

最 終 報 告 書

3,4-ジクロロ-1-ブテンのラットを用いる
反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 94-054)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要約	1
緒言	2
試験目的	2
試験材料および方法	
1. 被験物質	2
2. 供試動物および飼育条件	2
3. 群分けおよび個体識別	3
4. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法	3
5. 観察および検査	
1) 親動物に関する項目	
(1) 一般状態観察	4
(2) 体重および摂餌量測定	4
(3) 交配および分娩状態観察	4
(4) 臨床病理学検査	4
(5) 病理学検査	7
2) 新生児に関する項目	
(1) 産児数および性比の観察	7
(2) 外表異常および一般状態観察	8
(3) 体重測定	8
(4) 病理学検査	8
6. 統計処理	8
試験結果	
1. 反復投与毒性	
1) 死亡動物	8
2) 一般状態	8
3) 体重	9
4) 摂餌量	9
5) 雄の尿所見	9
6) 雄の血液学所見	9
7) 雄の血液生化学所見	9
8) 剖検所見	9
9) 器官重量	9
10) 病理組織学所見	10

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 交尾率および受胎率	1 0
(2) 黄体数、着床数および着床率	1 0
(3) 出産率および妊娠期間	1 0
(4) 分娩および哺育状態	1 1

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性	1 1
(2) 体重	1 1
(3) 形態	1 1

考察および結論

1. 反復投与毒性	1 1
2. 生殖発生毒性	1 2

参考文献	1 3
------------	-----

添付資料

A. 図・群別平均値表

Figures 1, 2	体重
Figures 3, 4	摂餌量
Tables 1, 2	死亡率
Tables 3, 4	一般状態
Tables 5, 6	体重
Tables 7, 8	摂餌量
Table 9	尿所見
Table 10	血液学所見
Table 11	血液生化学所見
Tables 12, 13	剖検所見
Tables 14, 15	器官重量
Tables 16, 17	病理組織学所見
Table 18	生殖に及ぼす影響
Table 19	新生児に及ぼす影響
Table 20	新生児の外表所見
Table 21	新生児の内臓所見

要約

主にプラスチック産業で合成ポリマーの製造等に用いられている高生産量既存化学物質3,4-ジクロロ-1-ブテンについて、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を、SD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用い、0、0.4、2、10および50mg/kg/day用量で実施した。動物は1群雌雄各10匹とし、被験物質は交配開始14日前から、雄は44日間、雌は分娩後哺育3日（41～46日間）まで経口投与した。

1. 反復投与毒性

雄親においては、病理組織学検査で、肝細胞の腫大および腎臓近位尿細管上皮の硝子滴の増加が10mg/kg以上の群に認められ、10mg/kg群の腎臓の絶対重量、50mg/kg群の肝臓および腎臓の絶対および相対重量は、有意に増加した。さらに、50mg/kg群で、一過性の自発運動低下、流涎および摂餌量の減少が、いずれも投与開始日に認められた。血液生化学検査では、有意な総タンパクの増加および尿素窒素の減少が認められた。体重、尿検査および血液学検査では、有意な変化は認められなかった。一方、雌親においても、雄親と同様に、一過性の一般状態の変化および摂餌量の減少が50mg/kg群で認められ、1匹は分娩後哺育2日に瀕死状態となり、切迫屠殺した。また、同群で肝細胞の腫大が少数例にみられたが、肝臓重量には有意な変化は認められず、腎臓は相対重量のみ増加したが、病理組織学的に異常は認められなかった。

以上の結果から、3,4-ジクロロ-1-ブテンのラットへの反復投与により、肝臓および腎臓に対する影響が認められ、無影響量は雄2mg/kg/day、雌10mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

親動物の交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、分娩および哺育状態に有意な変化は認められなかった。また、児動物に対しても、出産児数、生児数、性比、出生率、体重および形態に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。新生児の哺育4日生存率は、50mg/kg群で哺育2日に切迫屠殺した雌親の全児が死亡したため、対照群に比べてやや低下したが、有意な変化ではなかった。したがって、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は、いずれも50mg/kg/dayと推定された。

緒言

3,4-ジクロロ-1-ブテンは、主にプラスチック産業で、合成ポリマーの製造等に用いられている。本物質の異性体である1,4-ジクロロ-2-ブテンについて、ラットにおける経口LD₅₀値は 89 mg/kg¹⁾で、マウスへの77週間皮下および腹腔内投与では、投与部位に肉腫が発現することが知られている²⁾。また、妊娠ラットへの吸入投与では、胚の核酸および糖代謝に影響がみられ、着床後の胚の死亡率が増加するとの報告がある³⁾。しかし、3,4-ジクロロ-1-ブテンについては、変異原性を有するとの報告⁴⁾があるが、その毒性学的性質の詳細は明らかにされない。この試験は、OECDにおける高生産量既存化学物質の安全性点検プログラムの一環として実施したものである。

試験目的

3,4-ジクロロ-1-ブテンを雌雄ラットに反復経口投与し、投与期間中に交配、妊娠および分娩させ、本物質の反復投与毒性ならびに生殖発生毒性を検討する。

試験材料および方法

1. 被験物質 (Appendices 1~4)

3,4-ジクロロ-1-ブテン (CAS No. 760-23-6) は、分子量125.00、融点-61℃、沸点116℃の無色透明の液体で、水に溶けにくく、エタノール、エーテルに溶けやすく、ベンゼン、クロロホルムに極めて溶けやすい。試験には、

の試薬 (ロット番号 純度 99.7%) を入手し、冷暗所 (4℃) で密栓保管し、使用した。本物質の詳細は、Appendix 1に示した。用いた被験物質は、使用期間中安定であったことを確認した (Appendix 2)。本物質は油溶性であるため、溶媒として局方ゴマ油 (宮澤薬品株式会社、ロット番号 BE26) を用いて所定の投与用量になるような濃度の溶液に調製して投与液とし、使用時まで冷暗所 (4℃) で密栓保管した。投与液は、均一、かつ、冷暗条件下で少なくとも7日間は安定であることが確認されている (Appendix 3) ので、週1回調製し、調製後7日以内に使用した。また、初回と最後に調製したものについて分析し、所定濃度で調製されていることを確認した (Appendix 4)。なお、被験物質の分析のうち、原体の分析は
に委託して実施した。

2. 供試動物および飼育条件 (Appendices 5~8)

動物は、SD系 [Crj:CD(SD)] のSPFラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県厚木市下古沢795番地) から、雄は8週齢、雌は7週齢で搬入 (雄 57 匹、雌 57 匹) し、9日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で一般健康状態

の良好な雌雄各 50 匹を、雄は 9 週齢、雌は 8 週齢で試験に供した。投与開始時の平均体重（体重範囲）は、雄 356（343～384）g、雌 207（192～222）g であった。

ラットは、馴化および投与期間を通じて、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ （温湿度の測定結果：Appendix 5）、換気回数10回以上/時（オールフレッシュエアー方式）、照明 12 時間（午前 6 時点灯、午後 6 時消灯）に設定したバリアーシステム動物室で、馴化期間中は 3 匹ずつ、投与期間中は個体別にステンレス製金網ケージ〔276W×426D×200H(mm)〕に収容し、これをステンレス製 5 段のラックに配して飼育した。ただし、交尾確認後の雌は、巣作り材料〔日本チャールス・リバー株式会社、ホワイトフレーク（ロット番号 5-8.12、6-5.12）〕、汚染物質の分析結果：Appendix 6〕を入れたポリカーボネート製ケージ〔265W×426D×200H(mm)〕に収容した。飼料（日本農産工業株式会社、固型飼料ラボMRストック、ロット番号 94.09.72、94.10.77、汚染物質の分析結果：Appendix 7）と水（神奈川県営水道水を $1\mu\text{m}$ カートリッジフィルター濾過後紫外線照射して使用、汚染物質の分析結果：Appendix 8）は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶（ポリカーボネート製ケージの場合）により自由摂取させた。動物室の温度・湿度測定結果、飼料・水・巣作り材料の分析結果などから、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3. 群分けおよび個体識別

各群の動物数は雌雄各10匹とし、各群への動物の割り付けは、投与開始日（投与前）の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。

群分け後の動物の個体識別は耳パンチ法により行い、ラックおよびケージには標識札を貼付した。

4. 投与量の設定（別添資料D）、試験群の構成および投与方法

投与量設定試験として、ラットを1群雌雄各2匹とし、3,4-ジクロロ-1-ブテンの20、60、200、600あるいは2000 mg/kg用量を単回経口投与した。2000 mg/kg群で雌雄全例が死亡した。また、ラットを1群雌雄各4匹とし、0、3、10、30、100あるいは300mg/kg/day用量を14日間反復経口投与した。投与7日の夕方から交配が成立するまで、雌雄各1匹ずつを同居させた。主な変化として、30mg/kg以上の雌雄で自発運動低下、流涎などの症状、肝臓および腎臓重量の増加が認められた。交尾は、各群の全例に成立した（別添資料D）。そこで、本試験における投与量は、確実に毒性影響の発現が予想される50mg/kgを最高用量とし、以下10、2および0.4mg/kg/dayの4用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群（以下、対照群）、②被験物質0.4mg/kg/day投与群（0.4 mg/kg群）、同 2 mg/kg/day投与群（2 mg/kg群）、④同 10 mg/kg/day投与群（10 mg/kg群）、⑤同 50

mg/kg/day投与群(50 mg/kg群)の5群とした。

投与方法は、投与液量を体重1 kg当たり5 mlとし、胃ゾンデを装着した注射筒を用いて被験物質の0.008 w/v%液(0.4 mg/kg群)、0.04 w/v%液(2 mg/kg群)、0.2 w/v%液(10 mg/kg群)あるいは1 w/v%液(50 mg/kg群)を、雌雄とも交配開始14日前から、雄は44日間、雌は分娩後の哺育3日(41~46日間)まで、1日1回(午前中)、経口投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重に基づいて算出した。対照群には、溶媒を同様に投与した。

5. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、動物の生死、外観、行動等について観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重の測定は、個体ごとに投与開始日(投与開始直前)およびその後は7日間隔で行い、さらに最終投与日と屠殺日に測定した。ただし、雌の妊娠後は、妊娠0、7、14 および 20日と哺育0日および4日に測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて、翌日までの24時間の飼料消費量を測定した。雌の摂餌量の最終測定は、哺育3日に行った。交配期間中は、摂餌量を測定しなかった。これらの測定には、電子上皿天秤(メトラー社製、PL3000)を用いた。

(3) 交配および分娩状態観察

投与15日の午後に、雄のケージに同一群内の雌を入れて1対1の組み合わせを作り、交尾が確認されるまで(5日間で全例の交尾を確認)、連続同居させた。交尾の確認は毎朝一定時刻(9:30分頃)に行い、膣栓形成あるいは膣垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。分娩状態の観察も同じ時刻に行い、1腹全例の出産が確認された日を哺育0日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について同居開始から交尾成立までの期間、交尾率〔(交尾成立動物数/同居動物数)×100〕、受胎率〔(受胎雌数/交尾成立雌数)×100〕および出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕ならびに分娩の確認された例について妊娠期間(妊娠0日から分娩が確認された日までの期間)を算定した。

(4) 臨床病理学検査

雄について、以下の検査を実施した。

a. 尿検査：投与38日あるいは40日に、ラットを代謝ケージに収容して短時間尿(約3時間)を採取し、外観の観察、試験紙法(マイルス・三共株式会社、マルティスティックス®)によるpH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査、ならびに尿沈渣の検査(URI-CELL®液、ケンブリッジケミカルプロダクト社)を行った。また、24時間の尿量を測定した。

b. 血液学検査：供試血液の採取は、投与期間終了翌日(投与開始 45 日)の解剖直前に行った。動物は採血前日の午後 5 時より除餌し、水のみを給与した。採血はエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行ない、以下の項目について検査した。なお、採取した血液は 3 分割し、その一部は 3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を得、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の測定に、一部は、EDTA-2K処理してその他の血液検査に供した。メトヘモグロビン濃度は、van Kampen-Zijlstraによる Evelyn-Malloy 法の変法⁵⁾により測定した。

項目 (略号)	測定法	測定機器
①赤血球数(RBC)	電気抵抗検出方式	多項目自動血球計数装置〔E-4000：東亜医用電子(株)〕
②血色素量(Hb)	ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法	
③ヘマトクリット値(Ht)	パルス検出方式	
④平均赤血球容積(MCV)	計算値	
⑤平均赤血球血色素量(MCH)	計算値	
⑥平均赤血球血色素濃度(MCHC)	計算値	
⑦白血球数(WBC)	電気抵抗検出方式	
⑧血小板数(Plat.)	電気抵抗検出方式	
⑨網状赤血球数(Ret.)	Brilliant cresyl blue 染色した塗抹標本の鏡検	
⑩メトヘモグロビン濃度(Met-Hb)	Evelyn-Malloy変法	血液凝固自動測定装置(KC-10A：米アメルング社)
⑪プロトロンビン時間(PT)	Quick一段法	
⑫活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)	エラジン酸活性化法	

なお、ハイツ小体保有赤血球数および白血球百分率算定用に血液塗抹標本を作製したが、赤血球関連項目や白血球数に変化が認められなかったので、観察は実施しなかった。

c. 血液生化学検査：採取した血液の一部から血清を分離し、次の項目を測定した。

項目（略号）	測定法	測定機器
① 総タンパク（T.P.）	Biuret 法	生化学自動分析 装置〔JCA-VX- 1000 型クリナ ライザー：日本 電子（株）〕
② アルブミン（Alb.）	BCG 法	
③ A/G 比（A/G）	計算値	
④ 血糖（Glu.）	酵素法 （GK ¹⁾ -G6PDH ²⁾ -UV 系）	
⑤ トリグリセライド（T.G.）	酵素法 （LPL ³⁾ -GPO ⁴⁾ -POD ⁵⁾ 系）	
⑥ 総コレステロール（T-Cho.）	酵素法 （CES ⁶⁾ -COD ⁷⁾ -POD 系）	
⑦ 総ビリルビン（T-Bil.）	Jendrassik 法	
⑧ 尿素窒素（BUN）	Urease-UV 法	
⑨ クレアチニン（Crea.）	Jaffé法	
⑩ GOT（GOT）	SSCC ⁸⁾ 法	
⑪ GPT（GPT）	SSCC 法	
⑫ γ -GTP（ γ -GTP）	SSCC 法	
⑬ LDH（LDH）	SSCC法	
⑭ ALP（ALP）	GSCC ⁹⁾ 法	
⑮ コリンエステラーゼ（ChE）	BTC ¹⁰⁾ -DTNB ¹¹⁾ 法	
⑯ カルシウム（Ca）	OCPC 法	
⑰ 無機リン（P）	酵素法 （PNP ¹²⁾ -XOD ¹³⁾ -POD系）	
⑱ ナトリウム（Na）	イオン電極法	電解質自動分析 装置〔NAKL-1: 東亜電波工業（株）〕
⑲ カリウム（K）	イオン電極法	
⑳ 塩素（Cl）	イオン電極法	

1) グルコキナーゼ、2) グルコース 6 リン酸脱水素酵素、3) リボプロテイン
リパーゼ、4) グリセロリン酸酸化酵素、5) ペルオキシダーゼ、6) コレステ
ロールエステラーゼ、7) コレステロールオキシダーゼ、8) スカンジナビア臨
床化学会、9) ドイツ臨床化学会、10) ブチリルチオコリン、11) 5,5-ジチオビス
-2-ニトロ安息香酸、12) プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、13) キサンチン
オキシダーゼ

(5) 病理学検査

瀕死動物は発見後速やかに、雄の計画屠殺動物は採血に続いて、雌の計画屠殺動物は哺育4日の観察終了後に、分娩予定日を過ぎても分娩が認められない雌については分娩予定の4日後に、いずれもエーテル麻酔下で放血屠殺し、次の項目を検査した。

- a. 剖検：全身諸器官を肉眼的に観察した。さらに、雌については、卵巢の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率〔(着床数/黄体数)×100〕を算定した。
- b. 器官重量測定：電子上皿天秤(メトラー社、AT 200)を用いて、雌雄の脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺ならびに雄の精巣、精巣上体を秤量(絶対重量)し、対体重比(相対重量)を算出した。腎臓、副腎、精巣および精巣上体は、左右を一括して秤量した。
- c. 病理組織学検査：次の器官を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体のみブアン液)で固定した。

脳、下垂体、眼球、ハーター腺、甲状腺(上皮小体含む)、唾液腺、胸腺、気管、肺(気管支を含む)、心臓、舌、食道、胃、腸、肝臓、脾臓、膵臓、副腎、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巢、子宮、膈、大動脈(胸部)、脊髄(頸膨大部、腰膨大部)、坐骨神経、骨・骨髓(胸骨、大腿骨)、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節)、骨格筋(下腿三頭筋)、皮膚(背部)、乳腺(腹部)、肉眼的異常部位

病理組織学検査は、対照群および50 mg/kg群の全例、ならびに他の群の妊娠の成立しなかった対の脳、下垂体、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、胃、小腸(十二指腸・空腸・回腸)、大腸(盲腸・結腸・直腸)、膵臓、膀胱、骨髓、肉眼的異常部位、さらに、雄では精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、雌では卵巢、子宮、膈、乳腺について行った。0.4、2および10mg/kg群の妊娠が成立した対では、50mg/kg群で毒性影響と考えられる変化の認められた雌雄の肝臓および雄の腎臓を検査した。組織標本の作製は、株式会社組織科学研究所(東京都青梅市黒沢2丁目984-1)に委託して実施し、常法に従いパラフィン切片を作製し、H-E染色を施した。また、沈着物を同定するため、雄の腎臓についてはPAS染色、雌の切迫屠殺例の肝臓、腎臓、胃および腸については脂肪染色(ズダンⅢ)も行った。

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数および性比の観察

分娩完了の確認後各腹の産児数(生児と死亡児の合計)を調べ、分娩率〔(総出産児数/着床数)×100〕を算定した。また、性別を肛門と生殖突起の距離の長短により判定し、群ごとの性比を算出した。

(2) 外表異常および一般状態観察

分娩完了後、新生児について口腔内を含む外表の異常を観察した。また、毎日一般状態および生死を確認し、出生率〔(出産確認時生児数/総出産児数)×100〕および新生児生存率〔(哺育4日生児数/出産確認時生児数)×100〕を求めた。

(3) 体重測定

新生児について哺育0日および4日に、雌雄別に各腹ごとの総体重を測定し、1匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学検査

死亡例はその都度、生存例は雌親の解剖時(哺育4日)にエーテル・クロロホルムで麻酔死させ、胸腹部における主要器官を肉眼的に観察した。

6. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との間の有意差(危険率5%以下)を次の方法で検定した。

体重、摂餌量、血液学および血液生化学データ、器官重量、黄体数、着床数、妊娠期間、産児数などのパラメトリックデータは、Bartlettの分散検定を行った。分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法(群の大きさが異なる場合)により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一樣でない場合、ならびに着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、尿検査の定性的データなどのノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法(群の大きさが異なる場合)により対照群に対する各群の比較検定を行った。親動物の生存率、交尾率、受胎率、出産率、出産児の性比、一般状態の変化および病理学的な異常例の出現率などのカテゴリカルデータは、 χ^2 検定を行った。

試験結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物 (Tables 1, 2, Appendices 9, 10)

50mg/kg群において、分娩後哺育2日に雌の1匹が瀕死状態となったので、切迫屠殺した。この1匹以外、死亡は認められなかった。

2) 一般状態 (Tables 3, 4, Appendices 11, 12)

雄において、投与1日に、自発運動低下および流涎が50mg/kg群のほぼ全例に認められた。投与2日以降は、自発運動の低下が投与5～12日かけて1匹に認められた以外、異常は認められなかった。

雌においても、50mg/kg群で投与1日に自発運動低下が全例に、流産が約半数に認められた。また、哺育2日に切迫屠殺した例では、妊娠末期の投与39日以降において自発運動が著しく低下し、深大呼吸、眼瞼下垂などが認められた。その後分娩はしたが飼料を摂餌せず、一般状態はさらに悪化し、哺育行動をとらず、皮膚は蒼白で瀕死状態となった。

3) 体重 (Figures 1,2, Tables 5,6, Appendices 13,14)

雌雄とも、体重に有意な変化は認められなかった。50mg/kg群の体重は、雌雄とも対照群をやや下回って推移し、雄の投与期間中の増体量、雌の交配前、妊娠期間および哺育期間中の増体量はいずれも対照群に比べて少なかったが、統計学的有意差は認められなかった。

4) 摂餌量 (Figures 3,4, Tables 7,8, Appendices 15,16)

雌雄とも、50mg/kg群で、投与1日の摂餌量は対照群に比べて有意に少なかった。投与8日以降は、有意な変化は認められなかった。

5) 雄の尿所見 (Table 9, Appendix 17)

各検査項目に、有意な変化は認められなかった。

6) 雄の血液学所見 (Table 10, Appendix 18, 背景データ: Appendix 30)

各検査項目に、有意な変化は認められなかった。

7) 雄の血液生化学所見 (Table 11, Appendix 19, 背景データ: Appendix 30)

有意な総タンパクの増加および尿素窒素の減少が、50mg/kg群で認められた。

8) 剖検所見 (Tables 12, 13, Appendices 20, 21)

生存動物において、雄は肝臓の腫大が50mg/kg群の2匹、腎臓の腫大が10mg/kg群の1匹および50mg/kg群の3匹に認められた。雌は肝臓の腫大が、50mg/kg群の1匹に認められた。雌の50mg/kg群の切迫屠殺動物においては、肝臓および腎臓の退色、副腎の肥大・退色、胸腺および脾臓の萎縮が認められた。これらの所見以外にも、各群に変化が認められたが、散発的で、被験物質投与との関連性はみられなかった。

9) 器官重量 (Tables 14, 15, Appendices 22~25)

雄においては、いずれも有意な肝臓の絶対および相対重量の増加が50mg/kg群に、腎臓の絶対重量の増加が10mg/kg群、絶対および相対重量の増加が50mg/kg群に認められた。雌においても、

肝臓および腎臓重量の増加傾向が50mg/kg群でみられたが、有意差は腎臓の相対重量にのみ認められた。

10) 病理組織学所見 (Tables 16, 17, Photos 1~9, Appendices 20, 21)

被験物質の投与に起因すると考えられる変化が、肝臓および腎臓に認められた。

妊娠を成立させた雄において、肝細胞の小葉中心性腫大が50mg/kg群の9匹中4匹に認められた。腎臓では、近位尿細管上皮にPAS陽性硝子滴が対照群にも認められたが、10mg/kg群の10匹中5匹および50mg/kg群の9匹全例では、その数および大きさが明らかに増加していた。また、やや萎縮し、多核で好塩基性の上皮細胞から成り、障害後の再生像と考えられる尿細管の目立つ例が、50mg/kg群の2匹に認められた。分娩し、哺育も順調であった雌においては、肝細胞の腫大が50mg/kg群の8匹中3匹に認められた。妊娠が成立しなかった対においては、50mg/kg群の1対の雄の肝臓に、妊娠を成立させた雄と同様の変化がみられたが、雌雄とも下垂体や生殖器系器官に異常は認められなかった。50mg/kg群の雌の切迫屠殺動物においては、肝細胞、腎臓の近位尿細管上皮ならびに胃および小腸粘膜表層上皮の脂肪化、肺のうっ血、腎臓の尿細管上皮再生および遠位尿細管拡張、脾臓および胸腺の萎縮、骨髓造血細胞の減少などの所見が認められた。以上の変化以外にも検査した器官に異常が認められたが、散発的あるいは用量依存的な発現傾向のみられない所見であった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 18, Appendix 26)

(1) 交尾率および受胎率

交尾は、同居開始5日以内に、対照群および被験物質投与各群の全例に成立した。受胎率も、対照群の90%に対し、被験物質投与各群では80~100%の範囲であり、有意な変化は認められなかった。

(2) 黄体数、着床数および着床率

対照群の黄体数は18.3、着床数は17.6、着床率は95.6%であった。被験物質投与各群の黄体数、着床数、着床率とも対照群と類似した値を示し、有意な変化は認められなかった。

(3) 出産率および妊娠期間

出産率は、対照群および被験物質投与各群とも100%であった。妊娠期間は、対照群の22.6日に対し、被験物質投与各群では22.3~22.5日の範囲であり、有意な変化は認められなかった。

(4) 分娩および哺育状態

50mg/kg群の切迫屠殺した1匹を除いて、いずれの動物にも分娩および哺育状態に異常は認められなかった。切迫屠殺例は妊娠末期から一般状態が悪化し、自然分娩したが分娩確認時において16匹中9匹の児動物は死亡していた。親動物は分娩後一般状態がさらに悪化し、哺育行動を取らず、哺育2日までに残りの児動物も全例が死亡した。全児が死亡した時点で、親動物は瀕死状態であった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性 (Table 19, Appendix 27)

対照群の1腹当たりの総出産児数は16.7匹、分娩率は95.0%であった。また、新生児数は16.3匹、出生率は98.0%、性比は0.88、哺育4日生存率は99.3%であった。10mg/kg以下の群では、これらの指標は対照群と類似した値を示した。50mg/kg群においても、上述の切迫屠殺した1匹の雌親で全児が死亡したため、哺育4日生存率が対照群に比べてやや低値を示したが、有意な変化ではなかった。生存した新生児の一般状態に、異常は認められなかった。

(2) 体重 (Table 19, Appendix 27)

対照群の哺育0日における体重は雄7.1g、雌6.7gに対し、被験物質投与各群は雄6.7~7.0g、雌6.3~6.6gの範囲であった。また哺育4日における体重は対照群の雄11.2g、雌10.9gに対し、被験物質投与各群は雄10.7~11.3g、雌10.2~10.5gの範囲であり、いずれも有意な変化は認められなかった。

(3) 形態 (Tables 20, 21, Appendices 28, 29)

被験物質の投与に起因すると考えられる外表および内臓の異常は認められなかった。外表異常については、10mg/kg群で長鼻、眼球および下顎の欠損、小耳、唇裂など顔面の重複異常を有する1匹が認められた。この例は分娩確認時に死亡していた。内臓異常は、いずれの児動物にも認められなかった。内臓変異については、胸腺の頸部残留、左臍動脈遺残あるいは尿管の拡張・屈曲が総計対照群で2匹(1.3%)、0.4mg/kg群で4匹(2.9%)、2mg/kg群で1匹(0.5%)、10mg/kg群で1匹(0.6%)および50mg/kg群で5匹(3.6%)認められた。しかし、これらの発現率には群間に有意な差は認められなかった。

考察および結論

1. 反復投与毒性

雄親について、50mg/kg群で投与初日の投与後、自発運動低下および流涎がほぼ全例に認めら

れ、翌日までの摂餌量も減少した。しかし、これらの変化は一過性で、大部分の例では投与2日以降症状は消失し、摂餌量も投与8日以降対照群と差はなかった。体重は、観察期間を通じて変化は認められなかった。

病理学検査において、肝臓重量の増加および肝臓の肉眼的腫大例が50mg/kg群に認められ、組織学的には肝細胞の腫大が観察された。血液生化学検査では総タンパクの増加が認められ、肝機能に対して亢進的な影響が示唆された。しかしながら、14日間の投与量設定試験においては、100mg/kg以上でグルコースの減少、GOT、GPT、 γ -GTP、総ビリルビンの増加およびプロトロンビン時間の延長が認められている。したがって、本被験物質は、肝臓に対し毒性影響を有するものと判断された。

腎臓においては、10mg/kg以上の群で近位尿細管上皮におけるPAS陽性硝子滴の増加が認められ、腎臓重量は増加し、肉眼的にも腎臓が腫大する例があった。

尿細管上皮の硝子滴は、多くの化学物質で雄ラットへの投与により増加することが知られており^{6,7,8)}、これは α -2u-グロブリンの沈着像で、近位尿細管上皮におけるタンパクの再吸収あるいはその代謝過程に対する何らかの障害によるものと考えられている⁹⁾。

しかしながら、尿検査および血液生化学検査においては、腎機能の異常を示唆する所見は認められなかった。

一方、雌親においても、雄親と同様に一般状態および摂餌量に対する一過性の影響が50mg/kg群で認められた。

雌親の肝臓では、肝細胞の腫大が50mg/kg群の少数にみられたが、肝臓重量には有意な変化は認められなかった。また、腎臓においても、相対重量のみ50mg/kg群で増加したが、病理組織学的には変化は認められなかった。したがって、肝臓および腎臓に対する影響は、雄親に比べて軽度なものと考えられた。

50mg/kg群の雌親の1匹は妊娠末期から一般状態が悪化し、哺育2日に瀕死状態となったので切迫屠殺した。この例の病理組織学検査では、各器官のうっ血あるいは萎縮性変化に加えて、肝細胞、腎臓尿細管上皮ならびに胃および小腸粘膜の表層上皮に脂肪化が認められ、全身的な脂質代謝の異常がうかがわれた。

以上の結果から、3,4-ジクロロ-1-ブテンのラットへの反復投与により、肝臓および腎臓に対する影響が認められた。無影響量は、雄2mg/kg/day、雌10mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

雄親および雌親の生殖に対しては、観察した各指標とも対照群との間に有意な差は認められなかった。また、児動物の発生に対しても、有意な影響は認められなかった。

上述の50mg/kg群で切迫屠殺した1匹の雌親は、分娩後哺育行動を取らず、出産した全児が死

亡した。この哺育行動の欠除および児動物の死亡は、重度な一般毒性学的影響による母動物の衰弱によるもので、哺育機能等に対する直接的な影響を示唆するものではないと判断される。

また、交尾が確認されたにもかかわらず妊娠しなかった対が、投与量とは無関係に散発したが、いずれの対にも生殖能の異常を示唆する病理学的な異常は認められず、偶発的なものと考えられた。

以上の結果から、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する影響は、50mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量はいずれも、50mg/kg/dayと推定された。

参考文献

- 1) H. F. Smyth Jr., C. P. Carpenter and C. S. Weil, *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*, 4, 119-122 (1951).
- 2) B. L. van Duuren, B. M. Goldschmidt and I. Seidman, *Cancer Res.*, 35, 2553-2557 (1975).
- 3) F. R. Petrosian, W. W. Balian and M. S. Gizhlarian, *Zh. Arm.*, 35(5), 380-384 (1982).
- 4) H. Bartsch, C. Malaveille, A. Barbin and G. Planche, *Arch. Toxicol.*, 41, 249-277 (1979).
- 5) E. J. vanKampen and W. G. Zijlstra, *Adv. Clin. Chem.*, 8, 141-187 (1965).
- 6) C. A. Halder, C. E. Holdsworth, B. Y. Cockrell and V. J. Piccirillo, *Toxicol. Indust. Health*, 1, 67-87 (1985).
- 7) M. Charbonneau, J. Strasser, E. A. Lock, M. J. Tumer and J. A. Swenberg, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 99, 122-132 (1989).
- 8) S. J. Broghoff, B. B. Shrt and J. A. Swenberg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 349-367 (1990).

3,4-ジクロロ-1-ブテンのラットを用いる
反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 94-054)

最終報告書 添付資料 A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

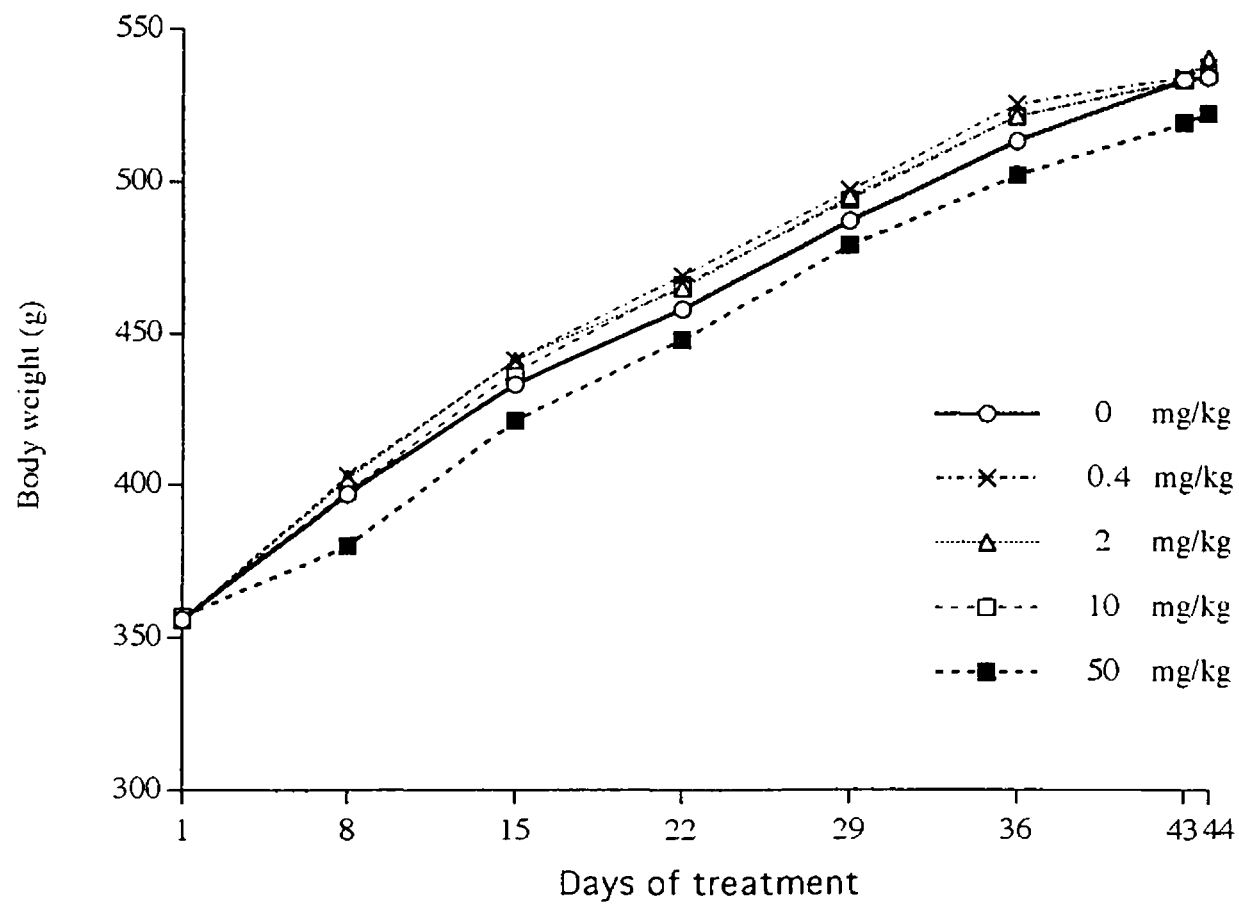


Fig. 1 Body weight change in male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

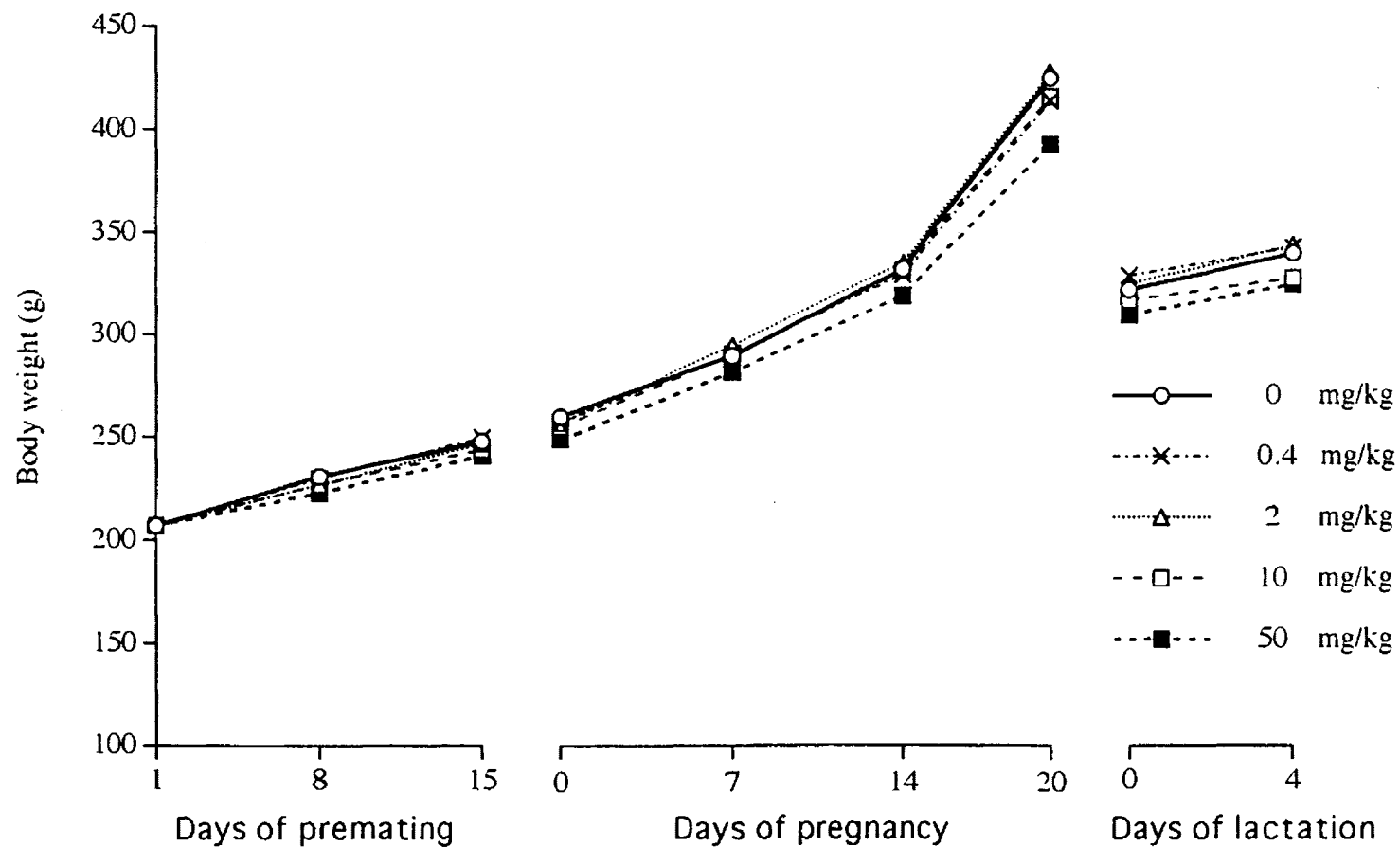


Fig. 2 Body weight change in female rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

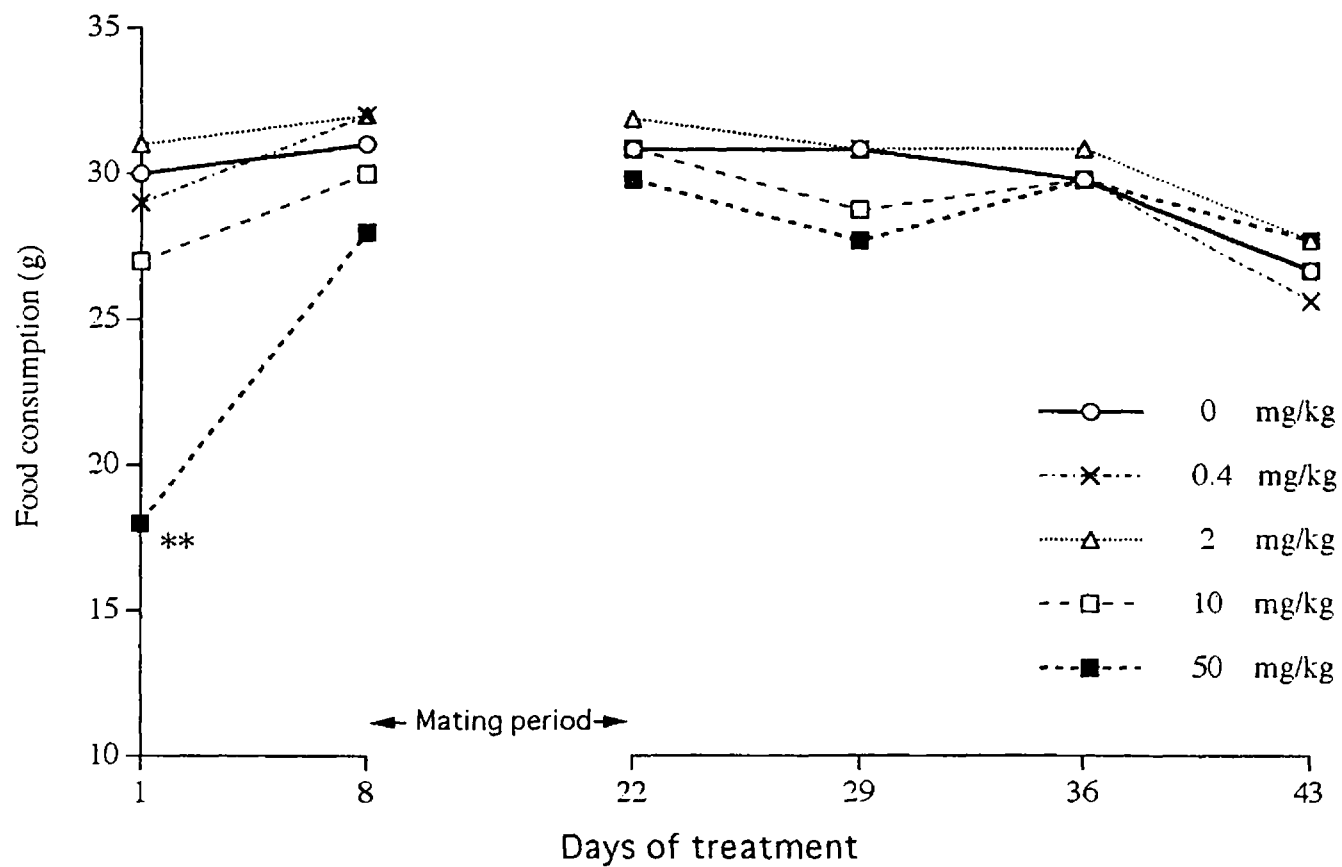


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductivi/developmental toxicity screening test

Significantly different from control (**: $P < 0.01$)

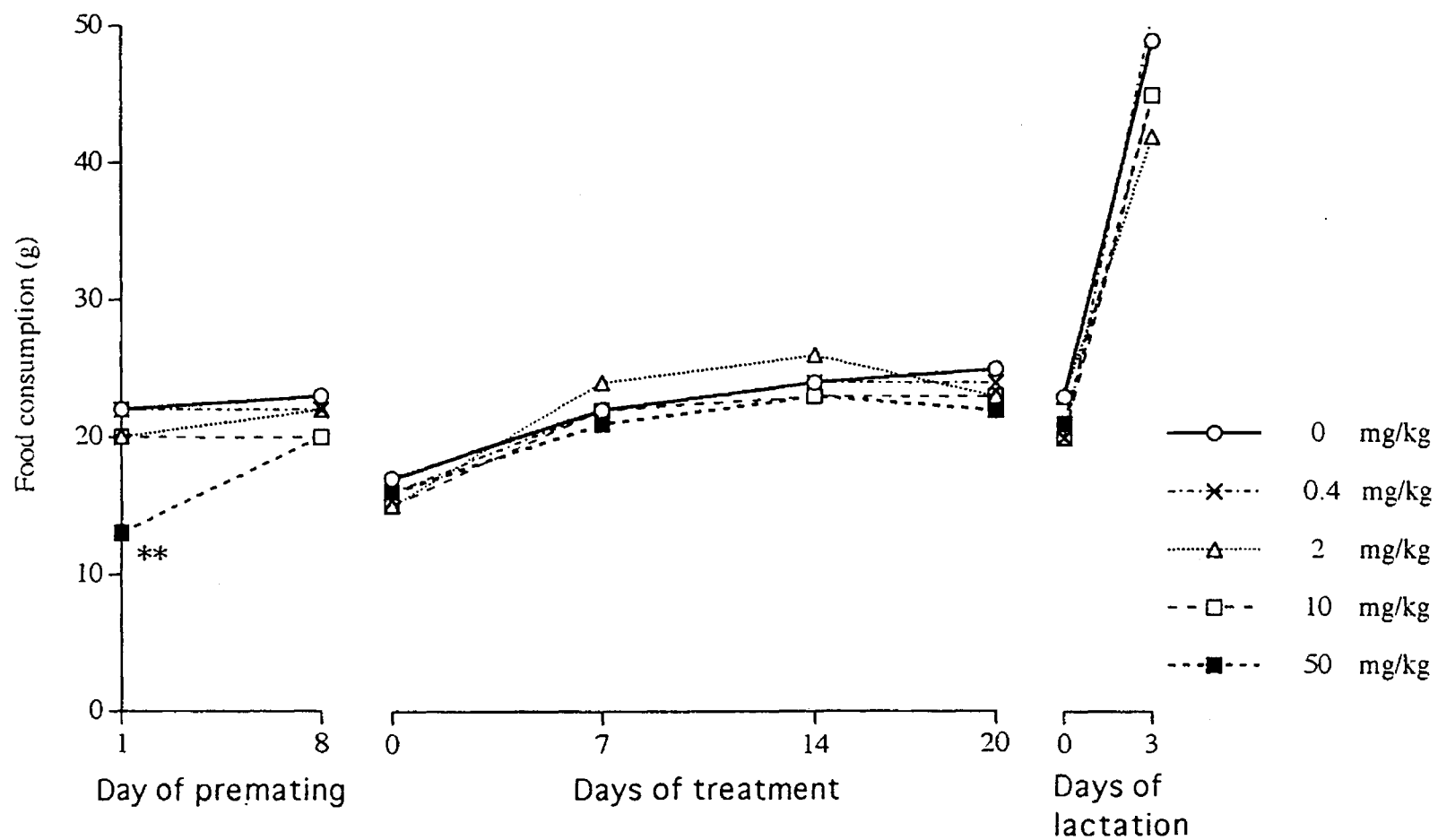


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significantly different from control (** : $P < 0.01$)

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	0.4	2	10	50
No. of animals	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0	0

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	0.4	2	10	50
No. of animals	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	1 ^a
Mortality (%)	0	0	0	0	10

a : Killed in extremis

Table 3 Incidence of clinical signs of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0			0.4			2	10	50		
	Fate	TK	FP(Total)		TK	FP(Total)		TK	TK	TK	FP(Total)	
	No. of animals	9	1	(10)	8	2	(10)	10	10	9	1	(10)
Decrease in locomotor activity		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	9	1	(10)**
Salivation		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	7	1	(8)**

TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy

** : Significantly from control at 1 % level of probability

Table 4 Incidence of clinical signs of female rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0			0.4			2	10	50			
		TK	NP	Total	TK	NP	Total	TK	TK	TK	NP	KE	Total
	No. of animals	9	1	(10)	8	2	(10)	10	10	8	1	1	(10)
Decrease in locomotor activity		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	8	1	1	(10)**
Salivation		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	3	0	1	(4)*
Ptosis, pale skin, deep respiration and lacking of nursing and lactation		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	0	1	(1)

TK : Terminal kill

NP : Non-pregnant(killed on 26 days after copulation)

KE : Killed in extremis

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 5

Body weights of male rats treated orally with
3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and
reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of treatment								Gain 1~44
	1	8	15	22	29	36	43	44	
0	356 ± 11 (10)	397 ± 14 (10)	433 ± 17 (10)	458 ± 18 (10)	487 ± 19 (10)	513 ± 22 (10)	533 ± 27 (10)	534 ± 28 (10)	178 ± 22 (10)
0.4	356 ± 10 (10)	403 ± 16 (10)	441 ± 25 (10)	469 ± 28 (10)	497 ± 33 (10)	525 ± 39 (10)	534 ± 38 (10)	537 ± 41 (10)	181 ± 36 (10)
2	356 ± 11 (10)	402 ± 16 (10)	441 ± 21 (10)	465 ± 24 (10)	495 ± 31 (10)	521 ± 34 (10)	533 ± 39 (10)	540 ± 37 (10)	183 ± 28 (10)
10	357 ± 13 (10)	398 ± 13 (10)	437 ± 15 (10)	466 ± 17 (10)	494 ± 19 (10)	521 ± 17 (10)	533 ± 18 (10)	535 ± 20 (10)	178 ± 16 (10)
50	357 ± 13 (10)	380 ± 23 (10)	421 ± 30 (10)	448 ± 29 (10)	479 ± 32 (10)	502 ± 31 (10)	519 ± 31 (10)	522 ± 30 (10)	165 ± 19 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals examined).

Table 6

Body weights of female rats treated orally with
3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and
reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of premating				Days of pregnancy					Days of lactation		
	1	8	15	Gain 1~15	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4	Gain 0~4
0	207 ± 7 (10)	231 ± 11 (10)	248 ± 12 (10)	40 ± 8 (10)	261 ± 16 (9)	294 ± 16 (9)	337 ± 19 (9)	438 ± 26 (9)	177 ± 15 (9)	322 ± 18 (9)	340 ± 13 (9)	18 ± 14 (9)
0.4	207 ± 7 (10)	230 ± 9 (10)	250 ± 14 (10)	43 ± 10 (10)	258 ± 14 (8)	295 ± 14 (8)	335 ± 15 (8)	436 ± 20 (8)	178 ± 12 (8)	329 ± 24 (8)	343 ± 15 (8)	14 ± 16 (8)
2	207 ± 7 (10)	227 ± 9 (10)	247 ± 12 (10)	39 ± 9 (10)	257 ± 15 (10)	295 ± 17 (10)	335 ± 17 (10)	428 ± 23 (10)	171 ± 15 (10)	325 ± 24 (10)	344 ± 17 (10)	19 ± 23 (10)
10	207 ± 6 (10)	227 ± 10 (10)	244 ± 13 (10)	37 ± 11 (10)	255 ± 12 (10)	290 ± 16 (10)	331 ± 23 (10)	416 ± 29 (10)	161 ± 22 (10)	317 ± 19 (10)	328 ± 21 (10)	11 ± 15 (10)
50	207 ± 8 (10)	223 ± 9 (10)	241 ± 12 (10)	34 ± 10 (10)	250 ± 11 (9)	283 ± 16 (9)	320 ± 20 (9)	404 ± 23 (9)	154 ± 16 (9)	310 ± 34 (9)	325 ± 27 (8)	8 ± 15 (8)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 7

Food consumption of male rats treated orally with
3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and
reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Days of treatment					
	1	8	22	29	36	43
0	30 ± 2 (10)	31 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	29 ± 2 (10)	26 ± 2 (10)
0.4	29 ± 3 (10)	32 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	30 ± 4 (10)	29 ± 3 (10)	25 ± 5 (10)
2	31 ± 3 (10)	32 ± 3 (10)	31 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	27 ± 3 (10)
10	27 ± 5 (10)	30 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	28 ± 3 (10)	29 ± 3 (10)	26 ± 3 (10)
50	18** ± 3 (10)	28 ± 4 (10)	29 ± 2 (10)	27 ± 2 (10)	29 ± 3 (10)	27 ± 3 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals examined).

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 8

Food consumption of female rats treated orally with
3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and
reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	(g/rat/day)							
	Days of pre mating		Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	0	7	14	20	0	3
0	22 ± 2 (10)	23 ± 4 (10)	16 ± 3 (9)	23 ± 3 (9)	25 ± 2 (9)	26 ± 2 (9)	23 ± 7 (9)	49 ± 3 (9)
0.4	22 ± 3 (10)	22 ± 2 (10)	17 ± 2 (8)	23 ± 2 (8)	24 ± 3 (8)	24 ± 5 (8)	20 ± 7 (8)	51 ± 6 (8)
2	20 ± 2 (10)	22 ± 2 (10)	15 ± 2 (10)	24 ± 3 (10)	26 ± 2 (10)	23 ± 3 (10)	23 ± 9 (10)	42 ± 14 (10)
10	20 ± 2 (10)	20 ± 4 (10)	15 ± 2 (10)	22 ± 3 (10)	23 ± 2 (10)	23 ± 4 (10)	20 ± 11 (10)	45 ± 12 (10)
50	13** ± 5 (10)	20 ± 2 (10)	16 ± 3 (9)	21 ± 2 (9)	23 ± 2 (9)	23 ± 6 (9)	21 ± 10 (9)	45 ± 6 (8)

Each value is expressed as mean ± S.D. and (number of animals available).

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 9 - 1 Urinary findings of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene
in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Color				Cloudy		Volume (ml/24hrs)	pH						Protein				
		PY	Y	PB	B	-	+		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	+++
0	10	7	3			2	8	13.0 ^{a)} ±6.6			2	5	2	1			8	2	
0.4	10	6	3	1		1	9	13.2 ±6.2		1	2	2	1	4			4	5	1
2	10	4	6			1	9	12.8 ±4.9			4	2	1	3	1	1	6	2	
10	10	6	3		1	2	8	12.0 ±7.3		2	2	2	1	3			3	6	1
50	10	4	4	2		6	4	15.1 ±4.6		2	2	2	1	3	2	7			1

Dose (mg/kg)	No. of animals	Glucose					Ketone body					Occult blood					Urobilinogen				Bilirubin			
		-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	0.1	1	2	4	-	+	++	+++
0	10	10					1	3	4	2		8	2				10				10			
0.4	10	10					1	3	4	2		8	2				10				10			
2	10	10						4	3	2	1	7	3				10				10			
10	10	10						2	2	5	1	6	4				10				10			
50	10	10						6	3	1		5	5				10				10			

a) : Mean±S.D.

Color : PY(pale yellow), Y(yellow), PB(pale brown), B(brown)

Cloudy : - (negligible), + (cloudy)

Protein : - (negligible), ± (15~30mg/dl), + (30mg/dl), ++ (100mg/dl), +++ (300mg/dl)

Glucose : - (negligible), ± (0.1g/dl), + (0.25g/dl), ++ (0.5g/dl), +++ (1g/dl)

Ketone body : - (negligible), ± (5mg/dl), + (15mg/dl), ++ (40mg/dl), +++ (80mg/dl)

Occult blood : - (negligible), ± (trace), + (slight), ++ (moderate), +++ (marked)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dl, 0 (negligible), 1 (marked)

Table 9 - 2 Urinary findings of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene
in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes				Leukocytes				Crystals											
										Mg				Ca				Ams			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
0	10	10				10						6	4	10				10			
0.4	10	10				10						3	7	10				10			
2	10	10				10				1	1	4	4	10				10			
10	10	9	1			9	1					5	5	10				10			
50	10	10				9		1		2	1	7		10				10			

Dose (mg/kg)	No. of animals	Epithelial cells						Casts						Fat globules	
		Sq		R		S		G		H		W			
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
0	10	10		10		10		10		10		10		10	
0.4	10	10		10		10		10		10		10		10	
2	10	10		10		10		10		10		10		10	
10	10	10		10		10		10		10		10		10	
50	10	10		10		10		10		10		10		10	

- : Not observed; + : A few in some fields; ++ : A few in all fields; +++ : Many in all fields

Crystals

Mg(ammonium magnesium phosphate)

Ca(calcium phosphate)

Ams(amorphous)

Epithelial cells

Sq(squamous)

R (round)

S (spindle)

Casts

G(granule)

H(hyaline)

W(waxy)

Table 10 Hematological findings of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	Met-Hb (%)	Plat. ($10^4/\mu\text{l}$)	PT (sec)	APTT (sec)	WBC ($10^2/\mu\text{l}$)
0	10	836 $\pm$ 27	15.2 $\pm$ 0.6	45.0 $\pm$ 1.5	54 $\pm$ 1	18.2 $\pm$ 0.4	33.8 $\pm$ 0.4	21 $\pm$ 3	0.6 $\pm$ 0.3	138 $\pm$ 16	12.9 $\pm$ 0.1	17.8 $\pm$ 1.2	86 $\pm$ 21
0.4	10	844 $\pm$ 36	15.4 $\pm$ 0.4	45.7 $\pm$ 1.2	54 $\pm$ 1	18.2 $\pm$ 0.6	33.6 $\pm$ 0.3	22 $\pm$ 5	0.5 $\pm$ 0.2	138 $\pm$ 14	13.2 $\pm$ 0.2	18.1 $\pm$ 1.4	82 $\pm$ 36
2	10	820 $\pm$ 28	15.1 $\pm$ 0.4	44.6 $\pm$ 0.9	54 $\pm$ 2	18.4 $\pm$ 0.6	33.9 $\pm$ 0.6	22 $\pm$ 6	0.4 $\pm$ 0.4	142 $\pm$ 12	13.0 $\pm$ 0.3	18.3 $\pm$ 0.9	86 $\pm$ 16
10	10	828 $\pm$ 29	15.0 $\pm$ 0.3	44.5 $\pm$ 0.6	54 $\pm$ 1	18.1 $\pm$ 0.8	33.6 $\pm$ 0.8	22 $\pm$ 6	0.4 $\pm$ 0.2	133 $\pm$ 9	13.1 $\pm$ 0.7	18.2 $\pm$ 0.9	74 $\pm$ 17
50	10	820 $\pm$ 22	14.8 $\pm$ 0.6	43.9 $\pm$ 1.6	54 $\pm$ 2	18.0 $\pm$ 0.7	33.6 $\pm$ 0.7	20 $\pm$ 5	0.3 $\pm$ 0.2	143 $\pm$ 19	12.8 $\pm$ 0.3	18.1 $\pm$ 0.8	78 $\pm$ 15

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

Table 11

Biochemical findings of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene
in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	LDH (IU/l)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	ChE (IU/l)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G	T-Chol. (mg/dl)
0	10	410 $\pm$ 266	63 $\pm$ 11	28 $\pm$ 5	255 $\pm$ 65	0.50 $\pm$ 0.66	69 $\pm$ 45	6.45 $\pm$ 0.19	2.95 $\pm$ 0.21	0.85 $\pm$ 0.09	76 $\pm$ 14
0.4	10	253 $\pm$ 54	60 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3	247 $\pm$ 55	0.64 $\pm$ 0.42	70 $\pm$ 29	6.47 $\pm$ 0.13	3.00 $\pm$ 0.17	0.87 $\pm$ 0.10	71 $\pm$ 17
2	10	214 $\pm$ 76	56 $\pm$ 5	28 $\pm$ 5	266 $\pm$ 50	0.37 $\pm$ 0.19	48 $\pm$ 17	6.40 $\pm$ 0.26	2.82 $\pm$ 0.22	0.79 $\pm$ 0.10	71 $\pm$ 11
10	10	232 $\pm$ 116	62 $\pm$ 20	35 $\pm$ 16	267 $\pm$ 45	0.32 $\pm$ 0.24	39 $\pm$ 12	6.63 $\pm$ 0.14	3.02 $\pm$ 0.18	0.84 $\pm$ 0.09	77 $\pm$ 16
50	10	280 $\pm$ 112	52 $\pm$ 7	31 $\pm$ 8	304 $\pm$ 110	0.41 $\pm$ 0.25	38 $\pm$ 12	6.77** $\pm$ 0.27	3.17 $\pm$ 0.22	0.88 $\pm$ 0.10	80 $\pm$ 17
Dose (mg/kg)	No. of animals	T.G. (mg/dl)	Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
0	10	94 $\pm$ 34	137 $\pm$ 18	0.32 $\pm$ 0.03	15.5 $\pm$ 1.6	0.56 $\pm$ 0.06	10.1 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.5	142 $\pm$ 1	4.55 $\pm$ 0.31	105 $\pm$ 1
0.4	10	65 $\pm$ 13	131 $\pm$ 17	0.32 $\pm$ 0.04	14.2 $\pm$ 1.4	0.56 $\pm$ 0.04	10.1 $\pm$ 0.4	6.7 $\pm$ 1.1	143 $\pm$ 1	4.36 $\pm$ 0.23	106 $\pm$ 1
2	10	64 $\pm$ 37	131 $\pm$ 21	0.32 $\pm$ 0.05	15.9 $\pm$ 1.4	0.56 $\pm$ 0.06	9.9 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.6	142 $\pm$ 1	4.45 $\pm$ 0.22	105 $\pm$ 1
10	10	68 $\pm$ 27	140 $\pm$ 13	0.30 $\pm$ 0.04	15.0 $\pm$ 1.9	0.55 $\pm$ 0.07	10.1 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.5	142 $\pm$ 1	4.50 $\pm$ 0.30	105 $\pm$ 1
50	10	73 $\pm$ 38	142 $\pm$ 15	0.29 $\pm$ 0.05	13.1** $\pm$ 1.7	0.50 $\pm$ 0.04	10.0 $\pm$ 0.4	7.4 $\pm$ 0.6	142 $\pm$ 1	4.65 $\pm$ 0.30	106 $\pm$ 1

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 12 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

		Dose (mg/kg)			0			0.4			2			10			50		
Organs : Findings	Degree	Fate No. of animals	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 8	FP 2	(T) (10)	TK 10	TK 10	TK 9	FP 1	(T) (10)						
Liver : Discoloration	+		0	0	(0)	1	0	(1)	1	0	0	0	(0)						
Enlargement	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	2	0	(2)						
Kidney : Enlargement	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	1	3	0	(3)						

+ : Slight; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy; T : Total

Table 13 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

			Dose (mg/kg)			0			0.4			2			10			50		
Organs : Findings	Degree	Fate No. of animals	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 8	NP 2	(T) (10)	TK 10	TK 10	TK 8	NP 1	KE 1	(T) (10)						
Liver : Discoloration	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	0	1	(1)						
Enlargement	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	1	0	0	(1)						
Kidney : Discoloration	++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	0	1	(1)						
Adrenal: Hypertrophy and discoloration	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	0	1	(1)						
Unilateral defect	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	1	0	0	(1)						
Thymus : Atrophy	+++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	0	1	(1)						
Spleen : Atrophy	++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	0	1	(1)						
Bone : Black spot*	+		1	0	(1)	0	0	(0)	0	0	0	0	0	(0)						

a : Black spot in the right frontal bone

+ : Slight; ++ : Moderate; +++ : Marked; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant; KE : Killed in extremis;

T : Total

Table 14 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epidid. (g)
Absolute	0	10	505 ± 27	2.10 ± 0.05	15.31 ± 1.50	3.24 ± 0.26	0.79 ± 0.13	1.47 ± 0.09	0.39 ± 0.06	61.3 ± 8.9	3.46 ± 0.27	1.51 ± 0.20
	0.4	10	510 ± 39	2.12 ± 0.08	15.13 ± 2.08	3.21 ± 0.18	0.78 ± 0.10	1.56 ± 0.11	0.34 ± 0.05	63.7 ± 9.1	3.44 ± 0.33	1.45 ± 0.13
	2	10	512 ± 37	2.07 ± 0.07	15.19 ± 2.17	3.22 ± 0.29	0.79 ± 0.08	1.50 ± 0.12	0.37 ± 0.08	59.0 ± 5.3	3.43 ± 0.21	1.44 ± 0.14
	10	10	512 ± 19	2.10 ± 0.06	16.58 ± 0.65	3.57* ± 0.25	0.80 ± 0.09	1.57 ± 0.09	0.32 ± 0.12	63.4 ± 7.0	3.65 ± 0.22	1.49 ± 0.15
	50	10	492 ± 32	2.08 ± 0.10	18.42** ± 2.23	3.83** ± 0.36	0.76 ± 0.11	1.51 ± 0.11	0.39 ± 0.10	63.0 ± 5.4	3.65 ± 0.23	1.46 ± 0.18
Relative@	0	10	505 ± 27	0.42 ± 0.02	3.03 ± 0.25	0.64 ± 0.04	0.16 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.08 ± 0.01	12.12 ± 1.63	0.69 ± 0.07	0.30 ± 0.05
	0.4	10	510 ± 39	0.42 ± 0.04	2.96 ± 0.27	0.63 ± 0.05	0.16 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.07 ± 0.01	12.55 ± 1.99	0.68 ± 0.09	0.29 ± 0.05
	2	10	512 ± 37	0.41 ± 0.03	2.96 ± 0.26	0.63 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.07 ± 0.02	11.59 ± 1.30	0.67 ± 0.05	0.28 ± 0.03
	10	10	512 ± 19	0.41 ± 0.02	3.24 ± 0.15	0.70 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.06 ± 0.02	12.41 ± 1.48	0.72 ± 0.04	0.29 ± 0.04
	50	10	492 ± 32	0.42 ± 0.02	3.74** ± 0.28	0.78** ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.08 ± 0.02	12.79 ± 0.77	0.75 ± 0.07	0.30 ± 0.05

Each value is expressed as mean±S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 15

Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Adrenal (mg)
Absolute	0	9	340 ± 13	1.97 ± 0.06	14.89 ± 1.06	2.02 ± 0.12	0.70 ± 0.08	1.03 ± 0.06	0.25 ± 0.06	77.1 ± 9.5
	0.4	8	343 ± 15	1.93 ± 0.10	14.67 ± 0.82	1.96 ± 0.14	0.66 ± 0.04	1.06 ± 0.10	0.25 ± 0.06	75.3 ± 8.0
	2	10	344 ± 17	1.93 ± 0.07	14.77 ± 1.40	1.99 ± 0.12	0.65 ± 0.08	1.05 ± 0.06	0.23 ± 0.05	78.0 ± 12.2
	10	10	328 ± 21	1.96 ± 0.11	14.39 ± 1.25	2.01 ± 0.16	0.66 ± 0.09	1.07 ± 0.12	0.24 ± 0.06	78.0 ± 10.0
	50	8	325 ± 27	1.91 ± 0.08	16.51 ± 1.81	2.20 ± 0.15	0.62 ± 0.10	1.01 ± 0.10	0.20 ± 0.07	75.9 ± 8.6
Relative [@]	0	9	340 ± 13	0.58 ± 0.03	4.38 ± 0.30	0.59 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.07 ± 0.02	22.69 ± 2.68
	0.4	8	343 ± 15	0.56 ± 0.04	4.28 ± 0.11	0.57 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.07 ± 0.02	21.97 ± 2.10
	2	10	344 ± 17	0.56 ± 0.03	4.30 ± 0.42	0.58 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.07 ± 0.02	22.70 ± 3.46
	10	10	328 ± 21	0.60 ± 0.05	4.39 ± 0.32	0.61 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.07 ± 0.02	23.82 ± 3.25
	50	8	325 ± 27	0.59 ± 0.03	5.09 ± 0.32	0.68** ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.06 ± 0.02	23.38 ± 1.72

Each value is expressed as mean ± S. D.

[@] : Relative organ weight per 100g body weight

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 16 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

			Dose(mg/kg)			0			0.4			2			10			50		
Organ	: Findings	Degree	Fate No. of animals	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 8	FP 2	(T) (10)	TK 10	FP 10	(T) (10)	TK 10	FP 10	(T) (10)	TK 9	FP 1	(T) (10)		
Lung	: Arterial wall mineralization	+		3	1	(4)	—	0	(0/2)	—	—	—	—	—	—	5	1	(6)		
	Foam cell accumulation in alveolar space	+		2	0	(2)	—	0	(0/2)	—	—	—	—	—	—	0	0	(0)		
	Bronchopneumonia	+		0	1	(1)	—	0	(0/2)	—	—	—	—	—	—	0	0	(0)		
Liver	: Hepatocellular swelling	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	4	1	(5)*		
	Hepatocellular fatty change	+		1	0	(1)	0	0	(0)	1	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)		
		++		0	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)		
Total				1	0	(1)	1	0	(1)	2	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)		
	Focal necrosis	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	1	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)		
Pancreas:	Interstitial cell infiltration	+		2	0	(2)	—	0	(0/2)	—	—	—	—	—	—	1	0	(1)		
Kidney	: Eosinophilic bodies in proximal tubule	+		2	0	(2)	4	1	(5)	4	5	(5)	5	0	(5)	5	0	(5)		
		++		2	0	(2)	0	0	(0)	1	1	(1)	1	0	(0)	0	0	(0)		
	Total			4	0	(4)	4	1	(5)	5	6	(5)	6	0	(5)	5	0	(5)		
	Hyaline droplets in proximal tubular epithelium	+		8	1	(9)	8	2	(10)	10	5	(5)	5	0	(5)	0	1	(1)		
		++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	4	0	(4)**		
		+++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	5	0	(5)		
Total				8	1	(9)	8	2	(10)	10	10	(10)	10	0	(0)	9	1	(10)		
	Atrophic and regenerated tubule	+		4	0	(4)	3	0	(3)	4	4	(4)	4	0	(0)	4	1	(5)		
		++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	2	0	(2)		
	Total			4	0	(4)	3	0	(3)	4	4	(4)	4	0	(0)	6	1	(7)		
	Hyaline casts	+		2	0	(2)	0	0	(0)	1	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)		
	Interstitial cell infiltration	+		1	0	(1)	0	1	(1)	1	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)		
Prostate:	Interstitial cell infiltration	+		2	1	(3)	—	0	(0/2)	—	—	—	—	—	—	3	0	(3)		
		++		0	0	(0)	—	1	(1/2)	—	—	—	—	—	—	0	0	(0)		
	Total			3	0	(3)	—	1	(1/2)	—	—	—	—	—	—	3	0	(3)		
Thymus	: Hemorrhage	+		1	0	(1)	—	0	(0/2)	—	—	—	—	—	—	0	0	(0)		

—: Not examined; +: Slight; ++: Moderate; +++: Marked; TK: Terminal kill; FP: Failed to cause pregnancy; T: Total

*: Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 17 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

			Dose(mg/kg)		0		0.4		2		10		50	
Organ	: Findings	Degree	Fate No. of animals	TK 9	NP 1 (T) 10	TK 8	NP 2 (T) 10	TK 10	TK 10	TK 8	NP 1	KE 1 (T) 10		
Lung	: Arterial wall mineralization	+		3	1 (4)	—	0 (0/2)	—	—	2	0	0 (2)		
	Foam cell accumulation in alveolar space	+		3	0 (3)	—	0 (0/2)	—	—	0	0	0 (0)		
	Congestion	+		0	0 (0)	—	0 (0/2)	0	0	0	0	1 (1)		
Liver	: Hepatocellular swelling	+		0	0 (0)	0	0 (0)	0	0	3	0	0 (3)		
	Hepatocellular fatty change	+		0	0 (0)	0	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)		
		++		0	0 (0)	0	0 (0)	0	0	0	0	1 (1)		
	Total			0	0 (0)	0	0 (0)	1	0	0	0	1 (1)		
Stomach	: Fatty change in glandular and nonglandular mucosal epithelia	+		0	0 (0)	—	0 (0/2)	0	0	0	0	1 (1)		
Small intestine	: Fatty change in mucosal epithelium	+		0	0 (0)	—	0 —	—	—	0	0	1 (1)		
Kidney	: Interstitial cell infiltration	+		1	0 (1)	—	0 —	—	—	2	0	0 (2)		
	Atrophic and regenerated tubule	+		3	0 (3)	—	0 —	—	—	0	0	0 (1)		
		++		0	0 (0)	—	0 —	—	—	0	0	1 (1)		
	Total			3	0 (3)	—	0 —	—	—	1	0	1 (2)		
	Fatty change of proximal tubular epithelium	++		0	0 (0)	—	0 —	—	—	0	0	1 (1)		
	Dilatation of distal tubule	+		0	0 (0)	—	0 —	—	—	0	0	1 (1)		
Adrenal	: Cortical cell vacuolization	++		0	0 (0)	—	0 —	—	—	0	0	1 (1)		
	Cortical hypertrophy	++		0	0 (0)	—	0 —	—	—	1*	0	0 (1)		
Thymus	: Hemorrhage	+		0	0 (0)	—	1 —	—	—	0	0	0 (0)		
	Atrophy	+++		0	0 (0)	—	0 —	—	—	0	0	1 (1)		
Spleen	: Atrophy	++		0	0 (0)	—	0 —	—	—	0	0	1 (1)		
Bone marrow	: Decreased cellularity	++		0	0 (0)	—	0 —	—	—	0	0	1 (1)		
	Angiectasis	+		1/1 ^b	— (1/1)	—	— —	—	—	—	—	—		

—: Not examined; +: Slight; ++: Moderate; +++: Marked; TK: Terminal kill; NP: Non-pregnant; KE: Killed in extremis; T: Total
a: A case with unilateral defect of the adrenal; b: A case with macroscopical abnormality
The organs of the Heart, Lung, Liver, Pancreas, Stomach, Intestine, Kidney, Urinary bladder, Ovary, Uterus, Vagina, Pituitary, Thyroid, Parathyroid, Adrenal, Thymus, Spleen, Bone marrow, Brain, Eye ball and Mammary gland were examined from animals of the control and 50 mg/kg groups, and NP animals.

Table 1 8 Reproduction results of rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	0	0.4	2	10	50
No. of pairs mated		10	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation		10	10	10	10	10
Copulation index (%)		100	100	100	100	100
Pairing days until copulation(days, Mean±S.D.)		2.4±1.2	2.1±1.3	2.7±0.9	2.4±1.2	2.0±1.2
No. of pregnant females		9	8	10	10	9
Fertility index (%)		90	80	100	100	90
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)		18.3±1.6	18.6±2.1	17.4±2.2	18.5±2.8	17.2±1.4
No. of implantation sites (Mean±S.D.)		17.6±1.4	18.1±1.4	16.1±3.1	17.3±2.5	16.6±1.3
Implantation index (% , Mean±S.D.)		95.6±5.0	97.7±4.7	92.1±9.2	93.9±8.9	96.3±5.6
No. of pregnant females with parturition		9	8	10	10	9
Gestation length (days, Mean±S.D.)		22.6±0.5	22.3±0.5	22.5±0.5	22.3±0.5	22.4±0.5
No. of pregnant females with live pups		9	8	10	10	9
Gestation index (%)		100	100	100	100	100
No. of pregnant that died ^a		0	0	0	0	1
No. of pregnant females that survived		9	8	10	10	8

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated) × 100

Fertility index = (No. of pregnant animals/No. of pairs with successful copulation) × 100

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of living pregnant females) × 100

a : Killed in extremis

Table 19

Litter results of female rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	0.4	2	10	50
No. of pups born	16.7± 1.4	17.5± 2.2	15.4± 2.8	15.1± 3.3	15.3± 1.4
Delivery index (%)	95.0± 5.2	96.3± 7.0	96.0± 5.5	86.5± 14.6	92.9± 8.7
No. of pups alive on day 0 of lactation					
Total	16.3± 1.4	17.3± 2.3	15.4± 2.8	14.9± 3.3	14.3± 3.1
Male	7.8± 2.0	8.9± 3.0	8.1± 2.2	7.4± 2.5	6.2± 2.3
Female	8.6± 2.1	8.4± 3.2	7.3± 2.4	7.5± 1.7	8.1± 2.5
Live birth index (%)	98.0± 4.0	98.6± 2.7	100 ± 0	98.8± 2.6	93.8± 18.7
Sex ratio (Male/Female)	0.88	1.06	1.11	0.99	0.79
No. of pups alive on day 4 of lactation					
Total	16.2± 1.4	17.0± 2.0	15.4± 2.8	14.7± 3.3	13.6± 5.3
Male	7.8± 2.0	8.8± 2.9	8.1± 2.2	7.3± 2.5	5.9± 3.0
Female	8.4± 2.0	8.3± 3.3	7.3± 2.4	7.4± 1.7	7.7± 3.5
Viability index (%)	99.3± 2.0	98.7± 2.4	100 ± 0	98.7± 2.8	88.9± 33.3
Body weight of live pups (g)					
on day 0					
Male	7.1± 0.5	6.7± 0.6	7.0± 0.8	6.9± 0.4	6.8± 0.5
Female	6.7± 0.6	6.3± 0.6	6.6± 0.6	6.5± 0.5	6.3± 0.5
on day 4					
Male	11.2± 1.0	10.7± 1.1	11.3± 1.5	10.9± 1.5	11.1± 1.0
Female	10.9± 1.1	10.2± 1.2	10.5± 1.4	10.3± 1.6	10.5± 0.8

Delivery index = (No. of pups born / No. of implantation sites) × 100

Live birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of pups born) × 100

Viability index = (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0) × 100

Sex ratio = Total No. of male pups / Total No. of female pups

Each value is expressed as Mean ± SD., except sex ratio

Table 20 Incidence of external findings of rats treated orally with 3,4 dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	0.4	2	10	50
External	No. of pups examined	150	140	154	151	138
	No. of pups with external anomalies ^a	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6±2.0)	0 (0)
	External anomalies ^a					
	Multiple anomaly ^b	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6±2.0)	0 (0)

a : No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages)

b : Malformations of the facial structures such as proboscis, anophthalmia, microtia, agnatia and cleft lip

Table 21 Incidence of visceral findings of rats treated orally with 3,4-dichloro-1-butene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	0.4	2	10	50
Visceral	No. of pups examined	150	140	154	151	138
	No. of pups with visceral anomalies ^a	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	No. of pups with visceral variations ^a	2 (1.3±2.6)	4 (2.9±3.1)	1 (0.5±1.7)	1 (0.6±2.0)	5 (3.6±4.8)
	Visceral variations ^a					
	Thymic remnant in neck	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6±2.0)	2 (1.4±2.9)
	Persistent left umbilical artery	2 (1.3±2.6)	2 (1.4±2.5)	0 (0)	0 (0)	3 (2.2±4.7)
	Dilatation and bending of ureter	0 (0)	2 (1.5±2.9)	1 (0.5±1.7)	0 (0)	0 (0)

a : No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages)