２００３年　９月３０日

４-エチルモルホリンのラットを用いる
経口投与簡易生殖毒性試験

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室　委託

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

【目　　次】

要　約 1
試験目的 2
材料および方法 3
　1．被験物質 3
　2．使用動物および飼育条件 3
　3．群分けおよび個体識別 3
　4．投与検体の調製 4
　5．投与量、群構成および投与方法 4
　6．観察方法 5
　7．データの解析 7
結　果 9
　1．親動物 9
　2．生殖能力 10
　3．出生児 11
考　察 12
文　献 13

Figs. 1～4
Tables　1～17

【要　　約】

Sprague-Dawley 系（Crj:CD）ラットの雌雄（各 13 匹／群）に、4-エチルモルホリンの 0（媒体）、50、150 および 500 mg/kg を、雄では交配前 2 週間から交配を経て、連続 42 日間、雌では交配前 2 週間から交配を経て、妊娠期間を通して哺育 3 日まで、経口投与して、雌雄動物に対する生殖毒性について検討した。成績は、以下のように要約される。

1．親動物所見

雌では 500 mg/kg 投与群の 1 例が哺育 2 日に死亡したが、雄ではいずれの投与群においても死亡例は認められなかった。一般状態の観察では、死亡した雌 1 例に振戦が観察された他、150 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、投与直後に一過性の流涎が観察された。その他、雄では 500 mg/kg 投与群、雌では 150 mg/kg 以上の投与群において、体重増加抑制および摂餌量の低下が認められた。剖検および生殖器の病理組織学検査では、被験物質投与の影響を示唆する異常は認められなかった。

2．生殖能力所見

500 mg/kg 投与群の着床数および着床率が対照群よりやや低下したが、性周期、交尾率、受胎率、妊娠期間および黄体数には、被験物質投与の影響は認められなかった。

3．出生児所見

500 mg/kg 投与群では、着床数の低下に起因した産児数、出産生児数、生児出産率および出生率の低下がみられたが、出生児の形態ならびに体重には、被験物質投与の影響は認められなかった。

4．無作用量

以上の結果から、本試験条件下における 4-エチルモルホリンの親動物に対する無作用量は、体重増加抑制が認められたことから雄では 150 mg/kg/day、雌では 50 mg/kg/day、親動物の生殖能力に対する無作用量は、着床数の低下から 150 mg/kg/day、出生児に対する無作用量は 500 mg/kg/day と判断される。

【試 験 目 的】

OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、4-エチルモルホリンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

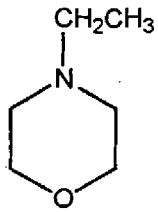
本試験は、「OECD化学物質試験法ガイドライン 421/生殖発生毒性スクリーニング試験（簡易生殖毒性試験）」（1995年7月27日）、および「化学物質GLP」（平成12年3月1日改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号）に準拠して実施した。

【材料および方法】

1．被験物質

4-エチルモルホリン（英名 Morpholine, 4-ethyl-、略称 EM）は、別名 *N*-エチルモルホリン、CAS No. 100-74-3、分子量 115.18、分子式 $C_6H_{13}NO$、凝固点－70℃以下、沸点138.3℃（760 mmHg）、比重 0.914（20/20℃）、蒸気圧 6 mmHg（20℃）のアンモニア臭を有する無色の液体である（構造式については下図参照）。本試験には、ロット番号　　純度 99 wt%以上、不純物として水分を 0.05 wt%含む被験物質を　　から提供され、使用した。受領した被験物質は、使用時まで窒素充填して密閉し、冷暗所（冷蔵庫内）に保管した。なお、動物試験終了後に被験物質を返却し、　　にて品質試験を再度実施した結果、試験期間中の安定性が確認された（Appendix A）。

<構造式>



2．使用動物および飼育条件

7週齢の Sprague-Dawley（SD）系〔Crj:CD(SD)IGS、SPF〕雌雄ラット（日本チャールス・リバー㈱、厚木飼育センター生産）を購入し、入荷日を含む 7 日間、検疫と馴化を兼ねて飼育した。検疫・馴化期間中は、毎日一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定したが、異常を示した動物は発見されなかった（Appendix B）。検疫が終了した雌動物については、さらに 14 日間、性周期および一般状態を観察した。雄動物については、この間、一般状態を観察した。

動物は、許容温湿度各 21.0～25.0℃および 40.0～75.0%、換気回数約 15 回／時間、照明 12 時間（7 時～19 時点灯）に制御された飼育室（9 室）で、金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に個別に収容して飼育し、飼料（固形 CE-2、日本クレア㈱）および飲料水（水道水、秦野市水道局給水）を自由に摂取させた。雌動物においては、妊娠 18 日から哺育 4 日までの間、床敷として紙パルプ製チップ（ペパークリーン、日本エスエルシー㈱）を入れたラット用プラスチック製繁殖ケージ（350w×400d×180h mm）を使用した。なお、飼育期間中における飼育室の温湿度は、温度 23.5～24.5℃、相対湿度 53.0～73.5%であり、許容範囲内であった。また、使用した飼料、水道水および床敷の分析結果では、試験に支障を来す可能性のある混入物は確認されなかった。

3．群分けおよび個体識別

群分けは、雌雄とも、投与開始前日（2002 年 8 月 26 日）に測定した体重をもとに、体重

別層化無作為抽出法により実施した。その際、検疫終了後の馴化期間中に一般状態または体重増加に異常が認められた動物は、群分けの対象から除外した。また、雌動物については、性周期を規則的に回帰しなかった動物も除外した。群分け後の動物には、フェルトペンで尾に動物番号を標識して個体を識別した。また、飼育ケージには、群ごとに色彩の異なった動物カードを掛け、これに試験計画番号、個体識別番号を記入した。なお、出生児の個体識別は実施しなかった。

4．投与検体の調製

投与検体は、被験物質を秤量して、日局注射用水（製造元 光製薬㈱、製造番号 A106AA）を加えて最高濃度液（10 w/v%）を調製してから、日局注射用水で段階希釈して、各濃度（3および1 w/v%）の投与検体を調製した。

投与検体の安定性については、0.1および20 w/v%の調製検体について、冷蔵、遮光条件下における8日間の安定性が確認されている（Appendix C)。また、投与開始前日に調製した投与検体については、各濃度の投与検体に含まれる被験物質の含量を測定し、所定量のEMが含まれていることを確認した（Appendix D)。

調製検体中の濃度測定法は、以下の通りに実施した。各調製検体の1 mLを採取し、メタノールで一定量とした後、メタノールで適宜希釈して試料溶液を調製した。別に、被験物質を必要量秤量し、メタノールに溶解して標準溶液（5～100 μg/mL）を調製した。試料溶液および標準溶液をガスクロマトグラフ（GC）法により測定して、標準溶液から作成した検量線を用いて濃度を求めた。

GC条件

分析カラム：	Pora PLOT Q （内径 0.53 mm、長さ 10 m、膜厚 20 μm、CHROMPACK）
昇温条件：	50℃（1分間）→15℃／分→250℃
キャリアーガス：	ヘリウム、約 12 cm/sec
水素：	60 kPa
空気：	50 kPa
注入口温度：	250℃
検出器温度：	250℃
試料注入量：	1 μL

5．投与量、群構成および投与方法

投与量は、4-エチルモルホリンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験予備試験（試験計画番号 C-01-007）の結果に基づいて設定した。すなわち、同試験においてEMを100、500、800および1000 mg/kgの用量で、雌雄各群3匹のラットに7ないし5日間反復投与した結果、1000 mg/kgの用量で雌雄各1例が死亡した。800 mg/kg以上の用量を投与した群で、振戦、活動性の低下、うずくまりおよび閉眼などが散見され、投与初期に体

重減少ないし増加抑制が認められた。また、100 mg/kg 投与群の雌 1 例および 500 mg/kg 以上を投与した群の雌雄全例で、咀嚼様動作やケージ内を舐める動作が観察された。以上の結果から、本試験における投与量は、500 mg/kg を高用量に設定し、公比を約 3 で減じて、中用量には 150 mg/kg を、低用量には 50 mg/kg を設定した。

投与経路は経口とし、ラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に投与容量を算出した。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は以下の通りである。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	日局注射用水	0	0	5	MX01001～013	FB01001～013
2	EM	50	1	5	MX02001～013	FB02001～013
3	EM	150	3	5	MX03001～013	FB03001～013
4	EM	500	10	5	MX04001～013	FB04001～013

投与期間は、雄に対しては交配前 2 週間から交配を経て、剖検前日までの連続 42 日間、雌に対しては交配前 2 週間から交配を経て、妊娠期間を通して哺育 3 日まで、交尾が確認されなかった雌は剖検前日までの連続 52 日間、分娩しなかった雌は妊娠 25 日相当日までとし、1 日 1 回、9 時から 13 時の間に投与した。

6．観察方法

1）親動物

(1) 一般状態の観察

全例について、飼育期間中毎日 1 回以上、投与期間中は投与前後の毎日 2 回観察した。特に、被験物質に起因すると考えられた症状が発現した場合は、症状の発現している間、継続的に観察した。

(2) 体重測定

全例について、投与期間中週 1 回ならびに解剖日に測定した。交尾が確認された雌では妊娠 0、7、14 および 20 日に、分娩した雌では哺育 0 および 4 日に測定したほか、死亡例については死亡発見時に測定した。

(3) 摂餌量測定

全例について、交配期間を除く投与期間中週 1 回、給餌量および残餌量を測定し、その差から 1 日の摂餌量を算出した。交尾が確認された雌では妊娠 0～1、7～8、14～15 および 20～21 日、分娩した雌では哺育 3～4 日の摂餌量を測定した。

(4) 性周期観察

全例の雌について、群分け日までの性周期観察に引き続き、腟スメアを毎日採取し、同居後、交尾が確認されるまで性周期を観察した。性周期の型は、投与前2週間および投与開始後2週間の各観察期間内に少なくとも2回以上の発情期像を示した雌のうち、規則的に4日あるいは5日間隔で発情を回帰した動物を4日周期あるいは5日周期とし、4日と5日の間隔が混在して発情を回帰した動物を4/5日周期に、これらに分類されない動物は不正周期とし、各型の性周期を示す動物の割合を求め、投与開始後に性周期が変化した動物の頻度を群ごとに求めた。また、各動物の発情期から発情期までの日数の平均から、群ごとの平均発情回帰日数を求めた。

(5) 交配

交配は、投与15日（12週齢）の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で連日同居させて行った。交尾の確認は、腟スメア中の精子の存在、あるいは腟栓の有無の確認により行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日として起算するとともに、同居を中止し、個別飼育に戻した。交尾の有無および妊娠の成否により（子宮に着床痕が確認された動物を妊娠例とした）、各投与群における交尾率〔(交尾動物数／交配動物数）×100、%〕、受胎率〔(妊娠動物数／交尾動物数）×100、%〕、さらには同居開始日から交尾確認日までの日数、およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

(6) 分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の直接観察は観察可能な動物について断続的に行い、分娩状態が直接観察できなかった動物についても、分娩前後の一般状態および産児の状態から分娩異常の有無を判断して記録した。分娩が午前11時までに完了した動物については、その日を分娩日（哺育0日）とし、妊娠期間（妊娠0日から分娩日までの日数）および出産率〔(生児出産雌数／妊娠動物数）×100、%〕を算出した。分娩日の翌日からは、哺育状態を毎日観察した。

(7) 剖検・病理組織学検査

雄動物は、投与42日の翌日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、放血・致死させ、剖検した。その際、精巣および精巣上体の重量を測定し、前立腺腹葉、凝固腺を含む精嚢および病変部は、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。精巣および精巣上体はブアン液に固定し、全例について標本を作製し、対照群および500 mg/kg 投与群について病理組織学検査を実施した。その他、剖検時に観察された病変部についても病理組織学検査を実施した。

雌動物のうち、分娩した例は哺育4日に、分娩しなかった例は妊娠26日相当日に、また交

尾が確認されなかった例は投与52日の翌日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で、放血・致死させ、剖検した。死亡例は、発見後すみやかに剖検した。その際、卵巣および子宮を摘出して、卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮については着床数を数え、着床率〔(着床数／妊娠黄体数) ×100、%〕を算出した。卵巣、子宮、腟、病変部および死亡例の胸腹部主要器官は、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。卵巣については、全例について標本を作製し、対照群および500 mg/kg 投与群について病理組織学検査を実施した。その他、剖検時に観察された病変部および死亡例の胸腹部主要器官についても病理組織学検査を実施した。

2）出生児

(1) 産児数および死亡児

哺育0日に産児の性別および外表奇形の有無を観察した後、産児数(生存児数+死亡児数)を雌雄別に数えて、分娩率〔(産児数／着床痕数) ×100、%〕、生児出産率〔(出産生児数／着床痕数) ×100、%〕、出生率〔(出産生児数／産児数) ×100、%〕および哺育0日の性比〔(哺育0日の雄生児数／哺育0日の総生児数) ×100、%〕を求めた。

哺育1日以降は、毎日、出生児の一般状態を観察し、生児数と死亡児数を雌雄別に数えて、新生児生存率〔(哺育4日の生児数／哺育0日の生児数) ×100、%〕および哺育4日の性比〔(哺育4日の雄生児数／哺育4日の総生児数) ×100、%〕を求めた。死亡児については、発見後すみやかに剖検し、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。

(2) 体重測定

哺育0および4日に個別の体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出した。

(3) 剖検

生存児は、全例を哺育4日にエーテル吸入により致死させ、剖検し、外表および内部器官の異常の有無を観察した。

7．データの解析

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率については、Fisher の直接確率検定 [1)] を行った。被験物質投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けしたデータは Mann-Whitney のU検定 [1,2)] により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により対照群との間で有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは腹ごとの平均値を1標本として、先ず、Bartlett の方法 [3)] により各群の分散の一様性について検定を行い、分散が一様であった場合には、一元配置型の分散分析 [3)] を行い、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett 法 [4)] により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が 0 となった場合および分散が一様でなかった場合には、Kruskal-

Wallisの順位検定[5]を行い、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett型の検定法により多重比較を行った。有意水準は、いずれも5%とした。

【結　　果】

1．親動物

1）一般状態（Tables 1、2；Appendices 1-1～2-4）

EM 500 mg/kg 投与群の雌 1 例が哺育 2 日に死亡した。死亡例では、死亡の前日に静止時振戦が観察された。生存例では、投与 14 日から投与後一過性の流涎が 150 mg/kg 以上の投与群で、雌雄とも 4～7 例に観察された他、左下腹部の腫瘤が 50 mg/kg 投与群の雌 1 例に観察された。

2）体重（Figs.1、2；Tables 3～6；Appendices 3-1～6-4）

雄では、500 mg/kg 投与群において体重増加抑制がみられ、体重実測値は投与 42 日および 43 日（解剖時体重）、体重増加量は投与 1～7、21～28 および 35～42 日の各値が、対照群と比較して有意な低値を示した。150 mg/kg 以下の投与群では、対照群との間に有意差は認められなかった。

雌では、150 mg/kg 以上の投与群において体重増加抑制がみられ、体重実測値は 500 mg/kg 投与群の妊娠 20 日、体重増加量は 150 mg/kg 投与群の投与 1～7 日、妊娠 0～7 日および哺育 0～4 日、500 mg/kg 投与群の投与 1～7 日、妊娠 7～14、14～20 日および哺育 0～4 日の各値が、対照群と比較して有意な低値を示した。50 mg/kg 投与群では、対照群との間に有意差は認められなかった。

3）摂餌量（Figs.3、4；Tables 7、8；Appendices 7-1～8-4）

雄では、500 mg/kg 投与群において摂餌量の低下がみられ、投与 1～2、7～8、14～15、29～30 および 41～42 日の値が、対照群と比較して有意な低値を示した。150 mg/kg 以下の投与群では、対照群との間に有意差は認められなかった。

雌では、150 mg/kg 以上の投与群において摂餌量の低下がみられ、150 mg/kg 投与群の投与 1～2 日、妊娠 7～8 日、500 mg/kg 投与群の投与 1～2 日、妊娠 0～1、7～8、14～15 日の値が、対照群と比較して有意な低値を示した。50 mg/kg 投与群では、対照群との間に有意差は認められなかった。

4）剖検所見（Tables 9、10；Appendices 9-1～10-4）

雄では、両側精巣の小型化が対照群、50 および 500 mg/kg 投与群の各 1 例に観察され、50 および 500 mg/kg 投与群では両側精巣上体の小型化も認められた。このほか両側精巣上体尾部の大型化が対照群の 1 例にみられた。

雌では、哺育期間中に死亡した 500 mg/kg 投与群の 1 例に、肺および腎臓の暗赤色化がみられた。その他、乳腺腫瘤（一般状態の項では左下腹部の腫瘤と記載）が 50 mg/kg 投与群の 1 例に観察された。

5）器官重量（Table 11；Appendices 11-1～11-4）

雄の解剖時体重が 500 mg/kg 投与群で有意に低下したが、精巣および精巣上体の重量には、実測値、相対重量ともに対照群と比較して有意差は認められなかった。

6）病理組織所見（Tables 12、13；Appendices 12-1～13-3）

雄では、剖検時に小型化かみられた対照群、50 および 500 mg/kg 投与群の各 1 例の精巣に、精細管の萎縮と水腫が観察され、精巣上体には細胞残屑がみられた。萎縮の程度が強い 50 および 500 mg/kg 投与群の各 1 例ではライディッヒ細胞の過形成も認められた。その他、精子肉芽腫が対照群の 1 例では両側に、高用量の 1 例では片側の精巣上体尾部にみられた。

雌では、対照群および 500 mg/kg 投与群の卵巣に異常は認められなかった。哺育期間中に死亡した 500 mg/kg 投与群の 1 例に中等度の肺水腫、心臓には軽度なリンパ球浸潤が観察された。その他、50 mg/kg 投与群の 1 例に観察された乳腺腫瘤は、組織学的には腺腫であった（Appendix 13-3）。

2．生殖能力

1）性周期および交配成績（Tables 14、15；Appendices 14-1～15-4）

性周期の観察では、投与開始後に 4 日周期から 4/5 日周期に変化した動物が 150 および 500 mg/kg 投与群で各 1 例みられたが、その頻度には対照群と比較して有意差はなかった。交配成績では、交尾率および受胎率、さらには交尾までの日数およびその間の発情回数に、対照群と被験物質各投与群との間に有意差は認められなかった。

2）出産率および妊娠期間（Table 16；Appendices 16-1～16-4）

500 mg/kg 投与群の 1 例は妊娠 24 日に 2 匹の産児を出産したが、いずれも死亡児であり、同群の出産率は 90.9%となった。その他の投与群の出産率はいずれも 100%であった。妊娠期間については、対照群と被験物質各投与群との間に有意差は認められなかった。

3）黄体数、着床数および着床率（Table 16；Appendices 16-1～16-4）

500 mg/kg 投与群の着床数および着床率は、対照群より低下したが、有意差は認められなかった。150 mg/kg 以下の投与群では、対照群との間に差はなかった。

4）分娩および哺育状態

分娩状態の直接観察は、対照群の 12 例中 4 例、50 mg/kg 投与群の 12 例中 3 例、150 mg/kg 投与群の 12 例中 3 例、および 500 mg/kg 投与群の 11 例中 4 例について実施されたが、異常分娩を示した例は観察されなかった。また、分娩状態を直接観察できなかった動物についても、500 mg/kg 投与群で妊娠 24 日に死亡児 2 匹を分娩した 1 例の他には、分娩異常と判

断された例はなかった。

哺育状態の観察では、哺育2日に死亡した500 mg/kg投与群の1例において、死亡の前日に母動物の乳頭突出不良および全児のミルクスポット（腹側から透かして見える胃内の乳汁）の消失が認められたが、その他の動物に哺育状態の異常は観察されなかった。

3．出生児

1）生存（Table 16；Appendices 16-1～16-4）

500 mg/kg 投与群の産児数、出産生児数、生児出産率および出生率が対照群と比較して低下したが、有意差は認められなかった。500 mg/kg投与群の性比および新生児生存率、さらには150 mg/kg以下の投与群の各指標については、対照群と比較して差はなかった。

2）体重（Table 17；Appendices 17-1～17-4）

哺育0および4日における出生児の体重には、対照群と被験物質各投与群との間に有意差は認められなかった。

3）形態

哺育0日における産児の外表観察では、形態異常を呈した児は認められなかった。また、死亡児の剖検でも異常は認められなかったが、哺育2日に母動物が死亡した500 mg/kg投与群の哺育児のうち、雄の生存児1例に両側の腎盂拡張が観察された。哺育4日に剖検した児については、外表および内部器官の異常は観察されなかった。

【考　　察】

EM 500 mg/kg 投与群の死亡動物では、死亡日の前日に静止時振戦が観察された。類似の神経症状は、本被験物質の急性経口投与毒性試験[6]においても観察されていることから、死亡は被験物質投与の影響と考えられ、病理所見から死因は肺水腫と推定された。その他、生存例では、流涎が 150 mg/kg 以上の投与群で観察された。流涎は、投与後一過性であったことから被験物質の苦味によって惹起されたものと推察されるが、一部の動物でしかみられておらず、発症までに約 2 週間を要していることなどから、その作用はごく軽度なものと考えられる。なお、50 mg/kg 投与群の雌 1 例に観察された左下腹部の腫瘤は、組織検査の結果、腺腫であることが判明したが、被験物質の投与に起因した変化ではないと判断した。

雄では 500 mg/kg 投与群、雌では 150 mg/kg 以上の投与群において体重増加抑制と摂餌量の低下がみられた。同様の変化は、本被験物質の 28 日間反復経口投与毒性試験[7]においても認められていることから、被験物質投与の影響と考えられる。

剖検時には、両側精巣の小型化が 50 および 500 mg/kg 投与群に観察され、組織学検査では精細管の萎縮と水腫が確認されたが、各群とも 1 例のみの所見であり、対照群でも同様な所見がみられていることから、被験物質投与の影響ではないと判断した。なお、精巣および精巣上体の重量にも、対照群との間に有意差は認められなかった。

500 mg/kg 投与群では、着床数および着床率が対照群より低下し、死亡児 2 匹を妊娠 24 日に出産した母動物が 1 例みられた。500 mg/kg 投与群の性周期、交尾率、受胎率および黄体数には被験物質の影響は認められなかったことから、本被験物質は交尾までの生殖能力に影響を及ぼさないが、着床に対しては影響を及ぼす可能性が示唆された。なお、哺育状態の観察で、500 mg/kg 投与群の死亡した 1 例にみられた母動物の乳頭突出不良および全児のミルクスポットの消失は、母動物の一般状態の悪化に伴った変化と推察される。

500 mg/kg 投与群の産児数、出産生児数、生児出産率および出生率が対照群と比較して低下したが、出生児の体重、哺育 4 日の新生児生存率には対照群との間に差はみられなかったことから、着床数の低下に起因した変化と考えられる。

哺育 2 日に母動物が死亡した 500 mg/kg 投与群の哺育児のうち、雄の生存児 1 例に両側の腎盂拡張が観察されたが、哺育 4 日に剖検した児については、外表および内部器官の異常は観察されなかったことから、被験物質の投与に起因した変化ではないと判断した。

以上の結果から、本試験条件下における 4-エチルモルホリンの親動物に対する無作用量は、体重増加抑制が認められたことから雄では 150 mg/kg/day、雌では 50 mg/kg/day、親動物の生殖能力に対する無作用量は、500 mg/kg 投与群における着床数の低下から 150 mg/kg/day、出生児に対する無作用量は 500 mg/kg/day と判断された。

【文　　献】

1）石居進：「生物統計学入門」，倍風館，東京（1992）

2）丹後俊郎：「医学への統計学」，古川俊之監修，朝倉書店，東京（1985）

3）佐久間昭：「薬効評価－計画と解析」，東京大学出版会，東京（1977）

4）Dunnet, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491 (1964)

5）Kruskal, W. H., Wallis, W. A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc. 47: 583-621 (1952)

6）太田亮：4-エチルモルホリンのラットを用いる急性経口投与毒性試験（試験計画番号：A-01-071），秦野研究所報告書（2003）

7）森村智美：4-エチルモルホリンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験（試験計画番号：C-01-008），秦野研究所報告書（2003）

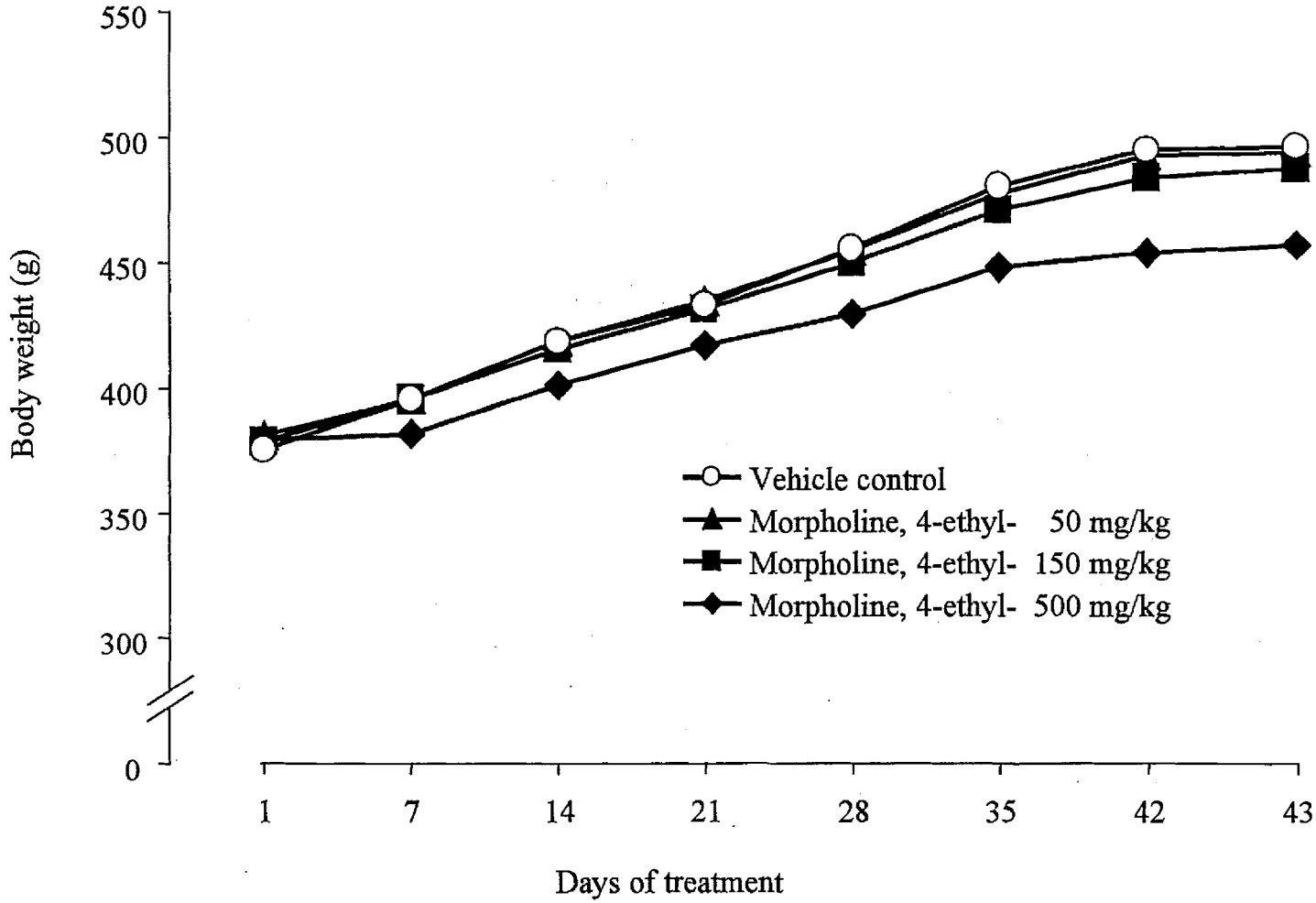


Fig.1 Body weight of males

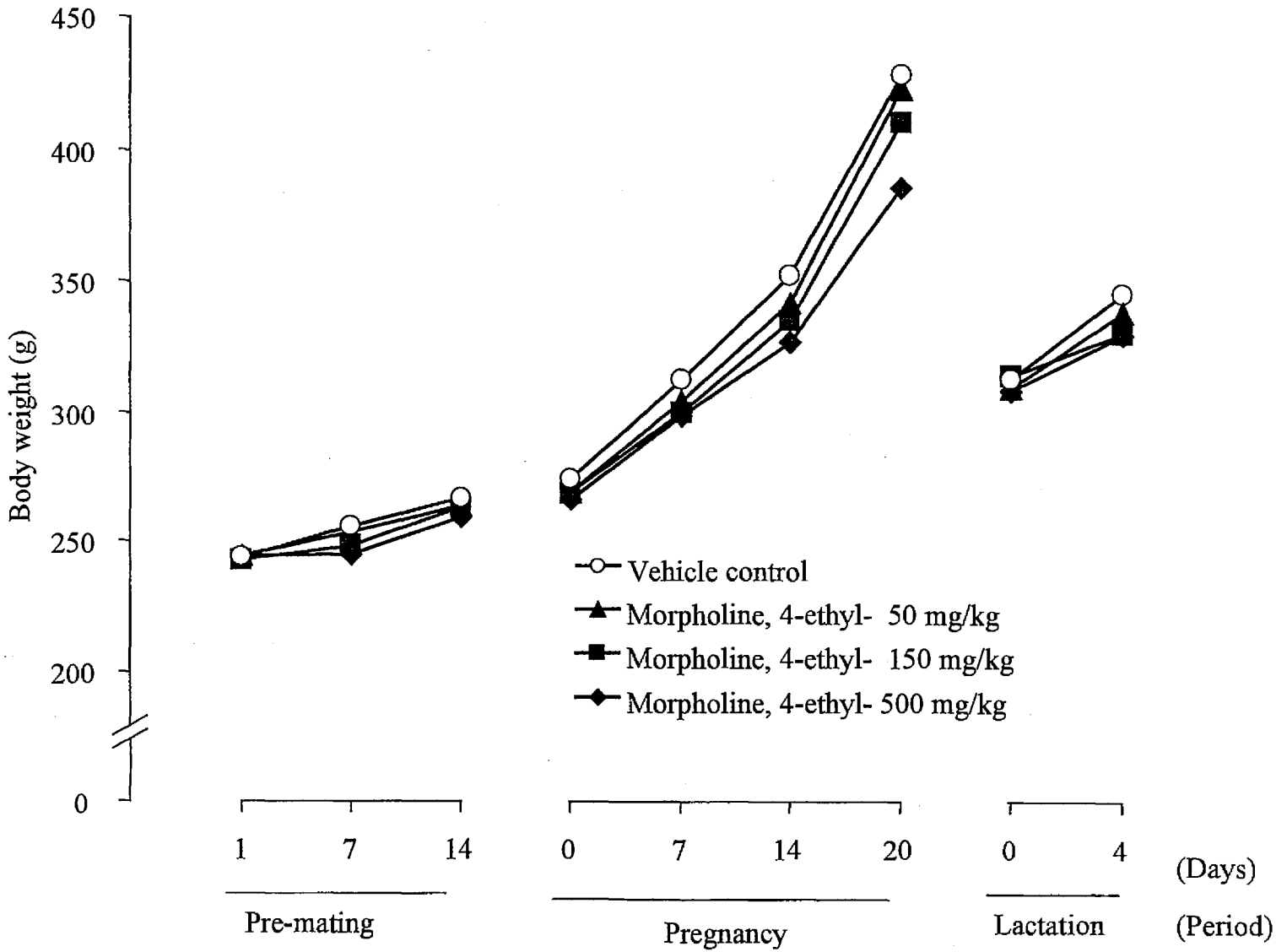


Fig.2 Body weight of females

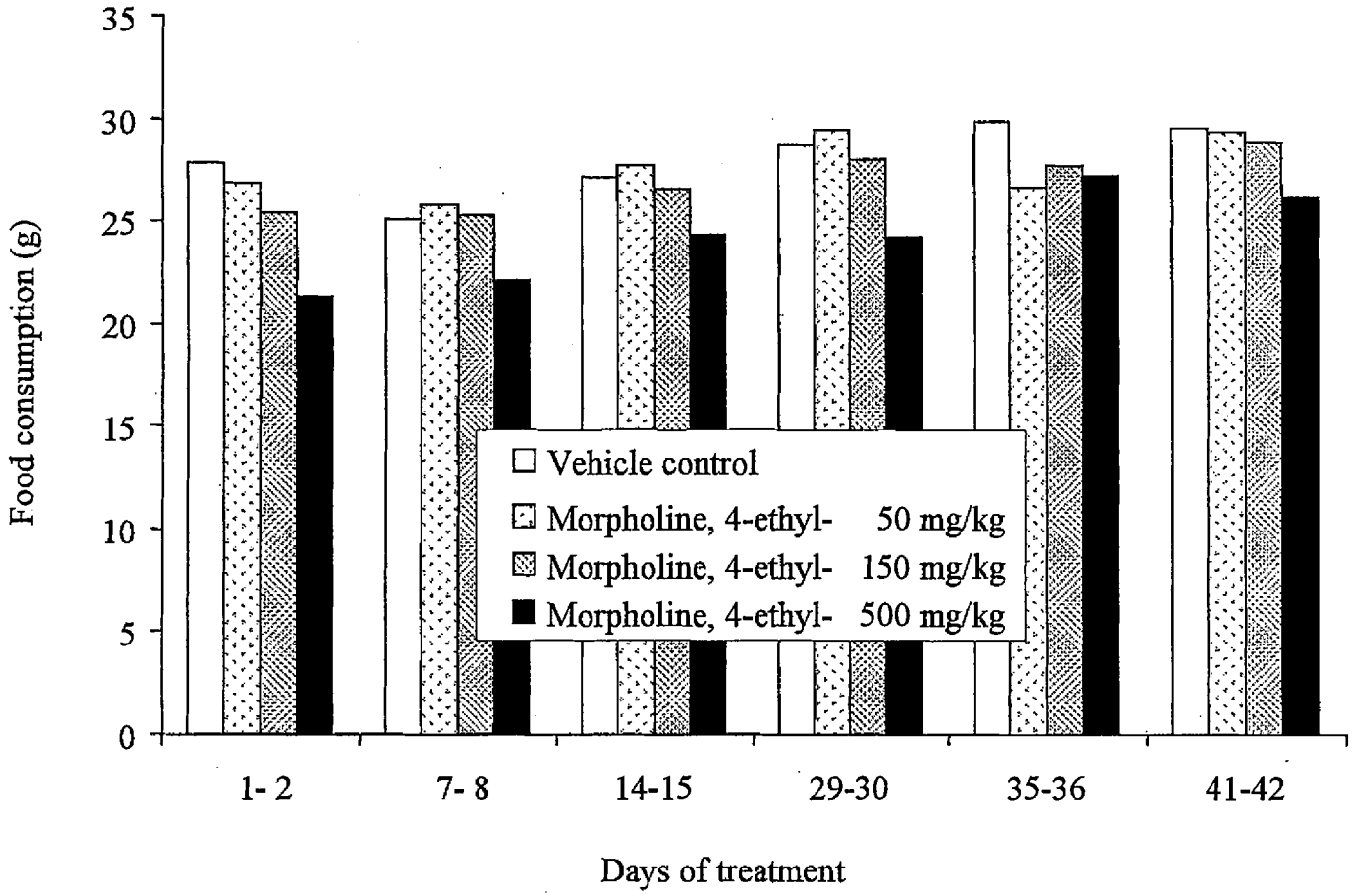


Fig.3 Food consumption of males

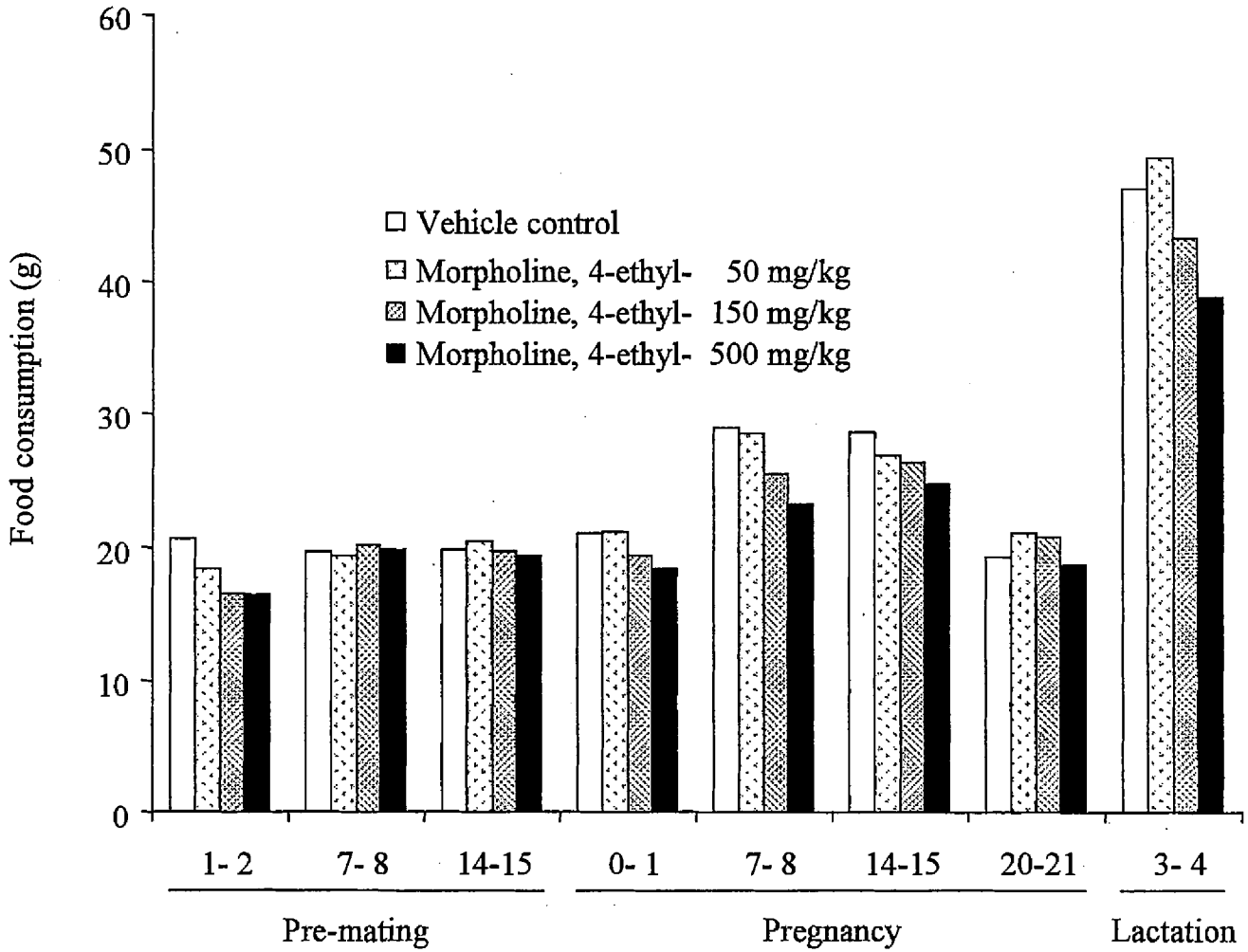


Fig.4 Food consumption of females

Table 1

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Clinical signs of males

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
No. of males examined	13	13	13	13
No. of males with abnormality	0	0	4	7
Category of abnormality; N				
Salivation (only after the treatment)	0	0	4	7

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)

Table 2

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Clinical signs of females

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
No. of females examined	13	13	13	13
No. of females with abnormality	0	1	4	5
Category of abnormality; N				
Mass nodule in the left lower abdominal region	0	1	0	0
Salivation (only after the treatment)	0	0	4	4
Rest tremor	0	0	0	1
Death	0	0	0	1

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)

Table 3

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Body weight of males (g); mean ± S.D. (N)

Compound	Morpoholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
Days of treatment				
1 (initial body weight)	375.4 ± 18.1 (13)	380.3 ± 16.1 (13)	377.9 ± 16.4 (13)	379.3 ± 18.9 (13)
7	394.8 ± 24.0 (13)	395.3 ± 20.5 (13)	394.8 ± 24.8 (13)	381.8 ± 17.2 (13)
14	418.2 ± 28.8 (13)	418.6 ± 22.1 (13)	415.6 ± 26.2 (13)	400.6 ± 20.5 (13)
21	433.2 ± 30.7 (13)	434.3 ± 23.5 (13)	431.8 ± 28.5 (13)	416.7 ± 23.3 (13)
28	455.7 ± 34.5 (13)	454.9 ± 24.9 (13)	449.9 ± 32.9 (13)	429.9 ± 27.4 (13)
35	480.6 ± 38.2 (13)	477.5 ± 30.4 (13)	470.7 ± 34.6 (13)	448.7 ± 28.4 (13)
42	494.9 ± 39.5 (13)	492.7 ± 32.1 (13)	484.1 ± 37.5 (13)	454.3 ± 29.8 * (13)
43 (final body weight)	497.0 ± 40.4 (13)	494.0 ± 30.9 (13)	488.0 ± 38.9 (13)	457.5 ± 31.7 * (13)

* ,Significant difference from control, $p<0.05$ (by multiple comparisons)

Table 4

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Body weight gain of males (g); mean ± S.D. (N)

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
Days of treatment				
1- 7	19.4 ± 7.4 (13)	15.1 ± 5.5 (13)	16.9 ± 10.6 (13)	2.5 ± 7.8 ** (13)
7-14	23.4 ± 6.9 (13)	23.3 ± 3.5 (13)	20.8 ± 4.4 (13)	18.9 ± 5.2 (13)
14-21	15.0 ± 5.8 (13)	15.7 ± 4.1 (13)	16.2 ± 5.8 (13)	16.0 ± 5.8 (13)
21-28	22.6 ± 10.8 (13)	20.6 ± 4.8 (13)	18.0 ± 6.7 (13)	13.2 ± 7.0 ** (13)
28-35	24.9 ± 7.9 (13)	22.5 ± 9.6 (13)	20.8 ± 8.8 (13)	18.9 ± 8.5 (13)
35-42	14.3 ± 8.8 (13)	15.3 ± 8.0 (13)	13.4 ± 6.6 (13)	5.5 ± 4.9 ** (13)
42-43	2.1 ± 4.5 (13)	1.2 ± 3.6 (13)	3.9 ± 5.0 (13)	3.3 ± 6.2 (13)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)
**, Significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 5

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Body weight of females (g); mean ± S.D. (N)

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
Days of treatment				
1	243.7 ± 11.7 (13)	244.4 ± 12.0 (13)	242.4 ± 13.9 (13)	244.1 ± 14.2 (13)
7	255.8 ± 10.5 (13)	253.4 ± 13.5 (13)	248.1 ± 12.0 (13)	244.8 ± 13.4 (13)
14	266.5 ± 13.1 (13)	263.6 ± 15.7 (13)	263.4 ± 17.8 (13)	259.5 ± 17.5 (13)
Days of pregnancy				
0	274.2 ± 17.0 (12)	269.1 ± 17.1 (12)	268.8 ± 13.4 (12)	265.9 ± 17.5 (11)
7	312.5 ± 20.3 (12)	304.4 ± 19.3 (12)	299.5 ± 15.3 (12)	298.3 ± 20.2 (11)
14	352.2 ± 24.9 (12)	342.0 ± 22.7 (12)	334.7 ± 16.7 (12)	326.8 ± 25.5 (11)
20	428.5 ± 33.1 (12)	423.2 ± 29.8 (12)	410.6 ± 27.2 (12)	386.1 ± 42.1 * (11)
Days of lactation				
0	312.8 ± 24.8 (12)	309.4 ± 27.1 (12)	314.3 ± 26.6 (12)	308.1 ± 32.0 (11)
4	345.6 ± 22.8 (12)	338.4 ± 26.9 (12)	330.1 ± 19.3 (12)	329.7 ± 24.5 (9)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)
*, Significant difference from control, $p<0.05$ (by multiple comparisons)

Table 6

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Body weight gain of females (g); mean ± S.D. (N)

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
Days of treatment				
1- 7	12.1 ± 7.8 (13)	9.0 ± 4.5 (13)	5.7 ± 5.2 * (13)	0.7 ± 6.6 ** (13)
7-14	10.8 ± 5.3 (13)	10.3 ± 6.0 (13)	15.3 ± 8.0 (13)	14.8 ± 5.7 (13)
Days of pregnancy				
0- 7	38.3 ± 6.8 (12)	35.3 ± 6.7 (12)	30.7 ± 5.6 ** (12)	32.4 ± 4.6 (11)
7-14	39.7 ± 9.0 (12)	37.6 ± 6.9 (12)	35.2 ± 5.5 (12)	28.6 ± 7.4 ** (11)
14-20	76.3 ± 13.0 (12)	81.2 ± 13.7 (12)	75.9 ± 13.1 (12)	59.2 ± 23.4 * (11)
Days of lactation				
0- 4	32.8 ± 12.2 (12)	29.1 ± 17.1 (12)	15.8 ± 17.4 * (12)	12.0 ± 18.6 ** (9)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)

*, Significant difference from control, $p<0.05$ (by multiple comparisons)

**, Significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 7

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Food consumption of males (g); mean ± S.D. (N)

Compound	Morpholine, 4-ethyl-									
Dose group (mg/kg)	0 [a)]			50			150		500		
Days of treatment											
1 - 2	27.8 ± 1.9	(13)		26.9 ± 2.3	(13)		25.4 ± 3.7	(13)	21.3 ± 2.7	**	(13)
7 - 8	25.1 ± 1.9	(13)		25.8 ± 1.5	(13)		25.3 ± 2.8	(13)	22.1 ± 1.7	**	(13)
14 - 15	27.1 ± 2.9	(13)		27.7 ± 8.2	(13)		26.6 ± 2.9	(13)	24.3 ± 3.2	*	(13)
29 - 30	28.7 ± 2.4	(13)		29.5 ± 2.1	(13)		28.0 ± 2.7	(13)	24.2 ± 1.7	**	(13)
35 - 36	29.9 ± 7.5	(13)		26.7 ± 3.3	(13)		27.7 ± 3.0	(13)	27.2 ± 6.4		(13)
41 - 42	29.6 ± 3.3	(13)		29.4 ± 3.4	(13)		28.9 ± 4.1	(13)	26.2 ± 2.0	*	(13)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)
* , Significant difference from control, $p<0.05$ (by multiple comparisons)
* *, Significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 8

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Food consumption of females (g); mean ± S.D. (N)

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
Days of treatment				
1-2	20.7 ± 1.9 (13)	18.5 ± 3.5 (13)	16.6 ± 3.4 ** (13)	16.5 ± 3.7 ** (13)
7-8	19.7 ± 3.7 (13)	19.4 ± 3.9 (13)	20.2 ± 2.9 (13)	19.9 ± 3.5 (13)
14-15	19.9 ± 3.7 (13)	20.4 ± 2.6 (13)	19.7 ± 2.3 (13)	19.4 ± 1.8 (13)
Days of pregnancy				
0-1	21.0 ± 2.6 (12)	21.1 ± 1.9 (12)	19.4 ± 2.7 (12)	18.4 ± 2.9 * (11)
7-8	28.9 ± 3.6 (12)	28.5 ± 3.0 (12)	25.5 ± 3.4 * (12)	23.2 ± 3.2 ** (11)
14-15	28.6 ± 3.4 (12)	26.8 ± 2.8 (12)	26.3 ± 2.0 (12)	24.7 ± 4.3 * (11)
20-21	19.3 ± 3.5 (12)	21.0 ± 2.4 (12)	20.8 ± 4.0 (12)	18.7 ± 2.5 (11)
Days of lactation				
3-4	47.1 ± 6.7 (12)	49.4 ± 4.6 (12)	43.3 ± 4.3 (12)	41.4 ± 8.8 (9)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)
*, Significant difference from control, $p<0.05$ (by multiple comparisons)
**, Significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 9

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Summary of macroscopical findings in males

Compound	Morpholine, 4-ethyl-								
Groups (mg/kg)	0			50			150			500		
Grade		-	+		-	+		-	+		-	+
(Testis)	[13]			[13]			[13]			[13]		
Small, bilateral		12	1		12	1		13	0		12	1
(Epididymis)	[13]			[13]			[13]			[13]		
Enlargement, tail, bilateral		12	1		13	0		13	0		13	0
Small, bilateral		13	0		12	1		13	0		12	1

-, negative +, positive.
[ ], number of animals examined.
No significant macroscopical changes were observed in organs unless otherwise listed above.

Table10

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Summary of macroscopical findings in females

Compound	Morpholine, 4-ethyl-							
Groups (mg/kg)	0		50		150		500	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Dark red	13	0	13	0	13	0	12	1
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Dark red	13	0	13	0	13	0	12	1
(Mammary gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Nodule	13	0	12	1	13	0	13	0

-, negative +, positive.
[ ], number of animals examined.
No significant macroscopical changes were observed in organs unless otherwise listed above.

Table 11

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Organ weight of males; mean±S.D.(N)

Compound		Morpholine, 4-ethyl-							
Dose group (mg/kg)		0 [a]		50		150		500	
Final body weight	(g)	497.0 ± 40.4	(13)	494.0 ± 30.9	(13)	488.0 ± 38.9	(13)	457.5 ± 31.7 *	(13)
Testes	(g)	3.0704 ± 0.4313 [b]	(13)	2.9969 ± 0.6747	(13)	3.1846 ± 0.5103	(13)	3.0067 ± 0.5671	(13)
		0.6197 ± 0.0891 [c]	(13)	0.6099 ± 0.1427	(13)	0.6511 ± 0.0744	(13)	0.6582 ± 0.1234	(13)
Epididymides	(g)	1.1853 ± 0.1337	(13)	1.1381 ± 0.1981	(13)	1.1744 ± 0.1233	(13)	1.0775 ± 0.1678	(13)
		0.2393 ± 0.0287	(13)	0.2315 ± 0.0434	(13)	0.2415 ± 0.0266	(13)	0.2356 ± 0.0341	(13)

a), vehicle control; water for injection (5 mL/kg)
b), absolute weight
c), relative weight (g per 100g body weight)

* , Significant difference from control, $p<0.05$ (by multiple comparisons)

Table12

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Summary of histological findings in males

Compound	Morpholine, 4-ethyl-											
Groups (mg/kg)	0						500					
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.
(Testis)	[13]							[13]						
Atrophy, seminiferous tubule,bilateral		12	0	1	0	0	1		12	0	0	0	1	1
Edema		12	0	1	0	0	1		12	0	1	0	0	1
Hyperplasia, Leydig cell		13	0	0	0	0	0		12	0	1	0	0	1
(Epididymis)	[13]							[13]						
Cell debris, lumen		12	0	1	0	0	1		12	0	0	0	1	1
Granuloma, spermatic, bilateral		12	0	0	1	0	1		13	0	0	0	0	0
Granuloma, spermatic, unilateral		13	0	0	0	0	0		12	0	1	0	0	1

-, negative ±, very slight +, slight ++, moderate +++, severe Pos., total of positive grade.
[ ], number of animals examined.

Table 13

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethylby- oral administration in rats

Summary of histological findings in females

Compound	Morpholine, 4-ethyl-											
Groups (mg/kg)	0						500					
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.
(Ovary)	[13]							[13]						
No abnormalities														
(Heart)								[1]						
Cellular infiltration, lymphocyte									0	1	0	0	0	1
(Lung)								[1]						
Edema									0	0	0	1	0	1
(Liver)								[1]						
No abnormalities														
(Kidney)								[1]						
No abnormalities														
(Spleen)								[1]						
No abnormalities														

-, negative ±, very slight +, sligh ++, moderate +++, severe Pos., total of positive grade.
[ ], number of animals examined.

Table 14

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Summary of estrous cycles

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
Number of females examind	13	13	13	13
Mean length of estrous cycle in days				
Pre-treatment period; Mean ± S.D	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
Treatment period; Mean ± S.D.	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1
Number of animals showing each type of cycle during pre-treatment period				
4-day cycle	13	13	13	13
Changes of estrous cycle after treatment				
Number of animals not changed	13	13	12	12
4-day cycle → 4,5-day cycle	0	0	1	1
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean ± S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (13)	1.1 ± 0.3 (12)	1.0 ± 0.0 (12)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)

Table 15

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Reproductive performance of animals

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	12	12
Copulation index (%)	100.0	100.0	92.3	92.3
Number of pregnant animals	12	12	12	11
Fertility index (%)	92.3	92.3	100.0	91.7
Pairing days until copulation Mean ± S.D. (N)	2.3 ± 1.1 (13)	2.2 ± 1.1 (13)	3.3 ± 1.7 (12)	2.6 ± 1.3 (12)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)
Copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs)×100, %
Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs)×100, %

Table 16

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Development of pups up to day 4 of lactation; mean ± S.D. (N)

Compound	Morpholine, 4-ethyl-			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	50	150	500
Number of pregnant females	12	12	12	11
Number of pregnant females with live pups	12	12	12	10
Gestation index	100.0	100.0	100.0	90.9
Gestation length in days	22.7 ± 0.5 (12)	22.3 ± 0.7 (12)	22.3 ± 0.5 (12)	22.8 ± 0.6 (11)
Number of corpora lutea	16.2 ± 2.0 (12)	16.9 ± 1.8 (12)	15.7 ± 1.9 (12)	16.0 ± 3.0 (11)
Number of implantation sites	15.6 ± 2.6 (12)	16.1 ± 1.7 (12)	14.8 ± 1.8 (12)	13.1 ± 4.7 (11)
Implantation index	95.9 ± 7.4 (12)	95.2 ± 4.9 (12)	94.9 ± 6.1 (12)	80.6 ± 26.6 (11)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	14.2 ± 2.8 (12)	15.1 ± 1.2 (12)	13.8 ± 1.6 (12)	11.4 ± 4.9 (11)
Delivery index	90.6 ± 9.3 (12)	94.1 ± 6.0 (12)	93.1 ± 7.7 (12)	84.6 ± 15.8 (11)
Number of live pups	13.7 ± 2.9 (12)	15.0 ± 1.3 (12)	13.7 ± 1.7 (12)	10.0 ± 5.4 (11)
Birth index	87.4 ± 9.7 (12)	93.6 ± 5.7 (12)	92.5 ± 8.0 (12)	71.2 ± 32.7 (11)
Live birth index	96.5 ± 5.6 (12)	99.4 ± 1.9 (12)	99.4 ± 2.2 (12)	83.5 ± 35.6 (11)
Sex ratio on day 0	52.4 ± 13.2 (12)	47.9 ± 8.0 (12)	48.9 ± 12.6 (12)	54.2 ± 26.3 (10)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	13.6 ± 2.8 (12)	15.0 ± 1.3 (12)	13.5 ± 1.7 (12)	11.6 ± 3.9 (9)
Viability index	99.5 ± 1.7 (12)	100.0 ± 0.0 (12)	98.8 ± 2.8 (12)	98.1 ± 3.8 (9)
Sex ratio on day 4	52.6 ± 13.1 (12)	47.9 ± 8.0 (12)	49.5 ± 12.6 (12)	58.5 ± 25.9 (9)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)
Gestation index = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females) × 100, %
Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) × 100, %
Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) × 100, %
Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites) × 100, %
Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) × 100, %
Sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0) × 100, %
Viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) × 100, %
Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4) × 100, %

Table 17

Preliminary reproduction toxicity screening test of morpholine, 4-ethyl- by oral administration in rats

Body weight of pups up to day 4 of lactation; mean ± S.D. (N)

Compound	Morpholine, 4-ethyl-							
Dose group (mg/kg)	0 [a)]		50		150		500	
Day 0 of lactation								
Number of live pups								
Male	7.3 ± 2.3	(12)	7.2 ± 1.3	(12)	6.8 ± 2.2	(12)	5.2 ± 3.4	(11)
Female	6.4 ± 2.0	(12)	7.8 ± 1.5	(12)	6.9 ± 1.7	(12)	4.8 ± 3.6	(11)
Weight of pups (g)								
Male	7.2 ± 0.6	(12)	6.7 ± 0.5	(12)	7.0 ± 0.6	(12)	7.0 ± 0.7	(10)
Female	6.8 ± 0.6	(12)	6.2 ± 0.5	(12)	6.6 ± 0.5	(12)	6.5 ± 0.6	(9)
Day 4 of lactation								
Number of live pups								
Male	7.3 ± 2.3	(12)	7.2 ± 1.3	(12)	6.8 ± 2.2	(12)	6.2 ± 2.7	(9)
Female	6.3 ± 1.9	(12)	7.8 ± 1.5	(12)	6.8 ± 1.7	(12)	5.3 ± 3.5	(9)
Weight of pups (g)								
Male	11.4 ± 1.4	(12)	10.4 ± 0.9	(12)	10.9 ± 0.9	(12)	11.9 ± 1.9	(9)
Female	11.0 ± 1.3	(12)	9.8 ± 1.0	(12)	10.4 ± 1.0	(12)	10.8 ± 1.4	(8)

a), Vehicle control (water for injection, 5 mL/kg)