

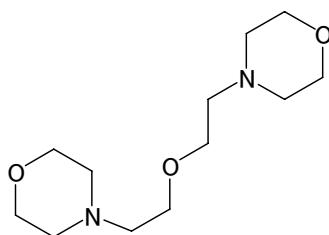
Bis (2-morpholinoethyl) ether

ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテル

[CAS No. 6425-39-4]

Molecular formula: C₁₂H₂₄N₂O₃

Molecular weight: 244.33



ABSTRACT

1. Material and method

Purity	: 94.8%
Test species/strain	: Rat/Crl:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 30, 100, 300 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 300 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 12 (5 for recovery) ; females, 12; satellite females, 5
Vehicle	: Water for injection
Administration period	: Males, 42 days Females, from 14 days before mating to day 4 of lactation Females (satellite), 42 days
Recovery period	: Males, 14 days Females (satellite), 14 days
Terminal killing	: Males, day 43 of treatment and 15 of recovery Females, day 5 of lactation Females (satellite), day 15 of recovery Offspring, day 4 after birth
GLP	: Yes

2. Results

Repeated dose toxicity

In the 300 mg/kg-dosed groups, one male rat died ten days after the administration, and one female died forty-one days after the administration under parturition. Cause of their death was respiratory insufficiency by lung edema. In the clinical observation, flash of skin, edema of limbs, erythema and purpura of tail and/or pinnae, loss of fur, a lot of spilled food, increased irritability of touch response and irregular respiration were observed in the 300 mg/kg-dosed group. An increased locomotor activity was observed in the males given 100 mg/kg and above, and in the females given 300 mg/kg. Food consumption reduced in the males given 100 mg/kg and above and in the females given 300 mg/kg during first week of administration. Body weight gain was decreased in the 300 mg/kg-dosed group of both sexes.

Urinalysis shows no abnormal finding in any dosed male group. Hematological examination revealed a decrease in WBC in both sexes given 300 mg/kg. And increased percentage of neutrophils and decreased percentages of eosinophils and lymphocytes were shown in the males, and increased percentage of neutrophils and monocytes and decreased percentages of eosinophils and lymphocyte were noted in the females. In the 300 mg/kg-dose group, decreased hemoglobin concentration, PT and APTT were observed in the males, and decreased reticulocytes were noted in the females. In the blood biochemistry, plasma levels of albumin and A/G ratio were decreased in the females given 300 mg/kg, although no treatment-related effect was observed in the males.

In the measurement of organ weight, both absolute and relative kidney weights and absolute lung weight were increased in the males given 300 mg/kg. Relative kidney weight was increased in the females given 100 mg/kg, and in addition both absolute and relative kidney weight were also increased in the 300 mg/kg-dosed female group. Absolute liver weight was increased in the females given 100 mg/kg and above, and relative lung weight was increased in the 300 mg/kg-dosed group.

In the histopathological examination, treatment-related lesions were found in the kidney, lung, tail and epididymis in the 300 mg/kg-dosed group. Occurrence of vacuolic change of distal tubule in the kidney, edema, congestion, inflammatory infiltration, perivascular edema, accumulation of foamy cells and thickening of alveolar wall in the lung were noted in both sexes. And, vacuolic change of blood vessel, atrophy of muscle and hemorrhage were observed in the subcutis of tail in females. In the males, vacuolic change occurred also in the epithelium of epididymis.

Reproductive and developmental toxicity

Prolonged estrous cycle was observed in the females given 300 mg/kg. No treatment-related effect was recognized on reproductive performance, including the copulation, fertility, delivery or lactation in any dosed group. No treatment-related effect was observed on number of pups, pups viability or pups weights. Neither external abnormality nor macroscopic finding was detected in any pup.

3. Evaluation

No observed effect level (NOEL)

For the repeated dose toxicity, the endpoint for a NOEL in males was an increased locomotor activity in the males given 100 mg/kg and above. Endpoint for a NOEL in female was an increased relative kidney weight in the females given 100 mg/kg and above. For the reproductive/developmental toxicity, prolonged estrous cycle was observed in the 300 mg/kg-dosed female group, but there was no effect in the males or offspring.

It was concluded that a NOEL for the repeated dose toxicity of bis(2-morpholinoethyl)ether was 30 mg/kg/day for males and females, and that a NOEL for the reproductive/developmental toxicity was 300 mg/kg/day for males and offspring and 100 mg/kg/day for females.

No observed adverse effect level (NOAEL)

For the repeated dose toxicity, endpoint for a NOAEL in male was an increased

locomotor activity in the males given 100 mg/kg and above. Endpoint for a NOAEL in female was an increased relative kidney weight in the females given 100 mg/kg and above. For the reproductive/developmental toxicity, prolonged estrous cycle was observed in the 300 mg/kg-dosed female group, but there was no effect in the males or offspring.

It was concluded that a NOAEL for the repeated dose toxicity of bis(2-morpholinoethyl)ether was 30 mg/kg/day for males and females, and that a NOAEL for the reproductive/developmental toxicity was 300 mg/kg/day for males and offspring and 100 mg/kg/day for females.

ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの
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

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity
Screening Test of bis(2-morpholinoethyl)ether
by Oral Administration in Rats

要約

ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの反復投与毒性および生殖発生毒性を検討するために、OECD テストガイドライン 422 に基づき、試験を実施した。

本試験では、ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルを、0 (媒体対照、注射用水)、30、100 および 300 mg/kg の用量で、CrI:CD(SD)ラットの雌雄 (12 匹/群、10 週齢) に、雄では 42 日間、雌では哺育 4 日までの 42～48 日間、毎日、強制経口投与し、雌雄動物に対する反復投与の影響、ならびに親動物の生殖および哺育 4 日までの児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。また、対照群と 300 mg/kg 投与群については、雄では交配に供した 12 匹のうち 5 匹を、雌では交配に供した動物とは別にサテライト雌 5 匹を用意し、42 日間の反復投与終了後、2 週間の回復期間を設けた。結果は、以下のように要約される。

1. 反復投与毒性

300 mg/kg 群の雌雄各 1 例に死亡が認められた。雄は投与 10 日に、雌は投与 41 日の分娩時に死亡した。推定死因は雌雄ともに肺水腫による呼吸不全であった。300 mg/kg 群には主な一般状態所見として、皮膚の紅潮、四肢の浮腫、尾や耳介の発赤・紫斑、脱毛、餌こぼし量の増加、接触過敏、呼吸異常が認められた。また、自発運動量の増加が雄では 100 mg/kg 群から、雌では 300 mg/kg 群に認められた。投与 1 週の摂餌量が、雄は 100 mg/kg 群から、雌は 300 mg/kg 群で減少し、300 mg/kg 群の雌雄には投与期間を通して体重増加の抑制が認められた。

尿検査では雄に投与の影響は認められなかった。血液学検査の結果、雌雄の 300 mg/kg 群に白血球数の減少がみられ、雄では好中球比の増加および好酸球比とリンパ球比の減少、雌では好中球比と単球比の増加および好酸球比とリンパ球比の減少が認められた。雌の好酸球比の減少は 100 mg/kg 群にも認められた。また、雄の 300 mg/kg 群にはヘモグロビン濃度の減少および PT と APTT の短縮、雌の 300 mg/kg 群には網赤血球比の減少が認められた。血液生化学検査の結果、雄に投与の影響はみられなかったが、雌では 300 mg/kg 群にアルブミン濃度と A/G 比の減少が認められた。

器官重量に及ぼす影響として、雄には 300 mg/kg 群に腎臓重量 (絶対重量・相対重量) と肺重量 (相対重量) の増加がみられ、雌には 100 mg/kg 以上の群に腎臓重量

(100 mg/kg : 相対重量, 300 mg/kg : 絶対重量・相対重量) と肝臓重量 (相対重量) の増加、300 mg/kg 群に肺重量 (相対重量) の増加が認められた。

病理組織検査の結果、300 mg/kg 群で腎臓、肺、尾部および精巣上体に投与の影響が認められた。腎臓には遠位尿細管上皮の空胞変性がみられ、肺には水腫、鬱血、炎症性細胞浸潤、血管周囲の浮腫、泡沫細胞の出現および肺胞壁の肥厚が認められた。雌の尾部には血管壁の空胞変性、骨格筋の萎縮および出血が認められた。空胞変性は精巣上体管上皮にも認められた。

2. 生殖発生毒性

300 mg/kg 群に性周期の延長が認められた。交配結果や妊娠および分娩中の状態に投与の影響はみられなかった。また、児動物の発生・発育に投与の影響は認められなかった。

3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

本試験におけるビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの NOEL は、雄では 100 mg/kg の用量からみられた自発運動量の増加等、雌では 100 mg/kg の用量からみられた腎臓の相対重量の増加等をエンドポイントとし、反復投与毒性に関しては雌雄ともに 30 mg/kg/day と結論される。また、生殖発生毒性に関しては、雄親動物と児動物には投与の影響はみられなかったが、雌親動物では 300 mg/kg の用量で性周期の延長がみられたため、これをエンドポイントとし、雄親動物と児動物は 300 mg/kg/day、雌親動物は 100 mg/kg/day であると結論される。

4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

本試験におけるビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの NOAEL は、雄では 100 mg/kg の用量からみられた自発運動量の増加、雌では 100 mg/kg の用量からみられた腎臓の相対重量の増加をエンドポイントとし、反復投与毒性に関しては雌雄ともに 30 mg/kg/day と結論される。また、生殖発生毒性に関しては、雄親動物と児動物には投与による有害影響はみられなかったが、雌親動物では 300 mg/kg の用量で性周期の延長がみられたため、これをエンドポイントとし、雄親動物と児動物は 300 mg/kg/day、雌親動物は 100 mg/kg/day であると結論される。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製法

被験物質のビス(2-モルホリノエチル)=エーテルは、
 購入（ロット番号：DLI3F）したもので、純度 94.8%の無色透明の液体である。被験物質は、入手後、使用時まで室温で暗所に保管した。被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（Shimadzu FTIR-8200PC）を用いて測定し、文献値と比較することにより確認した。また、被験物質の安定性は、使用開始前および使用終了後にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ（Agilent Technologies 1090）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

媒体として選択した注射用水（日本薬局方）は大塚製薬工場から購入（ロット番号：9G70N）し、使用時まで室温で暗所に保管した。投与検体（溶解液）は、被験物質を注射用水と混和して、各用量の1回の投与液量が5 mL/kg 体重になるように調製した。投与検体は8日間の安定性試験の結果に基づき、調製8日以内に使用した。投与検体中の被験物質の濃度および均一性は、初回調製時に高速液体クロマトグラフ（Agilent Technologies 1090）を用いて測定し、確認した。

2. 使用動物および飼育方法

日本チャールス・リバー（厚木飼育センター）のCrI:CD(SD)ラット(SPF)の雌雄を8週齢で購入した。導入日を含む7日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、投与前の雌の性周期を観察するために、さらに、8日間の予備飼育を行った。これらの飼育期間中に、状態の変化や異常な性周期がみられなかった動物から、投与開始日の体重の中央値に近い雄48匹と雌58匹（投与開始時体重範囲、雄：370～435g、雌：219～256g）を選定し、試験に用いた。

群分けは、体重の重い動物から順に各群に1匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の合計体重を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることで、群間の体重の偏りを小さくする方法（適正層別方式）により実施した。

動物は、温度；23±2℃、湿度；55±15%、換気回数；15～17回/時、明暗サイクル；12時間点灯(8:00～20:00)/12時間消灯(20:00～8:00)に制御された飼育室でステンレス製網ケージに個別に収容して飼育した。ただし、妊娠18日以降の母動物は、床敷（ALPHA-dri™：Shepherd Specialty Papers）をいれたステンレス製分娩ケージに収容した。飼料（CRF-1 固型、30KGy-γ線照射滅菌：オリエンタル酵母工業）と飲料水（秦野市水道局供給の水道水をフィルターろ過した後、紫外線照射）は自由摂取としたが、解剖前日の夕方からは絶食させた。

3. 投与量の設定および投与方法

投与量は、用量設定試験の結果に基づいて設定した。

用量設定試験の投与量は、OECD 化学品テストガイドラインに定められている1000 mg/kgを最高用量とし、以下、600 mg/kg、300 mg/kg、100 mg/kgに設定した。10週齢のCrI:CD(SD)ラット、1群あたり雌雄各5匹に、ビス(2-モルホリノエチル)=エーテルを14日間、毎日、強制経口投与し、投与終了翌日に剖検した。その結果、600 mg/kg および 1000 mg/kg の用量では、雌雄全例が死亡または切迫屠殺された。これらの動物には呼吸の異常、接触過敏（攻撃性）、四肢の浮腫が観察され、剖検では肺の浮腫または赤色化、胸水貯留等が観察された。300 mg/kg の用量では、雄には一般状態、体重および摂餌量に異常は認められなかったが、雌では全身発赤（紅潮）、体重増加の抑制（投与1週で対照群の84%、投与2週では90%）および摂餌量の減少が認められた。血液学検査で雌雄ともに白血球数の減少がみられたが、血液生化学検査での異常は認められなかった。雄の器官重量に投与の影響はみられなかったが、雌では脾臓重量の減少と腎臓重量の増加が認められた。剖検による肉眼病変は観察されなかった。100 mg/kg の用量では、雌雄ともに投与の影響は認められなかった。以上の結果から、本試験の高用量には300 mg/kgを設定し、以下、中用量には100 mg/kg、低用量には30 mg/kgを設定した。

本試験では、対照群1群と投与群3群の計4群を設け、1群あたり雌雄各12匹の動物を用いた。なお、対照群と300 mg/kg 群については、雄では12匹のうち各群5匹を回復動物とし、雌では交配をさせないサテライト動物（回復動物）として、各群5匹の雌を追加した。

各用量の投与検体は、雄には交配前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、雌には交配前14日間、交配期間（交尾成立まで）、妊娠期間および哺育4日まで、計42～48日間、サテライト雌には42日間、毎日午後に投与した。ただし、分娩中および午前中に分娩が確認された雌にはその日の投与はしなかった。

対照群と300 mg/kg 群の雌雄の回復動物については、投与期間終了後14日間の回復期間を設けた。

4. 観察および検査（反復投与毒性）

1) 一般状態の観察

投与期間中には毎日2回（投与前・投与後）、回復期間中には毎日1回行った。

2) 行動機能観察

(1) 詳細観察

投与・回復期間中に週1回行った。ただし、雌の投与6週の観察は、分娩および哺育時の動物への負荷を軽減するため、サテライト動物のみ行った。

詳細観察は、ケージから動物を取り出す際、ケージから動物を取り出した後および作業台上で実施した。ケージから動物を取り出す際には接触反応や取り出し易さを観察した。ケージから動物を取り出した後には、扱い易さ・体温・被毛状態・皮膚の色・眼の状態・流涎・排尿の有無・排便の有無を観察した。作業台上では、姿勢・

活動性・警戒/探索行動・歩行状態・常同行動・呼吸・振戦/攣縮/痙攣の有無を観察した。

(2) 反応性検査、握力測定および自発運動量測定

反応性検査と握力測定は、雄は全例について投与6週に行い、雌は分娩日の近い動物から各群5匹を選定し、解剖前日(分娩4日後)に行った。自発運動量測定は、雄は全例について投与6週に1回、回復2週に1回行い、雌は分娩した動物については分娩日の近い動物から各群5匹を選定し解剖前日(分娩4日後)に1回、サテライト動物については投与6週に1回、回復2週に1回行った。

反応性検査は、視覚・聴覚・痛覚・瞳孔反射・空中正方向反射について行った。

握力は、握力測定装置(MK-380CM:室町機械)を用いて前肢・後肢ともに2回測定し、平均値をその個体の値とした。

自発運動量は、自発運動量測定装置(SCANET MV-10:メルクエスト)を用いて60分間測定した。

3) 体重測定

雄の体重は、投与1・8・15・22・29・36・42日および回復1・8・14日に測定した。

雌の体重は、交配前の投与1・8・15日、妊娠0・7・14・20日および分娩日と分娩4日後(哺育0日と哺育4日)に測定した。サテライト雌は投与1・8・15・22・29・36日および回復1・8・14日に測定した。

なお、解剖日には絶食後の体重を測定した。

4) 摂餌量測定

摂餌量は、各測定期間に給餌量と残餌量を測定し、その値から1匹1日あたりの摂餌量を算出した。

雄の摂餌量は、投与1~8・8~15・29~36・36~42日および回復1~8・8~14日に測定した。

雌の摂餌量は、交配前の投与1~8・8~15日、妊娠0~7・7~14・14~20日および哺育0~4日に測定した。サテライト雌は投与1~8・8~15・29~36・36~43日および回復1~8・8~14日に測定した。

5) 尿検査

投与6週の投与前に雄の新鮮尿を採取し、尿試験紙(マルティスティックス:シーメンスヘルスケア)を用いて、pH・蛋白・グルコース・ケトン体・ビリルビン・潜血・ウロビリノーゲンを検査した。

6) 剖検

雄は、最終投与日(投与42日)の翌日と回復14日の翌日に剖検した。分娩した雌は分娩5日後、サテライト雌は回復14日の翌日に剖検した。死亡動物は死亡発見日に剖検した。

7) 血液学検査

解剖時にエーテル麻酔下で腹大動脈よりEDTA-2カ

リウム入り採血管およびクエン酸ナトリウム入り採血管(凝固検査用)に採血した血液を用いて血液学検査を行った。赤血球数・血小板数・網赤血球比・平均赤血球容積(MCV)・白血球数・白血球分類(以上、光学的散乱法)、ヘモグロビン濃度(シアニメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値・平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)・平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)(以上、計算による)は総合血液学検査装置(ADVIA 120:シーメンスヘルスケア)を用いて、プロトロンビン時間(PT)(Quick一段法)と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)は全自動血液凝固測定装置(Sysmex CA-5000:シスメックス)を用いて検査した。

8) 血液生化学検査

解剖時にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿について、総蛋白(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(計算による)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、グルコース(GlcK・G-6-PDH法)、総コレステロール(CE・COD・POD法)、トリグリセリド(MGLP・GK・GPO・POD法)、リン脂質(PLD・ChOD・POD法)、AST・ALT・LDH・ALP・γ-GTP・CK(以上、JSCC法)、BUN(ウレアーゼ・GLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、ナトリウム・カリウム・クロール(以上、イオン選択電極法)、カルシウム(OCPC法)および無機リン(PNP・XOD・POD法)を自動分析装置(日立7080:日立製作所)を用いて検査した。

9) 器官重量

胸腺・副腎・心臓・腎臓・脾臓・肝臓・脳・肺・精巣・精巣上体の湿重量(絶対重量)を測定した。また、各器官の絶対重量の解剖時体重に対する百分率(相対重量)を算出した。

10) 病理組織学検査

雌雄全例について、気管・肺・骨髄(大腿骨)・リンパ節(腋窩・鼠径等)・胸腺・脾臓・心臓・胃・小腸・大腸・肝臓・腎臓・膀胱・下垂体・甲状腺・上皮小体・副腎・子宮(回復動物)・腔・乳腺・脳・脊髄・末梢神経(坐骨神経)・筋肉・骨(大腿骨)を検査した。

上記組織を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液またはブアン固定液(精巣・精巣上体のみ)で固定後、パラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した標本について光学顕微鏡で観察した。

5. 観察および検査(生殖発生毒性)

1) 性周期の観察

投与開始日から交配開始日までの毎朝、雌動物(サテライト動物は除く)の腔垢を採取・塗抹し、ギムザ染色した標本について観察した。

性周期は発情前期、発情期および発情休止期に分類し、発情期が4日から7日の間隔で回帰される例を正常とし、発情休止期が7日以上継続してみられる例は連続非発情

とし異常とした。また、性周期を算出した。

2) 交配

交配は、投与 15 日の夕方から交尾が確認されるまで、14 日間を限度として同一群内の雌雄 1 匹ずつを同居させる方法で行った。交尾の確認は毎朝、膈内の膈栓または膈垢中の精子の存在を調べることににより行い、これらが確認された日を妊娠 0 日と規定した。交尾した雌は直ちに雄から離して個別に飼育した。

交配の結果から、交尾所要日数（交配開始から交尾成立までに要した日数）と交尾率〔（交尾成立ペア数／交配ペア数）×100〕を算出した。

3) 分娩・哺育

分娩の確認は妊娠 20 日から 25 日を限度に 1 日 2 回行い、16 時までには分娩が終了していた動物についてはその日を分娩日（哺育 0 日）と規定した。分娩中の動物については分娩状態を観察した。

これらの結果から、妊娠期間（妊娠日から分娩日までの日数）・受胎率〔（受胎動物数／交尾成立ペア数）×100〕・出産率〔（生児出産動物数／受胎動物数）×100〕を算出した。

4) 妊娠黄体数・着床痕数

解剖時に卵巣を摘出して実体顕微鏡により妊娠黄体を計数した。また、子宮は摘出して 10% 硫化アンモニウム溶液で染色し、翌日、着床痕を計数した。

これらの結果から、着床率〔（着床痕数／妊娠黄体数）×100〕を算出した。

分娩しなかった雌で着床痕のみられなかった動物は不妊動物とした。

5) 児動物の観察・検査

(1) 出生時の産児数、性および外表観察

出生時（哺育 0 日）に、産児（生存児・死亡児）の計数、性別確認および外表観察を行った。

これらの結果から、分娩率〔（産児数／着床痕数）×100〕、出生率〔（哺育 0 日の生存児数／着床痕数）×100〕、哺育 0 日の生存率〔（哺育 0 日の生存児数／産児数）×100〕、産児の性比（雄の産児数／雌雄の産児数）および生存児の性比（雄の生存児数／雌雄の生存児数）を算出した。

(2) 生存児数および一般状態の観察

哺育 4 日まで毎日、生存児の計数と一般状態の観察を行った。

この結果から、哺育 4 日の生存率〔（哺育 4 日の生存児数／哺育 0 日の生存児数）×100〕および哺育 4 日の生存児の性比（哺育 4 日の雄の生存児数／哺育 4 日の雌雄の生存児数）を算出した。

(3) 体重

哺育 0 日と哺育 4 日に、母動物（腹）毎に雌雄別にま

とめた体重を測定し、児動物 1 匹あたりの平均値を算出した。

(4) 剖検

児動物は哺育 4 日に剖検した。死亡児は死亡発見日に剖検した。

6. 統計解析

交尾率・受胎率・出産率・尿検査・病理組織学検査の結果は、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。

その他の検査で得られた数値データは、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。回復動物における数値データは、まず、F 検定を行い、分布の違いが認められなかった場合は、Student の t 検定を、分布の違いが認められた場合は Aspin-Welch の t 検定を用いて統計処理を行った。

各検定は 5% および 1% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

雄では 300 mg/kg 群の 1 例が投与 10 日に死亡した。本例には死亡前日に皮膚の紅潮と糞量の減少が認められた。皮膚の紅潮は 300 mg/kg 群の生存動物 11 例中の 5 例にも認められ、投与約 1 週間後から 2 週間後にかけて継続した後に回復した。紅潮が観察された期間、5 例中の 2 例には一時的に四肢の浮腫も認められた。300 mg/kg 群にみられたその他の異常として餌こぼし多量が 1 例、接触過敏（発声）と腰部の脱毛が 1 例に認められた。これらの所見も投与期間中に回復した。30 mg/kg 群および 100 mg/kg 群の一般状態に投与の影響は認められなかった。

雌では 300 mg/kg 群の 1 例が分娩時（投与 41 日）に死亡した。本例には投与 10 日から 13 日に皮膚の紅潮がみられたが、その後に異常は観察されていなかった。皮膚の紅潮は 300 mg/kg 群（サテライト雌を含む）の生存動物 16 例中の 8 例にも認められ、投与約 1 週間後から 2 週間後にかけて継続した後に回復した。紅潮が観察された期間、8 例中の 3 例には一時的に四肢の浮腫、弯背姿勢および立毛も認められた。さらにこの 3 例中の 2 例には不整呼吸、1 例には自発運動減少も観察された。300 mg/kg 群にみられたその他の異常として餌こぼし多量が 3 例、接触過敏（発声）が 1 例、腹部あるいは腰部の脱毛が 7 例、糞量の減少が 5 例に認められた。これらの所

見も投与期間中に回復した。300 mg/kg 群（サテライト雌を含む）では投与約 4 週間後から 5 週間後になると 9 例の尾または耳介に発赤が出現した。そのうちの 7 例の尾または耳介には紫斑も認められた。1 例の尾と耳介には紫斑に続いて痂皮の形成が認められた。回復期間を設けたサテライト雌ではこれらの所見は投与終了後に徐々に回復した。30 mg/kg 群および 100 mg/kg 群の一般状態に投与の影響は認められなかった。

2) 行動機能観察

(1) 詳細観察

週に 1 回実施した行動機能に関する詳細観察時には、雄では 300 mg/kg 群に接触過敏（発声）と皮膚の紅潮が認められた。雌では 300 mg/kg 群に接触過敏（発声）、立毛、穹背姿勢、自発運動減少、不整呼吸、皮膚の紅潮、発赤、紫斑が認められた。雌雄ともに 30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群では全観察項目に投与の影響は認められなかった。

(2) 反応性検査

反応性検査時には、雌雄ともに全検査項目に投与の影響は認められなかった。

(3) 握力 (Table 1)

雌雄の前肢・後肢の握力に投与の影響は認められなかった。

(4) 自発運動量 (Table 2)

雄では投与 6 週に 1 回実施した自発運動量測定で、100 mg/kg 群と 300 mg/kg 群の自発運動量に増加が認められた。回復期間後期に 1 回測定した 300 mg/kg 群の自発運動量には、総測定時間での増加はみられなくなったが、測定開始 10 分間の自発運動量には増加が認められた。30 mg/kg 群の自発運動量に投与の影響は認められなかった。

雌では分娩 4 日後（解剖前日）に 1 回測定した雌（母動物）の自発運動量には投与の影響は認められなかった。しかし、投与 6 週に 1 回測定したサテライト雌では、300 mg/kg 群の測定開始 10 分間の自発運動量に増加が認められた。回復期間後期に 1 回測定した 300 mg/kg 群の自発運動量には増加はみられなくなった。30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の自発運動量に投与の影響は認められなかった。

3) 体重 (Fig. 1~3)

雄では投与期間を通して 300 mg/kg 群に体重増加の抑制がみられ、特に投与 1 週の平均体重は投与開始時に比較して低値であった。300 mg/kg 群の体重は回復期間終了時には対照群との差がみられなくなった。30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の体重の推移に投与の影響は認められなかった。

雌では投与期間を通して 300 mg/kg 群に体重増加の抑制がみられ、特に投与 1 週の平均体重は投与開始時に

比較して低値であった。また、300 mg/kg 群の 1 例では哺育期間中に著しい体重減少が認められた。300 mg/kg 群（サテライト雌）の体重は投与終了後には対照群との差がみられなくなった。30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の体重の推移に投与の影響は認められなかった。

4) 摂餌量 (Fig. 4~6)

雄では 100 mg/kg 群と 300 mg/kg 群の投与 1 週の摂餌量に減少が認められた。一方、回復期間には 300 mg/kg 群の摂餌量に増加が認められた。30 mg/kg 群の摂餌量に投与の影響は認められなかった。

雌では 300 mg/kg 群の投与 1 週の摂餌量に減少が認められた。また、300 mg/kg 群の 1 例（哺育期間中に著しい体重減少がみられた動物）では哺育期間中に著しい摂餌量の減少が認められた。一方、回復期間には 300 mg/kg 群（サテライト雌）の摂餌量に増加が認められた。30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の摂餌量に投与の影響は認められなかった。

5) 尿検査 (雄) (Table 3)

投与 6 週に 1 回、雄で実施した尿試験紙を用いた尿検査では、全ての検査項目に投与の影響は認められなかった。

6) 血液学検査 (Table 4)

雄では 300 mg/kg 群にヘモグロビン濃度の減少および PT と APTT の短縮が認められた。また、300 mg/kg 群では白血球数が減少して白血球分類比に変化が認められた。白血球分類比の変化は好中球比の増加およびリンパ球比と好酸球比の減少であった（リンパ球比の減少に統計学的有意差なし）。これらの変化は回復期間終了時には認められなかった。回復期間終了時の 300 mg/kg 群に MCV と MCH の増加および好塩基球比の減少がみられたが、これらの変化は投与期間終了時にはなく、軽微な変化であるため投与の影響ではないと判断した。30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の全検査項目に投与の影響は認められなかった。

雌では 300 mg/kg 群に網赤血球比の減少が認められた。また、300 mg/kg 群では白血球数が減少して白血球分類比に変化が認められた（白血球数の減少に統計学的有意差なし）。白血球分類比の変化は好中球比と単球比の増加およびリンパ球比と好酸球比の減少であった。好酸球比の減少は 100 mg/kg 群にも認められた。これらの変化は回復期間終了時の 300 mg/kg 群（サテライト雌）には認められなかった。100 mg/kg 群に MCH の増加がみられたが、投与量に対応していないため投与の影響ではないと判断した。従って、30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群では全検査項目に投与の影響は認められなかったと判断した。

7) 血液生化学検査 (Table 5)

雄では投与期間終了時の血液生化学検査の結果に投与の影響は認められなかった。回復期間終了時の 300

mg/kg 群にトリグリセリドの減少がみられたが、投与期間終了時には認められず、軽微な変化のため投与の影響ではないと判断した。従って、雄には全検査項目に投与の影響は認められなかったと判断した。

雌では 300 mg/kg 群にアルブミンと A/G 比およびクレアチニンの減少が認められた。ただし、剖検時に腎臓の肥大が観察された 1 例では他の動物に比較してクレアチニンと BUN に高値が認められた。BUN の高値は 300 mg/kg 群の他の 1 例にも認められた。回復期間終了時の 300 mg/kg 群にグルコースの減少がみられたが、投与期間終了時には認められず、軽微な変化のため投与の影響ではないと判断した。30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群では全検査項目に投与の影響は認められなかった。

8) 病理学検査

(1) 剖検所見

投与 10 日に死亡した 300 mg/kg 群の雄 1 例には、肺の水腫と赤色化および腎臓の肥大が観察された。30 mg/kg 群の 1 例に胸腺の赤色斑が観察された。

雌では分娩時に死亡した 300 mg/kg 群の 1 例に、肉眼病変は観察されなかった。300 mg/kg 群の生存例では肺の白色斑、腎臓の肥大、尾部の痂皮が各 1 例に認められた。

(2) 器官重量 (Table 6)

雄では 300 mg/kg 群に腎臓の絶対重量と相対重量の増加が認められた。また、300 mg/kg 群の肺と精巣に相対重量の増加が認められた。これらの器官重量の増加は回復期間終了時には対照群との差は認められなかった。30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の器官重量に投与の影響は認められなかった。

雌では 300 mg/kg 群に腎臓の絶対重量と相対重量の増加が認められた。相対重量の増加は 100 mg/kg 群にも認められた。また、300 mg/kg 群に肺の相対重量の増加が認められた。哺育期間に体重と摂餌量の著しい減少がみられた 1 例では、肺の絶対重量および相対重量ともに他の動物に比較して高値であった。回復期間終了時には 300 mg/kg 群（サテライト雌）の腎臓と肺の重量に対照群との差は認められなかった。肝臓の相対重量の増加が雌の 100 mg/kg 群と 300 mg/kg 群に認められた。相対重量の増加は回復期間終了時の 300 mg/kg 群（サテライト雌）にも認められた。300 mg/kg 群には脾臓の絶対重量の減少と脳の相対重量の増加も認められた。回復期間終了時の 300 mg/kg 群（サテライト雌）には対照群との差は認められなかった。回復期間終了時の 300 mg/kg 群（サテライト雌）に副腎の相対重量の増加がみられたが、投与期間終了時には認められなかった変化であるため投与の影響ではないと判断した。30 mg/kg 群の器官重量に投与の影響は認められなかった。

(4) 病理組織学検査 (Table 7, 8)

雄の組織病変

死亡例 (300 mg/kg 群の 1 例)

投与の影響が示唆される組織病変が腎臓、肺および精巣上体に観察された。腎臓には遠位尿細管上皮の空胞変性と近位尿細管の再生、肺には水腫、鬱血、血管周囲の浮腫および炎症性細胞浸潤、精巣上体には精巣上体管上皮の空胞変性が認められた。

生存例

投与の影響が示唆される組織病変が 300 mg/kg 群の腎臓、尾部および精巣上体に観察された。

腎臓：遠位尿細管上皮の空胞変性が、投与期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群の 7 例全てに認められた。空胞変性は主に弓状動脈より外側の皮質領域の遠位尿細管上皮に認められたが、1 例では近位尿細管直部の上皮にも認められた。この所見は上皮細胞の細胞質内に大きな空胞がみられる変化であり、細胞は腫大し、核は細胞の辺縁部に認められた。遠位尿細管上皮の空胞変性は回復期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群には観察されなかった。

尾部：血管壁の空胞変性が、投与期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群の 7 例中 6 例に認められた。空胞変性がみられた血管は尾の皮下組織の動脈と静脈であり、空胞は血管内皮や中膜に観察された。血管壁の空胞変性は回復期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群には認められなかった。

精巣上体：精巣上体管上皮の空胞変性が、投与期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群の 7 例中 5 例に認められた。空胞変性は主に精巣上体頭部の精巣上体管上皮に観察された。上皮細胞の細胞質内に大きな空胞がみられたが、細胞の腫大は軽微であった。精巣上体管上皮の空胞変性は回復期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群には認められなかった。

前立腺の炎症が 30 mg/kg 以上の全ての投与群で増加したが、発生数と病変の程度が投与量に対応していないことから投与の影響ではないと判断した。

剖検時の肉眼観察で 30 mg/kg 群の 1 例にみられた胸腺の赤色斑は鬱血と診断された。

雌の組織病変

死亡例 (300 mg/kg 群の 1 例)

投与の影響が示唆される組織病変が腎臓、肺および尾部に観察された。腎臓には遠位尿細管上皮の空胞変性、肺には水腫、鬱血、血管周囲の浮腫および泡沫細胞の出現、尾部には血管壁の空胞変性が認められた。本例の腎臓にみられた空胞変性は、遠位尿細管上皮だけでなく一部は近位尿細管直部の上皮にも認められた。

生存例

投与の影響が示唆される組織病変が 300 mg/kg 群の腎臓、肺および尾部に観察された。

腎臓：遠位尿細管上皮の空胞変性が、投与期間終了時（分娩 5 日後）に解剖した 300 mg/kg 群の 11 例全てに認められた。本病変は 1 例では近位尿細管直部の上皮に

も認められた。遠位尿細管上皮の空胞変性は回復期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群のサテライト雌には観察されなかった。

肺：投与期間終了時（分娩 5 日後）に解剖した 300 mg/kg 群の 11 例のうち、肺水腫および血管周囲の浮腫が 1 例、泡沫細胞の出現が 6 例、肺胞壁の肥厚が 6 例に認められた。肺水腫では拡張した肺胞腔や間質にフィブリンを含んだ滲出液が認められた。肺胞壁の肥厚はⅡ型肺胞上皮細胞と線維の増加であり、肺全体に散在して認められた。回復期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群のサテライト雌では、5 例中の 1 例に泡沫細胞の出現がみられた以外に上記病変は観察されなかった。

尾部：投与期間終了時（分娩 5 日後）に解剖した 300 mg/kg 群の 11 例のうち、血管壁の空胞変性が 10 例、皮下出血と痂皮の形成が 1 例、筋肉の萎縮が 2 例に認められた。これらの尾部病変は回復期間終了時に解剖した 300 mg/kg 群のサテライト雌には観察されなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期 (Table 9)

300 mg/kg 群に性周期の延長が認められた。そのうちの 1 例には連続 7 日間の休止期がみられたため異常性周期と判定した。30 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の性周期に投与の影響は認められなかった。

2) 交配成績 (Table 9)

14 日間の交配期間中に全例で交尾が成立した（最長例は 7 日間）。また、交尾所要日数に群間の差はなく、投与の影響は認められなかった。30 mg/kg 群の 1 例は妊娠 25 日相当日になっても分娩がなかったため、妊娠 26 日相当日に剖検した結果、卵巣に妊娠黄体はみられず、子宮には胎児や着床痕が観察されなかった。従って、この 1 例は不妊と判断した。1 例の不妊は投与量に対応していないことから投与の影響ではないと判断した。従って、交配成績に投与の影響は認められなかったと判断した。

3) 妊娠・分娩 (Table 9, 10)

300 mg/kg 群の 1 例が分娩時に死亡した。死亡発見時には授乳や哺育の形跡がなかったため分娩途中の死亡と判断したが、解剖の結果、子宮内に胎児や胎盤が残存していなかったことから分娩は完了したと判断して結果を評価した。

全ての妊娠雌で分娩が成立し、妊娠期間中および分娩中の雌（母動物）の状態に異常のみられた例はなかった。また、妊娠期間（交尾から分娩日までの期間）に投与の影響は認められなかった。

4) 着床 (Table 10)

妊娠黄体数、着床痕数および着床率に投与の影響は認められなかった。

5) 児動物と哺育 (Table 10)

(1) 出生日（哺育 0 日）の児動物

産児の数と性比、分娩率、哺育 0 日の生存児の数と性比、生存率、出生率、雌雄児の体重に投与の影響は認められなかった。哺育 0 日の生存児の外表面観察で、対照群の 2 例（1 腹）に切断尾が認められた。切断面の状態から、出生後に母動物により切断されたものと判断した。分娩時に死亡した 300 mg/kg 群の母動物の出生児は、児数、性比および外表面観察の検査を実施後に解剖した。授乳・哺育の開始がみられなかったことから児動物の体重は測定しなかった。また、出生児のうち 4 例に表皮の剥離創が認められた。これは剥離した表皮の状況から母動物による咬傷と判断した。

(2) 哺育状況と児動物の一般状態

300 mg/kg 群の 1 例の出生児（13 例）には体温低下と活力低下が認められ、そのうちの 11 例が哺育期間中に死亡した。2 例は哺育 4 日まで生存したが発育不良の状態であった。この母動物には哺育期間中の摂餌量と体重に著しい減少がみられ、児動物の哺育不全が観察された。その他に哺育状況や児動物の一般状態に異常がみられた例はなかった。

(3) 哺育 4 日の児動物

哺育 4 日の生存児の数と性比・生存率に投与の影響は認められなかった。また、哺育 4 日の雌雄生存児の体重に投与の影響は認められなかった。ただし、300 mg/kg 群で発育不良がみられた 2 例の児動物の体重は、顕著な低値を示した。

(4) 剖検

死産児や哺育期間中に死亡して剖検観察できた児動物に肉眼病変は認められなかった。また、哺育 4 日の生存児の剖検では、外表面観察で対照群にみられた 2 例の切断尾以外に肉眼病変は認められなかった。300 mg/kg 群で分娩時に母動物が死亡した出生児 4 例には剥離創が観察された。

考察

1. 反復投与毒性

ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルは工業用中間体であり、発泡剤などとして使用されている²⁾。本化合物の毒性に関する情報は得られていない。本試験ではビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルを雌雄のラットに経口投与した結果、皮膚の紅潮がみられ、主に肺、腎臓、尾部および精巣上体に病変が認められた。また、行動機能に及ぼす影響も観察された。

300 mg/kg 群の雌雄には投与約 1 週から 2 週に継続して皮膚の紅潮が観察され、四肢には浮腫が認められた。紅潮が観察された期間には、弯背姿勢を呈し、立毛、糞量減少、不整呼吸がみられ、一般状態が悪化した例もあ

った。本試験の投与量を設定するために実施した 14 日間経口投与による用量設定試験において、600 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群の雌雄には皮膚の紅潮に加えて接触時の過敏による発声や噛み付きなどの攻撃性が観察されたことから、ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルには末梢血管拡張物質（ヒスタミン、ブラジキニンなど）を遊離させる作用があり、ブラジキニンなどの発痛作用のある物質が神経細胞に作用して接触時の異常を誘発させる可能性が考えられた。ただし、攻撃性についてはビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの中枢神経系への作用による可能性も否定できない。本試験の高用量である 300 mg/kg 群の動物に攻撃性はみられなかったが、接触時の過敏や餌を多量にこぼす動物が散見された。さらに自発運動量測定で投与による自発運動量の増加が認められた。類縁物質である 4-エチルモルホリンの 28 日間反復経口投与毒性試験では、雌雄のラットに振戦、ハンドリング時の発声、常同行動などがみられ中枢神経系への影響が認められたと報告している³⁾。自発運動量の増加は、本試験と用量設定試験の一般状態観察でみられた行動異常を考慮すると中枢神経系に及ぼす有害影響であると判断される。ただし、回復期間に 300 mg/kg 群の雌雄にみられた摂餌量の増加は、投与中止によるリバウンド効果であり、遅発性の神経・行動異常による結果ではないと考える。

300 mg/kg 群の雌では投与後期になると尾や耳介に発赤が出現し、その一部は紫斑に変化していった。紫斑部位に痂皮が形成される例もあった。尾の病理組織検査を実施した結果、用量設定試験で肺にみられた血管中膜の空胞変性に類似した病変が皮下の血管に認められた。また、皮下出血や骨格筋の萎縮が観察された例もあった。ラットにみられる尾の病変として、リング状の壊死 (ring tail) が挙げられ、この発症メカニズムとして尾の血行障害が推定されている⁴⁾。先に述べたようにビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルに末梢血管拡張物質を遊離させる作用があると考え、体の末端部位である尾や耳介ではその作用の継続により血管病変が発症し、投与期間後期になると血行障害に発展し、皮下の出血や筋の萎縮を発症すると考えられる。

300 mg/kg 群の雌雄各 1 例に死亡が認められた。病理検査の結果から死因は肺水腫による呼吸不全と考えられた。用量設定試験の 600 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群で死亡した動物の死因は、本試験の死亡例と同様に主として肺水腫による呼吸不全であり、病理組織検査では肺水腫のほかに肺の血管平滑筋に多数の大きな空胞が観察され、血管の外膜は浮腫状を呈していた。本試験の 300 mg/kg 群の肺には血管平滑筋の空胞変性はみられなかったが、肺水腫や血管周囲の浮腫は認められた。ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルは経口的に摂取させたため、肺の浮腫病変には血液を介した発症機序が考えられる。ただし、心臓には重量増加や組織変化はなかったことから、心機能には異常がないと判断し、心不全に起因した肺水腫ではないと考える。ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルには末梢血管拡張物質を遊離させる作用

があると考え、肺水腫は肺の血管内皮の透過性亢進に起因する病変とも考えられる。雌の 300 mg/kg 群にみられたアルブミンと A/G 比の減少、すなわち血漿タンパクの減少は血管透過性の亢進による結果と考える。

雌雄の 300 mg/kg 群の腎臓に絶対重量と相対重量の増加が認められた。雌では腎臓の相対重量は 100 mg/kg 群でも増加していた。腎重量増加に関連する組織病変として、雌雄の 300 mg/kg 群に遠位尿細管上皮の空胞変性が観察された。遠位尿細管上皮の空胞変性（空胞化）は、類縁物質の 4-エチルモルホリンの 28 日間反復経口投与毒性試験でも雌雄のラットに認められた病変である³⁾。別の類縁物質であるモルホリンでは、ラットへの吸入暴露により腎臓重量の増加と尿細管壊死が観察されたと報告されているが、本試験でみられた腎臓病変とは異なる病変であった⁵⁾。遠位尿細管上皮の空胞変性は、腎臓の相対重量に増加のみみられた雌の 100 mg/kg 群では認められなかった。しかし、遠位尿細管上皮の空胞変性と腎臓重量増加には関連性があると考え、100 mg/kg 群の雌にみられた腎臓の相対重量の増加は投与による腎臓への有害影響と判断した。遠位尿細管上皮に空胞を形成するメカニズムについては不明であり、また、4-エチルモルホリンの試験報告³⁾においても明らかにされていない。本試験の雌の 300 mg/kg 群で剖検時に腎臓の肥大が観察された例では、血中のクレアチニンと BUN の増加がみられ腎機能の低下が示唆されたが、300 mg/kg 群全体としての雌のクレアチニンは軽微な減少を示し、雄では変化がみられなかった。雄で実施した尿試験紙を用いた尿検査結果にも異常所見は認められなかった。尿量の測定は実施していないが、糞尿受けトレー上の尿の痕跡から尿量に明らかな変化はみられなかったと考える。

死亡した雄の 300 mg/kg 群の 1 例には、遠位尿細管上皮の空胞変性の他に近位尿細管の再生がみられた。本病変は生存例にはみられなかった病変であることから投与との関連は不明である。

300 mg/kg 群の精巣上体に腎臓の遠位尿細管上皮にみられた空胞変性に類似した病変が観察された。精巣上体重量に変化はなく、空胞のみみられた精巣上体管上皮が形成する管腔内には精子が満たされ、その状態には異常が観察されなかった。精巣には 300 mg/kg 群で相対重量の増加がみられたが、この増加は対照群に比較して解剖時の体重が低いことによる結果と考える。精巣に病変は観察されず、雌との交配にも影響がなかったため、ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの精子に及ぼす影響はなかったと判断した。

以上のようにビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの経口投与により異常がみられた組織に共通して出現した組織病変は上皮の空胞変性であった。これらの空胞は投与中止によりみられなくなった。ただし、この発症メカニズムについては不明である。

雌の 100 mg/kg 群と 300 mg/kg 群には肝臓の相対重量の増加が認められた。しかし、重量増加に関連すると考えられる組織病変は観察されなかった。4-エチルモルホリンの経口投与では肝臓重量増加がみられ、小葉中心性

の肝細胞肥大が観察されている。投与中止により肝細胞肥大はみられなくなったが、薬物代謝酵素誘導による変化であるか否かは判断できなかったと報告されている³⁾。本試験では、回復期間終了時のサテライト雌の肝臓相対重量にも増加がみられたことから、回復性のある変化であるとの判断はできなかった。また、フェノバルビタール投与による薬物代謝酵素誘導でみられる総コレステロールの増加⁶⁾もなかった。従って、雌にみられた肝臓の相対重量の増加は、ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテル投与による影響ではあると考えるが、その毒性学的意義については不明である。

血液学検査の結果、白血球と血液凝固の変化に4-エチルメルホリン投与によりみられた影響³⁾との類似性が認められた。本試験の雌雄の300 mg/kg群では白血球数が減少し、好中球比の増加およびリンパ球比と好酸球比の減少が認められた。雌の300 mg/kg群には単球比の増加もみられた。また、好酸球比の減少は雌の100 mg/kg群にもみられた変化であった。4-エチルメルホリンの試験報告では、雌で好中球比と単球比の増加およびリンパ球比と好酸球比の減少が認められた。ただし、白血球数の減少はなく、雄には白血球の変化はみられていない。血液凝固に関しては、本試験の雄の300 mg/kg群でPTとAPTTの短縮がみられ、4-エチルメルホリン投与でも雄に認められた変化である。これらの類似性から本試験でみられた白血球と血液凝固の変化は投与の影響であると考えられる。ただし、この発症メカニズムについては不明である。

300 mg/kg 群には、雄にヘモグロビン濃度の減少、雌に網赤血球比の減少が認められているが、その毒性学的意義は不明である。

ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルの標的器官は、肺、腎臓、精巣上体、尾・耳介等の体末端部の皮下血管および中枢神経系であると考えられる。そして、行動異常と標的器官にみられた組織病変は有害な影響としてNOAELの根拠とされると判断した。

2. 生殖発生毒性

ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルの経口投与により300 mg/kg 群に性周期の延長が認められ、これを有害な影響と考え、NOAELの根拠とするエンドポイントにした。ただし、性周期の延長は交配結果に影響を及ぼさなかった。また、妊娠や分娩への影響も認められなかった。

分娩時に死亡した300 mg/kg 群の1例は、病理検査結果から肺水腫に起因する呼吸不全による死亡と推定された。また、哺育不全のために児動物が死亡した1例の母動物では、分娩後に著しい摂餌量減少と体重減少、そして病理検査で肺水腫や腎臓病変が認められたことから、これらの状態異常により児動物の哺育ができなかったと考える。従って、この2症例はビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルの生殖発生毒性を示す証拠にはならないと考える。

類縁物質である4-エチルメルホリンの簡易生殖毒性

試験では、体重増加抑制がみられた用量でも性周期に異常は観察されなかったが、着床数と着床率がやや低下したと報告されている⁷⁾。本試験では着床数や着床率に影響はなく、児動物の数や重量、生存率、性比、外表などに及ぼす影響も観察されなかった。

ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルの投与により、交配結果や児動物への影響がなかったことから、雄の精巣上体管上皮の空胞変性は交配能力に関連しない病変と考え生殖毒性とは判断しなかった。

3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

本試験におけるビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルのNOELは、雄では100 mg/kgの用量からみられた自発運動量の増加等、雌では100 mg/kgの用量からみられた腎臓の相対重量の増加等をエンドポイントとし、反復投与毒性に関しては雌雄ともに30 mg/kg/dayと結論される。また、生殖発生毒性に関しては、雄親動物と児動物には投与の影響はみられなかったが、雌親動物には300 mg/kgの用量で性周期の延長がみられたため、これをエンドポイントとし、雄親動物と児動物は300 mg/kg/day、雌親動物は100 mg/kg/dayであると結論される。

4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

本試験におけるビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルのNOAELは、雄では100 mg/kgの用量からみられた自発運動量の増加、雌では100 mg/kgの用量からみられた腎臓の相対重量の増加をエンドポイントとし、反復投与毒性に関しては雌雄ともに30 mg/kg/dayと結論される。また、生殖発生毒性に関しては、雄親動物と児動物には投与による有害影響はみられなかったが、雌親動物には300 mg/kgの用量で性周期の延長がみられたため、これをエンドポイントとし、雄親動物と児動物は300 mg/kg/day、雌親動物は100 mg/kg/dayであると結論される。

文献

- 1) 東京化成工業。ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテル 製品安全データシート。2009。
- 2) 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 提供資料。
- 3) 森村智美ら。2004。4-エチルメルホリンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告, 11。化学物質点検推進連絡協議会。251-266。
- 4) 前島一淑ら。1986。新実験動物学。東京, 朝倉書店。93。

- 5) IARC. 1989. Morpholine. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 47. Some Organic Solvents, Resin Monomers and Related Compounds, Pigments and Occupational Exposures in Paint Manufacture and Painting. IARC working group, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 199-213.
- 6) Kiyosawa N, Tanaka K, Hirano J, Ito J, Niio N et al. 2004. Molecular mechanism investigation of phenobarbital-induced serum cholesterol elevation in rat livers by microarray analysis. Arch Toxicol 78: 435-442.
- 7) 太田亮ら. 2004. 4-エチルモルホリンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験. 化学物質毒性試験報告, 11. 化学物質点検推進連絡協議会. 267-276.

連絡先

試験責任者 :
試験担当者 :

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究
センター
〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445
Tel 0463-82-3911 Fax 0463-82-3860

Correspondence

Authors

Japan Bioassay Research Center, Japan
Industrial Safety and Health Association
2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015,
Japan
Tel +81-0463-82-3911 Fax +81-0463-82-3860

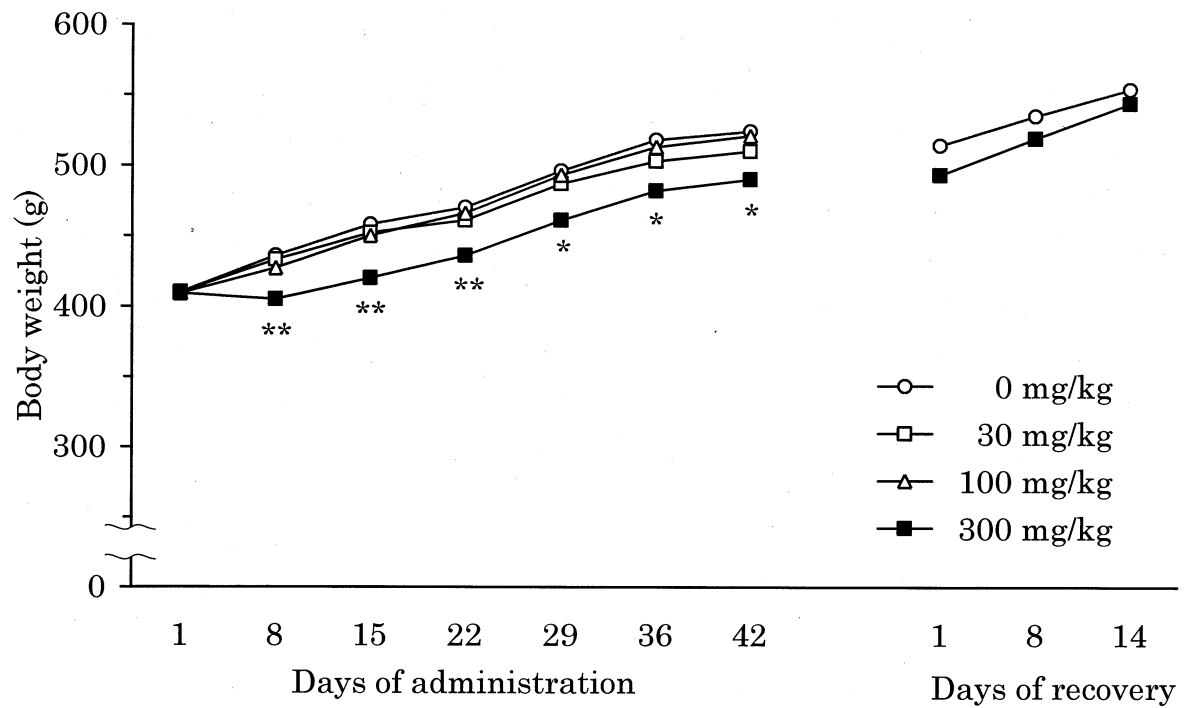


Figure 1 Body weight changes of male rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

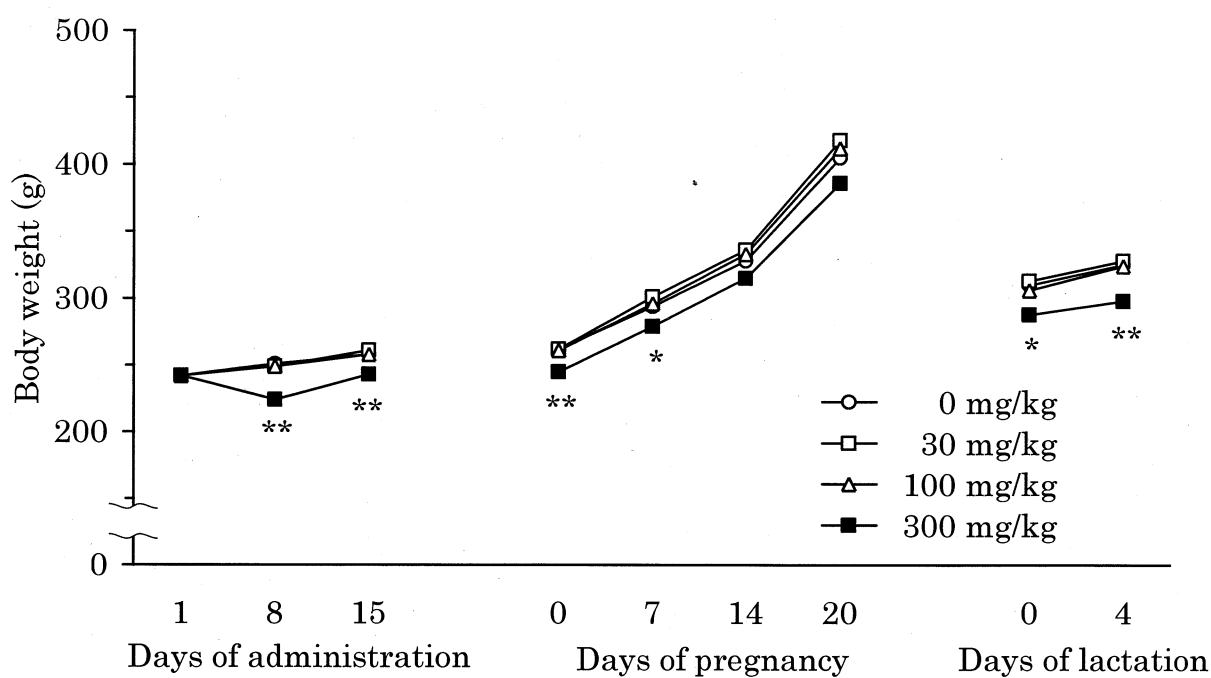


Figure 2 Body weight changes of female rats (dams) treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

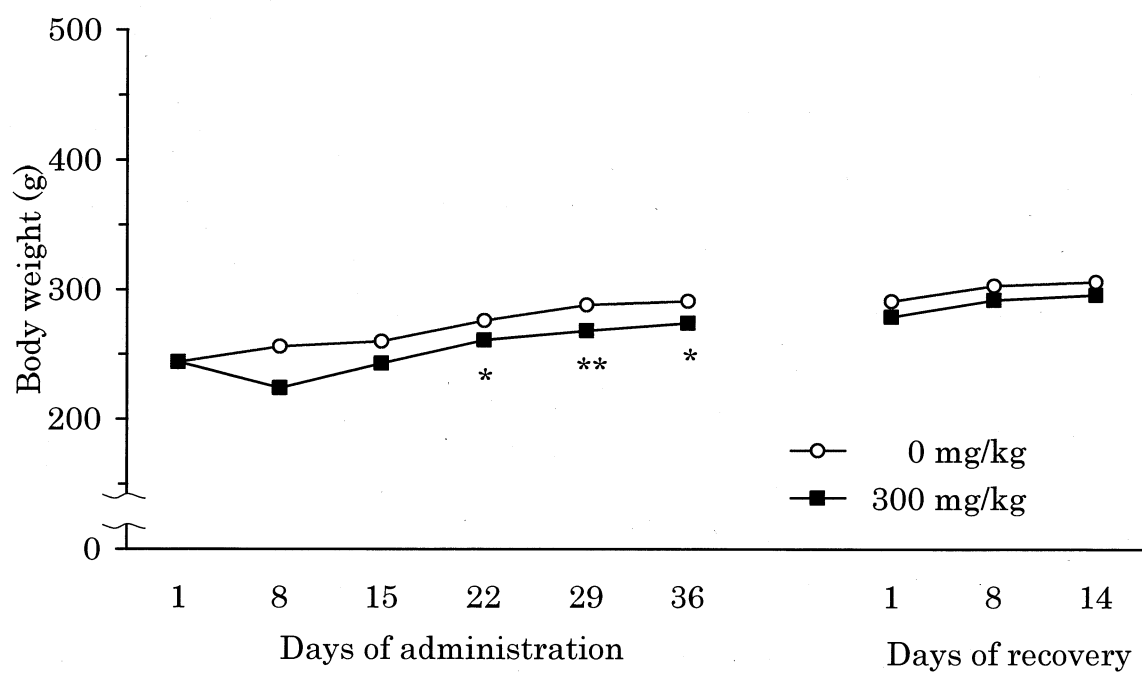


Figure 3 Body weight changes of satellite female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

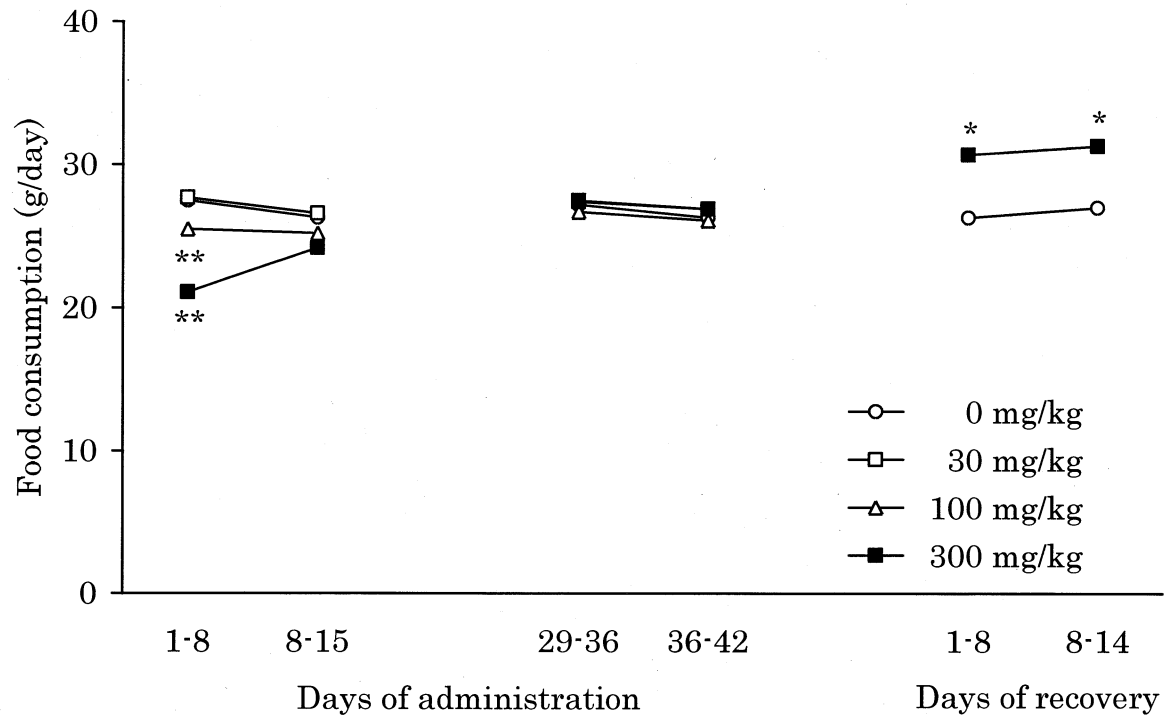


Figure 4 Food consumption changes of male rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

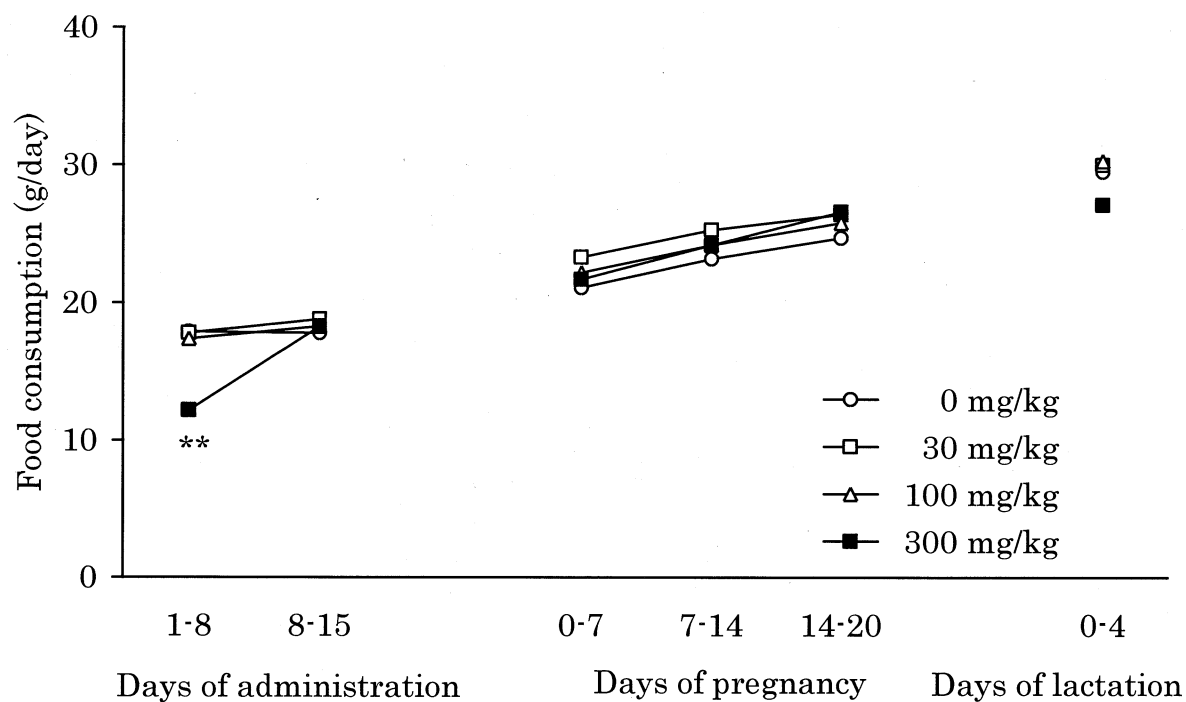


Figure 5 Food consumption changes of female rats (dams) treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, ** $p \leq 0.01$

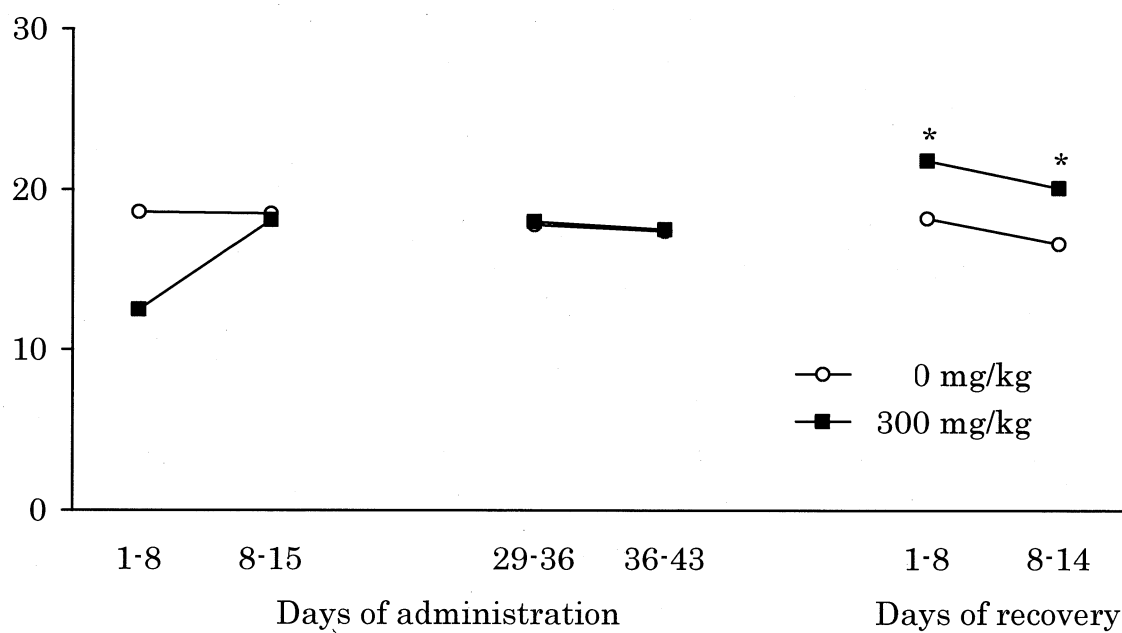


Figure 6 Food consumption changes of satellite female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$

Table 1 Grip strength of rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300
Male				
No. of animals examined	12	12	12	11
Forelimb grip strength (g)	367 ± 129	395 ± 63	410 ± 65	332 ± 64
Hindlimb grip strength (g)	310 ± 95	318 ± 69	295 ± 81	312 ± 88
Female (dam)				
No. of animals examined	5	5	5	5
Forelimb grip strength (g)	273 ± 43	252 ± 64	243 ± 78	237 ± 42
Hindlimb grip strength (g)	269 ± 32	227 ± 65	283 ± 70	299 ± 52

Data represent mean ± S.D.

Table 2 Locomotor activity of rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
	0	30	100	300	0	300
Male						
No. of animals	12	12	12	11	5	4
Interval count						
0 – 10 (min)	2250 ± 994	2820 ± 797	3098 ± 890	3684 ± 955 **	1429 ± 447	2371 ± 627 *
10 – 20 (min)	1237 ± 652	1981 ± 708	2226 ± 868 *	2946 ± 1181 **	931 ± 629	1796 ± 1439
20 – 30 (min)	963 ± 999	1128 ± 687	1566 ± 584	2203 ± 771 **	631 ± 622	1178 ± 1174
30 – 40 (min)	614 ± 543	915 ± 735	1285 ± 656	1257 ± 1108	315 ± 326	591 ± 749
40 – 50 (min)	382 ± 481	984 ± 679	933 ± 603	1270 ± 1029 *	535 ± 697	344 ± 513
50 – 60 (min)	315 ± 559	843 ± 780	780 ± 646	889 ± 1021	467 ± 418	949 ± 1865
Total count						
0 – 60 (min)	5760 ± 2838	8671 ± 3178	9887 ± 2611 *	12249 ± 5034 **	4308 ± 1709	7229 ± 5125
Female (dam)						
No. of animals	5	5	5	5	—	—
Interval count						
0 – 10 (min)	1950 ± 606	2796 ± 639	3006 ± 1244	3039 ± 1102	—	—
10 – 20 (min)	2010 ± 299	1183 ± 556	2499 ± 2151	2159 ± 1583	—	—
20 – 30 (min)	1443 ± 824	1019 ± 1153	2073 ± 1595	1148 ± 1239	—	—
30 – 40 (min)	851 ± 889	1050 ± 957	1407 ± 1618	2077 ± 1983	—	—
40 – 50 (min)	407 ± 590	741 ± 941	468 ± 855	1344 ± 1607	—	—
50 – 60 (min)	895 ± 1326	975 ± 1364	1679 ± 1293	424 ± 886	—	—
Total count						
0 – 60 (min)	7556 ± 4098	7764 ± 3985	11131 ± 6457	10191 ± 4931	—	—
Female (Satellite)						
No. of animals	5	—	—	5	5	5
Interval count						
0 – 10 (min)	2876 ± 1028	—	—	4149 ± 578 *	2369 ± 1237	3275 ± 417
10 – 20 (min)	2241 ± 1416	—	—	3138 ± 813	2676 ± 1180	2931 ± 1321
20 – 30 (min)	1673 ± 1138	—	—	2873 ± 1490	1917 ± 864	3081 ± 938
30 – 40 (min)	1237 ± 1016	—	—	2101 ± 1899	1483 ± 1363	2839 ± 1878
40 – 50 (min)	1091 ± 1011	—	—	565 ± 477	1075 ± 1343	1072 ± 1118
50 – 60 (min)	1126 ± 1479	—	—	893 ± 1147	1220 ± 1073	1439 ± 1356
Total count						
0 – 60 (min)	10244 ± 6084	—	—	13719 ± 5299	10740 ± 5636	14638 ± 5431

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 3 Urinalysis of male rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	30	100	300
No. of animals examined		12	12	12	11
pH	7.5	0	0	0	1
	8.0	1	3	3	3
	8.5	11	9	9	7
Protein	—	0	0	0	0
	±	2	0	2	3
	+	7	6	4	5
	2+	3	6	6	3
Glucose	—	12	12	12	11
Ketone body	—	2	3	1	5
	±	9	8	8	6
	+	1	1	3	0
Bilirubin	—	12	12	12	11
Occult blood	—	11	11	11	11
	±	1	1	1	0
Urobilinogen	±	12	12	12	11

Grade; —: negative, ±: trace, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked.

Data represent the number of animals.

Table 4 Hematology of rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	30	100	300	0	300
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	4
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.94 \pm 0.36	8.79 \pm 0.75	8.83 \pm 0.52	8.48 \pm 0.24	8.42 \pm 0.38	8.16 \pm 0.33
Hemoglobin (g/dL)	15.9 \pm 0.7	15.2 \pm 1.7	15.7 \pm 0.7	14.9 \pm 0.5 *	14.5 \pm 0.7	14.7 \pm 0.6
Hematocrit (%)	45.4 \pm 2.3	43.5 \pm 3.7	44.8 \pm 2.4	42.7 \pm 1.2	42.4 \pm 1.7	43.0 \pm 1.9
MCV (fL)	50.9 \pm 1.2	49.5 \pm 1.5	50.8 \pm 1.8	50.4 \pm 1.2	50.4 \pm 1.1	52.6 \pm 0.7 **
MCH (pg)	17.8 \pm 0.5	17.3 \pm 1.0	17.9 \pm 0.7	17.6 \pm 0.5	17.2 \pm 0.4	18.0 \pm 0.2 *
MCHC (g/dL)	35.0 \pm 0.5	34.9 \pm 1.3	35.2 \pm 0.5	34.9 \pm 0.4	34.2 \pm 0.5	34.1 \pm 0.2
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1085 \pm 155	1143 \pm 167	1229 \pm 93	1176 \pm 86	1156 \pm 199	1123 \pm 156
Reticulocyte (%)	1.8 \pm 0.4	2.6 \pm 2.5	2.1 \pm 0.3	2.1 \pm 0.3	2.4 \pm 0.2	2.3 \pm 0.4
PT (sec)	17.9 \pm 2.9	17.4 \pm 2.8	16.3 \pm 1.9	14.5 \pm 1.6 *	15.8 \pm 2.5	15.7 \pm 1.5
APTT (sec)	22.4 \pm 2.6	22.3 \pm 2.7	21.6 \pm 2.1	18.9 \pm 1.5 *	21.1 \pm 2.5	21.6 \pm 2.3
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.78 \pm 4.02	10.43 \pm 2.31	14.22 \pm 3.42	7.04 \pm 0.81 **	13.67 \pm 3.25	9.37 \pm 3.80
Differential WBC (%)						
Neutrophil	20.0 \pm 6.7	19.5 \pm 6.0	20.5 \pm 7.4	30.6 \pm 7.9 *	15.3 \pm 4.5	23.0 \pm 5.2
Lymphocyte	73.1 \pm 7.3	74.7 \pm 6.4	73.6 \pm 7.2	64.5 \pm 7.5	78.7 \pm 5.2	70.4 \pm 5.9
Monocyte	3.6 \pm 0.6	3.1 \pm 0.7	3.1 \pm 0.8	3.3 \pm 0.8	3.1 \pm 0.8	4.1 \pm 0.8
Eosinophil	1.6 \pm 0.5	1.5 \pm 0.6	1.4 \pm 0.7	0.1 \pm 0.1 **	1.4 \pm 0.5	1.5 \pm 0.6
Basophil	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1 *
Others	1.6 \pm 0.8	1.0 \pm 0.4	1.2 \pm 0.5	1.4 \pm 0.7	1.2 \pm 0.5	0.9 \pm 0.3
Female (dam)						
No. of animals examined	12	11	12	11	Satellite female 5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.82 \pm 0.24	6.72 \pm 0.42	6.70 \pm 0.32	7.08 \pm 0.32	7.96 \pm 0.30	8.27 \pm 0.38
Hemoglobin (g/dL)	12.9 \pm 0.4	12.8 \pm 0.6	13.2 \pm 0.6	13.4 \pm 0.7	14.5 \pm 0.6	14.8 \pm 0.7
Hematocrit (%)	37.6 \pm 1.4	37.0 \pm 1.5	38.0 \pm 1.3	38.4 \pm 1.7	40.8 \pm 1.2	42.3 \pm 2.0
MCV (fL)	55.2 \pm 2.1	55.1 \pm 1.8	56.8 \pm 2.0	54.3 \pm 1.7	51.3 \pm 0.8	51.1 \pm 0.7
MCH (pg)	19.0 \pm 0.6	19.1 \pm 0.6	19.8 \pm 0.8 *	19.0 \pm 0.7	18.3 \pm 0.6	17.9 \pm 0.4
MCHC (g/dL)	34.4 \pm 0.4	34.6 \pm 0.6	34.8 \pm 0.5	35.0 \pm 0.7	35.6 \pm 0.6	35.0 \pm 0.5
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1270 \pm 233	1349 \pm 224	1354 \pm 186	1392 \pm 292	1232 \pm 135	1241 \pm 163
Reticulocyte (%)	5.9 \pm 0.9	6.0 \pm 1.9	6.1 \pm 2.0	3.9 \pm 1.5 *	1.5 \pm 0.2	1.6 \pm 0.4
PT (sec)	13.6 \pm 0.5	13.5 \pm 0.7	13.7 \pm 0.5	14.0 \pm 0.5	13.2 \pm 0.2	13.4 \pm 0.6
APTT (sec)	16.4 \pm 1.0	16.0 \pm 1.0	15.8 \pm 1.0	16.1 \pm 1.1	16.0 \pm 0.4	16.4 \pm 0.3
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13.16 \pm 2.55	13.76 \pm 4.34	13.43 \pm 2.94	10.03 \pm 3.65	4.78 \pm 1.05	4.87 \pm 1.85
Differential WBC (%)						
Neutrophil	39.4 \pm 10.8	33.4 \pm 12.8	36.3 \pm 10.1	52.2 \pm 10.1 *	18.6 \pm 2.7	20.2 \pm 6.4
Lymphocyte	55.3 \pm 11.1	61.8 \pm 12.6	58.7 \pm 10.0	41.8 \pm 9.2 *	75.5 \pm 2.8	70.0 \pm 9.3
Monocyte	3.3 \pm 1.5	3.0 \pm 1.1	3.4 \pm 1.4	4.9 \pm 1.8 *	2.9 \pm 0.4	5.1 \pm 2.5
Eosinophil	0.9 \pm 0.5	0.8 \pm 0.4	0.5 \pm 0.2 **	0.1 \pm 0.1 **	2.1 \pm 0.2	3.4 \pm 1.3
Basophil	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0
Others	1.0 \pm 0.3	0.9 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	0.9 \pm 0.4	0.9 \pm 0.6	1.2 \pm 0.8

Data represent mean \pm S.D.Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 5 Biochemistry of rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	30	100	300	0	300
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	4
Total protein (g/dL)	6.4 ± 0.2	6.4 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.1 ± 0.3	6.3 ± 0.4	6.2 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.1
A/G ratio	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Total bilirubin (mg/dL)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	164 ± 9	174 ± 14	172 ± 17	162 ± 11	205 ± 31	182 ± 18
Total cholesterol (mg/dL)	64 ± 11	56 ± 11	58 ± 6	55 ± 7	70 ± 13	58 ± 5
Triglyceride (mg/dL)	54 ± 24	45 ± 27	51 ± 33	37 ± 16	59 ± 18	31 ± 14 *
Phospholipid (mg/dL)	107 ± 14	98 ± 12	101 ± 13	92 ± 11	115 ± 21	94 ± 9
AST (IU/L)	70 ± 11	69 ± 9	61 ± 7	62 ± 7	74 ± 30	61 ± 3
ALT (IU/L)	30 ± 5	30 ± 4	25 ± 5	29 ± 7	27 ± 8	22 ± 2
LDH (IU/L)	99 ± 18	113 ± 36	111 ± 56	92 ± 48	113 ± 41	91 ± 30
ALP (IU/L)	330 ± 55	365 ± 62	336 ± 62	344 ± 65	278 ± 41	311 ± 61
γ-GTP (IU/L)	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	2 ± 1
CK (IU/L)	106 ± 13	112 ± 16	110 ± 32	97 ± 33	105 ± 22	100 ± 25
BUN (mg/dL)	13.3 ± 0.7	14.2 ± 1.4	13.8 ± 1.1	12.0 ± 0.7	13.5 ± 2.7	15.1 ± 1.9
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Na (mEq/L)	142 ± 1	142 ± 1	143 ± 1	143 ± 1	142 ± 2	143 ± 1
K (mEq/L)	3.9 ± 0.2	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.1	4.2 ± 0.6	3.9 ± 0.1
Cl (mEq/L)	107 ± 1	106 ± 1	106 ± 2	105 ± 2	107 ± 1	108 ± 1
Ca (mg/dL)	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.3	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.3	9.8 ± 0.2
IP (mg/dL)	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.9	6.3 ± 0.6	6.5 ± 0.7	6.3 ± 0.5	6.5 ± 0.4
Female (dam)						
No. of animals examined	12	11	12	11	Satellite female 5	5
Total protein (g/dL)	6.3 ± 0.3	6.5 ± 0.3	6.4 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.6 ± 0.2	6.8 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.2	3.1 ± 0.2 **	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.2
A/G ratio	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1 **	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.2
Total bilirubin (mg/dL)	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	144 ± 11	147 ± 18	153 ± 17	139 ± 13	167 ± 15	143 ± 13 *
Total cholesterol (mg/dL)	60 ± 12	68 ± 18	58 ± 12	59 ± 12	65 ± 11	75 ± 13
Triglyceride (mg/dL)	29 ± 11	43 ± 20	38 ± 18	34 ± 11	23 ± 8	21 ± 10
Phospholipid (mg/dL)	123 ± 19	141 ± 28	120 ± 21	120 ± 23	131 ± 10	135 ± 23
AST (IU/L)	94 ± 20	101 ± 50	87 ± 15	94 ± 19	62 ± 11	71 ± 35
ALT (IU/L)	41 ± 11	53 ± 43	37 ± 15	38 ± 7	24 ± 3	27 ± 10
LDH (IU/L)	119 ± 46	115 ± 40	127 ± 40	124 ± 67	84 ± 38	74 ± 33
ALP (IU/L)	270 ± 114	232 ± 85	282 ± 97	248 ± 66	127 ± 30	133 ± 20
γ-GTP (IU/L)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
CK (IU/L)	108 ± 34	106 ± 18	107 ± 21	99 ± 16	73 ± 19	68 ± 19
BUN (mg/dL)	18.2 ± 2.8	18.4 ± 3.6	18.8 ± 3.3	22.6 ± 11.1	16.1 ± 1.6	16.9 ± 2.4
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.2 *	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Na (mEq/L)	142 ± 1	142 ± 2	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	143 ± 1
K (mEq/L)	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.4	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.4
Cl (mEq/L)	107 ± 2	106 ± 3	107 ± 2	105 ± 2	107 ± 1	108 ± 1
Ca (mg/dL)	10.4 ± 0.4	10.6 ± 0.3	10.4 ± 0.2	10.3 ± 0.4	10.1 ± 0.3	10.2 ± 0.3
IP (mg/dL)	8.1 ± 1.6	8.2 ± 1.3	8.4 ± 1.2	8.0 ± 1.2	4.3 ± 0.8	4.6 ± 1.1

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01.

Table 6 Organ weights of rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	30	100	300	0	300
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	4
Body weight (g)	503 ± 19	481 ± 38	489 ± 28	454 ± 23 *	522 ± 25	511 ± 11
Thymus (g)	0.405 ± 0.052	0.371 ± 0.060	0.411 ± 0.092	0.406 ± 0.062	0.393 ± 0.061	0.391 ± 0.065
(%)	0.080 ± 0.009	0.078 ± 0.013	0.084 ± 0.018	0.089 ± 0.014	0.075 ± 0.010	0.077 ± 0.011
Adrenals (g)	0.086 ± 0.015	0.092 ± 0.014	0.083 ± 0.010	0.080 ± 0.008	0.071 ± 0.009	0.068 ± 0.010
(%)	0.017 ± 0.003	0.019 ± 0.003	0.017 ± 0.002	0.018 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.002
Heart (g)	1.515 ± 0.147	1.427 ± 0.124	1.483 ± 0.131	1.406 ± 0.071	1.466 ± 0.189	1.545 ± 0.036
(%)	0.301 ± 0.024	0.297 ± 0.018	0.304 ± 0.027	0.310 ± 0.014	0.282 ± 0.042	0.303 ± 0.007
Lungs (g)	1.491 ± 0.130	1.507 ± 0.122	1.534 ± 0.130	1.538 ± 0.083	1.588 ± 0.092	1.655 ± 0.097
(%)	0.296 ± 0.023	0.314 ± 0.017	0.315 ± 0.032	0.338 ± 0.009 **	0.305 ± 0.025	0.324 ± 0.021
Kidneys (g)	3.125 ± 0.189	3.056 ± 0.295	3.221 ± 0.200	3.659 ± 0.253 **	3.086 ± 0.196	3.373 ± 0.270
(%)	0.622 ± 0.041	0.636 ± 0.041	0.662 ± 0.066	0.805 ± 0.034 **	0.592 ± 0.042	0.661 ± 0.063
Spleen (g)	0.735 ± 0.161	0.646 ± 0.115	0.758 ± 0.111	0.678 ± 0.088	0.785 ± 0.107	0.721 ± 0.062
(%)	0.146 ± 0.029	0.134 ± 0.017	0.155 ± 0.022	0.149 ± 0.018	0.151 ± 0.024	0.141 ± 0.011
Liver (g)	13.040 ± 0.946	12.502 ± 1.603	12.800 ± 1.093	12.371 ± 0.823	13.772 ± 0.982	13.861 ± 0.744
(%)	2.591 ± 0.118	2.592 ± 0.185	2.619 ± 0.154	2.722 ± 0.095	2.648 ± 0.275	2.713 ± 0.134
Brain (g)	2.112 ± 0.112	2.134 ± 0.052	2.136 ± 0.098	2.080 ± 0.041	2.139 ± 0.083	2.133 ± 0.112
(%)	0.420 ± 0.022	0.446 ± 0.037	0.439 ± 0.035	0.459 ± 0.020	0.411 ± 0.030	0.418 ± 0.028
Testes (g)	3.343 ± 0.347	3.472 ± 0.288	3.447 ± 0.421	3.613 ± 0.292	3.360 ± 0.391	3.669 ± 0.079
(%)	0.666 ± 0.078	0.723 ± 0.054	0.707 ± 0.093	0.795 ± 0.042 **	0.644 ± 0.062	0.718 ± 0.021
Epididymides (g)	1.248 ± 0.087	1.252 ± 0.115	1.235 ± 0.143	1.175 ± 0.081	1.243 ± 0.142	1.286 ± 0.011
(%)	0.248 ± 0.018	0.260 ± 0.011	0.253 ± 0.032	0.259 ± 0.019	0.238 ± 0.026	0.252 ± 0.005
Female (dam)						
No. of animals examined	12	11	12	11	Satellite female 5	5
Body weight (g)	293 ± 13	293 ± 12	287 ± 21	265 ± 16 **	288 ± 13	276 ± 17
Thymus (g)	0.271 ± 0.045	0.274 ± 0.065	0.276 ± 0.069	0.236 ± 0.088	0.310 ± 0.092	0.345 ± 0.076
(%)	0.093 ± 0.016	0.093 ± 0.021	0.095 ± 0.019	0.088 ± 0.029	0.107 ± 0.027	0.125 ± 0.029
Adrenals (g)	0.095 ± 0.013	0.099 ± 0.013	0.095 ± 0.013	0.099 ± 0.017	0.076 ± 0.011	0.087 ± 0.005
(%)	0.032 ± 0.005	0.034 ± 0.005	0.033 ± 0.005	0.037 ± 0.006	0.026 ± 0.003	0.032 ± 0.002 *
Heart (g)	1.055 ± 0.073	1.042 ± 0.107	1.014 ± 0.063	1.006 ± 0.109	0.914 ± 0.064	0.944 ± 0.107
(%)	0.360 ± 0.019	0.355 ± 0.031	0.354 ± 0.023	0.380 ± 0.029	0.317 ± 0.023	0.342 ± 0.030
Lungs (g)	1.186 ± 0.106	1.217 ± 0.066	1.238 ± 0.106	1.420 ± 0.355	1.140 ± 0.101	1.218 ± 0.154
(%)	0.404 ± 0.030	0.416 ± 0.030	0.431 ± 0.033	0.541 ± 0.157 **	0.395 ± 0.029	0.441 ± 0.039
Kidneys (g)	1.792 ± 0.146	1.901 ± 0.172	1.941 ± 0.164	2.347 ± 0.496 **	1.672 ± 0.116	1.952 ± 0.407
(%)	0.612 ± 0.054	0.649 ± 0.053	0.676 ± 0.043 *	0.886 ± 0.163 **	0.581 ± 0.047	0.706 ± 0.127
Spleen (g)	0.646 ± 0.065	0.653 ± 0.102	0.599 ± 0.070	0.540 ± 0.109 *	0.464 ± 0.113	0.486 ± 0.059
(%)	0.220 ± 0.016	0.223 ± 0.033	0.209 ± 0.024	0.203 ± 0.033	0.160 ± 0.033	0.176 ± 0.014
Liver (g)	9.564 ± 0.524	10.024 ± 0.688	9.960 ± 0.862	9.655 ± 0.671	6.956 ± 0.381	7.508 ± 0.736
(%)	3.261 ± 0.101	3.420 ± 0.153	3.468 ± 0.198 *	3.653 ± 0.202 **	2.415 ± 0.127	2.718 ± 0.192 *
Brain (g)	1.960 ± 0.092	1.948 ± 0.063	1.929 ± 0.087	1.908 ± 0.111	1.922 ± 0.031	1.913 ± 0.053
(%)	0.670 ± 0.042	0.666 ± 0.033	0.674 ± 0.045	0.722 ± 0.043 *	0.668 ± 0.035	0.694 ± 0.035

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 7 Histopathological findings of male rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				Dead	At the end of recovery period	
		0	30	100	300	300	0	300
No. of animals examined		<7>	<12>	<12>	<7>	<1>	<5>	<4>
(Kidney)	(Grade)							
vacuolic change: distal tubule	+	0	0	0	1	0	0	0
	2+	0	0	0	6	1	0	0
regeneration: proximal tubule	2+	0	0	0	0	1	0	0
eosinophilic body	+	1	1	1	1	0	2	1
(Subcutis of tail)								
vacuolic change: blood vessel	2+	0	0	0	3	NE	0	0
	3+	0	0	0	3	NE	0	0
(Testis)								
atrophy	3+	0	0	1	0	0	0	0
(Epididymis)								
vacuolic change	+	0	0	0	5	1	0	0
debris of spermatic elements	2+	0	0	1	0	0	0	0
(Prostate)								
inflammation	+	1	7	3	3	0	2	0
	2+	0	2	2	1	0	0	0
(Lung)								
edema	+	0	0	0	0	1	0	0
congestion	+	0	0	0	0	1	0	0
edema: perivascular	2+	0	0	0	0	1	0	0
inflammatory infiltration	+	0	0	0	0	1	0	0
(Thyroid)								
ultimobranchial body remanet	+	0	2	1	0	0	0	0
(Thymus)								
congestion	+	0	1	0	0	0	0	0

Grade; +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

NE: Not examined.

Table 8 Histopathological findings of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				Dead 300	At the end of recovery period	
		0	30	100	300		0	300
No. of animals examined		<12>	<12>	<12>	<11>	<1>	<5>	<5>
(Kidney)	(Grade)							
vacuolic change: distal tubule	+	0	0	0	4	0	0	0
	2+	0	0	0	6	1	0	0
	3+	0	0	0	1	0	0	0
(Skin and subcutis of tail)								
vacuolic change: blood vessel	+	0	0	0	6	1	0	0
	2+	0	0	0	4	0	0	0
scab	+	0	0	0	1	0	0	0
hemorrhage	+	0	0	0	1	0	0	0
atrophy: muscle	2+	0	0	0	2	0	0	0
(Lung)								
edema	+	0	0	0	1	1	0	0
congestion	+	0	0	0	0	1	0	0
edema: perivascular	+	0	0	0	1	0	0	0
	2+	0	0	0	0	1	0	0
accumulation of foamy cells	+	0	0	0	5	1	0	1
	2+	0	0	0	1	0	0	0
thickening: alveolar wall	+	0	0	0	6	0	0	0
(Liver)								
necrosis: focal	+	0	1	1	0	0	0	0
	2+	1	1	0	0	0	0	0
(Spleen)								
extramedullary hematopoiesis	+	0	1	1	1	0	0	0
deposit of hemosiderin	+	0	0	0	0	0	5	4
(Adrenal)								
necrosis: focal	2+	0	0	0	1	0	0	0
(Thyroid)								
ultimobranchial body remanet	+	0	3	0	2	0	1	0
(Pituitary)								
Rathke pouch	+	0	0	0	0	0	1	0

Grade; +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

Significant difference from the control group, ** $p \leq 0.01$.

Table 9 Estrous cycle and reproductive performance of rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Normal ^{a)}	12	12	12	11
Abnormal ^{a), c)}	0	0	0	1
Cycle (days) ^{b)}	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.0	4.7 ± 0.7 **
Reproductive performance				
No. of mated pairs	12	12	12	12
No. of copulated pairs	12	12	12	12
Copulation index (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation ^{b)}	2.7 ± 1.1	2.7 ± 1.0	2.4 ± 1.2	2.8 ± 1.6
No. of pregnant females	12	11	12	12
Fertility index (%)	100.0	91.7	100.0	100.0
No. of females with complete parturition	12	11	12	11
Gestation index (%)	100.0	100.0	100.0	91.7
Gestation length (days) ^{b)}	22.3 ± 0.5	22.0 ± 0.6	22.0 ± 0.4	22.1 ± 0.3
Findings in parturition ^{a)}				
No abnormalities detected	12	11	12	11
Maternal death under parturition	0	0	0	1
Findings in lactation ^{a)}				
No abnormalities detected	12	11	12	10
Negrect of nursing care	0	0	0	1

^{a)} Data represent the number of animals.

^{b)} Data represent mean ± S.D.

^{c)} Continuous 7-day or longer diestrus.

Copulation index = (No. of copulated pairs / No. of mated pairs) × 100.

Fertility index = (No. of pregnant females / No. of copulated pairs) × 100.

Gestation index = (No. of females with complete parturition / No. of pregnant females) × 100.

Significant difference from the control group, ** p ≤ 0.01.

Table 10 Summary of implantation and development of pups from dams treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		30		100		300	
No. of corpora lutea	15.3 ± 2.4	(12)	16.2 ± 1.0	(11)	16.1 ± 1.9	(12)	14.3 ± 1.5	(12)
No. of implantations	14.5 ± 1.4	(12)	15.6 ± 1.0	(11)	15.0 ± 2.5	(12)	13.1 ± 2.5	(12)
Implantation index (%)	95.8 ± 5.6	(12)	96.8 ± 6.1	(11)	93.2 ± 11.1	(12)	91.7 ± 16.8	(12)
Postnatal day 0								
No. of pups born	13.0 ± 2.8	(12)	14.8 ± 1.3	(11)	13.9 ± 2.7	(12)	12.1 ± 2.5	(12)
No. of males per group	72	(12)	82	(11)	77	(12)	66	(12)
No. of females per group	84	(12)	81	(11)	90	(12)	79	(12)
Sex ratio of pups born	0.47 ± 0.16	(12)	0.50 ± 0.13	(11)	0.48 ± 0.16	(12)	0.46 ± 0.13	(12)
Delivery index (%)	88.8 ± 13.6	(12)	94.7 ± 5.7	(11)	92.5 ± 6.5	(12)	92.0 ± 6.1	(12)
No. of live pups	13.0 ± 2.8	(12)	14.8 ± 1.3	(11)	13.9 ± 2.7	(12)	12.1 ± 2.5	(12)
No. of males per group	72	(12)	82	(11)	77	(12)	66	(12)
No. of females per group	84	(12)	81	(11)	90	(12)	79	(12)
Sex ratio of live pups	0.47 ± 0.16	(12)	0.50 ± 0.13	(11)	0.48 ± 0.16	(12)	0.46 ± 0.13	(12)
Birth index (%)	88.8 ± 13.6	(12)	94.7 ± 5.7	(11)	92.5 ± 6.5	(12)	92.0 ± 6.1	(12)
Live birth index (%)	100.0 ± 0.0	(12)	100.0 ± 0.0	(11)	100.0 ± 0.0	(12)	100.0 ± 0.0	(12)
Pups weight (g)								
Male	7.1 ± 0.7	(12)	6.8 ± 0.4	(11)	7.0 ± 0.7	(12)	7.1 ± 1.0	(11)
Female	6.7 ± 0.8	(12)	6.4 ± 0.4	(11)	6.6 ± 0.6	(12)	6.7 ± 1.0	(11)
Postnatal day 4								
No. of live pups	13.0 ± 2.8	(12)	14.5 ± 1.4	(11)	13.8 ± 2.7	(12)	10.7 ± 3.9	(11)
No. of males per group	72	(12)	80	(11)	77	(12)	55	(11)
No. of females per group	84	(12)	80	(11)	88	(12)	63	(11)
Sex ratio of live pups	0.47 ± 0.16	(12)	0.50 ± 0.13	(11)	0.48 ± 0.16	(12)	0.47 ± 0.15	(11)
Viability index (%)	100.0 ± 0.0	(12)	98.2 ± 3.1	(11)	98.8 ± 3.0	(12)	90.8 ± 25.5	(11)
Pups weight (g)								
Male	11.3 ± 1.4	(12)	10.5 ± 0.9	(11)	10.6 ± 1.5	(12)	11.4 ± 2.6	(11)
Female	10.9 ± 1.5	(12)	10.1 ± 0.8	(11)	10.2 ± 1.2	(12)	10.8 ± 2.7	(11)

Data represent mean ± S.D.

Parentheses represent the number of litters examined.

Implantation index = (No. of implantations / No. of corpora lutea) × 100.

Sex ratio of pups born = No. of male pups born / No. of male and female pups born.

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

Sex ratio on day 0 = No. of male live pups on day 0 / No. of live pups on day 0.

Birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of implantations) × 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 on day 4 = No. of male live pups on day 4 / No. of live pups on day 4.