2003年　9月22日

4-エチルモルホリンの

ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

(回復14日間)

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室　委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目次】

要約 - 1

目的 - 3

試験方法 - 4

　１．被験物質 - 4

　２．使用動物および飼育方法 - - - - - - - - - - - - - - - - - - 4

　３．投与検体 - 5

　４．群および群分け - 6

　５．投与方法 - 7

　６．観察および検査 - 7

　７．データの解析 - 11

結果 - 14

　１．死亡例 - 14

　２．一般状態 - 14

　３．詳細な臨床観察 - 14

　４．機能検査 - 15

　５．体重 - 16

　６．摂餌量 - 16

　７．尿検査 - 17

　８．血液学検査 - 17

　９．血液生化学検査 - 18

１０．病理学検査 - 19

考察 - 22

参考文献 - 27

Fig. - 28

Table - 35

【要　約】

4-エチルモルホリンの 28 日間反復経口投与毒性試験（回復 14 日間）を雌雄の Sprague-Dawley 系ラットを用いて実施した。雌雄とも 50、200 および 800 mg/kg の用量で被験物質を投与する3群ならびに媒体である注射用水を投与する対照群の計4群を設定し、各群 5 匹（対照群および 800 mg/kg 投与群は回復試験用 5 匹を加えた 10 匹）の動物に 28 日間反復強制経口投与した。

死亡例はなく、200 および 800 mg/kg 投与群において、ケージ内を舐める動作および咀嚼様動作が観察された。800 mg/kg 投与群では、動作振戦、活動性低下、うずくまりおよび閉眼も散見されたほか、数例で投与後約 2 時間に流涎が認められた。また、投与保定時ないし投与直後から投与後約 20 分にかけて流涎が認められることがあった。

詳細な臨床観察では、800 mg/kg 投与群において、雌雄数例で動作振戦が観察されたほか、雌では歩行時、断続的に停止し、腹臥位を呈する個体が散見され、雄 1 例では、探索行動がやや亢進した。また、同群の雌雄で、回復試験期間を含め接触に対する反応がやや過敏となり、ケージからの取り出し時およびハンドリング時に発声する個体が増加した。

機能検査の自発運動量測定において、800 mg/kg 投与群では、雌で投与後 30 分間の立上がり回数が減少し、個体別の比較では雌雄とも位置移動が認められない時間帯が少ない傾向にあった。回復試験期間中は 800 mg/kg 投与群の雄で測定開始後 30 分間の立ち上がり回数が増加した。機能検査では、この他、同群の雌 1 例で驚愕反応が僅かに過敏となった。

800 mg/kg 投与群の雄で投与第 1 週から第 3 週、雌で投与第 1 週に体重増加が抑制され、雄で投与第 2 日から雌では投与第 4 日からいずれも回復試験終了時まで体重が低値となった。同群では、雄で投与第 1 週から回復試験第 1 週まで、雌で投与第 1 週および第 2 週に摂餌量が減少した。

尿検査では、800 mg/kg 投与群の雄で尿蛋白が減少し、雌でケトン体およびウロビリノーゲンが増加して尿比重が低下した。

血液および血液生化学検査では、800 mg/kg 投与群の雌雄で無機リン濃度が上昇し、塩素濃度が低下した他、雄でカルシウム濃度が上昇した。また、同群の雄でプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間が短縮し、アルブミン濃度の低下および尿素窒素濃度の上昇が認められた他、雌でブドウ糖濃度およびトリグリセライド濃度の上昇ならびに総ビリルビン濃度の低下が認められた。

病理学的検査では、800 mg/kg 投与群の雌雄で肝臓と腎臓の重量が増加した。また、同群の雄では、副腎重量が増加した。800 mg/kg 投与群では、剖検時に肉眼的変化は観察されなかったが、組織学検査では、小葉中心性の肝細胞肥大および遠位尿細管あるいは遠位からヘンレ係蹄の上皮細胞の空胞化が観察された。

以上の結果から、本試験条件下における 4-エチルモルホリンの無作用量は雌雄とも 50 mg/kg/day であると考えられた。また、毒性標的器官は中枢神経系、肝臓、腎臓であることが示唆され、肝臓および腎臓の変化は 14 日間の投与中止により回復したが、中枢神経系に対する作用の一部は回復しなかった。

【目　　的】

4-エチルモルホリン（EM）は、化学合成の中間体、油脂や樹脂の溶剤、ポリウレタン類の製造過程における触媒などとして広く使用されている化学物質であるが[1]、刺激性を有することが知られており、40ppm以上のEMに数時間暴露された労働者で角膜浮腫が認められることが報告されている[2]。また、ヒトに100 ppmのEMを2.5分間吸入暴露させた場合、眼や上部気道への刺激性を示し、嗅覚疲労などを引き起こすことが確認されている[2]ほか、経皮吸収される可能性が指摘されている[3]。安全管理上の暴露限度は、我が国では規定されていないが、米国では国立労働安全衛生研究所（NIOSH)が勧告暴露限度として時間加重平均（TWA） 5 ppm（皮膚接触の場合は 23 mg/m^3）を、労働安全衛生局(OSHA)が許容暴露限度として時間加重平均20 ppm（皮膚接触の場合は94 mg/m^3）を定めているほか、欧州各国で同程度の許容ないし勧告暴露限度が定められている。毒性情報としては、マウスに単回静脈内投与したときのLD_{50}が180 mg/kg[1]、ラットに単回経口投与したときのLD_{50}が1780 mg/kg[1),4)]、吸入暴露したときのLC_{Lo}が2000ppm /4時間[4]という報告などがある。しかし、反復投与した場合の毒性に関する報告はほとんどない。

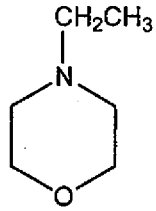
今回、OECD既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、EMの安全性を確認する目的で、ラットにおける28日間反復経口投与毒性試験を実施したのでその結果を報告する。なお、本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[407] げっ歯類における 28日間反復経口投与毒性試験」（1995年7月27日採択）および「化学物質GLP」（平成12年3月1日改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号）に準拠して実施した。

【試験方法】

1．被験物質

4-エチルモルホリン（英名 Morpholine, 4-ethyl-、略称 EM）は、別名 *N*-エチルモルホリン、CAS No. 100-74-3、分子量 115.18、分子式 $C_6H_{13}NO$、凝固点－70℃以下、沸点 138.3℃（760 mmHg）、比重 0.914（20/20℃）、蒸気圧 6 mmHg（20℃）の水に易溶なアンモニア臭を有する無色の液体である(構造式は下図参照)。本試験には、　　提供のロット番号　　純度 99 wt%以上、不純物として水分を 0.05 wt%含む EM を被験物質として使用した。受領した被験物質は、窒素を充填してから密閉し、冷暗所（冷蔵庫内）に保管した。なお、投与期間中の被験物質の安定性については、提供者において動物試験前後に本被験物質の品質試験（Appendix A）を実施することにより確認した。

〈構造式〉



2．使用動物および飼育方法

4 週齢の Sprague-Dawley 系〔Crj:CD(SD)IGS 、SPF 〕雌雄ラット（日本チャールス・リバー㈱、厚木飼育センター）を購入し、検疫と飼育環境への馴化を兼ねて、入荷日を含め 7 日間予備飼育した。検疫・馴化期間中は一般状態観察ならびに入荷時および検疫終了時の体重測定を実施し、鼻周囲の貧毛が観察された雄の 1 例を除く検疫期間中に異常が認められなかった雌雄各 30 匹を供試した。入荷時および投与開始時の匹数および体重を以下に示した。

	日　付	匹　数	体重範囲
動物入荷時	2002 年 7 月 22 日	雄 45 匹	72.3～83.9g（平均 76.9g）
		雌 45 匹	63.7～76.0g（平均 69.2g）
投与開始時	2002 年 7 月 29 日	雄 30 匹	142.8～156.5g（平均 148.3g）
		雌 30 匹	120.3～133.7g（平均 126.9g）

なお、群分け後の棄却動物のうち、雌雄各 12 匹は「4-エチルモルホリン投与ラット尿中の 4-エチルモルホリン濃度測定試験（試験計画番号：Q-01-036)」に転用し、その他の雌

雄各3匹は感染症の疑いが生じた場合の微生物モニタリング用として、供試動物と同室で回復試験終了日翌日まで飼育したのち剖検し、血清を採取した。しかし、感染症を疑う事態が発生しなかったため、血清検査は行わなかった。動物は、許容温度21.0～25.0℃、許容湿度40.0～75.0%、換気回数約15回／時、照明12時間（7時～19時）に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージ（220W×270D×190H）に1匹ずつ収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア㈱）と水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取（但し、解剖前約18～20時間は絶食）させて飼育した。なお、飼育期間中の温度は23.5～24.5℃、湿度は50.0～68.5%であり、いずれも許容範囲内にあった。また、供給した飼料および水道水の分析結果からは、試験に支障を来す可能性のある混入物は検出されなかった。

動物には、個体識別のため、耳パンチにより動物番号を標識した。また、識別の補助として、群ごとに色彩の異なる動物カードに、試験計画番号、性別、群（投与量）および動物番号を記入し、飼育ケージに掛けた。

3．投与検体

被験物質を秤量し、日局注射用水（英語表記 Water for injection、製造番号 A106AA、製造発売元：光製薬株式会社）を加えて高用量群に使用する高濃度液（16 w/v%）を調製した。その後、媒体で段階希釈して、中用量群用の中濃度液（4 w/v%）および低用量群用の低濃度液（1 w/v%）を調製した。

被験物質の急性経口毒性試験（秦野研究所で実施、試験計画番号：A-01-071）において、0.1および 20 w/v %に調製した投与検体について安定性試験を実施した結果(Appendix B)、冷蔵条件下で8日間の安定性が確認されたため、投与検体の調製は週1回以上の頻度で行い、調製後の投与検体は使用時まで冷蔵庫にて保管した。

また、初回調製時の投与検体について含量測定を実施した結果（Appendix C）、被験物質の平均含量は所定濃度の95.3～100%であり、許容範囲内（90～110%）であることが確認された。なお、投与検体中の被験物質濃度は以下に示すガスクロマトグラフ法により求めた。

1) 各調製検体の1 mLを採取し、メタノールで一定量とした後、メタノールで適宜希釈して試料溶液を調製した。

2) 被験物質を必要量秤取し、メタノールに溶解して標準溶液（5～100 μg/mL）を調製した。

3) 試料溶液および標準溶液を、以下の条件でガスクロマトグラフ(GC)法により測定し、標準溶液から作成する検量線を用いて濃度を求めた。

4) GC 条件

分析カラム：	Pora PLOT Q (内径 0.53 mm、長さ 10 m、膜厚 20 μm、CHROMPACK)
昇温条件：	50℃ (1 分間) → 15℃／分 → 250℃
キャリアーガス：	ヘリウム、約 12 cm/sec
水素：	0.6 kg/cm^2(60kPa)
空気：	0.5 kg/cm^2(50kPa)
注入口温度：	250℃
検出器温度：	250℃
試料注入量：	1 μL

4．群および群分け

投与用量は、本試験に先立って実施した予備試験（試験計画番号 C-01-007）の結果を基に決定した。即ち、EM を 100、500、800 および 1000 mg/kg の用量で、雌雄各群 3 匹のラットに 7 ないし 5 日間反復投与した結果、1000 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例が死亡した。800 mg/kg 以上の投与群で、動作振戦、活動性低下、うずくまりおよび閉眼などが散見され、反復投与初期に体重減少ないし増加抑制が認められた。また、100 mg/kg 投与群の雌 1 例および 500 mg/kg 以上を投与した群の雌雄全例で、ケージ内を舐める動作や咀嚼様動作が観察された。800 mg/kg 投与群の雄 1 例では、投与第 5 日の体重が減少したが、1000 mg/kg 投与群を含めて、反復投与に伴う一般状態の増悪は認められなかったこと、500 mg/kg 投与群では、ケージ内を舐める動作および咀嚼様動作以外に被験物質投与によると考えられる変化が認められなかったことから、本試験では 800 mg/kg を高用量に設定し、以下、公比 4 で除して 200 および 50 mg/kg 投与群を中および低用量に設定することとした。

群分けは、検疫終了時の体重をもとに体重別層化無作為抽出法により行った。各群の投与量および動物番号を含めた設定を以下に示した。

群識別	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号		剖検時期*
					雄	雌	
対照	注射用水	0	0	5	1～5 6～10	31～35 36～40	回復 投与
低用量	EM	50	1	5	11～15	41～45	投与
中用量	EM	200	4	5	16～20	46～50	投与
高用量	EM	800	16	5	21～25 26～30	51～55 56～60	回復 投与

＊剖検時期は以下の通りとした。
回復:投与期間終了後は回復試験に用い、回復試験期間終了時に定期解剖を行った。
投与：投与期間終了時に定期解剖を行った。

5．投与方法

1日1回の頻度で、28日間合計28回、9時から12時の間にラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。投与容量は5 mL/kgとし、投与液量は各投与時の最近時の体重を基に個体別に算出した。また、投与経路および方法ならびに投与回数は、準拠するガイドラインに従って決定した。なお、投与期間中の日数および週の表記は、投与開始日および投与開始週をそれぞれ投与第1日および投与第1週とし、回復試験期間中の日数および週の表記法もこれに準じて回復試験第1日および回復試験第1週とした。

6．観察および検査

1)　一般状態の観察

投与期間中は投与前および投与後の1日2回以上、回復試験期間中は1日1回以上、全例について生死を含む一般状態を観察した。投与後の観察は、投与後速やかに1回、および投与後約2から3時間（ただし、自発運動測定中の動物については、投与後約6時間）に1回の計2回行った他、所見の発現状況により追加して観察を行った。

2)　詳細な臨床観察

全例の以下の項目について、投与前の観察として検疫期間中に1回、投与開始後は回復試験期間終了日まで1週間に1回の頻度で、スコアリング法による詳細な症状観察を行った。観察は、投与期間中には投与後約2時間の時点で、検疫期間中および回復試験期間中には投与後約2時間に相当する時刻に、供試動物の投与用量が観察者にわからない方法（ブラインド）で行った。

ケージ越し（ホームケージ内）：
姿勢・体位、自発運動、発声、振戦、痙攣

ハンドリング時：　取り出し易さ、扱い易さ、心拍動、体温、被毛、皮膚色、可視粘膜、流涙、眼球突出、瞳孔径、流涎

作業台上（オープンフィールド）：
体位、姿勢、探索行動、身づくろい、発声、挙尾反応、歩行、常同行動、奇妙な行動、振戦、痙攣、呼吸数、立毛、眼裂、排尿回数、排便回数、接触に対する反応、撤去反応、耳介反射

3) 機能検査

以下の項目について、投与第4週に全例の検査を行った。この検査で被験物質投与の影響が疑われた驚愕反応、握力測定および自発運動量測定については、回復試験第2週にも検査を行った。なお、①、②の視覚定位および③は、前頁 2) 詳細な臨床観察におけるケージ外での観察に引き続き作業台上で行った。

① 聴覚刺激に対する反応
驚愕反応を観察した。

② 視覚刺激に対する反応
視覚定位、対光反射（左右眼球に交互に光刺激を与え、直接対光反射および間接対光反射を確認した。正常：評点4、正常より低下：評点2、反応なし：評点0とした)。

③ 固有感覚刺激に対する反応
正向反射を確認した。

④ 握力測定
握力計（Chatillon、Columbus Instrument）を用いて前肢および後肢の握力を測定した。

⑤ 自発運動測定
自発運動測定装置（SUPER-MEX、室町機器）を用いて、投与後6時間の自発運動量（立ち上がり回数、位置移動回数）を計測した。

4) 体重測定

投与第1週は投与第1、2および4日、第2週以降回復試験第2週まではそれぞれの週の第1日と第4日の毎週2回の頻度で、いずれも投与前に全例の体重を測定した。また、投与期間終了日（投与第28日）および回復試験期間終了日（回復試験第14日）にも測定したほか、器官重量の比体重値算出用（10)病理学検査の項を参照）として剖検日に体重を測定した。なお、各測定日間の体重増加分を測定間隔で除して、一日あたりの体重増加量を算出した。

5) 摂餌量測定

投与第1週では、投与第1日から2日にかけて全例の1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復試験第2週まで毎週1回の頻度で、それぞれの週の第1日から第2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定した。

6) 尿検査

投与第4週（投与直後）および回復試験第2週に全例を代謝ケージに収容し、収容後4時間（採取できなかった個体については6時間）および24時間の時点で蓄尿を採取して以下の項目について検査した。また、尿中電解質については、尿量を基に24時間の排泄量を算出した。なお、予備試験において、試験紙法を用いたpH、蛋白およびビリルビンが異常反応を示したため、この3項目については試験紙法の成績を採用せず、以下に示す方法で検査した。

採尿	項目	測定法	使用機器
4時間	色調・混濁度	視診	
	糖・ｹﾄﾝ体・潜血・ｳﾛﾋﾞﾘﾉｰｹﾞﾝ	試験紙法	クリニテック 200+（ﾊﾞｲｴﾙ・三共）
	pH	pHメーター	pH BOY-P2（新電元工業）
	蛋白	ｽﾙﾎｻﾘﾁﾙ酸法	
	ビリルビン	ｼﾞｱｿﾞｶｯﾌﾟﾘﾝｸﾞ反応	イクトテスト（ﾊﾞｲｴﾙ・三共）
	沈渣	鏡検	光学顕微鏡
24時間	尿量	計量	天秤
	比重	重量法	
	ナトリウム濃度	イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05(A&T)
	カリウム濃度	同上	同上
	塩素濃度	同上	同上

7) 採血

定期解剖例全例を、採血前（屠殺剖検前）に18～20時間絶食させた。その後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から以下の順序で採血した。また、採血は可能な限り対照群から低、中、高用量群の順に各群1匹ずつ、動物番号の若いほうから選抜して行った。

①血液学検査用採血（抗凝固剤：クエン酸ナトリウム）

②血液学検査用採血（抗凝固剤：EDTA-2K）

③血液生化学検査用採血（抗凝固剤：ヘパリン）

8) 血液学検査

前頁 7)採血の項②で採取した血液を用い、以下の項目について全例を検査した。ただし、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間は、7)項①で採取した血液から血漿を分離して測定に用いた。

項目	測定法	使用機器
赤血球数(RBC)	電気抵抗法	血液自動分析装置 CELL-DYN3500SL(ﾀﾞｲﾅﾎﾞｯﾄ)
白血球数(WBC)	ﾌﾛｰｻｲﾄﾒﾄﾘｰ・ﾚｰｻﾞｰ光散乱法／電気抵抗法	同上
白血球分類	ﾌﾛｰｻｲﾄﾒﾄﾘｰ・ﾚｰｻﾞｰ光散乱法	同上
血色素量(Hb)	吸光度法	同上
血小板数	電気抵抗法	同上
平均赤血球容積(MCV)	同上	同上
ﾍﾏﾄｸﾘｯﾄ値(Ht)	計算 (RBC×MCV×0.001)	同上
平均赤血球血色素量(MCH)	計算 (Hb×1000/RBC)	同上
平均赤血球血色素濃度(MCHC)	計算 (Hb×100/Ht)	同上
ﾌﾟﾛﾄﾛﾝﾋﾞﾝ時間(PT)	光散乱検出法	全自動血液凝固測定装置 CA-1000(東亜医用電子)
活性部分ﾄﾛﾝﾎﾞﾌﾟﾗｽﾁﾝ時間 (APTT)	同上	同上

9) 血液生化学検査

前頁 7)採血の項③で採取した血液から血漿を分離し、以下の項目について全例を検査した。

項目	測定法	使用機器
総蛋白濃度	ﾋﾞｳﾚｯﾄ法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA(ﾛｼｭ)
アルブミン濃度	BCG 法	同上
総ｺﾚｽﾃﾛｰﾙ濃度	COD・HDAOS 法	同上
ブドウ糖濃度	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ G6PDH 法	同上
尿素窒素濃度(BUN)	ｳﾚｱｰｾﾞ・GlDH 法	同上
クレアチニン濃度	Jaffé 法	同上
ALP 活性	GSCC 法	同上
GOT(AST)活性	IFCC 法	同上
GPT(ALT)活性	同上	同上
γ-GTP 活性	同上	同上
ﾄﾘｸﾞﾘｾﾗｲﾄﾞ濃度	GPO・HDAOS 法、ｸﾞﾘｾﾘﾝ消去法	同上
総ビリルビン濃度	ｱｿﾞﾋﾞﾘﾙﾋﾞﾝ変法	同上
無機ﾘﾝ濃度 (Inorg. phos.)	ﾓﾘﾌﾞﾃﾞﾝ酸直接法	同上
カルシウム濃度	OCPC 法	同上
A/G 比	計算	
ナトリウム濃度	ｲｵﾝ 電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	同上	同上
塩素濃度	同上	同上

10）病理学検査

7）項の採血後、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺し、剖検して器官組織の肉眼的観察を実施した。また、各動物の以下に示す器官の重量（実重量）を測定したほか、各器官の重量を剖検日の体重で除して比体重値（相対重量）を算出した。

重量測定器官
肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、胸腺、脾臓、脳、心臓

肉眼的観察に引き続き、下表に示す器官あるいは組織を固定保存した。なお、固定液としては、精巣および精巣上体はブアン液、その他の器官・組織ならびに精巣および精巣上体の長期保存には 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液を選択した。また、肺は、固定液を注入して膨らませてから浸漬した。さらに、投与期間終了時の対照群および高用量群の＊印を付した器官・組織をパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した後、光学顕微鏡を用いて病理組織学的に検査した。この検査の結果、肝臓、腎臓および脾臓では、被験物質投与に起因した可能性のある変化が認められたため、回復試験群を含むこの他の群でも組織学的検査を実施した。また、腎臓および脾臓の所見を確認するために、回復試験群を含む雌雄の対照群および高用量群について、同一標本上にある肝臓、腎臓および脾臓のベルリンブルー染色および PAS 染色標本を作製して観察し、所見の記載に反映させた。

固定保存器官・組織
肉眼的病変部＊、脳＊、脊髄＊、肝臓＊、腎臓＊、副腎＊、脾臓＊、心臓＊、胃＊、小腸（十二指腸、空腸、回腸＊）、大腸（結腸＊、直腸）、胸腺＊、甲状腺＊、気管＊、肺（気管支を含む）＊、生殖腺（精巣＊、卵巣＊）、副生殖器（精巣上体＊、前立腺＊、子宮＊、精嚢、膣）、膀胱＊、リンパ節（腸間膜リンパ節＊、下顎リンパ節＊）、坐骨神経＊（腓腹筋＊を含む）、大腿骨および骨髄＊、大動脈、舌、食道、膵臓、顎下腺、舌下腺、下垂体、上皮小体

7．データの解析

各検査値の解析は、以下の手順で行った。いずれの場合も有意水準は 5%とした。

1）定量的検査値

体重、摂餌量、尿量、尿比重、尿電解質、尿 pH、握力および自発運動量、ならびに血液学検査、血液生化学検査および器官重量の各測定値については、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。次に試験群の構成により手法を選択し、対照群と被験物質投与

群との間の平均値の差を検定した。

投与期間および投与期間終了時の各値（対照群を含めて 4 群）については、まず、Bartlett の方法により分散の一様性について検定を行った。次いで、分散が一様であった場合には一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 法により多重比較を行った。一方、分散が一様でなかった場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett 型の検定法で多重比較を行った。ただし、いずれかの群で分散が 0 となった場合には、Bartlett の検定は行わずに Kruskal-Wallis の順位検定を行い、その結果、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。

回復試験期間および回復試験期間終了時の各値（対照群を含めて 2 群）については、F 検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定を行った。ただし、どちらかの群で分散が 0 となった場合、t 検定は実施しなかった。

2) 半定量的検査成績

尿の試験紙による検査成績、尿の色調、濁度および蛋白については、試験群の構成により手法を選択し、対照群と被験物質投与群との間のグレードの差を検定した。

投与第 4 週に得られた各検査値は、下表に示す列の累積または分割表を用いる χ^2 検定を行い（雄の尿蛋白については実施せず）、有意性が認められた場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。ただし、χ^2 検定の周辺度数が 0 になった場合は、検定は不可能であるため実施しなかった。また、2×2 の分割表の場合、対照群および被験物質投与群、陰性および陽性で 2 分した。

回復試験第 2 週に得られた各検査値は、下表に示す Wilcoxon の順位和検定を行った。ただし、全体の分散が 0 となった場合は、検定を実施しなかった。

項目	検定方法			
	3 群以上あるとき			2 群間
	χ^2	順位化	Dunnett	Wilcoxon 順位和
色調	分割表（m×n）		両側	両側
糖、潜血	分割表（2×2）		片側	片側
濁度、ケトン体、ｳﾛﾋﾞﾘﾉｰｹﾞﾝ、尿蛋白（雌）	列の累積		片側	片側
尿蛋白（雄）	（実施せず）		両側	両側

3) 病理組織所見

グレード分けしたデータは Mann-Whitney のU検定により、また陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により、対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った。

なお、雄の 50 および 200 mg/kg 投与群の各 1 例（動物番号 14 および 18、以下、M-14 および M-18 と略す。この他の動物についても、雄は M、雌は F とし、動物番号を示す）については、投与第 4 週の握力測定時に爪が剥がれ、投与期間終了時の血液学的検査において、出血に起因すると考えられる変化が認められた。この 2 例の血液学検査値については、統計解析の対象とすることにより、被験物質投与に起因する変化が不明瞭となる可能性が懸念されたため、平均値の計算も含めて対象から除外することとし、Appendix 中のデータは（ ）を付して区別することとした。

【結　果】

1．死亡例

投与期間および回復試験期間中に死亡例はなかった。

2．一般状態（Table 1 、Appendix 1）

200 および 800 mg/kg 投与群の雌雄で、投与後ケージ内を舐める動作および咀嚼様動作が観察された。この動作は、投与後数分から認められ、投与後約 3 時間で観察される個体もあったが、全て翌日の投与前までには回復した。また、800 mg/kg 投与群では、雌雄数例で、投与後約 20 分から約 3 時間の間に動作振戦が観察されたほか、活動性低下、うずくまりおよび閉眼も散見された。その他、800 mg/kg 投与群の雌雄では、投与第 3 週より、投与保定時ないし投与直後から投与後約 20 分にかけて流涎が認められた。800 mg/kg 投与群では、投与第 18 日に雄 2 例、投与第 22 日には雌 1 例で投与後約 2 時間の観察時に流涎が観察され、このうち、雌雄各 1 例では、動作振戦に伴って流涎が観察された。また、同群では、雌 1 例で投与後約 2 時間の観察時に動作振戦とともに流涎の痕跡と思われる口唇部の被毛の汚れが観察され、雄 1 例で投与第 16 日から 3 日間、排便量が減少した。

この他、50 および 200 mg/kg 投与群の雄各 1 例で、握力測定時に爪が剥がれて出血し、200 mg/kg の雄 1 例では、貧血様蒼白を呈した。これら 2 例では、握力測定後数日間、トレイ上に血液が数滴落下しており、爪の剥がれた部位から出血が認められた。この他には、雌雄各群とも一般状態の変化は観察されなかった。

3．詳細な臨床観察（Table 2、Appendix 2）

投与期間中の各週において、800 mg/kg 投与群の雌雄では、接触に対して正常よりやや過敏に反応する個体が増加したほか、雄の第 1 週を除き、ケージから取り出す時およびハンドリング時に発声する個体が増加した。また、800 mg/kg 投与群の雄で投与第 2、3、4 週、雌で投与第 2 および 4 週に動作振戦が散見され、雄 1 例では投与第 3 および 4 週に探索行動がやや亢進した。投与第 2 から第 4 週に雌では、歩行時、断続的に停止し、腹臥位となる動作が数例で観察された。その他、雌雄とも各投与週で、一般状態観察と同様のケージ内を舐める動作および咀嚼様動作が散見された。ケージ内を舐める動作および咀嚼様動作は、200 mg/kg 投与群の雄 1 例で投与第 1 週に、雌 1 例で投与第 4 週も認められた。

また、800 mg/kg 投与群の雌では、投与第 4 週に口周囲の流涎が 1 例観察され、時折身繕いをする個体が 1 例認められた。

回復試験期間中の観察において、800 mg/kg 投与群の雌雄では、接触に対してやや過敏に反応する個体が増加する傾向にあった。また、800 mg/kg 投与群の雄 1 例では、回復試験期間第 1 および 2 週に探索行動が低下した。この他には、雌雄とも、対照群および被験物質投与群との間に差はなかった。

4．機能検査（Fig. 1、Table 3、Appendix 3）

1）驚愕反応、視覚定位、対光反射および正向反射

投与第 4 週の検査では、800 mg/kg 投与群の雌 1 例で、驚愕反応が僅かに過敏となった。この他に回復試験期間も含めて対照群と被験物質投与群との間に差はなかった。

2）握力測定

投与第 4 週の検査において、200 および 800 mg/kg 投与群の雄ならびに 50 および 200 mg/kg 投与群の雌で有意に握力が増加したが、雄では 200 mg/kg 投与群の 2 例および 800 mg/kg 投与群の 1 例を除き、対照群の値の範囲内であり、範囲外の 3 例も増加の程度はわずかであったことから、また、雌では個体間のばらつきが大きく変化が明瞭ではないこと、同系統同週齢の動物から得られた他試験のデータ（平均 0.961kgf）と比較して対照群の値が低かったことから、いずれも被験物質投与による変化ではないと判断した。この他には、回復試験期間も含めて対照群と被験物質投与群との間に有意差はなかった。

3）自発運動量測定

投与第 4 週の検査では、800 mg/kg 投与群の雌で、投与後 0 分から 30 分にかけての立上がり回数が有意に減少した。200 mg/kg 投与群の雄では、投与後 240 分から 270 分にかけての位置移動回数および立ち上がり回数が有意な増加となったが、個体別にみて同程度の運動量の増加は近辺の時間帯で対照群にも認められていることから、偶発的に増加例が認められ、有意となったと考えられた。この他に有意差は認められなかったが、全計測時間を通して 10 分毎の計測値を対照群と被験物質投与群とで個体別に比較した場合、800 mg/kg 投与群では、雌雄とも位置移動が認められない（計測が 0 を示す）ことが少ない傾向にあった。

回復試験第 2 週では、800 mg/kg 投与群の雄で開始直後から 30 分にかけての立上がり回数の増加、ならびに開始後 60 から 90 分にかけての位置移動回数および立上がり回

数の減少が有意な変化となった。800 mg/kg 投与群の雄で測定開始後 60 分から 90 分に観察された立ち上がり回数および位置移動回数の低下は、測定開始直後から 30 分に立ち上がり回数（探索行動）が亢進したことによる反動であり、抑制性の作用によるものではないと考えられた。雌では、開始後 330 から 360 分にかけての位置移動回数が有意に増加したが、投与期間中に認められなかった変化であること、環境変化による探索行動が沈静化した後に認められた増加であることから、被験物質の作用の継続ないし退薬症候ではないと判断した。この他には、対照群と比較して有意な変化はなかった。

5．体重（Fig. 2、Table 4、Appendix 4）

800 mg/kg 投与群の雄で投与第 2 日から回復試験期間終了日まで、対照群と比較して有意に低値となった。同群の雌でも投与第 4 日から回復試験期間終了日まで低い傾向にあり、投与第 4 から第 11 日および第 28 日ならびに回復試験期間第 4 日から回復試験期間終了日にかけて対照群と比較して有意な低値を示した。800 mg/kg 以外の投与群では、対照群との間に有意差はなかった。また、体重増加は、800 mg/kg 投与群の雄で投与第 1 日から 4 日および投与第 8 日から投与第 22 日の間、雌で投与第 1 日から第 4 日の間で有意に抑制された。この他、排便量の減少が認められた 800 mg/kg 投与群の雄 1 例（M-24）では、投与第 15 日から 18 日の 3 日間に体重が 37.0g 減少した。なお、800 mg/kg 投与群の雌では、投与第 4 日以降は順調な体重増加を示したにも係らず、回復試験第 1 日から 4 日にかけての体重増加が対照群と比較して低値となったが、対照群の体重増加が投与期間中と比較して高かったことから、投与中止による影響ではないと判断した。

6．摂餌量（Fig. 3、Table 5、Appendix 5）

投与第 1 日から 2 日にかけて測定した投与第 1 週の摂餌量は、800 mg/kg 投与群の雌雄で対照群と比較して有意に減少した。また、800 mg/kg 投与群では、雄で投与第 2 週から回復試験第 1 週にかけて、雌では投与第 2 週において摂餌量が有意に減少した。この他には、雌雄とも観察期間中を通して対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。なお、排便量が減少した 800 mg/kg 投与群の雄 1 例（M-24）では、投与第 15 日から 16 日にかけての摂餌量が減少した。

7．尿検査（Table 6、Appendix 6）

投与第4週の検査では、800 mg/kg 投与群の雄で尿蛋白の減少が、同群の雌でケトン体およびウロビリノーゲンの増加ならびに尿比重の低下で有意差が認められ、尿比重が低下した個体では、尿量が多い傾向にあった。また、800 mg/kg 投与群では、雌の尿中電解質でカリウム濃度および塩素濃度が有意に低下したが、血中電解質濃度の変化との関連性はなく、同群では尿量の多い個体が散見されていたこと、排泄量の減少は認められなかったことから、被験物質投与による影響ではないと判断した。この他には、対照群と被験物質投与群との間に有意差はみられず、尿沈渣の所見にも明らかな差はなかった。なお、尿蛋白は酢酸を用いて pH を 7.0 以下に調整してから検査したが、800 mg/kg 投与群の雄では、この他の群と比較して、約2倍量の酢酸を必要とした。

回復試験第2週の検査では、800 mg/kg 投与群の雄で、尿電解質の Na/K 比が有意に増加したが、投与期間中には認められなかった変化であり、被験物質投与による影響ではないと考えられた。この他に対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

8．血液学検査(Table 7、Appendix 7)

投与期間終了時剖検例では、各被験物質投与群の雄および 50 mg/kg 投与群の雌でプロトロンビン時間が有意に短縮し、800 mg/kg 投与群の雄では活性部分トロンボプラスチン時間が有意に短縮した。また、800 mg/kg 投与群の雌では、白血球百分比において、好中球比率および単球比率の有意な上昇、好酸球比率およびリンパ球比率の有意な低下が認められた。その他、800 mg/kg 投与群の雌で、血小板数の増加が有意となった。雄の被験物質投与群で有意差の認められたプロトロンビン時間を、同系統同週齢の動物を用いて秦野研究所で実施した近年4試験の対照群の値（Appendix D、以下、バックグラウンドデータ）と比較すると、今回の対照群で僅かに延長し、50 および 200 mg/kg 投与群は同程度、800 mg/kg 投与群では僅かに短縮していた。また、本試験では、プロトロンビン時間短縮の一因とされる急性失血や血栓性静脈炎を示唆する所見は認められておらず、50 および 200 mg/kg 投与群では、肝臓の組織所見および生化学検査各値に変化がなかったことから、50 および 200 mg/kg 投与群のプロトロンビン時間は短縮していないと判断した。しかし、800 mg/kg 投与群では、低値の個体が散見されること、肝臓に変化が認められていることから、被験物質投与による短縮である可能性を否定できないと考えられた。雌のプロトロンビン時間については同様に比較し、50 mg/kg 投与群でみられた短縮は被験物質投与による変化

ではないと判断した。

回復試験期間終了時剖検例では、800 mg/kg 投与群の雌で、血小板数が有意に増加し、血色素量が有意に低下した。投与期間終了時に貧血を示唆するような所見は観察されていないことから、血色素量の低下は被験物質投与による影響ではないと判断した。

なお、投与期間終了時剖検例のうち、投与第4週の握力検査時に爪が剥がれ、その後、数日間出血が認められた50および200 mg/kg投与群の雄各1例（M-14、18）は、剖検時の検査で、ヘマトクリット値、血色素量および赤血球数が減少したが、これらの変化は、同群の他の動物および高用量群では認められておらず、爪が剥がれたことによる出血に起因した貧血であると考えられた。また、本データを統計解析の対象とすることにより、本来の被験物質投与に起因した変化が不明瞭となることが懸念されたため、この2例の血液学検査値は、統計解析から除外することとした。

9．血液生化学検査(Table 8、Appendix 8)

投与期間終了時剖検例では、800 mg/kg投与群の雌雄で、無機リン濃度が有意に上昇し、塩素濃度が有意に低下した。また、800 mg/kg 投与群では、雄でカルシウム濃度および尿素窒素濃度の有意な上昇ならびにアルブミン濃度の有意な低下が、雌でブドウ糖濃度およびトリグリセライド濃度の有意な上昇ならびに総ビリルビン濃度の有意な低下が認められた。この他、雌では、各被験物質投与群で、GOT 活性が対照群と比較して有意に低下したが、バックグラウンドデータ（Appendix D）と比較して対照群の値が高かったこと、変化が用量依存的ではなかったことから、被験物質投与による影響ではないと判断した。

回復試験期間終了時剖検例では、800 mg/kg 投与群の雄でA/G比が有意に上昇した。同群の雌では総蛋白濃度およびアルブミン濃度の有意な低下、ナトリウム濃度の有意な上昇が認められた。ナトリウム濃度の上昇については、電解質濃度の生体内調節は速やかに行われることから投与期間終了時に認められた塩素濃度低下に起因する可能性はないと考えられること、この他の電解質濃度には変化が認められていないことから、投与中止による変化ではないと判断した。なお、800 mg/kg投与群の雌では、ブドウ糖濃度が低下したが、投与期間中には認められていないことから、被験物質投与の影響によるものではないと判断した。

１０．　病理学検査

1)　器官重量（Table 9・10、Appendix 9・10）

投与期間終了時剖検例では、800 mg/kg 投与群の雌雄で、肝臓と腎臓の相対重量が有意に増加し、雌では、肝臓の実重量も有意に増加した。また、同群の雄で、副腎の相対重量が有意に増加した。800 mg/kg 投与群では、雄で、脳の相対重量が有意に増加し、雌で実重量が有意に低下した。脳は体重減少や発育不良の影響を受けにくい器官であることから、雄での相対重量の増加は、解剖時体重が低い傾向にあったことによると考えられ、脳重量の増加を意味するものではないと判断した。また、同群の雌では、脳の実重量が低下したが、バックグラウンドデータ（Appendix D）の範囲内であることから被験物質投与による影響ではないと考えられた。この他、800 mg/kg 投与群の雄では、精巣の相対重量が有意に増加し、精巣上体の実重量が有意に減少したが、解剖時体重が対照群と比較して低値であったことおよび組織学的に萎縮あるいは発育不良を示す所見が観察されなかったことから、被験物質投与による重量変化ではないと判断した。また、50 mg/kg 投与群の雌では、卵巣の実重量および相対重量が有意に増加したが、1 例を除き対照群の範囲内にあり、病理組織学的にも変化が認められなかったことから、偶発的な有意差であると考えられた。

回復試験期間終了時剖検例では、800 mg/kg 投与群の雌雄で、解剖時体重が有意に低下し、脳の相対重量が有意に増加したが、投与期間終了時の雄と同様、体重が低値であったために脳の重量変化が有意となったと判断した。また、800 mg/kg 投与群の雄では、心臓および肝臓の実重量が有意に低下したが、投与期間中に認められた変化ではなく、また、相対重量も有意差はなかったため、被験物質投与による影響ではないと判断した。

2) 剖検所見（Table 11、Appendix 11）

投与期間終了時剖検例において、片側性の腎盂拡張あるいは空腸および回腸の赤色化が対照群の雄で各 1 例観察された。この他に、雌雄各群とも回復試験期間終了時剖検例を含めて変化は観察されなかった。

3) 組織学検査所見

① 投与期間終了時剖検例

投与期間終了時屠殺剖検例において、主として肝臓、腎臓および脾臓に以下に示す変化が観察された。

肝臓では、800 mg/kg 投与群の雄 1 例および雌 4 例で小葉中心性の肝細胞肥大が観察され、雌で対照群と比較して発生頻度が有意に増加した。また、800 mg/kg 投与群の雌

1 例に微小肉芽腫が認められた。この他、50 および 200 mg/kg 投与群の雄各 1 例に髄外造血が認められたが、この 2 例は、爪が剥がれたことによる貧血が示唆された個体であるため、髄外造血の増加は被験物質投与による変化ではないと判断した。また、200 mg/kg 投与群の雄 1 例を除く雌雄全例で門脈周囲性の肝細胞の脂肪化が観察され、雄の対照群および 800 mg/kg 投与群を除く雌雄各群で単細胞壊死が散見されたが、対照群と被験物質投与群との間に有意差はなく、所見の増強も認められなかったことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

腎臓では、800 mg/kg 投与群の雄 3 例および雌 2 例で遠位尿細管あるいはヘンレ系跡から遠位にかけての上皮細胞に空胞化が観察された。この他には、対照群を含む雌雄各群で好塩基性尿細管が観察され、200 および 800 mg/kg 投与群の雌を除く雌雄各群でリンパ球浸潤が、対照群の雌雄、50 および 200 mg/kg 投与群の雌ならびに 800 mg/kg 投与群の雄で皮髄境界部の鉱質沈着が散見され、200 mg/kg 投与群を除く雄の各群の各 1 例で蛋白円柱が、皮質の嚢胞あるいは腎盂拡張が雄の対照群の 1 例に認められたが、いずれも被験物質投与群で増強していないことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

脾臓では、対照群を含む雌雄各群で、髄外造血およびヘモジデリン沈着が観察されたが、対照群と各被験物質投与群との間に発生頻度および程度とも差はなく、被験物質投与に起因した変化ではないと考えられた。

この他、心臓では、対照群の雄 1 例で、軽微な心筋の変性および線維化が観察され、前立腺では、雄の対照群および 800 mg/kg 投与群の各 3 例で軽微なリンパ球浸潤が認められたが、いずれも、対照群のみあるいは対照群を含む被験物質投与群で認められた変化であったため、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。なお、対照群の雌 1 例で肉眼的に赤色化が認められた空腸および回腸には、変化は観察されなかった。

② 回復試験期間終了時剖検例

回復試験期間終了時剖検例では、主として肝臓、腎臓および脾臓に以下に示す変化が観察された。

肝臓では、800 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で髄外造血が認められたが、2 例とも軽微な変化であること、投与期間中を含めてこの他の動物では被験物質投与に起因した貧血が認められていないことから、被験物質投与による変化ではないと考えられた。また、雌 2 例で微小肉芽腫が認められ、この変化は投与期間中にも同群の雌 1 例で観察された

が、微小肉芽腫は今回の試験に用いた系統のラットでは、自然発生的に認められる変化であることから[5]、被験物質投与による変化ではないと判断した。この他、対照群を含む雌雄各群で門脈周囲性の肝細胞の脂肪化および単細胞壊死が観察された。

腎臓では、対照群の雌および800 mg/kg投与群の雌雄で好塩基性尿細管が観察され、雌の各群でリンパ球浸潤が、対照群の雌で皮髄境界部の鉱質沈着が散見された。

脾臓では、対照群を含む雌雄各群で髄外造血およびヘモジデリン沈着が観察された。

【 考　　察 】

4-エチルモルホリン（以下、EM と略）を 50、200 および 800 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに 28 日間反復経口投与した結果、以下に示すような中枢神経、肝臓および腎臓への影響を中心とした変化が認められた。

800 mg/kg 投与群で動作振戦が観察された。EM の単回経口投与毒性試験[6]および本試験予備試験では振戦および痙攣が認められていることから、EM の中枢神経系に対する興奮作用が示唆された。また、200 および 800 mg/kg 投与群で観察されたケージ内を舐める動作および咀嚼様動作は、常同行動の一種であると考えられていることから、被験物質の中枢神経系への影響の一つであると判断した。さらに、800 mg/kg 投与群では、自発運動量測定中、雌雄で静止する（移動回数が 0 となる）ことが少ない傾向にあったことから自発運動の亢進が示唆され、雌では投与後 30 分間の立ち上がり回数が減少し、探索行動は抑制されていた。常同行動の発現時には、自発運動が亢進し、探索行動が抑制されることから、立ち上がり回数の減少は、常同行動の発現と関連した変化であると考えられた。

800 mg/kg 投与群の雄では、回復試験期間中の計測で、開始直後から 30 分にかけての立ち上がり回数が増加した。投与期間中は、雄 1 例で詳細な臨床観察における探索行動の亢進が認められたのみで、立ち上がり回数の増加はなかったが、計測値として相反する常同行動による抑制の可能性もあり、回復試験期間中に認められた立ち上がり回数の増加は被験物質投与による影響であると判断した。800 mg/kg 投与群では、回復試験期間中を含めて接触に対する反応がやや過敏となり、ケージからの取り出し時ないしハンドリング時に発声する個体が増加したことから、易刺激性が示唆された。また、驚愕反応が 1 例でわずかに亢進したことも易刺激性によるものと考えられた。本試験と同用量の EM を単回経口投与後、24 時間の尿中濃度を測定した試験では、投与量の約 20～70%（平均 40%）の EM が、未変化体として尿中に検出されることが確認されている[7]。また、類似化合物であるモルホリンは、ラットではほとんど血漿蛋白質とは結合せず、投与後 24 時間で 70～90%が尿中に、残りが糞中と呼気中にいずれも未変化体として排泄され、半減期が 115 分であることが報告されている[8]。これらのことから、今回、易刺激性および探索行動の亢進といった EM の中枢神経系に対する作用の一部が投与中止によって回復性を示さなかったのは、被験物質の蓄積性によるものではなく、非可逆的あるいは、回復に時間を要する変化が生じたためであることが推測された。この他、800 mg/kg 投与群では、うずくまり、活動性の

低下、閉眼が観察されたが、同様の所見は、EMの単回投与毒性試験で痙攣ないし振戦が表れた後に認められていることから[6]、EMの中枢神経系に対する作用の一つであると考えられた。また、詳細な臨床観察時、800 mg/kg 投与群の雌数例で断続的に歩行を停止して腹臥位を呈したが、脱力および歩行障害は観察されなかったことから、中枢神経系に対する作用と関連する可能性が示唆された。さらに、800 mg/kg 投与群の雄2例雌1例では、投与後約2時間の観察時に流涎が、雌1例で流涎の痕跡が観察された。このうち雄1例を除く3例で動作振戦を伴っていたこと、EMの単回投与毒性試験でも振戦および流涎が観察されていること[6]、モルホリンのラット単回投与では振戦、自発運動の抑制の他、流涎および流涙が報告されていること[9]から、投与後約2時間で観察された流涎は、EMの作用の一つであると考えられた。この他、800 mg/kg 投与群の雌で血漿中ブドウ糖濃度が上昇した。本試験では易刺激性が認められているが、ストレス状態を示唆する所見はなく、ブドウ糖濃度の上昇が、EM投与によるものであるか否か判断出来なかった。また、800 mg/kg 投与群の雄1例で回復試験期間中に観察された作業台上の探索行動の抑制は、易刺激性と関連する可能性もあるが、回復試験第2週では探索行動の抑制が観察されたのみであったため、被験物質投与の影響によるものであるか否か判断できなかった。また、投与第4週に800 mg/kg 投与群の雌1例で身繕いが観察されたが、1例のみの変化であり、被験物質投与による影響であるか否か判断できなかった。

800 mg/kg 投与群では、摂餌量が減少し、体重増加が抑制された。しかし、摂餌に影響を及ぼすような一般状態の変化は観察されていないこと、体重減少を示した800 mg/kg 投与群の雄1例（M-24）でも、摂餌量減少および排便量減少が観察される前日には常同行動以外の変化は認められなかったことから、摂餌量減少および体重増加の抑制は、一般状態の悪化による二次的な変化ではないと考えられた。また、800 mg/kg 投与群の雄で血中アルブミン濃度の低下および尿蛋白の減少が認められた。この週齢の雄ラットでは尿蛋白の大半がα_{2u}グロブリンであることから[10]、尿蛋白の減少が、血中アルブミン濃度の低下を反映している可能性は低いが、尿蛋白が陰性だった個体で体重が低かったことから摂餌量減少と関連した変化である可能性が考えられた。雌の尿中ケトン体の増加は被験物質投与による変化である可能性はあるが、原因は不明であった。なお、回復試験期間に観察された血漿蛋白の変化は、被験物質投与による影響であるか否か判断できなかった。

800 mg/kg 投与群の雌雄において、肝重量の増加および小葉中心性の肝細胞肥大が観察され、雌では、個体別にみて所見の一致があったことから、肝重量増加の一因として、肝

細胞肥大が示唆された。病理組織学的および血液生化学的に肝臓の損傷を示唆する所見はなく、肝細胞肥大が肝障害を意味する所見ではないと考えられたが、薬物代謝酵素の誘導を示す変化であるか否かは判断できなかった。この他、800 mg/kg 投与群では、雄では血液凝固時間の短縮が認められ、雌でトリグリセライド濃度の上昇およびビリルビン濃度の低下が認められた。これらは、個体別にみて必ずしも肝臓の変化と一致しなかったが、肝重量がより増加した雄の1例（M-28）では凝固時間が短縮し、雌の1例（F-56）ではビリルビン濃度が低下してトリグリセライド濃度が上昇したことから、肝臓への影響と関連した変化である可能性が示唆された。また、800 mg/kg 投与群の雌でみられた尿中のウロビリノーゲンの増加は、ビリルビン濃度の変化と関連する可能性もあるが、明らかではなかった。なお、肝細胞肥大を含め、いずれの変化も回復試験期間終了時には認められず、肝臓に関する所見は投与中止により回復すると考えられた。

800 mg/kg 投与群では腎重量が増加し、組織学的にはヘンレ係蹄あるいは遠位の尿細管上皮に空胞化が観察された。雄で尿素窒素濃度がわずかに上昇した以外に、尿細管壊死や再生尿細管といった損傷を示唆する所見の増強はなく、個体別の比較では、尿素窒素濃度が高値となった1例（M-26）で尿細管の空胞化が観察されたほかは、腎重量の増加と尿細管の空胞化、尿素窒素濃度の増加を示す個体が必ずしも一致していなかった。また、雌では、尿比重低下を伴う尿量増加が示唆された。尿細管の空胞化が観察されたヘンレ係蹄および遠位尿細管は、主として水および電解質の再吸収を行っていることから、尿比重に影響が表れる可能性もあるが、個体別に比較して腎重量の増加および尿細管の空胞化が著しかった1例（F-60）では比重および尿量は変化していなかった。類似化合物であるモルホリンは、マウスに経口投与することにより、腎機能低下が起こることおよびラット吸入暴露により肝臓および腎臓の重量が増加し、尿細管壊死が観察されることが確認されており[11]、モルホリンオレイン酸塩では、マウスに経口投与することにより腎重量の増加、血中尿素窒素濃度の上昇、尿比重増加および遠位尿細管の混濁腫脹が報告されている[12]。EMも同様に腎臓に作用する可能性が示唆されたが、組織所見は異なっており、遠位尿細管上皮の空胞化が何を示すのか本試験結果からは明らかとはならなかった。しかし、尿中に被験物質の未変化体が検出されていること[7]、被験物質は化学反応の触媒として利用されていることから、予備試験において、試験紙（クリニティック 200+）が異常発色したこと、本試験の尿蛋白測定時のpH調整で800 mg/kg投与群の雄でより多くの酢酸を必要としたことは、尿中に被験物質が存在することを示唆するものであると考えられた。

800 mg/kg 投与群で血漿中塩素濃度が低下した。今回、重炭酸濃度は測定していないため、カリウム濃度およびナトリウム濃度の和から塩素濃度を減ずることによりアニオンギャップを推測すると、塩素濃度がより低下した個体で増加する傾向にあり、塩素濃度低下の一因として、塩素以外の陰イオンの血中濃度が増加した可能性が示唆された。また、800 mg/kg 投与群の雌雄で血中無機リン濃度が、雄でカルシウム濃度が上昇し、この変化は、塩素イオン濃度がより低値であった個体（M-26、M-28、F-60）と一致する傾向にあった。血漿中電解質濃度の変化が、血液中に存在する被験物質の物理化学的影響によるものなのか、被験物質の生体に対する作用の結果であるのかは、本試験結果からは判断できなかったが、いずれも、14 日間投与中止により回復することが確認された。また、800 mg/kg 投与群では、雄で副腎重量が増加し、雌の 1 例（F-60）でも高値を示したが、血漿電解質あるいは易刺激性といった変化に関連した所見であるのか判断できなかった。

以上の肝臓、腎臓、副腎および電解質の変化は、影響が強く表れた個体が一致する傾向にあり（M-28 および F-60）、被験物質投与による影響が相互に関連する、あるいは被験物質に対する感受性に個体差がある可能性が考えられた。また、28 日間反復投与後に尿中の被験物質濃度を測定した試験では、尿中の被験物質濃度にばらつきがあったことから被験物質の影響の個体差が示唆されたが、雌雄全体として比較すると有意差があった項目に差異はあるものの、標的器官への影響は類似していることから性差は少ないと考えられた。

800 mg/kg 投与群の雌雄において、投与保定時ないし投与直後から投与後約 20 分にかけて流涎が観察された。この流涎は投与第 3 週になってから認められ、この他の一般状態の変化と比較して発現時間が短く、投与前の保定段階でも観察された。刺激性物質の経口投与に際しては、しばしば反射性の流涎が観察されるが、本被験物質は、刺激性を有するという情報があること、本被験物質の単回投与毒性試験において、被験物質の刺激性が示唆される腺胃粘膜の変化が観察されていることから、被験物質の物理的刺激による反射性の流涎であると考えられた。

この他、800 mg/kg 投与群の雌では、好中球比率が上昇し、リンパ球比率が低下した。白血球百分比に白血球数を乗じることにより算出した白血球数で比較すると 1 例（F-60）を除き、リンパ球数は対照群の範囲内にあり、好中球数は増加していたことから、好中球の増加による百分比の変動であることが示唆された。また、同様に計算して好酸球数の減少および単球数の増加が示唆されたが、この他の検査項目で、関連する所見に変化は認められず、今回の試験結果のみでは、これら白血球数の変化と被験物質投与との関連は不明

であった。この他、800 mg/kg 投与群の雌で血小板数の増加が認められたが、同群の雄で観察された血液凝固系の変化と関連の有無、さらには被験物質投与による変化であるのか否かは本試験結果からは判断できなかった。

以上の結果から、本試験条件下における EM の無作用量は雌雄とも 50 mg/kg/day であると考えられた。また、EM の標的器官は中枢神経、肝臓、腎臓であることが示唆され、常同行動、易刺激性および振戦といった中枢神経興奮作用、肝重量および腎重量の増加ならびに肝細胞肥大および腎臓のヘンレ系蹄から遠位尿細管にかけての尿細管上皮細胞の空胞化が認められ、摂餌量低下を伴う体重増加抑制、塩素イオン濃度低下を主とした血液中の電解質濃度の変化が生じることが明らかとなった。これらの変化のうち、中枢神経に対する影響は 14 日間の投与中止によっても認められたが、その他は回復した。

【参　考　文　献】

1) National toxicology program study overviews and general protocols. NTP home page. Last updated 2002.02.11

2) Hazardous substances data bank national library of medicin's toxicology data network (TOXNET®). Last updated 2002.05.10

3) Occupational safety & health administration U.S. department of labor. OSHA technical links, health guidelines, n-ethylmorpholine. Revision date 1999.04.27

4) Smyth, H.F, Carpenter, C.P, Weil, C.S, et.al: Range-finding toxicity data list V. Arch. Ind. Hyg. Occupational Med. 10:61-68(1954)

5) Maeda, H., Omori, M., Miyajima, H.: Comparison of historical control data between Crj:CD(SD)IGS and Crj:CD(SD) rats. in "Biological Reference Data on CD(SD)IGS Rats-1999" Matsuzawa, T., Inoue, H., eds, CD(SD)IGS Study Group, Yokohama (1999) pp.106-118

6) 太田亮ら:4-エチルモルホリンのラットを用いる急性経口投与毒性試験(試験計画番号A-01-071). 未公刊

7) 安生孝子ら: 4-エチルモルホリン投与ラット尿中の 4-エチルモルホリン濃度測定試験(試験計画番号Q-01-036). 未公刊

8) Sohn, S. O., Fiala, S. E., Conaway, C. C., et al.: Metabolism and disposition of morpholine in the rat, hamster, and guinea pig. Toxicol. Appli. Pharmacol. 64. 486-491(1982)

9) Clayton, D. G., Clayton, E. F. edit. : Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. Vol. 2A. (3). John Wiley & Sons, New York (1981)pp.2693-2697

10) 堀内茂友、輿水馨 編：B.動物別の尿性状 B-1 ラット, 田嶋嘉雄 監修「実験動物の生物学的特性データ」, ソフトサイエンス社, 東京(1989)pp.205-208

11) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol.47. IARC working group. Lyon (1989)pp.199-213

12) Shibata, M., Kurata, Y., Tamano, S. et al.: 13-week subchronic toxicity study with morpholine oleic acid salt administered to B6C3F$_1$ mice. J. Toxicol. Env. Health. 22: 187-194(1987)

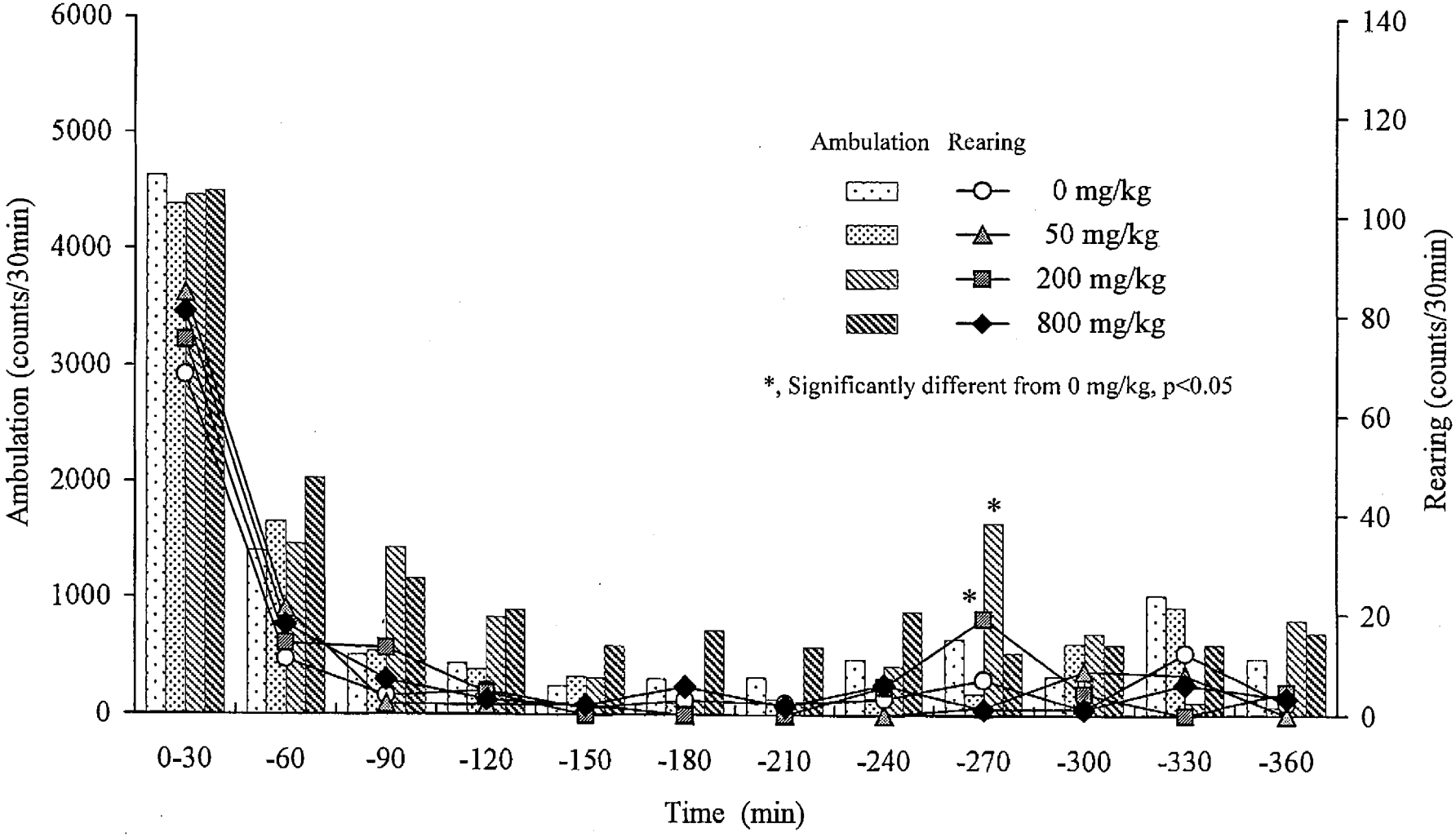


Fig. 1-1-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine,4-ethyl- in rats

Functional observations in males in the 4th week of the dosing period (motor activity)

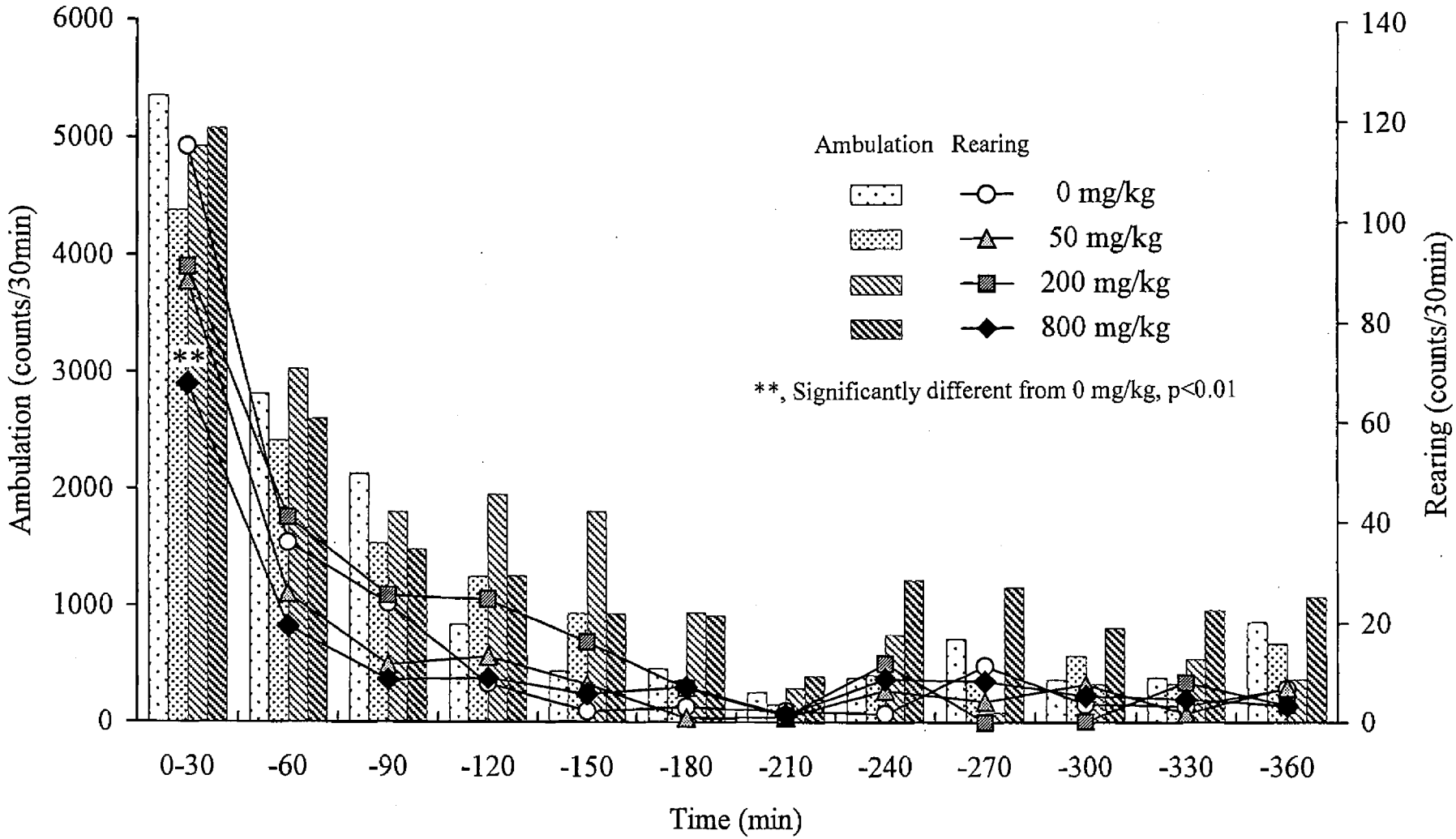


Fig. 1-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine,4-ethyl- in rats

Functional observations in females in the 4th week of the dosing period (motor activity)

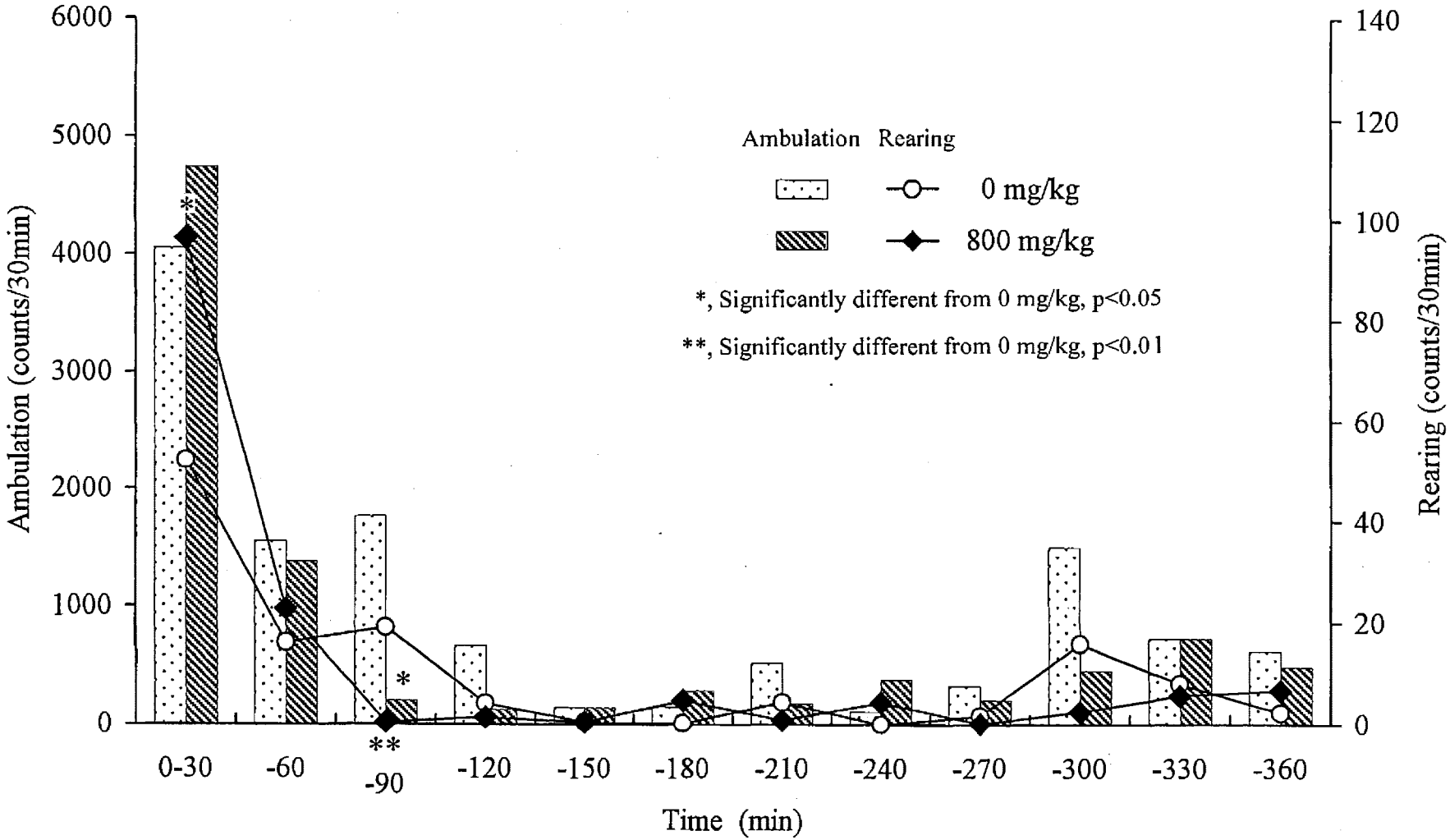


Fig. 1-2-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine,4-ethyl- in rats

Functional observations in males at the 2nd week of the recovery period (motor activity)

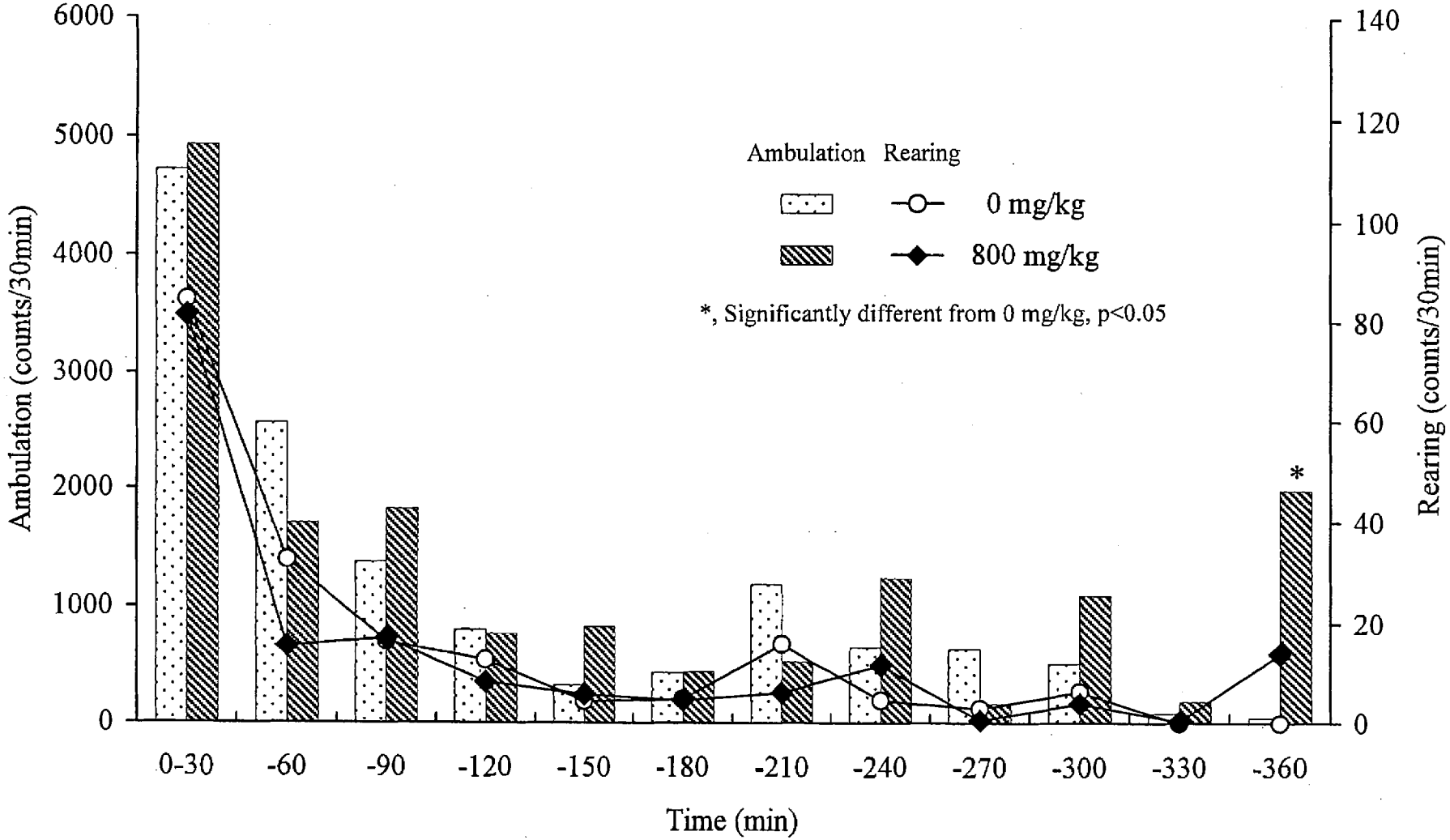


Fig. 1-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine,4-ethyl- in rats

Functional observations in females at the 2nd week of the recovery period (motor activity)

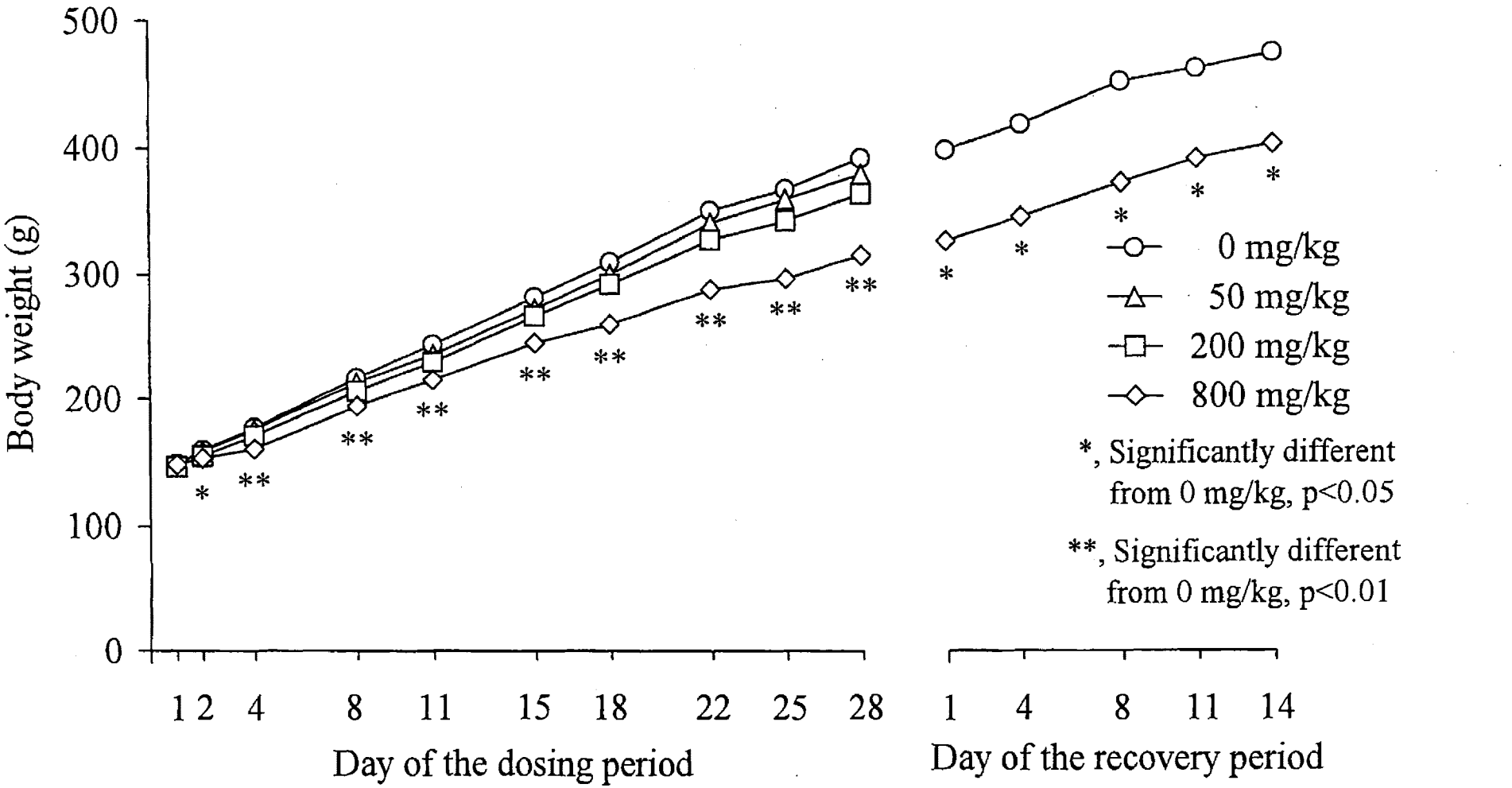


Fig. 2-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Body weight changes in males

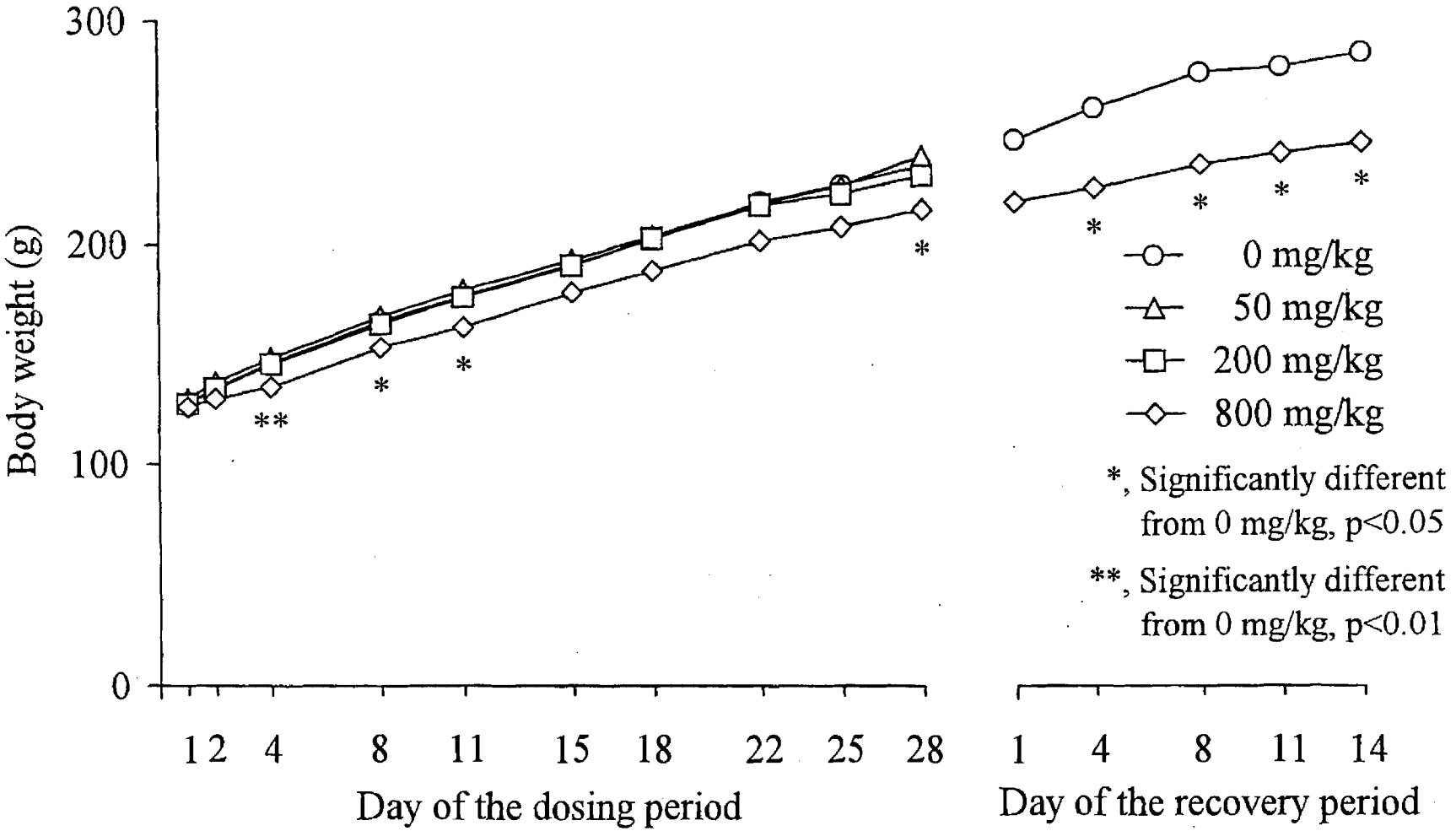


Fig. 2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Body weight changes in females

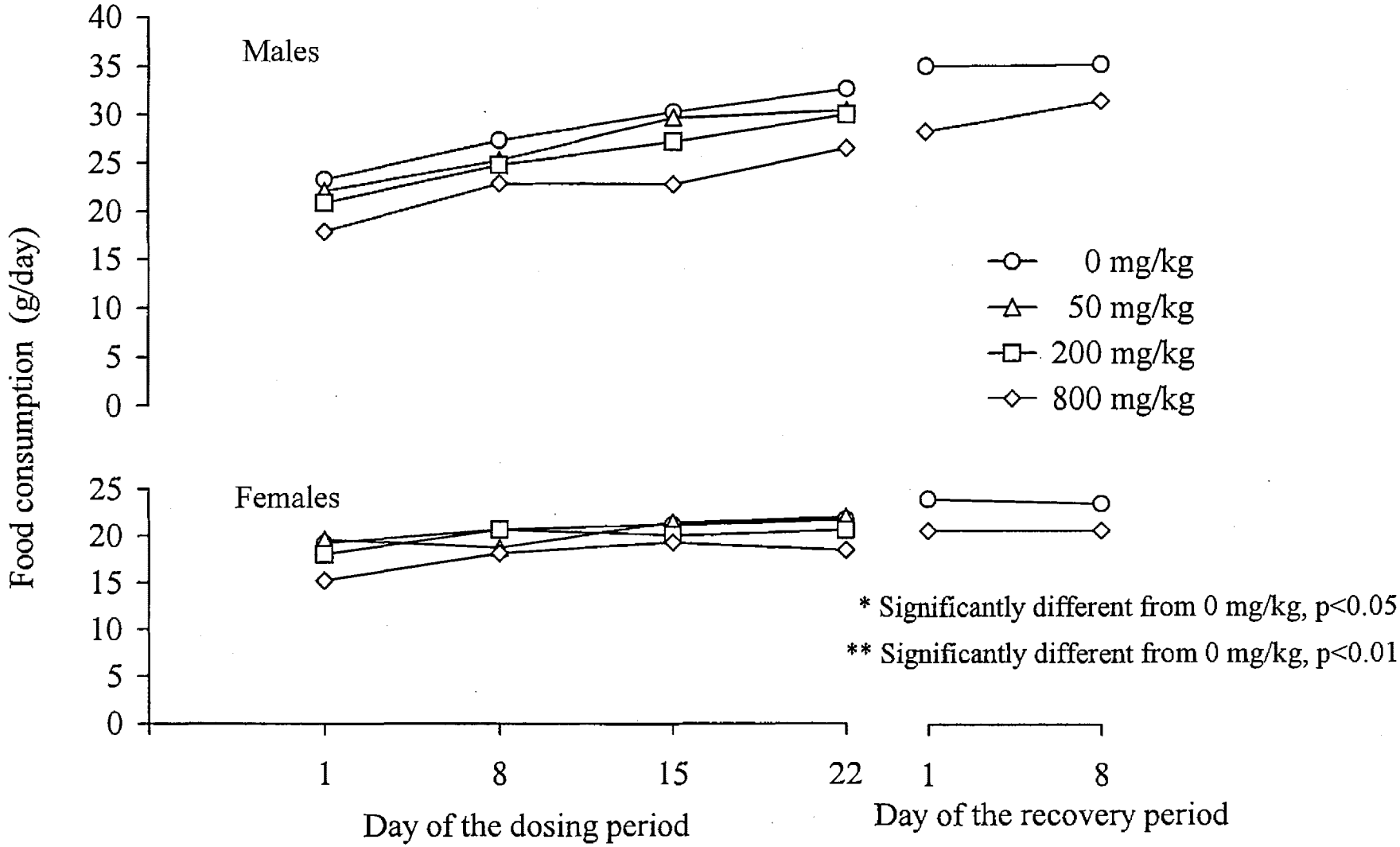


Fig. 3
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Food consumption in males and females

Table 1-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl- in rats

Clinical signs in males

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs — Day of the dosing period																													Day of [a] — the recovery period —	Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	1-14	
Intermittent chewing/licking	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	2	2	2	1	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-		4
	800	10	1	4	6	6	8	5	5	6	10	10	10	10	10	10	7	7	7	10	9	8	10	6	3	8	9	7	7	8	-	10
Action tremor	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Decrease in movement	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Crouching position	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Eyelid closure	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Salivation immediatly after administration	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	3	3	4	5	3	4	3	1	3	4	4	-	6
Salivation about two hours after administration	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Decrease in fecal volume	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Anemic paleness	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1		1
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-, No animal showed the sign
a) The recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 800 mg/kg groups.

Table 1-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl- in rats

Clinical signs in females

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs — Day of the dosing period																												Day of [a] — the recovery period —	Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	1-14	
Intermittent chewing/licking	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	-	2	1	1	1	3	2	3	-	-	1	-	-	2	1	4	1		5
	800	10	1	5	5	9	5	4	6	7	10	9	9	10	10	10	4	8	10	10	10	5	7	8	5	9	8	10	9	7	-	10
Action tremor	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	2	-	-	-	2	2	-	1	-	1	-	-	8
Decrease in movement	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	1	2	1	-	-	-	2	-	-	2	-	1	-	-	7
Crouching position	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Eyelid closure	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	-	-	3
Salivation immediatly after administration	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	1	3	1	1	6	-	3	1	3	2	-	7
Salivation about two hours after administration	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Soiled fur around the mouth	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	200	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	800	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1

-, No animal showed the sign
a) The recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 800 mg/kg groups.

Table 2-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl- in rats

Detailed clinical observations in males

Observations	Score /code	Dose	0 mg/kg							50 mg/kg					200 mg/kg					800 mg/kg						
		Period	Pre.	D1	D2	D3	D4	R1	R2	Pre.	D1	D2	D3	D4	Pre.	D1	D2	D3	D4	Pre.	D1	D2	D3	D4	R1	R2
Number of animals examined			10	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	5	5
Home cage observations																										
Posture	O		10	10	10	10	10	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	9	10	10	10	9	5	5
	R		-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-
Locomotor	-		-	6	5	7	5	4	4	-	2	1	5	4	-	1	-	1	5	-	6	2	2	5	5	5
Chewing/licking	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	1	4	-	-
Home cage observations (observed after handling)																										
Tremor	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-
Chewing/licking	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	4	-	3	1	-	-
Responses to handling																										
Behavior while removing from cage	2		4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	1	1	4	1	2	5	5	1	-
Handling behavior	2		4	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	2	-	1	1	1	5	1	3	6	5	1	-
Salivation	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chewing/licking	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Observed at the outside of home cage																										
Posture	O		10	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	5	5
Exploration	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
Grooming	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
Urination (frequency/30sec.)	1		4	2	2	2	1	2	-	2	2	1	-	-	3	2	1	3	1	4	3	4	2	2	-	1
	2		-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-
Defecation (frequency/30sec.)	1		-	-	3	1	1	2	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3	1	1	1	-	1	1
	2		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Touch response	6		-	2	-	-	-	1	1	-	1	-	-	2	-	1	2	2	2	-	3	4	5	8	2	3
Chewing/licking	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-

Pre., during the acclimatizing period
D1-D4, in the week of the dosing period
R1,R2, in the week of the recovery period

Parameter, number of animals showed the signs

Posture: O, sitting or standing position; R, rearing
Locomotor: -, not determined due to the usual sleep
Chewing/licking: 4, observed
Tremor: 2, observed on part of the body (included in the action tremor)
Behavior while removing form cage: 2, normal behavior with vocalization

Handling behavior: 2, normal behavior with vocalization
Salivation: 2, salivation was observed around the mouth
Exploration: 2, decreased; 6, slightly increased
Grooming: 4, sometimes observed
Touch response: 6, slightly irritable

Table 2-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl- in rats

Detailed clinical observations in females

Observations	Score /code	Dose	0 mg/kg							50 mg/kg					200 mg/kg					800 mg/kg						
		Period	Pre.	D1	D2	D3	D4	R1	R2	Pre.	D1	D2	D3	D4	Pre.	D1	D2	D3	D4	Pre.	D1	D2	D3	D4	R1	R2
Number of animals			10	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	5	5
Home cage observations																										
Posture	O		10	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	9	10	10	8	10	5	5
	R		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	2	-	-	-
Locomotor	-		-	5	4	7	7	3	2	-	2	2	2	4	-	3	1	2	1	-	5	2	4	1	1	1
Chewing/licking	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	3	1	2	-	-
Home cage observations (observed after handling)																										
Tremor	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chewing/licking	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3	-	-	-
Responses to handling																										
Behavior while removing from cage	2		1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3	4	4	4	2	1
Handling behavior	2		1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	6	6	5	2	1
Salivation	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Chewing/licking	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Observed at the outside of home cage																										
Posture	O		10	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	5	5
Exploration	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grooming	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Tremor	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-
Urination (frequency/30sec.)	1		2	2	1	-	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	4	3	2	1	1	-	1
	2		1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Defecation (frequency/30sec.)	1		-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Touch response	6		-	-	1	1	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	2	9	8	9	4	4
Chewing/licking	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
Others[a)]			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	1	-	-

Pre., during the acclimatizing period
D1-D4, in the week of the dosing period
R1,R2, in the week of the recovery period

Parameter, number of animals showed the signs

Posture: O, sitting or standing position; R, rearing
Locomotor: -, not determined due to the usual sleep
Chewing/licking: 4, observed
Tremor: 2, observed on part of the body (included in the action tremor)
Behavior while removing form cage: 2, normal behavior with vocalization

Handling behavior: 2, normal behavior with vocalization
Salivation: 2, salivation was observed around the mouth
Exploration: 2, decreased; 6, slightly increased
Grooming: 4, sometimes observed
Touch response: 6, slightly irritable

a) When these animals were walking, these occasionally came to a stop and took a prone position for a moment, and started walking again.

Table 3-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl- in rats

Functional observations in males and females (sensory reactivity to stimuli)

	Sex	Male						Female					
	Dose (mg/kg)	0		50	200	800		0		50	200	800	
	Score Period	D4	R2	D4	D4	D4	R2	D4	R2	D4	D4	D4	R2
Number of animals		10	5	5	5	10	5	10	5	5	5	10	5
Auditory													
Startle response	4	10	5	5	5	10	5	10	5	5	5	9	5
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Visual													
Visual placing	4	10		5	5	10		10		5	5	10	
Pupillary light reflex													
Direct Right	4	10		5	5	10		10		5	5	10	
Left	4	10		5	5	10		10		5	5	10	
Indirect Right	4	10		5	5	10		10		5	5	10	
Left	4	10		5	5	10		10		5	5	10	
Proprioceptive stimuli													
Righting reflex	4	10		5	5	10		10		5	5	10	

Parameter, number of animals showed the signs

D4, in the 4th week of the dosing period
R2, in the 2nd week of the recovery period

Score 4, normal score
Score 6, slightly increased

Table 3-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl- in rats

Functional observations in individual males and females (assessment of grip strength)

Sex	Dose (mg/kg)	Initial number of animals [a)]	In the 4th week of the dosing period		In the 2nd week of the recovery period	
			Forelimb	Hindlimb	Forelimb	Hindlimb
Male	0	10	1.078 ±0.107	0.236 ±0.035	1.058 ±0.107	0.369 ±0.251
	50	5	1.143 ±0.059	0.185 ±0.029		
	200	5	1.191 * ±0.091	0.187 ±0.048		
	800	10	1.178 * ±0.029	0.214 ±0.054	1.137 ±0.089	0.235 ±0.052
Female	0	10	0.746 ±0.127	0.139 ±0.024	0.981 ±0.094	0.206 ±0.044
	50	5	0.926 * ±0.083	0.161 ±0.012		
	200	5	0.940 * ±0.171	0.211 ±0.075		
	800	10	0.705 ±0.086	0.169 ±0.079	0.987 ±0.053	0.208 ±0.051

Parameter, grip strength (kgf)
*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
a) The recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 800 mg/kg groups.

Table 3-3-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine,4-ethyl- in rats

Functional observations in males(motor activity)

Time[a)]	In the 4th week of the dosing period				In the 2nd week of the recovery period	
(min)	0	50	200	800	0	800
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Ambulation (counts/30min)						
0-30	4634 ±845	4384 ±534	4464 ±1487	4501 ±1033	4053 ±481	4738 ±834
30-60	1404 ±926	1651 ±787	1463 ±1505	2032 ±1247	1554 ±935	1380 ±939
60-90	508 ±459	539 ±742	1435 ±827	1163 ±1075	1765 ±1051	201 ±189*
90-120	441 ±983	389 ±495	836 ±1259	900 ±796	670 ±854	130 ±183
120-150	251 ±523	326 ±475	315 ±322	589 ±624	140 ±107	141 ±103
150-180	310 ±667	97 ±103	114 ±40	720 ±961	157 ±168	292 ±320
180-210	322 ±377	134 ±82	117 ±18	583 ±698	527 ±997	183 ±199
210-240	479 ±767	144 ±106	417 ±598	883 ±878	106 ±72	385 ±420
240-270	649 ±1101	182 ±99	1648 ±976*	531 ±677	334 ±298	211 ±110
270-300	332 ±400	607 ±707	691 ±675	600 ±717	1500 ±1434	462 ±527
300-330	1025 ±1224	922 ±847	111 ±64	598 ±597	731 ±1032	728 ±567
330-360	482 ±566	73 ±36	810 ±1200	697 ±1094	625 ±749	492 ±658
Rearing (counts/30min)						
0-30	68 ±22	85 ±23	75 ±60	81 ±33	52 ±22	97 ±34*
30-60	11 ±8	21 ±16	14 ±23	18 ±20	16 ±13	23 ±18
60-90	4 ±4	2 ±5	13 ±12	7 ±9	19 ±6	0 ±1**
90-120	5 ±12	2 ±3	4 ±6	3 ±5	4 ±7	1 ±3
120-150	1 ±4	2 ±4	0 ±0	2 ±4	0 ±1	0 ±1
150-180	3 ±8	0 ±0	0 ±0	6 ±9	0 ±0	5 ±10
180-210	2 ±4	0 ±0	0 ±0	2 ±4	4 ±10	1 ±2
210-240	3 ±7	0 ±0	6 ±10	6 ±11	0 ±0	4 ±7
240-270	7 ±16	2 ±2	19 ±10*	1 ±2	2 ±3	0 ±0
270-300	1 ±3	9 ±12	4 ±7	1 ±3	16 ±18	3 ±4
300-330	12 ±20	8 ±11	0 ±0	6 ±11	8 ±16	6 ±6
330-360	2 ±5	0 ±0	5 ±7	3 ±7	2 ±4	7 ±13

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$ **, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

a) These counts of each animal were started immediately after dosing(=time 0).

Table 3-3-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine,4-ethyl- in rats

Functional observations in females(motor activity)

Time[a)]	In the 4th week of the dosing period				In the 2nd week of the recovery period	
(min)	0	50	200	800	0	800
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Ambulation (counts/30min)						
0-30	5361 ±751	4384 ±482	4921 ±787	5082 ±704	4728 ±1256	4933 ±868
30-60	2815 ±1169	2420 ±533	3025 ±708	2606 ±1176	2566 ±971	1708 ±1042
60-90	2130 ±1476	1532 ±1226	1807 ±1499	1479 ±1267	1380 ±1216	1832 ±1321
90-120	840 ±1044	1250 ±494	1955 ±1245	1256 ±903	803 ±794	767 ±734
120-150	444 ±953	939 ±1140	1811 ±1368	937 ±923	329 ±361	833 ±721
150-180	463 ±658	359 ±494	949 ±1237	920 ±874	443 ±582	447 ±741
180-210	257 ±573	150 ±114	290 ±306	399 ±431	1188 ±1356	538 ±882
210-240	385 ±974	407 ±722	756 ±881	1225 ±1016	657 ±678	1242 ±663
240-270	724 ±831	354 ±410	86 ±49	1160 ±1305	642 ±1210	171 ±64
270-300	368 ±826	575 ±790	329 ±235	818 ±555	522 ±635	1103 ±939
300-330	383 ±833	332 ±328	550 ±1041	967 ±742	89 ±38	189 ±106
330-360	866 ±1149	681 ±739	371 ±408	1079 ±1148	50 ±46	1988 ±1313*
Rearing (counts/30min)						
0-30	115 ±25	88 ±26	91 ±40	68 ±29**	85 ±45	82 ±26
30-60	36 ±23	26 ±10	41 ±17	19 ±18	33 ±17	16 ±11
60-90	24 ±22	12 ±12	25 ±30	9 ±14	16 ±22	17 ±17
90-120	8 ±16	13 ±16	25 ±17	9 ±10	13 ±22	8 ±12
120-150	2 ±5	8 ±13	16 ±25	6 ±6	4 ±7	6 ±6
150-180	3 ±5	1 ±2	7 ±9	7 ±11	5 ±11	5 ±10
180-210	2 ±7	1 ±2	1 ±3	2 ±2	16 ±25	6 ±12
210-240	2 ±5	6 ±14	12 ±19	9 ±9	5 ±5	12 ±11
240-270	11 ±18	4 ±6	0 ±0	8 ±9	3 ±7	1 ±1
270-300	4 ±11	8 ±11	0 ±0	5 ±7	6 ±9	4 ±4
300-330	3 ±9	2 ±4	8 ±18	5 ±6	0 ±0	0 ±1
330-360	7 ±9	7 ±9	3 ±8	3 ±4	0 ±0	14 ±13

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$ **, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

a) These counts of each animal were started immediately after dosing(=time 0).

Table 4-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Body weight changes in males

Dose (mg/kg)	Number of animals	Day of the dosing period									
		1	2	4	8	11	15	18	22	25	28
0	10	149.0 ±3.8	159.9 ±4.8	177.4 ±6.6	216.5 ±10.5	243.6 ±13.1	280.9 ±15.9	308.9 ±18.2	349.6 ±21.1	366.0 ±22.0	390.1 ±25.0
50	5	148.3 ±5.4	159.1 ±6.6	176.1 ±9.8	212.9 ±18.4	235.5 ±22.5	271.7 ±27.1	299.3 ±34.1	339.6 ±39.7	358.3 ±49.6	377.6 ±52.4
200	5	146.9 ±4.6	155.0 ±3.9	171.0 ±7.2	206.2 ±15.1	229.7 ±20.0	265.7 ±28.6	291.4 ±36.6	326.3 ±45.5	341.5 ±52.1	362.4 ±53.1
800	10	148.3 ±3.4	153.5 * ±3.3	160.8 ** ±6.2	194.1 ** ±9.6	215.2 ** ±11.4	244.1 ** ±15.6	259.4 ** ±15.0	286.8 ** ±17.5	295.5 ** ±23.6	314.1 ** ±25.5

Dose (mg/kg)	Number of animals	Day of the recovery period				
		1	4	8	11	14
0	5	392.2 ±38.7	412.5 ±37.0	445.5 ±41.9	455.9 ±40.3	468.5 ±41.1
800	5	321.9 * ±32.4	340.5 * ±34.4	366.7 * ±36.1	385.1 * ±34.3	396.7 * ±33.1

Parameter, mean(g)±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 4-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Body weight changes in females

Dose (mg/kg)	Number of animals	Day of the dosing period									
		1	2	4	8	11	15	18	22	25	28
0	10	127.1 ±4.0	134.4 ±5.3	145.7 ±5.8	164.8 ±9.5	176.1 ±12.7	190.5 ±14.6	201.7 ±18.0	217.5 ±20.7	225.2 ±20.7	233.7 ±21.0
50	5	129.1 ±4.3	137.0 ±4.9	147.9 ±5.0	167.1 ±4.9	179.1 ±6.2	192.5 ±9.6	202.8 ±11.0	217.1 ±13.5	224.8 ±16.8	238.2 ±18.4
200	5	127.0 ±4.1	134.0 ±4.6	145.2 ±4.3	163.4 ±2.3	175.6 ±2.2	189.8 ±2.0	202.0 ±5.1	216.4 ±5.6	221.3 ±6.6	229.3 ±9.2
800	10	125.6 ±3.7	129.4 ±4.4	134.6 ** ±5.2	152.7 * ±6.2	162.0 * ±6.7	177.6 ±7.6	187.4 ±9.3	200.6 ±13.0	206.7 ±14.0	214.1 * ±13.0

Dose (mg/kg)	Number of animals	Day of the recovery period				
		1	4	8	11	14
0	5	244.1 ±25.1	257.8 ±26.2	274.0 ±29.0	276.2 ±31.4	282.6 ±28.2
800	5	216.3 ±8.7	222.3 * ±6.8	232.6 * ±12.5	237.8 * ±12.8	242.4 * ±12.4

Parameter, mean(g)±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 4-3
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Gain in body weight in males

Dose (mg/kg)	Number of animals	Days of the dosing period								
		1-2	2-4	4-8	8-11	11-15	15-18	18-22	22-25	25-28
0	10	10.9 ±1.4	8.8 ±1.3	9.8 ±1.1	9.0 ±1.0	9.3 ±0.8	9.3 ±0.9	10.2 ±0.9	5.5 ±2.5	8.0 ±1.6
50	5	10.8 ±1.8	8.5 ±1.7	9.2 ±2.2	7.5 ±1.5	9.0 ±1.3	9.2 ±2.5	10.1 ±1.5	6.2 ±3.3	6.4 ±1.2
200	5	8.1 ±1.9	8.0 ±1.8	8.8 ±2.1	7.9 ±1.6	9.0 ±2.2	8.6 ±2.8	8.7 ±2.3	5.1 ±3.1	6.9 ±1.8
800	10	5.2 ** ±2.7	3.7 ** ±2.2	8.3 ±1.2	7.0 ** ±1.3	7.3 ** ±1.5	5.1 ** ±6.3	6.9 ** ±3.7	2.9 ±2.9	6.2 ±2.0

Dose (mg/kg)	Number of animals	Days of the recovery period			
		1-4	4-8	8-11	11-14
0	5	6.8 ±1.7	8.3 ±1.5	3.4 ±3.5	4.2 ±1.6
800	5	6.2 ±0.7	6.6 ±0.8	6.1 ±1.0	3.8 ±0.8

Parameter, mean(g/day)±S.D.

**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 4-4
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Gain in body weight in females

Dose (mg/kg)	Number of animals	Days of the dosing period								
		1-2	2-4	4-8	8-11	11-15	15-18	18-22	22-25	25-28
0	10	7.3 ±2.0	5.7 ±1.5	4.8 ±1.3	3.8 ±1.7	3.6 ±0.7	3.8 ±1.7	4.0 ±1.0	2.6 ±2.0	2.8 ±1.9
50	5	7.9 ±1.7	5.4 ±2.1	4.8 ±0.9	4.0 ±0.7	3.3 ±0.8	3.5 ±0.6	3.6 ±1.1	2.6 ±1.2	4.4 ±1.4
200	5	7.0 ±1.4	5.7 ±1.2	4.5 ±0.6	4.1 ±0.6	3.6 ±0.8	4.0 ±1.6	3.6 ±1.3	1.6 ±1.2	2.7 ±1.2
800	10	3.8 ** ±2.4	2.7 ** ±0.9	4.5 ±1.0	3.1 ±0.5	3.9 ±0.5	3.3 ±1.1	3.3 ±1.4	2.1 ±1.9	2.5 ±1.4

Dose (mg/kg)	Number of animals	Days of the recovery period			
		1-4	4-8	8-11	11-14
0	5	4.6 ±2.1	4.0 ±1.0	0.7 ±2.0	2.1 ±2.6
800	5	2.0 * ±1.3	2.6 ±1.7	1.8 ±1.8	1.5 ±1.4

Parameter, mean(g/day)±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 5
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Food consumption in males and females

Sex	Dose (mg/kg)	Initial number of animals [a)]	Day of the dosing period				Day of the recovery period	
			1	8	15	22	1	8
Male	0	10	23.3 ±1.8	27.4 ±2.4	30.3 ±2.6	32.8 ±2.6	35.0 ±3.0	35.2 ±3.8
	50	5	22.1 ±1.9	25.3 ±3.1	29.7 ±4.2	30.5 ±5.5		
	200	5	20.9 ±1.6	24.8 ±2.8	27.2 ±4.4	30.1 ±6.8		
	800	10	17.9 ** ±1.7	22.9 ** ±2.7	22.8 ** ±7.0	26.6 * ±4.2	28.2 ** ±2.8	31.4 ±1.9
Female	0	10	19.2 ±1.8	20.7 ±2.3	21.2 ±1.9	21.8 ±3.9	23.6 ±5.5	23.2 ±4.6
	50	5	19.6 ±0.7	18.7 ±1.6	21.5 ±2.3	22.1 ±3.1		
	200	5	18.0 ±0.9	20.7 ±2.4	20.1 ±3.5	20.7 ±1.5		
	800	10	15.2 ** ±1.7	18.1 * ±1.3	19.3 ±2.1	18.5 ±2.3	20.2 ±1.0	20.3 ±3.1

Parameter, mean(g)±S.D.
*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$
a) The recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 800 mg/kg groups.

Table 6-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Urinalysis in males and females on day 23 of the dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Urinary volume (mL/24hr)	Specific gravity	pH	Color		Turbidity	Protein				Glucose	Ketone			Bilirubin	Occult blood	Urobilinogen	
						ly	y	-	-	±	+	++	-	-	±	+	-	-	±	+
Male	0	10	23.1±6.1	1.044±0.013	8.2±0.5	10	0	10	0	0	10	0	10	6	4	0	10	10	9	1
	50	5	21.7±5.2	1.047±0.007	7.7±0.6	5	0	5	0	1	4	0	5	4	1	0	5	5	5	0
	200	5	21.9±8.1	1.045±0.010	7.7±0.5	5	0	5	0	1	3	1	5	5	0	0	5	5	5	0
	800	10	22.0±7.5	1.040±0.012	8.5±0.4	10	0	10	2	4	4	0 *	10	5	3	2	10	10	10	0
Female	0	10	12.4±4.3	1.047±0.010	7.7±0.8	10	0	10	7	2	1	0	10	9	1	0	10	10	10	0
	50	5	14.1±5.1	1.042±0.021	7.7±0.5	5	0	5	3	2	0	0	5	5	0	0	5	5	5	0
	200	5	9.9±2.4	1.049±0.017	7.8±0.6	5	0	5	5	0	0	0	5	4	1	0	5	5	4	1
	800	10	17.6±8.9	1.030±0.013*	7.6±0.6	9	1	10	9	1	0	0	10	4	5	1 *	10	10	6	4 *

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment							Concentration (mEq/L)			Total excretion (mEq/day)			Na/K
			Red blood cells	Crystal		Cast	White blood cells	Epithelial cells		Na	K	Cl	Na	K	Cl	
			-	-	±	-	-	-	±							
Male	0	10	10	0	10	10	10	10	0	94.8±39.1	184.4±51.4	107.8±47.4	2.08±0.73	4.09±0.96	2.38±0.87	0.49±0.09
	50	5	5	0	5	5	5	5	0	110.3±13.6	210.8±28.3	132.7±20.5	2.36±0.43	4.50±0.74	2.84±0.56	0.52±0.01
	200	5	5	0	5	5	5	5	0	117.7±34.7	212.5±37.5	139.6±34.7	2.39±0.40	4.43±0.93	2.84±0.38	0.55±0.10
	800	10	10	0	10	10	10	9	1	103.1±40.0	168.0±44.2	106.3±36.2	2.08±0.58	3.50±0.97	2.23±0.79	0.60±0.14
Female	0	10	10	2	8	10	10	10	0	123.0±22.3	227.1±55.6	136.3±33.4	1.54±0.56	2.72±0.78	1.69±0.65	0.55±0.09
	50	5	5	0	5	5	5	5	0	118.7±80.6	220.2±108.0	123.6±80.3	1.35±0.39	2.67±0.24	1.42±0.44	0.51±0.13
	200	5	5	0	5	5	5	5	0	131.4±83.0	230.4±112.8	141.8±87.9	1.26±0.75	2.17±0.89	1.37±0.78	0.54±0.15
	800	10	10	2	8	10	10	7	3	70.3±40.4	136.9±51.5*	78.5±37.2*	1.05±0.43	2.10±0.67	1.19±0.42	0.48±0.14

Color: ly, light yellow; y, yellow
Turbidity, glucose, bilirubin and occult blood: -, negative
Protein, ketone: -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate

Red blood cells, cast and white blood cells (count/3 visual field): -, not observed
Crystal and epithelial cells: -, not observed; ±, a few
*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$

Table 6-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Urinalysis in males and females on day 9 of the recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Urinary volume (mL/24hr)	Specific gravity	pH	Color	Turbidity	Protein				Glucose	Ketone			Bilirubin	Occult blood	Urobilinogen	
						ly	-	-	±	+	++	-	-	±	+	-	-	±	+
Male	0	5	27.9±8.5	1.037±0.013	7.2±0.4	5	5	0	0	3	2	5	0	3	2	5	5	5	0
	800	5	20.7±9.4	1.054±0.014	7.0±0.3	5	5	0	0	4	1	5	1	3	1	5	5	5	0
Female	0	5	18.4±10.0	1.051±0.019	7.0±0.6	5	5	3	1	0	1	5	5	0	0	5	5	5	0
	800	5	18.8±8.0	1.041±0.013	6.9±0.8	5	5	3	2	0	0	5	5	0	0	5	5	4	1

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment							Concentration (mEq/L)			Total excretion (mEq/day)			Na/K
			Red blood cells	Crystal		Cast	White blood cells	Epithelial cells		Na	K	Cl	Na	K	Cl	
			-	-	±	-	-	-	±							
Male	0	5	5	0	5	5	5	5	0	81.7±43.4	150.9±61.0	94.2±60.2	2.11±0.99	3.96±1.40	2.41±1.40	0.51±0.10
	800	5	5	0	5	5	5	5	0	140.4±40.7	220.3±54.7	169.2±51.2	2.61±0.15	4.16±0.50	3.13±0.13	0.63±0.06*
Female	0	5	5	2	3	5	5	5	0	135.3±65.7	227.9±100.7	149.4±68.6	2.00±0.33	3.44±0.56	2.24±0.32	0.58±0.06
	800	5	5	0	5	5	5	4	1	112.8±35.4	190.0±43.5	134.7±43.3	1.91±0.29	3.30±0.62	2.28±0.33	0.59±0.06

Color: ly, light yellow
Turbidity, glucose, bilirubin and occult blood: -, negative
Protein, ketone: -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate

Red blood cells, cast and white blood cells (count/3 visual field): -, not observed
Crystal and epithelial cells: -, not observed; ±, a few
*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$

Table 7-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Hematological findings in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	RBC ($x10^4/\mu L$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet ($x10^4/\mu L$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	5	730 ±22	14.5 ±0.5	43.7 ±2.0	59.8 ±1.1	19.8 ±0.4	33.1 ±0.5	112.7 ±6.2	22.6 ±3.1	24.3 ±2.1
50	4	759 ±19	15.2 ±0.2	45.8 ±0.3	60.3 ±1.4	20.1 ±0.5	33.3 ±0.2	104.3 ±10.9	18.1 ** ±1.9	23.4 ±0.6
200	4	749 ±61	14.8 ±1.0	44.6 ±3.1	59.6 ±2.4	19.8 ±0.8	33.1 ±0.8	107.1 ±20.0	15.7 ** ±1.2	23.3 ±1.6
800	5	770 ±50	14.5 ±0.8	43.8 ±2.2	57.0 ±1.5	18.9 ±0.3	33.2 ±0.4	118.9 ±5.4	13.6 ** ±1.3	19.8 ** ±1.0

Dose (mg/kg)	Number of animals	WBC ($x100/\mu L$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	5	109.7 ±31.0	6 ±1	1 ±0	0 ±0	3 ±1	90 ±1
50	4	101.2 ±12.5	6 ±2	1 ±0	0 ±0	3 ±1	91 ±2
200	4	90.0 ±21.8	9 ±3	1 ±0	0 ±0	5 ±3	86 ±5
800	5	100.3 ±11.6	8 ±3	0 ±1	0 ±0	3 ±2	88 ±5

Parameter, mean ±S.D.

**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 7-1-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Hematological findings in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	RBC ($x10^4/\mu L$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet ($x10^4/\mu L$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	5	725 ±39	14.4 ±0.4	43.0 ±1.2	59.4 ±2.6	19.9 ±0.7	33.6 ±0.3	100.4 ±12.3	14.1 ±0.8	19.1 ±1.2
50	5	727 ±26	14.4 ±0.3	42.7 ±0.6	58.8 ±1.4	19.8 ±0.3	33.7 ±0.4	97.3 ±6.2	12.9 * ±0.6	19.4 ±1.7
200	5	736 ±20	14.5 ±0.4	43.1 ±1.6	58.5 ±1.4	19.7 ±0.4	33.7 ±0.2	104.0 ±7.9	14.2 ±0.6	19.0 ±0.9
800	5	737 ±18	14.3 ±0.2	43.0 ±0.7	58.3 ±1.3	19.4 ±0.6	33.3 ±0.2	115.3 * ±7.4	13.2 ±0.5	18.4 ±1.0

Dose (mg/kg)	Number of animals	WBC ($x100/\mu L$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	5	61.2 ±16.0	6 ±2	2 ±1	0 ±0	2 ±1	90 ±3
50	5	75.6 ±45.3	6 ±3	1 ±0	0 ±0	2 ±1	91 ±3
200	5	53.1 ±2.8	6 ±2	2 ±1	0 ±0	4 ±2	88 ±2
800	5	59.1 ±13.5	12 * ±5	0 ** ±0	0 ±0	5 * ±2	83 * ±6

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 7-2-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Hematological findings in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	RBC ($x10^4/\mu L$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet ($x10^4/\mu L$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	5	799 ±32	15.5 ±0.5	46.0 ±1.8	57.6 ±1.2	19.3 ±0.4	33.6 ±0.4	104.5 ±20.7	16.6 ±2.3	24.4 ±1.9
800	5	794 ±10	15.1 ±0.1	44.9 ±0.8	56.5 ±1.3	19.0 ±0.3	33.6 ±0.5	107.5 ±7.3	17.4 ±2.6	25.0 ±1.1

Dose (mg/kg)	Number of animals	WBC ($x100/\mu L$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	5	115.1 ±20.2	6 ±2	1 ±0	0 ±0	3 ±1	89 ±2
800	5	92.3 ±13.1	8 ±2	1 ±0	0 ±0	3 ±1	88 ±2

Parameter, mean ±S.D.

Table 7-2-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Hematological findings in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	RBC ($x10^4/\mu L$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet ($x10^4/\mu L$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	5	766 ±19	14.8 ±0.3	43.5 ±0.9	56.9 ±2.2	19.3 ±0.8	34.0 ±0.1	97.0 ±11.0	12.5 ±0.2	18.7 ±0.5
800	5	751 ±19	14.2 * ±0.4	42.4 ±1.4	56.5 ±1.8	19.0 ±0.4	33.6 ±0.4	112.8 * ±8.6	13.1 ±0.6	18.9 ±0.9

Dose (mg/kg)	Number of animals	WBC ($x100/\mu L$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	5	53.1 ±14.8	9 ±3	2 ±1	0 ±0	3 ±0	86 ±3
800	5	54.9 ±13.5	8 ±3	2 ±0	0 ±0	3 ±2	87 ±4

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$

Table 8-1-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Biochemical findings in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	5	5.2 ±0.3	2.9 ±0.1	1.28 ±0.13	14 ±1	0.6 ±0.1	142 ±18	42 ±6	30 ±12	0.07 ±0.03
50	5	5.3 ±0.3	3.1 ±0.1	1.41 ±0.18	15 ±2	0.7 ±0.1	142 ±27	41 ±9	29 ±15	0.06 ±0.03
200	5	5.2 ±0.2	2.9 ±0.1	1.28 ±0.12	14 ±2	0.7 ±0.1	128 ±23	40 ±3	25 ±11	0.08 ±0.03
800	5	4.8 ±0.3	2.6 * ±0.2	1.20 ±0.08	19 ** ±2	0.6 ±0.0	134 ±11	42 ±6	29 ±11	0.07 ±0.01

Dose (mg/kg)	Number of animals	Inorganic phosphorus (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ -GTP (U/L)
0	5	8.1 ±0.2	8.9 ±0.2	146.1 ±0.6	3.93 ±0.11	107.5 ±1.0	531 ±155	32 ±4	73 ±8	1 ±1
50	5	8.5 ±0.5	9.1 ±0.2	144.9 ±0.3	4.20 ±0.27	107.2 ±1.9	485 ±48	31 ±7	72 ±11	1 ±0
200	5	8.5 ±0.6	9.0 ±0.1	144.8 ±0.8	4.03 ±0.33	106.8 ±1.3	484 ±64	32 ±2	73 ±8	1 ±0
800	5	9.9 ** ±0.9	9.5 * ±0.4	145.8 ±1.4	4.42 ±0.37	104.5 * ±1.9	449 ±71	25 ±4	65 ±5	1 ±1

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 8-1-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Biochemical findings in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	5	4.9 ±0.2	2.9 ±0.2	1.48 ±0.14	20 ±2	0.6 ±0.0	100 ±7	42 ±9	10 ±3	0.10 ±0.02
50	5	4.9 ±0.2	3.1 ±0.2	1.75 ±0.22	20 ±2	0.6 ±0.0	107 ±14	46 ±10	14 ±3	0.08 ±0.02
200	5	4.9 ±0.4	3.0 ±0.3	1.55 ±0.17	22 ±2	0.6 ±0.1	99 ±11	44 ±11	15 ±6	0.08 ±0.02
800	5	4.7 ±0.2	2.7 ±0.2	1.36 ±0.21	17 ±3	0.6 ±0.1	124 ** ±12	56 ±15	28 * ±19	0.05 ** ±0.02

Dose (mg/kg)	Number of animals	Inorganic phosphorus (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ -GTP (U/L)
0	5	7.2 ±0.5	8.6 ±0.2	145.3 ±1.6	4.02 ±0.22	110.4 ±1.2	319 ±135	22 ±2	72 ±4	1 ±0
50	5	7.4 ±0.6	8.6 ±0.1	144.9 ±0.2	4.02 ±0.22	109.8 ±0.9	318 ±50	20 ±4	62 * ±6	1 ±0
200	5	7.2 ±0.8	8.8 ±0.4	143.8 ±1.1	4.29 ±0.23	108.7 ±1.7	288 ±62	22 ±2	59 ** ±2	1 ±0
800	5	8.6 ** ±0.6	9.1 ±0.4	144.8 ±1.3	4.10 ±0.19	106.4 ** ±0.5	240 ±49	19 ±6	58 ** ±10	1 ±0

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 8-2-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Biochemical findings in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	5	5.5 ±0.1	3.0 ±0.0	1.21 ±0.08	18 ±2	0.7 ±0.2	142 ±12	42 ±11	35 ±12	0.08 ±0.02
800	5	5.3 ±0.2	3.1 ±0.1	1.42 * ±0.16	17 ±1	0.7 ±0.1	130 ±15	32 ±4	33 ±9	0.10 ±0.04

Dose (mg/kg)	Number of animals	Inorganic phosphorus (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ -GTP (U/L)
0	5	7.9 ±0.3	9.2 ±0.2	145.0 ±1.2	4.15 ±0.18	105.9 ±0.6	374 ±87	29 ±4	61 ±7	1 ±0
800	5	7.8 ±0.3	9.1 ±0.2	144.8 ±1.3	4.04 ±0.17	107.7 ±1.6	441 ±84	29 ±6	68 ±6	1 ±0

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$

Table 8-2-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Biochemical findings in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	5	5.7 ±0.1	3.5 ±0.1	1.59 ±0.12	21 ±4	0.7 ±0.1	131 ±21	54 ±7	14 ±4	0.12 ±0.02
800	5	5.4 ** ±0.1	3.3 ** ±0.1	1.50 ±0.08	21 ±2	0.7 ±0.0	104 * ±12	50 ±3	14 ±6	0.10 ±0.03

Dose (mg/kg)	Number of animals	Inorganic phosphorus (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ -GTP (U/L)
0	5	6.4 ±0.7	9.0 ±0.2	143.4 ±0.7	4.14 ±0.17	107.5 ±0.9	176 ±23	22 ±2	63 ±9	1 ±0
800	5	6.4 ±0.8	8.9 ±0.1	144.4 * ±0.5	4.23 ±0.21	109.0 ±1.8	214 ±50	23 ±2	65 ±7	1 ±0

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 9-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Absolute organ weights in males and females at the end of the dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
Males	0	5	351.5 ±13.9	1960.1 ±68.1	638.1 ±106.8	1210.4 ±45.4	11721.3 ±573.8	2780.5 ±207.7	751.2 ±115.5	52.3 ±3.7	3051.1 ±78.3	623.1 ±26.0
	50	5	334.6 ±49.1	1883.5 ±62.5	539.9 ±150.4	1169.4 ±203.9	11637.3 ±2050.0	2952.3 ±430.8	765.9 ±217.2	48.1 ±3.1	2855.3 ±182.0	624.6 ±58.0
	200	5	325.7 ±49.4	1980.9 ±84.3	588.1 ±201.2	1128.7 ±196.8	11127.8 ±1548.0	2933.7 ±485.5	883.9 ±266.8	45.3 ±4.4	3053.7 ±216.1	645.6 ±42.5
	800	5	274.8 ±17.6	1851.1 ±91.7	486.3 ±145.6	992.0 ±104.6	10504.4 ±1362.5	2722.3 ±315.9	572.1 ±80.6	59.7 ±9.6	2875.5 ±98.1	552.9 * ±34.5

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
Females	0	5	199.7 ±14.8	1794.3 ±98.8	459.3 ±125.5	740.6 ±63.7	6530.2 ±739.0	1830.5 ±195.4	485.7 ±70.5	61.2 ±4.1	78.2 ±15.1
	50	5	215.5 ±16.6	1803.3 ±48.4	529.7 ±139.8	839.8 ±58.4	7301.1 ±257.1	2088.6 ±151.8	530.1 ±88.2	58.0 ±4.9	98.1 * ±9.5
	200	5	211.2 ±8.5	1804.9 ±43.7	459.3 ±50.1	766.5 ±33.9	6871.6 ±337.8	2100.3 ±208.9	483.2 ±65.1	61.4 ±5.5	81.1 ±5.6
	800	5	195.5 ±13.9	1687.5 * ±47.3	349.4 ±30.7	695.4 ±86.5	8352.7 ** ±1026.2	2108.5 ±201.5	404.8 ±53.3	62.9 ±11.6	78.3 ±6.0

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$

**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 9-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Absolute organ weights in males and females at the end of the recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
Males	0	5	432.6 ±39.0	2063.3 ±81.0	570.7 ±57.1	1472.1 ±141.2	13402.6 ±1205.8	3159.9 ±303.1	823.7 ±109.3	63.4 ±7.1	3555.5 ±186.9	973.3 ±90.8
	800	5	360.8 * ±32.3	1971.1 ±52.9	504.6 ±98.7	1164.1 ** ±118.1	11036.3 * ±1316.9	2833.7 ±153.3	724.2 ±108.8	60.4 ±12.2	3257.3 ±281.6	933.6 ±72.9

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
Females	0	5	257.7 ±25.9	1823.7 ±65.2	475.7 ±155.8	920.5 ±102.3	7974.4 ±1085.9	2071.0 ±226.0	498.4 ±98.9	71.6 ±7.2	87.7 ±24.8
	800	5	224.2 * ±9.6	1819.1 ±17.4	467.8 ±32.5	820.8 ±70.6	7002.2 ±808.1	1906.7 ±203.4	505.3 ±97.3	64.3 ±11.3	87.4 ±10.0

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 10-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Relative organ weights in males and females at the end of the dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
Males	0	5	351.5 ±13.9	5.585 ±0.307	1.816 ±0.293	3.449 ±0.208	33.358 ±1.217	7.912 ±0.521	2.148 ±0.409	0.149 ±0.011	8.695 ±0.486	1.773 ±0.040
	50	5	334.6 ±49.1	5.725 ±0.864	1.613 ±0.431	3.489 ±0.253	34.680 ±1.292	8.828 ±0.367	2.282 ±0.492	0.147 ±0.025	8.661 ±1.252	1.888 ±0.244
	200	5	325.7 ±49.4	6.177 ±0.802	1.790 ±0.497	3.458 ±0.198	34.267 ±1.981	9.011 ±0.737	2.681 ±0.530	0.141 ±0.022	9.481 ±0.910	2.020 ±0.338
	800	5	274.8 ±17.6	6.754 * ±0.482	1.801 ±0.653	3.608 ±0.286	38.166 ** ±3.585	9.904 ** ±0.902	2.087 ±0.308	0.218 ** ±0.036	10.489 * ±0.584	2.013 ±0.070

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
Females	0	5	199.7 ±14.8	9.024 ±0.835	2.275 ±0.434	3.706 ±0.074	32.643 ±1.654	9.161 ±0.613	2.427 ±0.239	0.308 ±0.037	0.390 ±0.047
	50	5	215.5 ±16.6	8.404 ±0.608	2.452 ±0.555	3.914 ±0.375	33.982 ±1.644	9.710 ±0.560	2.451 ±0.281	0.270 ±0.024	0.455 * ±0.022
	200	5	211.2 ±8.5	8.562 ±0.522	2.173 ±0.203	3.632 ±0.183	32.535 ±0.879	9.948 ±0.953	2.286 ±0.278	0.291 ±0.026	0.384 ±0.022
	800	5	195.5 ±13.9	8.677 ±0.826	1.796 ±0.224	3.549 ±0.290	42.613 ** ±2.687	10.786 ** ±0.715	2.070 ±0.230	0.322 ±0.055	0.401 ±0.029

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$
**, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 10-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Relative organ weights in males and females at the end of the recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
Males	0	5	432.6 ±39.0	4.792 ±0.352	1.335 ±0.231	3.404 ±0.173	31.045 ±2.315	7.319 ±0.602	1.899 ±0.104	0.148 ±0.027	8.297 ±1.121	2.262 ±0.273
	800	5	360.8 * ±32.3	5.504 * ±0.584	1.403 ±0.269	3.232 ±0.250	30.542 ±1.566	7.884 ±0.507	2.013 ±0.301	0.166 ±0.022	9.097 ±1.293	2.596 ±0.207

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
Females	0	5	257.7 ±25.9	7.121 ±0.598	1.820 ±0.474	3.573 ±0.214	30.878 ±1.683	8.035 ±0.323	1.927 ±0.279	0.279 ±0.034	0.336 ±0.065
	800	5	224.2 * ±9.6	8.126 * ±0.381	2.090 ±0.181	3.663 ±0.316	31.261 ±3.735	8.499 ±0.798	2.252 ±0.399	0.286 ±0.040	0.391 ±0.051

Parameter, mean ±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, $p<0.05$

Table 11-1-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Macroscopical findings in males at the end of the dosing period

Dose	0 mg/kg		50 mg/kg		200 mg/kg		800 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dilatation, pelvis, unilateral	4	1	5	0	5	0	5	0

-, negative; +, positive.

[ ], number of animals examined.

No significant changes were observed in organs unless otherwise described above.

Table 11-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Macroscopical findings in females at the end of the dosing period

Dose	0 mg/kg			50 mg/kg			200 mg/kg			800 mg/kg		
Grade		-	+		-	+		-	+		-	+
(Jejunum)	[5]			[5]			[5]			[5]		
Discoloration, red, mucosa		4	1		5	0		5	0		5	0
(Ileum)	[5]			[5]			[5]			[5]		
Discoloration, red, mucosa		4	1		5	0		5	0		5	0

-, negative; +, positive.

[ ], number of animals examined.

No significant changes were observed in organs unless otherwise described above.

Table 11-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Macroscopical findings in individual males at the end of the recovery period

Dose	0 mg/kg		800 mg/kg	
Grade	-	+	-	+
(All organs)	[5]		[5]	
No abnormalities				

-, negative; +, positive.

[ ], number of animals examined.

Table 11-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Macroscopical findings in individual males at the end of the recovery period

Dose	0 mg/kg		800 mg/kg	
Grade	-	+	-	+
(All organs)	[5]		[5]	
No abnormalities				

-, negative; +, positive.

[ ], number of animals examined.

Table 12-1-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Histological findings in males at the end of the dosing period

Dose	0 mg/kg						50 mg/kg						200 mg/kg						800 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Fatty change, periportal	0	3	2	0	0	5	0	3	2	0	0	5	1	2	2	0	0	4	0	5	0	0	0	5
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Single cell necrosis	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0
Hematopoiesis, extramedullary	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
(Kidney)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Vacuolation, epithelium, distal tubule	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3
Basophilic tubule	2	3	0	0	0	3	1	4	0	0	0	4	3	2	0	0	0	2	2	3	0	0	0	3
Cellular infiltration, lymphocyte	3	2	0	0	0	2	3	2	0	0	0	2	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1
Cast, proteinous	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Cyst, cortex	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Dilatation, pelvis, unilateral	4	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Mineralization, cortico-medullary junction	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
(Spleen)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	3	2	0	5	0	0	3	0	2	5	0	0	1	3	1	5	0	0	1	4	0	5
Deposit, hemosiderin	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	4	1	0	0	5	0	4	1	0	0	5
(Heart)	[5]																		[5]					
Myocardial degeneration/fibrosis	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
(Prostate)	[5]																		[5]					
Cellular infiltration, lymphocyte	2	3	0	0	0	3													2	3	0	0	0	3
(Lung & Bronchus)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Adrenal gland)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Stomach)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Ileum)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Colon)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Mesenteric lymphnode)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Submandibular lymphnode)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Thymus)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Trachea)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Brain)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Spinal cord)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Sciatic nerve & Gastrocnemial muscle)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Thyroid gland)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Testis)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Epididymis)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Urinary bladder)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Bone & marrow of femur)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.
[ ], number of animals examined.

Table 12-1-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Histological findings in females at the end of the dosing period

Dose	0 mg/kg							50 mg/kg							200 mg/kg							800 mg/kg						
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]							[5]							[5]							[5]						
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0		1	3	1	0	0	4 #
Fatty change, periportal		0	4	1	0	0	5		0	5	0	0	0	5		0	4	1	0	0	5		0	5	0	0	0	5
Single cell necrosis		1	4	0	0	0	4		1	4	0	0	0	4		2	3	0	0	0	3		2	3	0	0	0	3
Microgranuloma		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0		4	1	0	0	0	1
(Kidney)	[5]							[5]							[5]							[5]						
Vacuolation, epithelium, distal & Henle's loop		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0		3	1	1	0	0	2
Basophilic tubule		1	4	0	0	0	4		1	4	0	0	0	4		0	4	1	0	0	5		3	1	1	0	0	2
Cellular infiltration, lymphocyte		3	2	0	0	0	2		4	1	0	0	0	1		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0
Mineralization, cortico-medullary junction		3	2	0	0	0	2		2	3	0	0	0	3		1	4	0	0	0	4		5	0	0	0	0	0
(Spleen)	[5]							[5]							[5]							[5]						
Hematopoiesis, extramedullary		2	3	0	0	0	3		3	2	0	0	0	2		2	3	0	0	0	3		2	2	1	0	0	3
Deposit, hemosiderin		0	4	1	0	0	5		0	5	0	0	0	5		0	5	0	0	0	5		0	4	1	0	0	5
(Heart)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Ovary)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Lung & Bronchus)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Adrenal gland)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Stomach)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Ileum)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Colon)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Mesenteric lymphnode)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Submandibular lymphnode)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Thymus)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Trachea)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Brain)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Spinal cord)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Sciatic nerve & Gastrocunemial muscle)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Thyroid gland)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Uterus)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Urinary bladder)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Bone & marrow of femur)	[5]																					[5]						
No abnormalities																												
(Jejunum)	[1]																											
No abnormalities																												

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.
[ ], number of animals examined.
#, significantly different from control, $p<0.05$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 12-2-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Histological findings in males at the end of the dosing period

Dose		0 mg/kg							800 mg/kg					
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]							[5]						
Fatty change, periportal		0	4	1	0	0	5		1	4	0	0	0	4
Single cell necrosis		1	4	0	0	0	4		2	3	0	0	0	3
Hematopoiesis, extramedullary		5	0	0	0	0	0		4	1	0	0	0	1
(Kidney)	[5]							[5]						
Basophilic tubule		5	0	0	0	0	0		2	3	0	0	0	3
(Spleen)	[5]							[5]						
Hematopoiesis, extramedullary		0	1	1	3	0	5		0	0	1	4	0	5
Deposit, hemosiderin		0	1	4	0	0	5		0	1	4	0	0	5

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.
[ ], number of animals examined.

Table 12-2-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of morpholine, 4-ethyl in rats

Histological findings in females at the end of the recovery period

Dose	0 mg/kg							800 mg/kg						
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]							[5]						
Fatty change, periportal		1	3	1	0	0	4		3	2	0	0	0	2
Single cell necrosis		0	5	0	0	0	5		0	4	1	0	0	5
Microgranuloma		5	0	0	0	0	0		3	2	0	0	0	2
Hematopoiesis, extramedullary		5	0	0	0	0	0		4	1	0	0	0	1
(Kidney)	[5]							[5]						
Basophilic tubule		2	2	1	0	0	3		0	5	0	0	0	5
Cellular infiltration, lymphocyte		3	2	0	0	0	2		1	4	0	0	0	4
Mineralization, cortico-medullary junction		3	1	1	0	0	2		5	0	0	0	0	0
(Spleen)	[5]							[5]						
Hematopoiesis, extramedullary		3	2	0	0	0	2		1	0	0	4	0	4
Deposit, hemosiderin		0	0	1	2	2	5		0	0	0	3	2	5

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.
[ ], number of animals examined.