

*N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの
ラットにおける簡易生殖毒性試験*

－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
東京都千代田区霞が関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	9
試験材料および方法	10
試験成績	15
考察	18
文献	20
Fig. 1 Mean body weight changes of male rats treated orally with guanidine, <i>N,N'</i> -bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	21
Fig. 2 Mean body weight changes of female rats treated orally with guanidine, <i>N,N'</i> -bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	22
Fig. 3 Mean food consumption of male rats treated orally with guanidine, <i>N,N'</i> -bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	23
Fig. 4 Mean food consumption of female rats treated orally with guanidine, <i>N,N'</i> -bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	24

Table 1 Clinical signs of male rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	25
Table 2 Clinical signs of female rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	29
Table 3 Body weights of male rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	36
Table 4 Body weights of female rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	37
Table 5 Food consumption of male rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	38
Table 6 Food consumption of female rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	39
Table 7 Necropsy findings of male rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	40
Table 8 Necropsy findings of male rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test - Dead	41
Table 9 Necropsy findings of female rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	42
Table 10 Necropsy findings of female rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test – Unscheduled sacrifice	43
Table 11 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	44
Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	45
Table 13 Histopathological findings of male rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	46
Table 14 Histopathological findings of male rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test - Dead	47
Table 15 Histopathological findings of female rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	48
Table 16 Histopathological findings of female rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test – Unscheduled sacrifice	49
Table 17 Reproductive performance of rats treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	50
Table 18 Terminal delivery of F0 dams treated orally with guanidine,N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test	51

要 約

OECD 既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として, *N,N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの 0(媒体対照), 8, 20 および 50 mg/kg/day を Crj:CD(SD 系)IGS ラットの雌雄(各 12 匹/群)に交配前 14 日間, 雄ではその後交配期間を含む 35 日間, 雌では交配期間, 妊娠期間および哺育 3 日まで通して経口投与し, 親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した.

1. 反復投与毒性

50 mg/kg 群で死亡が雄 2 例および雌 3 例に認められた. 生存例では, 20 および 50 mg/kg 群の雌雄で流涎, 20 mg/kg 群の雌および 50 mg/kg 群の雌雄で散瞳, 自発運動の低下, 緩徐呼吸, 腹臥位および振戦が認められた. これらの症状のほとんどが投与開始日からみられ, 投与日数の経過とともに出現例数は減少したが, 流涎は投与中期ごろより投与最終日にかけて散発的に認められた. さらに, 50 mg/kg 群の雌雄では体重および摂餌量の低値がみられ, 20 mg/kg 群の雌においても摂餌量の低値が認められた. 剖検, 器官重量および病理組織学検査では, 被験物質投与の影響は認められなかった.

以上のように, 20 および 50 mg/kg 群で被験物質投与による影響が認められていることから, 本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は, 雌雄とも 8 mg/kg/day と推察された.

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては, 性周期, 黃体数, 着床痕数, 着床率, 交尾率, 受胎率および交尾所要日数に被験物質投与の影響は認められなかった. 分娩時検査では, 50 mg/kg 群で出産児数, 新生児数, 出生率および雌雄の生後 0 日新生児体重の低値ならびに外表異常出現率の高値が認められた. 妊娠期間, 死産率, 出産率, 新生児の性比および型別外表異常出現率については, 被験物質投与の影響は認められなかった. 哺育期検査では, 50 mg/kg 群で新生児の生後 4 日の生存率に低値が認められた.

以上のように, 親動物の生殖能力に被験物質投与の影響はみられなかったが, 次世代児の発生・発育への影響が 50 mg/kg 群で認められた. したがって, 本試験条件下における親動物の生殖能力に関する無影響量は 50 mg/kg/day, 次世代児の発生・発育に関する無影響量は, 親動

物および児動物とともに 20 mg/kg/day と推察された。

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(Lot No. , 純度: 99.6 wt%)を試験に使用した。本被験物質は白色粉末である(添付資料 1)。試験期間中の被験物質の安定性については、本試験の投与期間終了後に上記の提供先にて分析を行った結果、投与期間中安定であったことが確認された(添付資料 2)。媒体には 0.1 w/v% Tween80 添加 0.5 w/v% カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na) 溶液(Tween 80: Lot No. M0A8651, ナカライトスク株式会社, CMC-Na: Lot No. M1R6775, ナカライトスク株式会社)を使用した。なお、被験物質および媒体調製用の試薬は室温で被験物質室の保管庫に保存した。

2. 使用動物および飼育条件

8 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 55 匹購入し、13 日間の検疫・馴化を行った。この期間中に一般状態の観察および体重測定を行い、異常がないことを確認したのち、雌雄各 48 匹を選抜し、10 週齢で試験に使用した。なお、投与開始時の体重は雄で 346.2~408.2 g, 雌で 216.9~260.5 g であった。動物は温度 24±2 °C(許容範囲 21~27 °C), 湿度 55±10 %(許容範囲 35~75 %), 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 C 区域(飼育室 94 番)で飼育した。検疫・馴化期間中は 2~3 匹、群分け後は個別(ただし、交配期間中は雌雄各 1 匹)にステンレススチール製ケージ(W260×H200×D380 mm, 東洋理工株式会社)に収容した。また、交尾が確認された雌動物については、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)に個別に収容した。なお、試験期間中の温度の実測値は最高 25 °C, 最低 22 °C, 湿度の実測値は最高 62 %, 最低 53 % 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または自動給水装置によりそれぞれ

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、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。なお、飼育器材は高圧蒸気滅菌処理したものを使用し、ケージ架台およびポリカーボネイト製ケージ用蓋は4週間に1回以上、ステンレススチール製ケージおよび給水瓶は2週間に1回以上、ポリカーボネイト製ケージは週1回以上、受皿は週2回以上の頻度で交換した。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	使用動物数	動物番号
対照群	0	0	10	♂	12	901~912
				♀	12	951~962
低用量群	8	0.8	10	♂	12	913~924
				♀	12	963~974
中間用量群	20	2	10	♂	12	925~936
				♀	12	975~986
高用量群	50	5	10	♂	12	937~948
				♀	12	987~998

投与量は、先に実施したラットを用いた14日間反復投与毒性予備試験[試験番号 P020012、投与量：10, 20, 40 および 80 mg/kg、動物数：雌雄各5匹/群(GLP非適用)]¹⁾の結果から設定した。すなわち、当該試験では80 mg/kg群の雄全例と雌4例が死亡した。一般状態観察では、死亡例で自発運動の低下、緩徐呼吸、散瞳、腹臥位、側臥位および振戦が認められた。生存例では、80 mg/kg群の雌1例で自発運動の低下、緩徐呼吸、散瞳、振戦および流涎がみられ、40 mg/kg群の雌2例で自発運動の低下、散瞳、振戦および流涎が認められた。摂餌量では80 mg/kg群の雌雄および40 mg/kg群の雌で投与2日に対照群と比較して有意な低値が認められた。剖検所見では80 mg/kg群の死亡例で雄4/5例および雌3/4例に肺の暗赤色化が認められた。したがって、本試験では明らかな毒性が発現すると考えられる50 mg/kgを高用量とし、以下公比2.5をもって20および8 mg/kgを設定した。また、媒体のみを投与する対照群を設

けた。

群分けは、投与開始前日に、その日の体重を基に層別連續無作為化法で行った。なお、試験には、平均体重の 20 %以内の動物を使用した。また、雌については検疫・馴化期間中に性周期検査を行い、発情期が 4 日周期で正常に回帰している動物を使用した。なお、群分け後の残余の雌雄各 7 例については、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 試験法ガイドラインに準じ、また予想されるヒトへの曝露経路の一つである経口投与とした。雄は交配前 14 日間およびその後 35 日間の合計 49 日間、雌は交配前 14 日間、交配期間(交尾成立までの最長 14 日間)、妊娠期間および哺育 3 日までの期間、それぞれ 1 日 1 回連日投与した。なお、投与開始日を投与 1 日とした。投与容量は 10 mL/kg とし、対照群には同容量の 0.1 w/v%Tween 80 添加 0.5 w/v%CMC-Na 溶液を投与した。投与液量は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については最新体重を基に、交尾成立後の雌については妊娠 0 日の体重を基にそれぞれ算出した。

5. 被験物質と媒体との混合物調製法および分析

被験物質をメノウ製乳鉢で磨碎したのち、0.1 w/v%Tween 80 添加 0.5 w/v%CMC-Na 溶液で所定の濃度になるように懸濁して、1 週間に 1~2 回の頻度で行った。0.1 w/v%Tween 80 添加 0.5 w/v%CMC-Na 溶液で懸濁した場合、被験物質の 0.1 および 100 mg/mL 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 日間安定であることが確認されている(添付資料 3)。また、初回に調製した各濃度の投与液について濃度測定を行い、設定濃度の許容範囲($\pm 10\%$ 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の頻度ならびに方法

6.1. 一般状態

雌雄とも、全例について一般状態の観察および生死の確認を毎日投与前および投与後の 2 回行った。

6.2. 体重測定

雄では、投与期間を通して週 2 回測定した。雌では、交配前の投与期間および交配期間

中は週 2 回、妊娠期間中は妊娠 0, 7, 14 および 21 日、哺育期間中は哺育 0(分娩日)および 4 日に測定した。

6.3. 摂餌量測定

雄では、交配期間を除く投与期間中に週 2 回測定した。雌では、交配前の投与期間中は週 2 回、妊娠期間中は妊娠 1, 7, 14 および 21 日、哺育期間中は哺育 1 および 4 日に測定した。午前中に飼料を入れた給餌器を秤量してケージにセットし、翌日の午前中に給餌器をケージから取り出し、残量を秤量した。この差し引きを 1 日当たりの摂餌量とした。なお、摂餌量の表示日は、残量の測定日とした。

6.4. 剖検および器官重量

雌雄ともエーテル麻酔下で外側腸骨動脈切断により放血致死させた後、解剖して諸器官および組織の肉眼的観察を行った。さらに、雌については、黄体数および着床痕数を調べ、着床率 [(着床数/黄体数)×100] を算出した。剖検後、雄は精巣および精巣上体、雌は卵巣について重量を測定するとともに、雌雄とも最終投与日 [投与期間：(雄)49 日間、(雌)40～49 日間] の翌日の体重をもとに体重比器官重量(相対重量)を算出した。

6.5. 病理組織学検査

精巣、精巣上体および卵巣を 10 %中性緩衝ホルマリン溶液(ただし、精巣および精巣上体はブアン液で前固定)で固定して保存した。対照群、高用量群(死亡例および全児死亡例含む)、雌雄未交尾例および雌雄不妊例の精巣、精巣上体ならびに卵巣についてはパラフィン切片としたのち、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

6.6. 性周期検査および生殖能力検査

雌について、投与開始日(投与 1 日)から 15 日間、毎日午前の一定時間に膣垢を採取し、性周期検査を行った。性周期検査では、発情回数を算出するとともに、発情期から次の発情期までの間の日数を発情周期日数とし、平均発情周期を算出した。

交配は投与 15 日の午後 4 時頃から、雌雄(12 週齢) 1 対 1 で一晩同居させる方法で行い、翌朝膣垢中の精子または膣栓の存在により交尾を確認し、その日を妊娠 0 日とした。また、交配は同一群内で行い、交配期間は最長 2 週間とした。交配期間終了後、交尾所要日数、

交尾率 [(交尾動物数/同居動物数)×100] および受胎率 [(妊娠動物数/交尾動物数)×100] を算出した。

6.7. 分娩および哺育期(哺育 4 日まで)検査ならびに新生児検査

交尾が確認された雌については全例を自然分娩させ、分娩徵候を含めた分娩状態ならびに授乳および営巣などの哺育状態を観察するとともに、妊娠期間および出産率 [(生児出産雌数/妊娠雌数)×100] を算出した。なお、分娩の確認は午前中に限定し、午後 12 時を過ぎて分娩した個体は、翌日に分娩をしたものとみなした。出産児については、分娩時に出産児数、新生児数、死産児数、新生児の性別および外表異常を検査した。新生児については、出生日および哺育 4 日に体重を個体ごとに測定するとともに出生率[(新生児数/着床痕数)×100]、死産率[(死産児数/出産児数)×100]および新生児の 4 日の生存率 [(哺育 4 日の生児数/出生児数)×100] を算出した。哺育 4 日に新生児の全例をエーテル麻酔下で放血致死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った。また、出産児(死産児、死亡児および外表異常児を含む)については、剖検後一腹単位で純エタノールに固定保存した。

7. 統計学的処理

体重、摂餌量、交尾所要日数、性周期検査値(発情周期および発情回数)、器官重量、体重比器官重量、妊娠期間、黄体数、着床痕数、総出産児数、新生児数および新生児体重については、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、対照群と被験物質投与群間で分散の均一性を Bartlett 法により検定した。分散が均一な場合は、Dunnett の多重比較検定を用いて対照群との比較を行い、分散が均一でない場合は、Steel の多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準を 1 および 5 %とし、両側検定とした。また、交尾率、受胎率、出産率および新生児の性比については χ^2 検定により、着床率、死産率、外表異常率、型別外表異常児出現率、出生率および新生児の 4 日の生存率については Wilcoxon の順位和検定により、病理組織学検査については Mann-Whitney の U 検定により対照群と各投与群間の比較を行った。いずれの場合も有意水準を 1 および 5 %とした。なお、新生児に関する測定値については一腹単位で処理した。

試験成績

1. 反復投与毒性

1.1. 一般状態

一般状態所見を Table 1, 2 および Appendix 1, 2 に示した。

50 mg/kg 群の雄で投与 6 および 7 日に各 1 例、雌で投与 1 日に 2 例および分娩当日に 1 例が死亡した。これらの死亡例は、散瞳、自発運動の低下、緩徐呼吸、腹臥位および振戦が投与 10 から 20 分ごろよりみられ、間代性痙攣あるいは呼吸困難を呈し、早いもので投与後 20 分、遅いもので投与後 3 時間 30 分に死亡した。また、分娩当日に死亡した雌 1 例では、これらの症状に加え投与直後から流涎が認められた。

生存例の雄では、50 mg/kg 群で散瞳が投与 1 日から 9 日までにほぼ全例にみられ、これに加え緩徐呼吸、自発運動の低下および腹臥位がほぼ全例で散発的に認められた。これらの症状の発現例数は投与日数の経過とともに減少した。また、振戦が投与期間を通して少数例で散発的にみられ、さらに、流涎が投与 22 日から投与最終日までに全例で散発的に認められた。20 mg/kg 群では、流涎が投与 28 日から投与最終日までに半数例で散発的に認められた。

生存例の雌では、50 mg/kg 群で散瞳、緩徐呼吸、自発運動の低下および腹臥位が投与 1 日から哺育 0 日までにほぼ全例で散発的にみられたが、発現例数は投与日数の経過とともに減少した。また、20 mg/kg 群においても散瞳、緩徐呼吸、自発運動の低下および腹臥位が投与 2 および 3 日に各 1 例で認められた。これらの症状に加え、50 mg/kg 群で振戦が投与 1 日から妊娠 5 日までに半数例で散発的に認められた。さらに、流涎が 50 mg/kg 群で妊娠 4 日から哺育 3 日までにほぼ全例で散発的にみられ、20 mg/kg 群でも妊娠 14 日から哺育 3 日までにほぼ半数例で散発的に認められた。

これらの症状は、雌雄とも投与直後から 4 時間の間に出現し、翌日までには消失した。

1.2. 体重

体重推移を Figure 1, 2, Table 3, 4 および Appendix 3, 4 に示した。

雄では、50 mg/kg 群で投与 4 から 50 日に対照群と比較して有意な低値が認められた。

雌では、50 mg/kg 群で投与期間を通して対照群と比較して低値傾向がみられ、投与 8 日および妊娠期間を通して対照群と比較して有意な低値が認められた。

1.3. 摂餌量

摂餌量を Figure 3, 4, Table 5, 6 および Appendix 5, 6 に示した。

雄では、50 mg/kg 群で投与 2 から 15 日に対照群と比較して有意な低値が認められた。

雌では、50 mg/kg 群で投与期間を通して低値傾向がみられ、投与 2 から 11 日、妊娠 7 日および哺育 4 日に対照群と比較して有意な低値が認められた。また、20 mg/kg 群においても投与 4 および 8 日に対照群と比較して有意な低値が認められた。なお、20 mg/kg 群の雄で投与 39 日および雌で妊娠 21 日、哺育 1 ならびに 4 日に高値がみられたが、体重に変動はみられず、50 mg/kg 群の雌雄に同様の変化は認められていないことから、被験物質投与と関連のない偶発的変化と考えられた。

1.4. 剖検

剖検の結果を Table 7～10 および Appendix 7, 8 に示した。

雌雄の生存例、死亡例、未交尾例および不妊例、雌の未分娩例および全児死亡例の剖検において異常は認められなかった。

1.5. 器官重量

器官重量の結果を Table 11, 12 および Appendix 9, 10 に示した。

雄では、50 mg/kg 群で精巣および精巣上体の相対重量に対照群と比較して有意な高値がみられたが、絶対重量では対照群との間に差は認められなかった。なお、50 mg/kg 群では、最終体重に対照群と比較して有意な低値が認められた。

雌では、被験物質投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった。

1.6. 病理組織学検査

病理組織学検査の結果を Table 13～16 および Appendix 11, 12 に示した。

雄の生存例では、対照群および 50 mg/kg 群の各 1 例で精巣に軽度の精細管の萎縮が認められた。雌の生存例では、対照群および全児死亡した 50 mg/kg 群の各 1 例で卵巣に黄体嚢胞が認められた。その他の雌雄の死亡例、未交尾例および不妊例ならびに雌の未分娩例および全児死亡例に異常は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

2.1. 性周期検査および生殖能力検査

性周期検査および生殖能力検査の成績を Table 17 および Appendix 13, 14 に示した。

性周期検査では、被験物質投与群と対照群との間で発情周期に有意な差は認められなかつた。

生殖能力検査では、8 mg/kg 群の 1 組を除いてすべてに交尾がみられ、20 mg/kg 群の 1 組を除いて妊娠が認められた。したがって、交尾率は対照群、8, 20 および 50 mg/kg 群でそれぞれ 100, 91.67, 100 および 100 %、受胎率は、100, 100, 91.67 および 100 %であり、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかつた。また、交尾所要日数においても、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかつた。なお、8 mg/kg 群の未交尾例および 20 mg/kg 群の不妊例では、雌雄とも生殖器の剖検および病理組織学検査において変化はみられず、受胎能の欠如を示唆する所見は認められなかつた。

2.2. 分娩および哺育期(哺育 4 日まで)検査ならびに新生児検査

分娩および哺育期検査の成績を Table 18 および Appendix 15 に示した。

分娩時の検査では、50 mg/kg 群で出産児数、新生児数、出生率および生後 0 日の雌雄新生児体重に対照群と比較して有意な低値が認められた。また、新生児の外表検査では 50 mg/kg 群で欠指が 3 例、曲尾が 6 例および短尾、欠指、鎖肛の合併が 1 例にみられ、外表異常出現率で対照群と比較して有意な高値が認められた。妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産率、出産率、新生児の性比および型別外表異常出現率では、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかつた。

哺育期の検査では、50 mg/kg 群で新生児の生後 4 日の生存率に対照群と比較して有意な低値が認められた。

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、交配前14日間、雄ではその後交配期間を含む35日間、雌では交配期間、妊娠期間および哺育3日まで通して経口投与し、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

50 mg/kg群の雌雄では、投与初期の投与後に散瞳、間代性痙攣および振戦など被験物質の中枢神経系への影響を示唆する変化が高頻度にみられ、雌雄各2例が投与7日までに死亡した。

また、50 mg/kg群の雌1例が同様の神経症状を呈し、分娩当日に死亡した。また、20 mg/kg群においても雌で散瞳、自発運動の低下、緩徐呼吸および腹臥位が認められた。これらの症状のほとんどは、投与日数の経過とともに出現頻度は減少した。このほか、20および50 mg/kg群の雌雄で流涎が認められた。

体重では、50 mg/kg群の雌雄で投与期間を通して、低値あるいは低値傾向がみられ、摂餌量にも低値あるいは低値傾向が認められた。また、摂餌量の低値は20 mg/kg群においても認められた。

剖検では、雌雄の生存例および死亡例ならびに雌の未交尾例、不妊例、未分娩例および全児死亡例のいずれにおいても異常は認められなかった。病理組織学検査では、生存例の50 mg/kg群の雄1例で精巣に軽度の精細管の萎縮、全児死亡した50 mg/kg群の雌1例で卵巣に黄体囊胞がみられたが、同様の所見は対照群においても認められており、出現例数も少ないとから被験物質投与と関連のない偶発的変化と考えられた。器官重量測定では、50 mg/kg群の雄で精巣および精巣上体の相対重量が対照群と比較して有意な高値を示したが、いずれも絶対重量には対照群との差が認められることから、最終体重の低値に起因した重量変動と考えられた。

以上のように、雌雄とも50 mg/kg群で死亡の発生がみられ、生存例においても20および50 mg/kg群で一般状態、体重および摂餌量に被験物質投与による影響が認められていることから、本試験条件下における*N,N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄とも8 mg/kg/dayと推察された。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、性周期、交尾所要日数、黄体数、交尾率、着床痕数、出産率および受胎率に被験物質投与の影響は認められなかつた。

分娩時の観察では、50 mg/kg 群で出産児数、新生児数および出生率の低値が認められた。これらの変化については、黄体数、着床痕数、着床率および死産率に変化がみられていないことから、死亡胚の増加が原因と考えられ、本被験物質の胚致死作用が示唆された。新生児の外表検査においても、50 mg/kg 群では外表異常児が 10 例(欠指が 3 例、曲尾が 6 例および短尾、欠指、鎖肛の合併が 1 例)にみられ、外表異常出現率は高値を示した。さらに、50 mg/kg 群では生後 0 日の雌雄新生児体重に低値が認められ、被験物質投与による発育抑制が認められた。妊娠期間および新生児の性比には被験物質投与の影響は認められなかつた。哺育期の観察では、50 mg/kg 群で新生児の生後 4 日の生存率に低値がみられたが、母動物の哺育行動に異常はみられないことから、胎生期での被験物質の曝露が新生児の生存性に影響を及ぼした可能性が考えられた。

以上のように、親動物の生殖機能に被験物質投与の影響はみられなかつた。次世代児の発生・発育に及ぼす被験物質投与の影響として、50 mg/kg 群で出生率の低下、外表異常出現率の高値、出生児体重の低値および生後の生存率の低下が認められた。したがつて、本試験条件下における *N,N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの親動物の生殖機能に関する無影響量は 50 mg/kg/day、次世代児の発生・発育に関する無影響量は、親動物および児動物とともに 20 mg/kg/day と推察された。

文 献

- 1) *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14日間反復経口投与毒性予備試験* (株式会社パナファーム・ラボラトリーズ, 試験番号: P020012, 未発表)

Study No.P020014

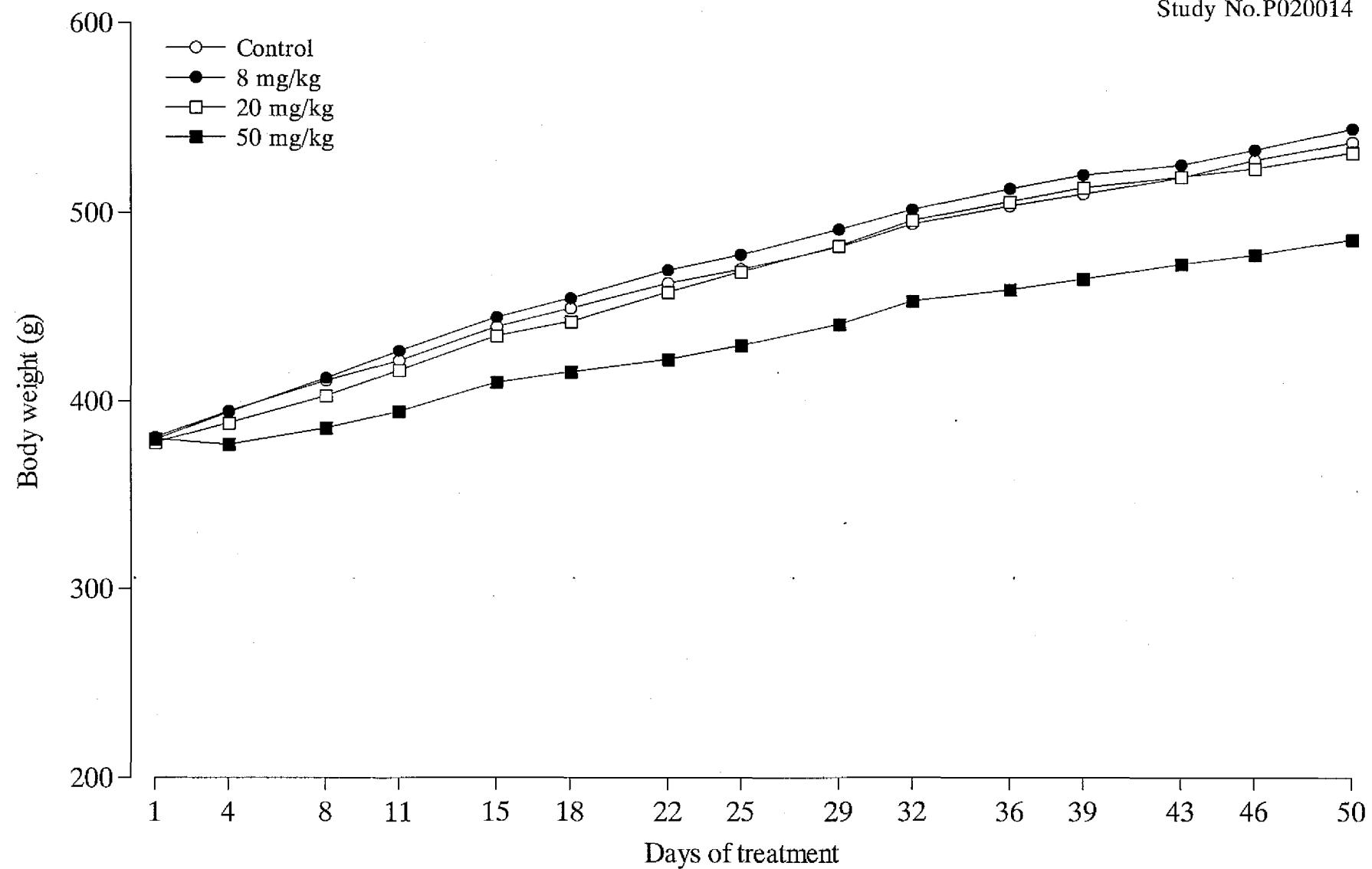


Fig.1 Mean body weight changes of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test.

Study No.P020014

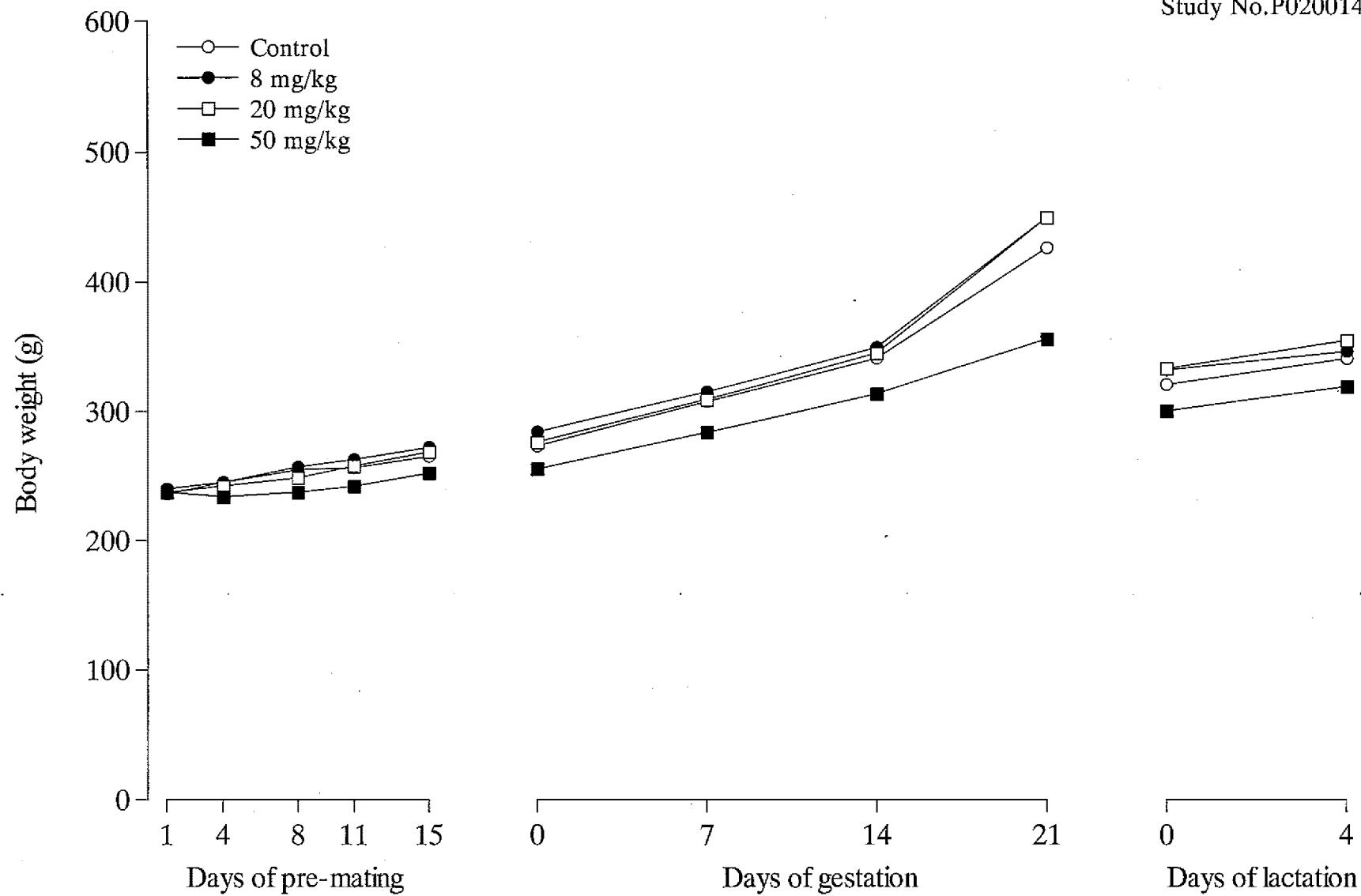


Fig.2 Mean body weight changes of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test.

Study No.P020014

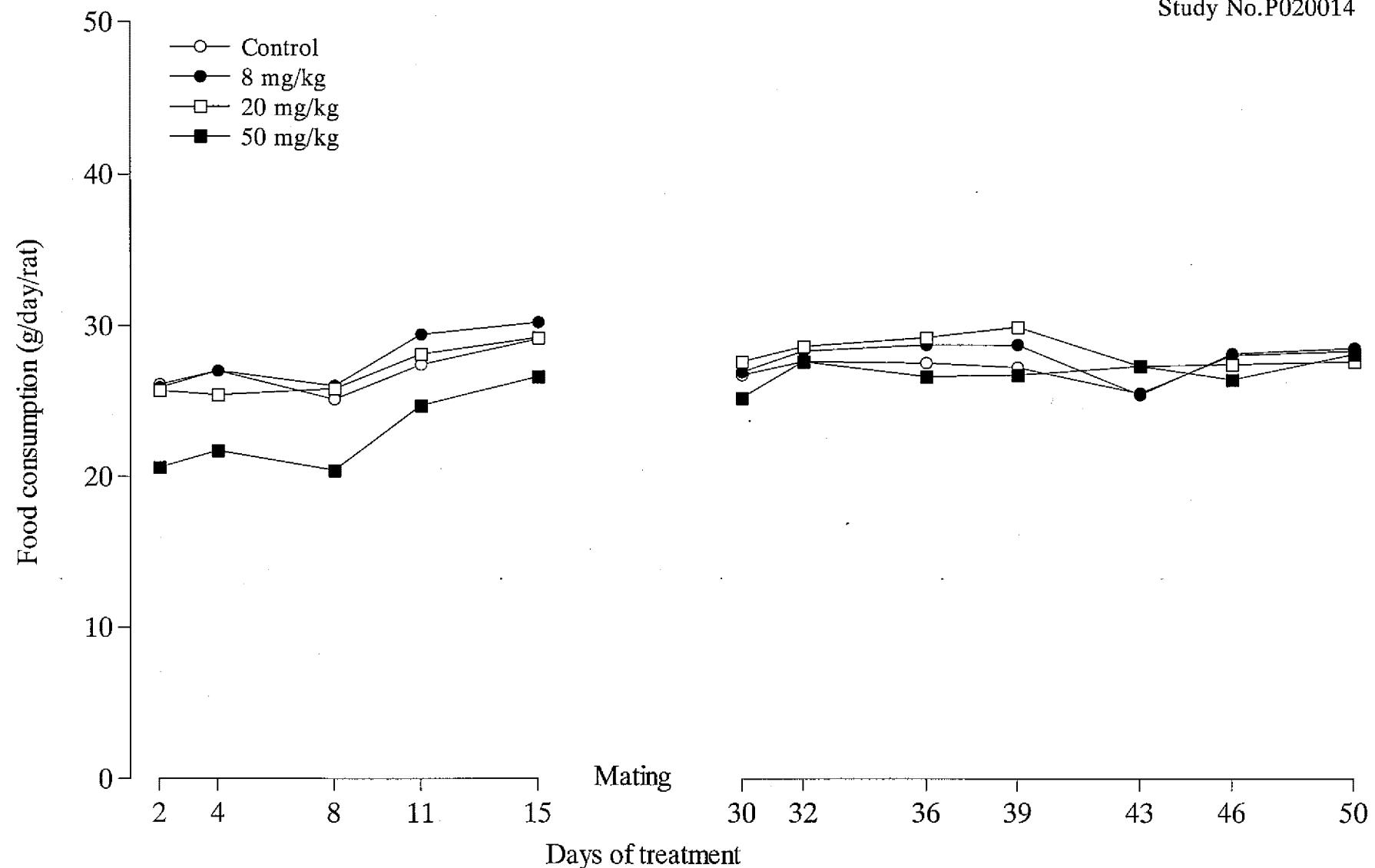


Fig.3 Mean food consumption of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test.

Study No.P020014

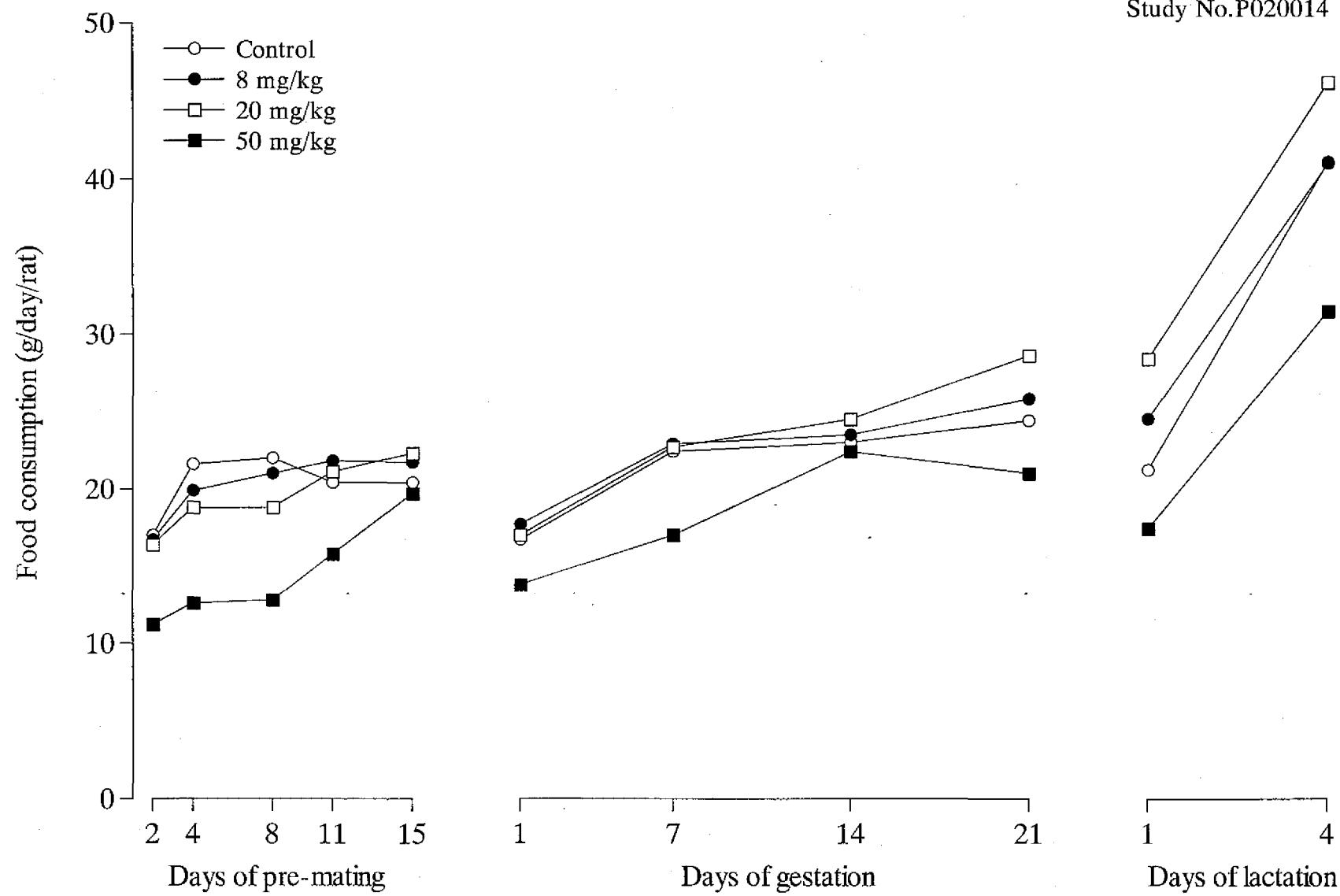


Fig.4 Mean food consumption of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test.

Table 1 Clinical signs of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of treatment													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
8	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	Number of examined	12	12	12	12	12	12	11	10	10	10	10	10	10	10
	No abnormality	8	5	6	8	12	4	6	7	9	9	10	9	10	10
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	4	7	6	4	0	8	5	3	1	1	0	1	0	0
	Prone position	1	3	1	3	0	3	1	3	1	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	2	6	2	3	0	4	1	3	1	0	0	0	0	0
	Bradypnea	2	6	2	3	0	3	1	3	1	0	0	0	0	0
	Tremor	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Table 1 - continued

Clinical signs of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl)
in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of treatment														
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
0	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
8	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
50	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	5	3	4	7	5	6	4	4
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	5	7	6	3	5	4	6	6
	Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1 - continued

Clinical signs of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl)
in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of treatment														
		30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
0	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
8	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	10	9	11	11	11	8	11	10	11
	Salivation	1	1	1	1	1	1	2	3	1	1	1	4	1	2	1
50	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	No abnormality	4	4	5	6	3	1	3	3	2	2	4	2	4	1	3
	Salivation	6	6	5	4	7	9	7	7	8	8	6	8	6	9	7
	Mydriasis	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1 - continued

Clinical signs of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl)
in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of treatment					
		45	46	47	48	49	50
0	Number of examined	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12
8	Number of examined	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12
20	Number of examined	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	8	9	10	10	7	12
	Salivation	4	3	2	2	5	0
50	Number of examined	10	10	10	10	10	10
	No abnormality	1	3	6	1	1	10
	Salivation	9	6	4	9	9	0
	Mydriasis	0	1	1	1	0	0
	Prone position	0	1	1	0	0	0
	Hypoactivity	0	1	1	0	0	0
	Bradypnea	0	1	1	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0

Table 2 Clinical signs of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of treatment												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
8	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	11	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Prone position	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	Number of examined	12	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	No abnormality	5	2	7	9	10	4	3	7	8	10	9	9	10
	Prone position	4	5	3	0	0	3	4	1	1	0	1	1	0
	Hypoactivity	7	6	3	1	0	3	5	1	2	0	1	1	0
	Bradypnea	7	6	3	0	0	3	5	1	2	0	1	1	0
	Mydriasis	7	8	3	1	0	6	7	3	2	0	1	1	0
	Tremor	2	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
	Clonic convulsion	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued

Clinical signs of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of treatment														
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
0	Number of examined	12	12	11	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	12	12	11	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Number of examined	12	12	10	9	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	No abnormality	12	12	10	9	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	Number of examined	12	12	9	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	12	12	9	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	Number of examined	10	10	7	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	10	9	7	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prone position	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued

Clinical signs of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl)
in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of treatment														
		30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
0	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Number of examined	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	No abnormality	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of treatment					
		45	46	47	48	49	50
0	Number of examined	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0
8	Number of examined	1	1	1	1	1	1
	No abnormality	1	1	1	1	1	1
20	Number of examined	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0
	Prone position	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	0	0	0	0	0	0
50	Number of examined	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0
	Prone position	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued

Clinical signs of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of gestation													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
8	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
20	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	No abnormality	10	10	9	10	7	6	7	4	7	7	5	5	8	9
	Salivation	0	0	0	0	3	3	2	6	3	3	5	4	2	1
	Prone position	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
	Hypoactivity	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
	Bradypnea	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
	Mydriasis	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	Tremor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued

Clinical signs of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl)
in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of gestation										
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	0
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	0
8	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	0
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	0
20	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	1
	No abnormality	10	12	11	10	8	11	9	11	11	6	1
	Salivation	2	0	1	2	4	1	3	1	1	0	0
50	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	1
	No abnormality	4	6	7	7	6	7	2	5	9	6	1
	Salivation	6	4	3	3	4	3	8	5	1	0	0
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mydriasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued

Clinical signs of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days of lactation				
		0	1	2	3	4
0	Number of examined	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12
8	Number of examined	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11
20	Number of examined	11	11	11	11	11
	No abnormality	10	10	10	7	11
	Salivation	1	1	1	4	0
50	Number of examined	9	8	8	8	6
	No abnormality	2	4	4	6	6
	Salivation	7	4	4	2	0
	Prone position	1	0	0	0	0
	Hypoactivity	1	0	0	0	0
	Bradypnea	1	0	0	0	0
	Dyspnea	1	0	0	0	0
	Mydriasis	1	0	0	0	0
	Dead	1	0	0	0	0

One animal (20 mg/kg) was non-pregnant.

One animal (50 mg/kg) did not deliver.

All newborns from 2 animals (50 mg/kg) died on day 3 of lactation.

Table 3 Body weights of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	20	50	
Body weight (g)					
Days of treatment	1	380.5 ± 14.8 (12)	379.3 ± 16.1 (12)	377.8 ± 14.7 (12)	379.8 ± 15.6 (12)
	4	394.5 ± 15.5 (12)	393.9 ± 17.4 (12)	388.2 ± 13.7 (12)	376.8 ± 20.6 * (12)
	8	410.8 ± 17.7 (12)	412.0 ± 19.3 (12)	402.6 ± 16.3 (12)	385.5 ± 21.7 ** (10)
	11	421.3 ± 18.2 (12)	426.5 ± 21.3 (12)	416.2 ± 17.2 (12)	394.3 ± 22.1 ** (10)
	15	439.3 ± 19.7 (12)	444.3 ± 21.4 (12)	434.4 ± 16.2 (12)	409.7 ± 23.6 ** (10)
	18	449.0 ± 20.0 (12)	454.4 ± 21.1 (12)	442.0 ± 20.6 (12)	415.2 ± 19.4 ** (10)
	22	462.3 ± 23.2 (12)	469.3 ± 23.2 (12)	457.6 ± 21.3 (12)	422.0 ± 20.8 ** (10)
	25	469.7 ± 25.6 (12)	477.5 ± 25.8 (12)	468.5 ± 23.5 (12)	429.4 ± 22.2 ** (10)
	29	481.5 ± 27.1 (12)	490.8 ± 26.9 (12)	482.2 ± 24.4 (12)	440.6 ± 23.2 ** (10)
	32	493.7 ± 27.0 (12)	501.4 ± 31.3 (12)	495.7 ± 26.7 (12)	453.0 ± 23.1 ** (10)
	36	503.2 ± 29.6 (12)	512.4 ± 29.3 (12)	505.6 ± 28.5 (12)	459.0 ± 27.5 ** (10)
	39	509.6 ± 29.3 (12)	519.6 ± 30.2 (12)	513.0 ± 27.7 (12)	464.7 ± 30.6 ** (10)
	43	518.2 ± 29.8 (12)	524.8 ± 31.9 (12)	518.6 ± 31.2 (12)	472.5 ± 30.9 ** (10)
	46	527.3 ± 31.0 (12)	532.7 ± 31.5 (12)	522.9 ± 30.2 (12)	477.2 ± 33.8 ** (10)
	50	536.7 ± 33.5 (12)	543.9 ± 33.3 (12)	531.5 ± 30.7 (12)	485.4 ± 34.6 ** (10)

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

Two animals(50 mg/kg) died on day 6 and 7 of treatment.

Table 4 Body weights of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0			8			20			50		
Days of treatment	1	236.1 ±	9.8 (12)	240.2 ±	12.7 (12)	237.3 ±	12.3 (12)	237.5 ±	9.9 (12)	237.5 ±	9.9 (12)	
	4	245.1 ±	12.3 (12)	245.0 ±	14.3 (12)	242.3 ±	12.8 (12)	233.8 ±	9.0 (10)			
	8	254.8 ±	13.1 (12)	257.0 ±	14.9 (12)	248.5 ±	13.7 (12)	237.3 ±	9.7 ** (10)			
	11	256.4 ±	14.2 (12)	262.8 ±	18.0 (12)	257.7 ±	13.9 (12)	242.0 ±	11.2 (10)			
	15	265.1 ±	17.5 (12)	272.1 ±	18.9 (12)	268.7 ±	14.2 (12)	252.3 ±	11.2 (10)			
Days of gestation	0	272.9 ±	17.9 (12)	283.9 ±	17.3 (11)	276.0 ±	16.0 (11)	255.2 ±	12.4 * (10)			
	7	307.3 ±	16.7 (12)	314.9 ±	19.1 (11)	309.1 ±	17.9 (11)	283.5 ±	15.3 ** (10)			
	14	340.8 ±	13.3 (12)	349.2 ±	19.7 (11)	344.9 ±	19.8 (11)	313.4 ±	23.3 ** (10)			
	21	426.1 ±	24.3 (12)	449.5 ±	29.6 (11)	449.5 ±	19.9 (11)	355.7 ±	30.1 ** (10)			
Days of lactation	0	320.5 ±	15.3 (12)	331.7 ±	21.9 (11)	332.8 ±	17.7 (11)	300.1 ±	32.0 (9)			
	4	340.4 ±	18.0 (12)	345.8 ±	18.7 (11)	354.5 ±	19.2 (11)	318.9 ±	24.3 (6)			

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

Two animals(50 mg/kg) died on day 1 of treatment.

One animal(8 mg/kg) did not copulated.

One animal(20 mg/kg) was non-pregnant.

One animal(50 mg/kg) did not deliver.

One animal(50 mg/kg) died on day 0 of lactation.

All newborns from 2 animals(50 mg/kg) died on day 3 of lactation.

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	20	50	
Food consumption (g/day/rat)					
Days of treatment	2	26.1 ± 1.9 (12)	25.9 ± 1.8 (12)	25.7 ± 2.7 (12)	20.6 ± 5.0 ** (12)
	4	27.0 ± 2.9 (12)	27.0 ± 1.7 (12)	25.4 ± 2.6 (12)	21.7 ± 3.9 ** (12)
	8	25.1 ± 3.0 (12)	26.0 ± 2.7 (12)	25.8 ± 2.3 (12)	20.4 ± 2.7 ** (10)
	11	27.4 ± 2.4 (12)	29.4 ± 1.9 (12)	28.1 ± 2.2 (12)	24.7 ± 2.5 * (10)
	15	29.1 ± 2.2 (12)	30.2 ± 1.6 (12)	29.2 ± 2.6 (12)	26.6 ± 3.1 * (10)
	30	26.7 ± 1.6 (12)	26.9 ± 2.6 (12)	27.6 ± 2.5 (12)	25.2 ± 2.1 (10)
	32	27.6 ± 1.8 (12)	28.3 ± 2.7 (12)	28.6 ± 2.4 (12)	27.6 ± 1.2 (10)
	36	27.5 ± 1.8 (12)	28.7 ± 1.9 (12)	29.2 ± 2.3 (12)	26.6 ± 1.9 (10)
	39	27.2 ± 2.0 (12)	28.7 ± 2.4 (12)	29.9 ± 2.6 * (12)	26.7 ± 2.7 (10)
	43	25.5 ± 2.6 (12)	25.4 ± 3.0 (12)	27.3 ± 3.5 (12)	27.3 ± 3.2 (10)
	46	28.0 ± 2.6 (12)	28.1 ± 2.7 (12)	27.4 ± 2.7 (12)	26.4 ± 3.0 (10)
	50	28.3 ± 3.6 (12)	28.5 ± 3.1 (12)	27.6 ± 2.2 (12)	28.1 ± 3.4 (10)

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

Two animals (50 mg/kg) died on day 6 and 7 of treatment.

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	20	50	
Food consumption (g/day/rat)					
Days of treatment	2	17.0 ± 2.0 (12)	16.7 ± 3.8 (12)	16.4 ± 1.9 (12)	11.2 ± 2.4 ** (10)
	4	21.6 ± 2.7 (12)	19.9 ± 2.4 (12)	18.8 ± 2.0 * (12)	12.6 ± 2.9 ** (10)
	8	22.0 ± 2.7 (12)	21.0 ± 2.1 (12)	18.8 ± 2.2 ** (12)	12.8 ± 2.8 ** (10)
	11	20.4 ± 3.5 (12)	21.8 ± 2.9 (12)	21.1 ± 2.2 (12)	15.8 ± 2.8 ** (10)
	15	20.4 ± 4.4 (12)	21.7 ± 3.4 (12)	22.3 ± 1.8 (12)	19.7 ± 1.7 (10)
Days of gestation	1	16.7 ± 5.1 (12)	17.7 ± 2.6 (11)	17.0 ± 3.5 (11)	13.8 ± 2.1 (10)
	7	22.4 ± 3.0 (12)	22.9 ± 2.4 (11)	22.7 ± 3.2 (11)	17.0 ± 3.2 ** (10)
	14	23.0 ± 2.0 (12)	23.5 ± 2.6 (11)	24.5 ± 2.2 (11)	22.4 ± 4.5 (10)
	21	24.4 ± 3.7 (12)	25.8 ± 2.9 (11)	28.6 ± 3.2 * (11)	21.0 ± 4.9 (10)
Days of lactation	1	21.2 ± 5.2 (12)	24.5 ± 5.8 (11)	28.4 ± 3.7 ** (11)	17.4 ± 4.6 (8)
	4	41.1 ± 5.0 (12)	41.0 ± 3.4 (11)	46.2 ± 4.3 * (11)	31.5 ± 5.6 ** (6)

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

Two animals (50 mg/kg) died on day 1 of treatment.

One animal (8 mg/kg) did not copulated.

One animal (20 mg/kg) was non-pregnant.

One animal (50 mg/kg) did not deliver.

One animal (50 mg/kg) died on day 0 of lactation.

All newborns from 2 animals (50 mg/kg) died on day 3 of lactation.

Table 7 Necropsy findings of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Number of animals	Dose (mg/kg)	0	8	20	50
			Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Terminal sacrifice
All organs and tissues			12	12	12	10
		NR	NR	NR	NR	NR

NR: no remarkable changes.

Table 8 Necropsy findings of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test - Dead

Organs and findings	Dose (mg/kg)	50	
	Animal No.	938	941
All organs and tissues		NR	NR

NR: no remarkable changes.

Table 9 Necropsy findings of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ and findings	Number of animals	Dose (mg/kg)	0	8	20	50
			Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Terminal sacrifice
All organs and tissues			12	11	11	6
		NR	NR	NR	NR	NR

NR: no remarkable changes.

Table 10 Necropsy findings of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test - Unscheduled sacrifice

Organs and findings\Animal No.	Dose (mg/kg)	8	20	50					
		966	986	987	988	991	996	997	998
All organs and tissues		NR							

NR: no remarkable changes.

No. 966: uncopulating female.

No. 986: non-pregnant female.

No. 987, 988 and 996: dead females.

No. 991: dam that did not deliver.

No. 997 and 998: dams that all newborns died.

Table 11 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	20	50
No. of animals	12	12	12	10
Absolute organ weights				
Final body weight (g)	536.7 ± 33.5	543.9 ± 33.3	531.5 ± 30.7	485.4 ± 34.6 **
Epididymides (g)	1.16 ± 0.10	1.21 ± 0.06	1.21 ± 0.12	1.23 ± 0.07
Testes (g)	3.24 ± 0.34	3.34 ± 0.19	3.31 ± 0.28	3.30 ± 0.24
Relative organ weights				
Epididymides (g/100gB.W.)	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.25 ± 0.02 **
Testes (g/100gB.W.)	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.07	0.63 ± 0.07	0.68 ± 0.07 *

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean ± S.D.

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	20	50
No. of animals	12	11	11	6
Absolute organ weights				
Final body weight (g)	340.4 ± 18.0	345.8 ± 18.7	354.5 ± 19.2	318.9 ± 24.3
Ovaries (mg)	101.3 ± 7.5	105.9 ± 6.3	100.7 ± 10.6	102.4 ± 10.2
Relative organ weights				
Ovaries (mg/100gB.W.)	29.8 ± 2.0	30.6 ± 1.5	28.4 ± 2.8	32.1 ± 2.4

Not significantly different from control.

Values are mean ± S.D.

Table 13 Histopathological findings of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Number of animals	Dose (mg/kg)				0				8				20				50			
		Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice			
		-	+	++	+++ Total	-	+	++	+++ Total	-	+	++	+++ Total	-	+	++	+++ Total	-	+	++	+++ Total
Genital system																					
Testis					(12)																
Atrophy, seminiferous tubule	11	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	9	1	0	(10)				
Epididymis					NR(12)																

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

8 mg/kg: uncopulating male.

20 mg/kg: non-pregnant male.

Table 14 Histopathological findings of male rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test - Dead

Organs and findings	Dose (mg/kg)	50	
	Animal No.	938	941
Genital system			
Testis		NR	NR
Epididymis		NR	NR

NR: no remarkable changes.

Table 15 Histopathological findings of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Number of animals	Dose (mg/kg)					0					8					20					50				
		Terminal sacrifice					Terminal sacrifice					Terminal sacrifice					Terminal sacrifice					Terminal sacrifice				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Genital system																										
Ovary						(12)					(0)					(0)					(0)					(6)
Cyst, luteal	11	1	0	0	1																	6	0	0	0	0

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 16 Histopathological findings of female rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test - Unscheduled sacrifice

Organs and findings	Dose (mg/kg)	8		20		50					
		Animal No.		966		987	988	991	996	997	998
Genital system											
Ovary				-	-	-	-	-	-	+	-
Cyst, luteal											

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

No. 966: uncopulating female.

No. 986: non-pregnant female.

No. 987, 988 and 996: dead females.

No. 991: dam that did not deliver.

No. 997 and 998: dams that all newborns died.

Table 17 Reproductive performance of rats treated orally with guanidine, *N,N'*-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	20	50
No. of females examined	12	12	12	10
Count of estrus ^{a)}	4.17 ± 0.39	3.92 ± 0.51	3.67 ± 0.65	3.90 ± 0.57
Estrous cycle ^{b)}	4.01 ± 0.18	4.06 ± 0.31	4.08 ± 0.29	4.13 ± 0.22
No. of mated				
Male	12	12	12	10
Female	12	12	12	10
No. of copulated ^{c)}				
Male	12(100)	11(91.67)	12(100)	10(100)
Female	12(100)	11(91.67)	12(100)	10(100)
No. of impregnated ^{d)}	12(100)	11(100)	11(91.67)	10(100)
No. of pregnant ^{c)}	12(100)	11(100)	11(91.67)	10(100)
Duration of mating ^{b)}	3.00 ± 0.95	2.73 ± 1.01	2.42 ± 1.08	2.20 ± 1.03

Not significantly different from control.

a) Values are mean ± S. D.

b) Values are mean ± S. D. (day)

c) Values in parentheses represent percentages to the number of mated.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of copulated.

Table 18 Terminal delivery of F₀ dams treated orally with guanidine, N,N'-bis(2-methylphenyl) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	20	50
Number of dams	12	11	11	10
Number of corpora lutea ^{a)}	15.58 ± 2.57	17.09 ± 2.26	16.36 ± 1.86	15.40 ± 2.01
Number of implantations ^{a)}	14.33 ± 2.57	16.18 ± 1.89	15.91 ± 1.38	14.20 ± 3.55
Implantation index ^{b)}	91.98	94.68	97.22	92.21
Gestation index ^{c)}	100	100	91.67	90.00
Number of dams with live newborns	12	11	11	9
Gestational days ^{a)}	22.58 ± 0.51	22.27 ± 0.47	22.45 ± 0.52	22.56 ± 0.53
Number of newborns ^{a)}	13.00 ± 2.41	15.18 ± 2.04	14.73 ± 1.42	7.22 ± 4.09**
Number of stillborns ^{d)}				
Male	0	1	0	0
Female	0	0	0	0
Total	0	1 (0.60)	0	0
Number of live newborns ^{e)}	13.00 ± 2.41	15.09 ± 1.92	14.73 ± 1.42	7.22 ± 4.09**
Viability index ^{e)}	90.70	93.26	92.57	51.59**
Sex ratio of live newborns ^{f)}	0.84 (71 / 85)	1.02 (84 / 82)	0.98 (80 / 82)	0.91 (31 / 34)
Body weight of live newborns (g) ^{a)}				
Male on day 0	7.4 ± 0.7	6.9 ± 0.6	7.3 ± 0.6	6.2 ± 1.0**
on day 4	11.9 ± 1.3	11.1 ± 1.0	11.7 ± 1.0	11.0 ± 2.3
Female on day 0	7.0 ± 0.7	6.6 ± 0.6	6.8 ± 0.7	5.7 ± 0.8**
on day 4	11.4 ± 1.3	10.5 ± 1.0	11.0 ± 0.9	10.5 ± 2.0
Viability index ^{g)}	99.36	99.40	100	77.36**
Number of external anomalies ^{h)}	0	0	0	10 (15.38) *
Oligodactyly	0	0	0	3 (4.62)
Short tail, Oligodactyly and Anal atresia	0	0	0	1 (1.54)
Kinky tail	0	0	0	6 (9.23)

*: <0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

a) Values are mean ± S.D.

b) Implantation index=(Number of implantations/Number of corpora lutea) × 100.

c) Gestation index=(Number of dams with live newborns/Number of pregnant females) × 100.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of litter.

e) Birth index=(Number of live newborns/Number of implantations) × 100.

f) Values in parentheses represent the number of male/female live newborns.

g) Viability index=(Number of live newborns on day 4 after birth/Number of live newborns) × 100.

h) Values in parentheses represent percentages to the number of newborns.