



1, 4-ブタンジオール(1, 4-butanediol)の
ラットを用いる
反復経口投与毒性・
生殖発生毒性併合試験

厚生省生活衛生局 委託

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
試験材料および方法	3
A. 被験物質	3
B. 使用動物および飼育方法	3
1. 使用動物	3
2. 飼育方法	3
C. 群分け法および個体識別法	3
D. 投与量、投与期間および投与方法	4
1. 投与量の設定	4
2. 投与方法および投与期間	4
E. 観察方法	5
1. 親動物	5
a. 一般状態	5
b. 尿検査	5
c. 飼料消費量	5
d. 体重	5
e. 交配	6
f. 分娩	6
g. 雄動物の血液学的、血液生化学的および病理学的検査	6
(1) 血液学的検査	6
(2) 血液生化学的検査	7
(3) 剖検、器官重量および病理組織学的検査	7
h. 雌動物の剖検、器官重量および病理組織学的検査	8
2. 産児	8
a. 産児の観察	8
b. 体重測定	8
c. 剖検	9

F. 統計分析	9
結果	10
A. 反復投与毒性 (F ₀ 動物所見)	10
1. 死亡動物	10
2. 一般状態	10
a. 症状 (Tables 1, 2; Appendices 1-1~2-4)	10
b. 尿検査 (Tables 3, 4; Appendices 3-1~4-4)	10
3. 飼料消費量	11
a. 雄動物 (Table 5; Fig. 1; Appendices 5-1~5-4)	11
b. 雌動物	11
(1) 交配前 (Table 6; Fig. 2; Appendices 6-1~6-4)	11
(2) 妊娠期間 (Table 7; Fig. 2; Appendices 7-1~7-4)	11
(3) 哺育期間 (Table 8; Fig. 2; Appendices 8-1~8-4)	11
4. 体重	12
a. 雄動物 (Tables 9, 10; Fig. 3; Appendices 9-1~10-4)	12
b. 雌動物	12
(1) 交配前 (Tables 11, 12; Fig. 4; Appendices 11-1~12-4)	12
(2) 妊娠期間 (Tables 13, 14; Fig. 4; Appendices 13-1~14-4)	12
(3) 哺育期間 (Tables 15, 16; Fig. 4; Appendices 15-1~16-4)	12
5. 解剖時検査所見	12
a. 雄動物	12
(1) 血液学的検査 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)	12
(2) 血液生化学的検査 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)	13
(3) 剖検 (Table 19; Appendices 19-1~19-4)	13
(4) 器官重量 (Table 20; Appendices 20-1~20-4)	13
(5) 病理組織学的検査 (Table 21; Appendices 21-1~21-4)	13
b. 雌動物	15
(1) 剖検 (Tables 22-1~22-3; Appendices 22-1~22-4)	15
(2) 器官重量 (Table 23; Appendices 23-1~23-4)	15
(3) 病理組織学的検査 (Tables 24-1~24-3; Appendices 24-1~24-4)	15

B. 生殖発生毒性	16
1. 生殖学的検査所見	16
a. 交配成績 (Table 25; Appendices 25-1~25-4)	16
b. 出産率および妊娠期間 (Table 26; Appendices 26-1~26-4)	16
c. 分娩および哺育状態	17
d. 黄体数、着床数および着床率 (Table 26; Appendices 26-1~26-4)	17
2. 産児観察所見 (Tables 27, 28; Appendices 27-1~27-4)	17
考察	18
結論	19
文献	20
Tables (Table 1~28)	
Figures (Fig. 1~4)	

【要 約】

OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査研究事業の一環として、ラットを用いて1,4-butanediol (BD) の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、本化合物の雌雄動物に及ぼす毒性ならびに生殖・発生毒性について検討した。

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラットに、交配前、交配期間および雌動物においては妊娠・哺育期間を通じて約6週間、BDの200、400および800 mg/kgを経口投与し、F₀動物およびF₁産児に対する影響を調査して大要次の結果を得た。

1. 一般毒性

いずれの被験物質投与群においても、投与後一過性に症状が発現し、投与量に依存してその重篤度は増加した。200 mg/kg投与群においては活動性が亢進した。400 mg/kg投与群においては活動性の亢進もみられたが、主として活動性は抑制され、800 mg/kg投与群においては昏睡状態に陥る動物もみられたが、5時間後には回復していた。

体重は400および800 mg/kg投与群において投与初期にその増加が抑制され、その後の増加率に変化はみられなかったが、初期の体重増加量の差が試験終了時まで継続した。またこれに付随して飼料消費量も減少していた。

雄動物の血液学的検査においては、何ら有意な変化は認められなかったが、血液生化学的検査において、軽度で正常範囲内の変化であり、被験物質投与との関係は疑問視されるが、血糖値の統計的に有意な減少が観察された。

肉眼的解剖所見としては特筆すべき変化はみられなかったが、400 mg/kg以上の投与量群の膀胱の病理組織学的観察により、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層に線維化が認められた。

2. 生殖・発生毒性

産児の形態および生存率については異常はみられなかったが、800 mg/kg投与群において軽度ではあったが有意な体重減少がみられた。

以上の観察結果に基づくと、F₀動物に対する最大無影響量は、この試験において投与した最少量の200 mg/kg以下であり、求めることはできなかったが、最大無毒性量は200 mg/kg、産児に対する最大無毒性量は400 mg/kgであると判断した。

【緒 言】

OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査研究事業の一環として、ラットを用いて1,4-butanediol (BD) の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、本化合物の雌雄動物に及ぼす毒性ならびに生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

【試験材料および方法】

A. 被験物質

1, 4-Butanediol (BD) [CAS番号 ; 110-63-4、ロット番号 ;

純度 ; 98.0% (wt%) 以上] は、常温で安定な、無色無臭の吸湿性を有する粘性液体である (Appendix 28)。これを投与液とするため、局方注射用水 (三亜製薬株式会社、製造番号 : DH004) に溶解希釈した。希釈調製した投与液は、室温で密封保管し、調製後 7 日以内に使用した。調製液中の被験物質は、室温条件下で少なくとも 8 日間安定であり (Appendix 29)、また、使用した投与液には所定量の BD が許容範囲内の濃度で含有されていた (Appendix 30)。

B. 使用動物および飼育方法

1. 使用動物

日本チャールス・リバー株式会社日野飼育センター生産の Sprague-Dawley 系雌雄ラット (Crj:CD, SPF) を 7 週齢時に購入し、馴化と検疫を兼ねて約 1 週間飼育し、一般状態に異常が認められない動物を試験に使用した (Appendix 31)。群分け時の動物の体重範囲は、雌 205.5~231.2 g、雄 280.3~309.5 gであった。

2. 飼育方法

動物は、温度 24 ± 1 °C、相対湿度 55 ± 5 %、換気回数約 15 回/時間、照明 12 時間 (午前 7 時~午後 7 時) に調節した飼育室で、金属製ケージ (22×27×19cm) に個別に収容して飼育し、固型飼料 (CA-1、日本クレア株式会社) および飲料水を自由に摂取させた。妊娠 18 日以後は、飼育ケージの床にステンレス製床板を敷き、床敷として木製チップ (ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社) を適宜供給した。

C. 群分け法および個体識別法

雌雄動物とも投与初日 (投与 1 日) の投与前に測定した体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法により群分けし、1 群雌雄各 13 匹を使用した。これら雌雄動物には、油性インクを用いて、尾に群識別番号および個体識別番号を印字した。また、個体識別を容易にする目的で、投与群毎に色彩の異なるカードを懸け、これに群識別番号および個体識別番号を記入し

た。産児に関しては個体識別は行わなかった。

D. 投与量、投与期間および投与方法

1. 投与量の設定

最大耐量を求める目的で1群5匹の雌雄ラットに、BD の1000, 800, 600 mg/kgを1週間、強制経口投与した。1回投与後、約10分経過した頃より、600 mg/kg 以上の投与量群において、活動性の低下が認められたが、これは時間と共に次第に重篤となり1時間30分後には昏睡状態となった。覚醒までの時間は投与量に比例して長くなり、ほぼ覚醒するまでに要した時間は600 mg/kg 投与群では3時間、800 mg/kg 投与群では4時間、1000 mg/kg 投与群では4から6時間であった。さらに、1000 mg/kg 投与群では雄1匹、雌2匹において覚醒時に痙攣が観察された。800 mg/kg および1000 mg/kg 投与群ではこれに加えて、血尿が認められ、その頻度は、それぞれ、雄2匹、雌1匹および雄3匹、雌1匹であった。1000 mg/kg の投与量は、初回投与後の症状から、最大耐量を凌駕すると考えられ、その後の投与を中止して、初回投与翌日、屠殺解剖した。解剖の結果、膀胱漿膜面の血管の充血（雄5匹、雌2匹）および粘膜面の点状出血（雄5匹、雌3匹）が観察された。600 mg/kg 以上の投与量で惹起された症状が重篤であったことから、さらに1群5匹の雄動物より成る2群を追加し、これらに400 および200 mg/kg を同様に投与することとした。

投与4日までは血尿を除き上記症状が継続したが、その程度は軽減される傾向にあった。投与5日の投与後約10分より、600 mg/kg 以上の投与群では活動性の亢進が観察されるようになり、この症状も投与の進行と共に顕著になった。

7日間の投与終了翌日に、すべての動物を屠殺解剖した。諸器官の肉眼観察の結果、異常を呈する器官は観察されなかった。

この予備試験においては対照群は設けなかったが、800 mg/kg 投与群では体重の増加量がやや抑制されていることが伺われる。

以上の所見に基づき、本試験における高用量を800 mg/kg とし、以下中間用量400 mg/kg、低用量を200 mg/kg とすることとした。

2. 投与方法および投与期間

投与液量は、各投与量群とも5 ml/kg とし、対照群のラットには、BD の媒体として用いた局方注射用水をBD 投与群と同一条件で投与した。

投与期間は、雄に対しては交配前14日間、交配期間14日間および交配期間終了後14日間の42日間、また、雌に対しては交配前14日間、交配期間中（交尾成立まで、最長14日間）ならびに交尾成立雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日まで投与した。投与は毎日1回、ラット用胃管を用いて強制経口投与した。毎日の投与は午前中に行った。各動物の投与液量は、雄ならびに交尾成立前の雌については週1回の測定体重を基に、また、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重を基に算出した。

E. 観察方法

1. 親動物

a. 一般状態

試験期間中毎日観察し、必要に応じて観察頻度を増減した。

b. 尿検査

予備試験の初回投与約4時間後に、800 および1000 mg/kg 投与群の少数の動物に肉眼で認められる血尿の排泄が観察されたため、この試験においても、エームス尿検査試験紙（マルティスティックス／クリニテック200、マイルス三共）を用いて尿中の血色素について調べることとした。検査日は、投与1、8、および15日とし、投与後約4時間目の尿を強制排泄させて検査に用いた。採尿が困難な場合には、極度の刺激を避けるため採尿を中止した。

c. 飼料消費量

体重測定日と同じ日に給餌器中の飼料重量を測定し、測定日間の飼料消費量を算定した。交配期間中の飼料消費量は測定しなかった。交尾成立雌については、妊娠0-7、7-14、14-20日および分娩した雌では、哺育0-4日の飼料消費量を測定した。

d. 体重

投与期間中週1回〔雄：投与1、8、15、22、29、36、42日、雌：投与1、8、15、22（22日は交配中の雌のみ）日〕および解剖日に測定した。また、交尾した雌については、妊娠0、7、14、20日の体重、さらに分娩した雌では、分娩後0および4日（哺育0および4日）の体重を測定した。

e. 交配

投与15日の夕方から最長2週間、同一投与量群の雌雄動物を1対1で同居させた。交尾の確認は、毎朝、腔内の腔栓および腔垢中の精子の存在を調べるにより行い、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。

交配結果および妊娠の成否より、各投与群における、交尾率〔(交尾動物数/同居動物数) × 100〕、受胎率〔(妊娠動物数/交尾動物数) × 100〕、同居開始日から交尾確認日までの日数および雌の発情回帰回数を求めた。

f. 分娩

各投与群とも交尾成立雌の全てを自然分娩させた。分娩状況を観察できた動物については、異常の有無を記録した。分娩が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、個別に記録した。

分娩の確認は、午前9時～11時に行い、分娩が完了していることが確認できた個体については、その日を分娩日（哺育0日）として妊娠期間（妊娠0日～分娩日の日数）を計算し、各投与群の平均妊娠期間および出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数) × 100〕を求めた。

g. 雄動物の血液学的、血液生化学的および病理学的検査

(1) 血液学的検査

最終投与日の翌日（投与43日相当日）ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈より、抗凝固剤としてEDTAを用いて採血し、以下の項目について、記載した測定法により検査した。

項目	測定法
赤血球数 (RBC)	電気抵抗法
白血球数 (WBC)	電気抵抗法
血色素量 (Hb)	吸光度法
ヘマトクリット値 (Ht)	計算 (RBC × MCV × 0.001)
平均赤血球容積 (MCV)	電気抵抗法
平均赤血球血色素量 (MCH)	計算 (Hb × 1000 / RBC)
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	計算 (Hb × 100 / Ht)

項目	測定法
血小板数	電気抵抗法
白血球分類	視算（静脈血塗抹標本、Wright-Giemsa 染色）

（2）血液生化学的検査

血液学的検査のための採血に引き続き、抗凝固剤にヘパリンを用いて採血し、血漿を分離して次の項目について、記載した測定法により検査した。

項目	測定法
総蛋白濃度	ビウレット法
アルブミン濃度	B C G 法
総コレステロール濃度	C O D ・ D A O S 法
ブドウ糖濃度	グルコキナーゼ G6PDH 法
尿素窒素濃度（BUN）	ウレアーゼ G L D H 法
クレアチニン濃度	Jaffe 法
アルカリフォスファターゼ活性	パラニトロフェニルリン酸基質法
G O T 活性	S S C C 法
G P T 活性	S S C C 法
総ビリルビン濃度	ビリルビン「ロシュ」キット S シリーズ
カルシウム濃度	O C P C 法
ナトリウム濃度	イオン電極法
カリウム濃度	イオン電極法
塩素濃度	イオン電極法
無機リン濃度	モリブデン酸直接法
γ -G T P 活性	γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法
A/G 比	計算

（3）剖検、器官重量および病理組織学的検査

血液学的および血液生化学的検査のための採血に引き続いて、動物をペントバルビタール

深麻酔下に放血・致死させて剖検した。その際、肝臓、腎臓、胸腺、精巣および精巣上体を摘出し、その重量を測定した。また、精巣および精巣上体を除くこれらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱ならびに右側ハーダー腺は10%ホルマリンに、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ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。さらに、高用量群で変化の認められた膀胱については、低用量群および中間用量群についても病理組織学的検査を行った。

h. 雌動物の剖検、器官重量および病理組織学的検査

分娩した雌動物は哺育4日に、交尾したが分娩しなかった雌は妊娠25日相当日に、それぞれネンブタール深麻酔下に放血・致死させ、剖検した。分娩した動物の卵巣および子宮は摘出し、子宮については着床痕数を数えた。卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた後、ブアン液に固定して保存した。不妊動物の子宮については、Salewski 法¹⁾により不妊を確認し、卵巣については病理組織学的検査を行った。また、全ての動物について肝臓、腎臓および胸腺の重量を測定した。これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱および右側ハーダー腺は10%ホルマリンに固定し、そのうち対照群および高用量投与群についてはヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。なお、膀胱、胸腺および脾臓に関しては、対照群と高用量群の所見の間に差異が認められたため、これらの器官に関しては、200 および400 mg/kg 投与群の雌動物についても病理組織学的観察を行った。

2. 産児

a. 産児の観察

哺育0日に産児数（生存児＋死亡児）を数え、分娩率 $\left[\left(\text{産児数} / \text{着床痕数}\right) \times 100\right]$ および産児生存率 $\left[\left(\text{生存産児数} / \text{着床痕数}\right) \times 100\right]$ を求めた。また、産児の性別を調べ、外形異常の有無を観察した。性比は、雄産児数を総産児数で除して算出した。また、哺育0日の生存率 $\left[\left(\text{生存産児数} / \text{産児数}\right) \times 100\right]$ および哺育4日の生存率 $\left[\left(\text{哺育4日の生存産児数} / \text{哺育0日の生存産児数}\right) \times 100\right]$ を求めた。死亡児は剖検し、胸腔および腹腔内の器官を除去した後、エタノールに固定して保存した。

b. 体重測定

哺育0日および4日に各腹雌雄別に合計体重を測定し、産児平均体重を計算した。

c. 剖検

哺育 4 日にエーテルを用いて安楽死させ剖検した。胸腔および腹腔内の器官は、一括して摘出し、各腹毎に10%ホルマリンに固定して保存した。屍体は、各腹毎にエタノールに固定して保存した。

F. 統計分析

交尾率および受胎率については χ^2 検定を行った。その他のすべてのデータは、個体毎に得られた値あるいは各腹児の平均値を1標本として、先ず、Bartlett 法により各群の分散の均一性について検定した。その結果、分散が均一であると判定された場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合には Dunnett 法²⁾あるいは Scheffé 法³⁾により対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が均一でなかった場合は、Kruskal-Wallis の順位検定⁴⁾を行い、群間に有意性が認められた場合に対照群と各被験物質投与群との差について Dunnett 型あるいは Scheffé 法の検定を行った。病理組織学的検査所見中、対照群および被験物質投与群の両方に共通してみられ、被験物質投与群で頻度および程度が増加している所見については Wilcoxon の順位和検定法により対照群と被験物質投与群の差について有意差検定を行った。有意水準は、5 %および1 %とした。

【結 果】

A. 反復投与毒性 (F. 動物所見)

1. 死亡動物

いずれの投与群の雌雄動物にも死亡は認められなかった。

2. 一般状態

a. 症状 (Tables 1, 2; Appendices 1-1~2-4)

200 mg/kg 投与群の雌雄動物において、3 回目投与後より、活動性の増加を示す動物がみられた。こうした動物の数は投与 1 週頃まで次第に増加し、雌雄動物それぞれ10および11匹に認められたが、その後は次第に減少し、投与23日以後はみられなくなった。この症状は投与後約20分頃より始まり、その後約30分程で消失した。400 mg/kg 投与群においては、全ての動物において、初回投与後より活動性の変化が観察され、投与回数の増加と共に症状の現われ方に変化が認められた。すなわち投与初期には、投与約20分後より活動性の減少が現われ、約30分後には回復したが、投与 3 日頃より先ず活動性の増加が発現し、その後に減少する動物も観察されるようになった。また、活動性の増加あるいは減少の後、腹臥位を呈する動物も少数みられた。雄動物においては、この症状は投与期間を通して観察されたが、雌動物においては、妊娠期間中は軽度となる傾向が認められた。800 mg/kg 投与群においても、投与20分後頃より全ての動物に毒性症状が認められたが、症状はさらに重篤で、活動性の減少から腹臥位を呈した。また、投与初期には昏睡に陥る動物も雌雄にそれぞれ数匹認められた。しかし、こうした症状も投与 5 時間後には消失していた。この投与群においても、投与開始後 1 週間を経過すると投与回数の増加と共に、特に雌動物においては妊娠期間中の症状の程度および発現動物数は減少した。しかし、この投与群においては、投与期間の後半期に、雌動物においては妊娠後半期に、軽度の眼球突出を示す動物が雌雄にそれぞれ 7 および 6 匹認められた。哺育期間中は、妊娠期間中に比較して、活動性の減少および昏睡状態を呈する動物数は増加し、またこうした症状を示す時間も延長する傾向にあった。

b. 尿検査 (Tables 3, 4; Appendices 3-1~4-4)

いずれのBD 投与群およびいずれの検査日においても、尿中に血色素が認められた動物の頻度に有意差はみられなかった。しかし、800 mg/kg 投与群の投与初日の検査において、

著しい量の血色素を排泄した動物が雌雄にそれぞれ3および2匹認められた。

3. 飼料消費量

a. 雄動物 (Table 5; Fig. 1; Appendices 5-1~5-4)

200 mg/kg 投与群の飼料消費量については、対照群に比較して殆ど差がみられなかった。400 mg/kg 投与群においては、投与開始後2週間の消費量が軽度 (7.6%~9.8%) ではあったが有意 ($p<0.05$ または $p<0.01$) に減少していた。800 mg/kg投与群においては、測定した全ての期間にわたって有意 ($p<0.05$ または $p<0.01$) に減少しており、減少の程度は約7% から20% であった。

b. 雌動物

(1) 交配前 (Table 6; Fig. 2; Appendices 6-1~6-4)

200 mg/kg 投与群の消費量は対照群と同等であった。400 mg/kg 投与群の消費量はいずれの週においても、対照群に比較して減少 (6.3%~7.5%) しており、投与開始後の1週間においてはこの減少は統計的に有意 ($p<0.05$) であった。800 mg/kg 投与群においても統計的に有意 ($p<0.01$) な減少が認められ、対照群に比較した減少の程度は約10% から15% であった。

(2) 妊娠期間 (Table 7; Fig. 2; Appendices 7-1~7-4)

200 mg/kg 投与群の消費量は、いずれの測定時においても対照群より減少 (2.3%~4.7%) していたが、統計的に有意なものではなかった。400 mg/kg 投与群においても消費量はすべての測定時に減少 (5.6%~10.2%) しており、妊娠前半期の減少は統計的に有意 ($p<0.05$ あるいは $p<0.01$) であった。800 mg/kg 投与群の消費量は、いずれの測定時においても有意 ($p<0.05$ あるいは $p<0.01$) に減少しており、その減少は対照群に比較して約9% から11% であった。

(3) 哺育期間 (Table 8; Fig. 2; Appendices 8-1~8-4)

BD 投与群の消費量はいずれの投与量群においても対照群に比較して減少 (8.8%~15.0%) しており、減少の程度は投与量に依存していた。しかし、消費量の個体差が比較的大きかったため、統計的有意差はみられなかった。

4. 体重

a. 雄動物 (Tables 9, 10; Fig. 3; Appendices 9-1~10-4)

200 mg/kg 投与群においては、対照群と比較して有意差はみられなかったが、400 および 800 mg/kg 投与群においては、投与開始 1 週間後の体重増加量が有意 ($p < 0.01$) に減少（それぞれ 32.0% および 78.6%）していた。これら被験物質投与群のその後の体重増加量に関しては、対照群との間に有意差はみられなかったが、投与初期の体重増加抑制による実重量の差は、実験終了時まで用量依存的に継続して認められた。

b. 雌動物

(1) 交配前 (Tables 11, 12; Fig. 4; Appendices 11-1~12-4)

200 mg/kg 投与群の平均体重は、対照群と殆ど同等であった。400 mg/kg 投与群における投与開始 1 週間後の体重増加量は、対照群に比較して約 30% 減少していたが、統計的有意差は認められなかった。投与開始 2 週間後においても、対照群と比較した実重量の差は継続して認められた。800 mg/kg 投与群においても、投与開始 1 週間後の体重増加量が有意 ($p < 0.01$) に減少 (80.1%) していた。1 週間後より 2 週間後における増加量には、対照群に比較して有意差はみられなかったが、実重量の差は継続して認められた。

(2) 妊娠期間 (Tables 13, 14; Fig. 4; Appendices 13-1~14-4)

被験物質投与群の妊娠期間中の体重増加量に関しても、対照群に比較して統計的に有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) な減少が散見されたが、投与量との関連は明確ではなかった。妊娠期間を通じて、妊娠 0 日の体重差が妊娠末期までそのまま継続していた。

(3) 哺育期間 (Tables 15, 16; Fig. 4; Appendices 15-1~16-4)

4 日間の哺育期間中の体重増加量に関して、対照群に比較して有意な変化はいずれの投与群においても認められなかった。従って、妊娠末期の実重量の差が継続的に示されていた。

5. 解剖時検査所見

a. 雄動物

(1) 血液学的検査 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

赤血球系の変化として 400 mg/kg 投与群のヘモグロビン量 (15.0 g/dl) および 800 mg/kg

投与群のヘモグロビン量 (14.9 g/dl) ならびにヘマトクリット値 (42.7%) が統計的に有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に減少していたが、その程度は極めて軽度のものであった。当研究所の14週齢雄ラットにおける過去5試験のヘモグロビン量およびヘマトクリット値は、それぞれ14.5~15.6 g/dl および40.1~44.3% であり、上記変化はすべてこれらの範囲内に含まれることから、毒性学的に無意味なものと考えられる。

(2) 血液生化学的検査 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)

すべてのBD 投与群において、血糖値の軽度ではあるが有意 ($p < 0.01$) な減少が認められた。対照群における血糖値の変動幅は、129~150 mg/dl であったが、200、400 および800 mg/kg 投与群ではそれぞれ105~138、115~141 および98~131 mg/dl であり、投与量依存的に減少していることから被験物質投与の影響と考えられる。また、200 および800 mg/kg 投与群においてカリウムの軽度ではあるが統計的に有意 ($p < 0.01$) な減少、および、これら投与群におけるリンの軽度ではあるが統計的に有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な増加が認められた。これらカリウムおよびリンの変化はいずれも正常範囲内の変化であり、毒性学的には無意味なものと考えられる。

(3) 剖検 (Table 19; Appendices 19-1~19-4)

被験物質投与に起因したと考えられる異常所見は認められなかった。

(4) 器官重量 (Table 20; Appendices 20-1~20-4)

400 および800 mg/kg 投与群の肝臓実重量が有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に減少していたが、体重比重量には有意差は認められなかった。この変化は体重減少を反映したものと考えられる。また、800 mg/kg 投与群においては、腎臓実重量の有意 ($p < 0.05$) な減少および精巣の比重量の有意 ($p < 0.05$) な増加が認められたが、いずれも体重減少に関連して生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

(5) 病理組織学的検査 (Table 21; Appendices 21-1~21-4)

各器官における観察所見の概要を以下に示す。

膀胱

400 mg/kg 投与群の5匹および800 mg/kg 投与群の7匹に粘膜上皮のびまん性過形成がみ

られ、400 mg/kg 投与群の 4 匹および800 mg/kg 投与群の12匹の粘膜固有層に線維化 (Photo 1, 2) が認められた。その他、対照群の 3 匹、400 mg/kg 投与群の 2 匹および 800 mg/kg 投与群の 1 匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

胸腺

異常所見は認められなかった。

肝臓

対照群および800 mg/kg 投与群に小葉周辺性の肝細胞の脂肪化、小肉芽腫、髓外造血、巣状壊死および壊死巣への好中球の浸潤がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

腎臓

対照群および800 mg/kg 投与群に、萎縮あるいは再生尿細管、eosinophilic body、尿細管の限局性拡張、腎盂の拡張がみられたが、両群間に頻度および程度の差はみられなかった。その他、対照群の 1 匹にリンパ球の浸潤が認められた。

副腎

異常所見は認められなかった。

脳

被験物質投与に起因したと考えられる異常所見は認められなかった。

心臓

対照群の 1 匹に心筋の線維化がみられ、対照群および800 mg/kg 投与群の各 1 匹に巣状壊死が認められた。

脾臓

対照群および800 mg/kg 投与群に、髓外造血巣および色素沈着がみられたが、両群間に頻度および程度の差はみられなかった。その他、対照群の 1 匹および800 mg/kg 投与群の 3 匹に、極めて軽度の鬱血が認められた。

精巣

800 mg/kg 投与群の 1 匹の精細管内に、多核巨細胞が認められた。

精巣上体

対照群および800 mg/kg 投与群に、リンパ球の浸潤、精子肉芽腫がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。

ハーダー腺

対照群の4匹および800 mg/kg 投与群の1匹にリンパ球の浸潤がみられた以外に変化は認められなかった。

b. 雌動物

(1) 剖検 (Tables 22-1~22-3; Appendices 22-1~22-4)

被験物質投与に起因すると思われる異常所見はなかった。

(2) 器官重量 (Table 23; Appendices 23-1~23-4)

400 mg/kg 投与群においては、肝臓の実重量が有意 ($p < 0.05$) に減少し、腎臓の比重量が有意 ($p < 0.05$) に増加していた。800 mg/kg 投与群においては、肝臓の実重量および比重量が有意 ($p < 0.01$) に減少し、また、腎臓の実重量も有意 ($p < 0.05$) に減少していた。これらの変化はいずれも体重減少に伴って生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

(3) 病理組織学的検査 (Tables 24-1~24-3; Appendices 24-1~24-4)

各器官における観察所見の概要は以下の通りである。

膀胱

400 mg/kg 投与群の1匹および800 mg/kg 投与群の3匹に上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg 投与群の2匹および800 mg/kg 投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた (Photo 3, 4)。その他、200 mg/kg 投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

胸腺

対照群を含む各投与群に萎縮がみられたが、400 mg/kg および800 mg/kg 投与群では、その頻度は対照群よりも高かった。その他、400 および800 mg/kg 投与群の各1匹に、出血が認められた。

脾臓

対照群を含む各群に髄外造血巣がみられたが、800 mg/kg 投与群では造血細胞の減少が認められる例が多かった。その他、対照群を含む各群に色素沈着がみられたが、各群間に頻度および程度の差はなかった。その他、400 mg/kg 投与群の2匹および800 mg/kg 投与群の3

匹に鬱血が見られ、対照群の 1 匹に線維化が認められた。

肝臓

対照群および800 mg/kg 投与群に、小葉周辺性の脂肪化、小肉芽腫および髄外造血がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

腎臓

対照群および800 mg/kg 投与群に、萎縮あるいは再生尿細管がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、800 mg/kg 投与群の 1 匹に、皮髄境界部の石灰沈着が認められた。

副腎

何ら異常所見は認められなかった。

脳

何ら異常所見は認められなかった。

心臓

対照群の 1 匹に巣状壊死がみられた。

ハーダー腺

対照群および800 mg/kg 投与群の各 1 匹に色素沈着の亢進がみられた。

卵巢

不妊であったために組織学的観察を行なった動物に異常所見は認められなかった。

B. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

a. 交配成績 (Table 25; Appendices 25-1~25-4)

交尾率はいずれの投与群においても100% であった。不妊動物が、対照群、200 および800 mg/kg 投与群にそれぞれ1、1および2匹認められたが、被験物質投与と関連する有意な変化ではなかった。その他生殖能に関連した観察項目においても、被験物質投与との関連を示す変化は認められなかった。

b. 出産率および妊娠期間 (Table 26; Appendices 26-1~26-4)

対照群を含むいずれの投与群においても、全ての妊娠動物が分娩し、妊娠期間に関しても異常はみられなかった。

c. 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態に関しても異常所見はなかった。

d. 黄体数、着床数および着床率 (Table 26; Appendices 26-1~26-4)

これら観察項目に関しても異常所見はなかった。

2. 産児観察所見 (Tables 27, 28; Appendices 27-1~27-4)

産児の形態観察および生存率に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。対照群に比較した雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg 投与群において僅か (10.2% および8.8%) ではあるが有意 ($p < 0.05$) に減少していた。この減少は母動物の哺育4日間の体重増加量が有意ではなかったが、対照群に比較して減少していたことに起因しているのかもしれないが、毒性学的意義は不明である。

【考 察】

雄ラットに対しては、交配期間を含む42日間、雌ラットに対しては、交配前、交配期間、妊娠期間および哺育期3日間を含む平均42日間、BDの200、400および800 mg/kgを経口投与し、F₀動物およびF₁産児に対する影響を観察した。

その結果、主要な変化として、行動あるいは一般状態に対する影響、血糖値の軽度の低下および膀胱における組織病理学的変化が認められた。

BD投与による毒性試験はいくつか報告されており^{5), 6), 7), 8)}、その中で共通して観察されている一般状態の変化としては、表現上の差異はあるものの、活動性の減少および睡眠であった。本試験においても、こうした変化は400 mg/kg以上の投与量において観察された。200 mg/kg投与群においては活動性はむしろ亢進したが、これはBDの生物学的活性^{9), 10)}に起因する変化と考え、毒性変化とは見なさなかった。400 mg/kg投与群においては、投与の進行に伴って活動性の現われ方はやや変化し、亢進を示す動物も発現した。また、こうした投与の進行に伴う変化は、BDの代謝速度の変化を示唆していると思われる。妊娠期間中に症状が軽減する傾向がみられた理由としては、この期間中動物の体重が急速に増加し、妊娠末期までに約50%~60%増加していたのに対し、BDの妊娠期間中の投与量が妊娠0日の体重に基づいていたことによるものと思われる。

雄動物の血液生化学的検査において、軽度ではあるが、統計的に有意な減少が観察された。Jedrychowskiら⁷⁾はBDの最高500 mg/kgまでの投与量を、Wistar系ラットに28日間経口投与したが、血糖値に関しては、統計的に有意差は認めていないがその平均値は投与量の増加とともにむしろ上昇していた。したがって本試験でみられた血糖値の軽度の減少は、被験物質投与によるものか否か、疑問視される。

膀胱の病理組織学的観察において、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層の線維化が400 mg/kg以上の投与量群において観察されたが、これらの所見は過去の報告には見当たらなかった。しかしBDは各種器官に充血をもたらすことが報告されており¹¹⁾、充血による透過性の亢進が被験物質あるいはその代謝物の組織中への移行を助長し、その結果これら物質が膀胱粘膜を刺激したと考えることができよう。

【結 論】

本試験条件下において、F₀ 動物に対する最大無影響量は投与した最少量の200 mg/kg 以下であり、最大無毒性量は200 mg/kg であった。また、F₁ 産児に対する最大無毒性量は400 mg/kg であると判断した。

【文 献】

- 1) Salewski, E. : Färbemethode zum makroskopischen nachweis von implantationsstellen am uterus der ratte. Naunyn-schmiedebergs arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 247 : 367 (1964)
- 2) Dunnett, C. W. : New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20 : 482-491 (1964)
- 3) Scheffè H. : A method for judging all contrasts in the analysis of variance. Biometrika 40 : 87-104 (1953)
- 4) Kruskal, W. H. and Wallis, W. A. : Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. 47 : 583-621 (1952)
- 5) Taberner, P. V., Rick, J. T. and Kerkut, G. A. : Metabolic factors involved in the interaction between pyrazole and butane-1,4-diol and 4-hydroxybuturic acid. Life Sciences 11 : 335-341 (1972)
- 6) Taberner, P. V. and Pearce M. J. : Hypothermic and toxic actions of 2-butyne-1,4-diol and other related diols in the rats. J. Pharm. Pharmac. 26 : 597-604 (1974)
- 7) Jedrychowski, R. A., Górny, R., Stetkiewicz, J. and Stetkiewicz, I. : Subacute oral toxicity of 1,4-butanediol in rats. Polish J. Occu. Med. 3 : 421-428 (1990)

- 8) National Toxicology Program : Developmental toxicity evaluation of 1,4-butanediol (CAS no. 110-63-4) administered by gavage to swiss (CD-1) mice on gestational days 6 through 15. Final Study Report. (1994)
- 9) Poidrugo, F. and Snead III, O. C. : 1-4-Butanediol, γ -hydroxybutyric acid and ethanol: relationships and interactions. Neuropharmacol. 23 : 109-113 (1984)
- 10) Sprince, H., Josephs Jr., J. A. and Wilpizeski, C. R. : Neuropharmacological effects of 1,4-butanediol and related congeners compared with those of gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone. Life Sciences 5 : 2041-2052 (1966)
- 11) Knyshova, S. P. : Biological effect and hygienic significance of 1,4-butanediol and 1,4-butanediol. Hyg. Sanit. 33 : 41-46 (1968)

【TABLE & FIGURE INDEX】

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Tables	(Appendices)	Table title
1	(1-1 ~ 1-4)	Summary of clinical signs of F ₀ males
2	(2-1 ~ 2-4)	Summary of clinical signs of F ₀ females
3	(3-1 ~ 3-4)	Summary of urinary occult blood test in F ₀ males
4	(4-1 ~ 4-4)	Summary of urinary occult blood test in F ₀ females
5	(5-1 ~ 5-4)	Food consumption of F ₀ males during treatment period
6	(6-1 ~ 6-4)	Food consumption of F ₀ females during pre-mating period
7	(7-1 ~ 7-4)	Food consumption of F ₀ females during pregnant period
8	(8-1 ~ 8-4)	Food consumption of F ₀ females during lactation period
9	(9-1 ~ 9-4)	Body weight of F ₀ males during treatment period
10	(10-1 ~10-4)	Body weight gain of F ₀ males during treatment period
11	(11-1 ~11-4)	Body weight of F ₀ females during pre-mating period
12	(12-1 ~12-4)	Body weight gain of F ₀ females during pre-mating period
13	(13-1 ~13-4)	Body weight of F ₀ females during pregnant period
14	(14-1 ~14-4)	Body weight gain of F ₀ females during pregnant period
15	(15-1 ~15-4)	Body weight of F ₀ females during lactation period
16	(16-1 ~16-4)	Body weight gain of F ₀ females during lactation period
17	(17-1 ~17-4)	Summary of hematological findings in F ₀ males
18	(18-1 ~18-4)	Summary of biochemical findings in F ₀ males
19	(19-1 ~19-4)	Summary of macroscopic findings in F ₀ males
20	(20-1 ~20-4)	Absolute and relative organ weight of F ₀ males
21	(21-1 ~21-4)	Summary of histopathological findings in F ₀ males
22-1~22-3	(22-1 ~22-4)	Summary of macroscopic findings in F ₀ females
23	(23-1 ~23-4)	Absolute and relative organ weight of F ₀ females
24-1~24-3	(24-1 ~24-4)	Summary of histopathological findings in F ₀ females
25	(25-1 ~25-4)	Summary of reproductive performance
26	(26-1 ~26-4)	Summary of development of F ₁ pups up to day 4 of lactation
27	(27-1 ~27-4)	Body weight of F ₁ pups up to day 4 of lactation
28		Summary of morphological findings in pups
	(28)	Physicochemical property
	(29)	Stability of the test article in the prepared sample
	(30)	Content of the test article in the prepared sample
	(31)	State of animal purchasing

Figures	Figure title
1	Average food consumption of F ₀ males during treatment period
2	Average food consumption of F ₀ females during treatment period
3	Average body weight of F ₀ males during treatment period
4	Average body weight of F ₀ females during treatment period

Table 1

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of clinical signs of F₀ males

Clinical signs	Dose groups (mg/kg)	Number of treated animals	Number of animals with clinical signs					
			Day of treatment					
			1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-43
Decreased activity	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	13	9	9	9	13	7
	800	13	5	6	9	7	11	8
Decreased activity with recumbency	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	13	7	8	3	2	3
Coma	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	5	2	1	1	1	1
Increased activity	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	7	11	6	0	0	0
	400	13	4	12	13	11	11	13
	800	13	1	5	5	6	5	4
Increased activity followed by decreased activity	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	9	11	9	7	9	10
	800	13	2	11	10	11	10	11
Increased activity followed by decreased activity with recumbency	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	1	0	0
	800	13	3	11	10	1	2	10

Vehicle control: distilled water

Table 1 (continued)

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of clinical signs of F₀ males

Clinical signs	Dose groups (mg/kg)	Number of treated animals	Number of animals with clinical signs					
			Day of treatment					
			1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-43
Increased activity followed by coma	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	3	2	1	0	1	0
Ocular bulging	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	0	0	0	0	6	6
Salivation	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	0	0	0	0	1	1

Vehicle control: distilled water

Table 2

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Dose groups (mg/kg)	Number of treated animals	Number of animals with clinical signs					
			Day of treatment					
			1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-Sacrifice
Decreased activity	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	13	12	10	13	9	9
	800	13	12	9	11	11	12	11
Decreased activity with recumbency	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	1	0	0	0	0	4
	800	13	12	2	4	0	1	5
Coma	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	7	0	0	0	1	7
Increased activity	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	9	10	8	1	0	0
	400	13	5	10	13	8	3	0
	800	13	2	4	8	7	7	0
Increased activity followed by decreased activity	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	1	0	0
	400	13	8	10	9	12	4	0
	800	13	4	8	10	11	6	1
Increased activity followed by decreased activity with recumbency	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	1	0	0	0
	800	13	1	4	2	0	0	0

Vehicle control: distilled water

Table 2 (continued)

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Dose groups (mg/kg)	Number of treated animals	Number of animals with clinical signs					
			Day of treatment					
			1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-Sacrifice
Increased activity followed by coma	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	0	1	0	0	0	0
Ocular bulging	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	0	0	0	0	6	5
Salivation	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	800	13	0	0	0	1	0	0
Depilation	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	200	13	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	1	1
	800	13	0	0	0	0	0	0

Vehicle control: distilled water

Table 3

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of urinary occult blood test in F₀ males

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
<u>1st day of treatment</u>				
No. of animals examined	12	12	13	13
No. of animals showed negative	11 (91.7) a	11 (91.7)	12 (92.3)	10 (76.9)
<u>Grade</u>				
Trace	1 (8.3)	1 (8.3)	1 (7.7)	1 (7.7)
Slight	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0
Marked	0	0	0	2 (15.4)
<u>8th day of treatment</u>				
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals showed negative	9 (75.0)	9 (75.0)	9 (75.0)	11 (91.7)
<u>Grade</u>				
Trace	2 (16.7)	1 (8.3)	3 (25.0)	1 (8.3)
Slight	0	1 (8.3)	0	0
Moderate	0	0	0	0
Marked	1 (8.3)	1 (8.3)	0	0
<u>15th day of treatment</u>				
No. of animals examined	8	7	11	10
No. of animals showed negative	7 (87.5)	5 (71.4)	10 (90.9)	9 (90.0)
<u>Grade</u>				
Trace	1 (12.5)	0	0	1 (10.0)
Slight	0	2 (28.6)	0	0
Moderate	0	0	1 (9.1)	0
Marked	0	0	0	0

Vehicle control: distilled water

a: frequencies (%)

Table 4

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of urinary occult blood test in F₀ females

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
<u>1st day of treatment</u>				
No. of animals examined	12	12	13	13
No. of animals showed negative	9 (75.0) ^a	9 (75.0)	13 (100.0)	7 (53.8)
<u>Grade</u>				
Trace	3 (25.0)	2 (16.7)	0	3 (23.1)
Slight	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0
Marked	0	1 (8.3)	0	3 (23.1)
<u>8th day of treatment</u>				
No. of animals examined	13	13	12	13
No. of animals showed negative	9 (69.2)	10 (76.9)	8 (66.7)	10 (76.9)
<u>Grade</u>				
Trace	4 (30.8)	1 (7.7)	3 (25.0)	2 (15.4)
Slight	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0
Marked	0	2 (15.4)	1 (8.3)	1 (7.7)
<u>15th day of treatment</u>				
No. of animals examined	11	13	13	13
No. of animals showed negative	8 (72.7)	9 (69.2)	8 (61.5)	11 (84.6)
<u>Grade</u>				
Trace	3 (27.3)	4 (30.8)	2 (15.4)	0
Slight	0	0	1 (7.7)	1 (7.7)
Moderate	0	0	2 (15.4)	0
Marked	0	0	0	1 (7.7)

Vehicle control: distilled water

a: frequencies (%)

Table 5

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F₀ males during treatment period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Treatment Weeks				
1	198.2 $\pm$ 13.9 (13)	199.1 $\pm$ 13.8 (13)	183.1 $\pm$ 9.8* (13)	159.5 $\pm$ 15.1** (13)
2	197.6 $\pm$ 12.0 (13)	192.8 $\pm$ 14.1 (13)	178.3 $\pm$ 12.2** (13)	162.7 $\pm$ 15.0** (13)
5	187.9 $\pm$ 11.8 (13)	193.4 $\pm$ 15.2 (13)	178.3 $\pm$ 8.8 (13)	174.9 $\pm$ 11.2* (13)
6	161.5 $\pm$ 9.8 (13)	164.4 $\pm$ 11.8 (13)	154.0 $\pm$ 7.9 (13)	145.9 $\pm$ 9.1** (13)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, p<0.05

** :Significant difference from control, p<0.01

Table 6

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F₀ females during pre-mating period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Treatment Weeks				
1	140.4 $\pm$ 13.1 (13)	139.9 $\pm$ 8.7 (13)	129.9 $\pm$ 9.0* (13)	118.7 $\pm$ 8.9** (13)
2	141.9 $\pm$ 11.7 (13)	145.5 $\pm$ 11.2 (13)	133.0 $\pm$ 7.4 (13)	128.1 $\pm$ 9.5** (13)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, $p < 0.05$ ** :Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 7

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F₀ females during pregnant period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Pregnant Days				
0~ 7	173.2 $\pm$ 14.2 (12)	165.1 $\pm$ 13.2 (12)	157.8 $\pm$ 10.2* (13)	158.3 $\pm$ 16.7* (11)
7~ 14	183.6 $\pm$ 17.6 (12)	177.3 $\pm$ 15.3 (12)	164.8 $\pm$ 8.6** (13)	167.6 $\pm$ 13.2* (11)
14~ 20	154.1 $\pm$ 12.9 (12)	150.6 $\pm$ 14.3 (12)	145.5 $\pm$ 9.4 (13)	137.7 $\pm$ 10.5** (11)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, p<0.05

** :Significant difference from control, p<0.01

Table 8

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F. females during lactation period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Postpartum Days				
0~4	121.9 $\pm$ 12.5 (12)	111.2 $\pm$ 24.7 (12)	108.6 $\pm$ 21.6 (13)	103.6 $\pm$ 22.0 (11)

Vehicle control : distilled water

Table 9

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₀ males during treatment period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)		0	200	400	800
Treatment Weeks					
1	(Init. wt.)	296.6 $\pm$ 7.3 (13)	296.7 $\pm$ 8.2 (13)	297.0 $\pm$ 7.3 (13)	296.6 $\pm$ 8.2 (13)
2		335.0 $\pm$ 17.1 (13)	335.3 $\pm$ 16.3 (13)	323.1 $\pm$ 12.8 (13)	304.8 $\pm$ 14.6** (13)
3		371.5 $\pm$ 20.6 (13)	372.3 $\pm$ 23.0 (13)	357.6 $\pm$ 16.6 (13)	335.0 $\pm$ 15.5** (13)
4		395.9 $\pm$ 23.8 (13)	398.7 $\pm$ 25.4 (13)	381.4 $\pm$ 19.1 (13)	358.5 $\pm$ 18.7** (13)
5		424.3 $\pm$ 27.7 (13)	428.2 $\pm$ 28.3 (13)	405.2 $\pm$ 21.1 (13)	381.5 $\pm$ 17.3** (13)
6		446.2 $\pm$ 30.1 (13)	454.1 $\pm$ 31.7 (13)	425.3 $\pm$ 20.9 (13)	402.7 $\pm$ 18.9** (13)
7		463.4 $\pm$ 31.1 (13)	470.0 $\pm$ 32.7 (13)	441.4 $\pm$ 23.2 (13)	416.4 $\pm$ 18.9** (13)

Vehicle control : distilled water

**:Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 10

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F₀ males during treatment period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Treatment Weeks				
1~ 2	38.4 $\pm$ 10.5 (13)	38.5 $\pm$ 10.0 (13)	26.1 $\pm$ 8.2** (13)	8.2 $\pm$ 9.5** (13)
2~ 3	36.5 $\pm$ 5.3 (13)	37.1 $\pm$ 9.5 (13)	34.5 $\pm$ 5.3 (13)	30.2 $\pm$ 6.6 (13)
3~ 4	24.4 $\pm$ 6.1 (13)	26.4 $\pm$ 4.3 (13)	23.8 $\pm$ 5.0 (13)	23.4 $\pm$ 5.0 (13)
4~ 5	28.4 $\pm$ 7.5 (13)	29.4 $\pm$ 6.4 (13)	23.8 $\pm$ 6.0 (13)	23.0 $\pm$ 9.7 (13)
5~ 6	21.9 $\pm$ 5.2 (13)	25.9 $\pm$ 5.8 (13)	20.1 $\pm$ 4.1 (13)	21.3 $\pm$ 5.5 (13)
6~ 7	17.2 $\pm$ 5.0 (13)	15.9 $\pm$ 3.7 (13)	16.0 $\pm$ 4.0 (13)	13.7 $\pm$ 2.8 (13)
1~ 3	74.9 $\pm$ 14.3 (13)	75.6 $\pm$ 17.6 (13)	60.6 $\pm$ 12.5* (13)	38.4 $\pm$ 11.8** (13)
1~ 4	99.3 $\pm$ 17.5 (13)	102.0 $\pm$ 20.3 (13)	84.4 $\pm$ 14.8 (13)	61.8 $\pm$ 14.9** (13)
1~ 5	127.7 $\pm$ 21.1 (13)	131.5 $\pm$ 23.5 (13)	108.2 $\pm$ 17.4* (13)	84.8 $\pm$ 14.7** (13)
1~ 6	149.5 $\pm$ 23.7 (13)	157.4 $\pm$ 26.8 (13)	128.3 $\pm$ 17.8* (13)	106.1 $\pm$ 16.5** (13)
1~ 7	166.8 $\pm$ 24.9 (13)	173.3 $\pm$ 27.8 (13)	144.4 $\pm$ 19.6* (13)	119.7 $\pm$ 16.4** (13)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, $p < 0.05$ ** :Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 11

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₀ females during pre-mating period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)		0	200	400	800
Treatment Weeks					
1	(Init. wt.)	216.5 $\pm$ 6.5 (13)	216.6 $\pm$ 7.4 (13)	216.1 $\pm$ 6.3 (13)	216.0 $\pm$ 6.3 (13)
2		235.1 $\pm$ 12.6 (13)	232.2 $\pm$ 10.9 (13)	229.2 $\pm$ 7.3 (13)	219.7 $\pm$ 8.8** (13)
3		251.8 $\pm$ 15.4 (13)	251.8 $\pm$ 16.2 (13)	245.4 $\pm$ 7.4 (13)	237.9 $\pm$ 11.2* (13)
4			268.8 (1)		280.4 (1)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, $p < 0.05$ ** :Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 12

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F₀ females during pre-mating period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Treatment Weeks				
1~ 2	18.6 $\pm$ 7.6 (13)	15.6 $\pm$ 5.5 (13)	13.1 $\pm$ 6.3 (13)	3.7 $\pm$ 6.9** (13)
2~ 3	16.7 $\pm$ 4.9 (13)	19.7 $\pm$ 7.6 (13)	16.2 $\pm$ 3.6 (13)	18.2 $\pm$ 4.6 (13)
3~ 4		17.0 (1)		32.9 (1)
1~ 3	35.3 $\pm$ 10.4 (13)	35.2 $\pm$ 11.0 (13)	29.3 $\pm$ 7.9 (13)	21.9 $\pm$ 8.2** (13)
1~ 4		45.5 (1)		61.2 (1)

Vehicle control : distilled water

**:Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 13

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₀ females during pregnant period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Pregnant Days				
0	259.2 $\pm$ 14.9 (12)	260.7 $\pm$ 16.5 (12)	252.5 $\pm$ 7.8 (13)	242.1 $\pm$ 13.5* (11)
7	300.4 $\pm$ 20.1 (12)	292.5 $\pm$ 19.3 (12)	285.3 $\pm$ 10.9 (13)	279.4 $\pm$ 18.0* (11)
14	339.0 $\pm$ 22.6 (12)	329.4 $\pm$ 22.2 (12)	318.1 $\pm$ 11.4* (13)	312.7 $\pm$ 21.0** (11)
20	412.9 $\pm$ 23.3 (12)	401.1 $\pm$ 27.1 (12)	391.0 $\pm$ 18.5 (13)	382.4 $\pm$ 29.4* (11)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, $p < 0.05$ ** :Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 14

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F₀ females during pregnant period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Pregnant Days				
0~7	41.2 $\pm$ 7.5 (12)	31.9 $\pm$ 7.2** (12)	32.7 $\pm$ 5.5** (13)	37.3 $\pm$ 6.7 (11)
7~14	38.7 $\pm$ 3.5 (12)	36.8 $\pm$ 6.1 (12)	32.9 $\pm$ 4.4** (13)	33.3 $\pm$ 4.3* (11)
14~20	73.8 $\pm$ 4.6 (12)	71.8 $\pm$ 6.5 (12)	72.9 $\pm$ 9.4 (13)	69.7 $\pm$ 12.2 (11)
0~14	79.8 $\pm$ 9.9 (12)	68.7 $\pm$ 11.5* (12)	65.6 $\pm$ 6.8** (13)	70.6 $\pm$ 8.4 (11)
0~20	153.7 $\pm$ 11.7 (12)	140.5 $\pm$ 15.1 (12)	138.5 $\pm$ 13.2* (13)	140.3 $\pm$ 17.1 (11)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, $p < 0.05$ ** :Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 15

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₀ females during lactation period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Postpartum Days				
0	308.2 $\pm$ 32.1 (12)	302.4 $\pm$ 20.1 (12)	279.1 $\pm$ 12.1* (13)	276.8 $\pm$ 21.7* (11)
4	335.1 $\pm$ 23.4 (12)	321.1 $\pm$ 26.0 (12)	305.6 $\pm$ 16.9** (13)	296.5 $\pm$ 23.4** (11)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, $p < 0.05$ ** :Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 16

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F₀ females during lactation period (g); average $\pm$ S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Postpartum Days				
0 ~ 4	26.9 $\pm$ 14.0 (12)	18.6 $\pm$ 11.0 (12)	26.6 $\pm$ 11.8 (13)	19.7 $\pm$ 11.7 (11)

Vehicle control : distilled water

Table 17

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of hematological findings in Fo males

Group	R B C (x10 ⁴ /mm ³)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (%)	Platelet (x10 ⁴ /mm ³)
Vehicle control	(13) 821 ±24	(13) 15.6 ±0.6	(13) 44.4 ±1.5	(13) 54.1 ±1.9	(13) 19.0 ±0.7	(13) 35.1 ±0.6	(13) 102.9 ±12.3
200 mg/kg	(13) 805 ±34	(13) 15.1 ±0.4	(13) 43.5 ±1.3	(13) 54.1 ±2.0	(13) 18.8 ±0.7	(13) 34.8 ±0.3	(13) 100.1 ±11.0
400 mg/kg	(13) 803 ±37	(13) 15.0* ±0.6	(13) 42.9 ±1.8	(13) 53.5 ±1.2	(13) 18.6 ±0.4	(13) 34.8 ±0.3	(13) 104.7 ±10.3
800 mg/kg	(13) 797 ±22	(13) 14.9** ±0.5	(13) 42.7* ±1.5	(13) 53.6 ±2.0	(13) 18.7 ±0.7	(13) 34.9 ±0.3	(13) 97.8 ±8.0

Group	W B C (x100/mm ³)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
Vehicle control	(13) 71 ±14	(13) 0 ±0	(13) 14 ±7	(13) 1 ±1	(13) 0 ±0	(13) 3 ±2	(13) 82 ±7
200 mg/kg	(13) 58* ±14	(13) 0 ±0	(13) 15 ±6	(13) 1 ±1	(13) 0 ±0	(13) 4 ±2	(13) 79 ±8
400 mg/kg	(13) 54** ±10	(13) 0 ±0	(13) 17 ±7	(13) 1 ±1	(13) 0 ±0	(13) 4 ±2	(13) 78 ±8
800 mg/kg	(13) 67 ±14	(13) 0 ±0	(13) 14 ±7	(13) 1 ±2	(13) 0 ±0	(13) 4 ±3	(13) 80 ±9

Parameter: average S.D.

(): N

Vehicle control : distilled water

*: Significantly different from control, p<0.05

**: Significantly different from control, p<0.01

Table 18

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of biochemical findings in Fo males

Group	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total bilirubin (mg/dl)
Vehicle control	(13) 5.6 ±0.2	(13) 3.0 ±0.1	(13) 1.12 ±0.08	(13) 16 ±1	(13) 0.7 ±0.1	(13) 139 ±7	(13) 29 ±3	(13) 0.06 ±0.02
200 mg/kg	(13) 5.5 ±0.1	(13) 2.9 ±0.1	(13) 1.17 ±0.12	(13) 15 ±2	(13) 0.7 ±0.0	(13) 127** ±10	(13) 27 ±6	(13) 0.06 ±0.04
400 mg/kg	(13) 5.4 ±0.2	(13) 2.9 ±0.1	(13) 1.16 ±0.13	(13) 15 ±2	(13) 0.7 ±0.1	(13) 128** ±9	(13) 27 ±4	(13) 0.07 ±0.02
800 mg/kg	(13) 5.4 ±0.2	(13) 2.9 ±0.1	(13) 1.16 ±0.14	(13) 17 ±3	(13) 0.7 ±0.1	(13) 116** ±9	(13) 29 ±4	(13) 0.06 ±0.03

Group	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	Ca (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)	ALP (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	γ-GTP (U/l)
Vehicle control	(13) 143.9 ±0.9	(13) 4.17 ±0.20	(13) 108.7 ±1.3	(13) 8.5 ±0.2	(13) 5.6 ±0.3	(13) 303 ±44	(13) 31 ±4	(13) 68 ±6	(13) 0 ±0
200 mg/kg	(13) 144.5 ±0.7	(13) 3.92** ±0.17	(13) 108.8 ±1.1	(13) 8.6 ±0.2	(13) 6.0* ±0.5	(13) 280 ±27	(13) 30 ±5	(13) 65 ±10	(13) 0 ±0
400 mg/kg	(13) 143.2 ±0.8	(13) 4.08 ±0.20	(13) 108.6 ±1.3	(13) 8.6 ±0.3	(13) 5.8 ±0.3	(13) 297 ±34	(13) 34 ±6	(13) 66 ±7	(13) 0 ±0
800 mg/kg	(13) 143.6 ±1.3	(13) 3.89** ±0.15	(13) 108.2 ±1.0	(13) 8.7 ±0.2	(13) 6.5** ±0.5	(13) 307 ±48	(13) 29 ±3	(13) 66 ±7	(13) 0 ±0

Parameter: average S.D.
(): N

Vehicle control : distilled water

*: Significantly different from control, p<0.05
**: Significantly different from control, p<0.01

Table 19

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of macroscopic findings in Fo males

Group Grade	Control		200 mg/kg		400 mg/kg		800 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
small	13	0	13	0	12	1	12	1
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dilated pelvis								
of the left side	12	1	13	0	13	0	13	0
dilated pelvis								
of the right side	12	1	13	0	13	0	13	0
indented spots	13	0	12	1	13	0	13	0
reddish cortico-medullary								
junction	13	0	12	1	13	0	13	0
cyst	13	0	12	1	13	0	13	0
(Ureter)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dilated lumen								
of the left side	12	1	13	0	13	0	13	0
(Testis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
small and edematous								
in the left side	13	0	12	1	13	0	13	0
(Epididymis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
yellowish white elevated area	13	0	13	0	12	1	12	1
(Brain)	[13]		[13]		[13]		[13]	
partial defect and								
replaced with clear fluid	12	1	13	0	13	0	13	0
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
yellowish	11	2	11	2	10	3	13	0
accentuated lobular pattern	10	3	9	4	10	3	13	0
pale colored mottle	13	0	12	1	13	0	13	0
whitish area	13	0	13	0	13	0	12	1
dark color	13	0	13	0	13	0	12	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 20

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weight of F₀ males; average $\pm$ S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)		0	200	400	800
Final body weight	(g)	434.3 ± 29.3 (13)	443.5 ± 30.7 (13)	415.3 ± 20.4 (13)	390.8 ± 18.0** (13)
Liver	(g)	12.15 ± 1.36 ^{a)} (13) 2.79 ± 0.20 ^{b)}	11.70 ± 0.96 (13) 2.64 ± 0.13	11.09 ± 1.02* (13) 2.67 ± 0.17	10.34 ± 0.83** (13) 2.64 ± 0.15
Kidneys	(g)	2.82 ± 0.20 (13) 0.65 ± 0.04	2.86 ± 0.22 (13) 0.65 ± 0.03	2.64 ± 0.18 (13) 0.64 ± 0.03	2.62 ± 0.16* (13) 0.67 ± 0.03
Thymus	(mg)	348.8 ±103.5 (13) 80.9 ± 25.5	343.3 ± 94.8 (13) 77.6 ± 21.6	317.8 ± 79.6 (13) 76.2 ± 17.2	286.2 ± 69.8 (13) 73.3 ± 18.0
Testes	(g)	3.06 ± 0.20 (13) 0.71 ± 0.05	3.11 ± 0.37 (13) 0.70 ± 0.08	3.14 ± 0.21 (13) 0.76 ± 0.06	3.06 ± 0.17 (13) 0.78 ± 0.07*
Epididymides	(g)	1.19 ± 0.06 (13) 0.28 ± 0.02	1.16 ± 0.09 (13) 0.26 ± 0.02	1.17 ± 0.08 (13) 0.28 ± 0.03	1.13 ± 0.08 (13) 0.29 ± 0.02

a) : Absolute weight

b) : Relative weight(g or mg per 100g body weight)

Vehicle control : distilled water

* : Significant difference from control, p<0.05

** : Significant difference from control, p<0.01

Table 21

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo males

Group Grade	Control					200 mg/kg					400 mg/kg					800 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Urinary bladder)	[13]					[13]					[12]					[13]				
diffuse hyperplasia of epithelium	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	7	5	0	0	0	6	7	0	0	0 *
fibrosis in lamina propria	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	8	4	0	0	0	1	12	0	0	0 **
infiltration of lymphocytes in lamina propria	10	3	0	0	0	13	0	0	0	0	10	2	0	0	0	12	1	0	0	0
(Thymus)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Liver)	[13]					[0]					[0]					[13]				
fatty change of hepatocyte in peripheral zone	0	0	8	5	0											0	0	10	3	0
microgranuloma	3	9	1	0	0											2	11	0	0	0
extramedullary hematopoiesis	12	1	0	0	0											11	2	0	0	0
focal necrosis	11	1	1	0	0											12	0	1	0	0
infiltration of neutrophils in necrotic focus	11	1	1	0	0											12	1	0	0	0
(Kidney)	[13]					[0]					[0]					[13]				
atrophic/regenerated tubule	1	10	2	0	0											2	11	0	0	0
eosinophilic body	5	5	3	0	0											9	2	2	0	0
focal dilatation of tubule in medulla	12	0	1	0	0											12	0	1	0	0
dilatation of pelvis	11	0	2	0	0											11	0	2	0	0
infiltration of lymphocytes	12	0	1	0	0											13	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Brain)	[13]					[0]					[0]					[13]				
partial defect	12	0	1	0	0											13	0	0	0	0
(Heart)	[13]					[0]					[0]					[13]				
myocardial fibrosis	12	1	0	0	0											13	0	0	0	0
focal necrosis	12	1	0	0	0											12	1	0	0	0
(Spleen)	[13]					[0]					[0]					[13]				
extramedullary hematopoiesis	0	6	7	0	0											0	4	9	0	0
deposits of pigment	0	2	11	0	0											0	0	13	0	0
congestion	12	1	0	0	0											10	3	0	0	0
(Testis)	[13]					[0]					[0]					[13]				
multinucleated giant cells in seminiferous tubules	13	0	0	0	0											12	1	0	0	0
(Epididymis)	[13]					[0]					[0]					[13]				
infiltration of lymphocytes	5	5	3	0	0											5	6	2	0	0
spermatic granuloma	10	0	3	0	0											11	0	2	0	0
(Harderian gland)	[13]					[0]					[0]					[13]				
infiltration of lymphocytes	9	3	1	0	0											12	1	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe
 [], Number of animals examined

* : Significant difference from control, $p < 0.05$
 ** : Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 22-1

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of macroscopic findings in Fo females

Group Grade	Control		200 mg/kg		400 mg/kg		800 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
small	12	1	13	0	11	2	12	1
dark colored area	13	0	13	0	13	0	12	1
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
deformity	12	1	13	0	13	0	13	0
pale colored area	12	1	13	0	13	0	13	0
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
pale colored area	13	0	12	1	13	0	13	0
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark color	13	0	13	0	13	0	12	1
(Mammary gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
developed	13	0	13	0	13	0	12	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 22-2

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of macroscopic findings in Fo females
(Subjected to autopsy on day 4 of lactation)

Group Grade	Control		200 mg/kg		400 mg/kg		800 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thymus)	[12]		[12]		[13]		[11]	
small	11	1	12	0	11	2	10	1
dark colored area	12	0	12	0	13	0	10	1
(Spleen)	[12]		[12]		[13]		[11]	
deformity	11	1	12	0	13	0	11	0
pale colored area	11	1	12	0	13	0	11	0
(Kidney)	[12]		[12]		[13]		[11]	
pale colored area	12	0	11	1	13	0	11	0
(Liver)	[12]		[12]		[13]		[11]	
dark color	12	0	12	0	13	0	10	1
(Mammary gland)	[12]		[12]		[13]		[11]	
developed	12	0	12	0	13	0	10	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 22-3

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of macroscopic findings in Fo females
(Not pregnant)

Group Grade	Control		200 mg/kg		400 mg/kg		800 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thymus)	[1]		[1]		[0]		[2]	
small	1	0	1	0			2	0
dark colored area	1	0	1	0			2	0
(Spleen)	[1]		[1]		[0]		[2]	
deformity	1	0	1	0			2	0
pale colored area	1	0	1	0			2	0
(Kidney)	[1]		[1]		[0]		[2]	
pale colored area	1	0	1	0			2	0
(Liver)	[1]		[1]		[0]		[2]	
dark color	1	0	1	0			2	0
(Mammary gland)	[1]		[1]		[0]		[2]	
developed	1	0	1	0			2	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 23

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weight of F₀ females; average $\pm$ S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)		0	200	400	800
Final body weight	(g)	335.1 $\pm$ 23.4 (12)	321.1 $\pm$ 26.0 (12)	305.6 $\pm$ 16.9** (13)	296.5 $\pm$ 23.4** (11)
Liver	(g)	14.27 $\pm$ 0.92 ^{a)} (12) 4.26 $\pm$ 0.15 ^{b)}	13.36 $\pm$ 1.40 (12) 4.17 $\pm$ 0.33	13.08 $\pm$ 1.07* (13) 4.28 $\pm$ 0.26	11.68 $\pm$ 1.15** (11) 3.94 $\pm$ 0.21**
Kidneys	(g)	2.07 $\pm$ 0.15 (12) 0.62 $\pm$ 0.06	2.07 $\pm$ 0.21 (12) 0.65 $\pm$ 0.05	2.09 $\pm$ 0.18 (13) 0.69 $\pm$ 0.06*	1.88 $\pm$ 0.17* (11) 0.63 $\pm$ 0.04
Thymus	(mg)	231.7 $\pm$ 88.9 (12) 68.6 $\pm$ 23.5	221.1 $\pm$ 66.1 (12) 68.1 $\pm$ 16.7	188.9 $\pm$ 62.0 (13) 61.3 $\pm$ 18.1	167.0 $\pm$ 57.5 (11) 55.5 $\pm$ 15.9

a) : Absolute weight

b) : Relative weight(g or mg per 100g body weight)

Vehicle control : distilled water

* :Significant difference from control, p<0.05

** :Significant difference from control, p<0.01

Table 24-1

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo females

Group Grade	Control					200 mg/kg					400 mg/kg					800 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Urinary bladder)	[13]					[12]					[13]					[13]				
diffuse hyperplasia	13	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	1	0	0	0	10	3	0	0	0
of epithelium	13	0	0	0	0	12	0	0	0	0	11	2	0	0	0	1	12	0	0	0
fibrosis in lamina propria																				0**
infiltration of lymphocytes																				
in lamina propria	13	0	0	0	0	11	1	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
(Thymus)	[13]					[13]					[13]					[13]				
atrophy	12	0	1	0	0	12	1	0	0	0	8	2	3	0	0	6	2	5	0	0
hemorrhage	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	1	0	0	0	12	0	1	0	0
(Spleen)	[13]					[13]					[13]					[13]				
extramedullary hematopoiesis	0	1	4	8	0	0	1	5	7	0	0	0	5	8	0	0	4	6	3	0
deposits of pigment	0	0	13	0	0	0	1	12	0	0	0	1	12	0	0	0	3	10	0	0
congestion	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	11	0	2	0	0	10	0	3	0	0
fibrosis	12	0	1	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
(Liver)	[13]					[0]					[0]					[13]				
fatty change of hepatocyte																				
in peripheral zone	12	0	1	0	0											12	1	0	0	0
microgranuloma	7	6	0	0	0											6	7	0	0	0
extramedullary hematopoiesis	9	4	0	0	0											10	3	0	0	0
(Kidney)	[13]					[0]					[0]					[13]				
atrophic/regenerated tubule	8	5	0	0	0											6	7	0	0	0
calcification in																				
cortico-medullary junction	13	0	0	0	0											12	0	1	0	0
(Adrenal gland)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Brain)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Heart)	[13]					[0]					[0]					[13]				
focal necrosis	12	1	0	0	0											13	0	0	0	0
(Harderian gland)	[13]					[0]					[0]					[13]				
increased pigmentation	12	0	1	0	0											12	0	1	0	0
(Ovary)	[1]					[1]					[0]					[2]				
abnormality	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						2	0	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe ** : Significant difference from control, p<0.01
[], Number of animals examined

Table 24-2

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo females
(Subjected to autopsy on day 4 of lactation)

Group Grade	Control					200 mg/kg					400 mg/kg					800 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Urinary bladder)	[12]					[11]					[13]					[11]				
diffuse hyperplasia of epithelium	12	0	0	0	0	11	0	0	0	0	12	1	0	0	0	9	2	0	0	0
fibrosis in lamina propria	12	0	0	0	0	11	0	0	0	0	11	2	0	0	0	1	10	0	0	0*
infiltration of lymphocytes in lamina propria	12	0	0	0	0	10	1	0	0	0	13	0	0	0	0	11	0	0	0	0
(Thymus)	[12]					[12]					[13]					[11]				
atrophy	11	0	1	0	0	11	1	0	0	0	8	2	3	0	0	4	2	5	0	0*
hemorrhage	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	1	0	0	0	10	0	1	0	0
(Spleen)	[12]					[12]					[13]					[11]				
extramedullary hematopoiesis	0	0	4	8	0	0	0	5	7	0	0	0	5	8	0	0	2	6	3	0
deposits of pigment	0	0	12	0	0	0	1	11	0	0	0	1	12	0	0	0	3	8	0	0
congestion	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	11	0	2	0	0	8	0	3	0	0
fibrosis	11	0	1	0	0	12	0	0	0	0	13	0	0	0	0	11	0	0	0	0
(Liver)	[12]					[0]					[0]					[11]				
fatty change of hepatocyte in peripheral zone	12	0	0	0	0											10	1	0	0	0
microgranuloma	7	5	0	0	0											6	5	0	0	0
extramedullary hematopoiesis	8	4	0	0	0											8	3	0	0	0
(Kidney)	[12]					[0]					[0]					[11]				
atrophic/regenerated tubule calcification in cortico-medullary junction	7	5	0	0	0											5	6	0	0	0
(Adrenal gland)	[12]					[0]					[0]					[11]				
abnormality	12	0	0	0	0											11	0	0	0	0
(Brain)	[12]					[0]					[0]					[11]				
abnormality	12	0	0	0	0											11	0	0	0	0
(Heart)	[12]					[0]					[0]					[11]				
focal necrosis	12	0	0	0	0											11	0	0	0	0
(Harderian gland)	[12]					[0]					[0]					[11]				
increased pigmentation	11	0	1	0	0											10	0	1	0	0
(Ovary)	[0]					[0]					[0]					[0]				
abnormality																				

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe
[], Number of animals examined

* : Significant difference from control, $p < 0.05$
** : Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 24-3

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo females
(Not pregnant)

Group Grade	Control					200 mg/kg					400 mg/kg					800 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Urinary bladder)	[1]					[1]					[0]					[2]				
diffuse hyperplasia																				
of epithelium	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						1	1	0	0	0
fibrosis in lamina propria	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						0	2	0	0	0
infiltration of lymphocytes																				
in lamina propria	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						2	0	0	0	0
(Thymus)	[1]					[1]					[0]					[2]				
atrophy	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						2	0	0	0	0
hemorrhage	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						2	0	0	0	0
(Spleen)	[1]					[1]					[0]					[2]				
extramedullary hematopoiesis	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0						0	2	0	0	0
deposits of pigment	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0						0	0	2	0	0
congestion	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						2	0	0	0	0
fibrosis	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						2	0	0	0	0
(Liver)	[1]					[0]					[0]					[2]				
fatty change of hepatocyte																				
in peripheral zone	0	0	1	0	0											2	0	0	0	0
microgranuloma	0	1	0	0	0											0	2	0	0	0
extramedullary hematopoiesis	1	0	0	0	0											2	0	0	0	0
(Kidney)	[1]					[0]					[0]					[2]				
atrophic/regenerated tubule	1	0	0	0	0											1	1	0	0	0
calcification in																				
cortico-medullary junction	1	0	0	0	0											2	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[1]					[0]					[0]					[2]				
abnormality	1	0	0	0	0											2	0	0	0	0
(Brain)	[1]					[0]					[0]					[2]				
abnormality	1	0	0	0	0											2	0	0	0	0
(Heart)	[1]					[0]					[0]					[2]				
focal necrosis	0	1	0	0	0											2	0	0	0	0
(Harderian gland)	[1]					[0]					[0]					[2]				
increased pigmentation	1	0	0	0	0											2	0	0	0	0
(Ovary)	[1]					[1]					[0]					[2]				
abnormality	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0						2	0	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe
[], Number of animals examined

Table 25

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of reproductive performance

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index A)	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant animals	12	12	13	11
Fertility index B)	92.3	92.3	100.0	84.6
Pairing days until copulation Average $\pm$ S.D.	2.8 $\pm$ 1.2	2.8 $\pm$ 1.9	3.1 $\pm$ 1.2	3.0 $\pm$ 3.5
Times of vaginal estrus Average $\pm$ S.D.	1.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.3

A): Copulation index = (Number of copulated pairs / Number of mated pairs) $\times$ 100 ; %B): Fertility index = (Number of pregnant animals / Number of copulated pairs) $\times$ 100 ; %

Vehicle control: distilled water

Table 26

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of development of F₁ pups up to day 4 of lactation; average $\pm$ S.D.

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
Number of pregnant females	12	12	13	11
Number of females with live pups	12	12	13	11
Gestation index A)	100	100	100	100
Gestation length in days	22.0 $\pm$ 0.0 (12)	22.0 $\pm$ 0.0 (12)	22.2 $\pm$ 0.4 (13)	22.2 $\pm$ 0.4 (11)
Number of corpora lutea	17.6 $\pm$ 3.4 (12)	17.9 $\pm$ 4.4 (12)	17.0 $\pm$ 1.4 (13)	16.8 $\pm$ 1.9 (11)
Number of implantation sites	15.1 $\pm$ 2.0 (12)	15.8 $\pm$ 2.4 (12)	15.4 $\pm$ 1.3 (13)	15.9 $\pm$ 1.6 (11)
Implantation index B)	87.5 $\pm$ 13.9 (12)	89.6 $\pm$ 11.3 (12)	90.8 $\pm$ 8.0 (13)	94.9 $\pm$ 5.7 (11)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	14.8 $\pm$ 1.9 (12)	14.6 $\pm$ 2.2 (12)	14.6 $\pm$ 1.9 (13)	15.0 $\pm$ 1.8 (11)
Delivery index C)	98.4 $\pm$ 2.9 (12)	92.9 $\pm$ 7.1 (12)	94.8 $\pm$ 6.3 (13)	94.2 $\pm$ 4.7 (11)
Number of live pups	14.7 $\pm$ 1.9 (12)	14.4 $\pm$ 2.1 (12)	13.9 $\pm$ 2.1 (13)	14.7 $\pm$ 1.8 (11)
Birth index D)	97.3 $\pm$ 3.3 (12)	92.0 $\pm$ 8.3 (12)	90.4 $\pm$ 10.6 (13)	92.4 $\pm$ 4.4 (11)
Live birth index E)	98.9 $\pm$ 2.5 (12)	98.9 $\pm$ 2.5 (12)	95.5 $\pm$ 9.8 (13)	98.2 $\pm$ 3.1 (11)
Sex ratio F)	45.6 $\pm$ 13.4 (12)	47.8 $\pm$ 13.5 (12)	51.6 $\pm$ 15.1 (13)	46.2 $\pm$ 14.8 (11)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	14.4 $\pm$ 1.7 (12)	14.3 $\pm$ 2.0 (12)	13.8 $\pm$ 2.2 (13)	14.5 $\pm$ 1.5 (11)
Viability index G)	98.5 $\pm$ 2.8 (12)	99.5 $\pm$ 1.7 (12)	99.3 $\pm$ 2.5 (13)	98.4 $\pm$ 3.7 (11)

Parentheses indicate the number of litters evaluated

A): Gestation index = (Number of females with live pups / Number of pregnant females) $\times$ 100 ; %B): Implantation index = (Number of implantation sites / Number of corpora lutea) $\times$ 100 ; %C): Delivery index = (Number of pups born / Number of implantation sites) $\times$ 100 ; %D): Birth index = (Number of live pups on Day 0 / Number of implantation sites) $\times$ 100 ; %E): Live birth index = (Number of live pups on Day 0 / Number of pups born) $\times$ 100 ; %F): Sex ratio = (Number of male live pups on Day 0 / Number of live pups on Day 0) $\times$ 100 ; %G): Viability index = (Number of live pups on Day 4 / Number of live pups on Day 0) $\times$ 100 ; %

Vehicle control: distilled water

Table 27

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₁ pups up to day 4 of lactation; average $\pm$ S.D.

Compounds	Vehicle control	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol	1,4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
D a y 0 (At birth)				
No. of live pups	14.7 $\pm$ 1.9 (12)	14.4 $\pm$ 2.1 (12)	13.9 $\pm$ 2.1 (13)	14.7 $\pm$ 1.8 (11)
Male	6.6 $\pm$ 1.7	7.0 $\pm$ 2.6	7.2 $\pm$ 2.3	6.8 $\pm$ 2.5
Female	8.1 $\pm$ 2.4	7.4 $\pm$ 1.7	6.8 $\pm$ 2.5	7.9 $\pm$ 2.4
Weight of pup in grams				
Male	6.3 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.5
Female	6.0 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.6
D a y 4				
No. of live pups	14.4 $\pm$ 1.7 (12)	14.3 $\pm$ 2.0 (12)	13.8 $\pm$ 2.2 (13)	14.5 $\pm$ 1.5 (11)
Male	6.6 $\pm$ 1.7	6.9 $\pm$ 2.5	7.2 $\pm$ 2.3	6.7 $\pm$ 2.3
Female	7.8 $\pm$ 2.2	7.4 $\pm$ 1.7	6.7 $\pm$ 2.5	7.7 $\pm$ 2.5
Weight of pup in grams				
Male	10.2 $\pm$ 0.8	9.8 $\pm$ 0.7	10.0 $\pm$ 0.5	9.3 $\pm$ 0.8 *
Female	9.8 $\pm$ 1.0	9.4 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 0.5	8.8 $\pm$ 0.8 *

Parentheses indicate the number of litters evaluated

Vehicle control: distilled water

* :Significantly difference from control, $p < 0.05$

Table 28

1,4-Butanediol: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of morphological findings in pups

Compounds	Vehicle control	1, 4-Butanediol	1, 4-Butanediol	1, 4-Butanediol
Dose groups (mg/kg)	0	200	400	800
No. of pups examined				
<u>External observation</u>	173	172	180	159
<u>Visceral observation</u>	173	172	180	159
No. of pups with abnormalities				
<u>External abnormalities</u>	0	0	0	0
<u>Visceral abnormalities</u>				
Malformation	1	0	0	0
Variation	0	0	0	0
Types and frequencies (%) of visceral abnormalities				
Hydronephrosis	0.6			

Vehicle control : distilled water

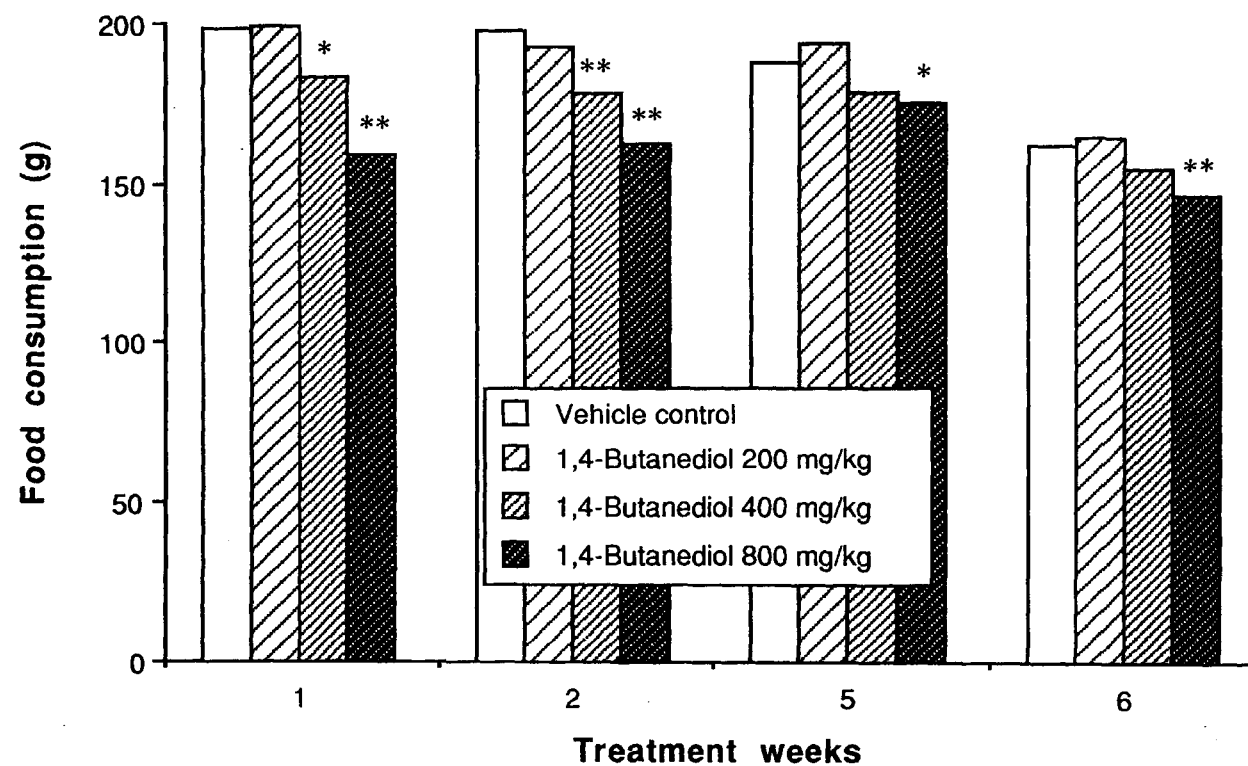


Fig. 1 Average food consumption of Fo males during treatment period

* : Significant difference from control, $p < 0.05$

** : Significant difference from control, $p < 0.01$

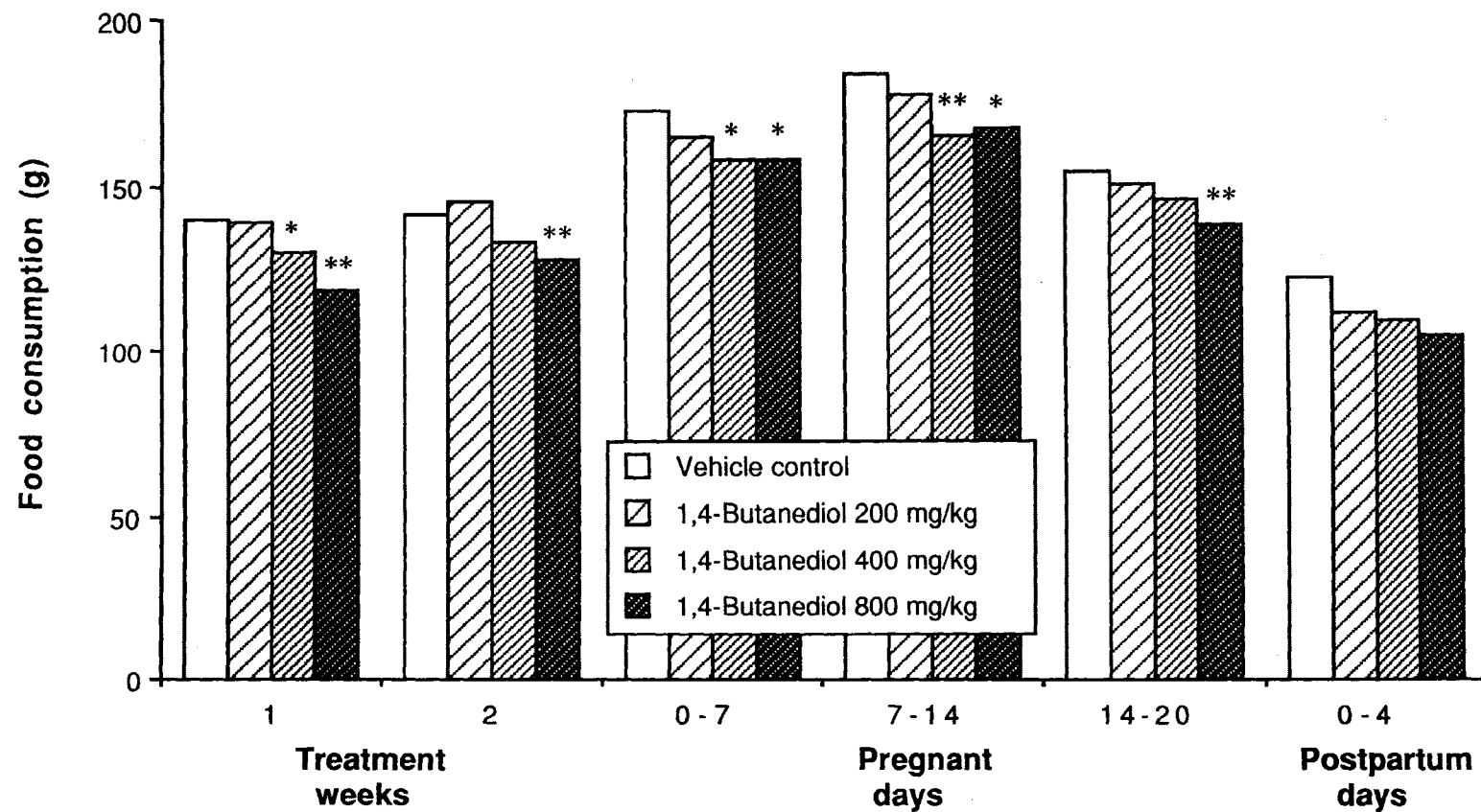


Fig. 2 Average food consumption of Fo females during treatment period

* : Significant difference from control, $p < 0.05$

** : Significant difference from control, $p < 0.01$

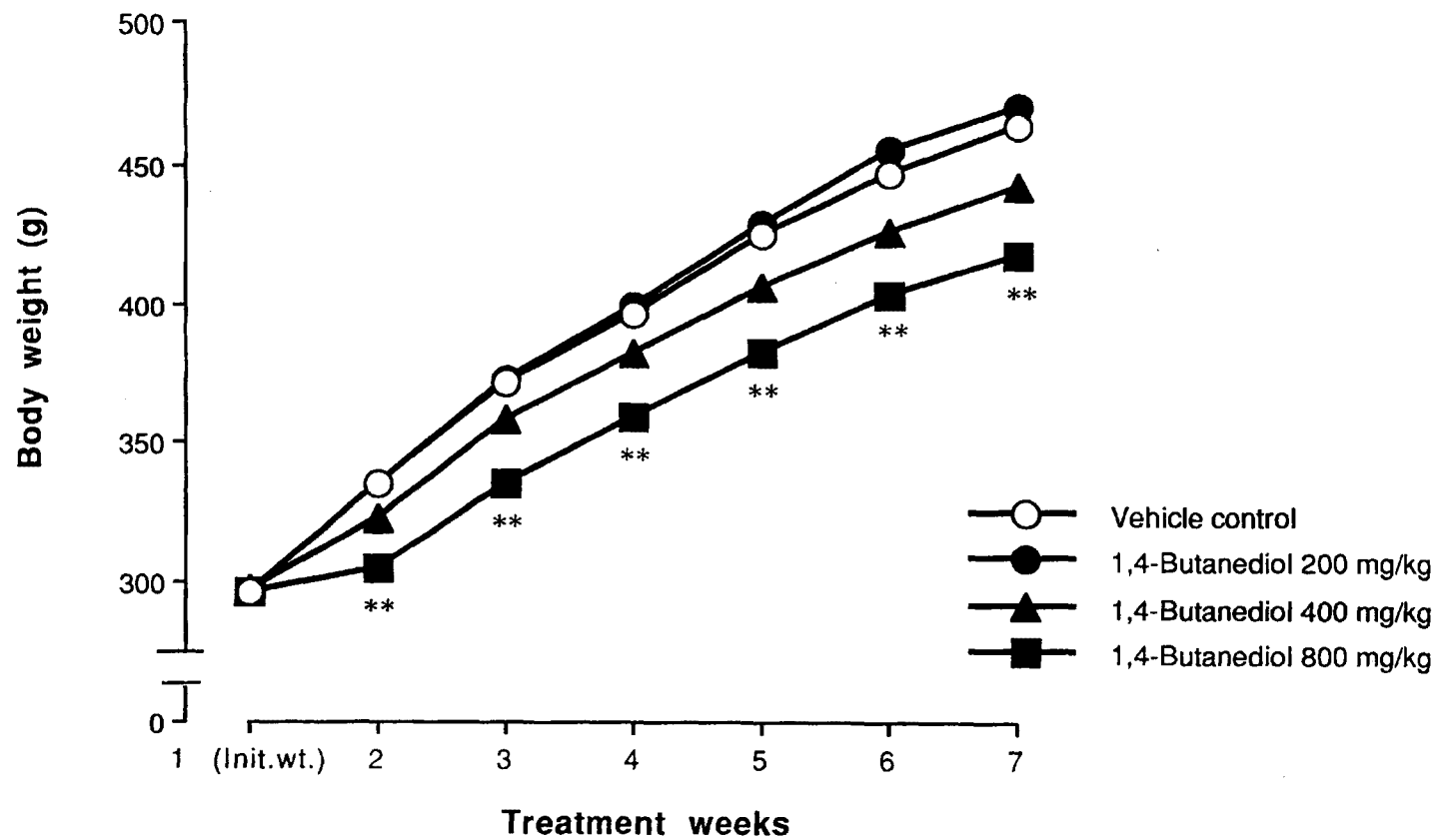


Fig. 3 Average body weight of Fo males during treatment period

** : Significant difference from control, $p < 0.01$

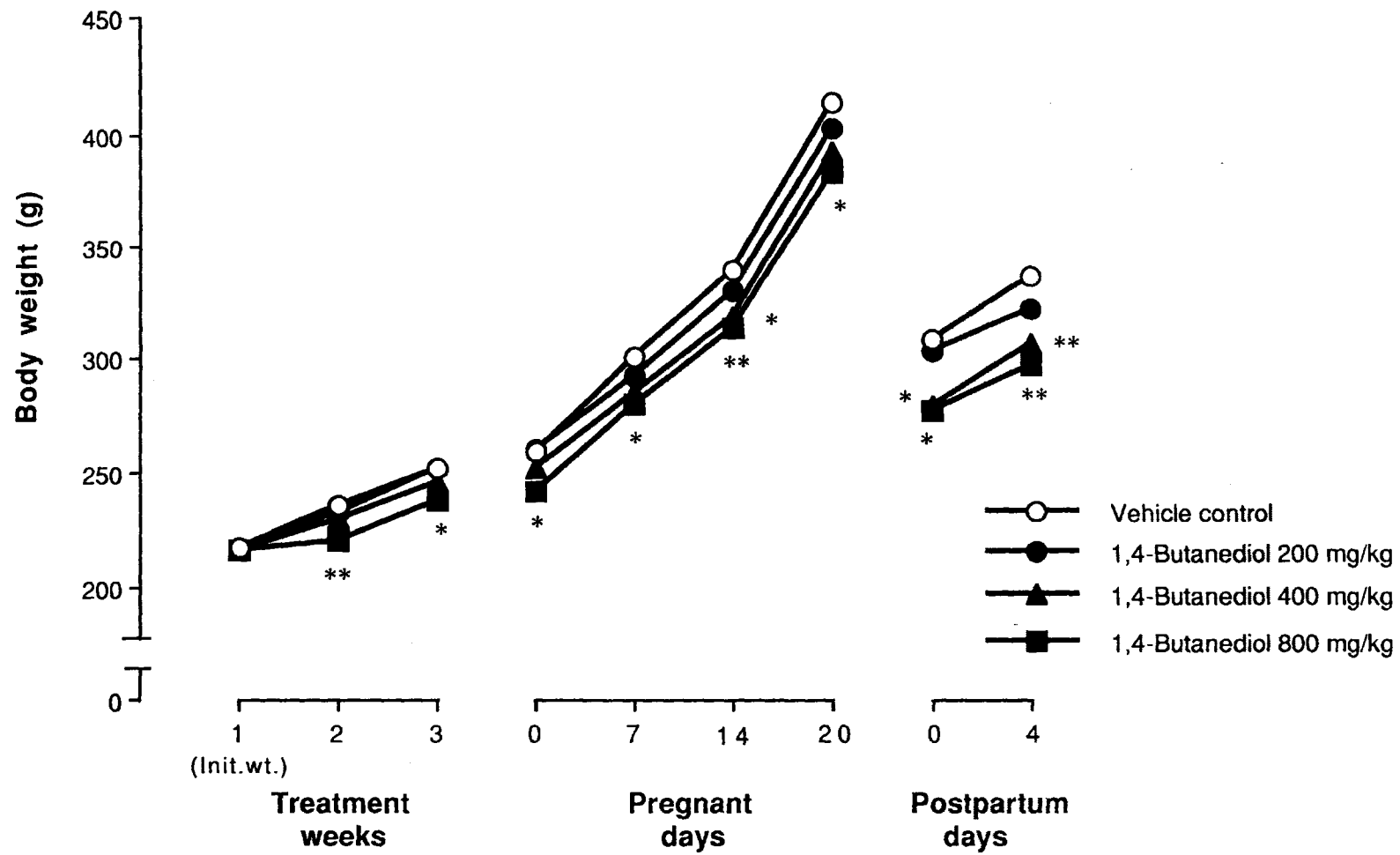


Fig. 4 Average body weight of Fo females during treatment period

* : Significant difference from control, $p < 0.05$

** : Significant difference from control, $p < 0.01$