

(トリフルオロメチル)ベンゼンのラットにおける
反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

－最終報告書－

試験実施施設 : 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

目 次

頁

要 約	-----	1
緒 言	-----	3
試験材料及び方法	-----	3
試験成績	-----	9
考 察	-----	12
文 献	-----	14
Fig. 1	Mean body weight changes of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	15
Fig. 2	Mean body weight changes of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	16
Fig. 3	Mean food consumption of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	17
Fig. 4	Mean food consumption of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	18
Table 1	Body weights of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	19
Table 2	Body weights of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	20

Table 3	Food consumption of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	21
Table 4	Food consumption of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	22
Table 5	Hematological findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	23
Table 6	Biochemical findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	24
Table 7	Necropsy findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	25
Table 8	Necropsy findings of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	26
Table 9	Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	28
Table 10	Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	29
Table 11	Histopathological findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	30
Table 12	Histopathological findings of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	32
Table 13	Reproductive performance of rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	34
Table 14	Findings of delivery of F ₀ dams treated orally with (trifluoromethyl)benzene and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test -----	35

要 約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として(トリフルオロメチル)ベンゼンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。すなわち、(トリフルオロメチル)ベンゼンの0(溶媒対照)、20、100及び500mg/kg/dayをCrj:CD(SD系)ラットの雌雄(各12匹/群)に交配前14日間、雄ではその後交配期間を含む35日間、雌では交配期間、妊娠期間及び分娩後3日まで通して経口投与し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討し、以下の結果が得られた。

1. 反復投与毒性

一般状態、体重推移及び摂餌量では、投与期間を通じて各投与群の雌雄とも被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学的検査では、各投与群とも被験物質投与の影響はみられなかったが、血液化学的検査では、500mg/kg群に総蛋白質、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の増加並びにグルコースの減少が認められた。

剖検では、500mg/kg群の雄で腎臓の肥大及び退色がみられ、器官重量では雄で100mg/kg以上の投与群に肝臓及び腎臓重量の高値、雌では500mg/kg群に肝臓重量の高値が認められた。

病理組織学的検査では、100mg/kg以上の投与群の雌雄に小葉中心性の肝細胞の肥大がみられ、雄で近位尿細管上皮の硝子滴の出現、壊死及び好塩基性変化並びに近位尿細管の拡張が認められた。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、性周期、雌雄の交尾率及び授(受)胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時及び哺育期検査では、妊娠期間、黄体数、着床数、総出産児数、出産率、死産率、出生児数、出生率及び出生児の性比に被験物質投与の影響はみられず、外表異常は1例も認められなかった。

出生児体重の増加抑制が20mg/kg以上の投与群でみられ、500mg/kg群では4日生存率の低下が認められた。

以上のことから，本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも20mg/kg，生殖発生毒性に関する無影響量は親動物では500mg/kg以上，出生児では20mg/kg未満と推察された。

緒 言

(トリフルオロメチル)ベンゼンは、化学産業の分野で染色化学あるいは高重合体化学に使用されている化学物質である。本被験物質の経口投与によるLD₅₀値は、マウスで10000 mg/kg, ラットで15000mg/kgであることが報告されているが¹⁾, 反復投与毒性あるいは生殖発生毒性についてはほとんど調査されていない。今回, OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として(トリフルオロメチル)ベンゼンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し, 親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響を検討したので報告する。

試験材料及び方法

1. 被験物質

より提供された(トリフルオロメチル)ベンゼン(Lot No. 純度99.7%)を試験に使用した(添付資料1)。本被験物質は, エタノール及びエーテルに易溶, 水に不溶の無色透明の液体であり, 本試験の投与期間終了後に分析した結果, 投与期間中安定であったことが確認された(添付資料2-1, 2-2)。媒体は, 日本薬局方コーンオイル(キシダ化学株式会社, Lot No. L51257F)を使用した。なお, 被験物質及び媒体は被験物質室の保管庫内に室温で保管した。

2. 使用動物及び飼育条件

9週齢のCrj:CD(SD系)ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を雌雄各55匹購入し, 7日間の検疫馴化を行った。この期間中に一般状態の観察及び体重測定を実施するとともに, 雌雄各3匹について剖検を行い, 異常がないことを確認したのち, 順調な発育を示した動物を10週齢で試験に使用した。なお, 投与開始時の体重は雄で319.7~391.2g, 雌で224.7~265.0gであった。

動物は温度24±2℃(許容範囲18~28℃), 湿度55±10%(許容範囲30~70%), 照明12時間(午前7時~午後7時)及び換気回数13回/時に設定したバリアーシステムC区域の飼育室(84番)で, ステンレススチール製ケージ(W260×H200×D380mm)に, 検疫馴化期間

中は2～3匹(雌雄別)、投与期間中は1匹(雌雄別)、交配期間中は2匹(雌雄各1匹)、妊娠及び哺育期間中は床敷(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社製)を入れたポリカーボネイト製ケージ(W265×H185×D425mm)に1匹ずつ(哺育期間中は哺育児を含む)収容し、飼育した。なお、温度の実測値は最高25.0℃、最低22.5℃で、湿度の実測値は最高65.0%、最低50.0%であった。飼料は、固型飼料(MF、オリエンタル酵母工業株式会社製)を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加した井水(約2 ppm)を自動給水装置または給水瓶によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料についてはオリエンタル酵母工業株式会社が、床敷は日本チャールス・リバー株式会社が財団法人 日本食品分析センターにて、飲水については(株)鶴城 南九科研センターにて分析し、いずれも許容基準に適合していることを確認した。なお、飼育器材及び飼料は高圧蒸気滅菌したものを使用し、ラックは4週間に1回、ステンレススチール製ケージは2週間に1回、ポリカーボネイト製ケージは週1～2回、受皿は週3回交換するとともに、飼育室は毎日清掃し、消毒薬を浸したモップで清拭した。

3. 試験群構成、投与量設定の根拠及び群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	性別	動物数	動物番号
対照群	0	♂	12	901～912
		♀	12	951～962
低用量群	20	♂	12	913～924
		♀	12	963～974
中間用量群	100	♂	12	925～936
		♀	12	975～986
高用量群	500	♂	12	937～948
		♀	12	987～998

投与量は、先に実施した予備試験の結果より設定した。すなわち、本被験物質の0、100、500及び1000mg/kgを2週間反復投与した結果、各投与群とも一般状態、体重推移及び摂餌量に被験物質投与による変化はなかったが、500mg/kg以上の投与群の雌雄で血

清GPT、総コレステロール及びリン脂質の増加又は増加傾向並びに肝臓重量の増加がみられ、100mg/kg群にもその傾向が窺われた。したがって、本試験の投与量には500mg/kgを最高用量に、以下公比5で除した100及び20mg/kgを設定した。

群分けは、投与開始前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法により行い、群分け後の動物には動物番号を刻印した耳標を取り付けて個体識別した。また、各ケージには試験番号、動物番号、投与量及び性別を表示したラベルを付けた。

4. 投与経路、投与方法及び投与期間

投与経路は、OECD試験法ガイドラインで指定されており、また、予想されるヒトへの曝露経路の一つである経口投与とした。雄は交配前14日間及びその後交配期間を含む35日間の合計49日間、雌は交配前14日間、交配期間(最長14日間)、妊娠期間及び哺育3日までの期間、連日1日1回、胃管を用いて投与した。投与容量は5ml/kgとし、動物ごとの投与液量は、雄並びに交配前及び交配期間中の雌については最新の体重を基に、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重を基にそれぞれ算出した。対照群には日本薬局方 コーンオイルを同様に投与した。

5. 被験物質と媒体の混合物調製法

(トリフルオロメチル)ベンゼンを日本薬局方コーンオイルに溶解し、0.4、2.0及び10.0W/V%溶液を調製した。調製は週1～2回の頻度で行い、被験液は投与時まで冷蔵保存した。本調製法による被験液の安定性試験は当研究所にて実施し、0.1、1及び10W/V%の溶液は低温遮光下で少なくとも8日間、その後室温に戻して4時間安定であることを確認した(添付資料3)。更に、調製した被験液については投与開始週に当研究所にて分析を行い、設定濃度の許容範囲内(±5%以内)であることを確認した(添付資料4)。

6. 観察及び検査方法

1) 一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定

雌雄とも、全例について一般状態の観察及び生死の確認を投与期間中は1日2回以上、そのほかの期間は1日1回以上行った。

体重については、雄は投与期間を通じて週2回測定した。雌は、交配前の投与期間

及び交配期間中は週2回、妊娠期間中は妊娠0, 4, 7, 10, 14, 17及び21日、哺育期間中は哺育0(分娩日)及び4日に測定した。

摂餌量については、雄は交配期間を除く投与期間中、週2回測定した。雌は、交配前の投与期間は週2回、妊娠期間中は妊娠1, 4, 7, 10, 14, 17及び21日、哺育期間中は哺育1及び4日に測定した。

2) 血液学的検査

雄全例について、投与期間終了後に、18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム30mg/kgを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780型、東亜医用電子株式会社)を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)及び血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数〔平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)]を算出した。また、血液の一部を塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色(白血球百分比用)及びニューメチレンブルー超生体染色(網状赤血球率検査用)を施して、保管した。

3) 血液化学的検査

血液学的検査と同時に採取した雄の血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10型、株式会社日立製作所)により、総蛋白質(T.protein, ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白質及びアルブミンより算出)、総ビリルビン(T.bilirubin, アルカリアゾビリルビン法)、GOT(GOT, Karmen法)、GPT(GPT, Wróblewski-La Due法)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP, γ -グルタミル-DBHA基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(ALP, p-ニトロフェニルリン酸基質法)、総コレステロール(T.cholesterol, COD-DAOS法)、トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(酵素法・DAOS発色法)、グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(BUN, ウレアーゼ-G 6 PDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、無機リン(モリブデン酸直接法)及びカルシ

ウム(Ca, OCPC法)を測定した。また、電解質分析装置(PVA- α III, 株式会社 アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(Na, 電極法), カリウム(K, 電極法)及びクロール(Cl, 電量滴定法)を測定した。

4) 剖検, 器官重量の測定及び病理組織学的検査

雄では投与期間終了後の採血を行ったのちに, 雌では哺育4日にエーテル麻酔下で外側腸骨動脈を切断して放血死させ, 解剖して諸器官及び組織の肉眼的観察を行い, 雌について黄体数及び着床痕数を調べた。剖検後, 脳, 心臓, 肺(気管支を含む), 胸腺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体及び卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに, 剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え, 肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。なお, 10%中性緩衝ホルマリン溶液による固定に先だって, 精巣及び精巣上体はブアン液で前固定した。対照群及び500mg/kg群の脳, 心臓, 肺(気管支を含む), 胸腺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体及び卵巣については, 常法に従ってパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し, 光学顕微鏡下で観察した。更に, 肝臓, 胸腺及び腎臓については, 被験物質投与に関連したと考えられる変化がみられたため, 100mg/kg以下の投与群のこれらの器官についても同様の検査を行った。また, 一部の動物で肝臓及び腎臓の脂肪染色を実施した。なお, 肉眼的異常部位, 交尾が確認されなかった雄の精巣, 精巣上体及び雌の卵巣については, すべて病理組織学的検査を行った。

5) 性周期検査及び生殖能力検査

雌について交配開始日の2週間前(投与開始日)から交尾確認日まで, 毎日午前の一定時間に膣垢を採取し, 性周期検査を行った。

交配は雌雄(12週齢)1対1で一晩同居させる方法で行い, 翌朝膣垢中の精子又は膣栓が確認されたものを交尾成立とし, その日を妊娠0日とした。また, 交配は同一群内で行い, 交配期間は最長2週間とした。なお, 交配相手が死亡した雌については, 同群内の交尾が確認された雄と同居させた。交配期間終了後, 交尾所要日数, 交尾率 $[(\text{交尾動物数}/\text{同居動物数}) \times 100]$ 及び授(受)胎率 $[(\text{妊娠動物数}/\text{交尾動物数}) \times 100]$ を算出した。

6) 分娩及び哺育期(哺育4日まで)検査並びに新生児検査

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩徴候を含め分娩状態及び授乳、営巣などの哺育状態を観察するとともに、妊娠期間、出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕を算出した。なお、分娩の確認は、午前中に限定し、12時を過ぎて分娩した個体は、翌日の分娩とした。出産児については、分娩時に出産児数、出生児数、死産児数、出生児の性別及び外表異常を検査した。出生児については、出生日及び哺育4日に体重を個体ごとに測定するとともに出生率〔(出生児数/着床痕数)×100〕及び4日生存率〔(生後4日の生児数/出生児数)×100〕を算出した。生後4日に出生児の全例をエーテル麻酔下で放血致死させ、器官・組織の肉眼的観察を行うとともに、異常が認められた器官・組織については摘出して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定保存した。また、出産児(死産児及び死亡児を含む)については、剖検後一腹単位で純エタノールに固定保存した。

7. 試験途中死亡例及び全児死亡例の処置

試験途中死亡例及び全児死亡例は速やかに剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った。なお、試験途中死亡例及び全児死亡例の器官重量については参考データにとどめた。

8. 統計学的処理

体重、摂餌量、血液学的検査値、血液化学的検査値、交尾所要日数、性周期検査値(発情回数、発情周期)、器官重量、妊娠期間、黄体数、着床痕数、総出産児数及び出生児数については各群ごとに平均値と標準偏差を求め、対照群と被験物質投与群間でまず分散の均一性をBartlett法により検定した。分散が均一な場合は一元配置型の分散分析を行い、ここで群間に有意差が認められた場合、各群の例数が同一の場合はDunnett法により、また、各群の例数が異なる場合はScheffé法により対照群と各群の一对比較検定を行った。分散が均一でない場合はKruskal-Wallisの方法によって順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合、各群の例数が同一の場合はDunnett型の、また、各群の例数が異なる場合はScheffé型的一对比較検定を行った。上記分散分析あるいはKruskal-Wallis法で群間に有意差を認めない場合は各群の多重比較は行わなかった。また交尾率、受(授)胎率、出産率及び出生児の性比については χ^2 検定により、死産率、

出生率及び4日生存率についてはWilcoxonの順位和検定により対照群と各投与群間の比較を行った。いずれの場合も有意水準5%以下を有意差有りとした。なお、出生児に関する測定値については一腹単位で処理した。

試 験 成 績

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

各投与群の雌雄とも投与期間を通じて被験物質投与による一般状態の変化は認められなかった。

なお、500mg/kg群の雄1例(Na. 944)が投与10日の投与直後に呼吸困難を呈し、死亡した。また、当該群の雌1例(Na. 992)では妊娠18日の投与前から眼周囲の汚れ、腹式呼吸、活動性の低下がみられ、翌日の妊娠19日には上記症状に加え鼻周囲の汚れ、腹臥位姿勢を呈し、死亡した。これら死亡例のうち、雄の剖検(Na. 944)では肺の収縮不全及び気管内の泡沫状の液体の貯留、雌の剖検(Na. 992)では食道の穿孔の他胸腔内臓器の癒着などがみられたことから、死因は投与過誤によるものと判断された。

2) 体重及び摂餌量

体重推移をFig. 1, 2, Table 1, 2 及びAppendix 1, 2, 摂餌量をFig. 3, 4, Table 3, 4 及びAppendix 3, 4 に示した。

各投与群の雌雄とも投与期間を通じて体重及び摂餌量に対照群との間の差は認められなかった。

3) 血液学的検査及び血液化学的検査

血液学的検査結果をTable 5 及びAppendix 5, 血液化学的検査結果をTable 6 及びAppendix 6 に示した。

血液学的検査では、500mg/kg群でMCHにごく軽度の減少がみられたが、他の赤血球系パラメータに変動はみられなかった。

血液化学的検査では、GOTの低下が100及び500mg/kg群で認められた。更に、500mg/kg群で総蛋白質、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質及び

カルシウムの増加並びにグルコースの減少が認められた。

4) 剖検

雌雄の剖検所見をTable 7, 8及びAppendix 7, 8に示した。

投与期間終了後の雄の剖検では、500mg/kg群で腎臓の肥大が2例、退色が3例、小陥凹が1例に認められた。そのほか、対照群の1例に肺の灰白色化がみられた。

哺育4日の雌の剖検では、脾臓と周囲脂肪組織との癒着が対照群の1例、肝臓の横隔膜面結節が20mg/kg群の1例に認められた。そのほか、100mg/kg群の1例(Na 980)に食道の穿孔、胸部リンパ節の肥大、胸部器官及び組織の癒着、及び胸腔内に油様物の貯留が認められ、投与過誤によるものと判断された。

5) 器官重量

雌雄の測定結果をTable 9, 10及びAppendix 9, 10に示した。

雄では、500mg/kg群で肝臓及び腎臓の絶対及び相対重量の増加がみられ、100mg/kg群においても肝臓の絶対重量の増加傾向及び相対重量の増加、腎臓の絶対及び相対重量の増加傾向が認められた。

雌では、500mg/kg群で肝臓の絶対及び相対重量の増加が認められた。

6) 病理組織学的検査

雌雄の検査結果をTable 11, 12及びAppendix 11, 12に示した。また、肝臓、腎臓及び胸腺の光学顕微鏡写真をPhoto. 1～8に示した。

雄では、小葉中心性の肝細胞の肥大が500mg/kg群の11例、100mg/kg群の10例に認められた。また、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の出現及び上皮の壊死が500mg/kg群の11例、100mg/kg群の12例、近位尿細管の拡張が500mg/kg群の9例、100mg/kg群の1例、近位尿細管上皮の好塩基性変化が500mg/kg群の6例、100mg/kg群の2例、腎臓の癒着が500mg/kg群の1例に認められた。そのほか、偶発的变化として対照群では雄の1例に肺のマクロファージによる肺胞中隔あるいはリンパ球による血管周囲への細胞浸潤及び動脈中膜の肥厚がみられた。

雌では、小葉中心性の肝細胞の肥大が500mg/kg群の10例、100mg/kg群の3例、胸腺皮質の萎縮が500mg/kg群の2例に認められた。そのほか、偶発的变化として対照群及

び500mg/kg群の各1例に脾臓の髄外造血の亢進，対照群の1例に脾臓と周囲脂肪組織との癒着が認められた。また，対照群の1例に肺のマクロファージによる肺胞中隔あるいはリンパ球による血管周囲への細胞浸潤及び動脈中膜の肥厚がみられた。

500mg/kg群の雌の死亡例では，生存例と同様の小葉中心性の肝細胞の肥大がみられたほか，腎臓の間質の毛細血管，小静脈及び動脈並びに糸球体毛細血管の血栓がみられ，更に胸腺皮質のリンパ球の壊死及び前胃の潰瘍が認められた。

100mg/kg群の全児死亡例では，肝小葉辺縁部から中間帯にかけての脂肪化，近位尿細管上皮の脂肪化及び壊死が認められた。

なお，500mg/kg群の投与過誤による雌雄各1例の死亡例では，雄で生存例と同様の小葉中心性の肝細胞の肥大及び近位尿細管上皮の硝子滴の出現がみられ，雌では胸腔内に膿瘍がみられ，腺胃の潰瘍，胸腺の萎縮，赤脾髄の形質細胞の過形成，近位尿細管上皮の脂肪化が認められた。そのほか，哺育4日の剖検時に投与過誤と判断された100mg/kg群の1例では肺のマクロファージによる肺胞中隔あるいはリンパ球による血管周囲への細胞浸潤，動脈中膜の肥厚及び膿瘍，胸部リンパ節の髄質における形質細胞の過形成が認められた。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期検査及び生殖能力検査

性周期検査及び生殖能力検査の成績をTable 13及びAppendix 13に示した。

性周期検査では各投与群とも発情回数及び発情周期に対照群との間の差は認められなかった。

生殖能力検査では100mg/kg群の1組を除いてすべてに交尾がみられ，交尾確認例の全例に妊娠が認められた。したがって，交尾率は，対照群，20，100及び500mg/kg群でそれぞれ100，100，91.67及び100%，受胎率はいずれも100%の成績を示し，交尾所要日数においても対照群と各投与群間の差は認められなかった。なお，100mg/kg群の未交尾例では，雌雄とも生殖器の剖検及び病理組織学的検査に変化はみられず，授(受)胎能の欠如を示唆する所見は認められなかった。

2) 分娩及び哺育期(哺育4日まで)検査並びに新生児検査

分娩及び哺育期検査並びに新生児検査の成績をTable 14及びAppendix 14に示した。

分娩時の検査では、500mg/kg群で1母動物(No. 995)が妊娠23日の分娩後に死亡した。本例では、出産児(死産児4匹、生存児12匹)の発育には特に変化はみられなかったが、血液による下腹部の汚れが顕著にみられ、出産児の羊膜除去、胎盤処理並びに児の回収などは不十分であった。剖検では、胸水貯留、肺の暗赤色化、気管に泡沫状水様液貯留及び前胃粘膜の白色点点在が認められた。

20mg/kg群の黄体数及び100mg/kg群の着床痕数にそれぞれ増加が認められたが、500mg/kg群の黄体数及び着床痕数に変化は認められなかった。

各投与群とも妊娠期間、総出産児数、出産率、死産率、出生児数、出生率及び出生児の性比に対照群との間に差は認められなかった。また、外表異常児は、各投与群とも1例も認められなかった。

出生児の体重では、各投与群とも出生日及び生後4日ともに減少が認められた。

哺育期の検査では、出生児の回収、授乳などの哺育行動の低下が100mg/kg群の1母動物にみられ、分娩後2日までに出生児の全例が死亡した。

4日生存率では、500mg/kg群に減少が認められた。なお、100mg/kg群にも減少傾向が認められたが、この変化は当該群の1母動物に全児死亡がみられたことによるものであった。

出生児の剖検では、肝臓内側左葉の黄白色化が100mg/kg群の1例に認められたのみであった。

考 察

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として(トリフルオロメチル)ベンゼンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

肝臓及び腎臓で被験物質投与に起因した変化が認められた。肝臓では、重量の増加が雄の100mg/kg以上の投与群及び雌の500mg/kg群に認められ、雌雄の100mg/kg以上の投与群で小葉中心性の肝細胞の肥大がみられた。また、腎臓では、重量の増加と近位尿細管上皮における硝子滴の出現、壊死、好塩基性変化及び近位尿細管の拡張が雄の100mg/kg以上の投与群に認められた。本被験物質とはハロゲン基が異なるトリクロロトルエンでも肝臓及び腎臓に対する影響が報告されており²⁾、これらの類似化合物では肝臓及び腎臓が標的器官になる可能性が示唆された。雄の血液化学的検査では、500mg/kg群で総蛋白質、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の増加並びにグルコースの減少が認められたが、これらも本被験物質の肝臓に対する影響に関連した変化のように考えられた。また、当該群ではカルシウムの増加も認められたが、これはアルブミンの増加に伴った変化と思われた。しかし、被験物質投与に起因した症状の発現や、体重及び摂餌量に対する影響はいずれの投与群にも認められず、全身状態の悪化を来するような毒性には至らなかったと考えられた。なお、腎臓では雄の500mg/kg群の1例に肉眼的に小陥凹がみられ、組織学的には癒痕が認められたが、本変化は正常ラットでも時折みられる変化であり、発生例数も少ないことから被験物質投与に起因したものとは考え難かった。また、胸腺では雌の500mg/kg群の2例に組織学的に萎縮がみられたが、変化の程度は軽微で発生例数も少ないこと及び雄では胸腺をはじめリンパ系への作用を示唆する変化は認められなかったことから、被験物質の直接的な影響よりは分娩に伴ったストレス性の変化である可能性が高いと思われた。

以上のことから、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも20 mg/kgと推定された。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、性周期、雌雄の交尾率及び授(受)胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時の観察では、500mg/kg群の1母動物が妊娠23日の分娩の終了後に死亡した。本例では妊娠期間中の一般状態並びに出産児の発育には特に変化はみられなかったが、分娩時に顕著な出血がみられ、出産児の羊膜除去、胎盤処理並びに児の回集などの母性行動が正常に行われた形跡は認められなかったことから、その死因については分娩に伴う

消耗性の変化と考えられた。しかしながら、この様な分娩異常は当該群のほかの母動物には観察されず、出現例数も少ないことから直接的な被験物質投与との関連性はないように思われた。ちなみに、当該群では妊娠期間、総出産児数、出産率、死産率、出生児数、出生率及び出生児の性比に被験物質投与の影響は認められなかった。一方、20mg/kg以上の群で出生日に体重減少が認められ、本被験物質の胎生期の発育に対する影響が示唆されたが、胚致死作用を窺わせる出生児数の減少はみられておらず、外表異常も観察されなかった。

哺育期の観察においても、出生児の継続した体重の増加抑制がみられ、500mg/kg群に4日生存率の低下がごく軽度認められた。これらの変化は、胎生期の発育抑制を反映しているものと考えられ、その内、特に低い体重を示した児が生存できなかったことによるものと考えられた。そのほか、哺育不良による全児死亡が100mg/kg群の1母動物に認められたが、500mg/kg群に全児死亡は観察されなかったことから特に問題視する変化とは考え難かった。

以上のことから、本試験条件下における生殖発生毒性に関する無影響量は親動物では500mg/kg以上、出生児では20mg/kg未満と推察された。

文 献

- 1) Doris v. Sweet, "Registry of Toxic Effects of Chemical Substances",
U. S. Government printing office, Washington, D C, 1987, 1985-1986,
Edition, Vol. 5.
- 2) Chu, I., Shen, S.Y., Villeneuve, D.C., Secours, V.E. and Valli, V.E.(1984):
Toxicity of trichlorotoluene isomers a 28-day feeding study in the rat.
J. Environ. Sci.Health, Part B, B19(2), PP 183-191

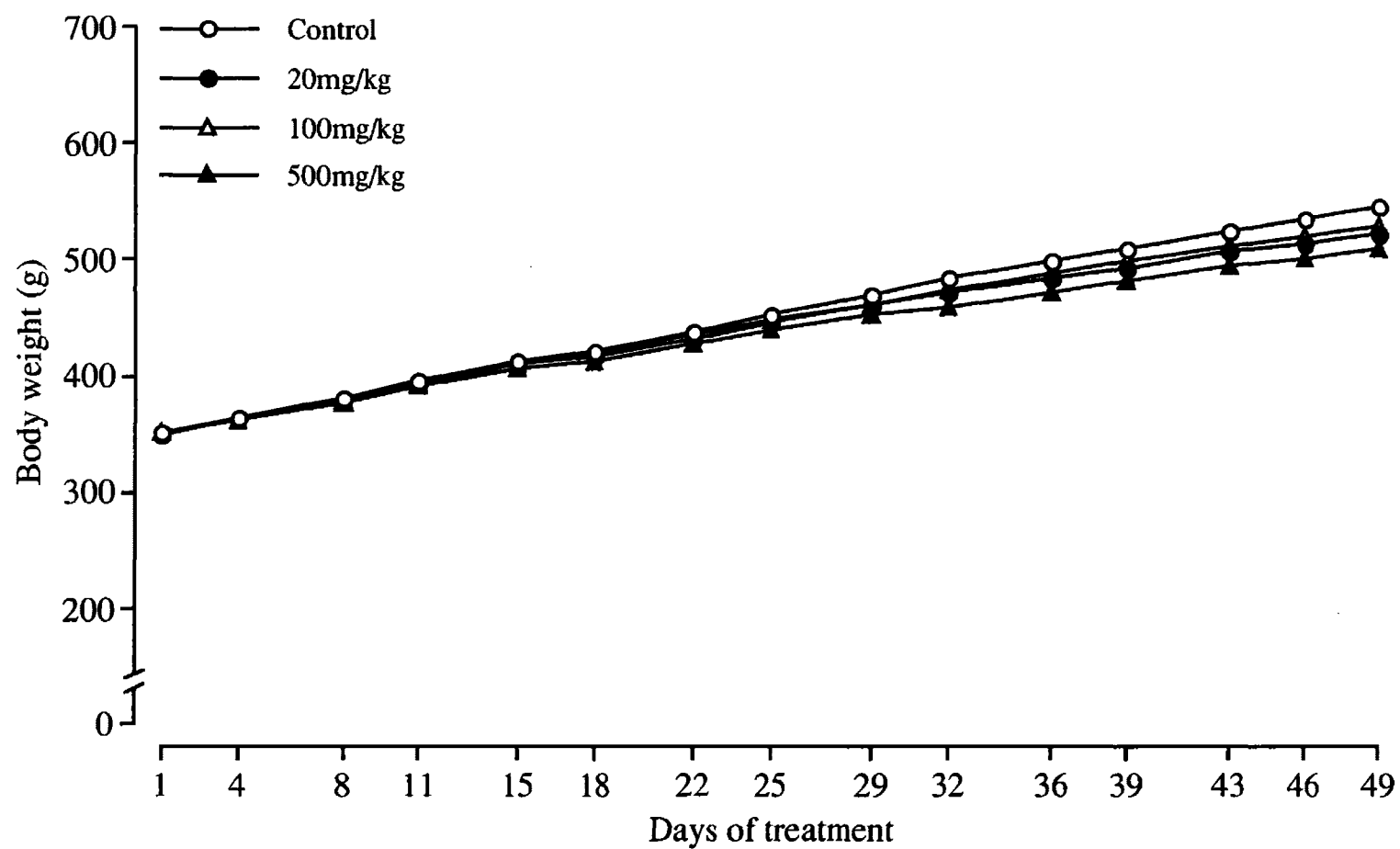


Fig. 1 Mean body weight changes of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

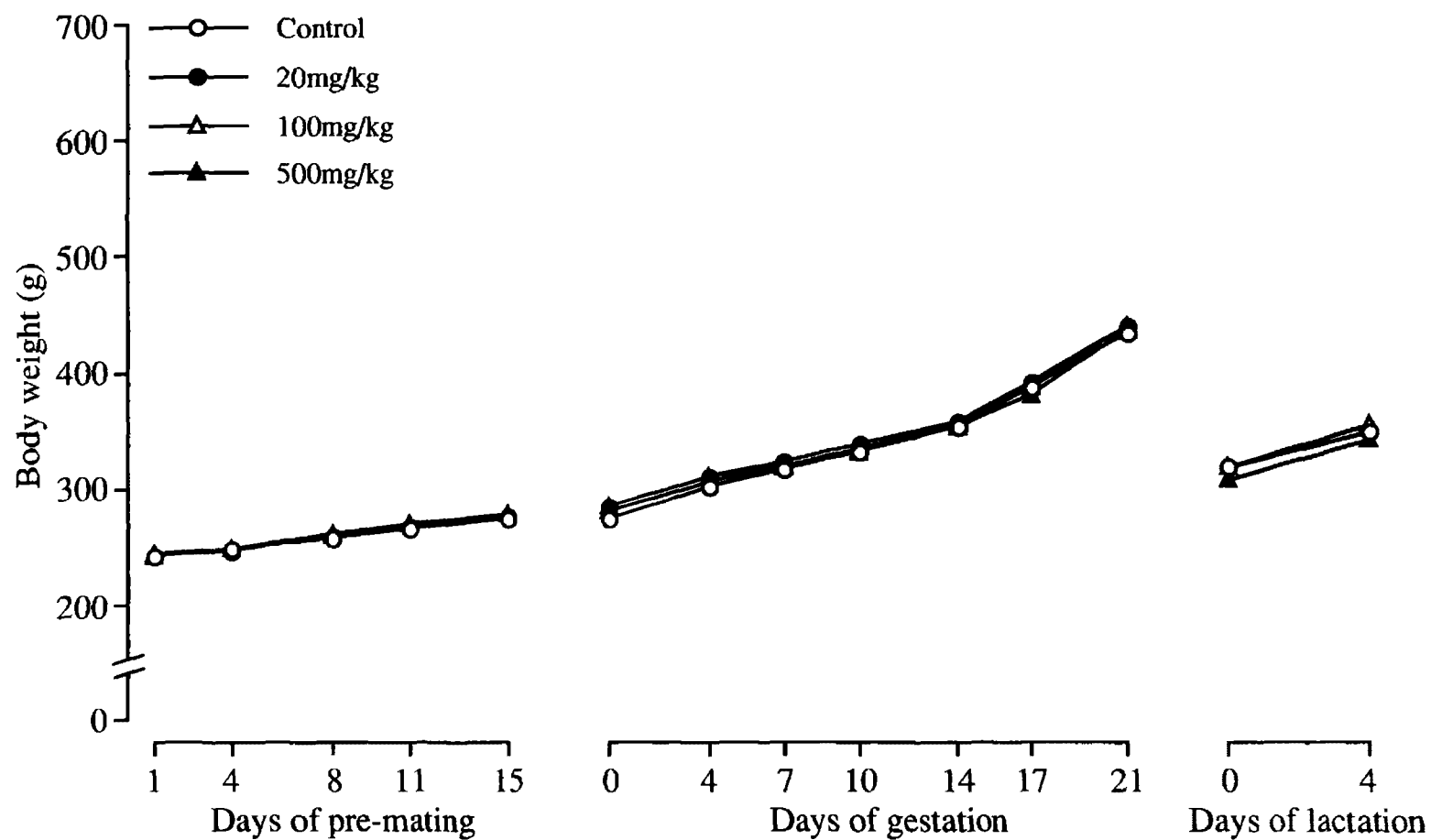


Fig. 2 Mean body weight changes of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

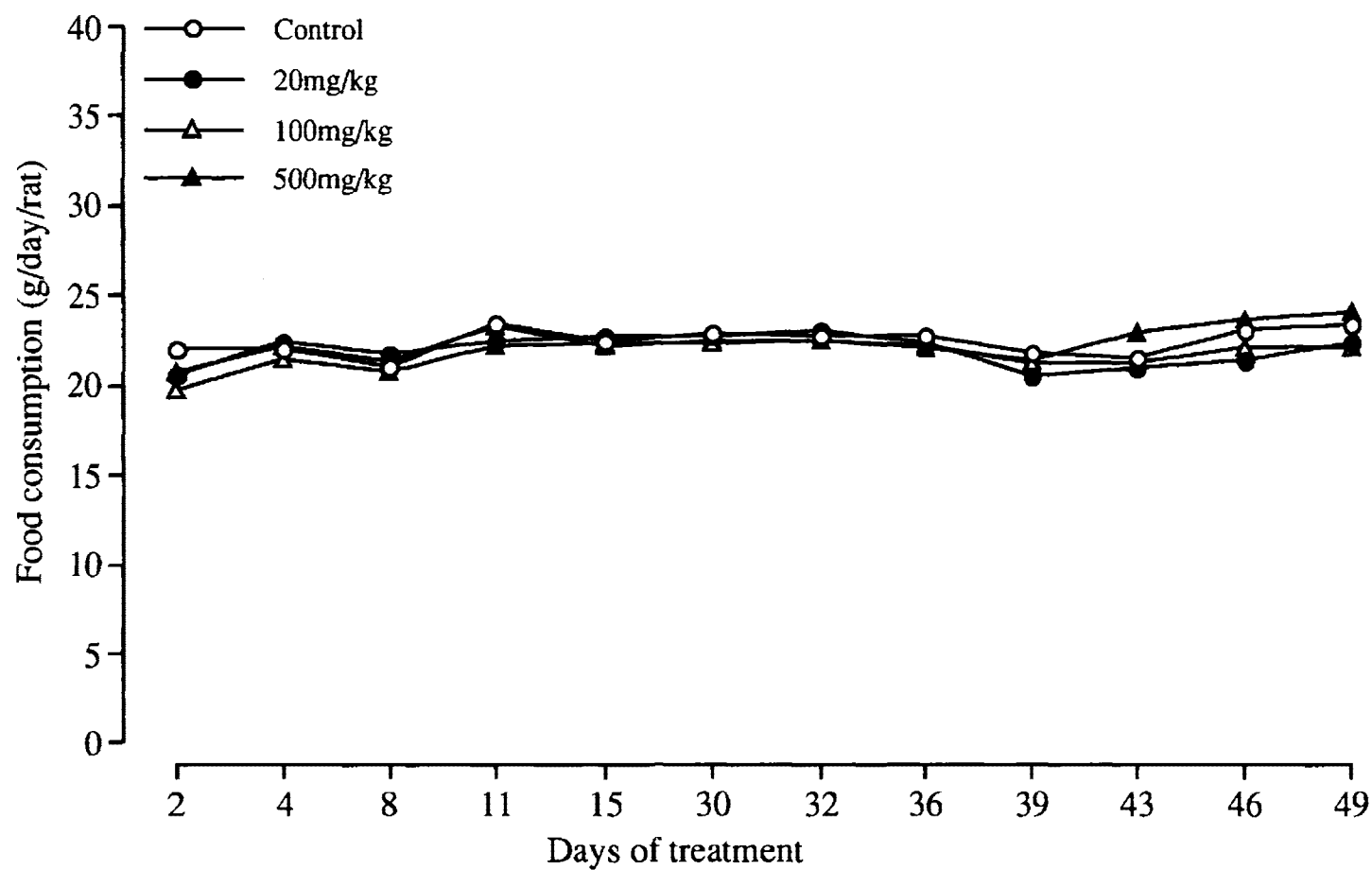


Fig. 3 Mean food consumption of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

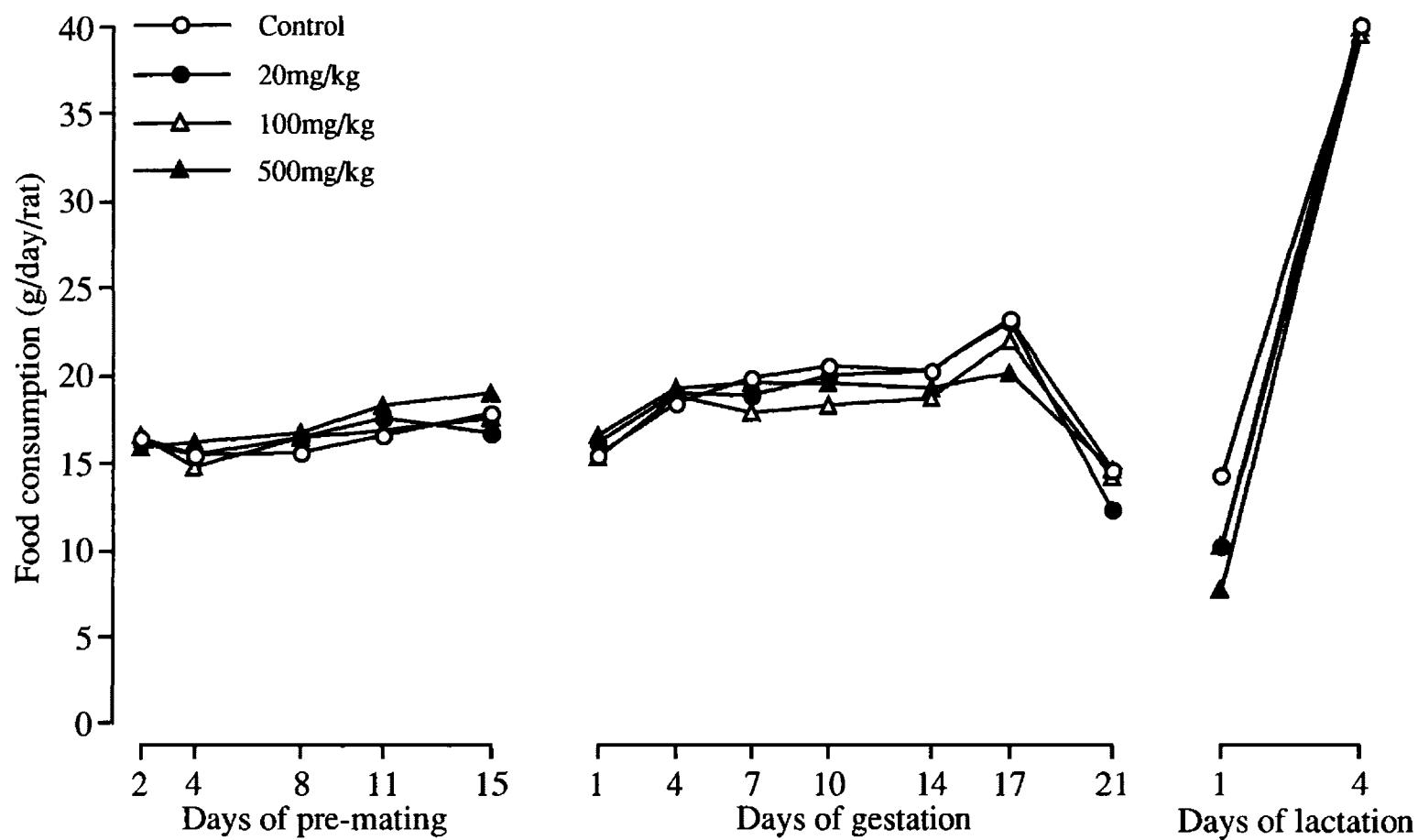


Fig. 4 Mean food consumption of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

Table 1 Body weights of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
Body weight(g)				
Days of treatment				
1	350.3±19.7(12)	349.6±16.1(12)	350.0±16.6(12)	350.7±18.5(12)
4	364.0±22.0(12)	363.0±20.2(12)	361.2±18.3(12)	360.6±19.0(12)
8	379.8±27.1(12)	380.0±24.0(12)	377.6±19.0(12)	376.8±25.1(12)
11	394.5±28.7(12)	393.3±28.1(12)	394.0±19.4(12)	392.0±29.7(11)
15	412.2±31.1(12)	410.0±29.6(12)	410.0±19.1(12)	406.4±33.7(11)
18	419.7±30.2(12)	416.0±29.4(12)	418.7±23.3(12)	412.1±36.5(11)
22	437.9±30.1(12)	431.3±30.4(12)	435.5±23.2(12)	428.0±36.8(11)
25	452.5±32.9(12)	445.0±32.7(12)	447.2±24.3(12)	439.3±38.9(11)
29	470.1±31.9(12)	460.4±34.5(12)	460.7±28.7(12)	451.8±39.2(11)
32	483.4±33.4(12)	472.0±37.4(12)	474.3±29.2(12)	459.7±39.1(11)
36	498.2±33.1(12)	484.4±38.3(12)	487.3±31.7(12)	471.5±41.1(11)
39	509.2±34.1(12)	492.0±39.3(12)	498.4±32.7(12)	482.0±42.5(11)
43	524.4±37.0(12)	506.4±41.7(12)	511.4±35.2(12)	494.1±42.9(11)
46	535.3±37.0(12)	513.3±41.7(12)	520.1±37.7(12)	500.8±44.9(11)
49	546.0±38.3(12)	523.2±42.9(12)	528.2±39.7(12)	510.2±44.4(11)

Values are mean ± S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 500mg/kg group died from administration error on day 10 of treatment.

Table 2 Body weights of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
Body weight(g)				
Days of pre-mating				
1	242.4±9.9 (12)	242.7±7.8 (12)	244.4±11.0(12)	243.1±7.9 (12)
4	248.7±8.2 (12)	247.8±9.3 (12)	249.1±7.5 (12)	249.4±8.6 (12)
8	257.2±11.3(12)	260.1±12.7(12)	261.4±8.5 (12)	260.6±7.9 (12)
11	265.9±9.8 (12)	269.0±12.8(12)	269.7±8.0 (12)	270.3±10.3(12)
15	275.6±12.0(12)	276.8±15.5(12)	278.5±8.3 (12)	278.7±9.4 (12)
Days of gestation				
0	275.5±11.1(12)	285.3±16.9(12)	284.7±12.9(11)	281.4±10.3(12)
4	301.8±12.1(12)	310.1±15.4(12)	310.0±12.6(11)	306.6±12.7(12)
7	316.3±12.7(12)	323.0±15.8(12)	319.3±22.6(11)	318.6±12.0(12)
10	331.7±12.7(12)	337.5±17.1(12)	332.9±24.9(11)	332.3±13.7(12)
14	353.4±13.8(12)	358.1±20.3(12)	355.2±25.6(11)	351.9±15.1(12)
17	386.3±17.2(12)	391.7±21.3(12)	387.0±22.3(11)	380.6±23.2(12)
21	432.9±15.3(12)	438.6±19.7(12)	439.0±24.9(11)	434.9±22.0(11)
Days of lactation				
0	319.8±17.6(12)	319.8±21.3(12)	318.4±28.3(11)	308.0±16.3(10)
4	347.9±14.2(12)	348.9±19.6(12)	354.0±21.6(10)	342.2±18.8(10)

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 100mg/kg group was not mated.

All newborns from one dam of 100mg/kg group died until day 2 postpartum, and so the dam was sacrificed immediately.

One dam of 500mg/kg group died on day 23 of gestation, and one dam of 500mg/kg group died from administration error on day 19 of gestation.

Table 3 Food consumption of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
Food consumption(g/day/rat)				
Days of treatment				
2	21.9±3.2(12)	20.5±2.6(12)	19.7±2.1(12)	20.6±2.6(12)
4	21.9±2.7(12)	22.4±2.6(12)	21.4±2.0(12)	22.1±2.1(12)
8	21.0±4.4(12)	21.7±3.3(12)	20.6±1.8(12)	21.3±2.0(12)
11	23.3±2.3(12)	22.4±2.8(12)	22.1±2.3(12)	23.2±3.2(11)
15	22.3±2.0(12)	22.6±3.2(12)	22.2±1.6(12)	22.1±2.6(11)
30	22.8±2.2(12)	22.6±2.6(12)	22.2±2.0(12)	22.4±2.1(11)
32	22.6±2.4(12)	22.9±2.4(12)	22.4±2.0(12)	22.3±2.0(11)
36	22.6±1.3(12)	22.2±2.2(12)	22.1±2.3(12)	21.9±2.1(11)
39	21.6±2.1(12)	20.4±2.6(12)	21.1±2.1(12)	21.3±2.2(11)
43	21.4±3.7(12)	20.8±2.9(12)	21.1±2.6(12)	22.8±2.3(11)
46	22.9±2.6(12)	21.3±2.6(12)	22.0±2.9(12)	23.5±2.6(11)
49	23.2±1.4(12)	22.2±2.4(12)	21.9±2.8(12)	23.9±2.6(11)

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 500mg/kg group died from administration error on day 10 of treatment.

Table 4 Food consumption of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
Food consumption(g/day/rat)				
Days of pre-mating				
2	16.4±2.5(12)	16.1±2.1(12)	16.6±2.5(12)	15.9±3.2(12)
4	15.5±2.5(12)	15.4±2.8(12)	14.8±3.0(12)	16.2±2.6(12)
8	15.6±4.9(12)	16.5±4.0(12)	16.5±2.8(12)	16.7±2.9(12)
11	16.6±3.1(12)	17.6±1.6(12)	16.9±3.4(12)	18.2±2.3(12)
15	17.8±3.8(12)	16.7±3.9(12)	17.6±2.6(12)	19.0±1.9(12)
Days of gestation				
1	15.5±2.1(12)	16.1±1.5(12)	15.3±2.7(11)	16.6±2.2(12)
4	18.4±1.9(12)	19.0±2.9(12)	18.9±2.7(11)	19.2±2.1(12)
7	19.8±2.3(12)	18.9±2.5(12)	17.9±5.2(11)	19.5±2.1(12)
10	20.5±1.7(12)	19.9±2.3(12)	18.2±4.9(11)	19.5±1.7(12)
14	20.2±1.8(12)	20.2±2.6(12)	18.7±3.8(11)	19.3±1.6(12)
17	23.2±2.7(12)	23.0±3.1(12)	22.0±2.5(11)	20.1±5.6(12)
21	14.6±2.8(12)	12.3±2.9(12)	14.2±5.9(11)	14.6±3.1(11)
Days of lactation				
1	14.3±5.8(12)	10.1±4.7(12)	10.2±6.6(11)	7.6±4.2(10)
4	40.0±4.9(12)	40.5±6.4(12)	39.4±4.4(10)	39.8±8.1(10)

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 100mg/kg group was not mated.

All newborns from one dam of 100mg/kg group died until day 2 postpartum, and so the dam was sacrificed immediately.

One dam of 500mg/kg group died on day 23 of gestation, and one dam of 500mg/kg group died from administration error on day 19 of gestation.

Table 5 Hematological findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
Leucocyte ($10^3/\mu\text{l}$)	79 ± 16	72 ± 18	86 ± 16	77 ± 19
Erythrocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	853 ± 36	872 ± 35	868 ± 27	877 ± 30
Hemoglobin (g/dl)	14.8 ± 0.6	14.9 ± 0.6	14.6 ± 0.2	14.6 ± 0.5
Hematocrit (%)	47.3 ± 1.9	48.4 ± 1.8	47.4 ± 1.3	47.2 ± 2.0
Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	100.3 ± 12.3	92.0 ± 10.9	95.9 ± 8.2	102.5 ± 7.8
MCV (fl)	56 ± 1	56 ± 2	55 ± 2	54 ± 2
MCH (pg)	17.3 ± 0.6	17.1 ± 0.4	16.8 ± 0.5	$16.6 \pm 0.5^*$
MCHC (%)	31.2 ± 0.5	30.9 ± 0.5	30.8 ± 0.6	30.9 ± 0.7

* : $P < 0.05$ (significantly different from control).

Values are mean $\pm$ S.D.

Table 6 Biochemical findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
T.protein (g/dl)	5.3±0.2	5.3±0.3	5.5±0.1	5.8±0.2**
Albumin (g/dl)	3.7±0.2	3.6±0.1	3.8±0.1	4.1±0.2**
A/G ratio	2.23±0.20	2.25±0.29	2.25±0.25	2.37±0.19
GOT (IU/l)	98±12	86±12	82±14*	77±15**
GPT (IU/l)	24±4	21±2	23±3	22±4
γ-GTP (IU/l)	0.4±0.2	0.4±0.2	0.4±0.2	0.5±0.2
ALP (IU/l)	198±23	203±29	197±27	184±24
T.cholesterol (mg/dl)	50±9	46±9	56±12	85±10**
Triglycerides (mg/dl)	31±10	28±8	35±12	66±15**
Phospholipids (mg/dl)	80±12	77±12	93±17	140±14**
T.bilirubin (mg/dl)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Glucose (mg/dl)	138±14	132±12	123±15	103±13**
BUN (mg/dl)	14.0±2.1	14.5±2.2	14.9±1.3	16.1±1.9
Creatinine (mg/dl)	0.5±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1
IP (mg/dl)	6.4±0.6	6.4±0.8	6.4±0.6	6.1±0.6
Ca (mg/dl)	9.5±0.2	9.5±0.2	9.6±0.2	9.9±0.2**
Na (mEq/l)	147.1±1.0	147.5±0.8	146.6±0.8	147.1±0.7
K (mEq/l)	4.38±0.26	4.32±0.20	4.36±0.10	4.34±0.17
Cl (mEq/l)	105.4±1.4	106.2±1.1	104.6±0.8	104.2±1.1

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

Values are mean ± S.D.

Table 7 Necropsy findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg		Total
	Number of animals	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Imminent sacrifice/Dead</u>	
		12	12	12	11	1	
Respiratory system							
Trachea							
Foamy fluid		0	0	0	0	1	1
Lung							
Coloration, grayish white		1	0	0	0	0	0
Uncollapse		0	0	0	0	1	1
Urinary system							
Kidney							
Hypertrophy		0	0	0	2	0	2
Discoloration		0	0	0	3	0	3
Pits		0	0	0	1	0	1

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 8 Necropsy findings of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control	20mg/kg	100mg/kg	
		<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 11	<u>Imminent sacrifice/Dead</u> 1 <u>Total</u> 12
Digestive system					
Liver					
Diaphragmatic nodule		0	1	0	0
Esophagus					
Perforation		0	0	1	1
Stomach					
Spot, white, forestomach		0	0	0	0
Pit, glandular stomach		0	0	0	0
Spot, blackish red, glandular stomach		0	0	0	0
Respiratory system					
Trachea					
Foamy fluid		0	0	0	0
Lung					
Coloration, dark red		0	0	0	0
Hematopoietic system					
Thymus					
Atrophy		0	0	0	1
Spleen					
Adhesion, adipose tissue		1	0	0	0
Thoracic lymph node					
Hypertrophy		0	0	1	1
Others					
Thoracic cavity					
Adhesion, organs and tissues		0	0	1	1
Oil retention		0	0	1	1
Hydrothorax		0	0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 8 - continued Necropsy findings of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	500mg/kg		
		<u>Terminal sacrifice</u> 10	<u>Imminent sacrifice/Dead</u> 2	<u>Total</u> 12
Digestive system				
Liver				
Diaphragmatic nodule		0	0	0
Esophagus				
Perforation		0	1	1
Stomach				
Spot, white, forestomach		0	1	1
Pit, glandular stomach		0	1	1
Spot, blackish red, glandular stomach		0	1	1
Respiratory system				
Trachea				
Foamy fluid		0	1	1
Lung				
Coloration, dark red		0	1	1
Hematopoietic system				
Thymus				
Atrophy		0	1	1
Spleen				
Adhesion, adipose tissue		0	0	0
Thoracic lymph node				
Hypertrophy		0	0	0
Others				
Thoracic cavity				
Adhesion, organs and tissues		0	1	1
Oil retention		0	0	0
Hydrothorax		0	1	1

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 9 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	516.2±35.7	497.1±40.6	501.1±37.6	477.8±41.6
Brain (g)	2.15±0.09	2.15±0.05	2.14±0.09	2.13±0.06
Heart (g)	1.59±0.10	1.60±0.08	1.52±0.13	1.60±0.20
Lungs (g)	1.60±0.27	1.46±0.13	1.51±0.11	1.42±0.12
Thymus (g)	0.39±0.06	0.40±0.11	0.36±0.07	0.34±0.08
Liver (g)	14.46±1.75	13.35±1.73	15.44±1.20	18.86±1.61**
Spleen (g)	0.78±0.11	0.76±0.13	0.75±0.12	0.78±0.12
Kidneys (g)	3.20±0.28	3.27±0.25	3.51±0.23	4.33±0.65**
Adrenals (mg)	64.5±6.1	65.0±7.4	61.3±6.5	61.8±6.9
Testes (g)	3.45±0.24	3.34±0.20	3.43±0.21	3.47±0.30
Epididymides (g)	1.32±0.09	1.32±0.09	1.31±0.10	1.33±0.10
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.42±0.03	0.44±0.03	0.43±0.02	0.45±0.04
Heart (g/100g B.W.)	0.31±0.03	0.32±0.03	0.30±0.03	0.33±0.03
Lungs (g/100g B.W.)	0.31±0.07	0.29±0.02	0.30±0.02	0.30±0.03
Thymus (g/100g B.W.)	0.07±0.01	0.08±0.02	0.07±0.02	0.07±0.02
Liver (g/100g B.W.)	2.80±0.21	2.68±0.19	3.09±0.25*	3.96±0.24**
Spleen (g/100g B.W.)	0.15±0.02	0.15±0.02	0.15±0.02	0.16±0.03
Kidneys (g/100g B.W.)	0.62±0.04	0.66±0.04	0.70±0.06	0.91±0.14**
Adrenals (mg/100g B.W.)	12.5±1.0	13.1±1.3	12.3±1.8	13.0±1.5
Testes (g/100g B.W.)	0.67±0.06	0.68±0.07	0.69±0.06	0.73±0.06
Epididymides (g/100g B.W.)	0.26±0.03	0.27±0.03	0.26±0.02	0.28±0.02

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

Values are mean ±S.D.

Table 10 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
No. of animals	12	12	10	10
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	347.9±14.2	348.9±19.6	354.0±21.6	342.2±18.8
Brain (g)	2.03±0.08	2.07±0.09	2.07±0.06	2.05±0.05
Heart (g)	1.12±0.12	1.11±0.08	1.07±0.10	1.08±0.13
Lungs (g)	1.25±0.20	1.26±0.14	1.46±0.79	1.19±0.10
Thymus (g)	0.20±0.03	0.20±0.08	0.22±0.07	0.17±0.05
Liver (g)	14.62±1.16	14.65±1.36	15.21±1.28	16.32±1.59*
Spleen (g)	0.68±0.12	0.65±0.06	0.64±0.09	0.62±0.12
Kidneys (g)	2.07±0.16	2.08±0.14	2.10±0.11	2.16±0.07
Adrenals (mg)	76.1±9.2	78.4±8.3	78.6±7.0	74.7±9.6
Ovaries (mg)	101.0±12.2	109.1±14.4	110.9±12.0	108.9±7.3
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.58±0.03	0.60±0.05	0.59±0.04	0.60±0.02
Heart (g/100g B.W.)	0.32±0.03	0.32±0.02	0.30±0.04	0.32±0.03
Lungs (g/100g B.W.)	0.36±0.06	0.36±0.04	0.42±0.27	0.35±0.02
Thymus (g/100g B.W.)	0.06±0.01	0.06±0.02	0.06±0.02	0.05±0.01
Liver (g/100g B.W.)	4.20±0.23	4.20±0.29	4.30±0.23	4.77±0.44**
Spleen (g/100g B.W.)	0.19±0.03	0.19±0.01	0.18±0.03	0.18±0.03
Kidneys (g/100g B.W.)	0.60±0.03	0.60±0.04	0.59±0.03	0.63±0.04
Adrenals (mg/100g B.W.)	21.9±2.6	22.4±2.0	22.2±1.6	21.8±2.3
Ovaries (mg/100g B.W.)	29.0±3.0	31.4±4.4	31.4±3.5	31.8±2.1

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

Values are mean ± S.D.

Table 11 Histopathological findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control				20mg/kg				100mg/kg			
		Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice			
		12				12				12			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Liver		(12)				(12)				(12)			
Hypertrophy, centrilobular		12	0	0	0	12	0	0	0	2	9	1	0
Respiratory system													
Lung		(12)				(0)				(0)			
Cellular infiltration		11	1	0	0								
Thickening, tunica media, artery		11	1	0	0								
Urinary system													
Kidney		(12)				(12)				(12)			
Hyaline droplets, proximal tubules		12	0	0	0	12	0	0	0	0	3	9	0
Necrosis, proximal tubules		12	0	0	0	12	0	0	0	0	7	5	0
Dilatation, proximal tubules		12	0	0	0	12	0	0	0	11	1	0	0
Change, basophilic, proximal tubules		12	0	0	0	12	0	0	0	10	2	0	0
Scar		12	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the thymus, spleen, heart, testis, epididymis, adrenal and brain of all animals and the thoracic lymph node of one animal in control group, and in the thymus of all animals and the testis and epididymis of one animal in 100mg/kg group.

Table 11 - continued Histopathological findings of male rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	500mg/kg											
		<u>Terminal sacrifice</u>				<u>Imminent sacrifice/Dead</u>				<u>Total</u>			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Liver	(11)					(1)				(12)			
Hypertrophy, centrilobular		0	0	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0
Respiratory system													
Lung	(11)					(1)				(12)			
Cellular infiltration		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Thickening, tunica media, artery		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Urinary system													
Kidney	(11)					(1)				(12)			
Hyaline droplets, proximal tubules		0	0	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0
Necrosis, proximal tubules		0	0	8	3	1	0	0	0	1	0	8	3
Dilatation, proximal tubules		2	6	1	2	1	0	0	0	3	6	1	2
Change, basophilic, proximal tubules		5	6	0	0	1	0	0	0	6	6	0	0
Scar		10	1	0	0	1	0	0	0	11	1	0	0

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the thymus, spleen, heart, testis, epididymis, adrenal and brain in 500mg/kg group.

Table 12 Histopathological findings of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control				20mg/kg				100mg/kg				Total			
		Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system																	
Liver				(12)				(12)				(11)			(1)		(12)
Hypertrophy, centrilobular		12	0	0	0	12	0	0	0	8	3	0	0	1	0	0	0
Change, fatty, periportal and mid-zonal		12	0	0	0	12	0	0	0	11	0	0	0	0	0	1	0
Stomach				(0)				(0)				(0)			(0)		(0)
Ulcer, forestomach																	
Ulcer, glandular stomach																	
Respiratory system																	
Lung				(12)				(0)				(1)			(1)		(2)
Cellular infiltration		11	1	0	0					0	1	0	0	1	0	0	0
Thickening, tunica media, artery		11	1	0	0					0	1	0	0	1	0	0	0
Hematopoietic system																	
Thymus				(12)				(0)				(11)			(0)		(11)
Atrophy		12	0	0	0					11	0	0	0			11	0
Necrosis, lymphocyte		12	0	0	0					11	0	0	0			11	0
Spleen				(12)				(0)				(0)			(1)		(1)
Hematopoiesis, extramedullary, increased		11	1	0	0									1	0	0	0
Adhesion, adipose tissue		11	1	0	0									1	0	0	0
Proliferation, plasma cell, red pulp		12	0	0	0									1	0	0	0
Thoracic lymph node				(0)				(0)				(1)			(0)		(1)
Proliferation, plasma cell, medulla										0	1	0	0			0	1
Urinary system																	
Kidney				(12)				(12)				(11)			(1)		(12)
Change, fatty, proximal tubules		12	0	0	0	12	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	1
Thrombus		12	0	0	0	12	0	0	0	11	0	0	0	1	0	0	0
Necrosis, proximal tubules		12	0	0	0	12	0	0	0	11	0	0	0	0	0	1	0
Others																	
Thoracic cavity				(0)				(0)				(1)			(0)		(1)
Abscess										0	1	0	0			0	1

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the heart, ovary, adrenal and brain in control group and in the ovary of one animal in 100mg/kg group.

Table 12 - continued Histopathological findings of female rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	500mg/kg											
		Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total			
		10				2				12			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Liver				(10)				(2)				(12)	
Hypertrophy, centrilobular		0	0	10	0	1	1	0	0	1	1	10	0
Change, fatty, periportal and mid-zonal		10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0
Stomach				(0)				(2)				(2)	
Ulcer, forestomach						1	1	0	0	1	1	0	0
Ulcer, glandular stomach						1	1	0	0	1	1	0	0
Respiratory system													
Lung				(10)				(2)				(12)	
Cellular infiltration		10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0
Thickening, tunica media, artery		10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0
Hematopoietic system													
Thymus				(10)				(2)				(12)	
Atrophy		8	2	0	0	1	0	1	0	9	2	1	0
Necrosis, lymphocyte		10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0
Spleen				(10)				(2)				(12)	
Hematopoiesis, extramedullary, increased		9	1	0	0	2	0	0	0	11	1	0	0
Adhesion, adipose tissue		10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0
Proliferation, plasma cell, red pulp		10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0
Thoracic lymph node				(0)				(0)				(0)	
Proliferation, plasma cell, medulla													
Urinary system													
Kidney				(10)				(2)				(12)	
Change, fatty, proximal tubules		10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0
Thrombus		10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0
Necrosis, proximal tubules		10	0	0	0	2	0	0	0	10	0	0	0
Others													
Thoracic cavity				(0)				(1)				(1)	
Abscess						0	1	0	0	0	1	0	0

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the heart, ovary, adrenal and brain in 500mg/kg group.

Table 13 Reproductive performance of rats treated orally with (trifluoromethyl)benzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
No. of females examined	12	12	12	12
Count of estrus ^{a)}	3.42±0.67	3.58±0.51	3.50±0.52	3.42±0.51
Estrous cycle ^{b)}	4.04±0.14	4.08±0.29	4.03±0.10	4.08±0.29
No. of mated				
Male	12	12	12	11
Female	12	12	12	12
No. of copulated ^{c)}				
Male	12(100)	12(100)	11(91.67)	11(100)
Female	12(100)	12(100)	11(91.67)	12(100)
No. of impregnated ^{d)}	12(100)	12(100)	11(100)	11(100)
No. of pregnat ^{d)}	12(100)	12(100)	11(100)	12(100)
Duration of mating ^{b)}	2.25±1.29	2.58±1.31	2.55±2.02	1.67±0.89

a) Values are mean ± S.D.

b) Values are mean ± S.D.(day).

c) Values in parentheses represent percentages to the number of mated.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of copulated.

Table 14 Findings of delivery of F₀ dams treated orally with (trifluoromethyl)benzene and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
No. of dams	12	12	11	11
Gestational days ^{a)}	22.33±0.49	22.08±0.29	22.00±0.00	22.36±0.50
No. of corpora lutea ^{b)}	190(15.83±1.53)	216(18.00±2.13)*	192(17.45±1.21)	192(17.45±1.29)
No. of implantations ^{b)}	179(14.92±1.16)	197(16.42±2.27)	187(17.00±1.10)*	183(16.64±1.21)
No. of litter ^{b)}	168(14.00±1.41)	191(15.92±2.07)	171(15.55±1.63)	173(15.73±2.00)
Gestation index ^{c)}	100	100	100	100
No. of stillborns ^{d)}				
Male	0	6	2	5
Female	2	1	6	7
Total	2 (1.19)	8 (4.19) ⁱ⁾	8 (4.68)	12(6.94)
No. of live newborns ^{b)}	166(13.83±1.40)	183(15.25±1.76)	163(14.82±1.60)	161(14.64±2.54)
Birth index ^{e)}	92.74	92.89	87.17	87.98
Sex ratio of live newborns ^{f)}	1.08(86/80)	1.01(92/91)	1.06(84/79)	0.99(80/81)
Body weight of live newborns(g) ^{g)}				
Male On day 0	6.7±0.5	6.1±0.5*	6.2±0.4	6.0±0.4**
4	11.1±1.0	9.9±1.0*	9.8±0.9**	9.4±0.4**
Female On day 0	6.4±0.5	5.7±0.4**	5.8±0.4**	5.7±0.4**
4	10.5±0.8	9.4±0.9*	9.0±0.7**	8.8±0.5**
Viability index ^{h)}	98.80	98.91	92.64	91.28*
No. of external anomalies	0	0	0	0

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

a) Values are mean ± S.D.(day).

b) Values in parentheses represent mean ± S.D.

c) Gestation index=(Number of females with live newborns/Number of pregnant females)×100

d) Values in parentheses represent percentages to the number of litters.

e) Birth index=(Number of live newborns/Number of implantations)×100

f) Values in parentheses represent the number of male/female live newborns.

g) Values are mean ± S.D.

h) Viability index=(Number of live newborns on day 4 after birth/Number of live newborns)×100

i) Including 1 cannibalized.