

# 最終報告書

表 題：2,5-ジメチルアニリンのラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

試験番号：SR07169

株式会社 化合物安全性研究所

## 目次

	頁
表紙-----	1
目次-----	5
要約-----	12
緒言-----	13
材料および方法-----	13
成績-----	27
考察-----	32
参考資料-----	34

## Figures

1 Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	36
2 Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	37
3 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	38
4 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	39
5 Water intake of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	40
6 Water intake of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	41

## Tables

1 General appearance of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	42
2 General appearance of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	43

3	Detailed clinical observation, in the cage, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	44
4	Detailed clinical observation, on the hand, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	45
5	Detailed clinical observation, in the open-field, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	46
6	Detailed clinical observation, in the cage, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	47
7	Detailed clinical observation, on the hand, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	48
8	Detailed clinical observation, in the open-field, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	49
9	Functional observation of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	50
10	Functional observation of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	51
11	Grip strength and motor activity measurements of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	52
12	Grip strength and motor activity measurements of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	53
13	Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	54
14	Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	55
15	Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	56
16	Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	57
17	Water intake of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	58
18	Water intake of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	59
19	Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	60
20	Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	61

21	Urinary findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	62
22	Urinary findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	63
23	Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	64
24	Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	66
25	Hematological findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	68
26	Hematological findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	69
27	Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	70
28	Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	72
29	Biochemical findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	74
30	Biochemical findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	75
31	Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	76
32	Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	77
33	Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	78
34	Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	79
35	Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	80
36	Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	81
37	Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	82
38	Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) -----	83

## 要 約

2,5-ジメチルアニリンの0(対照、トウモロコシ油)、12、60 および 300 mg/kg/day を1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0 および 300 mg/kg について1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し休薬による毒性の回復性を併せて検討し、以下の成績を得た。

1. 一般状態では、300 mg/kg の雄雌でよろめき歩行や流涙、流涎等が散見された。
2. 体重および摂餌量では、300 mg/kg の雄で投与期間を通して有意な低値が認められ、投与期間中の体重増加量および増加率にも有意な差が認められた。
3. 飲水量では、300 mg/kg の雄雌で投与期間を通して有意な高値が認められ、回復期間にも雄雌ともに有意な高値あるいは高値傾向が認められた。
4. 尿検査では、300 mg/kg の雄雌で尿量の有意な増加ならびに尿比重および蛋白質濃度の有意な低下が認められ、雄でpHの有意な低下が認められた。
5. 血液学的検査では、300 mg/kg の雄雌で赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度、雄で平均赤血球ヘモグロビン濃度の低値が認められ、さらに雄雌でメトヘモグロビンおよび網赤血球数の高値が認められた。  
さらに、300 mg/kg の雄では分葉核球比率の高値およびリンパ球比率の低値、60 mg/kg の以上の雌でプロトロンビン時間の有意な延長が認められた。
6. 血液化学的検査では、12 mg/kg の雄で  $\alpha_1$ -グロブリン分画比の有意な低値、60 mg/kg 以上の雌に蛋白分画で  $\alpha_1$ -グロブリン分画比の低値および  $\beta$ -グロブリン分画比の高値等が認められ、300 mg/kg の雄雌に総ビリルビン、蛋白分画で  $\alpha_2$ -グロブリン分画比の高値、尿素窒素の高値等、肝機能および腎機能の変化が認められた。
7. 剖検所見では、60 mg/kg の雄および 300 mg/kg の雄雌に前胃の限局性粘膜肥厚、300 mg/kg の雄雌に腎臓の乳頭部黄白色化が認められた。
8. 器官重量では、300 mg/kg の雄雌に肝臓、腎臓および脾臓の相対重量に高値が認められた。
9. 病理組織学的検査では、60 mg/kg 以上の雄雌に前胃の扁平上皮過形成および過角化、雄に腎臓の近位尿細管上皮の好酸性小体のグレード増強あるいは例数増加が認められ、300 mg/kg では雄雌に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、腎臓の乳頭部を中心とした領域の水腫、壊死、炎症性細胞浸潤等、脾臓にうっ血およびヘモジデリン沈着の亢進、雌に大腿骨骨髓に赤血球の造血亢進が認められた。
10. 投与期間終了時に認められた以上の変化には、回復性が認められた。
11. 詳細な一般状態観察および機能検査には、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における2,5-ジメチルアニリンの無影響量(NOEL)は雄で12 mg/kg/day未満、雌で12 mg/kg/dayと推察する。

## 緒 言

2,5-ジメチルアニリンの0(対照、トウモロコシ油)、12、60 および 300 mg/kg/day を1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0および300 mg/kgについて1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し休薬による毒性の回復性を併せて検討した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

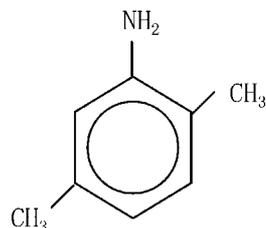
名称 : 2,5-ジメチルアニリン ; 2,5-Dimethylaniline <sup>1, 2)</sup>

別名 : 1-AMINO-2,5-DIMETHYLBENZENE <sup>2)</sup>  
 2,5-キシリジン <sup>2)</sup> ; 2,5-Xylidine <sup>1, 2)</sup>  
 p-Xylidine <sup>1)</sup>  
 2-AMINO-1,4-XYLENE <sup>2)</sup>  
 キシリジン <sup>2)</sup>

CAS No. : 95-78-3 <sup>1, 2)</sup>

化審法官報公示整理番号 : (3)-129 <sup>1, 2)</sup>

示性式(構造式) :  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3\text{NH}_2$  <sup>1, 2)</sup>



分子式 :  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$  <sup>2)</sup>

分子量 : 121.2 <sup>2)</sup>

物理化学的性質 : 外観 ; clear light brown liquid(Appendix 1-1)、  
 液体 <sup>1)</sup>、透明 <sup>1)</sup>、うすい黄色 <sup>1)</sup>、無色油状 <sup>2)</sup>

比重 ; 0.9774(20°C) <sup>1)</sup>、0.979(21°C) <sup>2)</sup>

屈折率 ; 1.5599(20°C、589 nm、Appendix 1-1)

融点 ; 155°C <sup>2)</sup>

沸点 ; 214°C <sup>2)</sup>

濃縮性 ; 無し～低い <sup>2)</sup>

LogPow ; 1.83<sup>1, 2)</sup>

溶解度 ; 微溶<sup>2)</sup>

- 純度 : 99.3% (GC、Appendix 1-1)  
 実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、被験物質の安定性について確認した (Appendix 1-2)。
- 不純物の名称およびその濃度 : 記載なし
- 入手量 : 500 g
- 安定性 : 光や空気の影響を受けて、徐々に着色する<sup>1)</sup>。  
 熱分解性 ; 加熱分解し、有毒な NOx ガスを発生<sup>2)</sup>。
- 保存条件 : 容器は密栓して冷暗所に保管した<sup>1)</sup>。  
 被験物質は受入後、冷蔵庫内に保存した (実測範囲 1~9°C)。
- 取扱上の注意 : 可燃性があるので、火気に注意した<sup>1)</sup>。  
 手袋、マスクおよび保護メガネを着用し、クリーンベンチ内で取り扱った。
- サンプリング : 被験物質サンプルとして、約 5 g を採取し、試験施設の資料保存室に保存した。
- 残余被験物質の処置 : 関連試験も含めすべての試験操作終了後、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。
- 有害性情報 : 吸入した時、皮膚に接触した時および飲み込んだ時有毒である<sup>1)</sup>。眼、呼吸器および皮膚を刺激する<sup>1)</sup>。蓄積性影響の危険がある<sup>1)</sup>。  
 急性毒性 ラット 経口 LD<sub>50</sub> 1120 mg/kg<sup>1)</sup>、1297 mg/kg<sup>2)</sup>  
 マウス 経口 LD<sub>50</sub> 841 mg/kg<sup>1, 2)</sup>  
 血液に影響を与え (メトヘモグロビン血症)、チアノーゼなどの症状が現れることがある<sup>1)</sup>。また、それらの症状は暴露後、時間が経過してから出現することがある<sup>1)</sup>。  
 変異原性あり<sup>2)</sup>。経口摂取で中程度の毒性を示す<sup>2)</sup>。動物実験で発癌性を示す<sup>2)</sup>。

## 2. 媒体

名称	: トウモロコシ油
ロット番号	: V8A6289
製造者	: ナカライテスク株式会社
保存条件	: 室温(実測範囲 21~25°C)
取扱上の注意	: 特になし。
使用期限	: 製造後 3 年

## 3. 投与液の調製および化学分析

### (1) 投与液の調製

被験物質をメートルグラスに精秤し、所定の濃度となるように媒体を添加後、スターラーを用いて溶解させた後、バイアル瓶に分注した。

被験物質はドラフト内で取扱い、調製の際にはマスク、手袋等を着用し、吸入、眼、皮膚および衣類等との接触を避けた。投与のために調製を 4 回行い、調製後は室温保存(実測範囲 21~25°C)して調製後 8 日以内に用いた。残余の投与液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

### (2) 投与液の化学分析

投与開始前に、被験物質の安定性を確認した。

被験物質調製液について、1 および 60 mg/mL 投与液中における調製後の室温保存 9 日間の安定性を確認した。その結果、残存率は室温保存 9 日間でそれぞれ 93.2 および 98.8%であり、この成績から、被験物質は調製液中で、室温保存 9 日間安定であると判断した(Appendix 2-1)。

初回および最終回調製時のすべての投与液について、被験物質の濃度を分析した結果、1.2、6 および 30 mg/mL 調製液の含有率は、所定の濃度に対して初回調製時で 101.7、102.7 および 101.7%、最終回調製時で 101.7、102.2 および 102.3%であった。これらの投与液はいずれも規定範囲とした 90~110%の範囲内にあり、かつ変動係数も 0.0~1.4%で規定の 5%以下であったことから、調製液の濃度は適正と判断した(Appendix 2-2 および 2-3)。

### (3) 濃度分析方法

標準物質として、被験物質を用いた。以下の割合で以下の溶液を調製した。なお、調製日を 0 日として起算した。

標準溶液の調製: 2,5-ジメチルアニリンの 20  $\mu$ L を 20 mL 容のメスフラスコに採取し、2,5-ジメチルアニリンの重量を正確に量りとった。テトラヒドロフランで定容して約 1000  $\mu$ g/mL 溶液を調製した(標準原液)。この液 1 mL を正確に 20 mL 容のメスフラスコに採取し、テトラヒドロフランで定容して約 50  $\mu$ g/mL 溶液とした(標準溶液)。調製は 1 回、HPLC への注入は 3 回とした。調製後は当日中に使用した。

移動相の調製：テトラヒドロフラン 400 mL に蒸留水 600 mL、酢酸 1 mL およびトリエチルアミンを 1 mL 加え、十分に混合したものを移動相とした。調製後は室温で保存し、18 日以内に使用した。

オートサンブラ洗浄液の調製：テトラヒドロフラン 400 mL に蒸留水 600 mL を加え、十分に混合したものをオートサンブラ洗浄液とした。調製後は室温で保存し、18 日以内に使用した。

洗浄用注入液の調製：テトラヒドロフランそのものを洗浄用注入液とした。

被験物質調製液の採取点数は、濃度確認試験および安定性試験については被験物質調製液の中層付近から 3 点とした。各被験物質調製液を採取し、被験物質の最終濃度が 15.0~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲内(可能な場合は 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  付近)、媒体の割合が 10%以下となるようにテトラヒドロフランを加えたものを試料溶液とした。試料溶液の調製は 1 点につき 1 回、HPLC への注入は各 1 回とした。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) の構成および測定条件は以下とした。

#### 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

UV-VIS Detector	L-4200	株式会社 日立製作所
Intelligent Pump	L-6200	株式会社 日立製作所
Column Oven	L-5025	株式会社 日立製作所
Autosampler	AS-2000	株式会社 日立製作所
Degasser	ERC-3315 $\alpha$	株式会社 イーアールシー
データ処理装置	Empower 2	日本ウォーターズ株式会社

#### 測定条件

カラム	: L-column ODS、4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm、 財団法人 化学物質評価研究機構
移動相	: テトラヒドロフラン/蒸留水/酢酸/トリエチルアミン (400 : 600 : 1 : 1)
オートサンブラ洗浄液	: テトラヒドロフラン/蒸留水 (400 : 600)
洗浄用注入液	: テトラヒドロフラン
測定波長	: 293 nm
カラム温度	: 40°C
流量	: 1 mL/min
注入量	: 10 $\mu\text{L}$
オートサンブラ温度	: 10°C
分析時間	: 12 分

システム適合性試験：測定日ごとに標準溶液を連続して6回注入した。2,5-ジメチルアニリンのピーク面積および保持時間について変動係数を求めた。

Empower 2 を用いて標準溶液のピーク面積と濃度から作成した検量線より、各試料溶液の測定濃度を求め、以下の式より調製液中の被験物質濃度、変動係数、含有率および残存率を算出した。

$$\text{被験物質濃度 (mg/mL)} = \frac{\text{測定濃度 } (\mu\text{g/mL}) \times \text{希釈係数}}{1000}$$

$$\text{変動係数 (\%)} = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100$$

$$\text{含有率 (\%)} = \frac{\text{被験物質濃度平均値}}{\text{調製液の表示濃度}} \times 100$$

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{保存後の被験物質濃度平均値}}{\text{調製時の被験物質濃度平均値}} \times 100$$

#### 4. 試験方法

##### (1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター生産の SPF Cr1:CD(SD) ラットを用いた。ラットは毒性試験等で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雄雌各 39 匹(発注数 雄雌各 37 匹)を 2008 年 8 月 20 日に 4 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 72~85 g、雌で 66~77 g であった。

##### (2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について馴化 1 日(受入日)から、雄雌とも馴化 7 日までの 6 日間、一般状態観察を 1 日 1 回、さらに受入時および群分け時(投与開始前々日)に体重測定を実施した。検疫および馴化期間中に異常は認められなかった。

##### (3) 群分け

検疫および馴化期間終了後、異常の認められない健康な動物を雄雌各 36 匹選抜して、5 週齢で試験に供した。検疫および馴化期間最終日(投与開始前々日)の体重に基づいて、層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行った。群分け時の動物の体重範囲は、雄で 127~146 g、雌で 109~126 g であり、平均体重(雄 136.6 g、雌 116.6 g)の±20%以内であった。選抜から外れた雄雌各 3 匹は試験から除外した。なお、選抜された動物について投与開始前日に一般状態に異常がないことを確認した。

なお、投与開始時の体重範囲は、雄で 140~168 g、雌で 111~139 g であり、平均体重(雄 157.1 g、雌 128.1 g)であった。

##### (4) 動物およびケージの識別

動物は、群分け前は受入時に油性フェルトペンで尾部に印を付け、群分け後は耳介に動物番号を入墨し、個体識別を行った。

飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および受入時の動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後は性別毎に色分けしたラベルに試験番号、試験群および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

## (5) 動物飼育

## 1) 飼育環境

動物は温度  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  (実測範囲  $21 \sim 25^\circ\text{C}$ )、湿度  $50 \pm 20\%$  (実測範囲  $43 \sim 57\%$ )、換気回数  $10 \sim 15$  回/時間、照明時間 12 時間 (8:00~20:00、人工照明) の動物飼育室 (308 号室) で飼育した。

## 2) 飼育器材および飼育方法

ブラケット式金属製金網床ケージ (260W×380D×180H, mm) に、検疫および馴化期間中は雄雌別に 3 匹ずつ、群分け後は 1 匹ずつ収容した。ケージおよび給餌器は群分け時および投与 7 日、その後は 2 週に 1 回交換した。受皿は週 2 回洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週 1 回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1 日 1 回実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用した。

## 3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製、 $\gamma$  線照射固型飼料 CRF-1 を、金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット (080509) の飼料について分析した。汚染物質の分析は Eurofins Scientific 社が、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった (Appendix 3-1~3-2)。

## 4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。ただし、尿検査時には給水器を使用した。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2008 年 7 月 1 日、2008 年 10 月 1 日および 2009 年 1 月 7 日に当該飼育室と同系統配管の最末端 (306 号室) から試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社が行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった (Appendix 4-1~4-3)。

## (6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号を以下に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
<毒性試験群>				
対照群	0	0	6 (101~106)	6 (151~156)
低用量群	12	1.2	6 (201~206)	6 (251~256)
中用量群	60	6	6 (301~306)	6 (351~356)
高用量群	300	30	6 (401~406)	6 (451~456)
<回復性試験群>				
対照群	0	0	6 (107~112)	6 (157~162)
高用量群	300	30	6 (407~412)	6 (457~462)

対照群には、他の群と同様の方法で媒体のみを投与した。

## (7) 被験物質の投与

## 1) 投与量の設定

1群につき雄雌各3匹のSD系ラット[Cr1:CD(SD)]に、トウモロコシ油に溶解させた被験物質の0(対照)、35、150および600 mg/kgを14日間反復経口投与した予備試験<sup>3)</sup>の結果、150あるいは600 mg/kgで尿比重およびpHの低下を伴う尿量の増加や貧血傾向、体重増加抑制、重量増加を伴う肝臓および脾臓の肥大等が認められた。このことから、28日間反復経口投与毒性試験では、投与期間が2倍となることを考慮し、高用量に予備試験の高用量の1/2に相当する300 mg/kg/dayを設定し、以下公比5で除した60および12 mg/kg/dayを中用量および低用量に設定した。なお、対照群および300 mg/kg/dayの2用量については28日間投与後14日間休薬による回復性を検討する群を設定した。

## 2) 投与

被験物質がヒトに経口的に暴露される可能性を考慮し、化審法及びOECDにおける試験法ガイドラインに従って、1日1回28日間、9:00~12:00、尿検査時は11:30~12:00の間にディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて強制的に胃内に経口投与した。

投与容量は10 mL/kgとし、各個体の投与液量は投与口に最も近い測定口の体重に基づいて算出した。

## (8) 観察、測定および検査項目

## 1) 一般状態観察

全例について個々の動物の生死、外観、行動等について、投与開始日を投与1日、投与28日の翌日を回復1日として起算し、投与1日から剖検日(投与28日あるいは回復14日の翌日)まで午前(投与前)および午後の1日2回、剖検日は午前中に1回観察した。

## 2) 詳細な一般状態観察

全例について、投与開始前ならびに投与7、14、21および28日、回復7および14日に、詳細な一般状態観察を行った。観察項目は、ケージ外から体位・姿勢、呼吸状態、振戦・痙攣、常同行動(回転・旋回)、異常行動(自咬)について、ケージから取り出す時に取り出し易さ、取扱い易さ、筋収縮性、立毛、被毛の状態、皮膚、眼・眼球および粘膜の外観、瞳孔径、流涙、流涎、その他分泌物の有無について、オープンフィールド内で歩行、運動協調性、環境刺激に対する反応、探索行動(臭嗅ぎ・立上り)、排泄状態(排尿・排糞)、常同行動(身づくろい・くびふり)、異常行動(後ずさり・異常発声)、攻撃性について、それぞれあらかじめ定めたスコアリング法を用いてスコアを記録した。

## 3) 機能検査

全例について、投与4週および回復2週に、機能検査および以下の測定を行った。検査台上で刺激に対する感覚運動反応(視覚刺激、触覚刺激、聴覚刺激、痛覚刺激、固有受容器刺激、空中正向反射)についてあらかじめ定めたスコアリング法を用いて観察し、そのスコアを記録した。また、握力および自発運動量を測定した。握力はCPUゲージ(アイコーエンジニアリング株式会社)を用いて前肢および後肢について各3回測定し、1g単位で記録した。自発運動量は自発運動量測定装置(スーパーメックスおよびCompAct、室町機械株式会社)を用いて、上記に引き続き、10分間隔で1時間測定した。

## 4) 体重測定

全例について、投与1、4、7、10、14、21および28日の投与前、回復7および14日ならびに剖検日に電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1g単位で記録した。

以下の式により体重増加量および体重増加率を算出した。

投与期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{投与28日体重(g)} - \text{投与1日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与1日体重(g)}} \times 100$$

回復期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{回復14日体重(g)} - \text{投与28日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与28日体重(g)}} \times 100$$

## 5) 摂餌量測定

全例について、投与 1、4、7、10、14、21 および 28 日の投与前、回復 7 および 14 日に、電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1 g 単位で記録した。投与開始前日に適当量を測定後ケージ毎に給与し、その後は測定日に残量および給与量を測定した。ただし、剖検前日は残量のみを測定した。以下の式により摂餌量(g/rat/day)を算出した。

$$\text{摂餌量(g/rat/day)} = \frac{\text{給与量(g/rat)} - \text{残量(g/rat)}}{\text{測定日間の日数(day)}}$$

## 6) 飲水量測定

全例について、投与 1、7、14、21 および 28 日の投与前、回復 7 および 14 日に、飲料水を充填した給水器を使用し、電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1 g 単位で記録した。各測定日の前日に適当量を測定後ケージ毎に給与し、測定日に残量を測定した。給与量から残量を減じた 1 日分の消費量を、飲水量(g/rat/day)とした。

$$\text{飲水量(g/rat/day)} = \frac{\text{給与量(g/rat)} - \text{残量(g/rat)}}{1(\text{day})}$$

## 7) 尿検査

全例について投与 4 週(投与 25~26 日)および回復 2 週(回復 8~9 日)に、非絶食下でラット用代謝ケージ(KN-646、B-1 型、夏目製作所)を用いて採尿し、投与直後から約 3 時間の蓄尿で①~⑧を、また約 21 時間の蓄尿で⑨および⑩を実施し、採取した尿は検査終了後廃棄した。

検査項目および検査方法：

①pH	試験紙法(マルティスティックス、バリエルメテカル)
②蛋白(Protein)	試験紙法(マルティスティックス、バリエルメテカル)
③糖 (Glucose)	試験紙法(マルティスティックス、バリエルメテカル)
④ケトン体(Ketone body)	試験紙法(マルティスティックス、バリエルメテカル)
⑤ウロビリノーゲン(Urobilinogen)	試験紙法(マルティスティックス、バリエルメテカル)
⑥ビリルビン(Bilirubin)	試験紙法(マルティスティックス、バリエルメテカル)
⑦潜血反応(Occult blood)	試験紙法(マルティスティックス、バリエルメテカル)
⑧色調(Color)	肉眼観察
⑨尿量(Urine Volume)	容量測定
⑩比重(Specific gravity)	屈折計法(尿比重屈折計コロン-S、アタゴ)

## 8) 血液学的検査

全例について剖検時に 16～22 時間の絶食下でラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。①～⑩については EDTA・2K(ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社)で処理した血液約 1 mL を用い、⑪、⑫については 3.8%クエン酸ナトリウムで処理した血液約 1～2 mL を 3500 回転/分で 10 分間遠心分離して得られた血漿を用いた。また、⑬については血液 1 mL あたりヘパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注 N「味の素」、1000 単位/mL、味の素株式会社)約 20 単位で処理したヘパリン加血液を用いた。得られた EDTA・2K 処理血液および 3.8%クエン酸ナトリウム処理血漿は検査終了後廃棄した。ヘパリン加血液は、引き続き血液化学的検査で使用した。

検査項目および検査方法：

①赤血球数(RBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
②ヘマトクリット値(Ht)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
③ヘモグロビン量(Hb)	シアンメトヘモグロビン法 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
④平均赤血球容積(MCV)	RBC, Ht 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑤平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	RBC, Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑥平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	Ht, Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑦網赤血球数(Reticulocyte)	Brecher 法(鏡検)
⑧血小板数(Platelet)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑨白血球数(WBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑩白血球百分比 (Differential count of WBC)	May-Grünwald-Giemsa 染色(鏡検)
⑪プロトロンビン時間(PT)	トロンボプラスチン法 (血液凝固自動測定装置 KC4 <sup>テラ</sup> 、トリニティ・バイオテック)
⑫活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	エラジン酸法 (血液凝固自動測定装置 KC4 <sup>テラ</sup> 、トリニティ・バイオテック)
⑬メトヘモグロビン (Methemoglobin)	Evelyn and Malloy 変法 (紫外可視分光光度計 UV-160A、島津製作所)

## 9) 血液化学的検査

全例について剖検時に 16～22 時間絶食させたラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。検査項目のうち①および⑤については血液 1 mL あたりへパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注 N「味の素」、1000 単位/mL、味の素株式会社)約 20 単位で処理後、3500 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血漿を用いて検査した。他の項目については分離剤入り試験管(セパクリーン、栄研器材株式会社)に血液を採取し、3500 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血清を用いて検査した。得られた血漿および血清は検査終了後、-20℃以下で凍結保存し、試験終了日に廃棄した。

検査項目および検査方法：

①AST	JSCC 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
②ALT	JSCC 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
③アルカリホスファターゼ (ALP)	JSCC 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
④γ-GTP	L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑤グルコース (Glucose)	ヘキソキナーゼ法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑥総コレステロール (T-Cho)	酵素法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑦トリグリセリド (TG)	遊離グリセロール消去法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑧総ビリルビン (T-Bil)	アゾビリルビン法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑨尿素窒素 (UN)	ウレアーゼ・GLDH 法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑩クレアチニン (Crea)	Jaffé 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑪ナトリウム (Na)	イオン選択電極(ISE)法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑫カリウム (K)	イオン選択電極(ISE)法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑬クロール (Cl)	イオン選択電極(ISE)法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑭カルシウム (Ca)	OCPC 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑮無機リン (IP)	Fiske-Subba Row 法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑯総蛋白 (TP)	ビウレット法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑰蛋白分画 (Protein fraction)	セルロースアセテート膜電気泳動法 (自動電気泳動装置 AES320、三島オリンパス)
⑱A/G 比 (A/G ratio)	蛋白分画より算出
⑲アルブミン (Albumin)	総蛋白と蛋白分画より算出

## 10) 剖検

全例について、投与 28 日の翌日あるいは回復 14 日の翌日に剖検した。体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後、放血により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、以下の器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。なお、眼球およびハーダー腺はデビッドソン液で固定・保存し、精巣および精巣上体はブアン液で固定、70% エタノールに保存した。肺については固定液を注入後浸漬固定とした。左右のある器官については、原則として左右とも固定・保存した。

器官・組織名：脳(大脳、小脳および延髄)、下垂体、脊髄、胸腺、甲状腺、上皮小体、副腎、脾臓、心臓、舌、食道、胃、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、気管、肺、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊(凝固腺含む)、卵巣、子宮、膺、眼球、ハーダー腺、大腿骨(骨髓含む、右)および坐骨神経。

## 11) 器官重量測定

全例について、剖検時に電子式上皿天秤(ER-180A、株式会社 エー・アンド・デイ)を用いて以下の器官について重量を測定した。なお、左右のある器官については、左右合わせて測定した。

器官名：脳、下垂体、甲状腺、副腎、脾臓、心臓、肝臓、腎臓、胸腺、精巣、精巣上体、前立腺、精囊(凝固腺含む)、卵巣、子宮

以下の式により相対重量を算出した。

$$\text{相対重量(\%)} = \frac{\text{絶対重量(g)}}{\text{剖検日体重(g)}} \times 100$$

## 12) 病理組織学的検査

剖検時に固定・保存した全例の全器官・組織についてパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群および 300 mg/kg 投与群(高用量群)の全例について鏡検した。

鏡検の結果、被験物質投与の影響と考えられる変化のみられた前胃、肝臓、腎臓、脾臓および大腿骨の骨髓については、その他の投与群の動物についても雄雌全例の鏡検を行った。なお、雌の肝臓の脂肪化について Oil red O 染色(中性脂肪の確認)、雄の腎臓の好酸性小体について  $\alpha_{2\text{u}}$ -グロブリン免疫染色、雄雌全例の脾臓についてベルリン青染色(鉄：ヘモジデリン)を施し、それぞれ確認を行った。

## 5. 統計学的方法

投与期間中は回復群の動物を合わせて集計した。

握力、自発運動量、体重、体重増加量および増加率、摂餌量、飲水量、尿量、血液学的検査、血液化学的検査、器官の絶対重量および相対重量の成績について平均値および標準偏差を算出し、Bartlett の検定法により等分散性を解析した。等分散 ( $p > 0.05$ ) の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散 ( $p \leq 0.05$ ) の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合 ( $p \leq 0.10$ ) は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合 ( $p \leq 0.10$ ) は Mann-Whitney の U-検定法を用い対照群との比較を行った。

詳細な一般状態観察および機能検査の観察項目、尿検査の定性的項目および尿比重の成績について Kruskal-Wallis の検定法で解析し、有意差がみられた場合 ( $p \leq 0.10$ ) は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行った。

対照群との比較検定については、有意水準を 5% とした。なお、統計学的方法に関する表示方法を INDIVIDUAL DATA の冒頭に示す。

# 成 績

## 1. 一般状態

一般状態の成績を Table 1 および 2、INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-2-4 に示す。

[投与期間]

対照、低用量(12 mg/kg)および中用量(60 mg/kg)群では、雄雌ともに異常は認められなかった。

高用量(300 mg/kg)群では、投与 5 日に雄雌で流涙およびよろめき歩行を示す例が認められ、雌ではその後も流涎、被毛の汚れ(外尿道口周囲、口周囲)、よろめき歩行が散見された。

[回復期間]

対照群および高用量群の雄雌ともに異常は認められなかった。

## 2. 詳細な一般状態観察

詳細な一般状態観察の成績を Table 3~8、INDIVIDUAL DATA 2-1-1~4-14-2 に示す。

[投与期間]

対照群および各投与(低・中および高用量)群の雄雌ともにいずれの検査時にも各観察項目に対照群と比較して有意な差は認められず、鎮静、興奮あるいは行動異常等の神経行動学的な異常は認められなかった。

[回復期間]

高用量群の雄雌ともにいずれの検査時にも各観察項目に対照群と比較して有意な差は認められず、鎮静、興奮あるいは行動異常等の神経行動学的な異常は認められなかった。

## 3. 機能検査

機能検査の成績を Table 9~12、INDIVIDUAL DATA 5-1-1~6-4-2 に示す。

[投与 4 週]

各機能検査では、各投与群の雄雌ともに対照群と比較して有意な差は認められなかった。

握力および自発運動量にも、各投与群の雄雌ともに有意な差は認められなかった。

[回復 2 週]

高用量群の雄雌ともに各機能検査、握力および自発運動量のいずれにも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

#### 4. 体重

体重推移を Figure 1 および 2、Table 13 および 14、INDIVIDUAL DATA 7-1-1~7-2-4 に示す。

[投与期間]

低用量および中用量群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

高用量群では、雄で投与 4 日以降投与期間中を通して有意な低値が認められ、体重増加量および増加率にも有意な低値が認められた。また、雌でも投与 7 日に有意な低値が認められた。

[回復期間]

高用量群の雄で投与期間中から継続して有意な低値が認められたが、体重増加率には有意な高値が認められた。雌には統計学的な有意差は認められなかった。

#### 5. 摂餌量

摂餌量を Figure 3 および 4、Table 15 および 16、INDIVIDUAL DATA 8-1-1~8-2-4 に示す。

[投与期間]

低用量および中用量群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

高用量群では、雄雌ともに投与 4 および 7 日に有意な低値が認められ、雄では投与 10 日以降も有意な低値が継続して認められた。

[回復期間]

高用量群の雄雌ともに有意な変化は認められなかった。

#### 6. 飲水量

飲水量を Figure 5 および 6、Table 17 および 18、INDIVIDUAL DATA 9-1-1~9-2-4 に示す。

[投与期間]

低用量群では、雌で投与 7 および 14 日に対照群と比較して有意な高値が認められた。雄で投与 28 日に有意な低値が認められた。

中用量群では、雄で投与 7 および 21 日に有意な高値が認められた。

高用量群では、雄雌ともに投与 7 日以降に有意な高値が継続して認められた。

[回復期間]

高用量群の雄で回復 7 および 14 日、雌で回復 14 日に有意な高値が認められた。

#### 7. 尿検査

尿検査の成績を Table 19~22、INDIVIDUAL DATA 10-1-1~10-4-2 に示す。

[投与 4 週]

低用量および中用量群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

高用量群では、雄雌ともに尿量の有意な増加ならびに蛋白排泄量および尿比重の有意な低下が認められ、さらに雄では pH の有意な低下が認められた。

[回復 2 週]

高用量群の雌で尿比重の有意な低下が認められた。雄には有意な変化は認められなかった。

## 8. 血液学的検査

血液学的検査の成績を Table 23～26、INDIVIDUAL DATA 11-1-1～11-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

低用量群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

中用量群では、雌でプロトロンビン時間の有意な延長が認められた。雄には有意な変化は認められなかった。

高用量群では、雄雌ともに赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度の有意な低値ならびにメトヘモグロビンおよび網赤血球数の有意な高値が認められ、雄では平均赤血球ヘモグロビン濃度およびリンパ球比率の有意な低値ならびに分葉核球比率の有意な高値、雌ではプロトロンビン時間の有意な延長も認められた。

[回復期間終了時]

高用量群の雄雌ともに赤血球数の有意な低値およびメトヘモグロビンの有意な高値が認められた。雄では網赤血球数および分葉核球比率の有意な高値ならびに平均赤血球ヘモグロビン濃度およびリンパ球比率の有意な低値、プロトロンビン時間の有意な短縮が認められた。

## 9. 血液化学的検査

血液化学的検査の成績を Table 27～30、INDIVIDUAL DATA 12-1-1～12-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

低用量群では、雄で  $\alpha_1$ -グロブリン分画比に対照群と比較して有意な低値が認められた。雌には有意な変化は認められなかった。

中用量群では、雄で  $\alpha_1$ -グロブリン分画比およびグルコースの有意な低値ならびに  $\beta$ -グロブリン分画比の有意な高値が認められた。雌には有意な変化は認められなかった。

高用量群では、雄雌ともに  $\alpha_1$ -グロブリン分画比の有意な低値ならびに  $\alpha_2$ -グロブリン分画比、総ビリルビンおよび尿素窒素の有意な高値が認められた。さらに、雄で  $\beta$ -グロブリン分画比、トリグリセリドおよび無機リンの有意な高値ならびにグルコースの有意な低値、雌で ALT および総コレステロールの有意な高値も認められた。

[回復期間終了時]

高用量群の雄雌ともに尿素窒素およびナトリウムの有意な高値ならびに総ビリルビンの有意な低値が認められた。さらに、雄でアルブミン、A/G 比およびアルブミン分画比の有意な高値ならびにアルカリホスファターゼおよび  $\alpha_1$ -グロブリン分画比の有意な低値、雌でアルブミンの有意な低値および無機リンの有意な高値も認められた。

## 10. 剖検

剖検所見を Table 31 および 32、INDIVIDUAL DATA 13-1-1～13-4-2 に示す。

[投与期間終了時]

対照群および低用量群では、雄雌ともに異常所見は認められなかった。

中用量群では、雄 2 例で前胃の限局性粘膜肥厚が認められた。雌には異常所見は認められなかった。

高用量群では、雄 4 例および雌 5 例で前胃の限局性粘膜肥厚が認められ、雄 1 例では胃と脾臓との癒着も認められた。また、雄 4 例および雌 1 例で左右腎臓の乳頭部黄白色化が認められ、雄 1 例では左右腎臓の多巢性黄褐色斑が認められた。他に、雄 1 例の前立腺および精囊の小型が認められた。

[回復期間終了時]

対照群では、雄雌ともに異常所見は認められなかった。

高用量群では、雄 1 例および雌 3 例に前胃の限局性粘膜肥厚、雄 3 例および雌 4 例に左右あるいは左腎臓の乳頭部黄白色化が認められた。

## 11. 器官重量

器官重量の成績を Table 33～36、INDIVIDUAL DATA 14-1-1～14-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

低用量群および中用量群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

高用量群では、雄雌の肝臓、腎臓および脾臓の相対重量に有意な高値が認められた。

他に、高用量群の雄で心臓、脳、下垂体、前立腺および精囊の絶対重量に有意な低値、また、脳および精巣の相対重量に有意な高値が認められたが、剖検時の体重に有意な低値が認められていることから、毒性学的な意義はないと判断した。

[回復期間終了時]

高用量群の雄雌で脾臓に相対重量の有意な高値、雌で肝臓の相対重量の有意な高値が認められた。

他に、高用量群の雄で肝臓および前立腺の絶対重量に有意な低値、また、脳、下垂体および精巣の相対重量に有意な高値が認められたが、剖検時の体重に有意な低値が認められていることから、毒性学的な意義はないと判断した。

## 12. 病理組織学的検査

病理組織学的所見を Table 37 および 38、INDIVIDUAL DATA 15-1-1～15-4-2 に示す。

[投与期間終了時]

前胃：軽度な扁平上皮過形成および過角化が、中用量以上の群の雄雌に認められ、用量依存的な例数増加が認められた。さらに、高用量群の雄 1 例および雌 2 例で軽度な粘膜下

組織の線維化、また、雌 1 例で軽度な粘膜下組織の炎症性細胞浸潤が認められた。

肝臓：軽度な小葉中心性肝細胞肥大が高用量群の雄雌全例(各 6 例)に認められた。

また、対照群、低用量および中用量群の雌では軽度な小葉周辺性脂肪化(Oil red O 染色の陽性が確認された)を示す例が認められたが、高用量群の雌には小葉周辺性脂肪化の例は認められなかった。

腎臓：高用量群で、乳頭部に軽度な間質の水腫が雄雌各 5 例、軽度あるいは中等度な壊死が雄雌各 5 例、軽度な鉍質沈着が雄雌各 5 例、軽度あるいは中等度な集合管/乳頭管の再生が雄 4 例および雌 2 例、軽度あるいは中等度な炎症性細胞浸潤および軽度あるいは中等度な尿細管の拡張が各雄 6 例に認められた。

また、高用量群の雄雌で軽度あるいは中等度な尿細管上皮の再生に用量依存的なグレードの増強あるいは例数増加が認められた。

他に、中用量以上の群の雄で、軽度から重度な近位尿細管上皮の好酸性小体に用量依存的なグレードの増強あるいは例数増加が認められ、これらの変化は $\alpha_{2u}$ -グロブリン免疫染色に陽性を示した。

脾臓：軽度あるいは中等度なヘモジデリン沈着(ベルリン青染色で陽性を確認)の亢進が、高用量群の雄雌全例に認められ、さらに、雄全例および雌 4 例に軽度なうっ血が認められた。

大腿骨骨髓：

軽度な赤血球の造血亢進が高用量群の雌 3 例に認められた。

その他の器官・組織：対照群および高用量群の雄雌とも発現例数やグレードが正常範囲を逸脱する変化は認められなかった。

[回復期間終了時]

前胃：高用量群では、雄雌に軽度な扁平上皮過形成および過角化、また、雌 1 例で軽度な粘膜下組織の線維化が認められたが、いずれも投与期間終了時と比較して発現例数に減少が認められた。

腎臓：高用量群では、乳頭部に軽度な間質の水腫が雄雌各 5 例、軽度な壊死が雄 2 例および雌 5 例、軽度な鉍質沈着が雄 5 例および雌 4 例、軽度な集合管/乳頭管の再生が雌 2 例に認められた。

また、高用量群の雄雌で軽度あるいは中等度な尿細管上皮の再生が認められた。

これらの所見のほとんどは、投与期間終了時と比較して発現例数やグレードに明らかな差は認められなかったが、集合管/乳頭管の再生には軽減が認められ、また、乳頭部の炎症性細胞浸潤や尿細管の拡張、近位尿細管上皮の好酸性小体は消失あるいは軽減が認められた。

脾臓：高用量群では、軽度あるいは中等度なヘモジデリン沈着の亢進が雄雌全例に認められ、投与期間終了時と比較して発現例数およびグレードに明らかな差は認められなかった。

その他の器官・組織：対照群および高用量群の雄雌とも発現例数やグレードが正常範囲を逸脱する変化は認められなかった。

## 考 察

2,5-ジメチルアニリンの0(対照、トウモロコシ油)、12、60 および 300 mg/kg/day を1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0および300 mg/kgについて1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し休薬による毒性の回復性を併せて検討した。

一般状態では、高用量(300 mg/kg)の雄雌でよろめき歩行や流涙、流涎等が散見され、本被験物質には眼、呼吸器および皮膚を刺激する作用<sup>1)</sup>があることから、発現頻度や発現例数は顕著なものでないが被験物質投与に関連した変化と考えられた。

体重および摂餌量では、高用量の雄で投与期間を通して有意な低値が認められ、投与期間中の体重増加量および増加率にも有意な差が認められた。雄の体重は回復期間中にも有意な低値が継続して認められたが、回復期間中の体重増加率は有意な高値を示し、この有意差は休薬による回復性を示すものと考えられた。雌についても、投与期間の初期に体重および摂餌量の有意な低値が認められ、雄と同様の変化であることから、一過性ではあるが被験物質投与に関連した変化と考えられた。

飲水量では、高用量の雄雌で投与期間を通して有意な高値が認められ、回復期間にも雄雌ともに有意な高値あるいは高値傾向が認められた。この変化は、尿量の有意な高値および腎臓の病理組織学的な変化と関連するものと考えられた。低用量の雌および中用量の雄で投与期間の初期に有意な高値が認められたが、一過性であることおよび用量依存的でないことから毒性学的な意義はないと考えられた。

尿検査では、高用量の雄雌で尿量の有意な増加が認められた。尿量の増加に伴う尿比重および蛋白質濃度の有意な低下も認められたが、尿素窒素の有意な高値および腎臓の病理組織学的な変化も認められていることから、これらの変化は腎臓の器質的变化に関連した変化と考えられた。また、雄でpHの有意な低下が認められたが、機序については明らかでなかった。回復2週の検査では、高用量の雌で尿比重の有意な低下が認められたのみであり、回復性を示すものと考えられた。

血液学的検査では、高用量の雄雌で赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度、雄で平均赤血球ヘモグロビン濃度の有意な低値が認められ、さらに雄雌で網赤血球数の有意な高値が認められた。この変化は、メトヘモグロビンの有意な高値を伴うことから被験物質投与に関連

したメトヘモグロビン形成を伴う貧血傾向と考えられ、脾臓重量の増加や病理組織学的検査における脾臓のヘモジデリン沈着の亢進および大腿骨骨髓の赤血球の造血亢進が認められていることから、被験物質投与に関連した赤血球破壊の亢進に基づく可能性が考えられた。

高用量の雄では、分葉核球比率の有意な高値およびリンパ球比率の有意な低値が認められ、この変化は前胃や腎臓の炎症性変化(炎症性細胞浸潤等)を反映するものと推察された。

中用量以上の雌でプロトロンビン時間の有意な延長が認められ、貧血傾向や腎臓の病理組織学的な変化との関連性が示唆された。

回復期間終了時にも赤血球数の有意な低値やメトヘモグロビンの有意な高値等が認められ、明らかな回復性は認められなかった。

血液化学的検査では、高用量の雄雌に蛋白分画で $\alpha_1$ -グロブリン分画比の有意な低値および $\alpha_2$ -グロブリン分画比の有意な高値が、また、総ビリルビンおよび尿素窒素の有意な高値が認められ、それぞれ被験物質投与による肝機能および腎機能への影響が示唆された。高用量では、雄に認められている $\beta$ -グロブリン分画比およびトリグリセリドの有意な高値、グルコースの有意な低値、雌に認められているALTおよび総コレステロールの有意な高値、また、雄に認められている無機リンの有意な高値についても肝機能および腎機能に対する影響が考えられた。

中用量の雄で $\alpha_1$ -グロブリン分画比およびグルコースの有意な低値ならびに $\beta$ -グロブリン分画比の有意な高値が認められ、高用量と同様の変化であることから被験物質投与の影響である可能性が考えられた。また、低用量の雄では $\alpha_1$ -グロブリン分画比のみに有意な低値が認められたが、背景データの範囲を逸脱する低値であり、被験物質投与の影響である可能性が考えられた。

病理検査では、高用量の雄雌に肝臓および腎臓の相対重量に有意な高値、剖検所見で腎臓の乳頭部黄白色化、病理組織学的検査で肝臓の軽度な小葉中心性肝細胞肥大、腎臓の乳頭部を中心とした領域の水腫、壊死、炎症性細胞浸潤等が認められ、血液化学的検査における肝機能および腎機能項目の変化はこれらの変化に基づくものと推察された。また、中用量および高用量の雄で、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン免疫染色に陽性を示す近位尿細管上皮の好酸性小体のグレード増強あるいは例数増加が認められ、被験物質投与に関連した変化と考えられた。好酸性小体中には $\alpha_{2u}$ -グロブリンが蓄積することから $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症と呼ばれ、雄ラットに特異的に発現する変化である。今回の試験において認められた変化は、雄のみに発現し $\alpha_{2u}$ -グロブリンが陽性であることおよび近位尿細管上皮に発現していることから、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症に類似した変化と考えられた。

器官重量では、高用量の雄雌に脾臓の相対重量にも有意な高値が認められ、病理組織学的検査で脾臓に軽度なうっ血および軽度から中等度なヘモジデリン沈着の亢進、雌の大腿骨骨髓に軽度な赤血球の造血亢進が認められ、血液学的検査における貧血傾向はこれらの変化と関連し、赤血球破壊の亢進ならびに反応性の造血亢進と推察された。

剖検所見で中用量の雄および高用量の雄雌に前胃の限局性粘膜肥厚が認められ、この変化は、病理組織学的検査では中用量および高用量の雄雌に前胃の軽度な扁平上皮過形成および過角化として認められた。被験物質には、眼、呼吸器および皮膚を刺激する作用が報告<sup>1)</sup>されていること

から、これらの変化はこの刺激性に関連する変化と推察された。

投与期間終了時に認められた以上の変化は、回復期間終了時にも認められたが、若干の軽減が認められ、回復性を示すものと考えられ、より長期の休薬により回復するものと推察された。

なお、詳細な一般状態観察および機能検査には、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上のように、被験物質投与に関連した変化として、低用量(12 mg/kg)の雄で  $\alpha_1$ -グロブリン分画比のみに有意な低値が認められ、中用量(60 mg/kg)以上の雄雌で病理組織学的検査における前胃の扁平上皮過形成および過角化、雄で血清蛋白分画の変化およびグルコースの低値、前胃の限局性粘膜炎、腎臓の近位尿細管上皮の好酸性小体のグレード増強あるいは例数増加、雌でプロトロンビン時間の延長が認められた。

高用量(300 mg/kg)では、一般状態で雄雌に流涙およびよろめき歩行、飲水量の増加、尿量の増加ならびに尿蛋白および比重の低下、メトヘモグロビン形成を伴う貧血傾向、肝機能および腎機能の異常値(ビリルビンおよび尿素窒素の高値等)、肝臓・腎臓・脾臓の相対重量の増加、剖検所見における腎臓の乳頭部黄白色化が認められ、病理組織学的検査では肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、腎臓の乳頭部の水腫や壊死等、脾臓のうっ血およびヘモジデリン沈着の亢進が認められた。また、雄では体重および摂餌量の低下、雌では流涎および大腿骨骨髓の赤血球の造血亢進が認められた。

これらのことから、本試験条件下における2,5-ジメチルアニリンの無影響量(NOEL)は雄で12 mg/kg/day未満、雌で12 mg/kg/dayと推察する。

## 参考資料

- 1) 製品安全データシート. 東京化成工業株式会社. (2005)
- 2) 個別物質全項目表示. 神奈川県環境科学センター 情報交流部.
- 3) 2,5-ジメチルアニリンのラットにおける14日間反復経口投与毒性予備試験 (S R 0 7 1 6 9 P) 最終報告書. 株式会社 化合物安全性研究所. (2008)

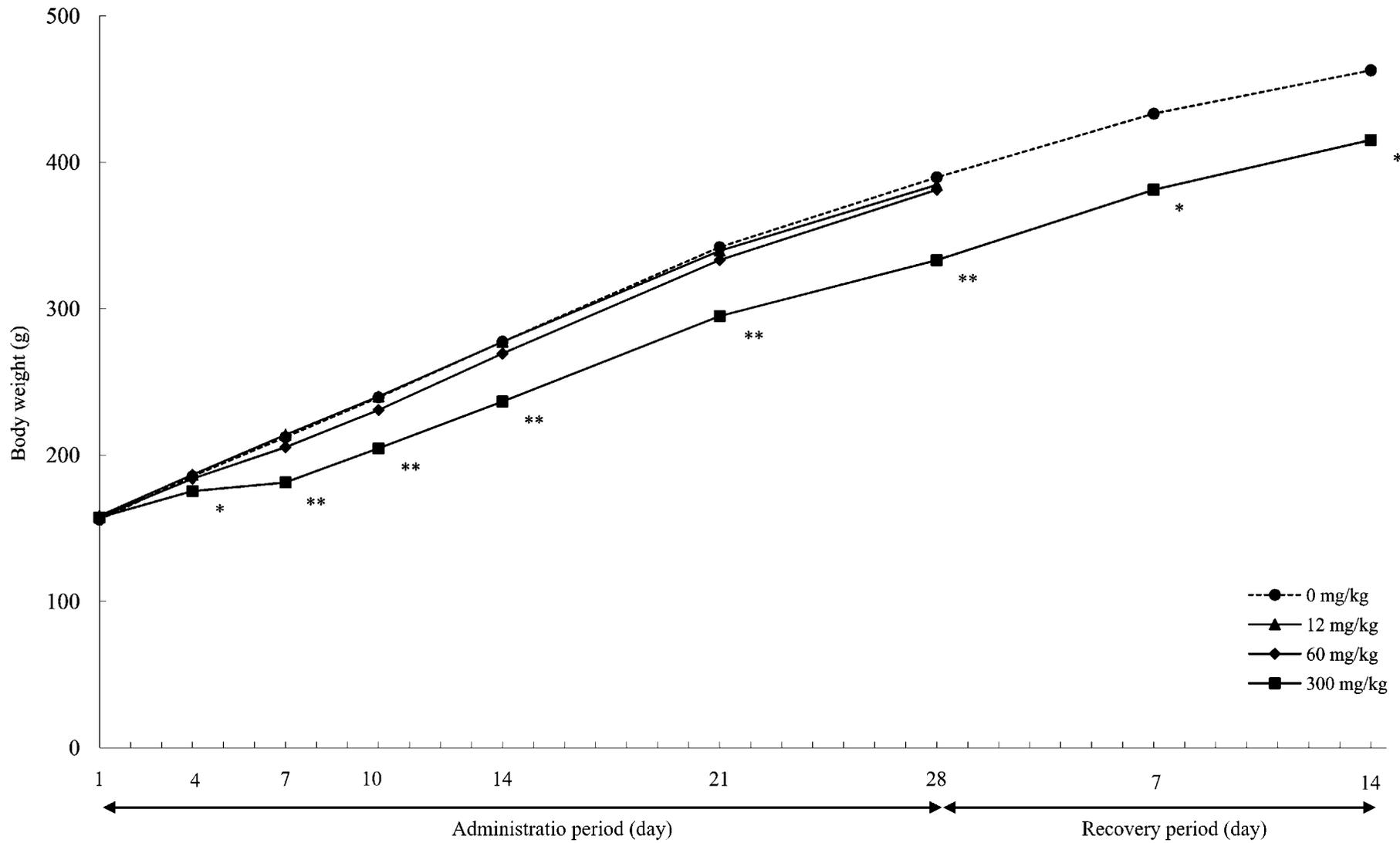


Figure 1 Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

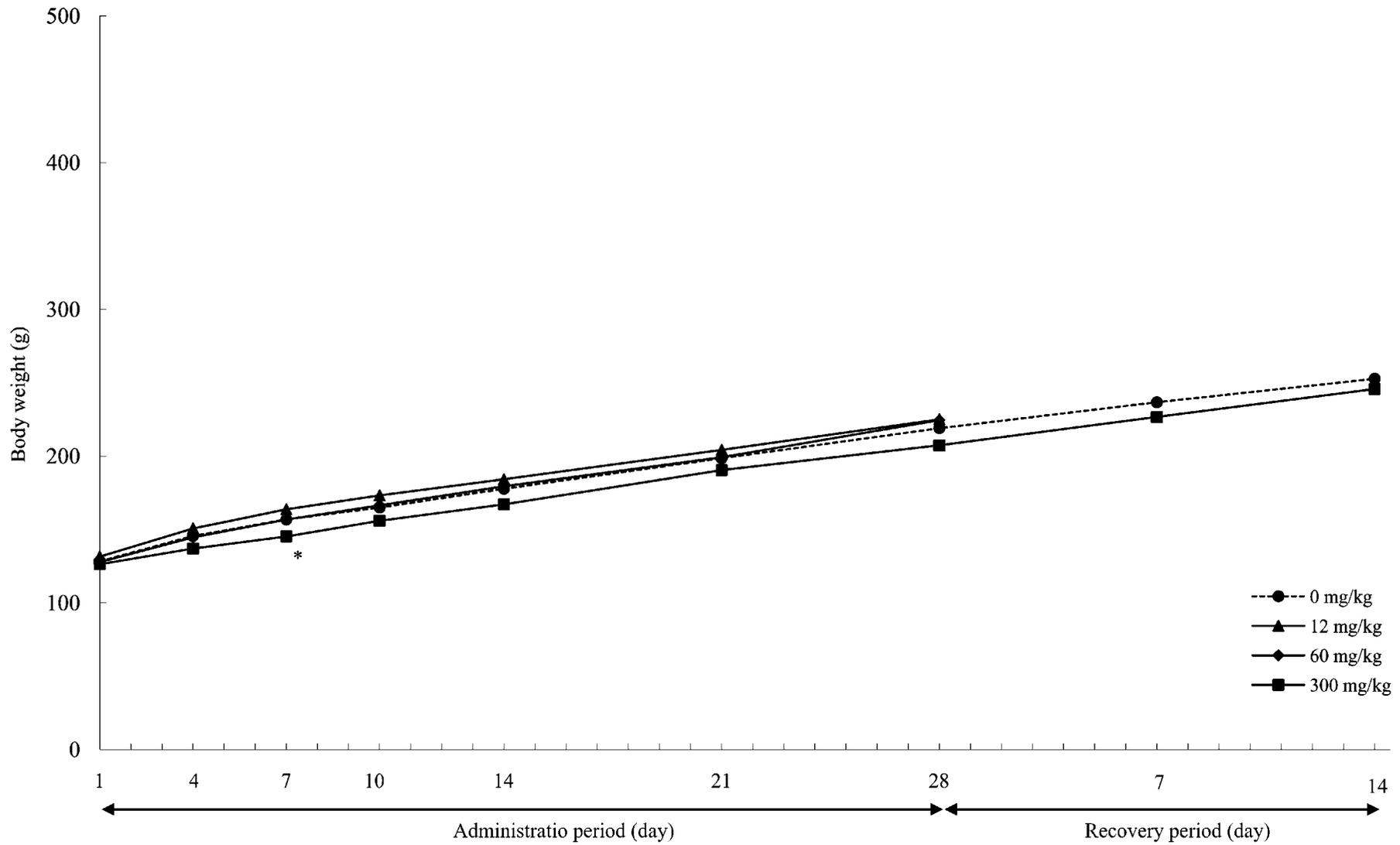


Figure 2 Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)  
\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

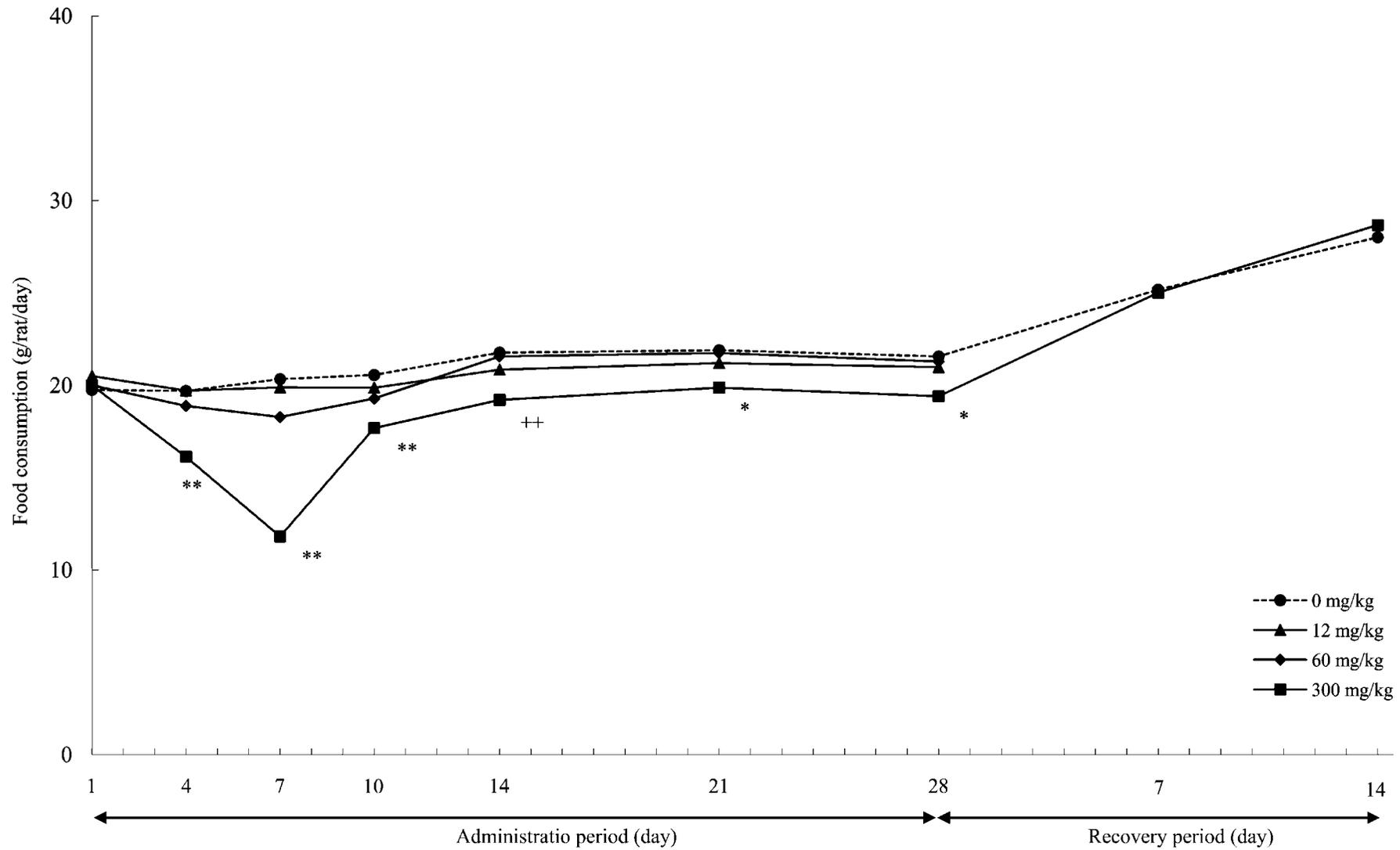


Figure 3 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

- \* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).
- \*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).
- ++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test)

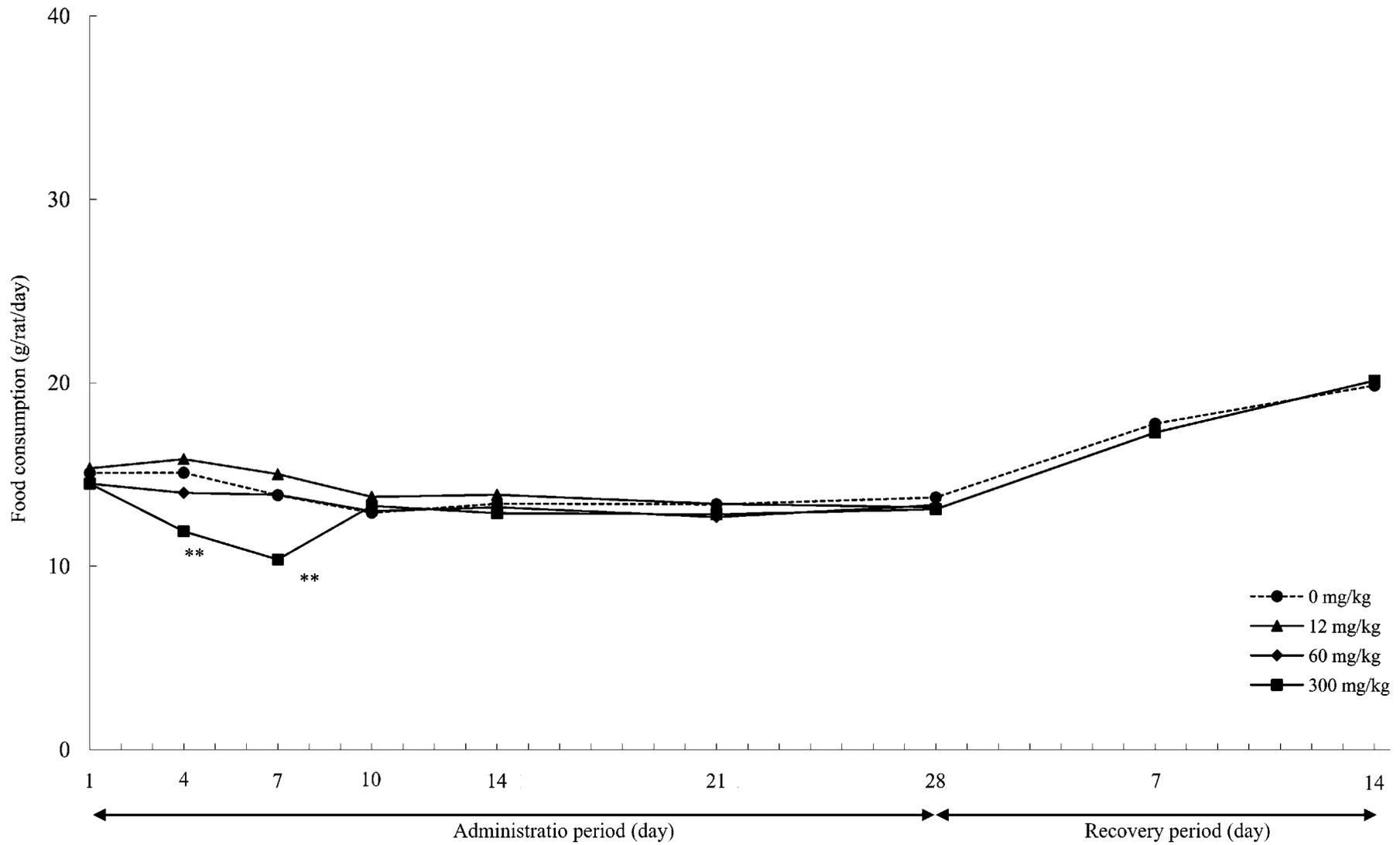


Figure 4 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

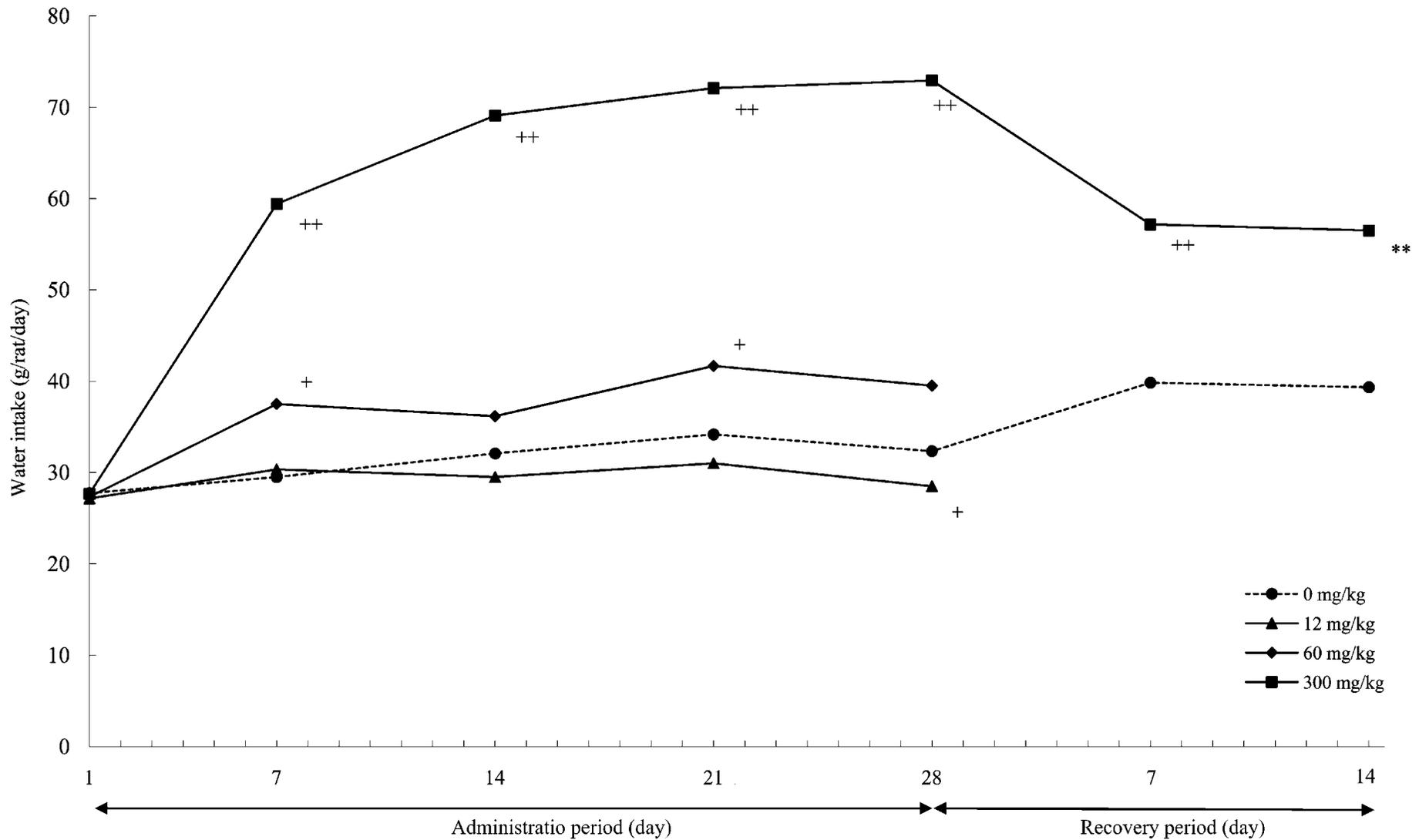


Figure 5 Water intake of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

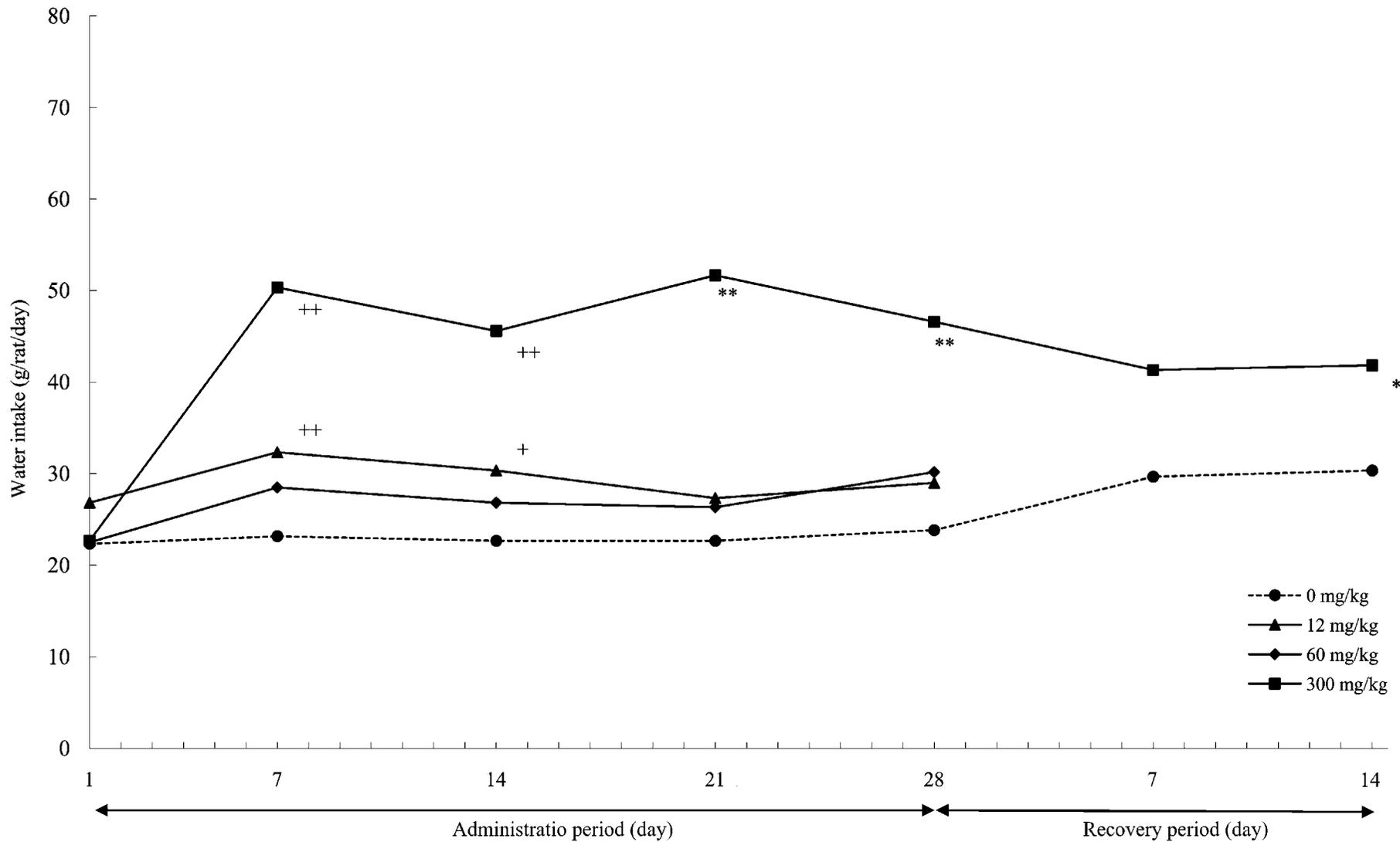


Figure 6 Water intake of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 1 General appearance of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Findings	Administration period (day)			Autopsy day	Recovery period (day)	
		1-4	5	6-28		1 - 14	Autopsy day
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	6	6	6
	No abnormal findings	12	12	12	6	6	6
12 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	-	-
60 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	-	-
300 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	6	6	6
	No abnormal findings	12	10	12	6	6	6
	Lacrimation	0	1	0	0	0	0
	Staggering gait	0	2	0	0	0	0

Values are number of animals with findings.

- : Blank.

Table 2 General appearance of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Findings	Administration period (day)										Autopsy day	Recovery period (day) 1 - 14	Autopsy day	
		1-4	5	6-13	14	15	16	17-25	26	27	28				
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6
12 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-
60 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-
300 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6
	No abnormal findings	12	8	12	11	12	11	12	11	11	12	12	6	6	6
	Lacrimation	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Soil of perigenital fur	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Soil of perioral fur	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Staggering gait	0	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Values are number of animals with findings.

- : Blank.

Table 3 Detailed clinical observation, in the cage, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Category	Body position/ Posture	Respiratory pattern	Tremor/ Convulsion	Stereotype		Bizarre behavior
							Rolling	Repetitive circling	Biting/ Selfmutilation
				1	1	1	0	0	1
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 4 Detailed clinical observation, on the hand, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Category	Ease of		Muscle tone	Piloerection	Fur	Eyes	Mucous membranes	Skin	Pupil size	Lacrimation	Salivation	Secretions/ Excretions
				Removal	Handling										
				1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	1	0
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 5 Detailed clinical observation, in the open-field, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity to environmental stimuli								Stereotype		Bizarre behavior		
				Gait	Co-ordination of movement	Searching	Urination	Defecation	Excessive grooming	Unusual head movement	Walking backward	Vocalization	Aggression			
				1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	11	1	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	4	2	4	2	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	10	2	10	2	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	10	2	12	0	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	5	1	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	7	5	12	0	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	11	1	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	8	4	11	1	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	10	2	11	1	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	0	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	0	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	10	2	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	5	1	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	5	1	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	4	2	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 6 Detailed clinical observation, in the cage, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Category	Body position/ Posture	Respiratory pattern	Tremor/ Convulsion	Stereotype		Bizarre behavior
							Rolling	Repetitive circling	Biting/ Selfmutilation
				1	1	1	0	0	1
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 7 Detailed clinical observation, on the hand, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Category	Ease of		Muscle tone	Piloerection	Fur	Eyes	Mucous membranes	Skin	Pupil size	Lacrimation	Salivation		Secretions/ Excretions
				Removal	Handling									1	2	
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	1	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 8 Detailed clinical observation, in the open-field, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity to environmental stimuli								Stereotype		Bizarre behavior		
				Gait	Co-ordination of movement	Searching	Urination		Defecation		Excessive grooming	Unusual head movement	Walking backward	Vocalization	Aggression	
							1	0	1	0						1
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	10	2	11	1	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	4	2	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	0	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	4	2	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	11	1	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	0	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	0	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 9 Functional observation of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity					Righting reflex
				Visual	Touch	Auditory	Pain	Proprioceptive	
				4	2	1	2	1	1
Week 4	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
R-Week 2	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Week 4 : Week 4 of administration.

R-Week 2 : Week 2 of recovery.

Visual reactivity: approach response.

Touch reactivity: touch response.

Auditory reactivity: response to Galton's whistle.

Pain reactivity: tail pinch response.

Proprioceptive reactivity: returning from enforced posture.

Righting reflex: landing performance from 30 cm above.

Table 10 Functional observation of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity					Righting reflex	
				Visual 4	Touch 2	Auditory 1	Pain 2	Proprioceptive 1	1	2
Week 4	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	0
	12 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	0
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	0
	300 mg/kg	12		12	12	12	12	12	11	1
R-Week 2	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	0
	300 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	0

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Week 4 : Week 4 of administration.

R-Week 2 : Week 2 of recovery.

Visual reactivity: approach response.

Touch reactivity: touch response.

Auditory reactivity: response to Galton's whistle.

Pain reactivity: tail pinch response.

Proprioceptive reactivity: returning from enforced posture.

Righting reflex: landing performance from 30 cm above.

Table 11 Grip strength and motor activity measurements of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Grip strength		Motor activity measurements (count)							
			Forelimb (g)	Hindlimb (g)	0'-10'	10'-20'	20'-30'	30'-40'	40'-50'	50'-60'	Total	
Week 4	0 mg/kg	12	Mean	954.87	421.10	410.2	340.0	215.8	192.2	142.9	86.0	1387.0
			S.D.	95.65	46.26	207.9	226.0	157.7	128.8	114.0	62.1	811.7
	12 mg/kg	6	Mean	904.68	403.88	390.7	264.8	189.2	149.2	127.5	95.8	1217.2
			S.D.	87.58	64.49	215.7	156.0	155.8	153.0	117.7	100.6	840.4
60 mg/kg	6	Mean	927.87	410.23	491.2	339.3	182.3	183.3	154.8	164.0	1515.0	
		S.D.	151.87	52.12	251.9	151.1	91.7	116.4	171.8	216.2	891.6	
300 mg/kg	12	Mean	908.70	403.38	475.3	299.5	181.7	119.8	120.2	84.8	1281.3	
		S.D.	115.33	51.45	220.4	161.2	165.2	101.4	103.1	131.2	682.0	
R-week 2	0 mg/kg	6	Mean	1278.23	528.22	451.8	364.7	286.7	197.5	123.7	111.0	1535.3
			S.D.	105.51	61.22	204.1	158.5	187.1	104.6	84.7	96.2	644.1
300 mg/kg	6	Mean	1184.72	517.93	602.7	404.3	219.2	150.0	179.3	73.2	1628.7	
		S.D.	39.38	44.38	300.4	207.2	37.4	111.8	168.3	92.9	737.9	

Week 4 : Week 4 of administration.

R-week 2 : Week 2 of recovery.

Table 12 Grip strength and motor activity measurements of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Period	Group	Number of animals	Grip strength		Motor activity measurements (count)							
			Forelimb (g)	Hindlimb (g)	0'-10'	10'-20'	20'-30'	30'-40'	40'-50'	50'-60'	Total	
Week 4	0 mg/kg	12	Mean	822.08	357.89	601.7	475.8	368.2	247.7	156.0	97.8	1947.0
			S.D.	103.82	51.11	202.7	198.6	219.6	110.2	140.0	95.1	804.9
	12 mg/kg	6	Mean	756.05	380.43	533.8	394.0	286.0	227.7	179.5	87.5	1708.5
			S.D.	28.84	59.28	250.2	160.3	175.5	152.3	130.4	114.4	852.0
60 mg/kg	6	Mean	860.50	341.65	674.2	586.2	300.5	273.8	172.3	126.8	2133.8	
		S.D.	80.38	49.50	228.0	282.6	114.0	97.0	111.1	62.2	671.5	
300 mg/kg	12	Mean	753.38	350.87	443.5	350.5	211.4	158.3	117.2	124.1	1404.9	
		S.D.	123.92	67.04	190.7	179.2	116.1	79.2	95.3	160.6	607.2	
R-week 2	0 mg/kg	6	Mean	1083.18	471.82	625.0	497.0	382.8	319.2	267.5	213.5	2305.0
			S.D.	148.53	55.86	171.0	177.4	122.4	71.6	55.3	89.5	311.4
300 mg/kg	6	Mean	953.67	418.60	615.0	466.7	331.2	342.7	253.2	208.2	2216.8	
		S.D.	173.71	75.16	249.1	186.9	217.8	243.6	279.2	151.3	1091.4	

Week 4 : Week 4 of administration.

R-week 2 : Week 2 of recovery.

Table 13 Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Body weight (g)								Body weight gain		Body weight (g)		Body weight gain	
		Administration period (day)								1-28		Recovery period (day)		0-14	
		1	4	7	10	14	21	28	g	%	7	14	g	%	
0 mg/kg	12	Mean	155.9	185.5	212.2	239.4	277.4	342.0	389.7	233.8	149.790	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	7.2	9.3	13.6	16.2	19.3	24.6	29.4	24.4	12.831	433.2	462.8	72.5	18.705
12 mg/kg	6	Mean	158.5	186.5	213.8	240.0	277.3	339.5	384.5	226.0	142.565	-	-	-	-
		S.D.	6.5	6.5	6.9	7.2	7.6	14.9	20.1	15.1	7.144	-	-	-	-
60 mg/kg	6	Mean	157.7	183.8	205.3	230.8	269.3	333.2	381.2	223.5	141.477	-	-	-	-
		S.D.	8.6	12.4	13.6	14.5	20.3	27.9	38.3	31.7	15.153	-	-	-	-
300 mg/kg	12	Mean	157.4	175.4*	181.3**	204.5**	236.5**	294.9**	333.1**	175.7**	111.429**	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	4.9	7.9	10.5	12.0	13.2	18.4	21.5	17.2	8.218	381.2*	415.2*	78.8	23.408**

Values in parentheses are number of animals.

Recovery day 0 is administration day 28.

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

- : Blank.

Table 14 Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Body weight (g)								Body weight gain		Body weight (g)		Body weight gain	
		Administration period (day)								1-28		Recovery period (day)		0-14	
		1	4	7	10	14	21	28	g	%	7	14	g	%	
0 mg/kg	12	Mean	128.3	145.6	156.9	165.0	177.8	198.5	219.0	90.8	70.676	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	5.9	7.7	11.6	11.5	14.0	17.7	22.1	19.2	14.109	236.7	252.7	27.8	12.207
12 mg/kg	6	Mean	131.5	150.7	163.8	173.3	184.2	204.2	225.0	93.5	71.110	-	-	-	-
		S.D.	6.0	8.8	14.3	14.0	14.7	17.5	19.3	16.8	12.166	-	-	-	-
60 mg/kg	6	Mean	127.8	144.7	156.8	166.5	179.5	199.2	224.5	96.7	75.303	-	-	-	-
		S.D.	4.9	8.3	9.2	10.1	13.4	18.8	22.4	18.0	11.803	-	-	-	-
300 mg/kg	12	Mean	126.3	137.0	145.3*	156.0	167.2	190.4	207.3	81.0	63.997	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	8.6	10.5	10.6	13.3	17.9	22.2	25.6	20.8	15.337	226.7	245.7	28.0	12.873

Values in parentheses are number of animals.

Recovery day 0 is administration day 28.

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

- : Blank.

Table 15 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Food consumption (g/rat/day)									
		Administration period (day)								Recovery period (day)	
		1	4	7	10	14	21	28	7	14	
0 mg/kg	12	Mean	19.75	19.69	20.33	20.56	21.77	21.90	21.57	(6)	(6)
		S.D.	1.29	1.57	2.03	2.01	2.02	2.02	2.05	25.18	28.02
12 mg/kg	6	Mean	20.50	19.72	19.88	19.87	20.85	21.20	20.98	-	-
		S.D.	1.64	0.91	1.08	0.80	0.55	1.32	1.26	-	-
60 mg/kg	6	Mean	20.00	18.88	18.28	19.28	21.57	21.75	21.28	-	-
		S.D.	1.67	1.71	1.60	1.62	2.31	1.86	2.63	-	-
300 mg/kg	12	Mean	20.00	16.13**	11.82**	17.68**	19.21++	19.88*	19.41*	(6)	(6)
		S.D.	1.35	1.58	2.75	1.67	1.84	1.27	1.66	25.02	28.68

Values in parentheses are number of animals.

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test)

- : Blank.

Table 16 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Food consumption (g/rat/day)									
		Administration period (day)								Recovery period (day)	
		1	4	7	10	14	21	28	7	14	
0 mg/kg	12	Mean	15.08	15.09	13.88	12.92	13.41	13.38	13.75	(6)	(6)
		S.D.	2.31	1.55	1.60	1.61	1.60	1.60	1.98	17.77	19.85
12 mg/kg	6	Mean	15.33	15.83	15.02	13.78	13.90	13.40	13.22	-	-
		S.D.	2.34	2.03	3.18	1.45	1.47	1.34	1.69	-	-
60 mg/kg	6	Mean	14.50	14.00	13.90	13.00	13.22	12.68	13.33	-	-
		S.D.	1.64	1.92	1.54	1.38	1.46	1.56	2.05	-	-
300 mg/kg	12	Mean	14.50	11.90**	10.37**	13.29	12.89	12.83	13.11	(6)	(6)
		S.D.	2.11	1.79	1.82	1.63	2.11	1.80	2.23	17.28	20.12

Values in parentheses are number of animals.

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

- : Blank.

Table 17 Water intake of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Water intake (g/rat/day)							
		Administration period (day)					Recovery period (day)		
		1	7	14	21	28	7	14	
0 mg/kg	12	Mean	27.8	29.5	32.1	34.2	32.3	(6)	(6)
		S.D.	2.6	3.1	3.0	3.8	3.4	39.8	39.3
12 mg/kg	6	Mean	27.2	30.3	29.5	31.0	28.5+	-	-
		S.D.	2.0	2.0	1.5	3.5	3.2	-	-
60 mg/kg	6	Mean	27.3	37.5+	36.2	41.7+	39.5	-	-
		S.D.	2.3	6.8	6.1	9.9	8.3	-	-
300 mg/kg	12	Mean	27.7	59.4++	69.1++	72.1++	72.9++	(6)	(6)
		S.D.	2.6	12.4	13.7	15.3	13.2	57.2++	56.5**

Values in parentheses are number of animals.

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

- : Blank.

Table 18 Water intake of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Water intake (g/rat/day)							
		Administration period (day)					Recovery period (day)		
		1	7	14	21	28	7	14	
0 mg/kg	12	Mean	22.3	23.2	22.7	22.7	23.8	(6)	(6)
		S.D.	5.1	3.0	4.8	4.9	7.2	29.7	30.3
12 mg/kg	6	Mean	26.8	32.3++	30.3+	27.3	29.0	-	-
		S.D.	6.3	5.4	6.7	6.9	8.2	-	-
60 mg/kg	6	Mean	22.5	28.5	26.8	26.3	30.2	-	-
		S.D.	3.3	6.4	6.4	7.7	6.4	-	-
300 mg/kg	12	Mean	22.7	50.3++	45.6++	51.7**	46.6**	(6)	(6)
		S.D.	5.1	14.3	15.7	10.9	12.6	41.3	41.8*
							12.4	9.1	

Values in parentheses are number of animals.

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

- : Blank.

Table 19 Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	pH						Protein					Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+				
0 mg/kg	12	1	0	1	0	2	8	0	0	6	5	1	12	12	12	12
12 mg/kg	6	0	0	0	0	1	5	0	0	1	5	0	6	6	6	6
60 mg/kg	6	0	0	1	0	1	4	0	0	5	1	0	6	6	6	6
300 mg/kg	12	[ 3	3	3	3	0	0 ]++	[ 2	1	9	0	0 ]++	12	12	12	12

Group	Number of animals	Occult blood					Color A	Specific gravity					Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		-	±	1+	2+	3+		1.011- 1.020	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050	1.050<	
0 mg/kg	12	12	0	0	0	0	12	1	1	2	0	8	12.00 ± 9.90
12 mg/kg	6	6	0	0	0	0	6	0	0	1	2	3	7.08 ± 2.80
60 mg/kg	6	6	0	0	0	0	6	0	0	3	1	2	12.33 ± 4.75
300 mg/kg	12	11	0	0	0	1	12	[ 3	6	3	0	0 ]++	33.88 ± 9.90 ++

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, 1+ ; Moderate, 2+ ; Severe, 3+ ; Very severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

[ ]++ or ++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 20 Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	pH						Protein				Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+				
0 mg/kg	12	1	2	2	1	4	2	3	2	4	3	12	12	12	12
12 mg/kg	6	0	2	0	1	2	1	2	2	1	1	6	6	6	6
60 mg/kg	6	0	0	1	0	1	4	2	2	0	2	6	6	6	6
300 mg/kg	12	1	2	4	3	2	0	[ 9	1	2	0 ]+	12	12	12	12

Group	Number of animals	Occult blood		Color A	Specific gravity						Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		-	±		1.000-1.010	1.011-1.020	1.021-1.030	1.031-1.040	1.041-1.050	<1.050	
0 mg/kg	12	12	0	12	1	1	0	5	1	4	14.00 ± 17.63
12 mg/kg	6	6	0	6	0	2	1	2	0	1	20.92 ± 23.23
60 mg/kg	6	6	0	6	0	0	1	4	1	0	11.25 ± 3.72
300 mg/kg	12	11	1	12	[ 0	5	7	0	0	0 ]++	28.92 ± 13.15 ++

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, 1+ ; Moderate, 2+ ; Severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

[ ]+ : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

[ ]++ or ++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 21 Urinary findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	pH				Protein				Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -
		7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+				
0 mg/kg	6	0	0	2	4	0	0	5	1	6	6	6	6
300 mg/kg	6	2	1	2	1	0	0	6	0	6	6	6	6

Group	Number of animals	Occult blood		Color A	Specific gravity			Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)	
		-	±		1.021-1.030	1.031-1.040	1.041-1.050<		
0 mg/kg	6	6	0	6	1	2	2	1	17.08 ± 6.62
300 mg/kg	6	5	1	6	2	4	0	0	25.00 ± 6.44

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, 1+ ; Moderate, 2+ ; Severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

Table 22 Urinary findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	pH						Protein				Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+				
0 mg/kg	6	0	0	0	0	1	5	1	1	2	2	6	6	6	6
300 mg/kg	6	1	0	0	0	2	3	3	2	1	0	6	6	6	6

Group	Number of animals	Occult blood		Color A	Specific gravity				Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		-	±		1.011- 1.020	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050	
0 mg/kg	6	6	0	6	0	1	1	4	13.17 ± 4.77
300 mg/kg	6	5	1	6	[ 1	3	2	0 ]+	29.67 ± 29.37

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, 1+ ; Moderate, 2+ ; Severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

[ ]+ : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 23 Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		RBC 10 <sup>4</sup> /μL	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC 10 <sup>2</sup> /μL	Platelet 10 <sup>4</sup> /μL	Methemoglobin %
0 mg/kg	6	Mean	743.0	44.82	15.30	60.42	20.63	34.13	123.2	114.88	1.12
		S.D.	32.4	0.37	0.09	2.66	0.94	0.24	42.0	13.88	0.29
12 mg/kg	6	Mean	752.0	44.88	15.37	59.68	20.42	34.23	126.0	112.37	1.18
		S.D.	14.2	1.22	0.42	1.25	0.49	0.16	5.5	17.20	0.12
60 mg/kg	6	Mean	731.0	43.75	14.80	59.83	20.25	33.80	113.8	108.67	1.37
		S.D.	23.6	1.86	0.62	1.03	0.42	0.26	21.8	13.98	0.15
300 mg/kg	6	Mean	688.5**	42.13++	14.15++	61.25	20.57	33.58*	156.5	128.87	2.45**
		S.D.	31.4	1.22	0.23	1.93	0.69	0.50	51.7	11.73	0.31

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

(to be continued)

Table 23 Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) (continued)

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lymphocyte	Others
						Stab form	Segmented					
0 mg/kg	6	Mean	28.7	17.62	27.92	1.33	10.40	0.47	0.00	2.60	85.20	0.00
		S.D.	3.8	1.50	2.17	0.65	3.44	0.30	0.00	0.75	3.96	0.00
12 mg/kg	6	Mean	28.5	17.02	25.55	1.67	13.13	0.47	0.07	1.53	83.13	0.00
		S.D.	9.1	1.76	3.83	0.59	3.37	0.30	0.16	0.93	3.68	0.00
60 mg/kg	6	Mean	32.0	17.60	27.65	1.87	12.87	0.33	0.00	2.00	82.93	0.00
		S.D.	5.7	1.30	1.87	0.60	3.33	0.30	0.00	0.62	3.05	0.00
300 mg/kg	6	Mean	68.3++	16.27	24.82	2.00	20.20+	0.47	0.00	2.73	74.60+	0.00
		S.D.	16.5	0.43	1.72	0.57	10.51	0.30	0.00	0.73	11.20	0.00

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 24 Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		RBC 10 <sup>4</sup> /μL	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC 10 <sup>2</sup> /μL	Platelet 10 <sup>4</sup> /μL	Methemoglobin %
0 mg/kg	6	Mean	781.0	43.80	15.32	56.10	19.63	34.95	80.8	114.17	0.93
		S.D.	34.8	1.41	0.44	1.45	0.50	0.56	32.2	10.27	0.38
12 mg/kg	6	Mean	767.0	44.12	15.37	57.53	20.03	34.83	92.2	116.57	1.12
		S.D.	22.0	1.16	0.52	1.49	0.56	0.37	26.0	15.53	0.32
60 mg/kg	6	Mean	741.2	42.52	14.73	57.42	19.92	34.65	75.7	109.77	1.37
		S.D.	39.0	1.81	0.49	1.47	0.47	0.44	17.2	12.23	0.40
300 mg/kg	6	Mean	680.3**	40.03**	13.77**	58.88	20.23	34.40	107.7	118.08	2.12**
		S.D.	20.5	1.54	0.46	2.73	0.67	0.51	27.6	9.13	0.41

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

(to be continued)

Table 24 Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) (continued)

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lympho-cyte	Others
						Stab form	Segmented					
0 mg/kg	6	Mean	19.3	15.75	21.45	2.00	9.53	0.53	0.00	0.73	87.20	0.00
		S.D.	5.8	0.57	0.91	0.51	3.20	0.41	0.00	0.47	3.70	0.00
12 mg/kg	6	Mean	23.0	15.97	21.38	1.53	11.67	0.40	0.00	1.40	85.00	0.00
		S.D.	10.6	0.66	1.62	0.73	4.14	0.44	0.00	0.55	5.10	0.00
60 mg/kg	6	Mean	25.3	16.70*	22.03	2.40	12.47	0.40	0.00	1.27	83.47	0.00
		S.D.	6.1	0.53	1.07	0.80	4.24	0.62	0.00	0.69	4.82	0.00
300 mg/kg	6	Mean	44.5**	17.05**	21.85	1.27	7.80	0.13	0.00	1.20	89.60	0.00
		S.D.	16.5	0.38	1.61	0.69	2.41	0.21	0.00	1.52	3.78	0.00

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

Table 25 Hematological findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		RBC	Ht	Hb	MCV	MCH	MCHC	WBC	Platelet	Methemoglobin
			10 <sup>4</sup> /μL	%	g/dL	fL	pg	g/dL	10 <sup>2</sup> /μL	10 <sup>4</sup> /μL	%
0 mg/kg	6	Mean	834.3	48.52	16.10	58.17	19.28	33.18	121.2	111.27	0.95
		S.D.	31.9	1.99	0.72	1.38	0.58	0.26	28.4	15.65	0.12
300 mg/kg	6	Mean	779.3**	47.28	15.48	60.70	19.88	32.77*	135.7	112.82	1.67**
		S.D.	24.2	1.66	0.42	2.60	0.74	0.31	30.1	13.53	0.18

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lympho-cyte	Others
						Stab form	Segmented					
0 mg/kg	6	Mean	22.2	20.57	28.15	1.20	6.07	0.80	0.00	1.60	90.33	0.00
		S.D.	3.7	1.78	1.73	0.57	1.74	0.72	0.00	0.84	1.53	0.00
300 mg/kg	6	Mean	30.7**	18.40*	26.20	1.13	11.80**	0.27	0.07	1.40	85.33**	0.00
		S.D.	5.1	1.15	2.15	0.39	2.17	0.21	0.16	0.49	1.95	0.00

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

Table 26 Hematological findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		RBC	Ht	Hb	MCV	MCH	MCHC	WBC	Platelet	Methemoglobin
			10 <sup>4</sup> /μL	%	g/dL	fL	pg	g/dL	10 <sup>2</sup> /μL	10 <sup>4</sup> /μL	%
0 mg/kg	6	Mean	819.3	46.32	15.60	56.55	19.05	33.67	61.8	113.93	1.20
		S.D.	20.5	1.35	0.43	1.79	0.52	0.33	15.0	9.96	0.30
300 mg/kg	6	Mean	760.0**	44.42	14.98	58.45	19.73	33.77	71.5	116.05	1.57*
		S.D.	34.1	2.32	0.55	1.82	0.70	0.72	16.7	11.15	0.19

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lympho-cyte	Others
						Stab form	Segmented					
0 mg/kg	6	Mean	21.8	16.58	18.75	1.93	17.07	1.73	0.07	1.53	77.67	0.00
		S.D.	4.4	1.03	2.07	1.17	8.82	0.86	0.16	0.78	10.21	0.00
300 mg/kg	6	Mean	24.0	16.57	20.22	1.80	16.07	1.00	0.00	1.60	79.53	0.00
		S.D.	4.6	0.53	1.34	1.10	8.31	1.18	0.00	0.72	8.91	0.00

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

Table 27 Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	$\gamma$ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							$\alpha$ 1	$\alpha$ 2	$\beta$	$\gamma$					
0 mg/kg	6	Mean	5.55	2.957	1.147	53.32	20.63	7.23	14.85	3.97	68.7	30.2	907.0	0.53	0.042
		S.D.	0.10	0.060	0.069	1.56	1.83	0.34	0.55	0.33	10.9	7.4	208.8	0.15	0.008
12 mg/kg	6	Mean	5.37	2.978	1.247	55.43	17.55+	8.15	14.88	3.98	64.0	27.5	766.7	0.47	0.040
		S.D.	0.30	0.181	0.069	1.33	2.46	1.01	0.87	0.51	5.7	4.6	232.9	0.12	0.011
60 mg/kg	6	Mean	5.38	2.930	1.202	54.48	16.50++	8.18	16.27*	4.57	69.8	28.8	813.8	0.55	0.033
		S.D.	0.19	0.121	0.077	1.72	0.56	0.89	1.31	0.94	7.7	5.0	338.7	0.23	0.008
300 mg/kg	6	Mean	5.37	2.878	1.158	53.68	14.23++	10.18**	17.47**	4.43	68.7	34.8	915.7	0.75	0.063**
		S.D.	0.20	0.149	0.062	1.37	1.24	0.64	0.80	0.74	7.1	3.4	207.1	0.19	0.010

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

(to be continued)

Table 27 Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) (continued)

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
0 mg/kg	6	Mean	181.3	64.7	48.3	9.25	0.545	140.8	4.975	104.8	9.67	8.68
		S.D.	20.9	13.4	20.0	0.76	0.046	0.8	0.335	0.8	0.14	0.64
12 mg/kg	6	Mean	162.5	63.7	63.7	8.73	0.500	141.3	5.053	104.8	9.67	8.50
		S.D.	19.7	10.8	34.4	0.86	0.042	1.9	0.325	1.5	0.27	0.86
60 mg/kg	6	Mean	156.7*	64.0	71.7	9.07	0.512	142.3	4.598	105.2	9.48	8.10
		S.D.	7.7	8.7	13.7	1.03	0.029	0.5	0.194	1.5	0.31	0.19
300 mg/kg	6	Mean	136.7**	73.8	141.8++	18.37++	0.617	141.0	5.128	104.7	9.78	9.88+
		S.D.	14.7	9.1	68.0	7.65	0.090	1.4	0.387	1.2	0.29	0.93

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 28 Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	$\gamma$ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							$\alpha$ 1	$\alpha$ 2	$\beta$	$\gamma$					
0 mg/kg	6	Mean	5.45	3.032	1.255	55.67	16.00	8.30	15.00	5.03	59.0	19.8	474.0	0.72	0.033
		S.D.	0.21	0.144	0.070	1.39	1.42	0.48	1.01	0.68	2.8	2.6	111.5	0.25	0.008
12 mg/kg	6	Mean	5.50	3.097	1.295	56.37	15.78	8.10	14.77	4.98	55.8	19.3	364.7	0.75	0.042
		S.D.	0.13	0.074	0.056	1.04	0.82	0.54	0.78	0.79	5.7	5.5	105.0	0.15	0.010
60 mg/kg	6	Mean	5.48	3.095	1.302	56.48	15.35	8.32	14.85	5.00	57.3	21.0	394.3	0.72	0.037
		S.D.	0.34	0.245	0.078	1.42	0.73	1.05	0.90	1.35	6.9	2.8	84.8	0.26	0.010
300 mg/kg	6	Mean	5.57	3.173	1.328	57.05	12.52**	9.58*	15.95	4.90	63.2	29.3**	382.0	1.12	0.072**
		S.D.	0.22	0.154	0.061	1.12	1.76	0.80	1.04	0.93	9.5	6.5	64.3	0.53	0.019

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

(to be continued)

Table 28 Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169) (continued)

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
0 mg/kg	6	Mean	130.5	53.2	11.7	10.92	0.513	141.3	4.802	106.2	9.45	7.70
		S.D.	20.1	11.6	4.1	1.10	0.034	1.9	0.402	0.8	0.33	0.49
12 mg/kg	6	Mean	131.2	53.7	15.2	11.80	0.512	142.0	4.655	105.7	9.48	7.87
		S.D.	25.2	10.8	5.3	1.59	0.031	0.6	0.278	0.5	0.16	0.50
60 mg/kg	6	Mean	131.2	63.8	14.8	13.00	0.527	142.0	4.538	105.2	9.48	7.55
		S.D.	19.3	8.8	5.6	2.89	0.026	0.9	0.151	1.2	0.34	0.19
300 mg/kg	6	Mean	116.7	89.5**	21.7	18.57++	0.547	142.8	4.570	105.0	9.75	7.98
		S.D.	18.2	14.1	11.0	4.60	0.029	1.6	0.443	1.3	0.27	0.66

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 29 Biochemical findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	$\gamma$ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$					
0 mg/kg	6	Mean	5.72	2.913	1.043	51.02	22.13	7.20	15.42	4.23	60.5	23.2	591.0	0.67	0.063
		S.D.	0.19	0.055	0.053	1.24	1.66	0.42	0.88	0.96	3.7	1.6	73.8	0.12	0.008
300 mg/kg	6	Mean	5.60	3.027*	1.175**	54.05**	18.30**	7.65	15.77	4.23	64.5	25.7	485.7*	0.72	0.045**
		S.D.	0.17	0.103	0.023	0.49	1.47	0.58	0.92	0.56	7.0	3.1	78.7	0.18	0.008

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
		S.D.	12.7	14.9	10.6	1.23	0.030	1.0	0.185	0.8	0.22	0.31
300 mg/kg	6	Mean	155.7	61.0	42.0	15.90*	0.550	143.2*	4.902	106.7	9.45	8.18
		S.D.	24.0	5.7	13.9	1.26	0.035	0.8	0.354	1.2	0.27	0.47

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

Table 30 Biochemical findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	$\gamma$ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$					
0 mg/kg	6	Mean	5.95	3.388	1.333	57.02	15.70	7.10	15.07	5.12	64.3	20.7	309.7	1.17	0.073
		S.D.	0.23	0.149	0.147	2.70	1.83	0.37	0.45	0.92	6.0	2.5	77.8	0.26	0.014
300 mg/kg	6	Mean	5.75	3.217*	1.270	55.95	15.92	7.47	15.75	4.92	69.3	22.2	302.0	1.07	0.050*
		S.D.	0.16	0.064	0.067	1.30	1.40	0.62	0.87	0.72	14.5	4.0	81.6	0.15	0.014

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
		S.D.	29.3	14.4	11.6	2.43	0.035	0.8	0.232	1.8	0.19	0.46
300 mg/kg	6	Mean	128.0	82.8	14.5	19.73*	0.607	143.8*	4.733	110.0	9.25	7.68**
		S.D.	11.8	17.7	10.6	1.90	0.029	0.8	0.148	1.4	0.14	0.44

\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

Table 31 Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

	Period	End of administration			End of recovery		
	Group	Control	2,5-Dimethylaniline			Control	2,5-Dimethylaniline
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	300
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
No abnormal findings		6	6	4	1	6	2
Organ : Findings							
Forestomach : Thickening, mucosa, focal		0	0	2	4	0	1
Kidney : Yellowish brown patch, multifocal, bilateral		0	0	0	1	0	0
Yellowish white discoloration, papilla, unilateral		0	0	0	0	0	2
Yellowish white discoloration, papilla, bilateral		0	0	0	4	0	1
Prostate : Small size		0	0	0	1	0	0
Seminal vesicle : Small size, bilateral		0	0	0	1	0	0
Stomach : Adhesion, spleen		0	0	0	1	0	0

Values are expressed as the number of animals.

Table 32 Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

	Period	End of administration			End of recovery		
	Group	Control	2,5-Dimethylaniline			Control	2,5-Dimethylaniline
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	300
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
No abnormal findings		6	6	6	1	6	1
Organ : Findings							
Forestomach : Thickening, mucosa, focal		0	0	0	5	0	3
Kidney : Yellowish white discoloration, papilla, unilateral		0	0	0	0	0	3
Yellowish white discoloration, papilla, bilateral		0	0	0	1	0	1

Values are expressed as the number of animals.

Table 33 Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland		
			g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	
0 mg/kg	6	Mean	370.0	12.792	3.445	2.732	0.737	0.683	0.183	1.222	0.332	2.118	0.575	12.00	3.240
		S.D.	28.3	1.974	0.329	0.365	0.053	0.118	0.023	0.086	0.028	0.087	0.044	1.35	0.276
12 mg/kg	6	Mean	365.3	12.232	3.342	2.677	0.733	0.725	0.200	1.220	0.335	2.117	0.580	11.77	3.228
		S.D.	19.2	1.750	0.388	0.134	0.075	0.107	0.023	0.074	0.016	0.063	0.038	0.75	0.281
60 mg/kg	6	Mean	359.2	12.240	3.393	2.608	0.728	0.657	0.180	1.295	0.362	2.072	0.582	10.77	3.005
		S.D.	39.0	2.011	0.217	0.275	0.065	0.134	0.018	0.108	0.021	0.082	0.050	1.43	0.379
300 mg/kg	6	Mean	308.0**	13.133	4.268**	3.132	1.015**	0.878	0.283**	1.017**	0.332	2.002*	0.650*	10.18*	3.303
		S.D.	18.5	0.805	0.190	0.510	0.141	0.171	0.041	0.075	0.031	0.054	0.035	1.16	0.281

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Testis		Epididymis		Prostate		Seminal vesicle	
			mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	g	%	g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	g	%
0 mg/kg	6	Mean	625.2	170.057	18.45	5.008	53.3	14.482	3.003	0.815	0.750	0.203	496.8	134.037	1.288	0.350
		S.D.	40.0	19.911	4.01	1.104	4.5	1.646	0.203	0.070	0.073	0.030	64.5	10.148	0.080	0.031
12 mg/kg	6	Mean	653.2	177.538	17.03	4.683	53.2	14.580	3.103	0.853	0.753	0.207	446.8	122.528	1.210	0.332
		S.D.	151.0	32.001	1.52	0.579	5.0	1.503	0.237	0.097	0.043	0.019	93.1	25.311	0.060	0.028
60 mg/kg	6	Mean	660.5	181.137	20.12	5.587	50.0	13.925	2.985	0.833	0.752	0.210	503.5	140.842	1.388	0.385
		S.D.	216.7	42.609	5.20	1.177	11.3	2.928	0.178	0.049	0.089	0.013	40.1	11.054	0.243	0.034
300 mg/kg	6	Mean	523.2	170.678	18.08	5.897	46.7	15.108	2.883	0.938*	0.645	0.208	345.8**	112.203	0.980++	0.317
		S.D.	58.8	23.853	3.72	1.270	11.7	3.311	0.100	0.074	0.085	0.017	99.0	32.850	0.247	0.070

\* : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 34 Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %
0 mg/kg	6	Mean	201.8	6.465	3.193	1.585	0.788	0.435	0.217	0.737	0.365	1.912	0.953	12.55	6.193
		S.D.	19.3	0.916	0.172	0.080	0.042	0.039	0.023	0.070	0.034	0.079	0.072	2.13	0.618
12 mg/kg	6	Mean	212.3	6.963	3.265	1.653	0.775	0.477	0.225	0.755	0.355	1.862	0.882	11.83	5.593
		S.D.	18.1	1.172	0.310	0.262	0.080	0.062	0.021	0.078	0.019	0.073	0.065	2.03	0.960
60 mg/kg	6	Mean	211.2	7.373	3.488	1.618	0.768	0.470	0.222	0.773	0.367	1.907	0.912	12.92	6.143
		S.D.	21.6	0.925	0.186	0.151	0.043	0.080	0.023	0.074	0.016	0.051	0.083	1.71	0.755
300 mg/kg	6	Mean	186.3	7.688	4.135**	1.642	0.888*	0.530	0.287**	0.680	0.365	1.870	1.018	10.25	5.587
		S.D.	26.9	0.990	0.154	0.144	0.077	0.074	0.037	0.139	0.045	0.103	0.151	1.75	1.202

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Ovary		Uterus	
			mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	g	%
0 mg/kg	6	Mean	507.5	250.022	12.47	6.250	68.8	34.068	98.2	48.445	0.532	0.260
		S.D.	102.5	31.029	2.65	1.699	10.2	3.515	21.3	7.660	0.242	0.110
12 mg/kg	6	Mean	514.7	241.610	13.65	6.438	63.8	30.033	103.5	48.540	0.437	0.203
		S.D.	122.9	49.737	1.51	0.574	9.1	2.938	17.3	5.177	0.104	0.047
60 mg/kg	6	Mean	551.5	260.922	12.82	6.127	69.0	32.645	91.5	43.738	0.520	0.253
		S.D.	134.9	53.398	1.72	1.089	10.8	3.393	16.8	9.578	0.134	0.081
300 mg/kg	6	Mean	403.8	216.878	13.88	7.463	64.2	34.867	85.0	45.660	0.352	0.188
		S.D.	165.1	75.844	2.03	0.433	5.7	4.414	19.4	8.881	0.093	0.045

\* : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

\*\* : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.01$  (Dunnett's test).

Table 35 Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland		
			g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	
0 mg/kg	6	Mean	428.7	13.105	3.048	3.177	0.743	0.677	0.158	1.418	0.332	2.185	0.512	11.65	2.707
		S.D.	33.8	1.875	0.254	0.272	0.054	0.101	0.020	0.158	0.041	0.082	0.027	1.79	0.239
300 mg/kg	6	Mean	379.3*	11.297+	2.982	2.963	0.780	0.752	0.198*	1.298	0.342	2.088	0.553*	11.75	3.103*
		S.D.	26.7	0.651	0.110	0.315	0.043	0.120	0.029	0.071	0.018	0.116	0.035	1.00	0.261

Group	Number of animals	Thymus		Thyroid		Adrenal		Testis		Epididymis		Prostate		Seminal vesicle		
		mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	g	%	g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	g	%	
0 mg/kg	6	Mean	512.3	120.177	20.63	4.808	68.2	15.832	3.155	0.738	1.058	0.248	636.3	148.968	1.472	0.342
		S.D.	58.5	16.991	3.93	0.815	11.7	1.736	0.309	0.086	0.081	0.025	136.5	33.460	0.111	0.017
300 mg/kg	6	Mean	584.8	155.147	19.63	5.168	64.7	17.065	3.248	0.858*	1.043	0.277	451.5+	119.485	1.455	0.387
		S.D.	174.6	47.971	4.46	1.094	9.7	2.464	0.302	0.074	0.087	0.031	43.0	13.212	0.180	0.066

\* : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

+ : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney's U-test).

Table 36 Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Group	Number of animals	Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland		
			g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	
0 mg/kg	6	Mean	234.2	6.662	2.840	1.738	0.745	0.445	0.190	0.845	0.363	1.978	0.855	13.52	5.755
		S.D.	28.6	0.967	0.106	0.167	0.042	0.059	0.024	0.085	0.023	0.052	0.084	2.25	0.421
300 mg/kg	6	Mean	224.8	7.003	3.115*	1.765	0.788	0.532	0.233*	0.848	0.378	1.967	0.880	13.05	5.837
		S.D.	22.3	0.844	0.245	0.136	0.089	0.116	0.029	0.072	0.025	0.091	0.081	1.66	0.842

Group	Number of animals	Thymus		Thyroid		Adrenal		Ovary		Uterus		
		mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	g	%	
0 mg/kg	6	Mean	464.0	200.390	16.55	7.052	71.0	30.495	92.8	39.600	0.600	0.252
		S.D.	86.8	41.883	3.19	1.014	8.9	3.796	14.3	3.629	0.241	0.069
300 mg/kg	6	Mean	444.3	194.383	14.87	6.610	68.5	30.785	104.2	46.802	0.653	0.293
		S.D.	144.7	40.911	2.22	0.731	4.5	4.206	19.5	10.464	0.254	0.124

\* : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's test).

Table 37 Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Item	Group	End of administration				End of recovery	
		0 mg/kg	12 mg/kg	60 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
Organ: Findings	Grade						
Lung: Accumulation, foamy cell	+	1	-	-	0	1	0
Granuloma	+	0	-	-	0	1	0
Metaplasia, osseous	+	0	-	-	0	0	1
Forestomach: Squamous cell hyperplasia	+	0	0	3	4	0	2
Hyperkeratosis	+	0	0	1	4	0	1
Fibrosis, submucosa	+	0	0	0	1	0	0
Liver: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	6	0	0
Microgranuloma	+	0	2	2	2	3	1
Kidney: Edema, interstitium, papilla	+	0	0	0	5	0	5
Necrosis, papilla	+	0	0	0	3	0	2
Cellular infiltration, inflammatory cell, papilla	++	0	0	0	2	0	0
Regeneration, collecting duct/papillary duct	+	0	0	0	4	0	0
Mineralization, papilla	++	0	0	0	2	0	0
Dilatation, tubule	+	0	0	0	3	0	0
Regeneration, tubular epithelium	++	0	0	0	1	0	0
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	+	0	0	0	5	0	5
Cellular infiltration, inflammatory cell, cortex, focal	+	0	0	0	4	0	0
Fibrosis, cortex, focal	++	0	0	0	2	0	0
Cast, hyaline	+	0	0	0	4	0	0
Prostate: Cellular infiltration, inflammatory cell	+	2	3	3	4	2	4
Spleen: Congestion	++	0	0	0	2	0	2
Increase, deposit, hemosiderin	+	2	3	3	0	0	1
Capsulitis	++	0	0	2	0	1	0
Pituitary gland: Hyperplasia, tubular, pars nervosa	+++	0	0	0	6	0	0
Cyst, pars distalis	+	0	0	1	0	0	0
	+	0	0	1	0	0	0
	+	0	0	1	0	0	0
	+	0	0	1	0	0	0
	+	4	-	-	0	3	1
	+	0	0	0	6	0	3
	+	0	0	0	3	0	4
	++	0	0	0	3	0	2
	+	0	0	0	1	0	0
	+	0	-	-	0	1	0
	+	0	-	-	0	1	1

Values are number of animals with findings.

-: Blank.

Grade; +: slight change, ++: moderate change, +++: severe change.

Table 38 Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 2,5-Dimethylaniline (SR07169)

Item	Group	End of administration				End of recovery	
		0 mg/kg	12 mg/kg	60 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
Organ: Findings	Grade						
Lung: Accumulation, foamy cell	+	1	-	-	0	1	0
Forestomach: Squamous cell hyperplasia	+	0	0	2	6	0	3
Hyperkeratosis	+	0	0	2	6	0	2
Cellular infiltration, inflammatory cell, submucosa	+	0	0	0	1	0	0
Fibrosis, submucosa	+	0	0	0	2	0	1
Liver: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	6	0	0
Microgranuloma	+	3	3	4	2	0	2
Fatty change, periportal	+	2	2	3	0	0	0
Kidney: Edema, interstitium, papilla	+	0	0	0	5	0	5
Necrosis, papilla	+	0	0	0	5	0	5
Regeneration, collecting duct/papillary duct	+	0	0	0	2	0	2
Mineralization, papilla	+	0	0	0	5	0	4
Regeneration, tubular epithelium	+	1	0	0	3	0	2
	++	0	0	0	0	0	1
Cellular infiltration, inflammatory cell, cortex, focal	+	1	0	0	0	0	1
Fibrosis, cortex, focal	+	0	0	0	0	0	1
Spleen: Congestion	+	0	0	0	4	0	0
Increase, deposit, hemosiderin	+	0	1	1	2	2	1
	++	0	0	0	4	1	5
Bone marrow: Increase, erythropoiesis	+	0	0	0	3	0	0
Pituitary gland: Hyperplasia, tubular, pars nervosa	+	0	-	-	1	0	0

Values are number of animals with findings.

-: Blank.

Grade; +: slight change, ++: moderate change.