。同一雌雄による同居期間は最長14日間であった。交尾が確認されなかった100 mg/kg投与群の2例（Nos. 4106、4111）は交配期間終了日を妊娠0日と仮定して一般状態の観察、体重及び摂餌量測定並びに投与を継続し、妊娠25日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査に供

した。妊娠の有無を確認した結果、着床は認められなかったため、妊娠期間中のデータを統計解析より除外した。

5.11.6 分娩及び哺育観察

1) 母動物の観察

交尾の確認された雌動物は全例自然分娩させ、分娩状態の異常の有無を観察した。分娩終了の確認（授乳 0 日の測定及び観察）は、妊娠 21 日から妊娠 25 日までの午前・午後、1 日 2 回（妊娠 25 日は午前 10 時までに 1 回）行い、妊娠期間を 0.5 日単位で表示し、1 日単位で算出した。分娩が 17 時までに終了していた場合、その日を授乳 0 日とした。胎盤及び羊膜の処理の有無を観察後、分娩が終了した母動物は授乳 4 日まで出生児を哺育させ、児集め、営巣及び授乳を指標として哺育状態を観察した。

分娩した母動物は授乳 5 日に、授乳期間中に全哺育児が死亡した母動物はその時点で、エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ病理学検査に供した。

2) 出生児の観察

出生日（生後 0 日）に出生児数及び死産児数を数えた。出生児は外表異常の有無を観察^注し、性別を判定して体重を測定した後、母動物に哺育させた。出生児の生死の観察を生後 4 日まで毎日 1 回行った。なお、死産児及び死亡児は廃棄した。

生後 4 日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検を行い、体外表、胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を調べた。胸腺の頸部残留が対照群の 1 母体に 1 例みられたことから、肉眼的異常部位として当該出生児の胸腺をリン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液で固定し、保存したが、発現状況及びその病理学的性状から偶発性と判断したため、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本の作製及び鏡検は行なわなかった。なお、出生児の体重は個体別に測定し、各腹単位で雌雄別に平均値を算出した。

注）：頭部の陥没や裂、顔面の鼻吻や上下顎、口唇のゆがみや裂、眼瞼や耳介の大きさ、形状、左右のバランス、胸腺部のゆがみや大きさ、内部臓器の突出、尾部の長さ、形状、数、欠損、四肢部の長さ、形状、指の数、欠損及び左右のバランスに注意して観察し、正常と異なる場合を異常とした。

5.11.7 病理学検査

1) 剖検及び器官重量測定

全ての生存動物については最終投与翌日に、授乳期間中に全哺育児が死亡した母動物についてはその時点で、エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後、死亡動物は可及的速やかに、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。なお、母動物については剖検時に黄体数及び着床痕数を数えた。次いで、全例の精巣及び精巣上体の重量を測定し、それら器官重量（絶対重量）と剖検時の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。なお、精巣及び精巣上体の重量については左右別々に測定し、その合計値で評価

した。

2) 病理組織学検査

全ての個体について、以下に示す器官・組織をリン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液で固定、保存した（ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換し保存した）。また、被験物質投与群の肝臓に被験物質投与に起因すると考えられる肉眼的異常がみられたため、比較対照として対照群の雄 3 例（Nos. 1001、1002、1003）の肝臓をリン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液で固定し、保存した。次いで、パラフィン包埋した後、切片とし（下線を施した器官・組織は固定・保存のみとした）、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色を行った。鏡検は、まず対照群及び高用量群の全個体、死亡動物、妊娠 25 日未分娩動物及び授乳期間中に全哺育児が死亡した母動物の全採取器官/組織、加えて全個体の肉眼的異常部位について行った。両側性の器官については両側を摘出し、精巣/卵巣、精巣上体及び精嚢は両側を、子宮は両角部を鏡検した。その結果、高用量群の生殖器系組織において被験物質投与の影響を示唆する異常所見は認められなかったため、中及び低用量群の全例についての追加検索は実施しなかった。なお、精巣については H・E 染色標本で被験物質投与の影響が認められなかったため、PAS 染色標本の作製及び観察は行わなかった。

精巣、精巣上体、卵巣、子宮、前立腺、精嚢、膣、肉眼的異常部位、
個体識別部（耳標を装着した耳介）

5.12 統計解析

5.12.1 パラメータの算出

以下の式により交尾率、授精率、受胎率及び出産率を群ごとに、妊娠期間、着床率、死産児率、外表異常率、出生率、生後 4 日生存率、生後 0 及び 4 日の性比を母動物ごとに算出した。なお、出生児の体重については母動物ごと雌雄別に平均値を求めた。

交尾率(%) = (交尾動物数/同居動物数) × 100

授精率(%) = (雌を妊娠させた雄の数/交尾した雄の数) × 100

受胎率(%) = (妊娠した雌の数/交尾した雌の数) × 100

妊娠期間(日) = 妊娠 0 日から分娩した日までの日数

出産率(%) = (出生児出産雌数/妊娠雌数) × 100

着床率(%) = (着床痕数/黄体数) × 100

死産児率(%) = (死産児数/出生児数及び死産児数) × 100

外表異常率(%) = (外表異常児数/出生児数) × 100

出生率(%) = (出生児数/着床痕数) × 100

生後 4 日生存率(%) = (生後 4 日生存児数/出生児数) × 100

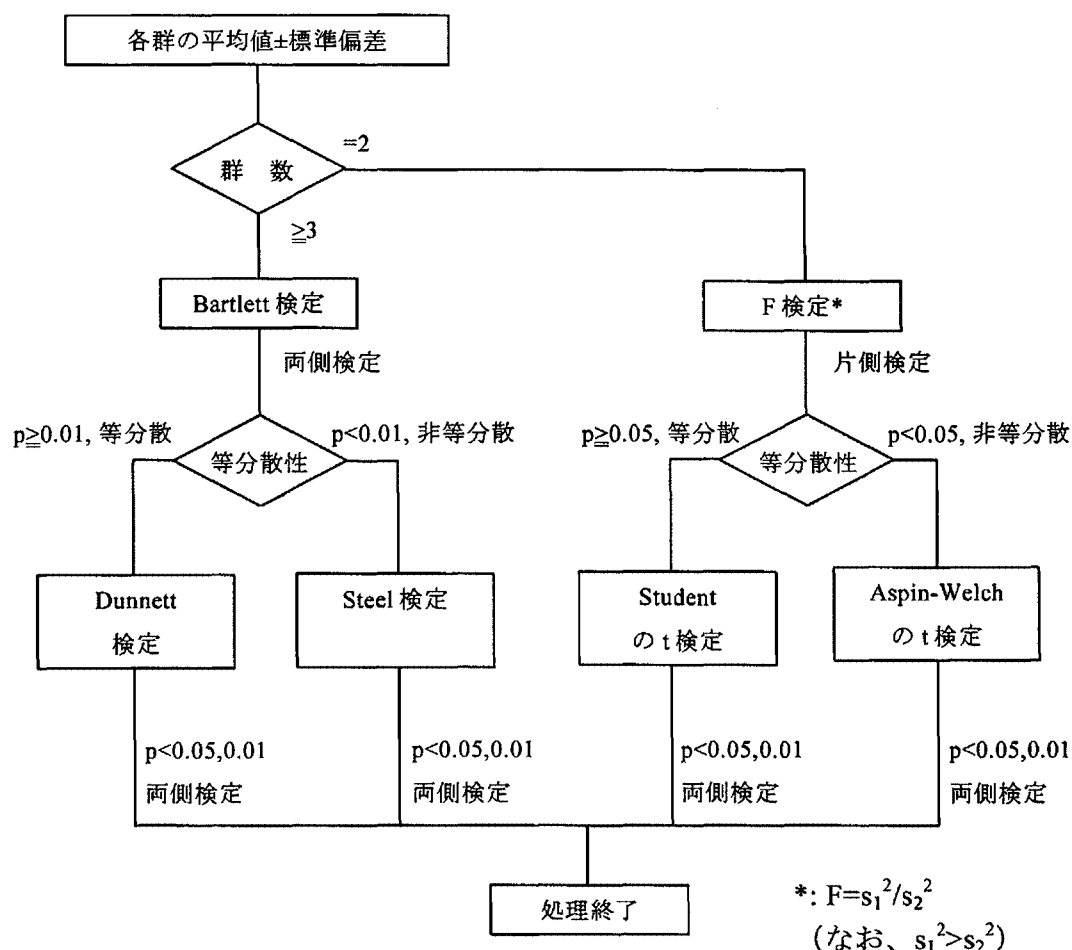
生後 0 日の性比 = 雄出生児数/出生児数

生後 4 日の性比 = 生後 4 日の雄生存児数/生後 4 日の生存児数

5.12.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量（雄：投与 1~42 日、雌：投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児：生後 0~4 日）、摂餌量、発情期像発現回数、性周期（発情周期）、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比（生後 0 及び 4 日）及び器官重量（雄の最終体重を含む）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した^{2), 3), 4)}。なお、未交尾雌は交尾率にのみ含め、交配期間中のデータは統計解析より除外した。



着床率、死産児率、外表異常率、出生率及び生後 4 日生存率については、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、Steel 検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った⁴⁾。

交尾率、授精率、受胎率、出産率は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、出生児出産雌動物数より算出し、Yeates の連続修正による χ^2 検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。ただし、期待度数が 5 以下のセルがみられたため Fisher の直接確率計算法により検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った⁴⁾。

6. 試験結果

6.1 一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)

雄ではいずれの投与群においても投与期間を通じ一般状態に異常はみられなかった。

雌では 20 mg/kg 投与群の 1 例で授乳 3 日に皮膚及び四肢の蒼白化、立毛、哺育行動の低下がみられ、授乳 4 日に死亡した。対照群の 1 例で授乳 4 及び 5 日に尿道口周囲の被毛の汚染、皮膚及び四肢の蒼白化、立毛がみられ、授乳 4 日には哺育行動の低下がみられた。対照群の 1 例で授乳 3 日までに、100 mg/kg 投与群の 1 例で授乳 1 日までに全哺育児が死亡した。その他には、いずれの投与群においても交配前、妊娠及び授乳期間を含め投与期間を通じ一般状態に異常はみられなかった。

6.2 体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)

雄では投与期間を通じ対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

雌では交配前、妊娠及び授乳期間を含め、投与期間を通じ対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.3 摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)

雄では 100 mg/kg 投与群で投与 4 日に対照群と比べ有意な低値が認められた。4 及び 20 mg/kg 投与群では、投与期間を通じ対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

雌では交配前、妊娠及び授乳期間を含め、投与期間を通じ対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.4 器官重量 (Table 4、Appendix 4-1~4-4)

剖検日の体重並びに精巣及び精巣上体重量には、対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.5 剖検所見 (Table 5-1~5-5、Appendix 5-1~5-96)

被験物質投与に起因すると考えられる変化として、100 mg/kg 投与群の雄の肝臓に大型化がみられた。一方、雌雄の生殖器系組織にはいずれの群においても特記すべき変化は認められなかった。総括を次の Text table 2. に示した。

Text table 2. 剖検所見の総括

	性別: 投与量(mg/kg): 検査例数:	雄				雌			
		0	4	20	100	0	4	20	100
		12	12	12	12	12	12	12	12
Liver Large		0	0	0	12	0	0	0	0

20 mg/kg 投与群の死亡動物（授乳 4 日、No. 3109）では、四肢及び皮膚の蒼白化、低栄養状態、副腎の大型化、脾臓の小型化、前胃の暗赤色巣及び白色巣がみられた。

妊娠 25 日未分娩動物（Nos. 4106、4111）では、いずれも着床は認められず肉眼的異常はみられなかった。

全哺育児が死亡した母動物（Nos. 1108、4110）では、No. 1108 で胸腺の小型化がみられたが、No. 4110 では肉眼的異常はみられなかった。

その他、精巣上体に結節が対照群の 1/12 例と 20 mg/kg 投与群の 2/12 例に、白色巣が 4 mg/kg 投与群の 1/12 例に、腎臓に結節が 4 mg/kg 投与群の雌 1/12 例に、下腹部被毛の汚染、腎臓の退色、脾臓の小型化、前胃の隆起巣、腺胃の白色巣及び胸腺の小型化が対照群の雌 1/12 例にみられたが、出現頻度及び病理学的性状から偶発的変化と考えられた。

6.6 病理組織学検査（Table 6-1~6-5、Appendix 5-1~5-96）

雌雄の生殖器系組織に特記すべき組織学的変化は認められなかった。一方、上述の肉眼的変化がみられた 100 mg/kg 投与群の雄の肝臓では被験物質投与の影響と考えられる変化として、小葉中心性の肝細胞肥大が検索全例に軽度又は中等度にみられた。総括を次の Text table 3. に示した。

Text table 3. 病理組織学検査の総括

性別: 投与量(mg/kg): 検査例数:	雄				雌			
	0	4	20	100	0	4	20	100
	3	0	0	12	0	0	0	0
Liver								
Hypertrophy, hepatocytic, central	0	-	-	12	-	-	-	-
mild	0	-	-	1	-	-	-	-
moderate	0	-	-	11	-	-	-	-

- : Not examined

20 mg/kg 投与群の死亡動物では、副腎の皮質細胞肥大が軽度に、脾臓の萎縮が軽度に、前胃の潰瘍が軽度にみられた。

妊娠 25 日未分娩動物では、妊娠を示唆する所見や卵巣、子宮、膣の病理組織に被験物質投与の影響を示唆する異常所見は認められず、不妊の要因及び被験物質投与との関連性は明らかでなかった。

全哺育児が死亡した母動物では、対照群の 1 例で中等度な胸腺の萎縮がみられたが、100 mg/kg 投与群の 1 例では組織学的変化はみられず、全哺育児が死亡した要因及び被験物質投与との関連性は明らかでなかった。

以上の他に、いくつかの器官・組織に種々の変化がみられたが、この系統の動物に背景的にみられる変化と質的及び頻度的な差はなく、その病理組織学的性状及び発現状況から、偶発性変化と判断した。

6.7 性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)

発情期像発現回数及び平均性周期日数には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.8 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)

100 mg/kg 投与群の 2 組 (Nos. 4006 及び 4106、4011 及び 4111) を除き全例で交尾が成立し、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.9 分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)

妊娠動物の分娩状態では、不妊であった 100 mg/kg 投与群の 2 例を除き、妊娠 21~23 日に全例が正常に分娩した。出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数及び着床率には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。4 及び 100 mg/kg 投与群で対照群と比べ死産児率の高値傾向、出生児数及び出生率の低値傾向が認められたが、20 mg/kg 投与群では同様の傾向はみられないことから、4 mg/kg 投与群については偶発性と判断した。

6.10 出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)

生後 0 及び 4 日の性比には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差はなく、いずれの投与群においても外表異常を有する出生児はみられなかった。

6.11 出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)

授乳期間中の死亡児は対照群で 26 例、4、20 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ 3、11 及び 44 例みられた。生後 4 日生存率には対照群と各被験物質投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかったが、100 mg/kg 投与群で低値傾向を示した。

6.12 出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)

100 mg/kg 投与群では、雄出生児の生後 0 日の体重に対照群と比べ有意な低値が認められ、統計学的に有意でないものの生後 4 日の雌雄体重及び生後 0~4 日の間の体重増加量に低値傾向が認められた。

4 及び 20 mg/kg 投与群では、出生時及び生後 4 日の雌雄体重並びに生後 0~4 日の間の体重増加量に対照群と比べ有意な差は認められなかった。

6.13 出生児の生後 4 日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)

胸腺の頸部残留が対照群の雄 1 例にみられた。その他には、いずれの投与群の出生児にも異常はみられなかった。

7. 考察

p-ジブロモベンゼンの 0（対照群：ゴマ油）、4、20 及び 100 mg/kg/day を、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄には交配前 14 日間に加え交配期間を通して剖検前日まで（42 日間）、雌には交配前 14 日間に加え交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日まで（41~46 日間）強制経口投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性の概略について検討した。

7.1 反復投与毒性

20 mg/kg 投与群の 1 例で皮膚及び四肢の蒼白化、立毛、哺育行動の低下がみられ、授乳 4 日に死亡した。剖検では、四肢及び皮膚の蒼白化、低栄養状態、副腎の大型化、脾臓の小型化、前胃の暗赤色巣及び白色巣がみられ、組織学的に副腎の皮質細胞肥大が軽度、脾臓の萎縮が軽度、前胃の潰瘍が軽度に見られたが、死因は不明であった。なお、100 mg/kg 投与群では死亡動物はみられていないため、偶発性と判断した。

一般状態では、対照群の 1 例で授乳期間中に尿道口周囲の被毛の汚染、皮膚及び四肢の蒼白化、立毛及び哺育行動の低下がみられ、対照群の他の 1 母体で授乳 3 日までに全哺育児が死亡したが、いずれも他の検査項目に関連する変化はみられず、一般状態の悪化及び全哺育児が死亡した原因は明らかでなかった。

体重及び摂餌量では、100 mg/kg 投与群の雄で投与 4 日の摂餌量に低値が認められたが、体重に異常はみられないことから、毒性学的意義はないと考えられた。

病理学検査では、精巣及び精巣上体重量、雌雄の生殖器系器官・組織にはいずれの群においても特記すべき変化は認められなかった。なお、被験物質投与の影響と考えられる変化として 100 mg/kg 投与群の雄で肉眼的に肝臓の大型化、肉眼的異常に相当する 100 mg/kg 投与群の雄のみの検索ではあるが、組織学的に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大がみられた。肥大した肝細胞は、細胞質内の淡好酸性均質領域の拡大を特徴としており滑面小胞体の増生が疑われた。本被験物質の類縁化合物であるブロモベンゼンは肝臓で代謝酵素と関連する酸化的代謝経路による変換を介して生物活性（毒性）を示し、肝ミクソーム酵素の誘導により肝毒性を増強することが知られており、同様の变化は先の 28 日間反復投与毒性試験¹⁾においても観察されていることから、肝薬物代謝酵素誘導の可能性が示唆された。なお、本試験では肝臓はあくまでも肉眼的異常動物しか検索していないため、20 mg/kg 以下の投与群での肝臓に対する影響の有無については不明であった。

7.2 生殖発生毒性

親動物では、性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率、更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数及び着床率に被験物質投与の影響は認められなかったが、100 mg/kg 投与群で死産児率の高値傾向、出生児数及び出生率の低値傾向、雌雄出生児の生後 0 及び 4 日の体重並びに生後 0~4 日の間の体重増加量に低値又は低

値傾向が認められたことから、雌雄動物の交尾能、授精能及び受胎能への被験物質投与の影響はないと考えられるものの、母動物の妊娠維持、分娩及び哺育行動などの生殖機能に影響を及ぼす可能性が推測され、被験物質投与が児の発育及び生存性に影響を及ぼすことが推察された。

100 mg/kg 投与群で 2 組の交尾不成立がみられたが、未交尾雌の性周期には異常はみられず、未交尾であった雌雄の剖検及び病理組織にも不妊に関連する組織学的変化はみられないことから、被験物質投与との関連性は明らかでなかった。100 mg/kg 投与群の 1 例で授乳 1 日までに全哺育児が死亡した。本例の雌雄出生時体重には低値傾向が認められているが、哺育状態を含む一般状態、体重、摂餌量、剖検及び病理組織学検査に異常はみられず、全哺育児死亡の要因は明らかでなかった。

これらの結果から、本試験条件下で *p*-ジブロモベンゼンを反復経口投与することにより、100 mg/kg 投与群の雄に小葉中心性肝細胞肥大が惹起され、100 mg/kg 投与群で死産児率の高値傾向、出生児数及び出生率の低値傾向、雌雄出生児の生後 0 及び 4 日の体重並びに生後 0~4 日の間の体重増加量に低値又は低値傾向が認められた。従って、本被験物質の反復投与による無影響量及び無毒性量は雄で 20 mg/kg、雌で 100 mg/kg 以上、生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量は雄親動物でいずれも 100 mg/kg 以上、母動物と児動物ではいずれも 20 mg/kg と判断した。

8. 文献

- 1) 1、4-ジブロモベンゼンのラットを用いた経口投与による 28 日間
反復投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, vol.2 pp.353-370 (1995)
- 2) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods, 8th ed. Ames: Iowa State University
Press; 1989.
- 3) Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a
control. J Am Stat Assoc 1955; 50: 1096-121.
- 4) 佐久間昭 (1981) : 薬効評価－計画と分析-II, pp.23-27, 387-389, 東京大学出版会,
東京.

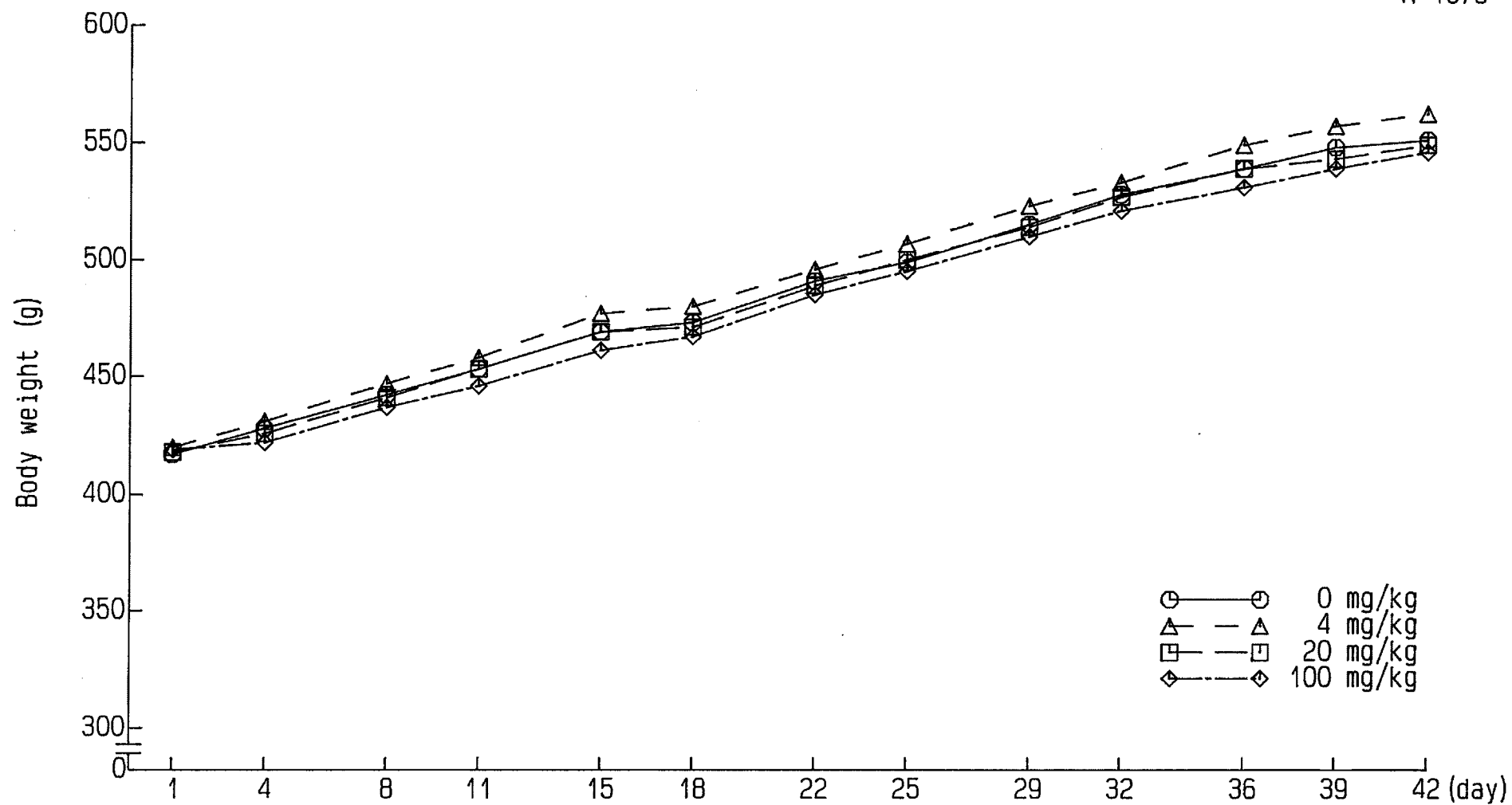


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene
Body weight of male rats

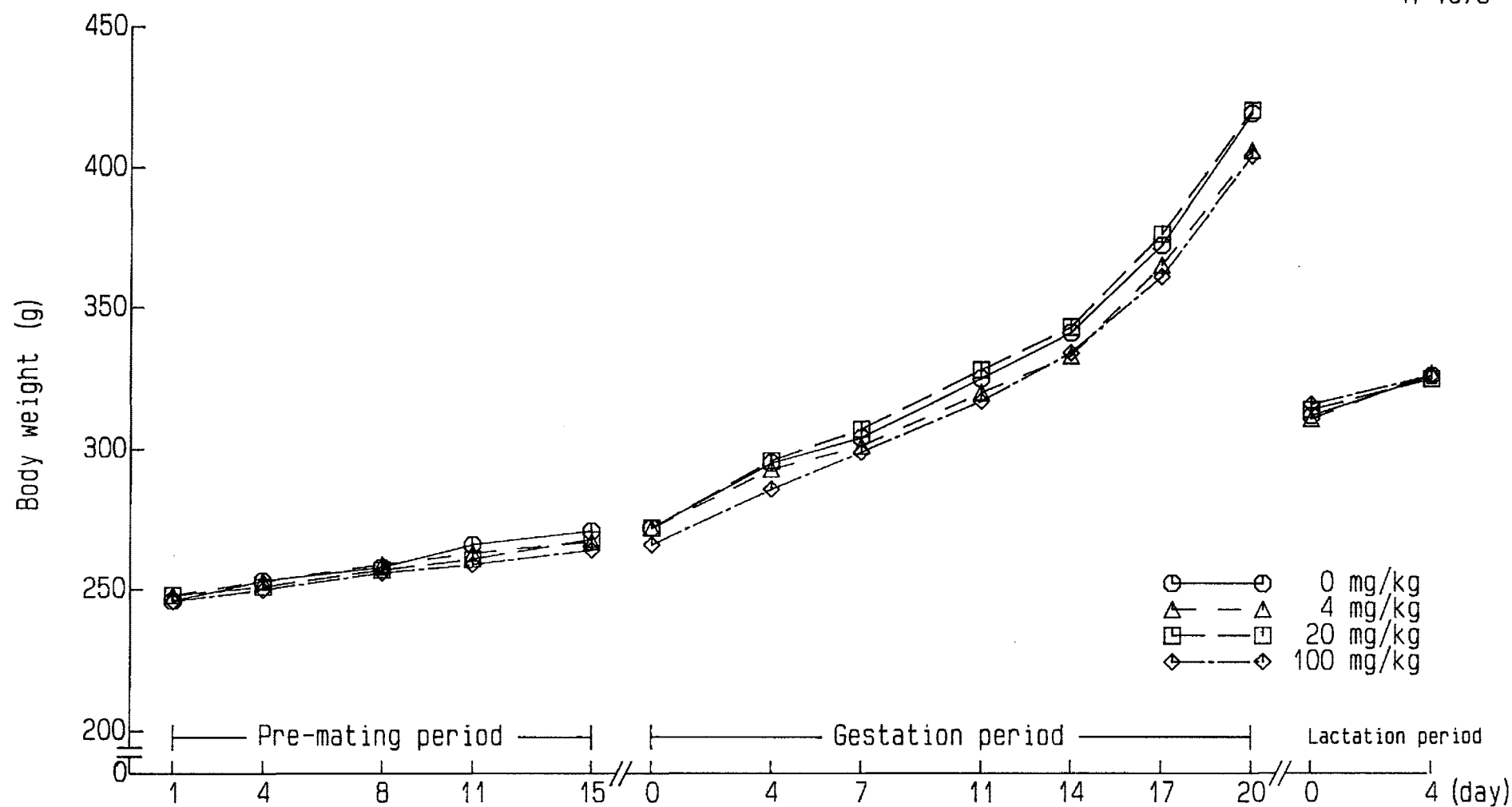


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Body weight of female rats

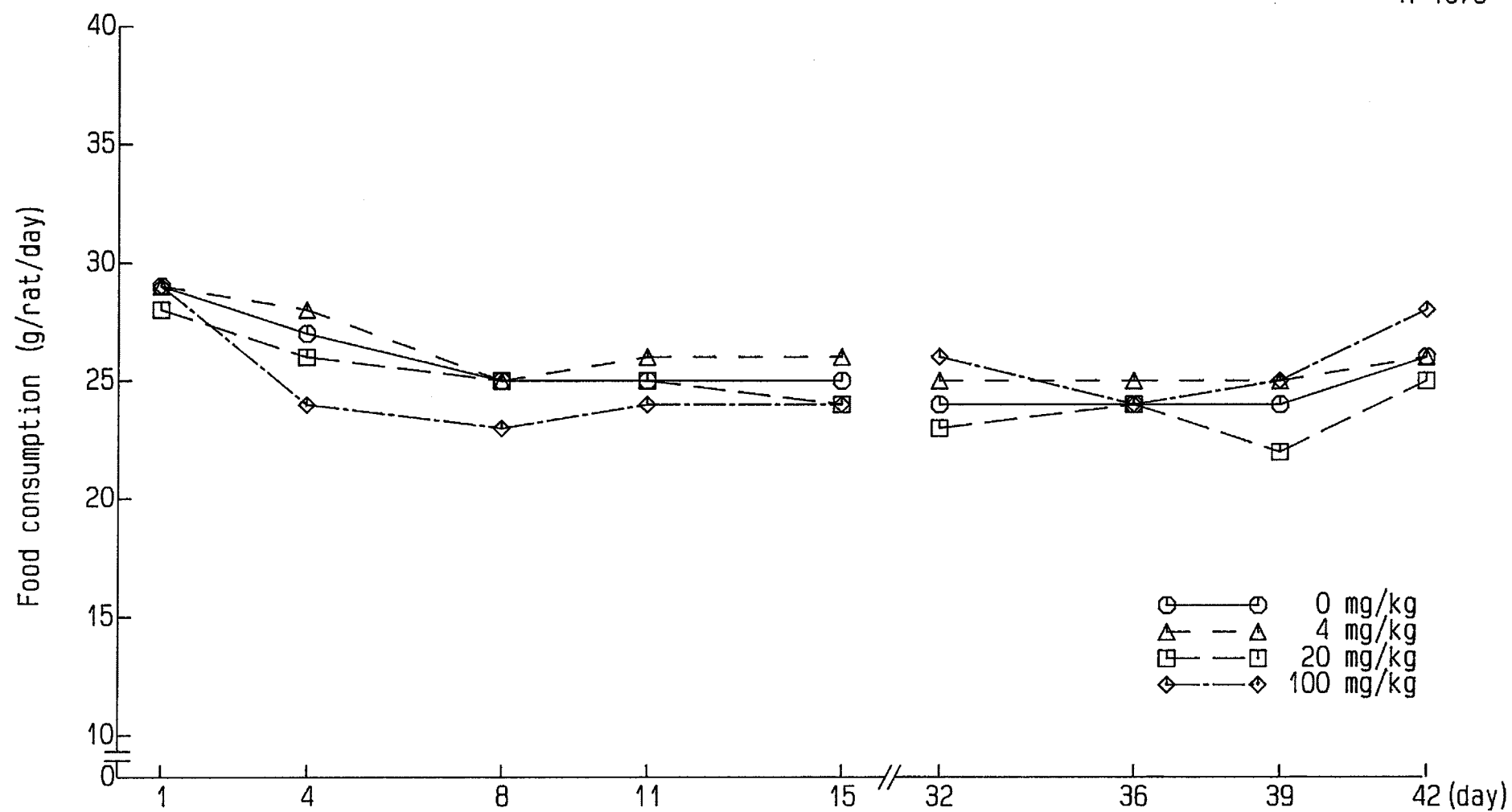


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Food consumption of male rats

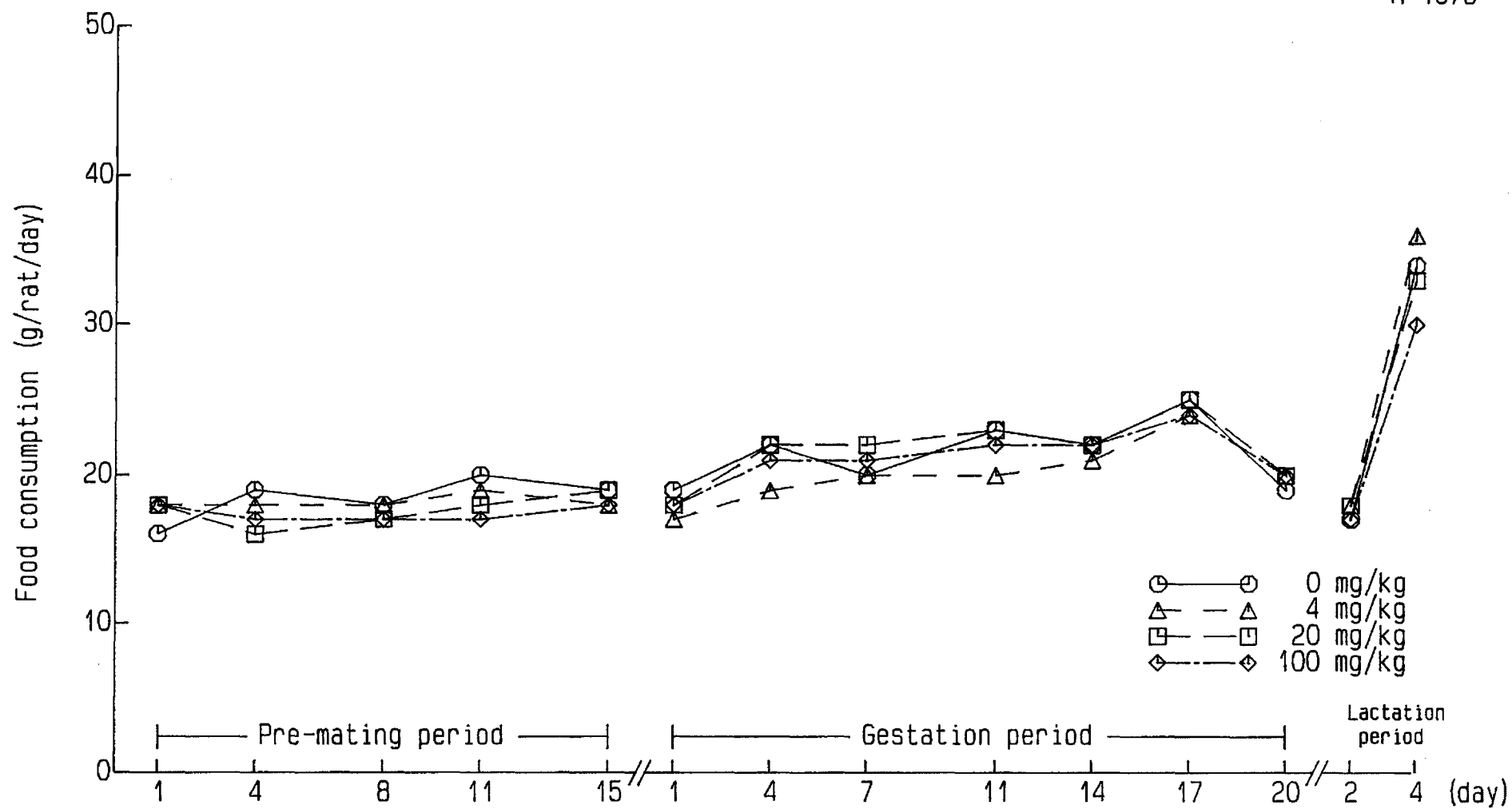


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Food consumption of female rats

Table 1-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Administration (day)						
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
4	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
20	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0

a): Day of necropsy

Table 1-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Clinical signs in female rats during the pre-mating period

[illegible]

Table 1-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Clinical signs in dams during the gestation period

Dose mg/kg	Signs	Administration																							
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100	No. of dams	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

a): Gestation day

Table 1-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Clinical signs in dams during the lactation period

Dose mg/kg	Signs	Administration					5a)
		0	1	2	3	4	
0	No. of dams	12	12	12	12	11 ^{b)}	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	1	1
	Smudge, peri-genitourinary area	0	0	0	0	1	1
	Paleness, skin and four limbs	0	0	0	0	1	1
	Piloerection	0	0	0	0	1	1
	Decrease in nursing behavior	0	0	0	0	1	0
4	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
20	No. of dams	12	12	12	12	12	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	1	1	0
	Paleness, skin and four limbs	0	0	0	1	0	0
	Piloerection	0	0	0	1	0	0
	Decrease in nursing behavior	0	0	0	1	0	0
	Dead	0	0	0	0	1	0
100	No. of dams	10	10	9 ^{c)}	9	9	9
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on day 3 of lactation because all pups died.

c): One dam was necropsied on day 1 of lactation because all pups died.

Table 2-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Body weight of male rats

Dose mg/kg	Pre-mating period					Mating period				Post-mating period				Gain 1-42
	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	417	428	442	453	469	473	491	499	515	528	539	548	551
	S.D.	19	20	21	21	23	26	28	29	30	32	32	33	34
4	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	420	431	447	458	477	480	496	507	523	533	549	557	562
	S.D.	19	22	28	30	33	32	35	38	41	42	45	48	48
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	418	426	441	453	469	471	489	500	514	527	539	543	549
	S.D.	19	19	17	17	16	19	21	23	25	25	29	33	35
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	419	422	437	446	461	467	485	495	510	521	531	539	546
	S.D.	19	19	25	27	31	29	34	36	38	39	38	39	39

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Body weight of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	Administration (day)					Gain 1-15
	1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	246	253	258	266	271
	S.D.	13	12	13	13	13
4	No.	12	12	12	12	12
	Mean	248	253	259	263	267
	S.D.	9	12	15	12	12
20	No.	12	12	12	12	12
	Mean	248	251	257	261	268
	S.D.	13	9	11	13	12
100	No.	12	12	12	12	12
	Mean	246	250	256	259	264
	S.D.	10	9	10	9	11

Unit: g

NO.: NO. of animals

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Body weight of dams during the gestation period

Dose mg/kg	Administration								Gain 0-20
		0	4	7	11	14	17	20a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	272	295	304	325	341	372	419	147
	S.D.	15	12	14	15	15	18	21	14
4	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	272	293	301	320	333	365	406	135
	S.D.	11	15	16	18	20	21	24	19
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	272	296	307	328	343	376	420	148
	S.D.	16	18	16	18	21	22	26	17
100	No.	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean	266	286	299	317	334	361	404	139
	S.D.	9	8	8	9	11	12	14	10

Unit: g

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Body weight of dams during the lactation period

Dose mg/kg	Administration			Gain 0-4
		0	4a)	
0	No.	12	11 ^{b)}	11
	Mean	312	326	13
	S.D.	12	34	30
4	No.	12	12	12
	Mean	311	327	16
	S.D.	21	24	17
20	No.	12	11 ^{c)}	11
	Mean	314	325	11
	S.D.	16	24	28
100	No.	10	9 ^{d)}	9
	Mean	316	326	10
	S.D.	17	14	14

Unit: g

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 3 because all pups died.

c): One dam died on lactation day 4

d): One dam was necropsied on lactation day 1 because all pups died.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Food consumption of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Post-mating period			
		1	4	8	11	15	32	36	39	42a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	29	27	25	25	25	24	24	24	26
	S.D.	2	3	3	3	2	3	3	2	2
4	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	29	28	25	26	26	25	25	25	26
	S.D.	4	4	5	5	3	3	2	3	4
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28	26	25	25	24	23	24	22	25
	S.D.	2	2	2	2	2	3	2	3	3
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	29	24*	23	24	24	26	24	25	28
	S.D.	2	1ST	1	2	2	2	2	3	3

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): Day of administration

*: p<0.05 (Significant difference from control group)

ST: Steel's test

Table 3-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Food consumption of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Administration (day)				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	16	19	18	20	19
	S.D.	3	2	3	3	3
4	No.	12	12	12	12	12
	Mean	18	18	18	19	18
	S.D.	3	3	3	2	2
20	No.	12	12	12	12	12
	Mean	18	16	17	18	19
	S.D.	3	3	3	3	2
100	No.	12	12	12	12	12
	Mean	18	17	17	17	18
	S.D.	3	3	2	3	2

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Food consumption of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration						
		1	4	7	11	14	17	20a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	19	22	20	23	22	25	19
	S.D.	4	3	3	3	2	2	2
4	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	17	19	20	20	21	24	20
	S.D.	2	4	3	4	4	3	3
20	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	18	22	22	23	22	25	20
	S.D.	2	4	4	3	3	3	2
100	No.	10	10	10	10	10	10	10
	Mean	18	21	21	22	22	24	20
	S.D.	4	2	2	2	1	2	2

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Food consumption of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration	
		2	4a)
0	No.	12	11 ^{b)}
	Mean	17	34
	S.D.	10	13
4	No.	12	12
	Mean	18	36
	S.D.	8	9
20	No.	12	11 ^{c)}
	Mean	18	33
	S.D.	9	12
100	No.	9	9 ^{d)}
	Mean	17	30
	S.D.	5	8

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 3 because all pups died.

c): One dam died on lactation day 4.

d): One dam was necropsied on lactation day 1 because all pups died.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Organ weight of male rats

		Dose mg/kg	Body weight g	Testes (R+L) g(g/100g BW)	Epididymides (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	12	12	12
		Mean	558	3.40	1310
		S.D.	33	0.27	95
	4	No.	12	12	12
		Mean	569	3.44	1349
		S.D.	49	0.29	58
	20	No.	12	12	12
		Mean	556	3.46	1327
		S.D.	35	0.24	73
	100	No.	12	12	12
		Mean	553	3.53	1347
		S.D.	41	0.33	88
Relative	0	No.		12	12
		Mean		0.61	236
		S.D.		0.06	20
	4	No.		12	12
		Mean		0.61	239
		S.D.		0.08	22
	20	No.		12	12
		Mean		0.62	239
		S.D.		0.04	18
	100	No.		12	12
		Mean		0.64	245
		S.D.		0.07	23

No significant difference in any treated groups from control group

Table 5-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
 with p-dibromobenzene
 Gross pathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	4 12	20 12	100 12
Epididymis					
Nodule		1	0	2	0
Focus,white		0	1	0	0
Liver					
Large		0	0	0	12

M : Male

Table 5-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with p-dibromobenzene

Gross pathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 11	F 4 12	F 20 11	F 100 9
Findings					
General descriptions					
Smudge, lower abdominal fur		1	0	0	0
Kidney					
Discoloration, pale		1	0	0	0
Nodule		0	1	0	0
Spleen					
Small		1	0	0	0
Stomach					
Focus, raised, forestomach		1	0	0	0
Focus, white, glandular stomach		1	0	0	0
Thymus					
Small		1	0	0	0

F : Female

Table 5-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
 with p-dibromobenzene
 Gross pathological findings (Undelivered)

Organs	Sex:	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	100 2
All tissues		
Not remarkable		2

F : Female

Table 5-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with p-dibromobenzene

Gross pathological findings (All littermates died)

Organs	Sex:	F	F
Findings	Dose (mg/kg): Number:	0 1	100 1
Thymus Small		1	0

F : Female

Table 5-5

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Gross pathological findings (Found dead)

Organs	Sex:	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	20 1
General descriptions		
Discolored skin,pale		1
Discolored four limb,pale		1
Undernourishment		1
Adrenal		
Large		1
Spleen		
Small		1
Stomach		
Focus,white,forestomach		1
Focus,dark red,forestomach		1

F : Female

Table 6-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with p-dibromobenzene
Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 12	M 4 12	M 20 12	M 100 12
Findings					
Epididymis					
Number examined		12	1	2	12
Not remarkable		11	0	0	12
Granuloma, spermatic		1	1	2	0
mild		1	1	2	0
Liver					
Number examined		3	0	0	12
Not remarkable		3	0	0	0
Hypertrophy, hepatocytic, central		0	0	0	12
mild		0	0	0	1
moderate		0	0	0	11
Prostate					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		6	0	0	6
Cell infiltration, inflammatory		6	0	0	6
minimal		5	0	0	4
mild		1	0	0	2
Seminal vesicle					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		12	0	0	12
Testis					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		12	0	0	12

M : Male

Table 6-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with p-dibromobenzene

Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 11	F 4 12	F 20 11	F 100 9
Findings					
Kidney					
Number examined		1	1	0	0
Vacuolation, tubular cell		1	0	0	0
moderate		1	0	0	0
Basophilia, tubular		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Urinary cast, granular		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
NEPHROBLASTOMA		0	1	0	0
present		0	1	0	0
Ovary					
Number examined		11	0	0	9
Not remarkable		11	0	0	9
Spleen					
Number examined		1	0	0	0
Atrophy		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Stomach					
Number examined		1	0	0	0
Ulcer, glandular stomach		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Ulcer, forestomach		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Thymus					
Number examined		1	0	0	0
Atrophy		1	0	0	0
moderate		1	0	0	0
Uterus					
Number examined		11	0	0	9
Not remarkable		11	0	0	9
Vagina					
Number examined		11	0	0	9
Not remarkable		11	0	0	9

F : Female

Table 6-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with p-dibromobenzene

Histopathological findings (Undelivered)

Organs	Sex:	F
Findings	Dose (mg/kg): Number:	100 2
Ovary		
Number examined		2
Not remarkable		2
Uterus		
Number examined		2
Not remarkable		2
Vagina		
Number examined		2
Not remarkable		2

F : Female

Table 6-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with p-dibromobenzene

Histopathological findings (All littermates died)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 1	F 100 1
Findings			
Ovary			
Number examined		1	1
Not remarkable		1	1
Thymus			
Number examined		1	0
Atrophy		1	0
moderate		1	0
Uterus			
Number examined		1	1
Not remarkable		1	1
Vagina			
Number examined		1	1
Not remarkable		1	1

F : Female

Table 6-5

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with p-dibromobenzene

Histopathological findings (Found dead)

Organs	Sex:	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	20 1
Adrenal		
Number examined		1
Hypertrophy, cortical cell		1
mild		1
Ovary		
Number examined		1
Not remarkable		1
Spleen		
Number examined		1
Atrophy		1
mild		1
Stomach		
Number examined		1
Ulcer, forestomach		1
mild		1
Uterus		
Number examined		1
Not remarkable		1
Vagina		
Number examined		1
Not remarkable		1

F : Female

Table 7 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4	
0	12	0	0	0	9	3	3.3±0.5 4.2±0.4
4	12	0	0	0	8	4	3.3±0.5 4.4±0.5
20	12	0	0	0	9	3	3.3±0.5 4.2±0.3
100	12	0	0	0	9	3	3.3±0.5 4.2±0.3

No significant difference in any treated groups from control group

Table 8 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Mating and fertility of animals

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	2.3±1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.3±1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)
4	12	3.3±1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	3.3±1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)
20	12	2.0±1.3	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.0±1.3	12/12(100.0)	12/12(100.0)
100	12	2.4±1.3	10/12(83.3)	10/10(100.0)	12	2.4±1.3	10/12(83.3)	10/10(100.0)

a): (No. of copulated animals / No. of mated animals) × 100

b): (No. of males which impregnated females / No. of copulated males) × 100

c): (No. of pregnant females / No. of copulated females) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 9 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with liveborns	Delivery index % a)	Gestation length in days	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % b)	No. of stillborns (%)c)	No. of liveborns	Live birth index % d)
0	Total	12	12	100.0		197	193		3	181	
	Mean				22.2	16.4	16.1	98.1	(1.6)	15.1	93.9
	S.D.				0.6	1.5	1.4	4.5	(5.4)	1.6	6.8
4	Total	12	12	100.0		190	184		6	161	
	Mean				21.9	15.8	15.3	97.0	(4.7)	13.4	87.6
	S.D.				0.3	1.9	1.7	4.0	(10.3)	2.8	16.8
20	Total	12	12	100.0		195	189		2	176	
	Mean				22.1	16.3	15.8	96.9	(1.0)	14.7	93.2
	S.D.				0.3	1.4	1.5	4.0	(3.6)	1.6	6.0
100	Total	10	10	100.0		163	160		7	139	
	Mean				22.0	16.3	16.0	98.2	(4.7)	13.9	86.8
	S.D.				0.5	1.8	1.8	2.9	(6.7)	2.0	6.6

a): (No. of females which delivered liveborns / No. of pregnant females) × 100

b): (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) × 100

c): (No. of stillborns / No. of liveborns and stillborns) × 100

d): (No. of liveborns / No. of implantation sites) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 10 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Sex ratio and external examination of pups

Dose mg/kg	No. of dams		Liveborns		Sex ratio of liveborns at birth a)	Day 4		Sex ratio of live pups on day 4 b)	External c) abnor- malities (%)d)
			No. of males	No. of females		No. of males	No. of females		
0	12	Total	94	87		78	77		0
		Mean	7.8	7.3	0.52	7.1	7.0	0.47	(0.0)
		S.D.	2.2	2.6	0.15	3.4	3.1	0.22	(0.0)
4	12	Total	79	82		77	81		0
		Mean	6.6	6.8	0.48	6.4	6.8	0.47	(0.0)
		S.D.	3.1	2.7	0.18	3.3	2.7	0.20	(0.0)
20	12	Total	91	85		85	80		0
		Mean	7.6	7.1	0.51	7.1	6.7	0.52	(0.0)
		S.D.	2.2	1.6	0.12	2.5	2.3	0.13	(0.0)
100	10	Total	65	74		45	50		0
		Mean	6.5	7.4	0.47	5.0	5.6	0.46	(0.0)
		S.D.	1.8	2.0	0.12	2.5	2.6	0.11	(0.0)

a): No. of liveborn males / No. of liveborns

b): No. of live males on day 4 / No. of live pups on day 4

c): No. of liveborns with external abnormalities

d): (No. of liveborns with external abnormalities / No. of liveborns) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Viability index of pups

Dose mg/kg		No. of dams	No. of live pups		Viability index on postnatal day 4 % a)
			Day 0	Day 4	
0	Total	12	181	155	
	Mean		15.1	12.9	84.0
	S.D.		1.6	5.7	36.1
4	Total	12	161	158	
	Mean		13.4	13.2	98.3
	S.D.		2.8	2.8	4.1
20	Total	12	176	165	
	Mean		14.7	13.8	93.5
	S.D.		1.6	3.5	20.5
100	Total	10	139	95	
	Mean		13.9	9.5	68.1
	S.D.		2.0	5.3	35.5

a): (No. of live pups on day 4 / No. of liveborns on day 0) × 100
 No significant difference in any treated groups from control group

Table 12 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with p-dibromobenzene

Body weight of pups

Dose mg/kg	Male			Female		
	0	4a)	Gain	0	4a)	Gain
0	No.	12	10 ^{b)c)}	12	11 ^{c)}	11
	Mean	6.4	9.4	6.0	8.6	2.5
	S.D.	0.5	1.0	0.5	1.5	1.4
4	No.	12	12	12	12	12
	Mean	6.3	9.3	5.9	8.8	2.9
	S.D.	0.3	1.0	0.4	1.0	0.9
20	No.	12	12	12	12	12
	Mean	6.4	9.1	6.0	8.7	2.6
	S.D.	0.4	1.8	0.3	1.8	1.6
100	No.	10	9 ^{c)}	10	9 ^{c)}	9
	Mean	5.9*	7.9	5.7	7.5	1.8
	S.D.	0.5D	1.5	0.5	1.8	1.5

Unit: g

No.: No. of dams

a): Postnatal day

b): All male pups in one dam died.

c): All pups in one dam died.

*: p<0.05 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 13 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
p-dibromobenzene
Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

	Dose (mg/kg)	0	4	20	100
Male					
No. of pups examined		78	77	85	45
No. of pups with abnormal findings		1	0	0	0
Thymic remnant in neck		1	0	0	0
Female					
No. of pups examined		77	81	80	50
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0