最終報告書

試験名：*N*－エチル－*N*－クロトノイル－2－トルイジンのラットを用いた
2週間回復性観察を含む28日間反復経口投与毒性試験

試験番号：B-6607

試験期間：2010年3月4日-2011年6月3日

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

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

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町36-7

2. 目次

2. 目次 3

4. 要約 11
5. 緒言 13
6. 試験材料及び方法 14
6.1 被験物質及び溶媒 14
6.1.1 被験物質 14
6.1.2 溶媒 15
6.2 投与液の調製 15
6.2.1 被験液の調製 15
6.2.2 投与液の保存方法 15
6.2.3 溶媒中での安定性 15
6.2.4 被験液の濃度確認 15
6.3 試験動物種及び系統の選択理由 17
6.4 試験動物及び群分け 17
6.5 飼育条件 17
6.6 飼料及び飲料水中の混入物質 17
6.7 動物の識別及びケージへの表示 18
6.8 投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由 18
6.9 投与方法 18
6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成 18
6.11 観察及び検査の方法 19
6.11.1 一般状態の観察 19

6.11.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定 19
6.11.2.1 詳細な一般状態の観察 19
6.11.2.2 機能検査 20
6.11.2.3 握力測定 20
6.11.2.4 自発運動量の測定 20
6.11.3 体重測定 20
6.11.4 摂餌量測定 20
6.11.5 摂水量測定 20
6.11.6 尿検査 21
6.11.7 血液学検査 22
6.11.8 血液化学検査 23
6.11.9 病理学検査 23
6.11.9.1 剖検 23
6.11.9.2 器官重量測定 23
6.11.9.3 病理組織学検査 24
6.12 統計解析 24
7. 試験結果 25
7.1 一般状態 25
7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量 25
7.2.1 詳細な一般状態 25
7.2.2 機能検査 25
7.2.3 握力 26
7.2.4 自発運動量 26
7.3 体重 26
7.4 摂餌量 26
7.5 尿検査（摂水量含む） 27
7.6 血液学検査 27
7.7 血液化学検査 29
7.8 器官重量 31
7.9 剖検所見 33
7.10 病理組織学検査 34
8. 考察 36
9. 文献 39

図

Fig. 1~4	自発運動量
Fig. 5	体重
Fig. 6	摂餌量

表

Table 1-1~1-3	一般状態
Table 2-1~2-18	詳細な一般状態
Table 2-19、2-20	機能検査
Table 2-21、2-22	握力
Table 2-23、2-24	自発運動量
Table 3-1、3-2	体重
Table 4-1、4-2	摂餌量
Table 5-1~5-8	尿検査（摂水量含む）
Table 6-1~6-6	血液学検査
Table 7-1~7-4	血液化学検査
Table 8-1~8-8	器官重量
Table 9-1、9-2	剖検所見
Table 10-1~10-4	病理組織学検査

4. 要約

N－エチル－*N*－クロトノイル－2－トルイジンの 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット〔Crl:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹〕を用いて実施した。投与量は 0（コーン油：対照群）、12、60 及び 300 mg/kg/日とし、胃ゾンデを用いて 1 日 1 回強制経口投与した。また、対照群と 300 mg/kg 投与群の一部の個体（1 群雌雄各 6 匹）については投与期間終了後 2 週間の回復期間を設け、毒性変化の可逆性及を検討した。

投与期間及び回復期間を通じて死亡動物はみられず、機能検査、握力、自発運動量では被験物質投与の影響は認められなかった。

一般状態及び詳細な一般状態では、投与 2 週以降に、投与直後ないし約 2 時間後に一過性の流涎が 300 mg/kg 投与群の雌雄に散見された。

体重及び摂餌量では、300 mg/kg 投与群の雄の体重は投与 10 日以降対照群をやや下回って推移し、体重増加量も低値傾向を示した。一方、同群の雌では摂餌量の高値を伴う体重の高値が投与 10 日以降にみられ、体重増加量も高値を示した。

尿検査では、潜血陽性例、ビリルビン陽性例およびウロビリノーゲン陽性例の出現例数の増加が 300 mg/kg 投与群の雄でみられた。

血液学検査では、平均赤血球血色素濃度の低値及び網赤血球率の高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられた。また、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の低値傾向も同群の雌雄にみられた。

血液化学検査では、総コレステロール及びリン脂質の高値が 60 mg/kg 投与群の雄と 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられた。また、300 mg/kg 投与群では、ALT 及び γ-GTP の高値が雄にみられた。更に、総たん白質の高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄に、アルブミンの高値が同群の雌に、A/G 比の低値が同群の雄にみられた。

器官重量では、肝臓の絶対重量の高値傾向及び相対重量の高値が 60 mg/kg 投与群の雄に、絶対及び相対重量の高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄に、腎臓の絶対重量の高値傾向及び相対重量の高値が 300 mg/kg 投与群の雄に、絶対重量の高値及び相対重量の高値傾向が 300 mg/kg 投与群の雌に、副腎の絶対及び相対重量の低値が 300 mg/kg 投与群の雄にみられた。

剖検では、肝臓の大型化が 60 mg/kg 投与群の雄と 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられた。

病理組織学検査では、肝臓の肝細胞肥大、胆管上皮細胞肥大及び小葉辺縁性肝細胞空胞化の減弱が 300 mg/kg 投与群の雌雄に、脾臓の髄外造血及び大腿骨骨髄の骨髄細胞数の増加が 300 mg/kg 投与群の雄にみられた。

回復期間では、300 mg/kg 投与群の雄の体重の低値、病理組織学検査における肝臓の小葉辺縁性肝細胞空胞化の減弱、雌の血液化学検査における総たん白質及びアルブミンの高値を除き、投与期間中にみられた変化は消失又は軽減し、回復性が認められ

た。

以上の結果、*N*－エチル－*N*－クロトノイル－２－トルイジンの本試験条件下における無影響量は、60 mg/kg 以上の投与群の雄に血中総コレステロールの高値、肝臓重量の高値などがみられ、また、300 mg/kg 投与群の雌雄にこれらの変化に加えて流涎、腎臓重量の高値、肝細胞及び胆管上皮細胞の肥大などがみられたことから、雄では 12 mg/kg/日、雌では 60 mg/kg/日と判断した。

5. 緒言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、*N*－エチル－*N*－クロトノイル－２－トルイジンをラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の可逆性を検討する試験を実施したのでその成績を報告する。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

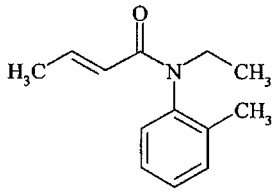
6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

本試験に使用した被験物質のロット番号、含量等は次の通りである。また、分析証明書を添付資料1に示した。

名称（別名）	:	*N*－エチル－*N*－クロトノイル－2－トルイジン（クロタミトン）
英名（別名）	:	*N*-Ethyl-*N*-crotonoyl-2-toluidine (Crotamiton)
CAS 番号	:	483-63-6
官報公示整理番号	:	9-214
分子式	:	$C_{13}H_{17}NO$
構造式	:	



分子量	:	203.28
常温における性状	:	無色~微黄色透明液体
含量（HPLC）	:	99.23%
屈折率	:	1.541
比重	:	1.009
強熱残分	:	0.07%
Z型異性体含量	:	8.1%
沸点	:	153~155°C
入手量	:	300 g（100 g；3本）
安定性	:	投与開始前と投与期間終了後に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で分析を行い、投与期間中の安定性を確認した（添付資料2）。
保存方法	:	冷所（冷蔵庫内、実測値：3~6°C）、密閉（シリカゲル入り容器内で保存） ただし、2010年2月19日~2010年2月20日は室温（実測値：19~21°C）で保存された。注)
保存場所	:	御殿場研究所　被験物質保存室及び第2研究棟4階被験物質調製室

取扱い上の注意　：　作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防いだ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをした。

返却　：　被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質の残量は安定性を確認後、全て廃棄した。

注）：購入元の製品情報では保存条件が室温であったため、受領日から翌日にかけて（2010 年 2 月 19 日~2010 年 2 月 20 日）室温条件下で保存したが、2010 年 2 月 20 日に MSDS を入手し確認をしたところ、保存条件は冷所、乾燥条件下、密閉容器で保存であったため、2010 年 2 月 20 日に保存条件を冷所（冷蔵庫内）、密閉（シリカゲル入り容器内で保存）に変更した。なお、本試験に先立って実施した HPLC を用いた*N*－エチル－*N*－クロトノイル－２－トルイジンの被験液中濃度測定法バリデーション及び安定性試験（試験番号：A-2190）[1)]において、被験物質を室温（実測値：18~23°C）で 18 日間保存したときの安定性が確認されていることから、本試験の保存条件による試験成績への影響はないと判断した。

6.1.2　溶媒

名称　：　コーン油

ロット番号　：　CDM1416

製造者　：　和光純薬工業株式会社

なお、溶媒については、本試験に先立って実施した*N*－エチル－*N*－クロトノイル－２－トルイジンの被験液中安定性試験（試験番号：A-2190）において、コーン油中での被験物質の安定性に良好な結果が得られていることから、コーン油を選択した。

6.2　投与液の調製

6.2.1　被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を秤取し、コーン油で希釈し、2.4、12 及び 60 mg/mL 液を調製した。被験液は 8 日に 1 回以上の頻度で調製し、調製後 7 日以内に使用した。

6.2.2　投与液の保存方法

投与液は 1 日必要分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用時まで冷所（冷蔵庫内、許容範囲 1~10°C；実測値 5~9°C）、遮光下で保存した。

6.2.3　溶媒中での安定性

本被験物質の 0.1 及び 200 mg/mL 溶解液（溶媒：コーン油）は、褐色ガラス瓶に入れ、冷所（冷蔵庫内、許容範囲：1~10°C）で 8 日間、その後室温で 24 時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている（試験番号：A-2190）。

6.2.4　被験液の濃度確認

投与 1 週と 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度を株式会社ボゾリサーチセンターで HPLC 法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割

合は95.0~105.0%（許容範囲：表示値に対する割合；100.0±10.0%）であり、いずれも許容範囲内であった（添付資料3）。分析法の概略を次に示す。

1濃度当たりの採取本数及び採取量
：　1本（10 mL/本）

測定対象物質　：　*N*－エチル－*N*－クロトノイル－2－トルイジン

測定対象標準物質

名称　：　*N*－エチル－*N*－クロトノイル－2－トルイジン

ロット番号　：　2597326

保存方法　：　冷所（冷蔵庫内、実測値：4~7°C）、密閉（シリカゲル入り容器内で保存）
ただし、2010年2月19日~2010年2月20日は室温（実測値：19~21°C）で保存された。注)

保存場所　：　御殿場研究所　被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

HPLC測定条件

カラム　：　L-column ODS（4.6 mm×150 mm、5 μm、財団法人 化学物質評価研究機構）

カラム恒温槽設定温度
：　40°C

HPLC移動相　：　精製水／メタノール／りん酸（500/500/1、v/v/v）

流量　：　1.5 mL/min

検出　：　UV（測定波長230 nm）

注入量　：　20 μL

オートサンプラー設定温度
：　10°C

注入順序　：

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	H-標準溶液（システム適合性用）
2	3	L-標準溶液（定量用）
3	1	測定実測試料（2.4 mg/mL）
4	3	M-標準溶液（定量用）
5	1	測定実測試料（12 mg/mL）
6	3	H-標準溶液（定量用）
7	1	測定実測試料（60 mg/mL）

標準溶液及び測定実測試料の測定は、注入後24時間以内に実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内における24時間保存後の安定性が確認されている。

注）：購入元の製品情報では保存条件が室温であったため、受領日から翌日にかけて（2010年2月19日~2010年2月20日）室温条件下で保存したが、2010年2月20日にMSDSを入手し確認

をしたところ、保存条件は冷所、乾燥条件下、密閉容器で保存であったため、2010年2月20日に保存条件を冷所（冷蔵庫内）、密閉（シリカゲル入り容器内で保存）に変更した。なお、本試験に先立って実施したHPLCを用いた*N*－エチル－*N*－クロトノイル－2－トルイジンの被験液中濃度測定法バリデーション及び安定性試験（試験番号：A-2190）[1)]において、被験物質を室温（実測値：18~23°C）で18日間保存したときの安定性が確認されていることから、本試験の保存条件による試験成績への影響はないと判断した。

6.3　試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用された系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4　試験動物及び群分け

Sprague-Dawley系SPFラット〔Crl:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター〕雌雄各47匹[注)]を5週齢で入手し、当所で8日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察（1回/日）、体重測定（3回）及び詳細な一般状態の観察（1回）を行い、体重増加量、一般状態及び詳細な一般状態に異常がみられず健康と思われる雌雄各36匹（主群として雌雄各24匹、回復群として雌雄各12匹）を選び、6週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で210~239 g、雌で153~182 gであった。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日（投与開始の2日前）の体重に基づいて、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた）により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験から除外し、動物管理責任者に移管した。

注）：試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各45匹であったが、実際には雌雄各47匹が納入された。

6.5　飼育条件

動物は温度22~27°C（許容範囲：23±3°C）、相対湿度30~55%、（許容範囲：50±20%）、換気回数1時間10~15回、照明1日12時間（07:00~19:00）の動物飼育室（904号室）で、ブラケット式金属製網ケージ（W 250×D 350×H 170 mm：リードエンジニアリング株式会社）で個別飼育し、毎日1回の飼育室内の清掃を実施した。固形飼料CRF-1（放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：091104、091203）及び御殿場市営水道水を自動給水装置により自由に摂取させた。

6.6　飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用ロットについてEurofins Scientific Analyticsで分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社に水道法に準拠する水質検査を定期的に（年4回）依頼した。これらの分析成績書を入手し、試験成績

に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

6.7　動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に小動物耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び投与量ごと（対照群、低、中及び高用量群の順）に4桁の番号をつけた。この場合、1000の位は群、100の位は性（0番を雄、1番を雌）、10と1の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量（群）ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査及び握力測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するため、ケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

6.8　投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は28日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回（7回/週）とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる2週間（14日間）とし、この間投与を行わなかった。

6.9　投与方法

投与容量は 5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した（08:30~11:25の間）。対照群には溶媒（コーン油）を同様に投与した。個体ごとの投与液量（表示単位：0.1 mL）は最新の体重を基準に算出した。

6.10　投与量及びその設定根拠並びに群構成

N－エチル－*N*－クロトノイル－２－トルイジンの0（コーン油）、100、300及び1000 mg/kg/day を 1 群雌雄各 5 匹のラットに 14 日間反復経口投与した結果 [2)]、1000 mg/kg 投与群では、一般状態で自発運動の減少、よろめき歩行又は腹臥を呈した後、投与5から8日に雄2/5例と雌1/5例が死亡した。生存動物では、一般状態で自発運動の減少又はよろめき歩行が散見され、体重、血液学検査、血液化学検査、器官重量及び剖検において明らかな被験物質投与の影響がみられた。更に、300 mg/kg 投与群でも血液学検査、血液化学検査、器官重量及び剖検において被験物質投与によると考えられる影響がみられた。以上のことから、本試験における投与量は、300 mg/kg を高用量とし、以下公比5で除し、60 mg/kg を中用量に、12 mg/kg を低用量に設定し、対照群を加え4群構成とした。1群当たりの動物を主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とした。群構成を表1.に示す。

表 1.群構成

試験群	投与量 (mg/kg)	濃　度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主　群		回　復　群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄 雌	6 6	1001~1006 1101~1106	6 6	1007~1012 1107~1112
低用量群	12	2.4	5	雄 雌	6 6	2001~2006 2101~2106	- -	- -
中用量群	60	12	5	雄 雌	6 6	3001~3006 3101~3106	- -	- -
高用量群	300	60	5	雄 雌	6 6	4001~4006 4101~4106	6 6	4007~4012 4107~4112

6.11　観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

投与 1 日（Day 1 of administration）　：投与開始日
投与 1 週（Week 1 of administration）　：投与 1 から投与 7 日
回復 1 日（Day 1 of recovery）　：回復開始日（投与期間終了の翌日）
回復 1 週（Week 1 of recovery）　：回復 1 から回復 7 日

6.11.1　一般状態の観察

全個体について投与期間中は毎日 4 回、投与前と投与直後、投与約 30 分後及び約 2 時間後（ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定を実施する時は投与前と投与直後の 2 回）、回復期間中は毎日 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

6.11.2　詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は、全個体について、投与開始前に 1 回、投与期間中及び回復期間中は毎週 1 回実施した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は、投与 4 週（雄を投与 24 日、雌を投与 25 日）及び回復 2 週（回復 11 日）に行った。詳細な一般状態の観察及び機能検査については実測値あるいはスコア化した評点法を用いた。また、観察、検査及び測定は、動物をランダムに配置し、観察者に対して投与の情報を制限（ブラインド化）した状態で行った。ただし、自発運動量の測定はブラインド化しないで行った。

6.11.2.1　詳細な一般状態の観察

1)　ケージ内観察

姿勢、痙攣、異常行動

2)　手に持っての観察

ケージからの取り出し易さ、被毛・皮膚の状態、眼・鼻の分泌物、眼球突出、眼瞼

閉鎖状態、可視粘膜、自律神経機能（流涙、流涎、立毛、瞳孔径、異常呼吸）、ハンドリングに対する反応、ハンドリング時の発声

3) オープンフィールド内観察

覚醒状態、痙攣、異常行動、常同行動、歩行、姿勢、身繕い、立ち上がり回数、排泄物（排糞数、排尿量）

6.11.2.2 機能検査

聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅

6.11.2.3 握力測定

CPU ゲージ MODEL- RX-5（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて前肢及び後肢の握力を測定した。

6.11.2.4 自発運動量の測定

実験動物用自発運動センサーNS-AS01（株式会社ニューロサイエンス）を用いて自発運動量を測定した。測定は 1 時間とし、10 分間隔及び 0~60 分の測定値を集計した。

6.11.3 体重測定

全個体について、投与期間中は投与 1、4、7、10、14、17、21、24 及び 28 日の投与前に、回復期間中は回復 1、4、7、10 及び 14 日に測定した。測定は 08:03~10:23 の間に行った。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約 16 時間絶食させた後の体重を測定した（07:40~08:11）。

6.11.4 摂餌量測定

全個体について、投与期間中は投与 1、7、14、21 及び 28 日の投与前に、回復期間中は回復 7 及び 14 日に測定した。測定は 08:54~10:25 の間に行った。なお、投与開始日の測定は前日からの 1 日量を、投与 7 日は 6 日間の累積摂取量を、その後は 7 日ごとに 7 日間の累積摂取量を測定し、1 匹 1 日量を算出した。回復 1 週は回復 1 日から 7 日までの 6 日間の累積摂取量を、その後は 7 日間の累積摂取量を測定し、1 匹 1 日量を算出した。

6.11.5 摂水量測定

尿検査時（投与 22~23 日及び回復 8~9 日）に、尿検査対象動物について、前日から 1 日あたりの摂水量を、給水瓶を用いて測定した。測定は 08:46~9:15 の間に行った。

6.11.6 尿検査

投与 4 週（投与 22~23 日）及び回復 2 週（回復 8~9 日）に行った。

投与 4 週は検査当日の投与後に主群及び回復群の全個体を、回復 2 週は回復群の全個体をそれぞれ採尿器をセットしたケージに収容し、絶食・自由摂水下で 4 時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の 20 時間尿を採取し、表 2.に記載した項目及び方法により検査した。

なお、投与 4 週の尿検査において、300 mg/kg 投与群の雄でビリルビン陽性が 3 例に、ウロビリノーゲン陽性、潜血陽性が各 7 例に認められた。投与液による陽性反応への干渉を確認するため、溶媒及び 300 mg/kg 投与群液（60 mg/mL 液）を用いて偽陽性反応の検査を実施した。結果は、溶媒、300 mg/kg 投与群液ともに陰性であり、投与液による陽性反応に対する干渉は認められなかった。

表 2. 尿検査の項目、測定法及び使用機器など

1）4 時間尿についての検査	
検査項目	測定方法
pH	オーションスティックス-7EA 試験紙 [a]（アークレイ株式会社）
たん白質	オーションスティックス-7EA 試験紙 [a]（アークレイ株式会社）
ケトン体	オーションスティックス-7EA 試験紙 [a]（アークレイ株式会社）
グルコース	オーションスティックス-7EA 試験紙 [a]（アークレイ株式会社）
潜血	オーションスティックス-7EA 試験紙 [a]（アークレイ株式会社）
ビリルビン	オーションスティックス-7EA 試験紙 [a]（アークレイ株式会社）
ウロビリノーゲン	オーションスティックス-7EA 試験紙 [a]（アークレイ株式会社）
色調	肉眼観察
沈渣	鏡検法
尿量（4 時間量）[注]	目盛付スピッツ管を用いた容量測定（単位：mL）
2）20 時間尿についての検査	
検査項目	測定方法
尿量（20 時間量）[注]	メスシリンダーを用いた容量測定（単位：mL）
浸透圧	氷点降下法 [b]（単位：mOsm/kg）
使用測定機器 [a]：AUTION™ MINI AM-4290（アークレイ株式会社） [b]：自動浸透圧測定装置　オートアンドスタット OM-6030（アークレイ株式会社）	

注）：4 時間の尿量と 20 時間の尿量を合計して 24 時間の尿量（mL/24h）を算出した。

6.11.7 血液学検査

投与期間及び回復期間終了の翌日の計画剖検時に、前日から一夜（16~20 時間）絶食させた全個体について、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から EDTA-2K 加採血瓶（SB-41：シスメックス株式会社）に血液（約 1 mL）を採取した。得られた血液について表 3.1）に記載した項目及び方法により検査した。更に、血液（約 0.9 mL）を 3.8%クエン酸ナトリウム溶液加試験管（血液 9 容に対し 1 容の割合）に採取し、遠心分離（3,000 rpm、約 1,600×g、10 分間）により得られた血漿について表 3.2）に記載した項目及び方法により検査した。なお、鏡検による確認に備え、全例について May-Grünwald-Giemsa 染色法による血液塗抹標本を作製したが、鏡検による確認は不要と判断し、鏡検は実施しなかった。

表 3. 血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

1）EDTA-2K 加血液についての検査		
検査項目	測定方法	単位
赤血球数（RBC）	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 [a)]	10^4/μL
ヘモグロビン量（HGB）	シアンメトヘモグロビン変法 [a)]	g/dL
ヘマトクリット値（HCT）	赤血球数及び平均赤血球容積から算出 [a)]	%
平均赤血球容積（MCV）	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 [a)]	fL
平均赤血球血色素量（MCH）	赤血球数及びヘモグロビン量から算出 [a)]	pg
平均赤血球血色素濃度（MCHC）	ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出 [a)]	g/dL
網赤血球率（Reticul.）	RNA 染色によるレーザーフローサイトメトリー法 [a)]	%
血小板数（PLT）	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 [a)]	10^4/μL
白血球数（WBC）	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 [a)]	10^2/μL
白血球百分率[注)]	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法	%
	+2 角度レーザーフローサイトメトリー法 [a)]	10^2/μL
2）クエン酸ナトリウム加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
プロトロンビン時間（PT）	クロット法 [b)]	s
活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）	クロット法 [b)]	s
フィブリノーゲン量（FIB）	トロンボプラスチン法 [b)]	mg/dL
使用測定機器 [a)]：総合血液学検査装置アドヴィア 120（Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Illinois, USA） [b)]：血液凝固自動分析装置　ACL Elite Pro（Instrumentation Laboratory, MA, USA）		

注）：リンパ球（LYMP）、好中球（NEUT）、好酸球（EOS）、好塩基球（BASO）、単球（MONO）及び大型非染色球（LUC）。また、白血球百分率と白血球数から各分画の実数を算出した。

6.11.8 血液化学検査

血液学検査用試料と同時に採取した血液（約 4 mL）を凝固促進剤入り試験管（ベノジェクト II-オートセップ：テルモ株式会社）に取り、遠心分離（3,000 rpm、約 1,670×g、10 分間）し、得られた血清について、表 4.1）に記載した項目及び方法により検査した。また、ヘパリン加試験管（血液 1 mL 当たり約 20 単位のヘパリン）に採取した血液（約 2 mL）を遠心分離（3,000 rpm、約 1,600×g、10 分間）し、得られた血漿について表 4.2）に記載した項目及び方法により検査した。

表 4. 血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

1）分離した血清についての検査		
検査項目	測定方法	単位
ALP	Bessey-Lowry 法 [a)]	IU/L
総コレステロール（T-CHO）	CEH-COD-POD 法 [a)]	mg/dL
トリグリセライド（TG）	LPL-GK-GPO-POD 法 [a)]	mg/dL
リン脂質（PL）	PLD-ChOD-POD 法 [a)]	mg/dL
総ビリルビン（T-BIL）	ビリルビンオキシダーゼ法 [a)]	mg/dL
グルコース（GLU）	グルコースデヒドロゲナーゼ法 [a)]	mg/dL
尿素窒素（BUN）	Urease-LEDH 法 [a)]	mg/dL
クレアチニン（CRNN）	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 [a)]	mg/dL
ナトリウム（Na）	イオン選択電極法 [a)]	mmol/L
カリウム（K）	イオン選択電極法 [a)]	mmol/L
塩素（Cl）	イオン選択電極法 [a)]	mmol/L
カルシウム（Ca）	OCPC 法 [a)]	mg/dL
無機リン（P）	モリブデン酸法 [a)]	mg/dL
総たん白質（TP）	Biuret 法 [a)]	g/dL
アルブミン（ALB）	BCG 法 [a)]	g/dL
A/G 比（A/G）	総たん白質及びアルブミンから算出	
2）ヘパリン加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AST	UV-rate 法 [a)]	IU/L
ALT	UV-rate 法 [a)]	IU/L
LDH	UV-rate 法 [a)]	IU/L
γ-GTP	L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法 [a)]	IU/L
使用測定機器		
[a)]：臨床化学自動分析装置　TBA-120FR 形（東芝メディカルシステムズ株式会社）		

6.11.9 病理学検査

6.11.9.1 剖検

全ての動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。

6.11.9.2 器官重量測定

全ての動物について、次に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。

なお、*印を付した両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価

した。

脳、副腎*、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓*、精巣*、精巣上体*、卵巣*、子宮

6.11.9.3 病理組織学検査

全ての個体について次に示す器官・組織を採取し、リン酸緩衝 10vol%ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、肺はリン酸緩衝 10vol%ホルマリン液を注入後、眼球及び視神経はリン酸緩衝液で調製した 3vol%グルタルアルデヒド・2.5vol%ホルマリン液で固定後、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、それぞれ、リン酸緩衝 10vol%ホルマリン液で保存し、パラフィン包埋した。その後、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、主群の対照群及び高用量群（肉眼的異常部位については全例）について鏡検した。*で示した両側性器官については両側を摘出したが、鏡検は左側のみ行った。なお、被験物質投与の影響が疑われた雌雄の肝臓、雄の大腿骨（骨髄を含む）及び脾臓については低及び中用量群並びに回復群の全個体を鏡検した。また、上皮小体の欠落が回復群の対照群の雄 1 例（動物番号：1007）に認められたが、主群の高用量群において被験物質投与の変化が認められず、回復群は検査対象外であったため、試験成績に影響はなかった。

大脳、小脳、脊髄（胸部）、坐骨神経*、眼球*、下垂体、甲状腺*、上皮小体*、副腎*、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、気管、肺（気管支を含む）、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板を含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓*、膀胱、精巣*、精巣上体*、前立腺、卵巣*、子宮、胸骨（骨髄を含む）、大腿骨（骨髄を含む）*及び大腿部骨格筋 *

他に、視神経*（視神経は眼球と分離せず、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製まで実施した。）、ハーダー腺*、胸大動脈、舌、食道、顎下腺*、舌下腺*、膵臓、腟、精嚢、乳腺（鼠径部）*、皮膚（鼠径部）*、個体識別部位（耳介）及び喉頭を摘出して保存した。

6.12 統計解析

オープンフィールド内観察の定量的項目、機能検査における定量的項目、握力測定、自発運動量の測定、体重、体重増加量、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査及び器官重量データについて、対照群と各投与群との間で統計解析を行った。先ず、Bartlett 検定により分散性の検定を行った（有意水準：両側 1%）。分散が等しい場合は Dunnett 法を用いて、非等分散の場合は Dunnett 型の mean rank test を用いて、対照群と各投与群との間で検定を行った（有意水準：両側 5 及び 1%）。なお、回復群については、F 検定により各群の分散の均一性の検定（有意水準：片側 5%）を行った。その結果、等分散性が認められた場合には対照群と被験物質投与群との平均値の差について Student の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を、等分散性が認められなかった場合には Aspin-Welch の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を行った[3) ~7)]。

7. 試験結果

7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

1) 投与期間

300 mg/kg 投与群では、雄で投与 19 日以降に流涎が散見された。一方、雌では流涎が投与 20 日に 1 例にみられた。流涎は投与直後又は投与約 30 分後にみられ、投与約 2 時間後にはいずれの動物でも消失した。

12 及び 60 mg/kg 投与群では、雌雄いずれの動物にも異常はみられなかった。

2) 回復期間

雌雄いずれの動物にも異常はみられなかった。

7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

1) 投与期間

成績の総括を表 5-1 に示した。

表 5-1. 詳細な一般状態の総括（投与期間）

		性	雄				雌			
		投与量 (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
観察項目	ステージ	動物数	12	6	6	12	12	6	6	12
手に持っての観察										
流涎										
軽度又は中等度	投与 1 週		0	0	0	0	0	0	0	0
	投与 2 週		0	0	0	0	0	0	0	1
	投与 3 週		0	0	0	4	0	0	0	2
	投与 4 週		0	0	0	3	0	0	0	3

表中の数値は出現例数を示す。

手に持っての観察において、軽度又は中等度の流涎が 300 mg/kg 投与群の雄では投与 3 及び 4 週にそれぞれ 4 及び 3 例に、雌では投与 2、3 及び 4 週に 1~3 例にみられた。

投与 1 週の観察では、雌雄ともにいずれの検査項目でも異常はみられなかった。

2) 回復期間

投与期間中に観察された流涎は、回復期間中の観察では雌雄ともに認められなかった。他の観察項目でも、雌雄ともに異常はみられなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

1) 投与 4 週

雌雄ともに、いずれの検査項目でも異常はみられなかった。

2) 回復 2 週

雌雄ともに、いずれの検査項目でも異常はみられなかった。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

1) 投与 4 週

雌雄ともに、いずれの被験物質投与群でも異常はみられなかった。

2) 回復 2 週

雌雄ともに、300 mg/kg 投与群で異常はみられなかった。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

1) 投与 4 週

雌雄ともに、いずれの被験物質投与群でも異常はみられなかった。

2) 回復 2 週

300 mg/kg 投与群の雄で測定開始後 10~20 分の測定値に有意な低値が、雌で測定開始後 30~40 分の測定値に有意な高値がみられたが、雌雄で異なる方向の一過性の変化であり、また、0~60 分の合計値では異常はみられなかったことから偶発性の変化と判断した。

7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

1) 投与期間

300 mg/kg 投与群の雄では、投与 10 日以降対照群をやや下回って推移し、体重増加量も低値であった。一方、雌では投与 10 日以降対照群を上回って推移し、投与 10、14、24 及び 28 日には統計学的な有意差もみられ、体重増加量も有意な高値を示した。

12 及び 60 mg/kg 投与群では、雌雄ともに対照群とほぼ同様に推移し、明らかな差はみられなかった。

2) 回復期間

300 mg/kg 投与群の雄では、体重の増加傾向はみられたものの、回復期間を通じて対照群を有意に下回って推移し、体重増加量でも有意な低値がみられた。一方、雌では体重及び体重増加量に統計学的な有意差はみられなかったが、回復期間を通じて対照群をやや上回って推移した。

7.4 摂餌量

成績を Fig.6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

1) 投与期間

300 mg/kg 投与群の雌では投与 7 日以降、対照群と比べて有意な高値がみられた。

一方、雄では対照群との間に明らかな差はみられなかった。

12 及び 60 mg/kg 投与群では、雌雄ともに対照群との間に明らかな差はみられなかった。

2) 回復期間

300 mg/kg 投与群の雄では回復期間を通じて対照群を下回り、回復 7 日には統計学的な有意差もみられた。一方、雌では回復期間を通じて対照群と比べて有意な高値がみられた。

7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

1) 投与 4 週

成績の総括を表 6-1 に示す。

表 6-1. 尿検査の総括（投与 4 週）

性	雄				雌			
投与量 (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
動物数	12	6	6	12	12	6	6	12
潜血								
–	12	6	6	5	10	6	6	11
+/–	0	0	0	6	0	0	0	0
1+	0	0	0	1	1	0	0	0
2+	0	0	0	0	1	0	0	0
3+	0	0	0	0	0	0	0	1
ビリルビン								
–	12	6	6	9	12	6	6	12
+	0	0	0	3	0	0	0	0
ウロビリノーゲン								
+/–	11	6	4	5	9	5	5	8
≥1+	1	0	2	7	3	1	1	4

表中の数値は出現例数を示す。

300 mg/kg 投与群の雄で潜血陽性例、ビリルビン陽性例及びウロビリノーゲン陽性例の出現例数の増加がみられた。

他に、潜血強陽性例が 300 mg/kg 投与群の雌 1 例にみられたが、1 例のみの変化であり、その出現状況から偶発性の変化と考えられた。

12 及び 60 mg/kg 投与群の雌雄並びに 300 mg/kg 投与群の雌では、いずれの検査項目でも異常はみられなかった。

2) 回復 2 週

300 mg/kg 投与群の雌雄ともに、いずれの検査項目でも異常はみられなかった。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

1) 投与期間終了時

成績の総括を表 7-1 に示す。

表 7-1. 血液学検査の総括（投与期間終了時）

性	雄			雌		
投与量 (mg/kg)	12	60	300	12	60	300
動物数	6	6	6	6	6	6
赤血球数	N	N	−1%	N	N	−1%
ヘモグロビン量	N	N	−5%	N	N	−4%
ヘマトクリット値	N	N	−2%	N	N	−1%
平均赤血球血色素濃度	N	N	−4%**	N	N	−3%**
網赤血球率	N	N	+39%*	N	N	+35%*
プロトロンビン時間	N	N	N	N	N	−7%**
フィブリノーゲン量	N	N	+29%**	N	N	N
単球　実数	N	N	+69%**	N	N	N
比率	N	N	N	N	N	N

表中の数値は対照群平均に対する増減率（+：増加、−：減少）

N: 著変なし

*: p<0.05, **: p<0.01（対照群との間に有意差あり）

赤血球系項目では、平均赤血球血色素濃度の有意な低値及び網赤血球率の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられ、同群では赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の低値傾向もみられた。

他に、フィブリノーゲン量の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雄に、プロトロンビン時間の有意な短縮が 300 mg/kg 投与群の雌にみられたが、低値又は延長ではないことから特記すべき変化ではなかった。また、単球数の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雄にみられたが、当社背景値内の変動であったことから生理学的変動の範囲内の変化と考えられた。

12 及び 60 mg/kg 投与群では、いずれの検査項目でも対照群との間に差はみられなかった。

2) 回復期間終了時

成績の総括を表 7-2 に示す。

表 7-2. 血液学検査の総括（回復期間終了時）

性		雄	雌
投与量 (mg/kg)		300	300
動物数		6	6
赤血球数		N	–4%*
ヘモグロビン量		–6%**	–4%**
ヘマトクリット値		–4%**	–1%
平均赤血球容積		–5%*	N
平均赤血球血色素量		–7%**	N
平均赤血球血色素濃度		–2%**	–3%**
網赤血球率		N	N
プロトロンビン時間		+28%**	N
フィブリノーゲン量		+18%**	+21%**
好酸球	実数	–36%*	+60%*
	比率	N	N

表中の数値は対照群平均に対する増減率（+：増加、–：減少）
N: 著変なし
*: p<0.05, **: p<0.01（対照群との間に有意差あり）

ヘモグロビン量及び平均赤血球血色素濃度の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雌雄に、ヘマトクリット値、平均赤血球容積及び平均赤血球色素量の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雄に、赤血球数の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雌にみられた。

他に、プロトロンビン時間の有意な延長が 300 mg/kg 投与群の雄にみられたが、投与期間終了時には認められない変化であった。フィブリノーゲン量の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられたが、生理的変動の範囲内の変化であり、低値ではないことから特記すべき変化ではなかった。好酸球数の有意な減少が 300 mg/kg 投与群の雄に、有意な増加が 300 mg/kg 投与群の雌にみられたが、投与期間終了時には認められない変化であり、白血球に占める割合の少ない分画における僅かな変動であることから毒性学的意義は低いと考えられた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

1) 投与期間終了時

成績の総括を表 8-1 に示す。

表 8-1. 血液化学検査の総括（投与期間終了時）

性	雄			雌		
投与量 (mg/kg)	12	60	300	12	60	300
動物数	6	6	6	6	6	6
ALT	N	N	+62%**	N	N	N
γ-GTP	N	N	+200%**	N	N	N
総コレステロール	N	+46%**	+54%**	N	N	+56%**
リン脂質	N	+36%**	+52%**	N	N	+45%**
グルコース	N	N	N	+24%**	N	N
塩素	N	N	N	N	N	−3%*
カルシウム	N	+4%**	+5%**	N	N	+6%**
総たん白質	N	N	+8%**	N	N	+13%**
アルブミン	N	N	+3%	N	N	+12%*
A/G 比	N	N	−10%**	N	N	−3%

表中の数値は対照群平均に対する増減率（+：増加、−：減少）
N: 著変なし
*: p<0.05, **: p<0.01（対照群との間に有意差あり）

酵素系では、ALT 活性及び γ-GTP 活性の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雄にみられた。

脂質系では、総コレステロール及びリン脂質の有意な高値が 60 mg/kg 投与群の雄と 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられた。

たん白質系では、総たん白質の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄に、アルブミンの有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌に、A/G 比の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雄にみられた。

他に、カルシウムの有意な高値が 60 mg/kg 投与群の雄と 300 mg/kg 投与群の雌雄に、塩素の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雌にみられたが、いずれも当社背景値内の変動であったことから生理学的変動の範囲内の変化と考えられた。また、グルコースの有意な高値が 12 mg/kg 投与群の雌にみられたが、用量に関連した変化ではなく、偶発性の変化と考えられた。

12 mg/kg 投与群の雌雄及び 60 mg/kg 投与群の雌では、いずれの検査項目でも被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

2) 回復期間終了時

成績の総括を表 8-2 に示す。

表 8-2. 血液化学検査の総括（回復期間終了時）

性	雄	雌
投与量 (mg/kg)	300	300
動物数	6	6
AST	N	–14%**
ALT	+32%*	N
ALP	N	–31%*
トリグリセライド	–50%*	+170%*
カルシウム	–3%**	+4%*
総たん白質	N	+14%**
アルブミン	N	+14%**

表中の数値は対照群平均に対する増減率（+：増加、–：減少）
N: 著変なし
*: p<0.05, **: p<0.01（対照群との間に有意差あり）

ALT 活性の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雄に、総たん白質及びアルブミンの有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌にみられた。

投与期間終了時検査で変化の認められた γ-GTP、総コレステロール、リン脂質及び塩素は、回復期間終了時検査では明らかな変化は認められなかった。

他に、AST 活性及び ALP 活性の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雌にみられたが、高値ではないことから、毒性学的に意義のない変化と考えられた。また、カルシウムの有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雄に、有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌にみられたが、いずれも当社背景値内の変動であったことから生理学的変動の範囲内の変化と考えられた。更に、トリグリセライドの有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雄に、有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌にみられたが、投与期間終了時検査では認められない変化であった。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

1) 投与期間終了時

成績の総括を表 9-1 に示す。

表 9-1. 器官重量の総括（投与期間終了時）

性		雄			雌		
投与量 (mg/kg)		12	60	300	12	60	300
動物数		6	6	6	6	6	6
剖検時体重		+5%	+5%	+1%	–1%	+5%	+7%
肝臓							
	絶対重量	N	+21%	+48%**	N	N	+51%**
	相対重量	N	+15%*	+46%**	N	N	+42%**
腎臓							
	絶対重量	N	N	+10%	N	N	+16%*
	相対重量	N	N	+10%*	N	N	+8%
副腎							
	絶対重量	N	N	–20%*	N	N	N
	相対重量	N	N	–19%**	N	N	N

表中の数値は対照群平均に対する増減率（+：増加、–：減少）
N: 著変なし
*: p<0.05, **: p<0.01（対照群との間に有意差あり）

肝臓 : 絶対及び相対重量の高値が 60 mg/kg 投与群の雄と 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられ、60 mg/kg 投与群の絶対重量を除いて統計学的な有意差もみられた。

腎臓 : 絶対及び相対重量の高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられ、雄の相対重量及び雌の絶対重量では統計学的な有意差もみられた。

副腎 : 絶対及び相対重量の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雄にみられた。

12 mg/kg 投与群の雌雄及び 60 mg/kg 投与群の雌では、いずれの検査項目でも対照群との間に差はみられなかった。

2) 回復期間終了時

成績の総括を表 9-2 に示した。

表 9-2. 器官重量の総括（回復期間終了時）

性		雄	雌
投与量 (mg/kg)		300	300
動物数		6	6
剖検時体重		−15%	+6%
脳			
	絶対重量	N	N
	相対重量	+17%**	N
心臓			
	絶対重量	N	+13%*
	相対重量	N	N
肝臓			
	絶対重量	−14%*	+29%**
	相対重量	N	+22%**
腎臓			
	絶対重量	N	N
	相対重量	+18%**	N
精巣			
	絶対重量	N	/
	相対重量	+19%**	/
精巣上体			
	絶対重量	N	/
	相対重量	+17%*	/

表中の数値は対照群平均に対する増減率（+：増加、−：減少）
N: 著変なし
/: 該当せず
*: $p<0.05$, **: $p<0.01$（対照群との間に有意差あり）

肝臓　：　絶対及び相対重量の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌にみられた。

他に、肝臓の絶対重量の有意な低値、脳、腎臓、精巣又は精巣上体の相対重量の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雄に、心臓の絶対重量の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌にみられたが、絶対又は相対重量のみの変化であり、特記すべき変化ではなかった。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

肝臓　：　大型化が 60 mg/kg 投与群の雄 1/6 例、300 mg/kg 投与群の雄 5/6 例と雌全例にみられた。

他に、腺胃の暗赤色巣が対照群の雌 1/6 例と 300 mg/kg 投与群の雌 1/6 例に、精巣の

小型化（両側性）が 12 mg/kg 投与群 1/6 例に、甲状腺の小型化（片側性）が 60 mg/kg 投与群の雌 1/6 例に、腎臓の嚢胞が 60 mg/kg 投与群の雌 1/6 例にみられたが、いずれも用量に関連した変化ではなく、偶発性の変化と考えられた。

2) 回復期間終了時

雌雄いずれの動物にも異常はみられなかった。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-4 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

成績の総括を表 10-1 に示す。

表 10-1.病理組織学検査の総括（投与期間終了時）

性	雄				雌			
投与量 (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
動物数	6	6	6	6	6	6	6	6
肝臓								
肝細胞肥大	0	0	0	6	0	0	0	5
軽微	0	0	0	4	0	0	0	5
軽度	0	0	0	2	0	0	0	0
胆管上皮細胞肥大	0	0	0	3	0	0	0	2
軽微	0	0	0	3	0	0	0	1
軽度	0	0	0	0	0	0	0	1
小葉辺縁性肝細胞空胞化	6	6	5	2	6	6	6	5
軽微	3	1	3	2	1	3	2	4
軽度	3	5	2	0	5	3	4	1
脾臓								
髄外造血	0	0	0	1	0	—	—	0
軽微	0	0	0	1	0	—	—	0
大腿骨（骨髄）								
骨髄細胞数の増加	1	0	1	4	2	—	—	2
軽微	1	0	1	4	2	—	—	2

表中の数値は出現例数を示す。
—：検査せず

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓、脾臓及び大腿骨（骨髄）で認められた。

肝臓 : 細胞質内の好酸性及び好塩基性領域がともに増加し、肝細胞の大型化を認める軽微又は軽度な肝細胞肥大が 300 mg/kg 投与群の雄全例と雌 5 例にみられた。また、軽微又は軽度な胆管上皮細胞肥大が 300 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例に、小葉辺縁性肝細胞空胞化の減弱が 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられた。

脾臓 : 軽微な髄外造血が 300 mg/kg 投与群の雄 1 例にみられた。

大腿骨（骨髄を含む）

: 軽微な骨髄細胞数の増加が 300 mg/kg 投与群の雄にみられた。

なお、Table 及び Appendix に示したその他の所見はその出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

2) 回復期間終了時

成績の総括を表 10-2 に示す。

表 10-2.病理組織学検査の総括（回復期間終了時）

性	雄		雌	
投与量 (mg/kg)	0	300	0	300
動物数	6	6	6	6
肝臓				
胆管上皮細胞肥大	0	1	0	0
軽微	0	1	0	0
小葉辺縁性肝細胞空胞化	6	6	6	6
軽微	0	6	6	6
軽度	6	0	0	0

表中の数値は出現例数を示す。

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓でみられた。

肝臓 : 軽微な胆管上皮細胞肥大が 300 mg/kg 投与群の雄 1 例に、小葉辺縁性肝細胞空胞化の減弱が 300 mg/kg 投与群の雄にみられた。

なお、Table 及び Appendix に示したその他の所見はその出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

8. 考察

N－エチル－*N*－クロトノイル－２－トルイジンの 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット〔Crl:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹〕を用いて実施した。投与量は 0（コーン油：対照群）、12、60 及び 300 mg/kg/日とし、胃ゾンデを用いて 1 日 1 回強制経口投与した。また、対照群と 300 mg/kg 投与群の一部の個体（1 群雌雄各 6 匹）については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

投与期間及び回復期間を通じて死亡動物はみられず、機能検査、握力及び自発運動量では被験物質投与の影響は認められなかった。

一般状態では、流涎が 300 mg/kg 投与群の雄では投与 19 日以降に散見され、雌では投与 20 日に 1 例にみられた。詳細な一般状態においても、流涎が投与 2 週以降に 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられた。病理組織学検査では、中枢及び末梢神経に異常はみられず、発現機序は不明であったが、被験物質投与に起因する変化と考えられた。回復期間中には流涎はみられず、回復性が認められた。

体重及び摂餌量では、300 mg/kg 投与群の雄で投与 10 日以降対照群をやや下回って推移し、体重増加量も低値であった。一方、雌では摂餌量の高値を伴う体重の高値が投与 10 日以降にみられ、体重増加量も高値を示した。本被験物質のラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（予備試験）[2)]においても同様に、1000 mg/kg 投与群の雄では体重及び体重増加量の低値がみられ、雌では体重に変化はみられなかったものの摂餌量の高値がみられており、本試験でみられた変化も被験物質投与に起因する変化と考えられた。回復期間においても、300 mg/kg 投与群の雄では体重の増加傾向はみられたものの、体重、摂餌量及び体重増加量の低値がみられ、回復性は明らかではなかった。一方、雌では回復期間を通じて摂餌量の高値がみられたが、体重では対照群と比べて明らかな変化はみられなかった。

尿検査では、300 mg/kg 投与群の雄でビリルビン陽性例及びウロビリノーゲン陽性例の出現例数の増加がみられ、後述する肝臓の変化に起因する変化と考えられたが、血液化学検査において血清ビリルビンに変化は認められず、極めて軽微な変化と考えられた。また、300 mg/kg 投与群の雄では潜血陽性例の出現例数の増加がみられたが、病理組織学検査において尿路系に異常は認められず、後述する貧血に関連する変化と考えられた。回復 2 週検査時ではいずれの項目にも異常はみられず、投与期間中にみられた変化には回復性が認められた。

血液学検査では、平均赤血球血色素濃度の低値及び網赤血球率の高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。本被験物質のラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（予備試験）[2)]において、1000 mg/kg 投与群の雌雄で明らかな貧血が認められており、本試験でも、僅かではあるが 300 mg/kg 投与群の雌雄で貧血傾向が認められたことから、被験物質投与により赤血球への影響があったことが示唆された。病理組織学検査

では、300 mg/kg 投与群の雄で脾臓の髄外造血及び大腿骨骨髄の骨髄細胞数の増加がみられ、貧血傾向に関連した変化であると推察された。本被験物質に化学構造が類似した *o*－トルイジンの雄性ラットを用いた反復強制経口投与試験において、ヘモグロビン酸化によると考えられる造血系への影響が報告されており[8)]、本試験でみられた貧血も同様の発現機序による可能性も考えられた。回復期間終了時においても、300 mg/kg 投与群の雌雄で貧血傾向が認められたが、貧血に対する生理的反応と考えられる網赤血球率の高値、脾臓の髄外造血あるいは大腿骨骨髄の骨髄細胞数の増加は消失したことから、回復傾向にあると判断した。

血液化学検査では、ALT 活性の高値が 300 mg/kg 投与群の雄にみられたが、肝臓の病理組織学検査では明らかな肝細胞障害性の変化はなかった。また、総コレステロール及びリン脂質の高値が 60 mg/kg 投与群の雄と 300 mg/kg 投与群の雌雄に、総たん白質の高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄に、アルブミンの高値が 300 mg/kg 投与群の雌に、A/G 比の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雄にみられ、これらの変化は後述の病理組織学検査でみられた肝臓の肝細胞肥大に関連する変化と推察された。回復期間終了時には、300 mg/kg 投与群の雌における総たん白質及びアルブミンの高値を除き、上記の変化はいずれも減弱又は消失し、回復性が認められた。

器官重量では、腎臓重量の高値が 300 mg/kg 投与群の雌雄に、副腎重量の低値が 300 mg/kg 投与群の雄にみられたが、病理組織学検査では異常は認められなかった。回復期間終了時にはこれらの変化はみられず、回復性が認められた。

病理学検査では、上記の脾臓及び大腿骨の他に、肝臓に被験物質投与に起因すると考えられる変化が認められた。肝細胞肥大が 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられた。本変化には明らかな変性所見が認められず、細胞質内の好塩基性及び好酸性領域がともに増加しており、肝細胞における何らかの機能的亢進を反映する変化である可能性が推察された。また、肝臓重量の増加及び肉眼的にみられた大型化は、上記の組織学的変化を反映した変化と考えられた。また、胆管上皮細胞肥大が 300 mg/kg 投与群の雌雄にみられ、変化の強い個体では肥大した上皮細胞とともに僅かに変性した細胞が観察され、かつ、γ-GTP 活性の高値もみられたことから、被験物質の胆管上皮細胞への障害性作用が疑われた。回復期間終了時には、肝細胞肥大は雌雄ともに消失し、回復性が認められた。胆管上皮細胞肥大は、300 mg/kg 投与群の雄 1 例で軽微な変化がみられたのみであり、回復傾向が認められた。

他に、肝臓の小葉辺縁性肝細胞空胞化の減弱が 300 mg/kg 投与群の雌雄でみられたが、小葉辺縁性肝細胞空胞化は絶食下の動物にみられる準生理的に出現する変化であることから、毒性学的に意義の低い変化であると考えられた。なお、回復期間終了時には、300 mg/kg 投与群の雌では小葉辺縁性肝細胞空胞化の減弱は回復性が認められたが、雄では明らかな回復性は認められなかった。

以上の結果、*N*－エチル－*N*－クロトノイル－２－トルイジンの本試験条件下における無影響量は、雄では 12 mg/kg/日、雌では 60 mg/kg/日と推定された。なお、回復

期間では、雄の体重の低値、病理組織学検査における肝臓の小葉辺縁性肝細胞空胞化の減弱、雌の血液化学検査における総たん白質及びアルブミンの高値を除き、投与期間中にみられた変化は消失又は軽減し、回復性が認められた。

9. 文献

1) HPLC を用いた *N*-エチル-*N*-クロトノイル-2-トルイジンの被験液中濃度測定法バリデーション及び安定性試験（媒体：コーン油）（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：A-2190、2009 年）
2) *N*-エチル-*N*-クロトノイル-2-トルイジンのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（予備試験）（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：C-B465、2009 年）
3) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods.8th ed. Ames: Iowa State University Press;1989.
4) Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control.J Am Stat Assoc 1955; 50:1096-121.
5) Dunnett CW. New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 1964; 20:482-91.
6) 佐久間昭（1977）：薬効評価－計画と解析－I 東京大学出版会, 東京.
7) 佐久間昭（1981）：薬効評価－計画と解析－II 東京大学出版会, 東京.
8) 化学物質の初期リスク評価書、No, 202、*o*-トルイジン（2008）、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、財団法人　化学物質評価研究機構

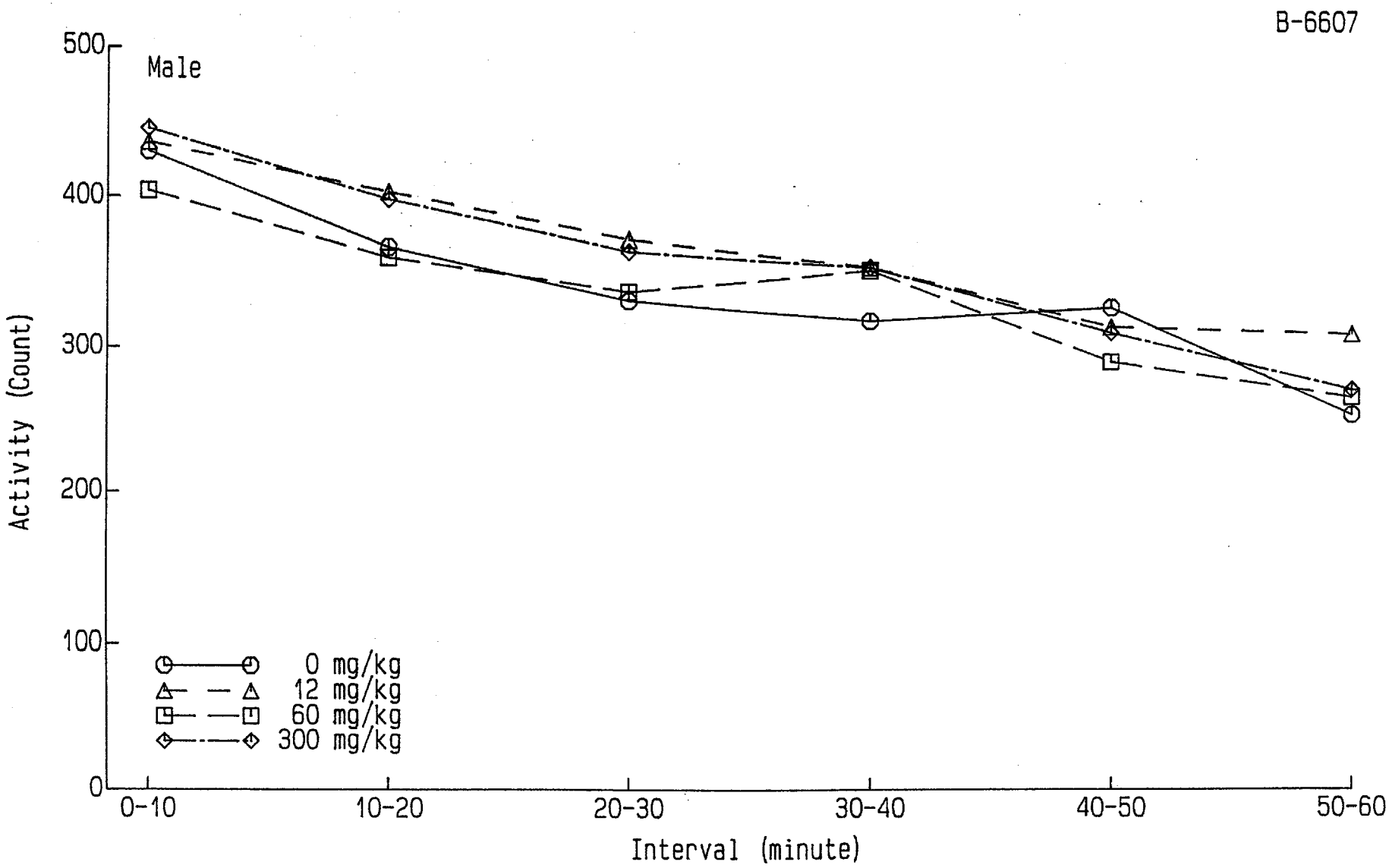


Fig.1 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Motor activity (Week 4 of administration period) ———

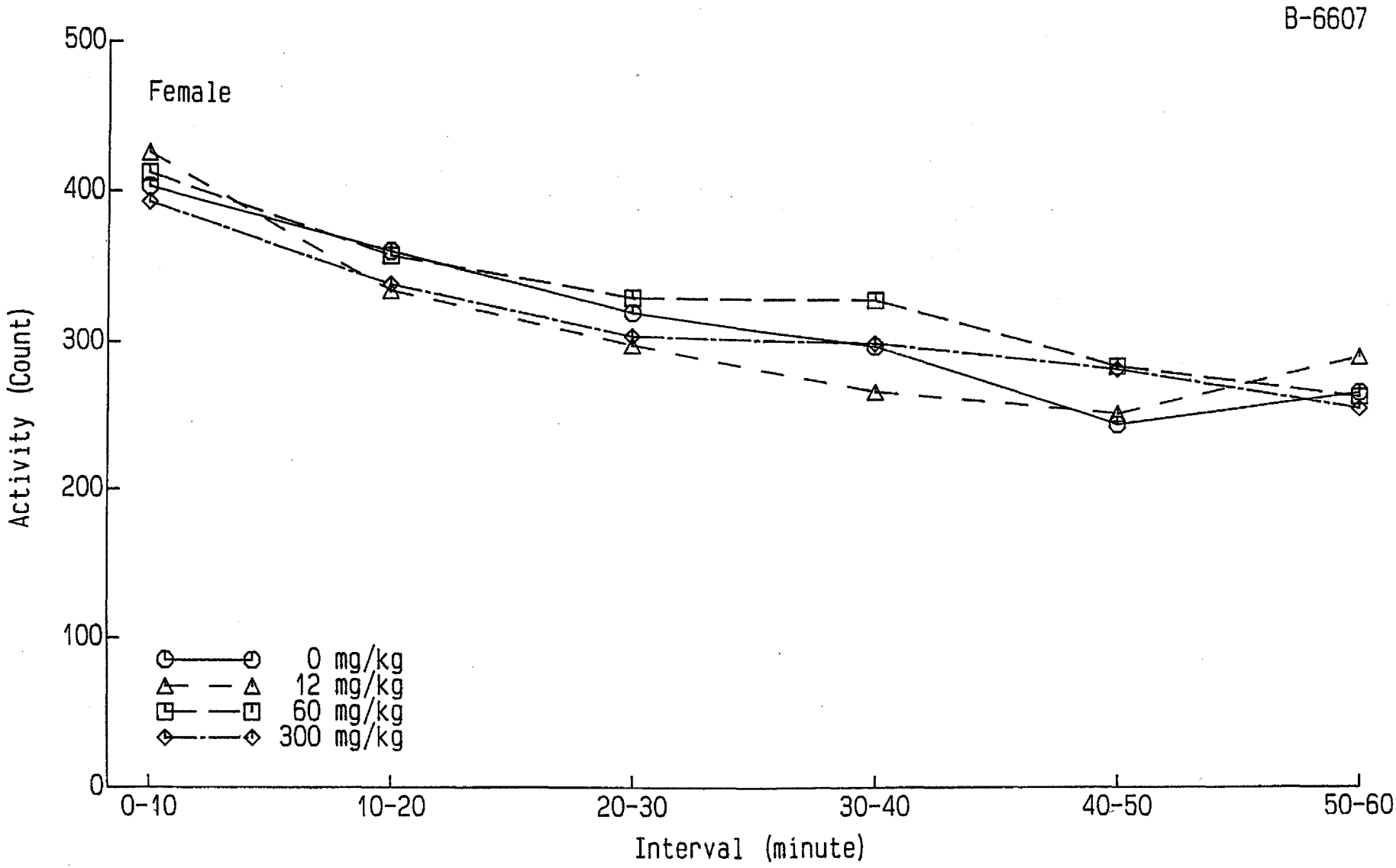


Fig.2 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Motor activity (Week 4 of administration period) ———

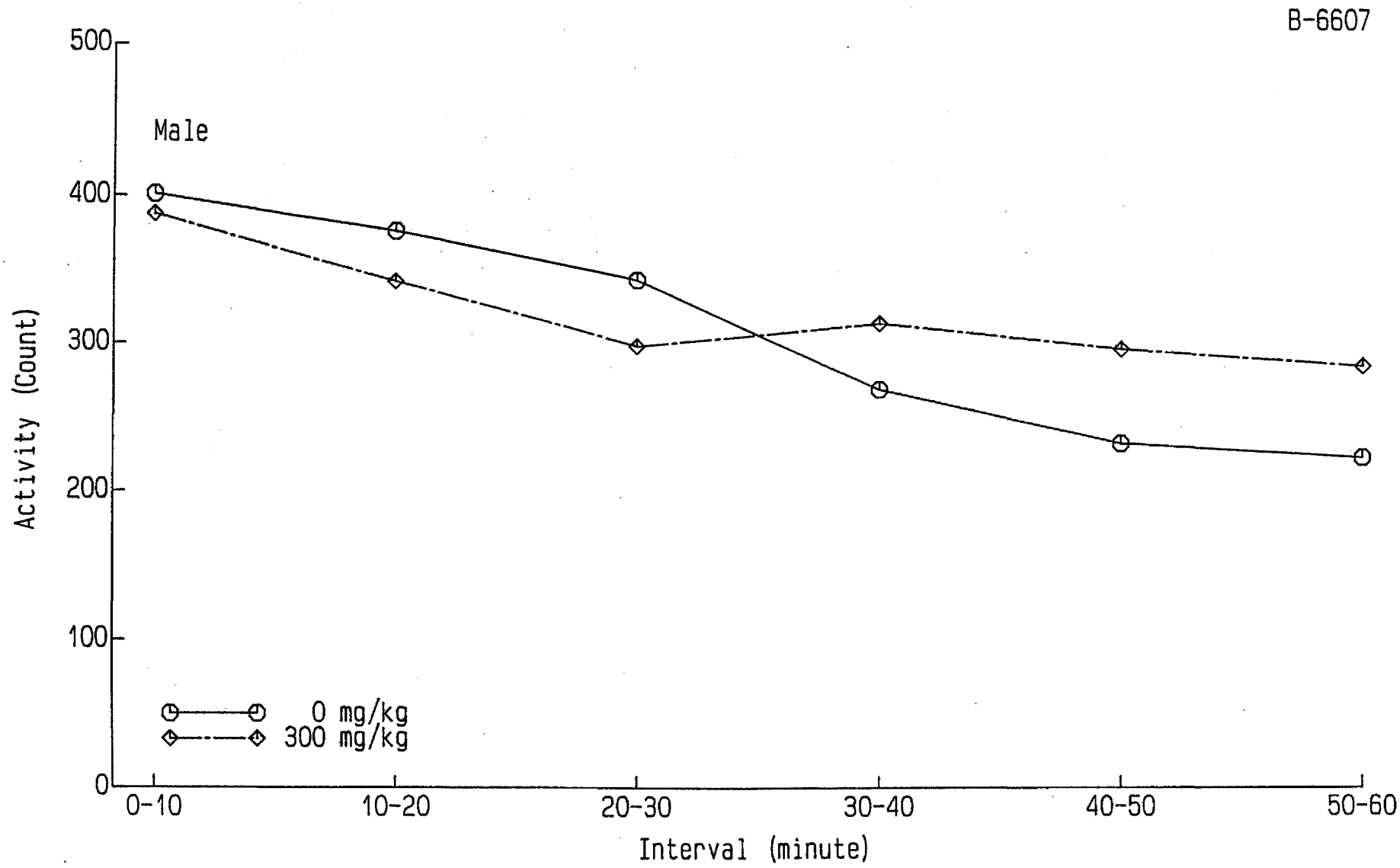


Fig.3 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Motor activity (Week 2 of recovery period) ———

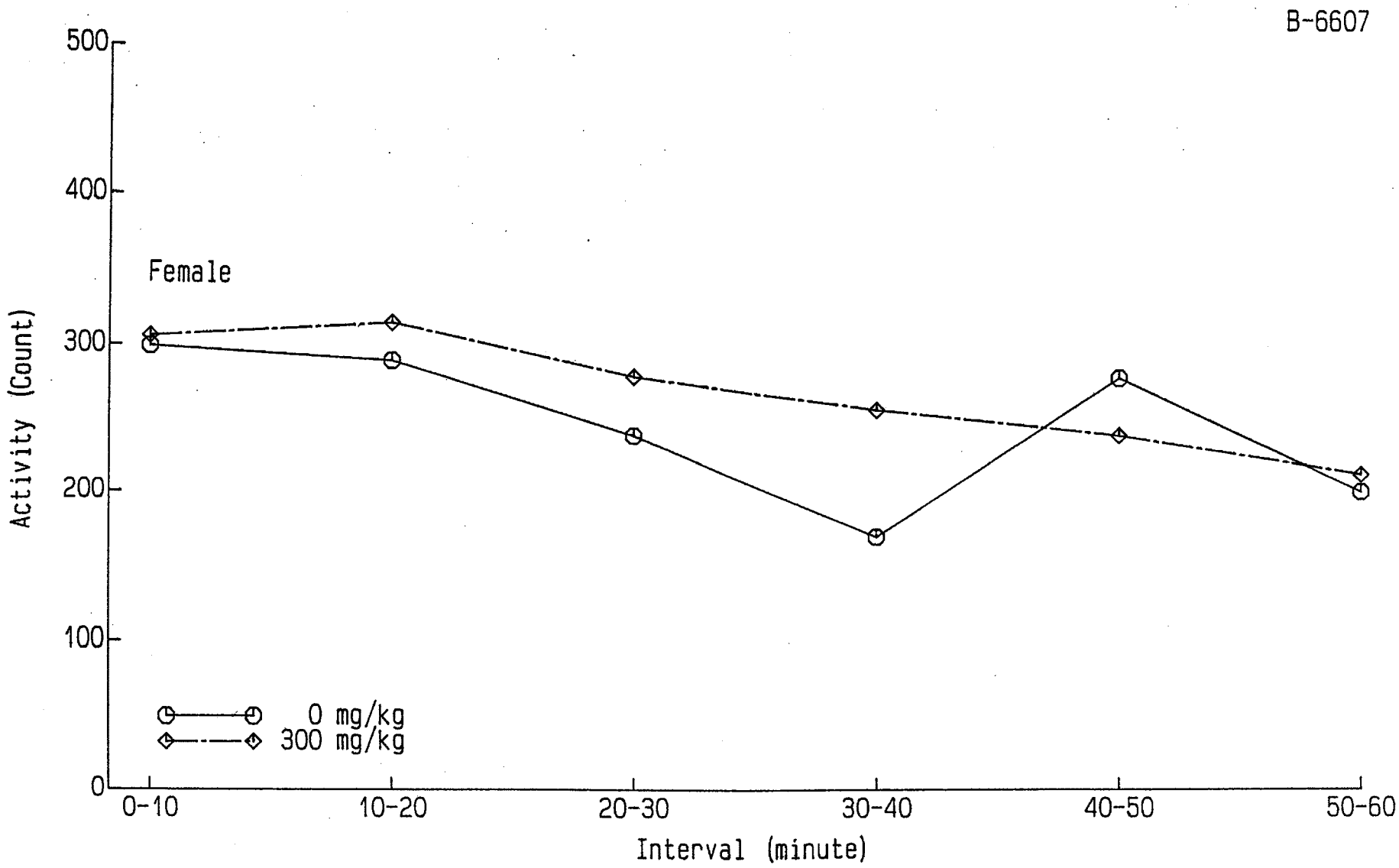


Fig.4 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Motor activity (Week 2 of recovery period) ———

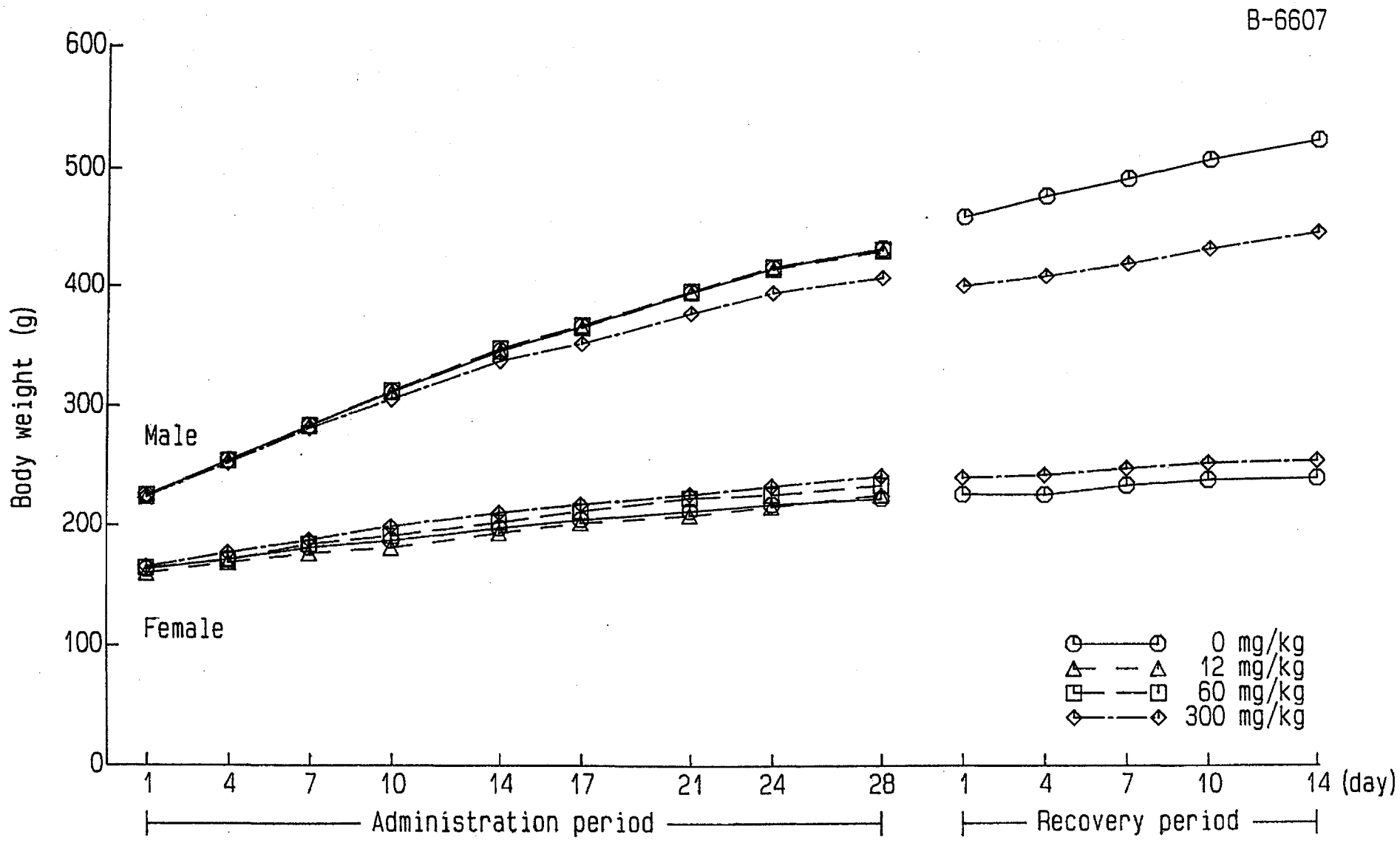


Fig.5 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Body weight ———

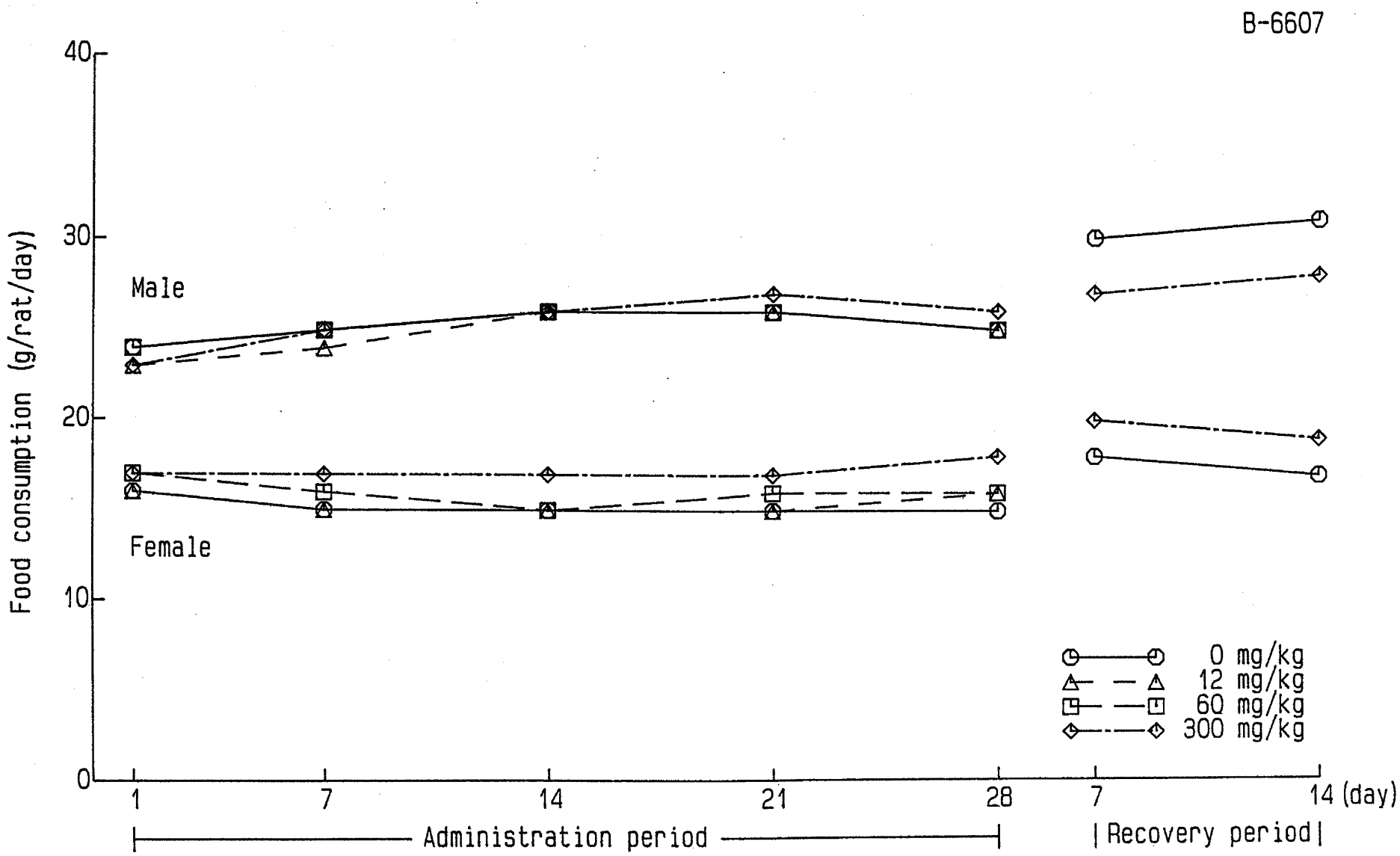


Fig.6 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Food consumption ———

Table 1-1 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Clinical signs (Administration period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of administration													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Female	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Table 1-2 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Clinical signs (Administration period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of administration													
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Male	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	9	9	10	9	10	11	11	11	11	11
		Salivation	0	0	0	0	3	3	2	3	2	1	1	1	1	1
Female	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12
		Salivation	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1-3 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Clinical signs (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of recovery													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	0	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Female	0	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Table 2-1 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 1 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-2 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 2 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-3 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 3 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-4 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 4 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-5 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 1 of recovery period)

	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

Table 2-6 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 2 of recovery period)

	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

Table 2-7 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 1 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Vocalization									
None		12	5	5	11	12	6	6	11
Soft		0	1	1	1	0	0	0	1
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-8 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 2 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	11
Slight		0	0	0	0	0	0	0	1
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Vocalization									
None		12	6	6	11	12	6	6	10
Soft		0	0	0	1	0	0	0	2
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-9 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 3 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	8	12	6	6	10
Slight		0	0	0	4	0	0	0	1
Moderate		0	0	0	0	0	0	0	1
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Vocalization									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-10 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 4 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	9	12	6	6	9
Slight		0	0	0	3	0	0	0	2
Moderate		0	0	0	0	0	0	0	1
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Vocalization									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-11 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 1 of recovery period)

	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		6	6	6	6
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Vocalization					
None		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

Table 2-12 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 2 of recovery period)

	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		6	6	6	6
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Vocalization					
None		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

Table 2-13 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		6± 3	4± 1	5± 2	5± 2	6± 2	7± 2	6± 2	6± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 1	1± 1	0± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		11	6	3	10	12	5	6	12
Small amount		1	0	3	2	0	1	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-14 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		0	1	1	1	0	0	0	0
Normal		12	5	5	11	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 2	4± 2	3± 3	4± 2	7± 2	7± 3	6± 3	9± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	1± 1	0± 0	0± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		9	5	3	9	10	6	6	12
Small amount		3	1	2	3	2	0	0	0
Moderate amount		0	0	1	0	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-15 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 3 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		0	0	1	0	0	0	0	0
Normal		12	6	5	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 3	4± 2	3± 2	4± 1	9± 2	7± 3	8± 1	9± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 0	1± 2	0± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		12	6	4	10	12	6	6	12
Small amount		0	0	2	2	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-16 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 4 of administration period)

	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		0	0	1	1	0	0	0	0
Normal		12	6	5	11	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 2	5± 2	3± 3	5± 2	8± 3	10± 2	8± 1	9± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	1± 1	1± 1	0± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		9	6	5	9	11	6	6	12
Small amount		3	0	1	3	1	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-17 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of recovery period)

	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
No/minimal location		1	1	0	0
Normal		5	5	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		3± 2	5± 3	12± 3	11± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	1± 1	0± 0	0± 0
Urination					
None		6	5	6	6
Small amount		0	1	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-18 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
No/minimal location		0	1	0	0
Normal		6	5	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 2	6± 3	9± 3	9± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination					
None		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-19 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Manipulative test (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Auditory response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Approach response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Touch response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Tail pinch response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupillary reflex Pass, both		12	6	6	12	12	6	6	12
Aerial righting reflex (Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		69±17	85±12	82±13	76±13	59±11	60±17	54±12	63±13

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-20 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Manipulative test (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Auditory response Normal		6	6	6	6
Approach response Normal		6	6	6	6
Touch response Normal		6	6	6	6
Tail pinch response Normal		6	6	6	6
Pupillary reflex Pass, both		6	6	6	6
Aerial righting reflex (Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		69±10	80±19	57± 8	56±12

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-21 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Grip strength (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	12	12
		Mean	1200	784
		S.D.	127	123
	12	No.	6	6
		Mean	1241	753
		S.D.	162	84
	60	No.	6	6
		Mean	1180	757
		S.D.	177	78
	300	No.	12	12
		Mean	1146	778
		S.D.	144	140
Female	0	No.	12	12
		Mean	977	630
		S.D.	95	116
	12	No.	6	6
		Mean	956	670
		S.D.	62	78
	60	No.	6	6
		Mean	941	719
		S.D.	92	74
	300	No.	12	12
		Mean	955	648
		S.D.	134	91

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-22 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Grip strength (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	6	6
		Mean	1497	891
		S.D.	164	143
	300	No.	6	6
		Mean	1499	773
		S.D.	165	73
Female	0	No.	6	6
		Mean	1259	671
		S.D.	116	146
	300	No.	6	6
		Mean	1228	668
		S.D.	138	117

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-23 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Motor activity (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes) 0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total(0-60)
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	430	368	333	320	329	256	2036
		S.D.	33	80	68	115	95	118	378
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	436	404	374	356	316	311	2196
		S.D.	16	25	37	38	62	59	87
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	404	361	339	354	292	268	2018
		S.D.	48	69	73	49	92	102	300
	300	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	445	399	366	356	312	273	2151
		S.D.	25	41	34	48	100	104	227
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	403	362	322	300	248	270	1906
		S.D.	50	76	65	75	138	92	394
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	425	336	300	269	255	294	1879
		S.D.	23	44	96	85	70	115	320
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	412	359	332	331	287	267	1988
		S.D.	24	64	86	111	118	112	445
	300	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	393	340	306	302	285	259	1884
		S.D.	38	64	43	54	82	101	294

Unit : Count
No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-24 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Motor activity (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes) 0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total(0-60)
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	401	377	345	271	235	226	1855
		S.D.	33	26	35	98	113	118	287
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	388	343*	300	316	299	288	1934
		S.D.	35	23T	58	55	54	73	233
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	299	290	240	171	280	203	1483
		S.D.	43	63	116	79	101	94	280
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	306	315	280	258*	241	215	1615
		S.D.	63	36	92	38T	37	56	216

Unit : Count
* : $p<0.05$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 3-1

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Body weight (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration 1	4	7	10	14	17	21	24	28	Gain 1-28
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	225	255	284	312	346	367	397	418	435	210
		S.D.	9	12	14	19	22	25	31	37	43	37
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	224	255	284	312	346	366	397	417	433	209
		S.D.	8	11	16	21	26	29	36	36	40	34
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	226	255	284	313	348	368	398	419	434	208
		S.D.	8	10	12	13	17	17	22	24	23	23
	300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	225	253	282	306	338	353	379	397	410	185
		S.D.	8	13	17	21	28	31	37	39	44	38
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	163	172	182	188	199	207	215	221	226	63
		S.D.	7	12	11	12	13	15	17	18	21	18
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	160	169	177	182	195	204	211	219	229	69
		S.D.	7	8	7	8	8	15	16	11	16	11
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	164	171	185	192	204	214	226	229	237	73
		S.D.	5	7	8	10	14	15	18	15	15	15
	300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	165	177	188	200*	212*	220	229	236*	245*	80*
		S.D.	9	9	12	12D	14D	12	13	13D	13D	14D

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

Table 3-2

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Body weight (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery 1	4	7	10	14	Gain 1-14
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	462	480	495	511	528	66
		S.D.	31	34	34	35	37	10
	300	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	403*	412*	423**	436**	450**	47*
		S.D.	38T	40T	39T	42T	43T	10T
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	230	230	238	243	245	16
		S.D.	20	22	22	20	19	5
	300	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	244	246	252	257	259	15
		S.D.	14	16	14	14	16	4

Unit : g
* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 4-1

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Food consumption (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration 1	7	14	21	28
Male	0	No.	12	12	12	12	12
		Mean	24	25	26	26	25
		S.D.	2	2	3	3	3
	12	No.	6	6	6	6	6
		Mean	23	24	26	26	25
		S.D.	3	3	4	4	4
	60	No.	6	6	6	6	6
		Mean	24	25	26	26	25
		S.D.	2	2	2	2	2
	300	No.	12	12	12	12	12
		Mean	23	25	26	27	26
		S.D.	1	2	3	3	3
Female	0	No.	12	12	12	12	12
		Mean	16	15	15	15	15
		S.D.	2	1	2	2	2
	12	No.	6	6	6	6	6
		Mean	16	15	15	15	16
		S.D.	2	1	1	2	1
	60	No.	6	6	6	6	6
		Mean	17	16	15	16	16
		S.D.	1	1	2	2	2
	300	No.	12	12	12	12	12
		Mean	17	17**	17**	17**	18**
		S.D.	3	1D	2D	1D	1D

Unit : g/rat/day
** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 4-2 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Food consumption (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery 7	Day of recovery 14
Male	0	No.	6	6
		Mean	30	31
		S.D.	2	2
	300	No.	6	6
		Mean	27*	28
		S.D.	2T	2
Female	0	No.	6	6
		Mean	18	17
		S.D.	2	1
	300	No.	6	6
		Mean	20*	19*
		S.D.	1T	1T

Unit : g/rat/day
* : $p<0.05$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 5-1 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein						2) Ketone body						3) Glucose					
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
	0	12	0	0	0	0	1	0	0	4	7	0	5	5	2	0	0	3	5	4	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Male	12	6	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	3	3	0	0	0	1	3	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	0	4	1	0	0	1	0	5	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	300	12	0	0	0	1	5	2	1	2	1	0	2	7	3	0	0	1	2	9	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	0	12	0	0	1	7	1	3	0	0	0	4	2	3	3	0	0	4	3	4	1	0	0	12	0	0	0	0	0
Female	12	6	0	0	0	1	2	2	1	0	0	2	2	2	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	1	0	1	3	1	1	4	1	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	300	12	0	0	1	5	2	0	0	3	1	2	0	9	1	0	0	5	4	3	0	0	0	12	0	0	0	0	0

1) - : <10 mg/dL +- : 10 - 25 mg/dL + : 26 - 85 mg/dL ++ : 86 - 250 mg/dL +++ : 251 - 600 mg/dL ++++ : >600 mg/dL
2) - : <5 mg/dL +- : 5 - 7.5 mg/dL + : 7.6 - 30 mg/dL ++ : 31 - 70 mg/dL +++ : 71 - 125 mg/dL ++++ : >125 mg/dL
3) - : <30 mg/dL +- : 30 - 60 mg/dL + : 61 - 125 mg/dL ++ : 126 - 250 mg/dL +++ : 251 - 750 mg/dL ++++ : >750 mg/dL

Table 5-2

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	11	0	1	0	0	0	12	0
Male	12	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0
	300	12	5	6	1	0	0	9	3	0	0	0	5	6	1	0	0	0	12	0
	0	12	10	0	1	1	0	12	0	0	0	0	9	3	0	0	0	0	12	0
Female	12	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
	300	12	11	0	0	0	1	12	0	0	0	0	8	4	0	0	0	0	12	0

4) - : <0.03 mg/dL +- : 0.03 - 0.05 mg/dL + : 0.06 - 0.15 mg/dL ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL +++ : >0.75 mg/dL
5) - : <0.5 mg/dL + : 0.5 - 1.5 mg/dL ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL ++++ : >10.0 mg/dL
6) +- : <2.0 mg/dL + : 2.0 - 3.5 mg/dL ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL ++++ : >12.0 mg/dL
7) LY : Light yellow Y : Yellow DY : Dark yellow

Table 5-3

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 4 of administration period)

			URINE SEDIMENT																																							
			RBC					WBC					SEC					SREC					Cast			PS					CO				
Sex	Dose mg/kg	No.	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++
	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	9	3	0	0	0	12	0	0	0	0
Male	12	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	300	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0
	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	9	3	0	0	0	12	0	0	0	0
Female	12	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	4	2	0	0	0	6	0	0	0	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	3	2	1	0	0	4	1	0	1	0
	300	12	12	0	0	0	0	10	2	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	6	2	4	0	0	12	0	0	0	0

SEC : Squamous Epithelial Cell
SREC : Small Round Epithelial Cell
PS : Phosphate Salts
CO : Calcium Oxalate

- : Negative
+- : Slight
+ : Mild
++ : Moderate
+++ : Severe

Table 5-4 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Water intake and urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
	0	12	Mean	39	8.6	2056
			S.D.	8	4.2	495
Male	12	6	Mean	41	9.6	1875
			S.D.	6	3.8	373
	60	6	Mean	37	7.8	1964
			S.D.	3	3.1	330
	300	12	Mean	44	9.2	2127
			S.D.	10	3.9	503
	0	12	Mean	29	3.8	2470
			S.D.	9	2.5	805
Female	12	6	Mean	31	5.4	2294
			S.D.	6	3.9	830
	60	6	Mean	27	4.3	2615
			S.D.	5	1.7	490
	300	12	Mean	30	4.1	2567
			S.D.	5	1.2	295

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 5-5 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein						2) Ketone body						3) Glucose					
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	6	0	0	0	0	0	0	0	2	4	1	2	3	0	0	0	2	2	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	300	6	0	0	0	0	0	0	1	2	3	0	4	1	1	0	0	2	2	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Female	0	6	0	0	0	4	1	0	0	0	1	2	4	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	300	6	0	0	0	2	0	0	0	3	1	3	1	2	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0

1) - : <10 mg/dL +- : 10 - 25 mg/dL + : 26 - 85 mg/dL ++ : 86 - 250 mg/dL +++ : 251 - 600 mg/dL ++++ : >600 mg/dL
2) - : <5 mg/dL +- : 5 - 7.5 mg/dL + : 7.6 - 30 mg/dL ++ : 31 - 70 mg/dL +++ : 71 - 125 mg/dL ++++ : >125 mg/dL
3) - : <30 mg/dL +- : 30 - 60 mg/dL + : 61 - 125 mg/dL ++ : 126 - 250 mg/dL +++ : 251 - 750 mg/dL ++++ : >750 mg/dL

Table 5-6

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	300	6	5	0	0	1	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
Female	0	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	300	6	4	2	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0

4) - : <0.03 mg/dL +- : 0.03 - 0.05 mg/dL + : 0.06 - 0.15 mg/dL ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL +++ : >0.75 mg/dL
5) - : <0.5 mg/dL + : 0.5 - 1.5 mg/dL ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL ++++ : >10.0 mg/dL
6) +- : <2.0 mg/dL + : 2.0 - 3.5 mg/dL ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL ++++ : >12.0 mg/dL
7) LY : Light yellow Y : Yellow DY : Dark yellow

Table 5-7

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.	RBC -	RBC +-	RBC +	RBC ++	RBC +++	WBC -	WBC +-	WBC +	WBC ++	WBC +++	SEC -	SEC +-	SEC +	SEC ++	SEC +++	SREC -	SREC +-	SREC +	SREC ++	SREC +++	Cast -	Cast +-	Cast +	PS -	PS +-	PS +	PS ++	PS +++	CO -	CO +-	CO +	CO ++	CO +++
Male	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	3	2	1	0	0	6	0	0	0	0
	300	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	3	3	0	0	0	6	0	0	0	0
Female	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	4	1	1	0	0	6	0	0	0	0
	300	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	2	3	1	0	0	6	0	0	0	0

URINE SEDIMENT; PS and CO: CRYSTALLIZATION

SEC : Squamous Epithelial Cell
SREC : Small Round Epithelial Cell
PS : Phosphate Salts
CO : Calcium Oxalate

\- : Negative
+- : Slight
\+ : Mild
++ : Moderate
+++ : Severe

Table 5-8 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Water intake and urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	6	Mean	45	15.0	1958
			S.D.	6	7.0	526
	300	6	Mean	47	15.8	1787
			S.D.	15	8.8	595
Female	0	6	Mean	33	4.8	2470
			S.D.	7	1.6	751
	300	6	Mean	30	7.4	2240
			S.D.	5	3.7	483

No significant difference between treated group and control group.

Table 6-1 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC $\times 10^4/\mu L$	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	Reticul. %	PLT $\times 10^4/\mu L$	PT s	APTT s	FIB mg/dL
Male	0	6	Mean	820	15.2	45.3	55.2	18.5	33.6	2.3	123.2	14.3	21.7	297
			S.D.	22	0.4	1.9	1.6	0.3	0.5	0.4	14.3	2.1	3.9	23
	12	6	Mean	821	15.1	45.4	55.4	18.4	33.2	2.5	122.3	14.5	22.0	295
			S.D.	59	0.5	1.8	2.2	0.9	0.5	0.4	12.4	1.7	3.8	33
	60	6	Mean	836	15.2	46.2	55.4	18.3	33.0	2.6	119.6	13.5	20.5	325
			S.D.	46	0.4	1.7	2.0	0.6	0.4	0.5	9.6	1.3	1.6	44
	300	6	Mean	813	14.4	44.6	54.9	17.7	32.3**	3.2*	127.8	15.5	25.5	384**
			S.D.	32	0.8	2.5	1.4	0.4	0.4D	0.6D	8.9	1.9	2.3	46D
Female	0	6	Mean	826	15.3	44.2	53.5	18.6	34.7	1.7	131.9	11.8	16.9	244
			S.D.	34	0.9	2.1	1.0	0.5	0.4	0.4	14.5	0.4	0.9	40
	12	6	Mean	823	15.3	44.5	54.1	18.6	34.4	2.2	131.0	11.7	17.9	220
			S.D.	30	0.4	1.2	2.1	0.7	0.3	0.5	11.5	0.5	1.2	17
	60	6	Mean	831	15.3	44.6	53.7	18.5	34.3	1.8	135.0	11.5	17.1	243
			S.D.	22	0.5	1.9	1.4	0.5	0.4	0.1	18.3	0.3	0.8	15
	300	6	Mean	821	14.7	43.6	53.1	17.9	33.7**	2.3*	132.5	11.0**	17.2	276
			S.D.	26	0.5	1.4	1.9	0.6	0.3D	0.6D	10.6	0.4D	3.7	30

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

Table 6-2

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC $\times 10^2/\mu L$	Differential leukocyte counts (%) LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	91.5	77.3	19.5	0.9	0.5	1.4	0.5
			S.D.	30.5	5.4	5.4	0.4	0.1	0.3	0.2
	12	6	Mean	99.7	80.8	16.1	0.9	0.5	1.4	0.4
			S.D.	36.4	4.3	4.2	0.3	0.1	0.2	0.1
	60	6	Mean	96.1	77.6	18.7	0.9	0.4	1.9	0.5
			S.D.	18.3	4.4	4.6	0.4	0.2	0.5	0.2
	300	6	Mean	112.8	77.2	19.0	0.8	0.5	1.9	0.6
			S.D.	16.3	2.6	2.4	0.4	0.1	0.5	0.1
Female	0	6	Mean	69.6	81.1	14.9	1.1	0.3	1.9	0.7
			S.D.	13.2	5.8	5.4	0.4	0.1	1.1	0.3
	12	6	Mean	75.8	78.0	18.8	0.9	0.4	1.3	0.6
			S.D.	14.7	5.0	5.1	0.2	0.1	0.3	0.2
	60	6	Mean	78.6	82.0	13.8	1.7	0.5	1.6	0.5
			S.D.	14.8	4.0	3.3	0.8	0.1	0.5	0.2
	300	6	Mean	88.9	78.1	18.0	1.2	0.4	1.9	0.5
			S.D.	21.5	6.5	6.5	0.4	0.1	0.2	0.1

LUC : Large unstained cells
No significant difference in any treated groups from control group.

Table 6-3 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Differential leukocyte counts ($\times 10^2/\mu L$)					
				LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
	0	6	Mean	71.3	17.3	0.8	0.4	1.3	0.5
			S.D.	27.2	5.7	0.2	0.3	0.4	0.5
Male	12	6	Mean	80.9	15.8	0.9	0.5	1.3	0.4
			S.D.	31.2	5.8	0.5	0.2	0.3	0.2
	60	6	Mean	74.9	17.7	0.9	0.4	1.8	0.5
			S.D.	16.8	3.6	0.5	0.2	0.4	0.2
	300	6	Mean	87.1	21.4	0.9	0.5	2.2**	0.6
			S.D.	13.0	3.8	0.5	0.2	0.7D	0.1
	0	6	Mean	56.2	10.5	0.8	0.3	1.4	0.5
			S.D.	9.9	4.7	0.3	0.1	0.8	0.3
Female	12	6	Mean	59.4	13.9	0.7	0.3	1.0	0.5
			S.D.	13.8	3.0	0.1	0.1	0.4	0.2
	60	6	Mean	64.6	10.8	1.3	0.4	1.2	0.4
			S.D.	12.9	3.0	0.6	0.1	0.5	0.3
	300	6	Mean	68.8	16.5	1.1	0.4	1.8	0.5
			S.D.	14.6	7.6	0.4	0.2	0.5	0.2

LUC : Large unstained cells
** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 6-4 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC $\times 10^4/\mu L$	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	Reticul. %	PLT $\times 10^4/\mu L$	PT s	APTT s	FIB mg/dL
Male	0	6	Mean	878	16.1	46.6	53.1	18.3	34.5	2.2	129.9	12.8	20.2	259
			S.D.	21	0.3	1.1	0.9	0.4	0.4	0.2	10.9	1.1	2.4	19
	300	6	Mean	886	15.1**	44.9**	50.7*	17.1**	33.7**	2.6	123.8	16.4**	22.5	306**
			S.D.	33	0.3T	0.7T	1.9T	0.7T	0.3T	0.7	8.7	1.8T	2.5	23T
Female	0	6	Mean	854	15.3	43.7	51.3	18.0	35.1	2.0	130.0	12.0	18.9	188
			S.D.	30	0.4	0.9	1.3	0.4	0.2	0.6	15.4	0.4	2.4	15
	300	6	Mean	821*	14.7**	43.1	52.6	17.9	34.0**	2.1	136.7	11.4	18.2	227**
			S.D.	17T	0.3T	0.9	1.7	0.5	0.3T	0.4	7.8	0.5	1.0	25T

* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 6-5 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC $\times 10^2/\mu L$	Differential leukocyte counts (%) LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	105.4	80.3	15.9	1.2	0.4	1.8	0.5
			S.D.	22.6	5.0	4.8	0.5	0.1	0.6	0.2
	300	6	Mean	107.3	81.1	15.7	0.7	0.4	1.6	0.4
			S.D.	20.1	4.9	4.8	0.3	0.1	0.3	0.1
Female	0	6	Mean	52.5	77.5	19.7	0.9	0.3	1.2	0.5
			S.D.	5.1	8.4	8.5	0.2	0.2	0.3	0.3
	300	6	Mean	70.2	77.5	19.0	1.2	0.3	1.5	0.6
			S.D.	22.7	7.9	7.8	0.3	0.1	0.3	0.2

LUC : Large unstained cells
No significant difference between treated group and control group.

Table 6-6 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Differential leukocyte counts ($X10^2/\mu L$)					
				LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	85.5	15.9	1.1	0.5	1.9	0.6
			S.D.	22.2	1.4	0.3	0.2	0.8	0.3
	300	6	Mean	87.4	16.6	0.7*	0.5	1.7	0.4
			S.D.	19.1	5.8	0.2T	0.1	0.3	0.1
Female	0	6	Mean	40.6	10.4	0.5	0.2	0.6	0.3
			S.D.	5.6	4.5	0.1	0.1	0.2	0.2
	300	6	Mean	55.2	12.5	0.8*	0.3	1.0	0.4
			S.D.	21.3	4.1	0.3AT	0.1	0.4	0.3

LUC : Large unstained cells
* : $p<0.05$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test
AT : Aspin-Welch t-test

Table 7-1 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Blood chemistry (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST IU/L	ALT IU/L	LDH IU/L	γ-GTP IU/L	ALP IU/L	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T-BIL mg/dL	GLU mg/dL
	0	6	Mean	61	26	55	1	632	50	39	85	0.1	130
			S.D.	8	6	14	1	142	3	8	7	0.0	7
Male	12	6	Mean	56	25	49	1	634	61	45	101	0.1	136
			S.D.	8	5	5	0	137	7	28	9	0.1	10
	60	6	Mean	57	26	54	1	656	73**	54	116**	0.1	148
			S.D.	10	6	14	0	100	12DT	26	16D	0.0	15
	300	6	Mean	62	42**	55	3**	584	77**	27	129**	0.1	145
			S.D.	8	10D	7	2DT	90	18DT	10	27D	0.0	27
	0	6	Mean	57	18	51	1	363	62	14	106	0.1	97
			S.D.	5	2	12	0	83	15	7	21	0.0	13
Female	12	6	Mean	56	18	46	1	388	62	15	114	0.1	120**
			S.D.	6	3	9	0	117	10	5	13	0.0	13D
	60	6	Mean	58	20	52	1	352	58	11	101	0.1	101
			S.D.	6	3	12	0	68	9	5	12	0.1	6
	300	6	Mean	52	26	48	2	317	97**	19	154**	0.1	94
			S.D.	11	12	16	2	116	26D	3	32D	0.0	5

** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test
DT : Dunnett-type rank test

Table 7-2 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Blood chemistry (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN mg/dL	CRNN mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G
	0	6	Mean	11	0.23	144	4.7	107	9.7	7.7	6.1	3.3	1.19
			S.D.	2	0.03	2	0.2	3	0.2	0.4	0.2	0.1	0.06
Male	12	6	Mean	10	0.21	145	4.8	108	9.9	8.3	6.1	3.3	1.16
			S.D.	2	0.03	1	0.4	1	0.1	0.9	0.1	0.1	0.06
	60	6	Mean	11	0.20	145	4.7	106	10.1**	8.2	6.4	3.4	1.12
			S.D.	2	0.02	2	0.2	1	0.2D	0.5	0.1	0.1	0.06
	300	6	Mean	10	0.23	144	4.7	106	10.2**	7.9	6.6**	3.4	1.07**
			S.D.	2	0.05	1	0.2	2	0.2D	0.7	0.4D	0.2	0.06D
	0	6	Mean	14	0.28	142	4.4	110	9.6	7.1	6.1	3.4	1.28
			S.D.	2	0.03	2	0.4	2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.10
Female	12	6	Mean	16	0.29	143	4.2	110	9.6	7.3	6.3	3.6	1.37
			S.D.	2	0.03	1	0.3	1	0.2	0.7	0.4	0.3	0.09
	60	6	Mean	16	0.30	141	4.7	109	9.7	7.3	6.4	3.6	1.26
			S.D.	5	0.06	0	0.2	1	0.3	0.2	0.3	0.1	0.08
	300	6	Mean	16	0.26	141	4.6	107*	10.2**	7.4	6.9**	3.8*	1.24
			S.D.	3	0.06	1	0.2	1D	0.2D	0.5	0.3D	0.2D	0.08

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

Table 7-3 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Blood chemistry (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST IU/L	ALT IU/L	LDH IU/L	γ-GTP IU/L	ALP IU/L	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T-BIL mg/dL	GLU mg/dL
Male	0	6	Mean	53	22	49	1	468	70	80	112	0.1	147
			S.D.	5	2	12	0	104	15	28	20	0.0	10
	300	6	Mean	58	29*	53	1	452	72	40*	110	0.1	143
			S.D.	5	5AT	15	0	84	9	12AT	10	0.0	10
Female	0	6	Mean	56	20	35	1	315	64	10	113	0.1	108
			S.D.	3	3	7	0	49	12	3	18	0.0	12
	300	6	Mean	48**	19	38	1	216*	90	27*	158	0.1	122
			S.D.	3T	1	4	0	63T	32	14AT	49	0.0	12

* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test
AT : Aspin-Welch t-test

Table 7-4 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Blood chemistry (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN mg/dL	CRNN mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G
Male	0	6	Mean	15	0.26	143	4.5	105	10.0	7.2	6.3	3.2	1.06
			S.D.	2	0.04	1	0.4	2	0.1	0.6	0.2	0.1	0.09
	300	6	Mean	14	0.23	143	4.7	106	9.7**	7.6	6.3	3.4	1.14
			S.D.	1	0.02	1	0.2	1	0.3T	0.5	0.2	0.1	0.08
Female	0	6	Mean	17	0.31	143	4.3	110	9.6	6.4	6.4	3.5	1.21
			S.D.	3	0.05	1	0.2	1	0.3	0.5	0.2	0.1	0.12
	300	6	Mean	18	0.30	143	4.6	109	10.0*	6.2	7.3**	4.0**	1.22
			S.D.	5	0.09	1	0.3	2	0.2T	0.3	0.4AT	0.3AT	0.08

* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test
AT : Aspin-Welch t-test

Table 8-1

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Male

	Dose mg/kg		Body weight g	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)
	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	390	2.04	530	1.37	11.92	0.67	2.77	61
		S.D.	41	0.12	162	0.21	1.42	0.13	0.29	10
Absolute	12	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	409	2.09	483	1.48	12.92	0.71	2.99	62
		S.D.	39	0.06	73	0.24	1.63	0.08	0.21	8
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	411	2.02	471	1.38	14.45	0.70	3.07	59
		S.D.	19	0.07	71	0.17	1.70	0.07	0.32	5
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	393	2.01	526	1.32	17.59**	0.80	3.04	49*
		S.D.	44	0.07	151	0.18	2.54D	0.18	0.33	8D
	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.53	135	0.35	3.06	0.17	0.71	16
		S.D.		0.05	35	0.05	0.09	0.02	0.04	2
Relative	12	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.51	118	0.36	3.15	0.18	0.73	15
		S.D.		0.05	16	0.05	0.18	0.02	0.04	1
	60	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.49	115	0.33	3.51*	0.17	0.75	15
		S.D.		0.03	17	0.03	0.26D	0.01	0.05	1
	300	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.52	134	0.34	4.48**	0.20	0.78*	13**
		S.D.		0.06	35	0.03	0.47D	0.03	0.04D	2D

Statistical analysis of body weight was not done.
* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 8-2 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Male

	Dose mg/kg		Testis (R+L) g(g/100g BW)	Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)
	0	No.	6	6
		Mean	3.20	861
		S.D.	0.18	60
Absolute	12	No.	6	6
		Mean	2.83	833
		S.D.	0.84	177
	60	No.	6	6
		Mean	3.41	925
		S.D.	0.29	73
	300	No.	6	6
		Mean	3.37	946
		S.D.	0.22	77
	0	No.	6	6
		Mean	0.83	224
		S.D.	0.09	31
Relative	12	No.	6	6
		Mean	0.71	207
		S.D.	0.24	50
	60	No.	6	6
		Mean	0.83	226
		S.D.	0.09	25
	300	No.	6	6
		Mean	0.87	243
		S.D.	0.13	33

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-3

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Female

	Dose mg/kg		Body weight g	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)
	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	218	1.86	422	0.78	6.55	0.46	1.67	73
		S.D.	19	0.08	101	0.06	0.78	0.10	0.20	13
Absolute	12	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	215	1.89	407	0.80	6.56	0.40	1.52	70
		S.D.	14	0.08	115	0.04	0.48	0.02	0.07	11
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	228	1.89	383	0.80	7.22	0.44	1.73	74
		S.D.	16	0.08	78	0.07	0.44	0.04	0.10	6
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	233	1.88	494	0.87	9.91**	0.53	1.94*	67
		S.D.	12	0.04	138	0.09	0.75D	0.05	0.20D	6
	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.86	194	0.36	3.00	0.21	0.77	34
		S.D.		0.05	42	0.02	0.18	0.03	0.04	6
Relative	12	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.89	190	0.37	3.06	0.19	0.71	33
		S.D.		0.08	56	0.02	0.13	0.02	0.05	5
	60	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.84	168	0.35	3.17	0.19	0.76	33
		S.D.		0.09	30	0.02	0.12	0.01	0.06	2
	300	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.81	210	0.37	4.25**	0.23	0.83	29
		S.D.		0.04	51	0.03	0.17D	0.02	0.07	2

Statistical analysis of body weight was not done.
* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 8-4

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Female

	Dose mg/kg		Ovary (R+L) mg(mg/100g BW)	Uterus mg(mg/100g BW)
	0	No.	6	6
		Mean	85.2	435
		S.D.	15.0	84
Absolute	12	No.	6	6
		Mean	77.2	501
		S.D.	10.8	78
	60	No.	6	6
		Mean	96.5	391
		S.D.	16.8	47
	300	No.	6	6
		Mean	93.8	394
		S.D.	12.0	29
	0	No.	6	6
		Mean	38.9	200
		S.D.	4.6	36
Relative	12	No.	6	6
		Mean	36.0	234
		S.D.	4.8	35
	60	No.	6	6
		Mean	42.6	172
		S.D.	8.9	27
	300	No.	6	6
		Mean	40.2	169
		S.D.	5.0	19

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-5

A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Male

	Dose mg/kg		Body weight g	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	493	2.08	519	1.54	15.15	0.86	3.03	73
		S.D.	33	0.10	72	0.16	1.65	0.18	0.26	15
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	419	2.05	470	1.35	12.98*	0.79	3.06	60
		S.D.	40	0.09	77	0.21	1.00T	0.19	0.29	7
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.42	106	0.31	3.07	0.17	0.62	15
		S.D.		0.04	16	0.02	0.20	0.02	0.04	3
	300	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.49**	113	0.32	3.11	0.19	0.73**	14
		S.D.		0.03T	16	0.03	0.19	0.03	0.05T	2

Statistical analysis of body weight was not done.
* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 8-6 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Male

	Dose mg/kg		Testis (R+L) g(g/100g BW)	Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	3.34	1184
		S.D.	0.23	111
	300	No.	6	6
		Mean	3.35	1173
		S.D.	0.25	46
Relative	0	No.	6	6
		Mean	0.68	241
		S.D.	0.04	25
	300	No.	6	6
		Mean	0.81**	282*
		S.D.	0.09T	21T

* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 8-7 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Female

	Dose mg/kg		Body weight g	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	232	1.94	359	0.77	6.06	0.50	1.67	65
		S.D.	20	0.08	92	0.04	0.58	0.10	0.18	7
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	245	1.89	338	0.87*	7.82**	0.50	1.84	67
		S.D.	14	0.13	42	0.09AT	0.79T	0.06	0.11	7
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.84	154	0.33	2.61	0.21	0.72	28
		S.D.		0.07	35	0.02	0.05	0.03	0.03	4
	300	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.78	139	0.36	3.19**	0.21	0.75	27
		S.D.		0.08	21	0.03	0.17AT	0.02	0.03	1

Statistical analysis of body weight was not done.
* : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ (Significant difference from control group)
T : Student's t-test
AT : Aspin-Welch t-test

Table 8-8 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Female

	Dose mg/kg		Ovary (R+L) mg(mg/100g BW)	Uterus mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	90.5	525
		S.D.	23.4	139
	300	No.	6	6
		Mean	100.2	502
		S.D.	12.4	137
Relative	0	No.	6	6
		Mean	38.8	228
		S.D.	8.2	66
	300	No.	6	6
		Mean	40.9	207
		S.D.	4.1	64

No significant difference between treated group and control group.

Table 9-1 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Gross pathological findings (After administration period)

Organs / Findings	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
	Dose(mg/kg):	0	12	60	300	0	12	60	300
	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6
Kidney									
Cyst		0	0	0	0	0	0	1	0
Liver									
Large		0	0	1	5	0	0	0	6
Stomach									
Focus,dark red,glandular stomach		0	0	0	0	1	0	0	1
Testis									
Small		0	1	0	0	-	-	-	-
Thyroid									
Small		0	0	0	0	0	0	1	0

M : Male, F : Female
- : Not applicable

Table 9-2 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Gross pathological findings (After recovery period)

Organs / Findings	Sex:	M	M	F	F
	Dose(mg/kg):	0	300	0	300
	Number:	6	6	6	6
All tissues					
Not remarkable		6	6	6	6

M : Male, F : Female

Table 10-1 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs / Findings	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
	Dose(mg/kg):	0	12	60	300	0	12	60	300
	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6
Adrenal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow,femoral									
Number examined		6	6	6	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	6	5	2	4	0	0	4
Hypercellularity,bone marrow		1	0	1	4	2	0	0	2
minimal		1	0	1	4	2	0	0	2
Bone+Bone marrow,sternal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebellum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebrum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Epididymis									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	0	0	6	-	-	-	-
Eye									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Heart									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,duodenum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,jejunum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,ileum(Peyer's patch)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,cecum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,colon									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,rectum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

M : Male, F : Female
- : Not applicable

Table 10-2 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs / Findings	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
	Dose(mg/kg):	0	12	60	300	0	12	60	300
	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6
Kidney									
Number examined		6	0	0	6	6	0	1	6
Not remarkable		6	0	0	5	4	0	0	6
Cyst		0	0	0	0	0	0	1	0
mild		0	0	0	0	0	0	1	0
Regeneration,tubular		0	0	0	1	1	0	0	0
minimal		0	0	0	1	1	0	0	0
Mineralization,papillary		0	0	0	0	2	0	0	0
minimal		0	0	0	0	2	0	0	0
Cell infiltration,interstitial		0	0	0	1	0	0	0	0
minimal		0	0	0	1	0	0	0	0
Liver									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Vacuolation,hepatocytic,perilobular		6	6	5	2	6	6	6	5
minimal		3	1	3	2	1	3	2	4
mild		3	5	2	0	5	3	4	1
Microgranuloma		6	3	3	3	2	1	2	2
minimal		6	3	3	3	2	1	2	2
Hypertrophy,bile ductal epithelium		0	0	0	3	0	0	0	2
minimal		0	0	0	3	0	0	0	1
mild		0	0	0	0	0	0	0	1
Hypertrophy,hepatocytic		0	0	0	6	0	0	0	5
minimal		0	0	0	4	0	0	0	5
mild		0	0	0	2	0	0	0	0
Lung(bronchus)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	5	5	0	0	6
Hemorrhage,focal		0	0	0	1	1	0	0	0
minimal		0	0	0	1	1	0	0	0
Accumulation,alveolar macrophage		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph node,mesenteric									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Lymph node,submandibular									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Ovary									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6
Parathyroid									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Pituitary									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Prostate									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		5	0	0	4	-	-	-	-
Cell infiltration,interstitial		1	0	0	2	-	-	-	-
minimal		0	0	0	2	-	-	-	-
mild		1	0	0	0	-	-	-	-

M : Male, F : Female
- : Not applicable

Table 10-3 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs / Findings	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
	Dose(mg/kg):	0	12	60	300	0	12	60	300
	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6
Sciatic nerve									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Skeletal muscle,femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spinal cord,thoracic									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spleen									
Number examined		6	6	6	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	6	6	5	6	0	0	6
Hematopoiesis,extramedullary		0	0	0	1	0	0	0	0
minimal		0	0	0	1	0	0	0	0
Stomach									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	5	0	0	5
Erosion,glandular stomach		0	0	0	0	1	0	0	1
minimal		0	0	0	0	1	0	0	1
Testis									
Number examined		6	1	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	0	0	6	-	-	-	-
Atrophy,seminiferous tubular		0	1	0	0	-	-	-	-
severe		0	1	0	0	-	-	-	-
Thymus									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Thyroid									
Number examined		6	0	0	6	6	0	1	6
Not remarkable		3	0	0	4	6	0	1	6
Ectopic thymus		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Remnant,ultimobranchial body		2	0	0	2	0	0	0	0
minimal		2	0	0	2	0	0	0	0
Trachea									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Urinary bladder									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Uterus									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6

M : Male, F : Female
- : Not applicable

Table 10-4 A 28-day oral toxicity study of N-Ethyl-N-crotonoyl-2-toluidine in rats with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After recovery period)

Organs / Findings	Sex:	M	M	F	F
	Dose(mg/kg):	0	300	0	300
	Number:	6	6	6	6
Bone+Bone marrow,femoral					
Number examined		6	6	0	0
Not remarkable		6	6	0	0
Liver					
Number examined		6	6	6	6
Vacuolation,hepatocytic,perilobular		6	6	6	6
minimal		0	6	6	6
mild		6	0	0	0
Microgranuloma		5	3	4	1
minimal		5	3	4	1
Hypertrophy,bile ductal epithelium		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Spleen					
Number examined		6	6	0	0
Not remarkable		6	6	0	0

M : Male, F : Female