

食薬セ研第12-1894号

2002年9月6日

2-(1-メチルエトキシ)エタノールのラットを用いる
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

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

【目 次】

	頁
要約	1
緒言	2
方法	3
1. 被験物質	3
2. 使用動物および飼育方法	3
3. 投与検体の調製	4
4. 投与量および投与方法	4
5. 観察および検査	5
6. データ解析法	7
結果	8
1. 親動物	8
2. 生殖能力	9
3. 出生児	9
考察	11
文献	14

Figures 1～4

Tables 1～18

【要 約】

Sprague-Dawley系[Crj:CD(SD)IGS,SPF]雌雄ラットの交配前2週間および交配期間ならびに雄では交配終了後剖検前日まで、雌では妊娠期間を通して哺育3日まで、2-(1-メチルエトキシ)エタノール（以下 MEE と略記）の 0、8、30 および 125 mg/kg を経口投与し、雌雄ラット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

いずれの投与群においても死亡動物はみられなかった。雄の 125 mg/kg 投与群および雌の 30 mg/kg 以上の投与群において、初回投与後に赤色尿が観察された。

体重および摂餌量には MEE 投与の影響はみられなかった。

剖検所見および病理組織学的検査では、被験物質の投与によると考えられる異常は認められなかったが、雌雄ともに125 mg/kg 投与群の脾臓重量が増加した。

2. 生殖能力所見

性周期、交尾および受胎能力、妊娠期間、分娩ならびに哺育状態に MEE の投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

3. 出生児所見

出生児の生存性および体重には、MEE 投与の影響は認められなかった。

4. 無毒性量

以上の成績から、本試験条件下における 2-(1-メチルエトキシ)エタノールの親動物に対する無作用量は、雄の 125 mg/kg 投与群および雌の 30 mg/kg 投与群において赤色尿が認められたことから雄に対しては 30 mg/kg/day、雌に対しては 8 mg/kg/day、親動物の生殖能力および出生児に対する無作用量は、ともに 125 mg/kgまでの投与で何ら異常が認められなかったことから、いずれも 125 mg/kg/day と判断された。

【緒 言】

OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、2-(1-メチルエトキシ)エタノールの安全性確認の資料を得るために、ラットを用いる簡易生殖毒性試験を実施し雌雄動物の生殖能力に及ぼす影響について検討したので、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「4 2 1 / 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日採択）および「化学物質GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号、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。

【方 法】

1. 被験物質

2-(1-メチルエトキシ)エタノール（以下 MEE と略記）の性状は下記のとおりである。

化学名	2- (1-メチルエトキシ) エタノール
別名	エチレングリコールイソプロピルエーテル
英名	Ethanol, 2-(1-Methylethoxy)-
CAS No.	109-59-1
分子量	104.15
物理化学的性状	性状：透明液体 融点：-60℃ 沸点：142.5℃ 蒸気圧（25℃）：0.347 kPa 溶解性：水 20℃で完全溶解 アセトン 常温で完全溶解
構造式	$(\text{CH}_3)_2\text{CHOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

本試験には、より提供された MEE（ロット番号：純度：99.5 wt%以上、不純物 水分 0.1%以下）を用いた。被験物質は受領後、使用時まで被験物質受領保管室において室温で保管した。試験終了後に返却した被験物質について、提供者が再度品質試験を実施した結果、試験期間中の安定性が確認された（Appendix D）。

2. 使用動物および飼育方法

試験には、Sprague-Dawley系[Crj:CD(SD)IGS、SPF]雌雄ラットを日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて入荷後14日間、予備飼育した。予備飼育中、動物の一般状態の異常は認められなかった。なお雌は予備飼育中に毎日膣スメアを採取し、観察期間中に2回以上、性周期が回帰している動物を選出した。試験には雌雄各52匹を用い、検疫終了時の測定体重をもとに体重別層化無作為抽出法により1群13匹からなる4群に分けた。群分け後、すべての雌雄は、油性フェルトペンにより尾に個体識別番号を示す番号を記入した。また、各飼育ケージには、群ごとに色彩の異なるカードに試験計画番号および個体識別番号を記入して掛け個体識別の補助とした。出生児の個体識別は行わなかった。投与開始時週齢は、雌雄ともに9週齢であった（注）。

(注)	動物入荷日	: 2001年9月17日
	入荷匹数	: 雄57匹、雌73匹
	入荷時体重	: 雄 196.4~230.9g、雌 154.1~181.1g
	投与開始日	: 2001年10月2日
	投与開始時体重	: 雄 327.3~410.4g、雌 183.5~252.9g

動物は、照明12時間（7時～19時点灯）、換気回数約15回/時、許容温度21.0～25.0℃、許容湿度40～75％に制御された飼育室で、金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ（交配時は2匹／ケージ）収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。ただし、交尾が確認された雌については、妊娠14日から哺育4日まで、紙パルプ製チップ（ペパークリーン、日本エスエルシー株式会社）を入れたプラスチック製ラット用繁殖ケージ（350w×400d×180h mm）に収容した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ温度21.0～24.5℃、湿度54～75％であった。また、供給した飼料、水道水および紙パルプ製チップには、試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかった。

3. 投与検体の調製

MEE は水に可溶であることから、媒体には日局注射用水（製造番号：9912ST、光製薬株式会社）を選択した。投与検体は、必要量の MEE を秤量し、媒体で溶解した後、段階希釈して調製した。調製した検体は冷蔵下で暗所に保存し、調製後1週間以内に使用した。

投与検体の安定性については、先に秦野研究所で実施した急性経口投与毒性試験（試験計画書番号：A-00-060）において、被験物質の 0.05 および 40.0w/v％の調製検体の冷蔵下での8日間の安定性が確認されている（Appendix A）。

初回調製した各濃度の検体について、被験物質の含量測定を実施した結果、投与検体には所定濃度の MEE が含有されていることが確認された（Appendix B）。均一性試験は、投与検体が溶液であることから実施しなかった。なお、調製検体中の被験物質の濃度の測定は、各調製検体を1mLずつ採取し、メタノールで一定量とした後メタノールで適宜希釈し、ガスクロマトグラフ(GC)法により測定し、同時に作成する検量線を用いて濃度を求めた（Appendix C）。

4. 投与量および投与方法

投与経路は、OECD化学物質試験法ガイドラインによりラット用胃管による強制経口投与とした。投与量は、本試験における投与量を設定する目的で実施した MEE のラットを用いる経口投与簡易生殖毒性予備試験（以下、予備試験と略記）（試験計画番号:R-00-016）

の結果をもとに設定した。予備試験では、雄に、MEEの 125、250 あるいは 500 mg/kg を 11週齢時から14日間、雌では、62.5、125 あるいは 250 mg/kg を妊娠期間を通して周産期(哺育3日)まで投与した。その結果、雄の 250 mg/kg 以上の投与群の全例および 125 mg/kg 投与群の1例では赤色尿が認められ、雌においても 125 mg/kg 以上の投与群の全例および 62.5 mg/kg 投与群の1例に赤色尿が認められた。赤色尿は、MEE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-00-008)においても 500 mg/kg の投与で観察され、第1回投与後に実施した尿検査において強い潜血反応がみられるとともに、投与期間終了時の血液学検査では赤血球数、ヘモグロビン濃度ならびにヘマトクリット値の低下がみられ、被験物質により溶血が起きていると判断された。以上の結果から、本試験の投与量は最高用量を雄の1例および雌の全例に赤色尿が観察された125 mg/kg とし、以下公比約4で除して30および 8 mg/kg を中用量および低用量に設定した。対照群には、MEE の媒体に用いた注射用水を投与した。

投与期間は、雄に対しては交配前2週間、交配期間(最長2週間)を通して剖検前日まで(総投与回数48回)、雌に対しては交配前2週間および交配期間(最長2週間)、さらに交尾した雌では妊娠期間を通して哺育3日(分娩日=哺育0日)まで(投与回数41~47回)、交尾は認められたものの、分娩のみられなかった雌は妊娠25日相当日まで(投与回数43~44回)とし、1日1回、9時から12時の間に投与した。投与容量は体重 1 kg 当たり 5 mL とし雄および交配前、交配期間中の雌では、週1回測定する体重を基に、交尾確認後の雌では、最新の測定日の体重を基に算出した。

各群の投与量、投与容量、調製濃度および動物番号は次の通りである。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (w/v%)	動物番号	
					雄	雌
1	注射用水	0	5	0	MX01001~013	FB01001~013
2	MEE	8	5	0.16	MX02001~013	FB02001~013
3	MEE	30	5	0.6	MX03001~013	FB03001~013
4	MEE	125	5	2.5	MX04001~013	FB04001~013

5. 観察および検査

1) 親動物

(1) 一般状態

飼育期間中、毎日1回以上観察した。

(2) 体重測定

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。

(3) 摂餌量測定

投与期間中（交配期間を除く）週1回、体重測定日と同じ日に給餌量を測定し、その翌日に残餌量を測定し、1日の摂餌量を算出した。なお、投与15日は交配の開始日であるため前日からの摂餌量を算出した。交尾が確認された雌では妊娠0、7、14および20日、分娩した雌では哺育3日の翌日までの摂餌量を測定した。

(4) 性周期

予備飼育期間中に引き続いて投与開始日以降も、毎日、膣スミアを採取して、性周期を観察した。なお、膣スミア採取は交尾成立日まで継続して行った。

(5) 交配

交配は、投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄について1対1の連続同居方式で行った。交尾の確認は、膣スミア中の精子の存在あるいは膣栓の確認により行い、交尾が確認された雌については、その日を妊娠0日として起算するとともに、雄から分離して個別に飼育した。交配の結果および妊娠の成否により、各投与群における交尾率〔(交尾確認動物数/交配動物数)×100〕、受胎率〔(妊娠動物数/交尾確認動物数)×100〕、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行い、分娩状態を直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩障害の有無を判断して記録した。分娩の確認は、午前9時から11時の間に行い、分娩が完了していることを確認した動物については、その日を分娩日(哺育0日)として妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を算出した。分娩後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48日の翌日に、致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、脾臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、脾臓、前立腺腹葉および凝固腺を含む精嚢は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に、精巣および精巣上体はブアン液に固定し、高用量群および対照群について精巣および精巣上体の病理組織学検査を実施した。

雌動物のうち、分娩した雌は哺育4日に、交尾はしたが分娩しなかった雌は妊娠26日相当日にそれぞれ致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、脾臓、卵巣および子宮を摘出し、脾臓については重量を測定した。また、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) $\times 100$] を算出した。また、脾臓、卵巣、子宮および膣は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定し、卵巣については高用量群および対照群について病理組織学検査を実施した。また、雌雄とも、剖検時に異常の認められた器官についても0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定し、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日に産児数(生存児＋死亡児)を調べ、性比 [(雄の生児数／生児数) $\times 100$]、分娩率 [(産児数／着床痕数) $\times 100$]、生児出産率 [(出產生児数／着床痕数) $\times 100$] ならびに出産率 [(生児出産雌数／妊娠動物数) $\times 100$] を求めた。生存児は外表奇形の有無を検査した。

哺育0日以降は死亡児数を毎日調べ、出生率 [(出產生児数／総産児数) $\times 100$] および新生児生存率 [(哺育4日の生児数／哺育0日の生児数) $\times 100$] を求めた。観察可能な死亡児は剖検し、0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定した。

(2) 体重

哺育0および4日に個体別に測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出した。

(3) 剖検

出生児は哺育4日に剖検し、外表および内部器官の異常の有無を観察した。

6. データ解析法

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率および出生児の形態異常出現頻度についてはFisher の直接確率検定を行った。病理組織学所見については、グレード分けしたデータは Mann-Whitney のU検定を用い、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 MEE 投与群の間の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各腹ごとの平均値を1標本として、先ず Bartlett 法により各群の分散の一樣性について検定を行った。分散が一樣である場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が0となる場合および分散が一樣でない場合には、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合には、順位化した値を用いて Dunnett 法により多重比較を行った。有意水準は5%とした。

【結 果】

1. 親動物

1) 一般状態 (Tables 1, 2; Appendices 1-1~2-4)

雌雄ともに死亡動物はみられなかった。

一般状態の変化として、初回投与日の投与後約4時間後から赤色尿が観察され、翌朝の投与前までに 125 mg/kg 投与群の雄の7例、雌の全例および 30 mg/kg 投与群の雌の1例に観察されたが、投与2日以降に血尿は観察されなかった。この他に、8 mg/kg 投与群の雌の1例に両前肢の脱毛が観察された。

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

雌雄ともに体重推移に MEE 各投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Fig.3、4; Table 7,8 ; Appendices 7-1~8-4)

125 mg/kg 投与群の雄の投与1~2日摂餌量が対照群と比較して有意($p<0.05$)な低値を示したが、雌では差は認められなかった。雌雄ともに 30 mg/kg 以下の MEE 各投与群では、対照群との間に有意差は認められなかった。

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

雄では脾臓の腫大が 125 mg/kg 投与群の2例に観察されたほか、30 mg/kg 投与群の4例に精巣の両側性の小型化が認められ、そのうちの2例では精巣上体に両側性の小型化が認められた。

雌では、30 mg/kg 投与群において腺胃粘膜に限局的な肥厚あるいは右肺に黒色斑が各1例、8 mg/kg 投与群の1例に局所的な脱毛が観察された。

5) 器官重量 (Table 11、12 ; Appendices 11-1~12-4)

精巣および精巣上体の重量には、対照群とMEE各投与群との間に有意差は認められなかった。脾臓重量の実重量および比体重値は、雌雄ともに 125 mg/kg 投与群において対照群と比較して有意($p<0.01$)に増加したが、30 mg/kg 以下の投与群と対照群の間に差は認められなかった。

6) 病理組織所見 (Table 13、14 ; Appendices 13-1~14-4)

雄では、125 mg/kg 投与群の3例および対照群の1例において、両側の精巣に限局性に萎縮した精細管が観察され、125 mg/kg 投与群の2例では精細管内に多核巨細胞が認められた。精巣上体では、萎縮した精細管が観察された例の管腔内に細胞残屑がみられたほか、125 mg/kg 投与群の1例の片側に精子肉芽腫が認められた。

剖検時に脾臓の腫大が観察された125 mg/kg 投与群の2例の脾臓では、髄外造血および褐色色素の沈着が認められたが、その程度は軽度あるいは中等度であった。また、剖検時に精巣の小型化が観察された 30 mg/kg 投与群の4例では、両側の精巣に限局性に萎縮した精細管が観察され、そのうち2例では萎縮した精細管の数が他の例に比較して多く、精細管内に多核巨細胞も認められた。さらに、精巣上体の小型化が認められた2例の精巣上体では、管腔内に細胞残屑がみられ、相手雌が不妊だった1例では管腔内に精子がほとんど存在せず、細胞残屑のみが観察された。

雌では、125 mg/kg 投与群および対照群の卵巣に異常は認められなかった。また、剖検時に病変が認められた胃および肺ならびに皮膚の脱毛部に組織学的な異常所見は認められなかった。

2. 生殖能力

1) 性周期および交配成績 (Table 15、16 ; Appendices 15-1~16-4)

性周期には MEE 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。交配の結果、交尾率および受胎率には MEE 投与の影響は認められなかった。また、交尾までの日数およびその間の発情回数にも、対照群と MEE 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 17 ; Appendices 17-1~17-4)

妊娠期間は、125 mg/kg 投与群が対照群と比較して有意($p<0.05$)に延長したが、全ての動物が妊娠22または23日に分娩していることから偶発的なものと判断した。

出産率には MEE 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 17 ; Appendices 17-1~17-4)

黄体数、着床数および着床率に MEE 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

4) 分娩および哺育状態

対照群を含む全ての投与群において、分娩および哺育状態の異常は観察されなかった。

3. 出生児

1) 生存性 (Table 17 ; Appendices 17-1~17-4)

出生率、産児数、分娩率、出生児数、生児出産率、哺育4日の生児数、新生児生存率および性比には、対照群と MEE 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 体重 (Tables 18 ; Appendices 18-1~18-4)

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

3) 出生児観察

哺育0日における生存児に外形異常は観察されなかった。

8および30 mg/kg 投与群において矮小児が各1例（母動物番号:FB02008、FB03007）認められたが、いずれも哺育4日まで生存し、剖検においても異常は認められなかった。

30 mg/kg 投与群において死亡児が散見（母動物番号:FB03001 雌1匹、FB03002 雌1匹、FB03008 雄2匹）され、1例（母動物番号:FB03008）では短尾が観察されたが、125 mg/kg 投与群の生存児の観察では同様の異常は認められないこと、また、予備試験において実施した 250 mg/kg までの MEE 投与において異常児は認められていないことから、自然発生的な異常と判断された。その他の死亡児についておこなった剖検では異常は認められなかった。

【考 察】

MEE の8、30 および 125 mg/kg を Sprague-Dawley 系ラットに雄には48日間、雌には交配前2週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育3日まで経口投与し、MEE の生殖毒性について検討した。

その結果、雌雄ともに、一般状態の変化として雄の 125 mg/kg 投与群、雌の 30 mg/kg 以上の投与群において、初回投与後約 4 時間後から翌朝にかけて赤色尿が観察された。赤色尿は本試験における投与量を設定する目的で実施した予備試験の雄の 125 mg/kg 以上の投与群、雌の 62.5 mg/kg 以上の投与群でも観察され、「2-(1-メチルエトキシ)エタノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験」¹⁾の 500 mg/kg 投与群においても認められている。反復投与毒性試験の初回投与後に行われた尿検査では潜血反応がみられ、投与期間終了時の血液学検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低下がみられている。また、血尿は本被験物質のラットにおける吸入曝露による毒性試験においても認められており被験物質の投与による影響と考えられる²⁾。反復投与毒性試験の血液学検査において投与期間終了時には、用量依存的に赤血球数、血色素濃度ならびに平均赤血球血色素濃度の低下等の貧血状態が認められ、網状赤血球比率の増加が認められている。さらに、投与期間終了時の解剖において脾臓ではヘモジデリンの沈着が認められ、肝臓や脾臓などでは髄外造血が起こっていた。5 種のエチレングリコールのモノアルキルエーテルの溶血作用について検討した Werner らの報告によれば³⁾、ブチルエーテルやノルマルプロピルエーテルとならんで、本試験の被験物質である MEE (エチレングリコールイソプロピルエーテル) では、赤血球数ならびにヘモグロビン濃度の低下が最初の観察時期である投与 1 週間目には著明に認められており、その時期に合わせて網状赤血球の増加がみられる。さらに、エチレングリコールモノブチルエーテルにおいても溶血性貧血が認められており^{4,5)}、この物質においてはその酸化代謝物であるエチレングリコールモノブチルエーテルに溶血作用の主体があることが、in vivo あるいは in vitro 的手法によって明らかになっている⁶⁻⁹⁾。Miller らによれば、本被験物質の主要な排泄は尿中に起こり、尿中代謝物は主にイソプロポキシアセテートならびにそのグリシン抱合体であることがあきらかになっていることから¹⁰⁾、本試験の被験物質である MEE が酸化による代謝をうけ、他のエチレングリコールモノアルキルエーテルと同様の機序で溶血性貧血を起こし、血色素尿を示した可能性が高い。

雌雄ともに 125 mg/kg の MEE 投与により脾臓の重量が増加し、雄の剖検では脾臓の腫大も観察され、病理検査では髄外造血および褐色色素の沈着が認められた。溶血性疾患では脾臓重量の増加や髄外造血が認められることが知られている。本試験において観察された脾臓重量の増加や髄外造血も MEE の投与による溶血が原因と考えられる。

本試験においては、雌の性周期、雌雄の交尾、受胎能および妊娠期間に MEE 投与の影響を示唆する変化は認められず、また、出生児の生存性、体重ならびに形態観察においても、MEE 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

本被験物質の構造類似物であるエチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテルアセテート、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート、ジエチレングリコールジメチルエーテルならびにジエチレングリコールモノエチルエーテルにおいては精巣毒性あるいは不妊といった生殖毒性が引き起こされることがすでに報告されており¹¹⁾、CD-1マウスで連続交配試験を実施した結果、エチレングリコールモノブチルエーテルやエチレングリコールモノフェニルエーテルにおいても妊娠率の低下がみられ、エチレングリコールモノブチルエーテルでは高用量群で1腹児数の低下が認められている¹²⁾。一方、精巣重量の低下はエチレングリコールやプロピレングリコール、プロピレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテルでは認められないことも知られている^{13, 14)}。長野らによるマウスでの検討によれば、エチレングリコールモノアルキルエーテルの精巣毒性はアルキル基の種類によって異なり、分子量が大きくなるほど弱くなった¹⁵⁾。この精巣重量の低下は精子形成障害によるものであり、この精子形成障害はパキーン期精母細胞に最も強く起こることが明かになっている¹⁶⁾。長野らによれば、この精子形成障害は細胞分裂に対する障害によるものと推定されているほか¹⁵⁾、エチレングリコールモノメチルエーテルによる精巣毒性が、カルシウムブロッカーであるベラパミルによって軽減するとする報告や¹⁷⁾、エチレングリコールモノメチルエーテルを投与された動物の精巣中の亜鉛量が減少するとした報告等が認められる¹⁸⁾。

ラットにおいてピラゾールにより代謝阻害を起こさせた状況では、エチレングリコールモノメチルエーテルによる精巣毒性が減弱することが明らかになっており、精巣毒性はその主要尿中代謝物であるエチレングリコールモノメチルエーテルアセテートによるものであることが示唆されている¹⁹⁾。エチレングリコールモノメチルエーテルアセテート、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートならびにエチレングリコールモノブチルエーテルアセテートを用いたin vitroの検討でも、これらの物質によるパキーン期精母細胞の直接の障害性ならびに分子量による毒性の差が再現されている²⁰⁾。前述の通り、本被験物質の主要な尿中代謝物はエチレングリコールイソプロピルエーテルアセテートならびにそのグリシン抱合体であることから¹⁰⁾、本被験物質がエチレングリコールモノエチルエーテルの水素1個がメチル基に置換されたものであることを考えると、本被験物質が精巣毒性を示す可能性は充分あると考えられた。

本被験物質については、これらの情報から、予備試験において雄ラットに 125、250 および 500 mg/kg を2週間にわたって投与し、精巣の病理組織学的検査を実施したが、異常は認められていない。また、本試験においても 125 mg/kg までの投与量では、交配成績、生殖器ならびに副生殖器についての病理学的検査を実施したが、いずれも異常を認めなかった。以上の結果から、MEEにおいては生殖毒性は認められないものと判断した。

一方、エチレングリコールモノメチルエーテルには、精巣毒性とともに胎児毒性があることが知られており、長野らはICR系マウスにおいて妊娠7日から14日に投与するとき²¹⁾、

生存胎児数の減少、外脳症ならびに四肢奇形、肋骨ならびに中軸骨格系の異常、化骨の遅延を認めたことを報告している。また、エチレングリコールモノメチルエーテルやエチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテルやその主な代謝物であるエチレングリコールモノエチルエーテルアセテートなどにおいては、催奇形性が認められ¹¹⁾、さらに、胎齢9.5日からの全胚培養法を用い、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテルならびにエチレングリコールモノブチルエーテルおよびエチレングリコールモノメチルエーテルアセテート、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートならびにエチレングリコールモノブチルエーテルアセテートの6化合物について行なわれた検討では²²⁾、アセテート化合物の胎児毒性はエーテル化合物のそれよりも強く、また鎖が長くなるほど弱くなることが、明らかになっている。

本被験物質の予備試験において妊娠ラットにMEEの62.5、125 あるいは 250 mg/kg を妊娠期間を通して投与し、出産させて分娩ならびに、児の観察を行なっているが、異常は発見されていない。また、本試験においてMEEの8、30ならびに125 mg/kg投与群のいずれにも、発生毒性はみられていない。

以上の結果から、本試験条件下における2-(1-メチルエトキシ)エタノールの親動物に対する無作用量は雄に対しては 30 mg/kg/day、雌に対しては 8 mg/kg/day、ただし親動物の生殖能力に対する無作用量は 125 mg/kg/day と考えられ、出生児に対する無作用量は 125 mg/kg/day と考えられた。

【文 献】

- 1) 高島宏昌, 佐藤昌子, 渡辺千朗他: 2-(1-メチルエトキシ) エタノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (回復 14 日間)
- 2) Arts, J.H.E., Reuzel, P.G.J., Woutersen, R.A., et al.: Repeated-dose (28-day) inhalation toxicity of isopropylethylene glycol ether in rats. *Inhalation Toxicology* 4: 43-55 (1992)
- 3) Werner, H.W., Nawrocki, C.Z., Mitchell, J.L., et al.: Effect of repeated exposures of rats to vapors of monoalkyl ethylene glycol ethers. *Journal of Industrial Hygienics and Toxicology*. 25: 374-379 (1943)
- 4) Carpenter, C.P., Pozzani, U.C., Weil, C.S., et al.: The toxicity of butyl cellosolve solvent. *Archives of Industrial Health*. 14: 114-131 (1956)
- 5) Ghanayem, B.I., Ward, S.M., Blair, P.C., et al.: Comparison of the hematologic effects of 2-butoxyethanol using two types of hematology analyzers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 106: 341-345 (1990)
- 6) Bartnik, F.G., Reddy, A.K., Klecak, G., et al.: Percutaneous absorption, metabolism, and hemolytic activity of n-butoxyethanol. *Fundamental and Applied Toxicology* 8: 59-70 (1987)
- 7) Ghanayem, B.I.: Metabolic and cellular basis of 2-butoxyethanol-induced hemolytic anemia in rats and assessment of human risk in vitro. *Biochemical Pharmacology* 38: 1679-1684 (1989)
- 8) Ghanayem, B.I., Burka, L.T., Matthews, H.B.: Metabolic basis of ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol) toxicity: Role of alcohol and aldehyde dehydrogenases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 242: 222-231 (1987)
- 9) Ghanayem, B.I., Burka, L.T., Matthews, H.B.: Structure-activity relationships for the in vitro hematotoxicity of N-alkoxyacetic acids, The toxic metabolites of glycol ethers. *Chem-Biol. Interactions* 70: 339-352 (1989)

- 10) Miller, R.R.: Metabolism and disposition of glycol ethers. *Drug Metabolism Reviews*. 18: 1-22 (1987)
- 11) Hardin, B.D.: Reproductive toxicity of the glycol ethers. *Toxicology*. 27: 91-102 (1983)
- 12) Morrissey, R.E., Lamb IV, J.C., Morris, R.W., et al.: Results and evaluations of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*. 13: 747-777 (1989)
- 13) Morris, H.J., Nelson, A.A., Calvery, H.O.: Observations on the chronic toxicities of propylene glycol, ethylene glycol, diethylene glycol, ethylene glycol mono-ethyl-ether, and diethylene glycol mono-ethyl-ether. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*. 74: 880-885 (1941)
- 14) Miller, R.R., Ayres, J.A., Calhoun, L.L., et al.: Comparative short-term inhalation toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 61: 368-377 (1981)
- 15) 長野嘉介, 中山栄基, 小谷野道子ら.: エチレングリコールモノアルキルエーテル類によるマウス精巣の萎縮. *産業医学*. 21: 29-35 (1979)
- 16) Anderson, D., Brinkworth, M.H., Jenkinson, P.C., et al.: Effect of ethylene glycol monomethyl ether on spermatogenesis, dominant lethality, and F1 abnormalities in the rat and the mouse after treatment of F0 males. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 7: 141-158 (1987)
- 17) Ghanayem, B.I., Chapin, R.E.: Calcium channel blockers protect against ethylene glycol monomethyl ether (2-methoxyethanol)-induced testicular toxicity. *Experimental and Molecular Pathology*. 52: 279-290 (1990)
- 18) Foster, P.M.D., Creasy, D.M., Foster, J.R., et al.: Testicular toxicity of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 69: 385-399 (1983)
- 19) Moss, E.J., Thomas, L.V., Cook, M.W., et al.: The role of metabolism in 2-

methoxyethanol-induced testicular toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 79: 480-489 (1985)

- 20) Foster, P.M.D., Lloyd, S.C., Blackburn, D.M.: Comparison of the in vivo and in vitro testicular effects produced by methoxy-, ethoxy- and N-butoxy acetic acids in the rat. *Toxicology*. 43: 17-30 (1987)
- 21) Nagano, K., Nakayama, E., Oobayashi, H., et al.: Embryotoxic effects of ethylene glycol monomethyl ether in mice. *Toxicology*. 20: 335-343 (1981)
- 22) Giavini, E., Broccia, M.L., Menegola, E., et al.: Comparative in vitro study of the embryotoxic effects of three glycol ethers and their metabolites, the alkoxyacids. *Toxicology in Vitro*. 7: 777-784 (1993)

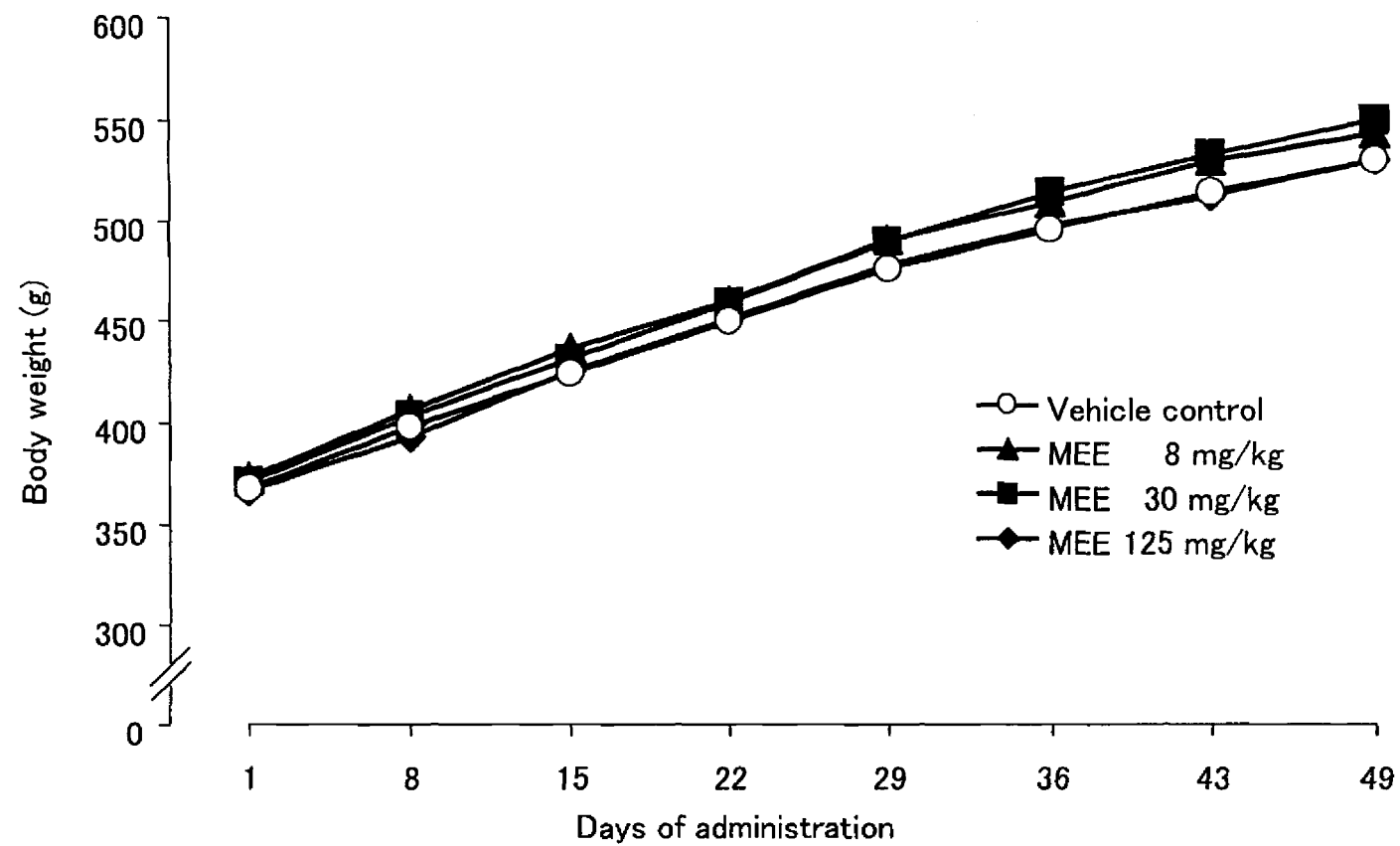


Fig.1 Body weight of males

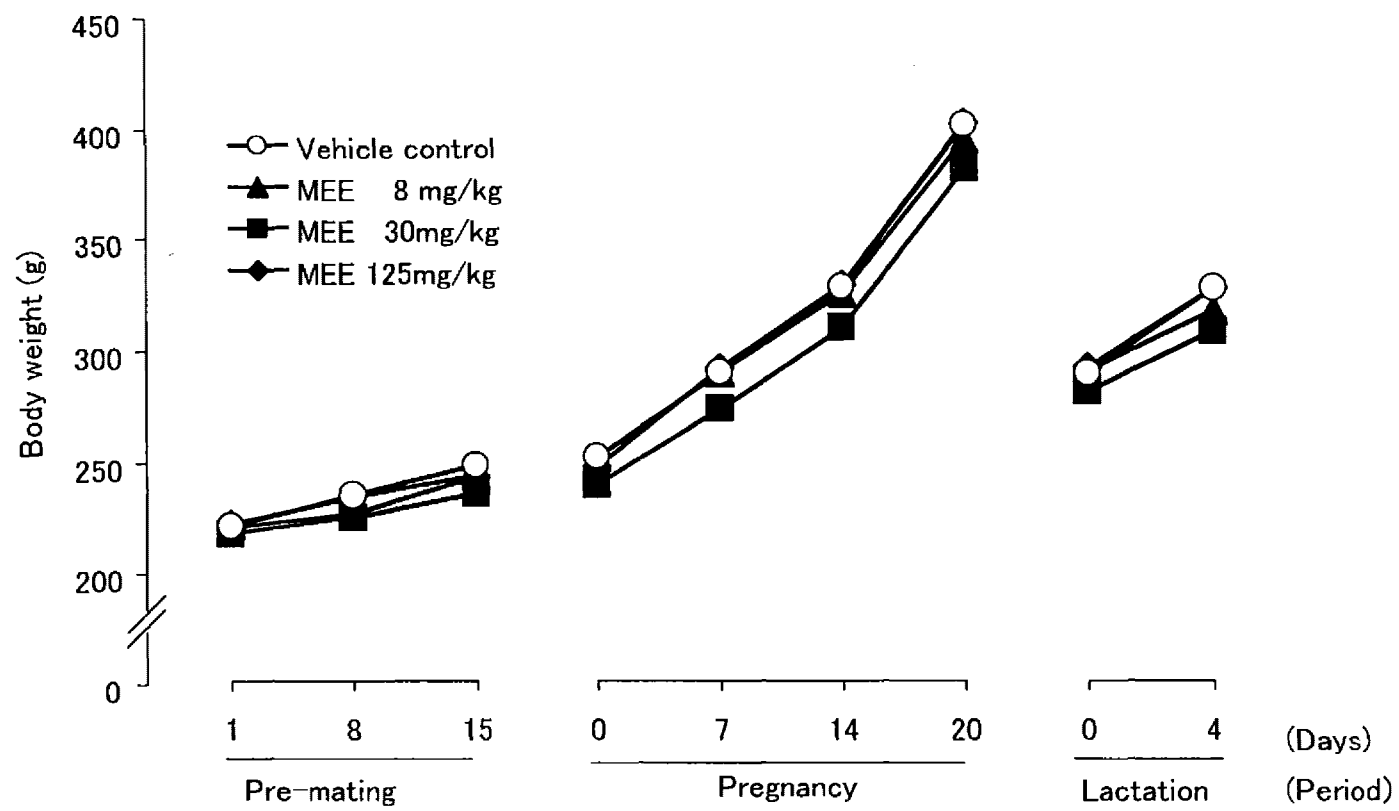


Fig.2 Body weight of females

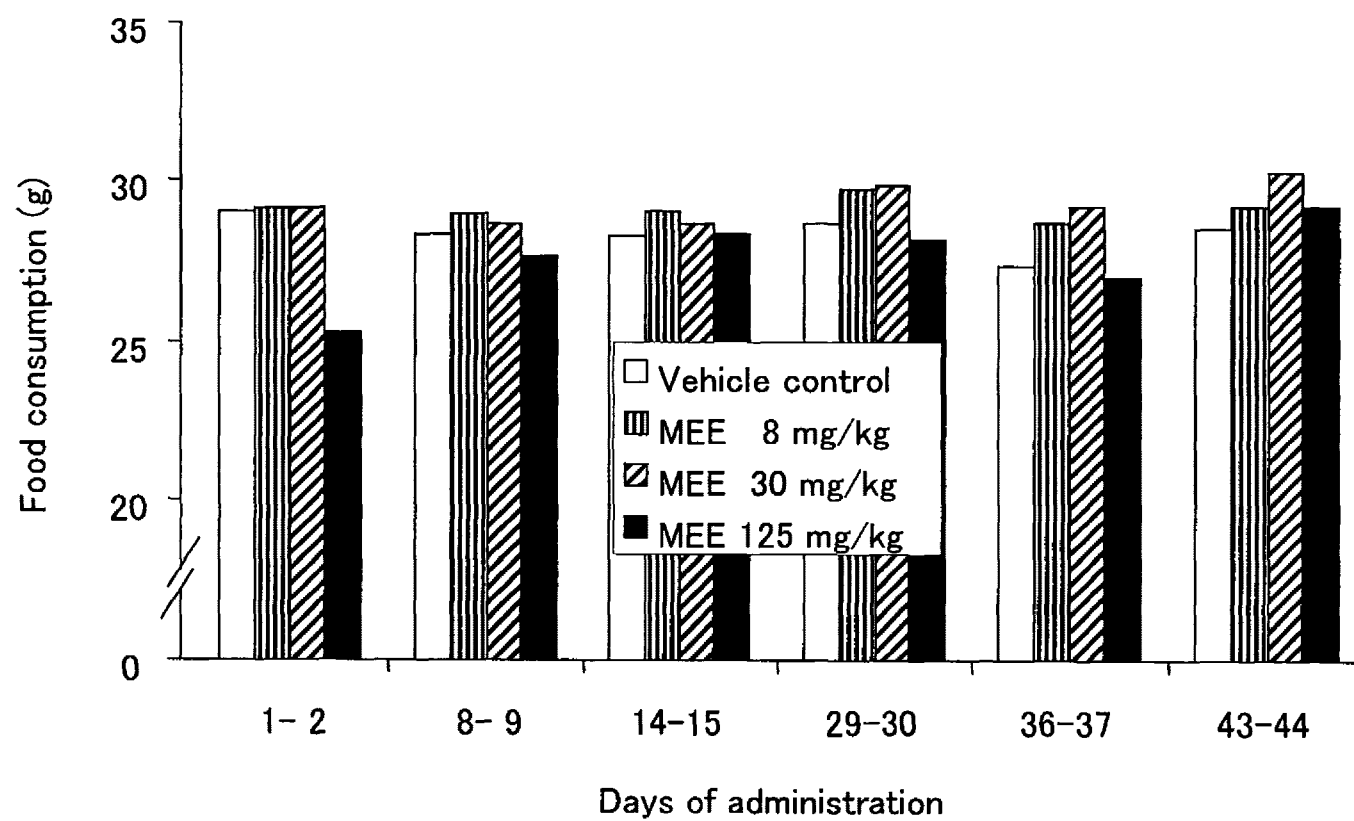


Fig.3 Food consumption of males

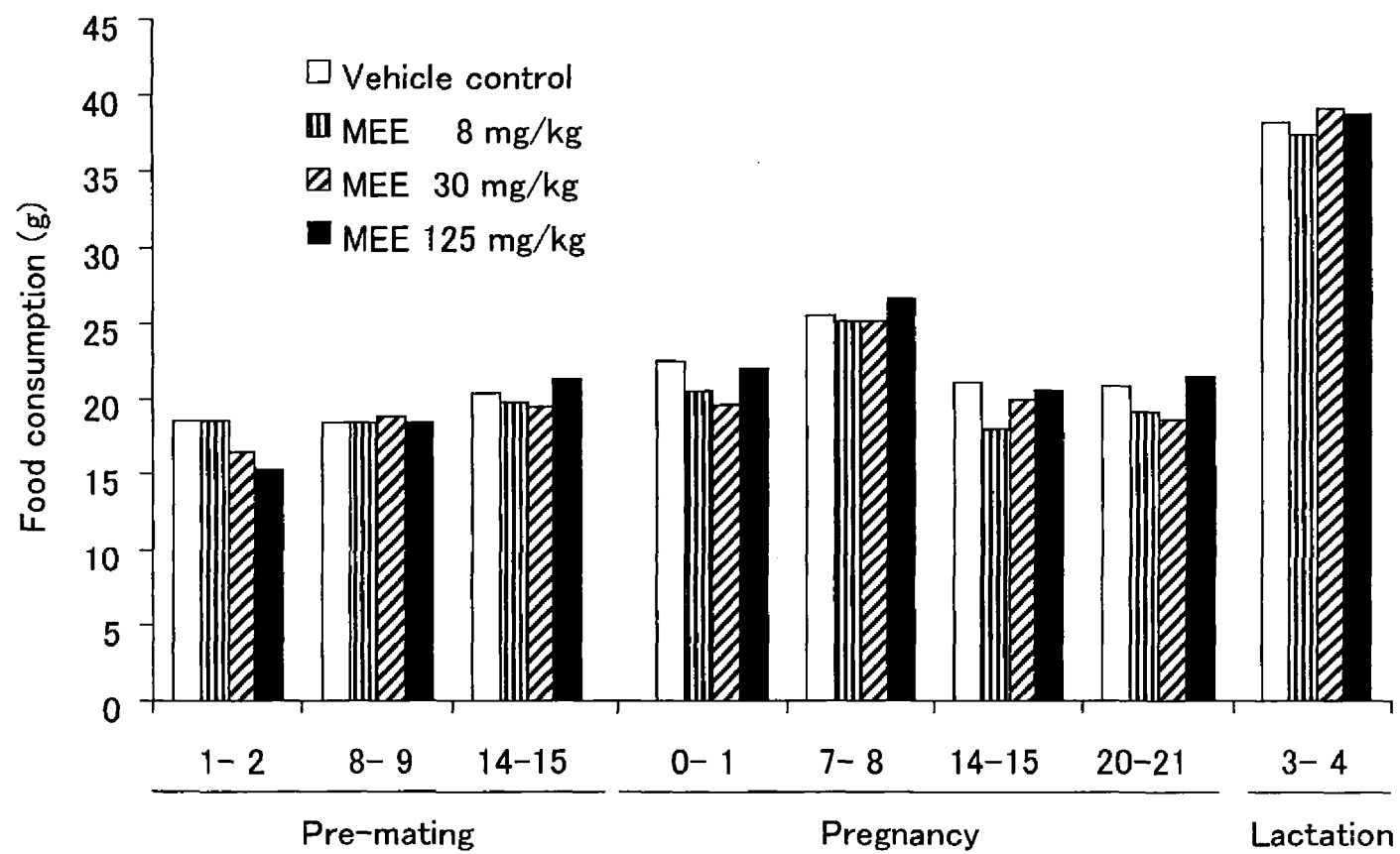


Fig.4 Food consumption of females

Table 1

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Clinical signs of males

Compound	MEE			
	0 a)	8	30	125
No. of males examined	13	13	13	13
No. of males with abnormality	0	0	0	7
Category of abnormality; N				
Reddish urine	0	0	0	7

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

Table 2

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Clinical signs of females

Compound Dose group (mg/kg)	MEE			
	0 a)	8	30	125
No. of females examined	13	13	13	13
No. of females with abnormality	0	1	1	13
Category of abnormality; N				
Reddish urine	0	0	1	13
Loss of fur	0	1	0	0

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

Table 3

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Body weight of males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MEE							
Groups (mg/kg)	0 a)		8		30		125	
Days of administration								
1 (initial body weight)	367.6 ± 19.1	(13)	372.5 ± 22.2	(13)	370.2 ± 16.9	(13)	365.9 ± 23.2	(13)
8	397.8 ± 28.2	(13)	406.0 ± 29.4	(13)	402.5 ± 27.6	(13)	392.7 ± 33.7	(13)
15	423.0 ± 37.5	(13)	436.1 ± 34.1	(13)	431.0 ± 35.3	(13)	424.1 ± 41.8	(13)
22	449.9 ± 43.5	(13)	460.3 ± 38.3	(13)	459.0 ± 39.5	(13)	450.9 ± 46.9	(13)
29	475.3 ± 52.4	(13)	489.5 ± 40.7	(13)	488.8 ± 44.3	(13)	477.9 ± 52.7	(13)
36	494.7 ± 58.1	(13)	508.6 ± 43.4	(13)	513.7 ± 46.6	(13)	496.8 ± 55.5	(13)
43	514.1 ± 60.9	(13)	529.3 ± 43.8	(13)	533.0 ± 49.4	(13)	511.8 ± 59.3	(13)
49	529.6 ± 63.6	(13)	542.6 ± 45.4	(13)	549.1 ± 52.6	(13)	529.6 ± 62.8	(13)

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

Table 4

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Body weight gain of males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MEE							
Groups (mg/kg)	0 a)		8		30		125	
Days of administration								
1- 8	30.2 ± 11.7	(13)	33.5 ± 9.4	(13)	32.3 ± 13.0	(13)	26.7 ± 12.8	(13)
8-15	25.2 ± 11.6	(13)	30.1 ± 7.5	(13)	28.5 ± 9.5	(13)	31.4 ± 9.5	(13)
15-22	27.0 ± 9.5	(13)	24.1 ± 6.7	(13)	28.1 ± 10.1	(13)	26.8 ± 8.1	(13)
22-29	25.3 ± 10.4	(13)	29.3 ± 3.9	(13)	29.8 ± 6.4	(13)	27.0 ± 7.8	(13)
29-36	19.4 ± 9.3	(13)	19.1 ± 6.6	(13)	24.9 ± 5.5	(13)	18.8 ± 6.7	(13)
36-43	19.4 ± 4.9	(13)	20.7 ± 8.0	(13)	19.4 ± 7.7	(13)	15.1 ± 7.2	(13)
43-49	15.6 ± 6.4	(13)	13.3 ± 8.3	(13)	16.1 ± 6.8	(13)	17.8 ± 7.9	(13)
1-15	55.4 ± 22.2	(13)	63.6 ± 15.7	(13)	60.8 ± 21.5	(13)	58.2 ± 21.3	(13)
1-22	82.3 ± 27.7	(13)	87.8 ± 19.6	(13)	88.9 ± 26.2	(13)	85.0 ± 27.2	(13)
1-29	107.6 ± 36.7	(13)	117.0 ± 21.4	(13)	118.6 ± 31.4	(13)	112.0 ± 33.1	(13)
1-36	127.1 ± 43.1	(13)	136.1 ± 24.7	(13)	143.5 ± 34.1	(13)	130.8 ± 36.7	(13)
1-43	146.4 ± 46.4	(13)	156.8 ± 26.6	(13)	162.9 ± 37.2	(13)	145.9 ± 39.9	(13)
1-49	162.0 ± 49.5	(13)	170.1 ± 28.6	(13)	178.9 ± 39.4	(13)	163.7 ± 43.4	(13)

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

Table 5

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Body weight of females (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MEE									
Groups (mg/kg)		0 a)		8		30		125			
Days of administration											
1		220.0 ± 20.8	(13)	220.8 ± 20.4	(13)	216.2 ± 20.1	(13)	219.5 ± 18.7	(13)		
8		233.9 ± 26.7	(13)	232.4 ± 24.1	(13)	223.4 ± 24.2	(13)	225.2 ± 23.0	(13)		
15		247.0 ± 28.2	(13)	242.1 ± 25.2	(13)	234.0 ± 26.4	(13)	241.2 ± 26.3	(13)		
Days of pregnancy											
0		250.4 ± 30.6	(13)	250.6 ± 27.5	(12)	237.8 ± 25.1	(12)	246.0 ± 25.4	(13)		
7		288.7 ± 33.7	(13)	288.6 ± 31.7	(12)	272.5 ± 28.0	(12)	289.9 ± 29.1	(13)		
14		326.2 ± 35.6	(13)	323.0 ± 36.2	(12)	308.1 ± 30.6	(12)	327.1 ± 33.1	(13)		
20		399.0 ± 45.3	(13)	392.7 ± 39.9	(12)	379.3 ± 36.8	(12)	400.0 ± 39.9	(13)		
Days of lactation											
0		287.5 ± 36.2	(13)	288.3 ± 32.7	(12)	279.2 ± 33.5	(12)	290.2 ± 33.0	(13)		
4		325.4 ± 37.2	(13)	315.2 ± 34.7	(12)	306.6 ± 32.9	(12)	325.4 ± 27.1	(13)		

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

Table 6

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Body weight gain of females (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MEE											
Groups (mg/kg)		0 a)			8			30			125		
Days of administration													
1- 8		13.9 $\pm$	8.7	(13)	11.6 $\pm$	10.4	(13)	7.2 $\pm$	7.7	(13)	5.7 $\pm$	7.3	(13)
8-15		13.0 $\pm$	4.4	(13)	9.7 $\pm$	5.0	(13)	10.7 $\pm$	4.7	(13)	16.1 $\pm$	6.2	(13)
1-15		27.0 $\pm$	10.4	(13)	21.3 $\pm$	13.0	(13)	17.8 $\pm$	9.1	(13)	21.7 $\pm$	10.8	(13)
Days of pregnancy													
0- 7		38.4 $\pm$	6.0	(13)	37.9 $\pm$	8.9	(12)	34.7 $\pm$	8.6	(12)	43.9 $\pm$	11.6	(13)
7-14		37.5 $\pm$	6.1	(13)	34.5 $\pm$	7.2	(12)	35.6 $\pm$	10.0	(12)	37.2 $\pm$	5.6	(13)
14-20		72.7 $\pm$	14.5	(13)	69.7 $\pm$	10.2	(12)	71.2 $\pm$	14.1	(12)	72.9 $\pm$	13.3	(13)
0-14		75.9 $\pm$	9.1	(13)	72.4 $\pm$	14.1	(12)	70.3 $\pm$	12.9	(12)	81.1 $\pm$	14.7	(13)
0-20		148.6 $\pm$	20.4	(13)	142.1 $\pm$	19.2	(12)	141.5 $\pm$	18.8	(12)	154.0 $\pm$	23.6	(13)
Days of lactation													
0- 4		37.8 $\pm$	14.9	(13)	26.9 $\pm$	15.2	(12)	27.4 $\pm$	14.9	(12)	35.2 $\pm$	15.2	(13)

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

Table 7

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Food consumption of males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MEE							
Groups (mg/kg)	0 a)		8		30		125	
Days of administration								
1- 2	29.0 ± 3.8	(13)	29.1 ± 4.1	(13)	29.1 ± 4.0	(13)	25.3 ± 3.7 *	(13)
8- 9	28.3 ± 3.8	(13)	28.9 ± 3.0	(13)	28.6 ± 3.5	(13)	27.6 ± 3.0	(13)
14-15	28.2 ± 4.0	(13)	29.0 ± 2.9	(13)	28.6 ± 2.9	(13)	28.3 ± 4.4	(13)
29-30	28.6 ± 4.1	(13)	29.7 ± 3.0	(13)	29.8 ± 3.1	(13)	28.1 ± 3.2	(13)
36-37	27.3 ± 3.0	(13)	28.6 ± 2.6	(13)	29.1 ± 3.0	(13)	26.9 ± 3.5	(13)
43-44	28.4 ± 3.5	(13)	29.1 ± 3.8	(13)	30.2 ± 3.0	(13)	29.1 ± 4.9	(13)

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

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

Table 8

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Food consumption of females (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MEE											
	0 a)			8			30			125		
Days of administration												
1- 2	18.6 $\pm$	3.1	(13)	18.6 $\pm$	4.0	(13)	16.5 $\pm$	3.5	(13)	15.3 $\pm$	3.8	(13)
8- 9	18.4 $\pm$	4.2	(13)	18.5 $\pm$	3.5	(13)	18.8 $\pm$	3.9	(13)	18.5 $\pm$	3.3	(13)
14-15	20.4 $\pm$	3.1	(13)	19.8 $\pm$	3.3	(13)	19.5 $\pm$	3.0	(13)	21.3 $\pm$	2.9	(13)
Days of pregnancy												
0- 1	22.5 $\pm$	3.8	(13)	20.6 $\pm$	5.2	(12)	19.6 $\pm$	3.4	(12)	22.0 $\pm$	3.7	(13)
7- 8	25.5 $\pm$	3.5	(13)	25.1 $\pm$	4.2	(12)	25.1 $\pm$	3.7	(12)	26.6 $\pm$	4.2	(13)
14-15	21.1 $\pm$	3.2	(13)	17.9 $\pm$	4.6	(12)	19.9 $\pm$	2.9	(12)	20.6 $\pm$	3.4	(13)
20-21	20.8 $\pm$	3.0	(13)	19.1 $\pm$	6.4	(12)	18.6 $\pm$	4.2	(12)	21.4 $\pm$	5.0	(13)
Days of lactation												
3- 4	37.9 $\pm$	12.1	(13)	37.2 $\pm$	10.3	(12)	38.9 $\pm$	7.4	(12)	38.4 $\pm$	10.6	(13)

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

Table 9

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Macroscopic findings in males at the end of the dosing period

Compound Groups (mg/kg) Grade	MEE											
	0 a)			8			30			125		
	[N]	-	+	[N]	-	+	[N]	-	+	[N]	-	+
Spleen	[13]			[13]			[13]			[13]		
Enlargement		13	0		13	0		13	0		11	2
Testis	[13]			[13]			[13]			[13]		
Small, bilateral		13	0		13	0		9	4		13	0
Epididymis	[13]			[13]			[13]			[13]		
Small, bilateral		13	0		13	0		11	2		13	0

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

-: Negative

+: Positive

Table 10 - 1

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Macroscopic findings in females at the end of the dosing period (Subject to autopsy on day 4 of lactation)

Compound Groups (mg/kg) Grade	MEE											
	0 a)			8			30			125		
	[N]	-	+	[N]	-	+	[N]	-	+	[N]	-	+
Stomach	[13]			[12]			[12]			[13]		
Thickening, mucosa, local, Glandular stomach		13	0		12	0		11	1		13	0
Lung	[13]			[12]			[12]			[13]		
Area, black, right lobu		13	0		12	0		11	1		13	0
Skin	[13]			[12]			[12]			[13]		
Alopecia, local		13	0		11	1		12	0		13	0

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

-: Negative

+: Positive

Table 10 - 2

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Macroscopic findings in females at the end of the dosing period (Non-pregnant)

Compound Groups (mg/kg) Grade	MEE											
	0 a)			8			30			125		
	[N]	-	+	[N]	-	+	[N]	-	+	[N]	-	+
Stomach	[0]			[1]			[1]			[0]		
Thickening, mucosa, local, Glandular stomach					1	0		1	0			
Lung	[0]			[1]			[1]			[0]		
Area, black, right lobu					1	0		1	0			
Skin	[0]			[1]			[1]			[0]		
Alopecia, local					1	0		1	0			

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

-: Negative

+: Positive

Table 11

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Organ weight of males, Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MEE							
		0 a)		8		30		125	
Groups	(mg/kg)								
Final body weight	(g)	529.6 $\pm$ 63.6	(13)	542.6 $\pm$ 45.4	(13)	549.1 $\pm$ 52.6	(13)	529.6 $\pm$ 62.8	(13)
Spleen	(g)	0.8494 $\pm$ 0.1113 b)	(13)	0.8935 $\pm$ 0.1277	(13)	0.9198 $\pm$ 0.0863	(13)	1.1322 $\pm$ 0.1677 **	(13)
		0.1620 $\pm$ 0.0261 c)	(13)	0.1651 $\pm$ 0.0224	(13)	0.1682 $\pm$ 0.0163	(13)	0.2144 $\pm$ 0.0246 **	(13)
Testes	(g)	3.2364 $\pm$ 0.2604	(13)	3.1799 $\pm$ 0.2138	(13)	3.0174 $\pm$ 0.6980	(13)	3.2266 $\pm$ 0.3448	(13)
		0.6164 $\pm$ 0.0627	(13)	0.5893 $\pm$ 0.0565	(13)	0.5515 $\pm$ 0.1316	(13)	0.6166 $\pm$ 0.0968	(13)
Epididymides	(g)	1.1876 $\pm$ 0.0932	(13)	1.2119 $\pm$ 0.1077	(13)	1.1164 $\pm$ 0.1949	(13)	1.1813 $\pm$ 0.1319	(13)
		0.2263 $\pm$ 0.0245	(13)	0.2245 $\pm$ 0.0242	(13)	0.2041 $\pm$ 0.0369	(13)	0.2258 $\pm$ 0.0358	(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, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 12

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Organ weight of females, Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MEE							
Groups (mg/kg)		0 a)		8		30		125	
Final body weight	(g)	325.4 $\pm$ 37.2	(13)	315.2 $\pm$ 34.7	(12)	306.6 $\pm$ 32.9	(12)	325.4 $\pm$ 27.1	(13)
Spleen	(g)	0.6366 $\pm$ 0.1107 b)	(13)	0.6489 $\pm$ 0.0905	(12)	0.6728 $\pm$ 0.1350	(12)	0.8353 $\pm$ 0.1620 **	(13)
		0.1950 $\pm$ 0.0202 c)	(13)	0.2069 $\pm$ 0.0277	(12)	0.2182 $\pm$ 0.0262	(12)	0.2574 $\pm$ 0.0487 **	(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, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 13

Preliminary reproduction toxicity screening test of MME by oral administration in rats

Histopathological findings in males at the end of the dosing period

Compound Groups (mg/kg) Grade	MEE																											
	0 a)						8						30						125									
	[N]	-	+/-	+	++	+++	Pos.	[N]	-	+/-	+	++	+++	Pos.	[N]	-	+/-	+	++	+++	Pos.	[N]	-	+/-	+	++	+++	Pos.
Testis	[13]							[0]							[4]							[13]						
Atrophy, seminiferous tubule, focal, bilateral		12	0	1	0	0	1									0	0	2	1	1	4		10	2	1	0	0	3
Multinucleated giant cell, lumen, seminiferous tubule		13	0	0	0	0	0									2	2	0	0	0	2		11	2	0	0	0	2
Epididymis	[13]							[0]							[2]							[13]						
Cell debris, lumen, bilateral		12	0	1	0	0	1									0	1	0	0	1	2		10	2	1	0	0	3
Decrease, sperm, lumen, bilateral		13	0	0	0	0	0									1	0	0	0	1	1		13	0	0	0	0	0
Spermatic granuloma, unilateral		13	0	0	0	0	0									2	0	0	0	0	0		12	0	1	0	0	1
Spleen	[0]							[0]							[0]							[2]						
Hematopoiesis, extramedullary																							0	0	1	1	0	2
Deposit, pigment, brown																							0	0	2	0	0	2

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

- : Negative
+/-: Very slight
+ : Slight
++ : Moderate
+++ : Severe

Pos.: Total of positive grade

Table 14

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Histopathological findings in females (Subject to autopsy on day 4 of lactation)

Compound Groups (mg/kg) Grade	TSA																											
	0 a)						8						30						125									
	[N]	-	+/-	+	++	+++	Pos.	[N]	-	+/-	+	++	+++	Pos.	[N]	-	+/-	+	++	+++	Pos.	[N]	-	+/-	+	++	+++	Pos.
Ovary	[13]							[0]							[0]							[13]						
No remarkable change																												
Stomach	[0]							[0]							[1]							[0]						
No remarkable change																												
Lung	[0]							[0]							[1]							[0]						
No remarkable change																												
Skin	[0]							[1]							[0]							[0]						
No remarkable change																												

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

- : Negative
+/-: Very slight
+ : Slight
++ : Moderate
+++ : Severe

Pos.: Total of positive grade

Table 15

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Summary of estrous cycles

Compound	MEE			
	0 a)	8	30	125
Dose group (mg/kg)				
Number of females examined	13	13	13	13
Mean length of estrous cycle in days				
Pre-treatment period; Mean $\pm$ S.D	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.0
Treatment period; Mean $\pm$ S.D.	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.4
Number of animals showing each type of cycle during pre-treatment period				
4-day cycle	13	13	12	13
4,5day cycle	0	0	1	0
Changes of estrous cycle after treatment				
Number of animals not changed	13	13	12	12
Number of animals changed (pre-treatment period) (treatment period)				
4-day $\rightarrow$ 4,5-day	0	0	1	0
4-day $\rightarrow$ irregular	0	0	0	1
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean $\pm$ S.D. (N)	1.0 $\pm$ 0.0 (13)	1.0 $\pm$ 0.0 (13)	1.0 $\pm$ 0.0 (13)	1.1 $\pm$ 0.3 (13)

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

Table 16

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Reproductive performance of animals

Compound Dose group (mg/kg)	MEE			
	0 a)	8	30	125
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant animals	13	12	12	13
Fertility index (%)	100.0	92.3	92.3	100.0
Pairing days until copulation Mean $\pm$ S.D. (N)	2.5 $\pm$ 1.1 (13)	2.4 $\pm$ 1.0 (13)	2.5 $\pm$ 1.1 (13)	2.5 $\pm$ 1.5 (13)

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

Copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) $\times$ 100, %Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) $\times$ 100, %

Table 17

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Development of pups up to day 4 of lactation; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MEE			
	0 a)	8	30	125
Number of pregnant females	13	12	12	13
Number of pregnant females with live pups	13	12	12	13
Gestation index	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length in days	22.3 $\pm$ 0.5	22.3 $\pm$ 0.5	22.3 $\pm$ 0.5	22.8 $\pm$ 0.4 *
Number of corpora lutea	15.0 $\pm$ 1.9	15.4 $\pm$ 1.9	14.8 $\pm$ 1.2	15.9 $\pm$ 2.4
Number of implantation sites	14.7 $\pm$ 2.0	14.8 $\pm$ 1.8	13.9 $\pm$ 2.4	14.9 $\pm$ 2.7
Implantation index	98.0 $\pm$ 4.1	95.8 $\pm$ 4.2	93.8 $\pm$ 14.3	93.6 $\pm$ 9.9
Day 0 of lactation				
Number of pups born	13.8 $\pm$ 1.9	13.9 $\pm$ 2.4	13.2 $\pm$ 2.4	13.3 $\pm$ 3.2
Delivery index	94.3 $\pm$ 4.3	93.9 $\pm$ 7.3	94.4 $\pm$ 6.4	88.3 $\pm$ 12.0
Number of live pups	13.8 $\pm$ 1.9	13.9 $\pm$ 2.4	12.9 $\pm$ 2.4	13.2 $\pm$ 3.1
Birth index	94.3 $\pm$ 4.3	93.9 $\pm$ 7.3	92.7 $\pm$ 6.8	87.8 $\pm$ 11.6
Live birth index	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	98.2 $\pm$ 4.4	99.5 $\pm$ 1.6
Sex ratio on day 0	49.7 $\pm$ 16.0	54.4 $\pm$ 15.7	48.7 $\pm$ 15.8	49.3 $\pm$ 10.8
Day 4 of lactation				
Number of live pups	13.8 $\pm$ 2.0	13.9 $\pm$ 2.4	12.6 $\pm$ 2.4	13.2 $\pm$ 3.0
Viability index	99.4 $\pm$ 2.1	100.0 $\pm$ 0.0	97.6 $\pm$ 6.3	99.5 $\pm$ 1.6
Sex ratio on day 4	49.5 $\pm$ 15.8	54.4 $\pm$ 15.7	49.3 $\pm$ 16.6	49.5 $\pm$ 10.6

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

Gestation index = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females) $\times$ 100, %Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) $\times$ 100, %Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) $\times$ 100, %Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites) $\times$ 100, %Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) $\times$ 100, %Sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %Viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4) $\times$ 100, %* : Significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)

Table 18

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEE by oral administration in rats

Body weight of pups up to day 4 of lactation; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MEE							
Dose group (mg/kg)	0 a)		8		30		125	
Day 0 of lactation								
Number of live pups								
Male	6.8 ± 2.4	(13)	7.5 ± 2.3	(12)	6.4 ± 2.6	(12)	6.5 ± 2.0	(13)
Female	7.0 ± 2.6	(13)	6.4 ± 2.2	(12)	6.5 ± 2.2	(12)	6.8 ± 2.3	(13)
Weight of pups (g)								
Male	6.8 ± 0.5		6.7 ± 0.5		6.9 ± 0.9		6.8 ± 0.7	
Female	6.3 ± 0.4		6.4 ± 0.6		6.5 ± 0.7		6.5 ± 0.8	
Day 4 of lactation								
Number of live pups								
Male	6.8 ± 2.4	(13)	7.5 ± 2.3	(12)	6.3 ± 2.3	(12)	6.5 ± 2.0	(13)
Female	7.0 ± 2.6	(13)	6.4 ± 2.2	(12)	6.3 ± 2.3	(12)	6.7 ± 2.2	(13)
Weight of pups (g)								
Male	10.6 ± 0.7		10.7 ± 1.1		10.9 ± 1.8		10.7 ± 1.8	
Female	10.1 ± 0.8		10.2 ± 1.1		10.5 ± 1.6		10.4 ± 1.9	

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