

最終報告書

試験表題：1,2-ビス（2-クロロエトキシ）エタンのラットを用いた
経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-1079

試験期間：2010年11月29日~2011年3月30日

試験実施施設

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

試験委託者

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

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1. 目次	3
3. 要約	9
3.1 雌雄動物に対する影響	9
3.2 生殖発生に対する影響	9
4. 緒言	10
5. 試験材料及び方法	11
5.1 被験物質及び媒体	11
5.1.1 被験物質	11
5.1.2 媒体	11
5.2 投与液の調製及び保存方法	12
5.2.1 投与液の調製及び保存	12
5.2.2 投与液の安定性	12
5.2.3 投与液の濃度確認	12
5.3 試験動物種及び系統の選択理由	13
5.4 試験動物	13
5.5 群分け	14
5.6 飼育条件	14
5.7 動物の識別	14
5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	15

5.9	投与方法	15
5.10	投与量及び群構成	15
5.11	投与量の設定根拠	15
5.12	観察及び検査の方法.....	16
5.12.1	一般状態	16
5.12.2	体重.....	16
5.12.3	摂餌量.....	16
5.12.4	膣垢検査	16
5.12.5	交配.....	16
5.12.6	分娩及び哺育.....	17
5.12.7	出生児	17
5.12.8	病理学検査	17
5.13	統計解析	18
5.13.1	パラメータの算出	18
5.13.2	検定.....	18
6.	試験結果.....	20
6.1	一般状態 (Table 1-1~1-5、Appendix 1-1~1-17)	20
6.2	体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-14)	20
6.3	摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-14)	20
6.4	器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-8)	20
6.5	剖検所見 (Table 5-1~5-4、Appendix 5-1~5-96)	20
6.6	病理組織学検査 (Table 6-1~6-4、Appendix 5-1~5-96)	21
6.7	性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)	21
6.8	交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-3)	21
6.9	分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-3)	21
6.10	出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-3)	21
6.11	出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-3)	21
6.12	出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-3)	21
6.13	出生児の生後4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-3)	22
7.	考察	23
7.1	雌雄動物に対する影響.....	23
7.2	生殖発生に対する影響.....	23
8.	文献	25

図

Fig. 1、2	体重
Fig. 3、4	摂餌量

表

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

3. 要約

1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンを 0 (対照群：コーン油)、50、100 及び 200 mg/kg/day の投与量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 3 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に生殖発生毒性について概略的に検討した。なお、200 mg/kg 投与群では、雌雄とも交配前投与期間中に死亡が発現し、生殖発生に関する評価に耐えないと判断されたため、投与 15 日に投与を中断して生存雌雄全例について病理検査を実施した。

3.1 雌雄動物に対する影響

200 mg/kg 投与群において、投与 14 日までに雄 3 例及び雌 1 例が死亡した。同群では一般状態の変化として流涎が雌雄に、雄ではさらに自発運動の低下、削瘦及び被毛の汚染が散見された。200 mg/kg 投与群の体重は雄において投与初期に摂餌量の低下を伴って減少を示し、雌においては対照群を下回る傾向を示した。病理学検査では、200 mg/kg 投与群の死亡動物全例及び投与を中断した雌雄の一部に心筋の変性・壊死が認められた。

3.2 生殖発生に対する影響

各用量群とも性周期に被験物質投与の影響は認められなかった。50 及び 100 mg/kg 投与群では交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には被験物質投与の影響は認められず、雌雄内部生殖器の病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率に被験物質投与の影響は認められず、分娩及び哺育状態に異常は認められなかった。

出生児の性比、生存性及び体重に被験物質投与の影響は認められず、出生時の外表及び剖検所見に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における 1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンの雌雄動物に対する無影響量及び無毒性量、生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量はいずれも 100 mg/kg/day と推定された。

4. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託により、1,2-ビス（2-クロロエトキシ）エタンのラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

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

5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び媒体

5.1.1 被験物質

1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンは 以下の情報とともに購入した。また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている。¹⁾

名称	:	1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタン
英語名称	:	1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
CAS 番号	:	112-26-5
官報公示整理番号	:	(2)-448 (化審法)
示性式	:	$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$
分子式	:	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}_2$
分子量	:	187.06
物理的状态 (20°C)	:	液体
形状	:	透明
色	:	無色~ほとんど無色
純度 (GC)	:	98.9 %以上
沸点/沸騰範囲	:	235°C
保存方法	:	容器を密栓して冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内 (実測温度: 3~6°C) に保存した。〕
保存場所	:	御殿場研究所被験物質保存室及び第 2 研究棟 4 階被験物質調製室
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。 取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
安定性	:	投与期間終了後、残余被験物質の赤外吸収スペクトルを確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトル ¹⁾ とほぼ同様であり、投与期間を通して被験物質は安定であったと判断した。
残余被験物質の処理:	:	被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質保存室に保存し、残余被験物質はすべて焼却処分した。

5.1.2 媒体

名称	:	コーン油
製造者	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	STN0989

保存方法 : 室温
保存場所 : 御殿場研究所第2研究棟4階被験物質調製室

なお、媒体については、先に実施された「1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験」²⁾において投与液の媒体として用いられたコーン油を選択するとともに陰性対照物質として対照群の投与に使用した。

5.2 投与液の調製及び保存方法

5.2.1 投与液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に秤取し、媒体を加えてメスシリンダーに移し、更に媒体を加え規定濃度 (10、20 及び 40 mg/mL) となるよう希釈した。投与液は、2010年12月16日、12月21日、12月28日、2011年1月3日、1月7日、1月14日、1月21日、1月25日、1月31日、2月7日に調製を行い、1日使用分ごと褐色ガラス瓶に小分けして冷所 (冷蔵庫内、許容温度: 1~10°C、実測温度: 4~8°C) に保存し、調製後8日以内の投与に使用した。

5.2.2 投与液の安定性

コーン油中の被験物質は、冷蔵7日+室温24時間安定であることが先に実施された急性毒性試験において確認されている。²⁾

5.2.3 投与液の濃度確認

雄の投与1週と投与6週の2回、投与に用いる各濃度の投与液について、投与に使用する前にGC法により濃度を確認した。その結果、規定濃度に対する各投与液の測定濃度の割合は98.0~101.8%であり、いずれも許容範囲内 (濃度: 表示値に対する割合: 100.0±10.0%) であった。なお、濃度測定は当試験施設において確立された分析法¹⁾に従い、用いた標準物質、GCシステム及び測定条件は以下の如くであった。分析法の概略を以下に示す。

[標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

[GCシステム]

機器名及び型式		メーカー
GC	HP6890N	Agilent Technologies Inc.
インジェクタ	G2613A	
オートサンプラトレイ	G2614A	
データ処理ソフト	GC ChemStation G2070AJ	

[GC 測定条件]

カラム	:	CBP20-W12-100 (0.53 mm i.d. ×12 m、膜厚 1 μm、株式会社島津製作所)
キャリアガス	:	He
流量	:	4.50 mL/min
H ₂	:	40 mL/min
Air	:	450 mL/min
流量モード	:	コンスタントフローモード
注入モード	:	スプリット
スプリット比	:	10 : 1
メイクアップガス	:	N ₂
メイクアップガス流量	:	10 mL/min
メイクアップガスモード	:	コンスタントメイクアップ
オープン温度	:	50°C (Hold 3 分) →150°C (20°C/min、Hold 10 分)
検出器	:	水素炎イオン化検出器 (FID)
注入口温度	:	200°C
検出器温度	:	220°C
試料注入量	:	1 μL
分析時間	:	18 分
注入順序	:	

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液
2	各 1	測定実測試料

5.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされており、また、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、背景資料が豊富である系統を選択した。

5.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] の雌雄各 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手^{注)} し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含む 20 日間、馴化飼育した。その間、一般状態を毎日 1 回観察し、体重を馴化 1、3、8、15 及び 20 日に測定した。雌については、更に腔垢を馴化 4~17 日の間採取し、多数の角化上皮細胞から成る腔垢像を発情の指標として 4~5 日の周期で回帰するものを正常とし、性周期異常の有無を調べた。その結果、雌

1 匹に性周期異常が認められたが、一般状態に異常は認められなかった。試験には、性周期異常の認められた個体を除き、順調な体重推移を示した雌雄各 48 匹をそれぞれ選択して 10 週齢で使用した。

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

5.5 群分け

前項に記載された馴化中の観察、検査結果に基づいて選抜された雌雄各 48 匹は、群分け当日の体重を基に各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた）で行った。投与開始時の体重は、雄で 388~472 g (平均体重: 426 g)、雌は 226~289 g (平均体重: 253 g) であり、雌雄とも平均値 $\pm 20\%$ 以内の体重範囲であった。群分けから除外された雄 14 匹及び性周期異常の雌 1 匹は、投与開始後試験から除外した。残りの雌 13 匹は交配用無処置動物として継続飼育したが、交配に用いなかったため、交配終了後、試験から除外した。

5.6 飼育条件

飼育は、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測値: $21\sim 24^{\circ}\text{C}$)、相対湿度 $50\pm 20\%$ (実測値: $41\sim 57\%$)、換気回数 10~15 回/h、照明 12 時間/日 (07:00~19:00) の動物飼育室 (飼育室番号: 909 号室) で行った。動物は、交配中を除いてブラケット式金属製網ケージ (W254×D350×H170 mm: リードエンジニアリング株式会社) へ個別に収容した。なお、妊娠 17 日から授乳 4 日までは、床敷 (ホワイトフレーク: 日本チャールス・リバー株式会社) を入れたプラスチック製エコンケージ (W340×D400×H185 mm: 日本クレア株式会社) へ 1 腹ごと収容した。飼料及び飲料水については NMF 固形飼料 (放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号: 100817、100913) 及び水道水 (御殿場市営水道水) をステンレス製給餌器あるいは自動給水装置又は給水瓶を用いてそれぞれ自由に摂取させた。飼料に関しては供試全ロットについて、床敷については、定期的 (年 6 回) にそれぞれ Eurofins Scientific Analytice あるいは財団法人日本食品分析センターで実施された混入物質の分析結果を入手した。飲料水については、芝浦セムテック株式会社に定期的 (年 4 回) に水質検査を依頼し、その結果を入手した。これらの検査結果より飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないことを確認した。

5.7 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に 3 桁の番号が連番で刻印された小動物用耳標をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと (対照群、低、中及び高用量の順) に 4 桁の番号をつけた。なお、1000 の位は群、100 の位は性 (0 番を雄、1 番を雌)、10 と 1 の位は個体番号とした。飼育ケージには、投与量 (群) ごとに色分けされ、試験番号、

投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日（雄）、交尾成立日（雌雄）及び分娩日（雌）を明記したラベルを付した。

5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄では交配前 14 日間、交配期間 14 日間、その後剖検前日までの 14 日間の計 42 日間、雌では交配前 14 日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳 3 日までとした。なお、本試験における雌の投与期間は 41~53 日間、投与を中断し、交配を実施しなかった 200 mg/kg 投与群の雌雄については 14 日間となった。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 回/日（7 回/週）とした。

5.9 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与として一般的な強制経口投与とした。投与容量は 5 mL/kg 体重とし、1 日 1 回、08:57~11:24 の間にフレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を投与した。ただし、投与時に分娩中であった動物は分娩終了を待って 13:52~14:34 の間に投与した。対照群には媒体（コーン油）のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量は、最近時の体重を基に mL 単位で小数第二位を四捨五入して算出した。

5.10 投与量及び群構成

投与量は 50、100 及び 200 mg/kg/day の 3 用量とし、対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は雌雄各 12 匹とした。群構成表を以下に示した。

群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対 照 群	0	0	5	雄	12	1001~1012
				雌	12	1101~1112
低用量群	50	10	5	雄	12	2001~2012
				雌	12	2101~2112
中用量群	100	20	5	雄	12	3001~3012
				雌	12	3101~3112
高用量群	200	40	5	雄	12	4001~4012
				雌	12	4101~4112

5.11 投与量の設定根拠

先に実施された「1,2-ビス（2-クロロエトキシ）エタンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験」（投与量：50、100、200 mg/kg/day）²⁾では、200 mg/kg 投与群の雄において 1/10 例が死亡し、同群の雌雄において心臓に心筋細胞の変性・壊死が観察された。100 mg/kg 投与群では、雌において肝臓相対重量の高値が認められたが、同群の雄には被験物質投与の影響は認められなかった。したがって、簡易生殖毒性試

験における投与量は、雌雄の一般状態に明らかな毒性兆候の発現が予想される 200 mg/kg を高用量とし、28 日間反復経口投与毒性試験と同様に以下公比 2 で除して 100 及び 50 mg/kg をそれぞれ中及び低用量に設定した。

5.12 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与 1 日、投与 1 日から 7 日を投与 1 週、交尾成立日を妊娠 0 日、分娩終了日を授乳 0 日とした。死亡動物は、発見後速やかに病理学検査 (5.12.8 項) に供した。

5.12.1 一般状態

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

5.12.2 体重

全個体について、雄は投与 1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42 日及び剖検日に、雌は投与 1、4、8、11、15 日、交配期間中週 2 回 (火曜、金曜)、妊娠 0、4、7、11、14、17 及び 20 日、授乳 0 及び 4 日に体重を測定した。なお、午後に分娩の終了が確認された個体の授乳 0 日の体重を除いて、体重は午前中の投与前に測定した。また、死亡動物については死亡例発見時に体重を測定した。

5.12.3 摂餌量

全個体について、雄は投与 1、4、8、11、15、32、36、39 及び 42 日に、雌は投与 1、4、8、11 及び 15 日、妊娠 1、4、7、11、14、17 及び 20 日並びに授乳 2 及び 4 日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差を 1 日摂餌量として算出した。給餌量及び残餌量ともに午前中の投与前に測定した。

5.12.4 膣垢検査

雌の全個体について、投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日膣垢を採取し、交配前投与期間中は 5.4 試験動物の項と同様に性周期異常の有無を調べるとともに発情回数及び発情から次の発情までの日数 (性周期) を求めた。交配期間中は膣垢内の精子の有無を調べた。

5.12.5 交配

交配前投与期間終了後、同じ投与群の雌雄を 1:1 で終夜同居させ、翌朝、膣栓形成あるいは膣垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交配開始日を 0 日と起算して交尾までに要した日数を求めた。同一雌雄による同居期間は最長 14 日間とした。

交尾が認められなかった 100 mg/kg 投与群の雌 1 例（動物番号：3110）は、同居期間が終了した日を妊娠 0 日と仮定して、他の交尾成立雌動物に準じて投与、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、25 日後にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査（5.12.8 項）に供した。なお、200 mg/kg 投与群については交配を実施しなかった。

5.12.6 分娩及び哺育

交尾が成立した雌動物は、妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前まで 1 日 2 回（午前、午後）分娩の有無並びにその終了を確認し、交尾成立日より分娩終了までの間を妊娠期間として 1 日単位で求めた。分娩が終了した母動物については、胎盤及び羊膜の処理等を指標として分娩異常の有無を観察した後、出生児を哺育させ、授乳 4 日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査（5.12.8 項）に供した。授乳期間中は児集め、営巣及び授乳の状態等を指標として哺育異常の有無を観察した。なお、妊娠 25 日の午前までに分娩が認められなかった 100 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：3111）は、当日エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査に供した。本例については、剖検時に子宮の着床の有無を確認した結果、着床が認められなかったため不妊とみなした。

5.12.7 出生児

母動物の分娩終了日を出生日（生後 0 日）とみなし、出生児数及び死産児数を数え、外表異常の有無を観察した。出生児は性別を判定した後、体重を測定した。授乳期間中は毎日 1 回、死亡児の有無を観察した。なお、死産児及び死亡児は廃棄した。生後 4 日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ、体外表、胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を肉眼的に調べた。なお、出生児の体重は個別に測定し、雌雄別に各腹の平均値を算出した。

5.12.8 病理学検査

5.12.8.1 剖検及び器官重量

最終投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、母動物については黄体数及び着床痕数を数えた。更に、肝臓、精巣及び精巣上体については重量（絶対重量）を測定し、これらの器官について剖検日の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。なお、精巣及び精巣上体の重量については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

5.12.8.2 病理組織学検査

全ての個体の心臓、肝臓、雄の精巣、精巣上体、前立腺及び精囊、雌の卵巣、子宮及び膈並びに肉眼的異常部位を個体識別部（耳標を装着した耳介）とともにリン酸緩

衝 10 vol%ホルマリン液で固定した（ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換した。）。個体識別部を除くこれらの器官は、パラフィン包埋した後、切片とし、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本を作製した。鏡検は、まず対照群と高および中用量群の全個体の心臓、肝臓及び上記内部生殖器並びに全ての肉眼的異常部位について行った。なお、精巣、卵巣、精巣上体及び精嚢は両側を、子宮は両角部を鏡検した。被験物質投与の影響が疑われた雌雄の心臓並びに精巣、精巣上体、前立腺及び精嚢については、更に低用量群の全個体を対象として検索した。

5.13 統計解析

5.13.1 パラメータの算出

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

交尾率(%) = (交尾動物数/同居動物数) × 100

授精率(%) = (雌を妊娠させた雄の数/交尾した雄の数) × 100

受胎率(%) = (妊娠した雌の数/交尾した雌の数) × 100

妊娠期間(日) = 妊娠 0 日から分娩した日までの日数

出産率(%) = (出生児出産雌数/妊娠雌数) × 100

着床率(%) = (着床痕数/黄体数) × 100

死産児率(%) = (死産児数/出生児数及び死産児数) × 100

外表異常率(%) = (外表異常児数/出生児数) × 100

出生率(%) = (出生児数/着床痕数) × 100

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

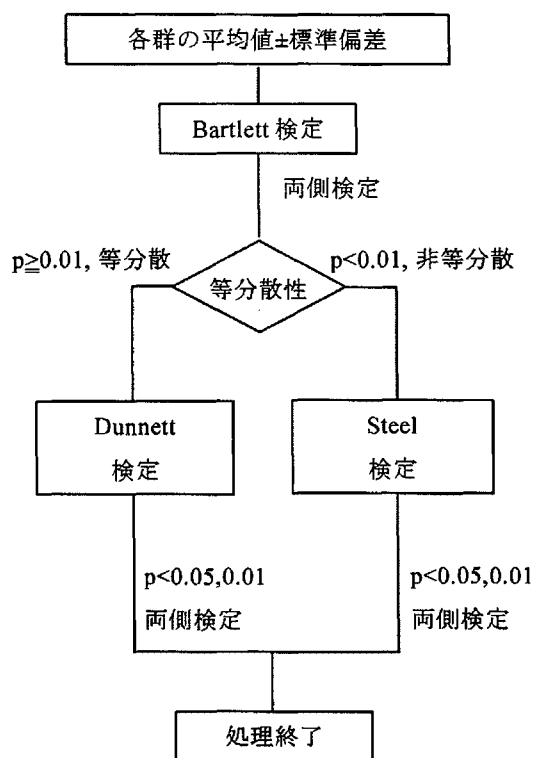
生後 0 日の性比 = 雄出生児数/出生児数

生後 4 日の性比 = 生後 4 日の雄生存児数/生後 4 日の生存児数

5.13.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量（雄：投与 1~42 日、雌：投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児：生後 0~4 日）、摂餌量、発情期像発現回数、性周期（発情周期）、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比（生後 0 及び 4 日）及び器官重量（含、剖検時体重）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した。なお、交配期間中の雌の体重データ、高用量群の雌雄及び未交尾並びに不妊雌動物の器官重量データは統計解析より除外した。



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

交尾率、授精率、受胎率、出産率は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、生存児出産雌動物数より算出し、Fisher の直接確率計算法により検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。

6. 試験結果

6.1 一般状態 (Table 1-1~1-5、Appendix 1-1~1-17)

200 mg/kg 投与群において、投与 14 日までに雄 3 例及び雌 1 例が死亡した。同群では一般状態の変化として、雌雄において投与 8 日以降流涎が 2~4 例にみられ、雄ではさらに自発運動の低下が投与 12 日以降 1 例に、消瘦及び被毛の汚染が投与 13 日以降 1 例にみられた。一方、50 及び 100 mg/kg 投与群では一般状態に異常は認められず、授乳期間中の哺育状態に関しても異常は認められなかった。

6.2 体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-14)

200 mg/kg 投与群において、雄では投与 1 日から 4 日の間に体重減少がみられ、投与 4、8 及び 11 日の体重が対照群と比べ有意な低値を示した。雌では有意な差は認められなかったが、投与 4 日以降の体重は対照群を下回る傾向を示した。一方、50 及び 100 mg/kg 投与群では雌雄とも投与期間中を通して対照群と同様な体重推移を示し、各測定日の体重並びに体重増加量ともに有意な差は認められなかった。

6.3 摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-14)

雄では 200 mg/kg 投与群において投与 4 日の摂餌量が対照群と比べ有意な低値を示した。50 及び 100 mg/kg 投与群では 100 mg/kg 投与群において投与 39 日の摂餌量が対照群と比べ有意な高値を示したが、一時的な変動であり、毒性学的意義はないと考えられた。雌の摂餌量には対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.4 器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-8)

100 mg/kg 投与群の雄において精巣の絶対重量が対照群に比べ有意な低値を、同群の雌において肝臓の絶対重量及び相対重量が有意な高値を示した。しかし、精巣の相対重量には変化は認められず、病理組織学検査では肝臓に被験物質投与による異常は認められず、いずれも毒性学的意義はないと考えられた。

6.5 剖検所見 (Table 5-1~5-4、Appendix 5-1~5-96)

200 mg/kg 投与群の死亡雄動物において精巣上体の白色巣が 1 例に、心臓の白色化が 1 例に、肺の暗赤色化及び暗調化が 1 例に、脾臓の小型化が 1 例に、前胃の陥凹巣及び腺胃の暗赤色巣が 1 例に、胸腺の小型化が 2 例に認められたほか、同群の投与 15 日に投与を中断して剖検した雄 1 例には低栄養状態、下腹部被毛の汚れ並びに脾臓、前立腺、精囊及び胸腺の小型化が認められた。この他に、精巣上体の結節が対照群の 1 例に、膈の結節が 50 mg/kg 投与群の 1 例に、肺の暗赤色巣が 50 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。

6.6 病理組織学検査 (Table 6-1~6-4、Appendix 5-1~5-96)

200 mg/kg 投与群の死亡動物全例において心臓に心筋の変性・壊死が認められ、死亡雄動物において肺の炎症性細胞浸潤、前立腺、脾臓及び胸腺の萎縮、腺胃のびらん及び前胃の潰瘍が1~2例に認められた。同群の投与15日に投与を中断して剖検した動物では、心筋の変性・壊死が雄2例、雌3例に認められた他、雄1例の精巣に精子形成細胞の変性・壊死、精巣上体管に細胞残屑増加と萎縮、前立腺、精囊、脾臓及び胸腺の萎縮が認められた。その他、200 mg/kg 投与群の死亡動物あるいは投与中断動物の精巣上体及び前立腺、50及び100 mg/kg 投与群の精巣上体、肺、前立腺及び精巣に変化が認められたが、これらの所見は発現状況あるいは病理学的性状から偶発変化と考えられた。

6.7 性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)

各群の全例に14日間の観察期間中に4~5日周期で正常な発情回帰が認められ、発情回数及び性周期ともに対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.8 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-3)

交尾が成立しなかった雌雄及び交尾は成立したが雌が不妊であった雌雄の組合せが100 mg/kg 投与群で各1組(動物番号:3010、3110、3011、3111)みられたが、交尾までに要した日数、授精率及び受胎率に対照群と50及び100 mg/kg 投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.9 分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-3)

対照群を含め50及び100 mg/kg 投与群の妊娠動物全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率には対照群と両投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.10 出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-3)

出生児の生後0及び4日における性比には対照群と50及び100 mg/kg 投与群との間に有意な差は認められず、外表異常を有する出生児は何れの群にもみられなかった。

6.11 出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-3)

生後4日生存率には対照群と50及び100 mg/kg 投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.12 出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-3)

50 mg/kg 投与群の雄において生後4日の体重が対照群と比べ有意な低値を示した。しかし、その差は僅かであり、同群の雌、さらには100 mg/kg 投与群の雌雄には変化は認められないことから50 mg/kg 投与群における変動は偶発的と考えられた。

R-1079

6.13 出生児の生後4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-3)

対照群を含む各群とも出生児の体外表、胸部・腹部を含む器官・組織に肉眼的異常はみられなかった。

7. 考察

1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンを 0 (対照群：コーン油)、50、100 及び 200 mg/kg/day の用量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 3 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの生殖発生に及ぼす影響を検討した。なお、200 mg/kg 投与群では、雌雄とも交配前投与期間中に死亡が発現し、生殖発生に関する評価に耐えないと判断されたため、投与 15 日に投与を中断して生存雌雄全例について病理検査を実施した。

7.1 雌雄動物に対する影響

200 mg/kg 投与群では、雄 3 例、雌 1 例が死亡し、一般状態変化として雌雄において流涎、雄ではさらに自発運動の低下、消瘦及び被毛の汚染がみられた。同群の雄では、投与初期に摂餌量の低下を伴う体重減少がみられ、雌では体重が対照群を下回る傾向がみられた。病理組織学検査では、200 mg/kg 投与群の死亡動物全例及び投与中断動物の一部の心臓に心筋の変性・壊死が認められた。本所見は 28 日間反復経口投与毒性試験²⁾においてもみられており、被験物質投与の影響と考えられた。その他、状態の悪化に伴う二次的変化と考えられる肺の炎症性細胞浸潤、前立腺、精囊、脾臓及び胸腺の萎縮、腺胃のびらん及び前胃の潰瘍、精巣に精子形成細胞の変性・壊死、精巣上体管に細胞残屑増加と萎縮が一部の個体に認められた。したがって、1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンの 200 mg/kg/day 投与はラットを死に至らしめ、心筋の変性・壊死を惹起するものと考えられた。

7.2 生殖発生に対する影響

雌の性周期には各用量群とも被験物質投与の影響は認められなかった。200 mg/kg 投与群を除く各群の雌雄を同居させた結果、交尾が成立しなかった雌雄並びに交尾は成立したが雌が不妊となった雌雄が 100 mg/kg 投与群で各 1 組みられた。しかし、同群の交尾率 (91.7%) 及び授精/受胎率 (90.9%) とともに当施設の背景データの範囲内 (交尾率: 90.0~100.0% (雄)、88.9~100.0% (雌)、授精/受胎率: 88.9~100.0%、2005~2010 年、25 試験) であり、100 mg/kg 投与群における交尾及び受胎の認められない動物の発現は偶発的と考えられた。交尾までに要した日数に被験物質投与の影響は認められず、これら交配成績に加え、雌雄内部生殖器に関する病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかったことから 1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンの 100 mg/kg/day 投与は、精子形成及び排卵などの性腺機能、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能に影響を及ぼさないと判断した。

妊娠動物はいずれも正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率に被験物質投与の影響は認められず、哺育状態に異常

はみられなかった。したがって、1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンの 100 mg/kg/day 投与は、妊娠維持、分娩及び哺育などの妊娠母体の機能に対して影響を及ぼさないと判断した。

出生児に関し、性比、生後 4 日生存率、出生日及び生後 4 日の体重に被験物質投与の影響は認められず、出生児の外表及び剖検所見に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における 1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンの雌雄動物に対する無影響量及び無毒性量、生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量はいずれも 100 mg/kg/day と推定された。

8. 文献

- 1) GC による 1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンの被験液中濃度測定法バリデーション (媒体：コーン油) (株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所、試験番号：A-2351、2011 年)
- 2) 1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (財団法人食品農医薬品安全性評価センター、試験番号：6393 (115-164) 2003 年)

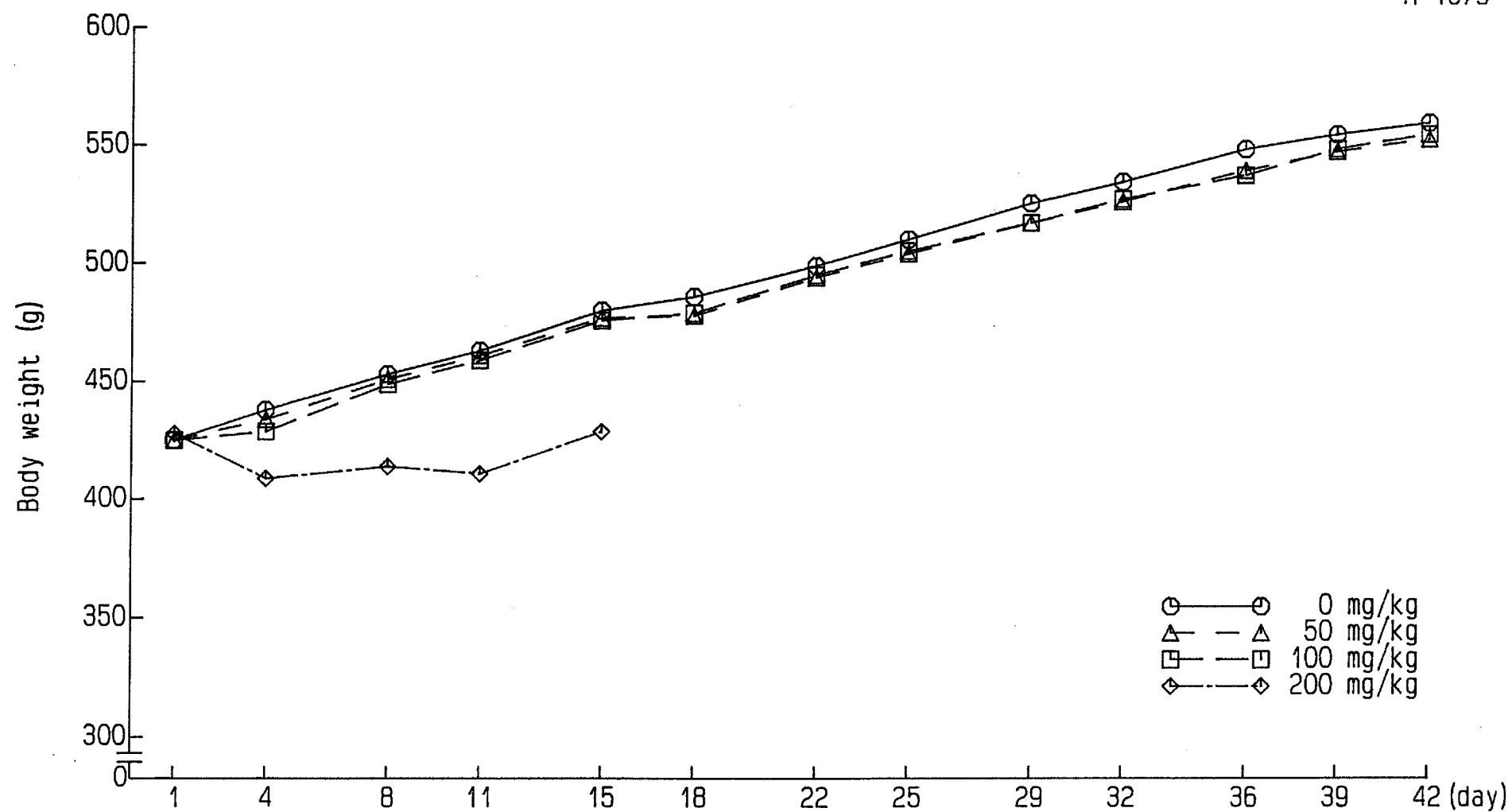


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 1,2-Bis (2-chloroethoxy) ethane

Body weight of male rats

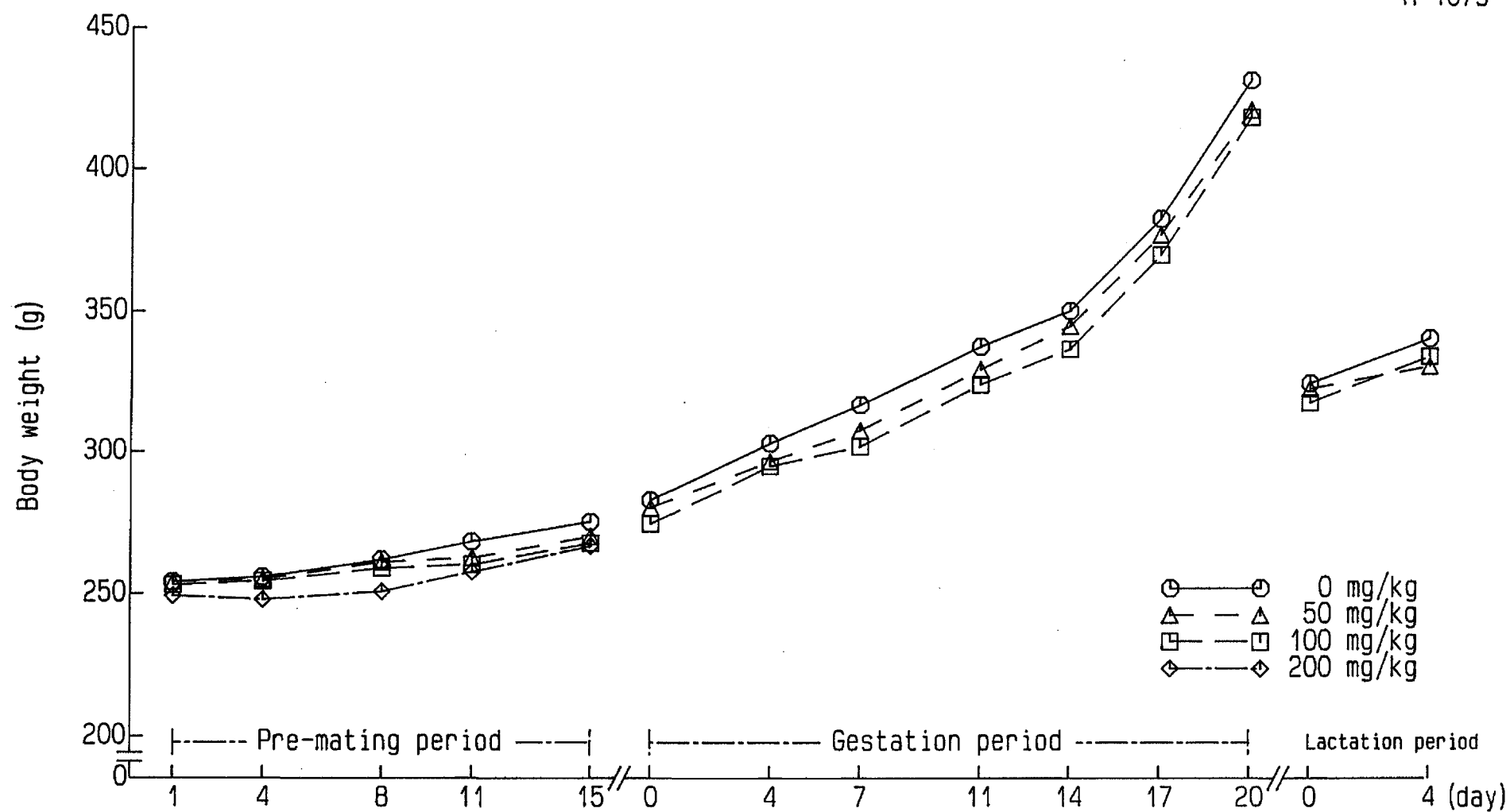


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 1,2-Bis (2-chloroethoxy) ethane

Body weight of female rats

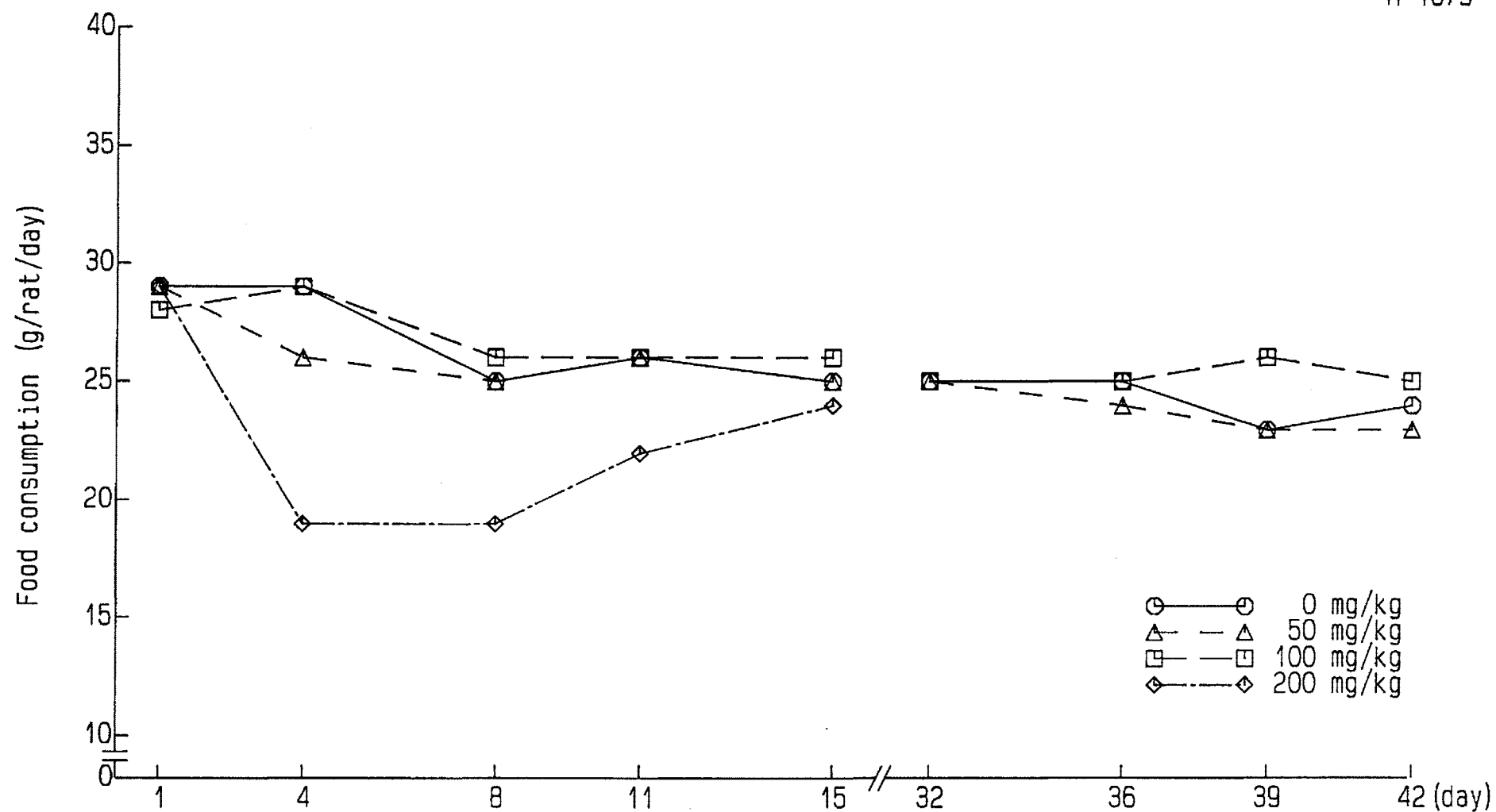


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Food consumption of male rats

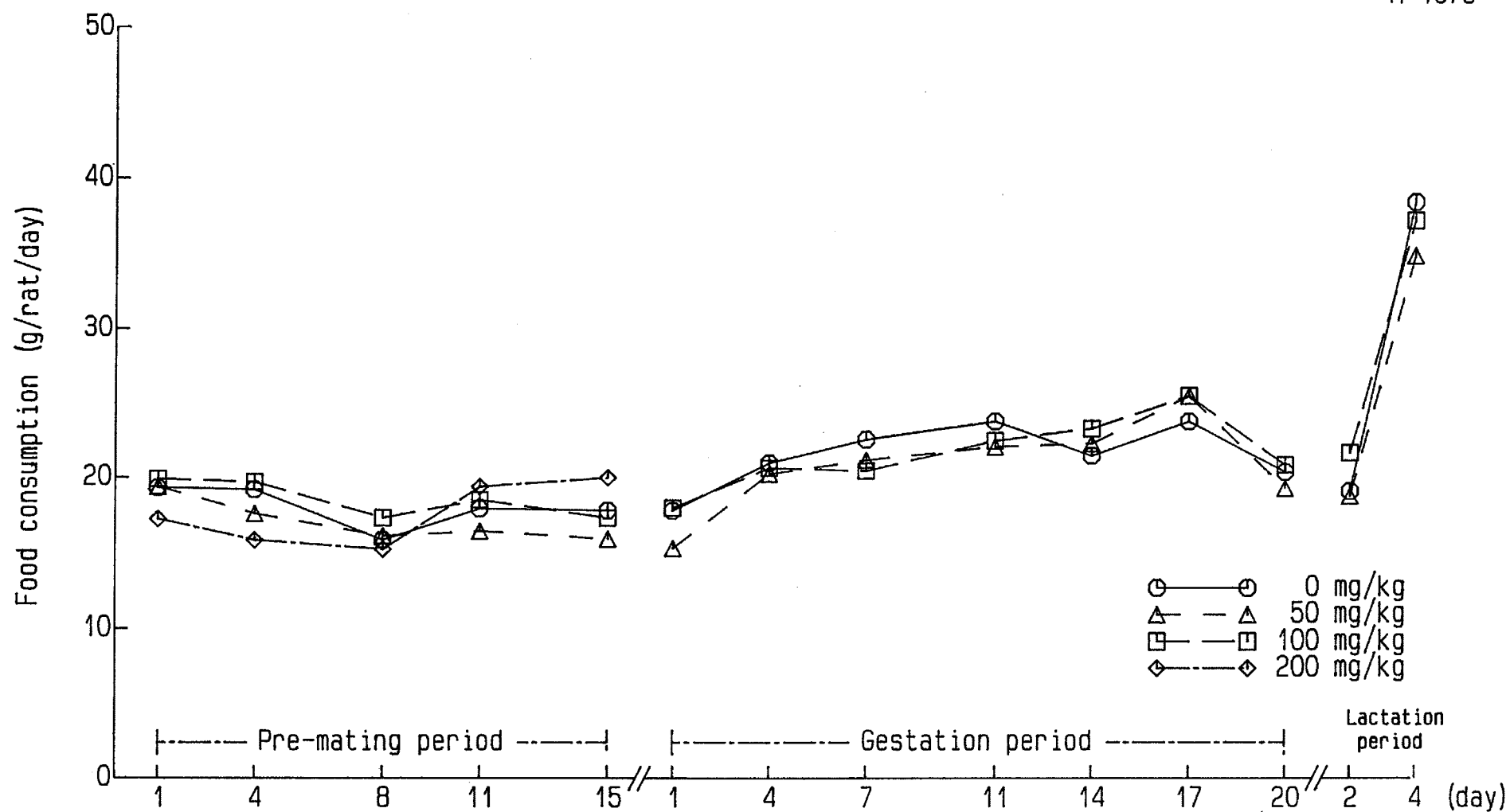


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 1,2-Bis (2-chloroethoxy) ethane

Food consumption of female rats

Table 1-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Administration (day)																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200 a)	No. of animals	12	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	10	10	9	9	0				
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	1	0	0	2	2	3	2	4	3	5	3	1					
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	2	3	3	4	3	0					
	Decrease in spontaneous movement	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0					
	Emaciation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1					
	Soiled fur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1					
	Dead	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0					

a): This group was subjected to necropsy on day 16 of administration

Table 1-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Administration (day)																					
		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a): Day of necropsy

Table 1-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Clinical signs in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	Signs	Administration (day)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200 a)	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	4	3	4	2
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	4	2
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

a) : This group was subjected to necropsy on day 16 of administration

Table 1-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Clinical signs in dams during the gestation period

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

a): Gestation day

Table 1-5 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
 Clinical signs in dams during the lactation period

Dose mg/kg	Signs	Administration				
		0	1	2	3	4a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
50	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
100	No. of dams	10	10	10	10	10
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0

a): Lactation day

Table 2-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Body weight of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Mating period				Post-mating period				Gain 1-42
		1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	425	438	453	463	480	486	499	510	525	534	548	554	559	134
	S.D.	22	24	27	29	32	32	35	36	37	41	43	46	48	30
50	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	425	434	451	461	477	478	494	504	517	526	539	547	552	128
	S.D.	20	20	22	24	25	28	30	30	30	32	33	34	34	20
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	425	429	449	459	476	479	495	505	517	527	537	548	554	129
	S.D.	19	18	21	22	24	27	28	27	27	25	26	26	25	18
200 b)	No.	12	12	11 ^{c)}	11	9 ^{d)}	0								
	Mean	428	409**	414**	411**	429									
	S.D.	20	19D	28D	48D	70									

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

b): This group was subjected to necropsy on day 16 of administration

c): One animal(Animal number 4007) died on day 5 administration

d): One animal(Animal number 4010) died on day 12 administration, and one animal(Animal number 4003) died on day 14 administration

** : p<0.01 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 2-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Body weight of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Administration (day)					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	254	256	262	268	275	21
	S.D.	15	16	15	16	17	6
50	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	254	255	261	263	270	16
	S.D.	17	17	19	17	13	6
100	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	253	255	259	260	268	15
	S.D.	16	15	14	15	18	8
200 a)	No.	12	12	12	12	11 ^{b)}	11
	Mean	249	248	251	258	267	16
	S.D.	19	16	23	19	19	12

Unit: g

No.: No. of animals

a): This group was subjected to necropsy on day 16 of administration

b): One animal(Animal number 4104) died on day 12 of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Body weight of dams during the gestation period

Dose mg/kg	Administration								Gain 0-20
		0	4	7	11	14	17	20a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	283	303	317	338	350	382	431	149
	S.D.	20	18	21	21	22	25	28	16
50	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	280	297	308	330	345	377	421	140
	S.D.	25	22	25	24	26	24	21	16
100	No.	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean	275	295	302	324	337	370	418	143
	S.D.	17	20	21	25	29	33	38	25

Unit: g

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Body weight of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration		Gain 0-4
		0	4a)	
0	No.	12	12	12
	Mean	325	341	16
	S.D.	26	28	10
50	No.	12	12	12
	Mean	323	331	8
	S.D.	30	17	20
100	No.	10	10	10
	Mean	318	334	16
	S.D.	27	33	14

Unit: g

No.: No. of dams

a): Lactation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Food consumption of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Post-mating period			
		1	4	8	11	15	32	36	39	42a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	29	29	25	26	25	25	25	23	24
	S.D.	3	3	3	3	2	3	3	4	4
50	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	29	26	25	26	25	25	24	23	23
	S.D.	3	2	2	3	3	3	3	2	4
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28	29	26	26	26	25	25	26*	25
	S.D.	2	2	2	2	2	2	2	2D	2
200 b)	No.	12	12	11 ^{c)}	11	9 ^{d)}	0			
	Mean	29	19**	19	22	24				
	S.D.	2	7ST	10	12	9				

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): Day of administration

b): This group was subjected to necropsy on day 16 of administration

c): One animal(Animal number 4007) died on day 5 administration

d): One animal(Animal number 4010) died on day 12 administration, and One animal(Animal number 4003) died on day 14 administration

*: p<0.05; **: p<0.01 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

ST: Steel's test

Table 3-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Food consumption of female rats during the pre-mating period

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

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): This group was subjected to necropsy on day 16 of administration

b): One animal(Animal number 4104) died on day 12 of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Food consumption of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration						
		1	4	7	11	14	17	20a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	18	21	23	24	22	24	20
	S.D.	3	3	3	3	3	2	3
50	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	15	20	21	22	22	26	19
	S.D.	4	3	4	4	4	2	4
100	No.	10	10	10	10	10	10	10
	Mean	18	21	21	23	23	26	21
	S.D.	2	3	3	4	4	4	4

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
 Food consumption of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration	
		2	4a)
0	No.	12	12
	Mean	19	38
	S.D.	7	6
50	No.	12	12
	Mean	19	35
	S.D.	9	6
100	No.	10	10
	Mean	22	37
	S.D.	7	7

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Lactation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Organ weight of male rats

		Dose mg/kg	Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Testes (R+L) g(g/100g BW)	Epididymides (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	12	12	12	12
		Mean	560	21.20	3.48	1362
		S.D.	48	3.59	0.15	105
	50	No.	12	12	12	12
		Mean	555	20.20	3.49	1395
		S.D.	34	2.26	0.32	121
	100	No.	12	12	12	12
		Mean	558	21.04	3.29*	1293
		S.D.	26	1.89	0.14ST	108
Relative	0	No.		12	12	12
		Mean		3.77	0.62	245
		S.D.		0.39	0.05	29
	50	No.		12	12	12
		Mean		3.64	0.63	252
		S.D.		0.27	0.07	23
	100	No.		12	12	12
		Mean		3.77	0.59	232
		S.D.		0.20	0.03	16

*: $p < 0.05$ (Significant difference from control group)
ST: Steel's test

Table 4-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Organ weight of female rats

		Dose mg/kg		Body weight g	Liver g(g/100g BW)
Absolute	0	No.		12	12
		Mean		341	13.40
		S.D.		28	1.19
	50	No.		12	12
		Mean		331	13.20
		S.D.		17	0.97
	100	No.		10	10
		Mean		334	14.64*
		S.D.		33	1.51D
Relative	0	No.			12
		Mean			3.94
		S.D.			0.25
	50	No.			12
		Mean			4.00
		S.D.			0.31
	100	No.			10
		Mean			4.39**
		S.D.			0.34D

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Significant difference from control group)
D: Dunnett's test

Table 5-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats
treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Gross pathological findings (End of administration : D42)

Organs	Sex:	M	M	M	M
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	50 12	100 12	200a) 9
General descriptions					
Undernourishment		0	0	0	1
Smudge, fur		0	0	0	1
Epididymis					
Nodule		1	0	0	0
Lung(bronchus)					
Focus, dark red		0	1	0	0
Prostate					
Small		0	0	0	1
Seminal vesicle					
Small		0	0	0	1
Spleen					
Small		0	0	0	1
Thymus					
Small		0	0	0	1

M : Male

a): This group was subjected to necropsy in day 16

Table 5-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats
treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Gross pathological findings (End of administration)

Organs	Sex:	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	50 12	100 12	200a) 11
Vagina					
Nodule		0	1	0	0

F : Female

a): This group was subjected to necropsy in day 16

Table 5-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats
treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Gross pathological findings (Found dead)

Organs	Sex:	M
Findings	Dose(mg/kg): Number:	200 3
Epididymis		
Focus, white		1
Heart		
Discoloration, white		1
Lung(bronchus)		
Discoloration, dark		1
Discoloration, dark red		1
Spleen		
Small		1
Stomach		
Focus, depressed, forestomach		1
Focus, dark red, glandular stomach		1
Thymus		
Small		2

M : Male

Table 5-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats
treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Gross pathological findings (Found dead)

Organs	Sex:	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	200 1
All tissues		
Not remarkable		1

F : Female

Table 6-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats
treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Histopathological findings (End of administration : D42)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 12	M 50 12	M 100 12	M 200a) 9
Findings					
Epididymis					
Number examined		12	12	12	9
Not remarkable		9	10	10	6
Atrophy		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Cell infiltration, interstitial		2	2	2	1
minimal		2	2	2	1
Granuloma, spermatic		1	0	0	1
mild		1	0	0	1
Increased cell debris, duct		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Heart					
Number examined		12	12	12	9
Not remarkable		12	12	12	7
Degeneration/necrosis, myocardial		0	0	0	2
minimal		0	0	0	2
Liver					
Number examined		12	0	12	9
Not remarkable		12	0	12	9
Lung(bronchus)					
Number examined		0	1	0	0
Cell infiltration, inflammatory		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Prostate					
Number examined		12	12	12	9
Not remarkable		4	3	5	2
Atrophy		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Cell infiltration, inflammatory		8	9	7	7
minimal		8	9	5	6
mild		0	0	2	1
Seminal vesicle					
Number examined		12	12	12	9
Not remarkable		12	12	12	8
Atrophy		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Spleen					
Number examined		0	0	0	1
Atrophy		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Testis					
Number examined		12	12	12	9
Not remarkable		12	11	12	8
Atrophy, seminiferous tubular		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Degeneration/necrosis, spermatogenic		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Thymus					
Number examined		0	0	0	1
Atrophy		0	0	0	1
severe		0	0	0	1

M : Male

a): This group was subjected to necropsy in day 16

Table 6-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats
treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Histopathological findings (End of administration)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 12	F 50 12	F 100 12	F 200a) 11
Findings					
Heart					
Number examined		12	12	12	11
Not remarkable		12	12	12	8
Degeneration/necrosis,myocardial		0	0	0	3
minimal		0	0	0	2
mild		0	0	0	1
Liver					
Number examined		12	0	12	11
Not remarkable		12	0	12	11
Ovary					
Number examined		12	0	12	11
Not remarkable		12	0	12	11
Uterus					
Number examined		12	0	12	11
Not remarkable		12	0	12	11
Vagina					
Number examined		12	1	12	11
Not remarkable		12	1	12	11

F : Female

a): This group was subjected to necropsy in day 16

Table 6-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats
treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Histopathological findings (Found dead)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 200 3
Findings		
Epididymis		
Number examined		3
Not remarkable		2
Granuloma, spermatic		1
mild		1
Heart		
Number examined		3
Degeneration/necrosis, myocardial		3
minimal		1
mild		2
Liver		
Number examined		3
Not remarkable		3
Lung(bronchus)		
Number examined		2
Not remarkable		1
Cell infiltration, inflammatory		1
mild		1
Prostate		
Number examined		3
Atrophy		2
minimal		2
Cell infiltration, inflammatory		2
minimal		2
Seminal vesicle		
Number examined		3
Not remarkable		3
Spleen		
Number examined		1
Atrophy		1
mild		1
Stomach		
Number examined		1
Erosion, glandular stomach		1
mild		1
Ulcer, forestomach		1
mild		1
Testis		
Number examined		3
Not remarkable		3
Thymus		
Number examined		2
Atrophy		2
mild		2

M : Male

Table 6-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats
treated orally with 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Histopathological findings (Found dead)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 200 1
Findings		
Heart		
Number examined		1
Degeneration/necrosis, myocardial		1
minimal		1
Liver		
Number examined		1
Not remarkable		1
Ovary		
Number examined		1
Not remarkable		1
Uterus		
Number examined		1
Not remarkable		1
Vagina		
Number examined		1
Not remarkable		1

F : Female

Table 7 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane

Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4	
0	12	0	0	0	8	4	3.3±0.5 4.1±0.2
50	12	0	0	0	6	6	3.5±0.5 4.2±0.3
100	12	0	0	1	5	6	3.4±0.7 4.3±0.5
200	11	0	0	0	8	3	3.3±0.5 4.2±0.3

No significant difference in any treated groups from control group

Table 8 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Mating and fertility of animals

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	2.5±1.5	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.5±1.5	12/12(100.0)	12/12(100.0)
50	12	2.8±1.5	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.8±1.5	12/12(100.0)	12/12(100.0)
100	12	2.9±1.1	11/12(91.7)	10/11(90.9)	12	2.9±1.1	11/12(91.7)	10/11(90.9)

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

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

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

No significant difference in any treated groups from control group

Table 9 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with liveborns	Delivery index % a)	Gestation length in days	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % b)	No. of stillborns (%)c)	No. of liveborns	Live birth index % d)
0	Total	12	12	100.0		197	189		2	176	
	Mean				22.2	16.4	15.8	96.3	(1.1)	14.7	93.4
	S.D.				0.4	1.5	1.2	6.9	(3.8)	1.2	7.4
50	Total	12	12	100.0		196	194		3	175	
	Mean				21.9	16.3	16.2	98.9	(1.6)	14.6	90.1
	S.D.				0.3	1.8	1.9	2.5	(2.9)	2.2	7.1
100	Total	10	10	100.0		156	155		2	141	
	Mean				22.1	15.6	15.5	99.3	(1.4)	14.1	90.6
	S.D.				0.3	1.9	2.0	2.1	(4.5)	2.6	8.9

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

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

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

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

No significant difference in any treated groups from control group

Table 10 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Sex ratio and external examination of pups

Dose mg/kg	No. of dams		Liveborns		Sex ratio of liveborns at birth a)	Day 4		Sex ratio of live pups on day 4 b)	External c) abnor- malities (%)d)
			No. of males	No. of females		No. of males	No. of females		
0	12	Total	96	80		95	79		0
		Mean	8.0	6.7	0.55	7.9	6.6	0.55	(0.0)
		S.D.	1.9	1.8	0.12	1.8	1.8	0.12	(0.0)
50	12	Total	88	87		87	83		0
		Mean	7.3	7.3	0.50	7.3	6.9	0.51	(0.0)
		S.D.	2.3	2.5	0.16	2.3	2.2	0.15	(0.0)
100	10	Total	79	62		78	60		0
		Mean	7.9	6.2	0.56	7.8	6.0	0.57	(0.0)
		S.D.	2.0	2.0	0.11	1.9	1.8	0.11	(0.0)

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

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

c): No. of liveborns with external abnormalities

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

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
 1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
 Viability index of pups

Dose mg/kg		No. of dams	No. of live pups		Viability index on postnatal day 4 % a)
			Day 0	Day 4	
0	Total	12	176	174	
	Mean		14.7	14.5	98.9
	S.D.		1.2	1.2	2.7
50	Total	12	175	170	
	Mean		14.6	14.2	97.5
	S.D.		2.2	1.9	5.3
100	Total	10	141	138	
	Mean		14.1	13.8	98.2
	S.D.		2.6	2.3	3.9

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

Table 12 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Body weight of pups

Dose mg/kg	Male			Female		
	0	4a)	Gain	0	4a)	Gain
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	6.5	10.0	6.2	9.5	3.3
	S.D.	0.4	0.7	0.4	0.7	0.6
50	No.	12	12	12	12	12
	Mean	6.2	9.2*	5.9	8.9	3.0
	S.D.	0.4	0.9D	0.4	0.8	0.7
100	No.	10	10	10	10	10
	Mean	6.6	9.7	6.3	9.3	3.0
	S.D.	0.4	1.0	0.3	1.0	0.9

Unit: g

No.: No. of dams

a): Postnatal day

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

D: Dunnett's test

Table 13 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
1,2-Bis(2-chloroethoxy)ethane
Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

	Dose (mg/kg)	0	50	100
Male				
No. of pups examined		95	87	78
No. of pups with abnormal findings		0	0	0
Female				
No. of pups examined		79	83	60
No. of pups with abnormal findings		0	0	0