

N,N'-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの
ラットにおける単回投与毒性試験

－ 最終報告書 －

2003 年 9 月 18 日

試験委託者 : 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室
東京都千代田区霞ヶ関 1 丁目 2 番 2 号 (〒100-8916)

試験施設 : 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ
熊本県宇土市栗崎町 1285 番地 (〒869-0425)

目 次

	頁
目次	1

要約	7
試験材料および方法	8
試験成績	11
考察	12

Table (図および群別表)

要 約

1 群雌雄各 5 匹の Crl:CD(SD)IGS のラットに、*N,N'*-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンを 0 (対照), 15, 30, 60 および 120 mg/kg の用量で 1 回経口投与し, その急性期の毒性徴候および概略の致死量について検討した. 結果を以下に示す.

1. 半数致死量 (LD_{50} 値)

120 mg/kg 群では雄 4/5 例および雌 5/5 例, 60 mg/kg 群では雄 1/5 例および雌 3/5 例が投与後 30~45 分に死亡した. その結果, LD_{50} 値 (95%信頼限界) は雄が 85.3 mg/kg (44.8~216.9 mg/kg), 雌が 56.0 mg/kg (40.2~78.0 mg/kg) であった.

2. 一般状態の観察

死亡例では, 雌雄ともに, 散瞳, 自発運動の低下, 緩徐呼吸, 振戦および腹臥位が認められた.

生存例では, 120 mg/kg 群の雄 1 例で死亡例と同様の症状が認められた. 60 mg/kg 群では, 雄で散瞳, 自発運動の低下, 緩徐呼吸および振戦がみられ, 雌で散瞳および自発運動の低下が認められた. 30 mg/kg 群では, 雄で散瞳がみられ, 雌で散瞳, 自発運動の低下, 緩徐呼吸および振戦が認められた. これらの変化は投与翌日 (投与後 1 日) にはすべて消失しており, その後は何ら変化は認められなかった. 15 mg/kg 群および対照群の雌雄では, 観察期間を通して何ら変化は認められなかった.

3. 体重測定

60 mg/kg 群の雄および 30 mg/kg 群の雌では投与後 1 日に, 60 mg/kg 群の雌では観察期間を通して, 体重の低値傾向を示した. 30 mg/kg 群の雄および 15 mg/kg 群の雌雄では, 観察期間を通して, 対照群と同様の増加推移を示した.

4. 病理学的検査

死亡した 60 および 120 mg/kg 群の雌で肉眼的に腺胃粘膜に軽度の暗赤色点, 組織学的に腺胃粘膜固有層の軽度の出血が認められた. 生存例では, 全例で何ら変化は認められなかった.

試験材料および方法

1. 被験物質および媒体

より提供された N,N' -ビス (2-メチルフェニル) グアニジン[純度 99.6 wt%, ロット番号] を被験物質として使用した (添付資料 1). 本被験物質は, 白色粉末であり, 試験期間中の被験物質の安定性については提供者にて分析し, 安定であることを確認した (添付資料 2). 媒体は, カルボキシメチルセルロースナトリウム (ロット番号: M1H1784, ナカライテスク株式会社) および Tween 80 (ロット番号: M0A8651, ナカライテスク株式会社) を精製水に溶解して 0.1% Tween 80 添加 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 溶液としたものを使用した. なお, 被験物質および媒体は被験物質室の保管庫に室温で保存した.

2. 使用動物および飼育条件

5 週齢の Crj:CD(SD)IGS ラット (日本チャールス・リバー株式会社, 厚木飼育センター) を雌雄各 30 匹購入し, 7 日間の検疫馴化を行った. この間に, 全例について一般状態の観察および体重測定を実施し, 異常がないことを確認したのち, 雌雄各 25 匹を選んで 6 週齢で試験に使用した. 投与日の体重は, 雄が 177.4~190.2 g, 雌が 131.4~152.7 g であった. 動物は, 温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ (許容範囲 $21 \sim 27^\circ\text{C}$), 湿度 $55 \pm 10\%$ (許容範囲 $35 \sim 75\%$), 照明 12 時間 (午前 7 時~午後 7 時) および換気回数 13~15 回/時に設定したバリアーシステム A 区域内の飼育室 08 番で床敷 (ホワイトフレーク, 日本チャールス・リバー株式会社) を入れたポリカーボネイト製ケージ (W265×H185×D425 mm) に, 1 ケージ当たり 2~3 匹ずつ収容して飼育した. なお, 温度の実測値は最高 24°C , 最低 22°C , 湿度の実測値は最高 65%, 最低 50% であった. 飼料は高圧蒸気滅菌処理した固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社) を, 飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加 (約 2 ppm) した井戸水を給水瓶によりそれぞれ自由に摂取させた. 飼料については財団法人日本食品分析センターにて, また, 飲水については株式会社鶴城南九科研センターにて分析を行い, いずれも許容基準に適合していることを確認した. 床敷および飼育器材は高圧蒸気滅菌したものを使用し, ケージおよび給水瓶は週 2 回の頻度で, ケージ蓋およびケージ架台 (ラック) は群分け時に 1 回交換した. また, 飼育室は毎日清掃し, 消毒薬を浸したモップで清拭した.

3. 試験群構成、投与量設定の根拠および群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性別	動物数	動物番号
対照群	0	0	10	♂	5	1~5
				♀	5	51~55
低用量群	15	1.5	10	♂	5	6~10
				♀	5	56~60
中用量群 1	30	3	10	♂	5	11~15
				♀	5	61~65
中用量群 2	60	6	10	♂	5	16~20
				♀	5	66~70
高用量群	120	12	10	♂	5	21~25
				♀	5	71~75

投与量は、ラットを用いた単回投与予備試験 [試験番号 P020010 (GLP 非適用), 投与量 : 10, 30, 100 および 300 mg/kg, 動物数 : 雌雄各 3 匹/群] の結果から設定した。すなわち, 当該試験では 100 および 300 mg/kg 群の雌雄全例が死亡し, 一般状態の観察で散瞳, 自発運動の低下, 緩徐呼吸および振戦などが認められた。したがって, 本試験では全例が死亡すると予想される 120 mg/kg を高用量とし, 以下公比 2 で除した 60, 30 および 15 mg/kg を設定した。

試験群は, 上記 4 用量に媒体を投与する対照群を加えて計 5 群とし, 1 群当たりの動物数は各群とも雌雄各 5 匹とした。

群分けは, 投与前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法で行い, 群分け後の動物には黒い色の油性フェルトペンによる尾の番号付けおよび耳パンチにより個体識別した。また, 各ケージには試験番号, 動物番号, 投与量および性別を表示したラベルを付けて識別した。なお, 投与日の投与前に試験に使用する動物の体重変動が平均体重の $\pm 20\%$ 以内であることを確認した。群分け後の残余動物は, 試験から除外した。

4. 投与経路、投与方法および投与期間

投与経路は, 「OECD 毒性試験ガイドライン」で指定されていること, また, 予想されるヒトへの曝露経路の一つであることから経口とし, 約 18 時間絶食させた動物に胃管を用いて 1 回強制投与した。投与容量は 10 mL/kg とし, 各動物の投与液量は投与日の体重を基に算出し

た。対照群には同容量の媒体を投与した。

5. 被験物質と媒体との混合物調製法および分析

被験物質を各濃度ごとに必要量秤量して 0.1%Tween 80 添加 0.5%CMC-Na 溶液で懸濁し, 1.5, 3, 6 および 12 mg/mL 懸濁液を調製した。調製は投与 2 日前に行い, 調製した混合物は被験物質保管室または飼育区域内の検体保管室に室温で保存した。なお, 本調製法による 0.1 および 100 mg/mL 液は均一であり, かつ褐色ガラス容器中で室温あるいは冷蔵保存下で 8 日間安定である (添付資料 3)。また, 調製した全ての調製物の濃度を分析し, 規定値の $\pm 10\%$ 以内にあることを確認した (添付資料 4)。

6. 観察, 検査および測定 of 頻度並びに方法

1) 一般状態の観察

観察期間は投与後 14 日間とし, 投与日 (投与 0 日) は投与後 6 時間まで経時的に, 投与後 1 日から 13 日は午前および午後の 1 日 2 回, 投与後 14 日は午前中に 1 回, 一般状態の観察および生死の確認を行った。

2) 体重測定

投与日の投与前 (投与 0 日), 並びに投与後 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日に測定した。また, 死亡動物については最終体重を測定した。

3) 病理学的検査

死亡した動物は発見後速やかに, また観察期間終了後の生存動物はエーテル麻酔下に放血致死させたのち剖検した。死亡例で肉眼的に異常が認められた 120 mg/kg 群の雄 1 例 (No.25) の肺, ならびに 60 および 120 mg/kg 群の雌各 1 例 (No.70 および 72) の胃については, 摘出して 10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。さらに, 常法に従ってパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

7. 統計学的処理

投与後 14 日間の累積死亡動物数から, 雄では Probit 法, 雌では Van der Waerden 法により LD_{50} 値を算出した。体重は, 各群ごとに平均値と標準偏差を求めた。なお, 有意差検定は行わなかった。

試験成績

1. 死亡の発生状況および LD₅₀ 値

死亡の発生状況を Table 1 に示した.

120 mg/kg 群では雄 4/5 例および雌 5/5 例が死亡し, 60 mg/kg 群では雄 1/5 例および雌 3/5 例が死亡した. その結果, LD₅₀ 値 (95%信頼限界) は雄が 85.3 mg/kg (44.8~216.9 mg/kg), 雌が 56.0 mg/kg (40.2~78.0 mg/kg) であった.

2. 一般状態の観察

一般状態の観察結果を Table 2 および Appendix 1, 2 に示した.

死亡例では, 投与後 15 分より散瞳, 自発運動の低下, 緩徐呼吸, 振戦および腹臥位がみられ, 投与後 30 分に 60 mg/kg 群の雌 1 例, 120 mg/kg 群の雄 4 例および雌 5 例が死亡し, 投与後 45 分に 60 mg/kg 群の雄 1 例および雌 2 例が死亡した.

生存例では, 120 mg/kg 群の雄 1 例で投与後 15 分より死亡例と同様の症状がみられ, 投与後 6 時間まで観察されたが, 投与翌日 (投与後 1 日) にはすべて消失しており, その後は何ら変化は認められなかった. 60 mg/kg 群では, 雄で投与後 15 分より投与後 2 時間まで散瞳, 自発運動の低下, 緩徐呼吸および振戦がみられ, 雌では投与後 15 分より投与後 1 時間まで散瞳および自発運動の低下が認められた. 30 mg/kg 群では, 雄で投与後 45 分より投与後 1 時間に散瞳がみられ, 雌では投与後 30 分より投与後 2 時間まで散瞳, 自発運動の低下, 緩徐呼吸および振戦が認められた. 15 mg/kg 群および対照群の雌雄では, 観察期間を通して何ら変化は認められなかった.

3. 体重測定

体重の推移を Figure 1, Table 3 および Appendix 3, 4 に示した.

60 mg/kg の雄および 30 mg/kg の雌で投与後 1 日に, 60 mg/kg 群の雌では観察期間を通して, 体重が低値傾向を示した. 30 mg/kg 群の雄および 15 mg/kg 群の雌雄では, 観察期間を通して, 対照群と同様の増加推移を示した.

4. 剖検

剖検の結果を Table 4 および Appendix 5, 6 に示した。

死亡例では、120 mg/kg 群の雄 1/4 例で肺の軽度の暗赤色化が認められた。また、60 mg/kg 群の雌 1/3 例および 120 mg/kg 群の雌 3/5 例で腺胃粘膜に軽度の暗赤色点が認められた。

生存例では、全例で何ら変化は認められなかった。

5. 病理学的検査

病理組織学的検査の結果を Table 5 に示した。

死亡した 120 mg/kg 群の雄で肉眼的に軽度の暗赤色化がみられた肺で組織学的に軽度のうっ血が認められた。また、60 および 120 mg/kg 群の雌で肉眼的に腺胃粘膜の暗赤色点がみられた胃で組織学的に腺胃粘膜固有層の軽度の出血が認められた。

考 察

N,N'-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの安全性に関する毒性試験の一環として、Crj:CD(SD)IGS の雌雄ラットに 1 回経口投与し、その急性期の毒性徴候および概略の致死量について検討した。投与量は 0 (対照), 15, 30, 60 および 120 mg/kg とした。

120 mg/kg 群では雄 4/5 例および雌 5/5 例が死亡し、60 mg/kg 群では雄 1/5 例および雌 3/5 例が投与後 30 ~ 45 分に死亡した。その結果、LD₅₀ 値 (95%信頼限界) は雄が 85.3 mg/kg (44.8~216.9 mg/kg), 雌が 56.0 mg/kg (40.2~78.0 mg/kg) であった。

死亡例では、雌雄ともに、一般状態の観察で散瞳、自発運動の低下、緩徐呼吸、振戦および腹臥位が認められた。病理学的検査では、60 および 120 mg/kg 群の雌で肉眼的に腺胃粘膜に軽度の暗赤色点、組織学的に腺胃粘膜固有層の軽度の出血が認められた。この変化は出血のみの変化で、粘膜上皮の変性や壊死を伴わないものの被験物質にわずかな刺激性があるものと考えられた。また、120 mg/kg 群の雄で肉眼的に肺に軽度の暗赤色化、組織学的に軽度のうっ血が認められたが、程度が弱く、出現頻度が低いこと、かつ死亡例でしばしば認められる変化であることから、本被験物質投与に起因した変化ではないと考えられた。

生存例では、120 mg/kg 群の雄 1 例で死亡例と同様の症状がみられ、投与後 6 時間まで観察されたが、投与翌日 (投与 1 日) にはすべて消失しており、その後は何ら変化は認められなかった。

60 mg/kg 群では、雄で散瞳、自発運動の低下、緩徐呼吸および振戦がみられ、雌で散瞳および自発運動の低下が認められた。30 mg/kg 群では、雄で散瞳がみられ、雌で散瞳、自発運動の低下、緩徐呼吸および振戦が認められた。また、60 mg/kg の雄および 30 mg/kg の雌で投与後 1 日に、60 mg/kg 群の雌では観察期間を通して、体重が低値傾向を示した。

N,N'-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの
ラットにおける単回投与毒性試験

Table
(図及び群別表)

目 次

	頁
Figure 1 Body weight changes	1
Table 1 Mortality and lethal dose	2
Table 2 Clinical signs	3
Table 3 Body weights	11
Table 4 Necropsy findings	12
Table 5 Histopathological findings	15

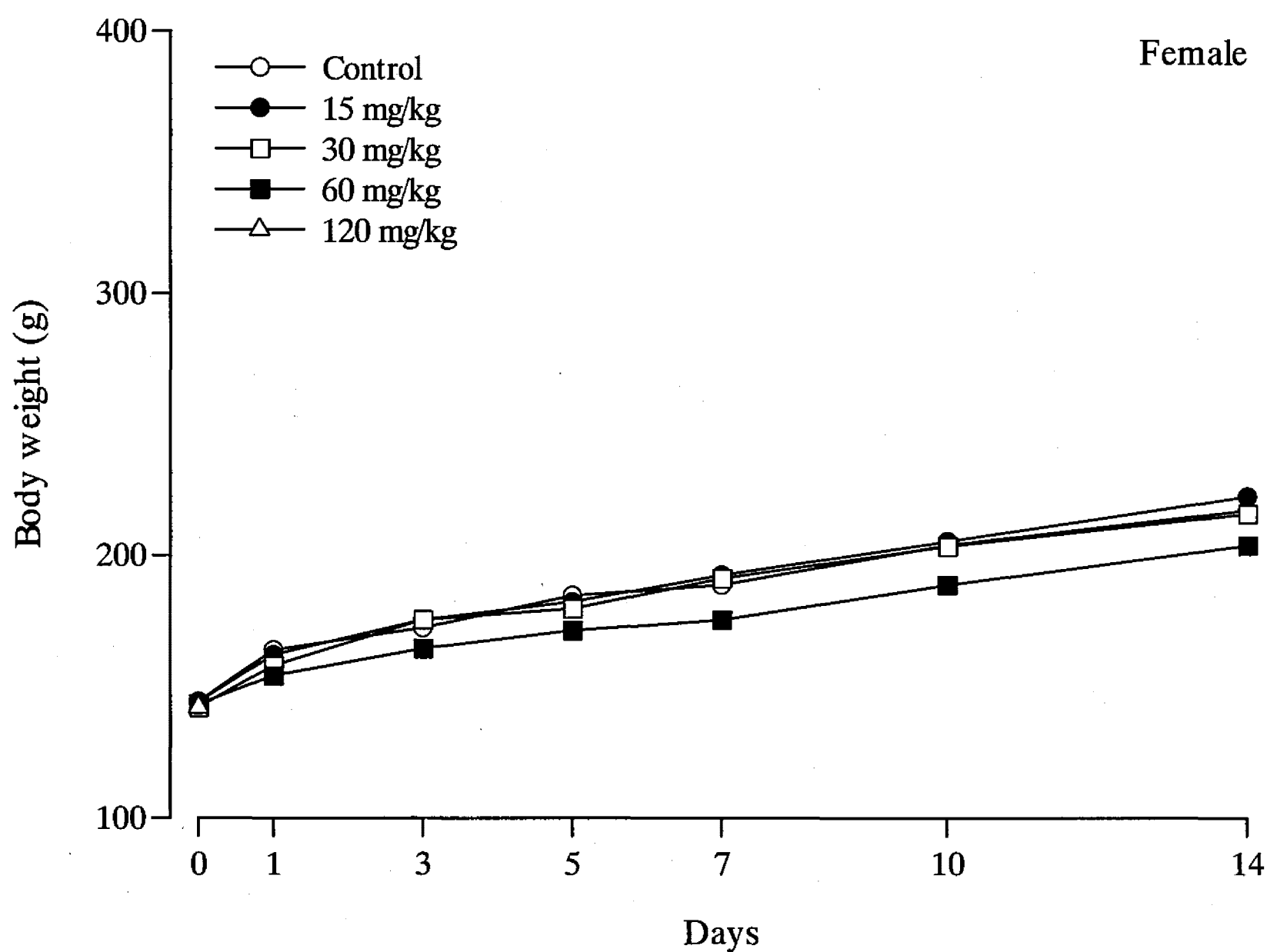
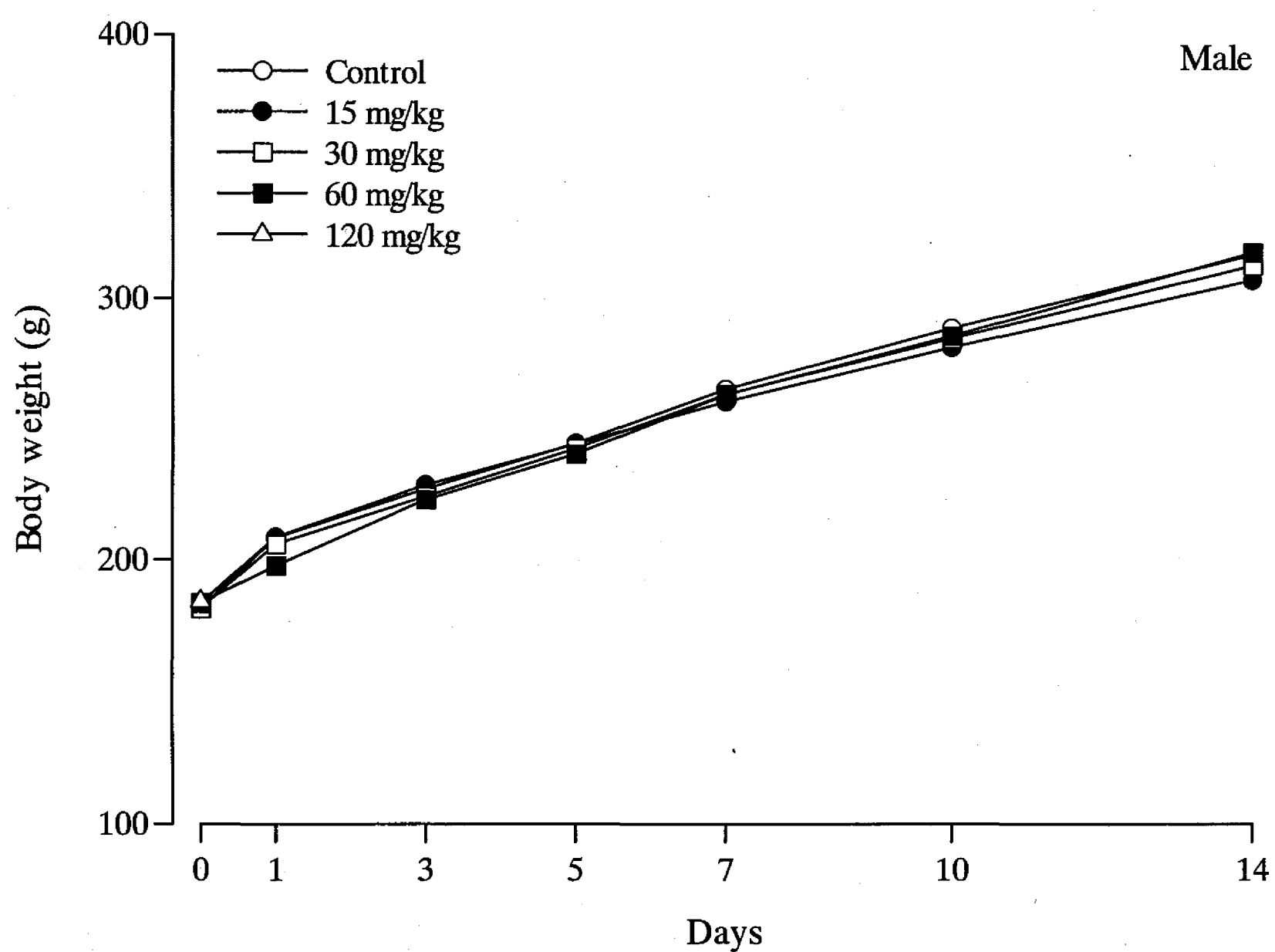


Figure 1 Body weight changes

Table 1 Mortality and lethal dose
Male, Female

Sex	Group and dose	Number of animals	Time after administration															Total number of dead animals	LD50	
			Minute				Hour				Day								(95% confidence interval)	
			0	15	30	45	1	2	3	6	1	2	3	4	5	6	7		8~14	(mg/kg)
Male	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85.3 (44.8~216.9)
	15 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	30 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	60 mg/kg	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	120 mg/kg	5	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	56.0 (40.2~78.0)
	15 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	30 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	60 mg/kg	5	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	120 mg/kg	5	0	0	5															

Table 2 Clinical signs
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Days								
			0								
			PRE	JUS	15min	30min	45min	1 hr	2 hr	3 hr	6 hr
Male	Control	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	15 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	30 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	4	4	5	5	5
		Mydriasis	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	60 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	4	4	4	4
		No abnormality	5	5	0	0	0	0	0	4	4
		Mydriasis	0	0	4	5	4	4	3	0	0
		Hypoactivity	0	0	5	5	4	4	3	0	0
		Bradypnea	0	0	0	4	3	3	0	0	0
		Tremor	0	0	0	1	1	2	0	0	0
		Prone position	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	120 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	1	1	1	1	1
		No abnormality	5	5	0	0	0	0	0	0	0
		Mydriasis	0	0	5	1	1	1	1	1	1
		Hypoactivity	0	0	5	1	1	1	1	1	1
		Bradypnea	0	0	5	1	1	1	1	1	1
		Tremor	0	0	0	0	1	1	1	1	0
		Prone position	0	0	0	1	1	1	1	0	0
		Dead	0	0	0	4	0	0	0	0	0

PRE: before administration, JUS: just after administration.

Table 2 - continued

Clinical signs
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Days									
			1		2		3		4		5	
			AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM
Male	Control	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	15 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	30 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	Number of examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		No abnormality	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120 mg/kg	Number of examined	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		No abnormality	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued

Clinical signs
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Days									
			6		7		8		9		10	
			AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM
Male	Control	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	15 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	30 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	Number of examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		No abnormality	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120 mg/kg	Number of examined	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		No abnormality	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued
Clinical signs
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Days							
			11		12		13		14	
			AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	
Male	Control	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	
	15 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	
	30 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	
	60 mg/kg	Number of examined	4	4	4	4	4	4	4	
		No abnormality	4	4	4	4	4	4	4	
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	
	120 mg/kg	Number of examined	1	1	1	1	1	1	1	
		No abnormality	1	1	1	1	1	1	1	
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2 - continued
Clinical signs
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Days								
			0								
			PRE	JUS	15min	30min	45min	1 hr	2 hr	3 hr	6 hr
Female	Control	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	15 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	30 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	3	3	3	4	5	5
		Mydriasis	0	0	0	2	1	2	1	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	2	1	1	1	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	1	1	0	0	0
		Tremor	0	0	0	2	2	1	0	0	0
		60 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	4	2	2	2
	No abnormality		5	5	1	1	0	0	2	2	2
	Mydriasis		0	0	4	3	1	0	0	0	0
	Hypoactivity		0	0	4	3	2	2	0	0	0
	Bradypnea		0	0	0	2	0	0	0	0	0
	Tremor		0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Prone position		0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Dead		0	0	0	1	2	0	0	0	0
	120 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	0	0	0	0	0
		No abnormality	5	5	0	0	0	0	0	0	0
		Mydriasis	0	0	5	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	5	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	5	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	2	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	5	0	0	0	0	0

PRE: before administration, JUS: just after administration.

Table 2 - continued
Clinical signs
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Days									
			1		2		3		4		5	
			AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM
Female	Control	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	15 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	30 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	Number of examined	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		No abnormality	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120 mg/kg	Number of examined										
		No abnormality										
		Mydriasis										
		Hypoactivity										
		Bradypnea										
		Tremor										
		Dead										

Table 2 - continued Clinical signs
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Days									
			6		7		8		9		10	
			AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM
Female	Control	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	15 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	30 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	Number of examined	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		No abnormality	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120 mg/kg	Number of examined										
		No abnormality										
		Mydriasis										
		Hypoactivity										
		Bradypnea										
		Tremor										
		Dead										

Table 2 - continued Clinical signs
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Days							
			11		12		13		14	
			AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	
Female	Control	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	
	15 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	
	30 mg/kg	Number of examined	5	5	5	5	5	5	5	
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	
	60 mg/kg	Number of examined	2	2	2	2	2	2	2	
		No abnormality	2	2	2	2	2	2	2	
		Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	
		Tremor	0	0	0	0	0	0	0	
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	
	120 mg/kg	Number of examined								
		No abnormality								
		Mydriasis								
		Hypoactivity								
		Bradypnea								
		Tremor								
		Dead								

Table 3 Body weights
Male, Female

Sex	Group and dose		Body weight (g) on day						
			0	1	3	5	7	10	14
Male	Control	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	181.6	208.4	227.2	244.7	265.4	288.8	316.7
		S.D.	±5.0	±6.7	±8.4	±8.2	±10.3	±12.0	±17.0
	15 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	183.6	208.7	228.7	244.3	260.6	281.5	307.2
		S.D.	±2.6	±3.3	±5.7	±5.8	±4.7	±5.9	±11.6
	30 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	181.5	206.0	224.3	242.6	263.4	284.9	312.7
		S.D.	±4.1	±4.2	±5.0	±4.9	±7.6	±9.4	±13.7
	60 mg/kg	N	5	4	4	4	4	4	4
		Mean	183.7	197.8	223.0	240.6	263.3	285.8	317.6
		S.D.	±4.9	±7.2	±6.0	±7.5	±9.4	±10.9	±17.2
	120 mg/kg	N	5	1	1	1	1	1	1
		Mean	184.2	-	-	-	-	-	-
		S.D.	±4.1	-	-	-	-	-	-
Female	Control	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	144.2	163.8	172.3	184.7	188.7	203.8	217.2
		S.D.	±5.6	±7.6	±6.8	±10.0	±9.9	±12.1	±12.8
	15 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	144.0	161.9	175.3	182.3	192.5	205.3	222.5
		S.D.	±7.9	±12.3	±11.6	±10.6	±11.0	±9.7	±12.0
	30 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	142.1	157.8	175.4	179.6	191.3	203.4	215.8
		S.D.	±4.7	±3.4	±5.0	±3.6	±6.0	±7.2	±7.8
	60 mg/kg	N	5	2	2	2	2	2	2
		Mean	143.2	154.1	164.4	171.3	175.3	188.6	203.8
		S.D.	±6.7	-	-	-	-	-	-
	120 mg/kg	N	5						
		Mean	142.0						
		S.D.	±5.2						

Table 4 Necropsy findings
Male, Female, Day 15

Organs and findings	Sex	Male											
	Group and dose	Control			15 mg/kg			30 mg/kg			60 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	5	0	5	5	0	5	5	0	5	4	1	5
Digestive system													
Stomach													
Spot, mucosa, glandular stomach, dark red													
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
Respiratory system													
Lung													
Coloration, dark red													
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 4 - continued Necropsy findings
Male, Female, Day 15

Organs and findings	Sex	Male			Female								
	Group and dose	120 mg/kg			Control			15 mg/kg			30 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	1	4	5	5	0	5	5	0	5	5	0	5
Digestive system													
Stomach													
Spot, mucosa, glandular stomach, dark red													
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
Respiratory system													
Lung													
Coloration, dark red													
0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 4 - continued Necropsy findings
Male, Female, Day 15

Organs and findings	Sex	Female					
	Group and dose	60 mg/kg			120 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	2	3	5	0	5	5
Digestive system							
Stomach							
Spot, mucosa, glandular stomach, dark red							
		0	1	1	0	3	3
Respiratory system							
Lung							
Coloration, dark red							
		0	0	0	0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 5 Histopathological findings
Male,Female,Day 15

Organs and findings	Group and dose	120 mg/kg	60 mg/kg	120 mg/kg
	Animal No.	25	70	72
	Necropsy timing	D	D	D
Digestive system				
Stomach		*		
Hemorrhage, lamina propria, glandular stomach			+	+
Respiratory system				
Lung			*	*
Congestion		+		

Abbreviation: D, dead.
Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.
*: not examined.