

平成 1 6 年度

化学物質に係る試験調査等の
実施について

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催奇形性試験

機 関 名

株式会社 化合物安全性研究所

研究責任者名

目 次

	頁
表紙	1
目次	2
要約	7
緒言	8
材料および方法	8
成績	18
考察	22
参考文献	24
Figures	26
1 Body weights of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	27
2 Food consumption of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	28
Tables	29
1 Experimental design, and summary of survival and pregnancy status in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	30
2 General appearance in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	31
3 Body weights and gravid uterine weights of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	32
4 Body weight gains of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	33
5 Food consumption of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	34

6 Autopsy findings in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	35
7 Observations at term of pregnancy of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)	36
8 Incidences of fetal external anomalies in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)	37
9 Incidences of fetal visceral anomalies in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)	38
10 Incidences of fetal skeletal anomalies and variations in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)	39
11 Fetal skeletal development in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)	40

要 約

N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジン(0 (対照群)、10、20 および 40 mg/kg/day の用量で、1 群当たり 24 匹の交尾を認めた Crj:CD (SD) IGS 雌ラットに妊娠 6 日から 19 日まで胃ゾンデを用いて経口投与して、ラットに対する胚・胎児発生毒性の有無を検討した。

母動物の一般状態では、被験物質投与に関連した変化として、投与後 10 分から 50 分の間に散瞳が、20 mg/kg 群では半数例に、40 mg/kg 群では全例に発現した。40 mg/kg 群では、これに続いて約半数例に、自発運動の低下が観察された。さらに、腹臥位、呼吸緩徐または振戦の症状が現れた 4 例が投与後 30 分以内に死亡した。生存した動物では、これらの症状はおよそ 10 分から 2 時間後に回復した。剖検では、被験物質投与に関連すると思われる変化はいずれの投与群においても観察されなかった。

母動物の体重および体重増加量では、投与期間を通じて 20 および 40 mg/kg 群で用量に依存して有意な低値が認められた。摂餌量については、40 mg/kg 群において、投与期間を通じて有意な低値がみられた。

妊娠 20 日の剖検時における卵巣と子宮内容の検査では、40 mg/kg 群においてのみ影響が認められた：即ち、妊娠子宮重量の有意な低値、死亡胚・胎児数および胚・胎児死亡率の有意な増加、生存胎児数および胎児生存率の有意な低下、雌雄の胎児体重および胎盤重量の有意な低値がみられた。

生存胎児の外表検査では、短指および短尾の胎児出現率および腹の頻度が 20 および 40 mg/kg 群において用量に依存して増加した。骨格異常では、尾椎の欠損、癒合または位置異常ならびに指節骨の欠損または癒合の胎児出現率および腹の頻度が、20 および 40 mg/kg 群において用量に依存して増加した。40 mg/kg 群では、さらに中手骨または中足骨と指節骨の癒合、中手骨の欠損または癒合または脛骨および腓骨の短縮が 1～4 例に観察された。一方、内部器官・組織異常を持つ胎児の被験物質投与に関連した増加は、いずれの投与群においても認められなかった。

胎児の化骨進行度に関しては、40 mg/kg 群において、仙尾椎椎体、胸骨分節、中手骨および中足骨の化骨数に有意な低値がみられた。

以上の結果から、本試験条件下における N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンのラットの母動物および胎児に対する無毒性量は、10 mg/kg/day であり、一方、20 および 40 mg/kg/day の用量は母動物に対して明確な毒性を現し、胎児に対しては四肢および尾の異常を誘発する用量であると考えられる。さらに、40 mg/kg/day の用量は母動物の死亡および胚・胎児の死亡率を増加させる用量であると考えられる。

緒 言

この試験の目的は、N, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンをラット胚の着床から妊娠末期まで母動物に経口投与して、母体への影響ならびに胚・胎児の器官形成および発育に及ぼす影響の有無を検討することであった。

材料および方法

1. 被験物質

試験用として被験物質 50 g (純度 99.5%) を 2005 年 3 月 16 日から入手し、2005 年 4 月 1 日から 2005 年 4 月 22 日まで使用した。被験物質は遮光気密容器に入れて室温（実測範囲 21～25℃）で株式会社化合物安全性研究所の検体保存室に保存した。

被験物質の性質は下記の通りである。

物質名（コード名）	: N, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジン
化学名	: Guanidine, N, N'-bis(2-methylphenyl)-
分子式	: $C_{16}H_{17}N_3$
CAS No.	: 97-39-2
物理化学的性質	: 外観；白色粉末
	溶解性；水、70 mg/L(20℃)

被験物質サンプルとして、上記ロットについて約 1 g を採取し、株式会社化合物安全性研究所の資料保存室に保存した。試験終了後、残余被験物質は被験物質提供者に返却した。

投与期間中の被験物質の安定性については、投与開始前および投与終了後に被験物質提供者が純度の分析を行い確認した（Appendix 1-1 および 1-2）。

2. 媒体

被験物質の媒体として、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水溶液（0.1%Tween 80 添加 0.5%CMC-Na 水溶液）を使用した。CMC-Na（日本薬局方カルメロースナトリウム、丸石製薬株式会社、ロット番号 4219）を精秤し、所定の量よりやや少ない量の日本薬局方精製水（ヤクハン製薬株式会社、ロット番号 51N1）に溶解した。次に、全調製量の 0.1%に当たる Tween 80（和光純薬工業株式会社、ロット番号 KLR6584）を精秤して添加

し、日本薬局方精製水でメスアップした。調製した溶媒は、遮光気密容器に入れ、株式会社化合物安全性研究所の検体保存室に冷蔵条件（実測範囲 2.1～7.9℃）で保存し、調製後 7 日以内に使用した。

3. 投与液の調製および保存

10、20 および 40 mg/mL の濃度毎に、必要量の被験物質を精秤し、所定の濃度となるように媒体（0.1%Tween 80 添加 0.5%CMC-Na 水溶液）を加えて懸濁した。

投与液の調製は、安定性の保証されている期間（調製後 8 日間）を考慮して、19 日間の投与期間中 7 日間隔で 3 回（2005 年 4 月 1 日、2005 年 4 月 8 日および 2005 年 4 月 15 日）実施した。

調製液は、遮光気密容器に入れて冷蔵条件下（実測範囲 2.1～7.9℃）で、使用時まで株式会社化合物安全性研究所の検体保存室に保存した。調製液は調製後 7 日以内に使用し、残余調製液は焼却処分とした。

4. 投与液の化学分析

調製液の均一性および安定性については株式会社パナファーム・ラボラトリーズにおいて 0.1 および 100 mg/mL の濃度で分析され、被験物質は 0.1%Tween 80 添加 0.5%CMC-Na 水溶液中に均一に分布し、室温・遮光下で 8 日間、冷蔵・遮光下で 8 日間安定であることが確認されている。

初回および最終回調製時のすべての濃度の投与液について、被験物質の濃度を以下の方法で分析した。

(1) 使用機器

高速液体クロマトグラフ (HPLC)

UV 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 α	株式会社 イーアールシー
Millennium ³² Chromatography Manager	M32SW	日本ウォーターズ株式会社
電子式上皿天秤	ER-182A	株式会社 エー・アンド・デイ
小型冷却遠心機	CR5B	株式会社 日立製作所
卓上型超音波洗浄器	B42JH	日本エマソン株式会社
pH メーター	F-22	株式会社 堀場製作所

(2) 試薬

N, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジン

	被験物質(Lot No. 34K21)	住友化学工業株式会社 提供品
蒸留水	分取クロマトグラフ用	和光純薬工業株式会社
アセトニトリル	高速液体クロマトグラフ用	和光純薬工業株式会社
メタノール	高速液体クロマトグラフィー用	関東化学株式会社
りん酸	特級	和光純薬工業株式会社
1-オクタンスルホン酸ナトリウム	イオンペアクロマトグラフ用	和光純薬工業株式会社

(3) 調製 (以下の割合で調製)

1) 移動相

1-オクタンスルホン酸ナトリウム(M.W. 216.28)約 2.16 g を秤量し、蒸留水を加えて 1000 mL とし、りん酸で pH 3.0 に調整した(0.01 mol/L オクタンスルホン酸ナトリウム水溶液)。この液 650 mL にアセトニトリル 350 mL を加え、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、3 日以内に使用した(調製日を 0 日として起算)。

2) 希釈溶液

蒸留水 100 mL にアセトニトリル 100 mL を加え、十分に混合したものを希釈溶液とした(用時調製)。

3) 検量線溶液

- ① N, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの 20 mg を正確に量り、アセトニトリルを約 160 mL 加えて超音波処理を約 1 分間行った後、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とした(100 μ g/mL 添加用標準溶液)。
- ② 添加用標準溶液 5、10、15 mL を採取し、それぞれに媒体 0.5 mL を添加後、アセトニトリルを加えて 50 mL とした(10、20、30 μ g/mL)。
- ③ よく混合した後、遠心分離(3500 回転/分、10 分間、4℃)した。
- ④ 得られた上清の 5 mL に蒸留水 5 mL を加え、希釈溶液で 10 mL にメスアップした(5、10、15 μ g/mL 検量線溶液)。検量線溶液の調製および HPLC への注入は各 1 回とした。

(4) 試料溶液の調製(以下の割合で調製)

各被験物質調製液の採取点数は、被験物質調製液の上、中、下層付近から各 1 点の計 3 点とした。

- 1) 被験物質濃度が 20 μ g/mL となる量の被験物質調製液を採取し、さらに媒体の総添加量が 1 mL となるように媒体を加えた後、アセトニトリルを加えて 100 mL とした。なお、被験物質

調製液の採取量が 1 mL の場合は媒体を添加しなかった。

- 2) よく混合した後、遠心分離(3500 回転/分、10 分間、4℃)した。
- 3) 得られた上清の 5 mL に蒸留水 5 mL を加え、希釈溶液で 10 mL にメスアップした(試料溶液)。
試料溶液の調製および HPLC への注入は各 1 回とした。

(5) HPLC 条件

カラム	: CAPCELL PAK C18 UG120、3 μ m、4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm (株式会社 資生堂)
移動相	: アセトニトリル/[0.01 mol/L オクタンスルホン酸ナトリウム水溶液 (pH3.0)] (35:65)
測定波長	: 254 nm
カラム温度	: 40℃
流量	: 1 mL/min
注入量	: 10 μ L
オートサンプリング温度	: 7℃
分析時間	: 10 分
オートサンプリング洗浄液	: メタノール(原液)

(6) 計算

Millennium³² から得られる検量線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の被験物質濃度、変動係数および含有率を算出した。

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

$$\text{変動係数 (\%)} = (\text{被験物質濃度標準偏差} / \text{被験物質濃度平均値}) \times 100$$

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

(7) 数値の表示

- 1) 調製液の被験物質濃度は四捨五入して有効数字 3 桁に丸めた。
- 2) 含有率および変動係数は四捨五入して小数点以下第 1 位に丸めた。

(8) 判定基準

含有率が 90～110%、変動係数が 5% 以下の場合を適とした。

分析の結果、各濃度の投与液中に、被験物質が目標濃度の 90.3%～99.5% の範囲で検出された。これらの変動係数は 0.5%～1.6% の範囲であった (Appendix 2-1 および 2-2)。

5. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社生産の SPF Crj:CD (SD) IGS ラットの雌雄を用いた。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、繁殖成績が安定していることと当研究所における背景対照データが利用できることから、この系統を選定した。

2005 年 3 月 23 日に、雄 62 匹および雌 114 匹をそれぞれ 11 および 10 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 354～401 g、雌で 202～246 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交配開始前 5 日間の検疫および馴化を行ない、この間一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を動物受入日ならびに検疫および馴化期間最終日に測定した。

(3) 動物飼育

1) 飼育環境

検疫および馴化期間ならびに試験期間中、動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10～15 回/時間、照明時間 12 時間（8:00 点灯、20:00 消灯の人工照明）のバリアシステムの動物飼育室（304 号室）で飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視し、実測範囲はそれぞれ $21 \sim 25^{\circ}\text{C}$ および $41\% \sim 61\%$ であった。

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雌雄別に 2 匹ずつ、検疫および馴化期間終了後の雄および群分け後の雌は 1 匹、交配中は 2 匹（雄 1 匹、雌 1 匹）収容した。ケージおよび給餌器は 2 週に 1 回交換した。受皿は週 2 回交換した。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消毒は、1 日 1 回実施した。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

γ 線照射固型飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社）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（04I104 および 050112）の飼料について分析した。汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センター、また微生物検査はオリエンタル酵母工業株式会社がそれぞれ行なった。分析の結果、いずれの項目にも株式会社化合物安全性研究所の標準操作手順書に規定された許容基準値を超える値は認められなかった（Appendix 3-1、3-2、4-1 および 4-2）。

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。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2005年1月6日、2005年4月1日および2005年7月1日に採水して確認した。分析は日本衛生株式会社において行なった。分析の結果、いずれの項目にも、株式会社化合物安全性研究所の標準操作手順書に規定された許容基準値を超える値は認められなかった (Appendix 5-1、5-2 および 5-3)。

(4) 妊娠動物の獲得および群分け

馴化期間終了後、馴化期間中の一般状態および体重増加に異常の認められない動物を選抜して雄は11週齢、雌は10週齢で交配を開始した。

交配を以下の通り行なった。雌の膣垢を採取して顕微鏡下で発情周期を観察し、発情前期の状態にある雌を雄と1対1で一晩同居させた。翌朝、膣栓の有無および膣垢中の精子の有無を調べ、いずれかが認められた場合に交尾が成立したと判断し、その日を妊娠0日とした。交配は6日間にわたって実施した。交尾成立日に、雌を、各群における平均体重と標準偏差ができるだけ同じになるように、対照、低用量、中間用量および高用量群の4群に振り分けた。各群の交尾成立動物数は24匹とした。交配期間中、雌雄の一般状態を1日1回観察した。雄動物および試験に使用しない雌動物は、群分け終了日にエーテル麻酔下での放血により安楽死させた。

(5) 動物およびケージの識別

群分け前は、動物のケージ内個体識別を油性フェルトペンで尾部に印を付けて行ない、各飼育ケージには試験番号および動物番号を明記し、雌雄別に色分けしたラベルを標示した。

群分け後の雌動物の識別は、右耳介に群識別番号を、左耳介に群内個体識別番号を入れ墨して行ない、雌の飼育ケージには試験番号、試験群および動物番号を明記したラベルを標示した。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号は以下の通りであった。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	交尾成立動物数 (動物番号) 雌
対照	0	0	24 (151～174)
低用量	10	2	24 (251～274)
中間用量	20	4	24 (351～374)
高用量	40	8	24 (451～474)

対照群の動物には被験物質投与群と同様の方法で、0.1%Tween 80 添加 0.5%CMC-Na 水溶液のみを投与した。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

先に実施された 28 日間反復経口投与毒性試験²⁾ならびに簡易生殖毒性試験³⁾の結果に基づいて設定した。28 日間反復経口投与毒性試験では、N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンを 0、7.5、15、30 および 60 mg/kg/day の用量で 1 群雌雄各 6 匹の Crj:CD (SD) IGS ラットに 28 日間反復経口投与した。その結果、30 mg/kg 以上の投与群の雌雄に散瞳および流涎がみられ、60 mg/kg 群では雄 1 例および雌 7 例が死亡した。体重および摂餌量の低値が 60 mg/kg 群の雌雄にみられた。器官重量では、30 mg/kg 以上の群の雌に肝臓の相対重量の高値がみられた。簡易生殖毒性試験では、N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンを 0、8、20 および 50 mg/kg/day の用量で 1 群雌雄各 12 匹の Crj:CD(SD) IGS ラットに交配前 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 日まで反復経口投与した。その結果、20 mg/kg 以上の投与群で流涎がみられた。さらに、50 mg/kg 投与群では、散瞳、呼吸緩徐および腹臥位がみられ、雄 2 例および雌 3 例が死亡した。50 mg/kg 群では、体重および摂餌量の低値が雌雄にみられた。20 mg/kg 群の雌においても摂餌量の低値がみられた。児動物では、50 mg/kg 群で出産児数、新生児数、出生率および出生時体重の有意な低値と外表異常出現率の有意な高値がみられた。これらのことから、本試験では、母動物の体重または摂餌量に影響を及ぼすと予測される 40 mg/kg/day を高用量とし、以下公比 2 で除して、20 および 10 mg/kg/day を設定した。

2) 投与

各投与液を、ラットの胚・胎児の器官形成から妊娠末期までの発育を含む期間である妊娠 6 日から 19 日まで 1 日 1 回、ほぼ同じ時刻 (13 : 12～13 : 55) に胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した。投与容量を 5 mL/kg とし、各個体の投与液量は投与日の体重に基づいて

算出した。経口経路は、ヒトで被験物質が暴露されると考えられる経路であるため選択した。胃ゾンデを用いる経口投与は、毒性試験において必要な容量を正確かつ確実に投与できる経口投与の一般的な方法であることから選択した。

(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、投与期間中は1日2回（投与前および投与後）、投与開始前の期間および剖検日は1日1回の頻度で、動物の生死および一般状態を観察した。異常が認められた場合は、その症状ならびに症状が観察された期間を記録した。試験途中で死亡した動物は発見後速やかに剖検し、妊娠20日に剖検する動物と同じ器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

2) 体重測定

全例について、妊娠0日（交尾成立日）、妊娠3日、および妊娠6日から20日（剖検日）までの間は毎日、電子式上皿天秤（GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて体重を測定した。さらに、妊娠20日の体重から妊娠子宮重量を減じて補正体重を算出した。

3) 体重増加量

全例について、妊娠3日から20日までの各測定日の体重値から妊娠0日の体重値を減じて体重増加量を求めた。

加えて次の式より妊娠6～20日の体重増加量を算出した。

妊娠6～20日の体重増加量＝妊娠20日体重－妊娠6日体重

4) 摂餌量測定

妊娠0、3、6、9、12、15、18および20日の各測定日に、電子式上皿天秤（GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて各ケージの給与量と残量を測定した。飼料消費量を給与日数で除し、妊娠0-3、3-6、6-9、9-12、12-15、15-18および18-20日の各測定日間について各個体の1日当たりの摂餌量（g/day）を算出した。

5) 妊娠末期母動物の剖検

全例について、妊娠20日に、体外表を観察し、エーテル麻酔下で放血により安楽死させた後、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。以下の器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

脳（大脳および小脳）、下垂体、胸腺、甲状腺（左右）、上皮小体（左右）、副腎（左右）、脾臓、心臓、肝臓、肺（気管支含む）、腎臓（左右）、卵巢（左右）、子宮（左右角部および頸部）、膈、乳腺（右腹部）および肉眼的異常部位（正常組織との境界部含む）。

6) 妊娠末期における子宮内観察

妊娠 20 日における生存例全例について母動物剖検時に卵巣および子宮を摘出し、妊娠子宮重量を電子式上皿天秤（ER-180A、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて測定した。次に卵巣および子宮内容について、妊娠黄体数、着床数、ならびに生存胎児および死亡胚・胎児の数を検査した。死亡胚・胎児については、発生上の死亡の時期の早い順に着床痕、胎盤遺残、浸軟胎児および死亡胎児に分類して記録した。生存胎児およびそれらの胎盤を取り出し、重量を電子式上皿天秤（ER-180A、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて個々に測定した。

胎盤は重量測定後、腹毎に母動物の器官・組織とともに保存した。

以下の指標を算出した。

着床率(%) = (着床数 / 妊娠黄体数) × 100

胎児生存率(%) = (生存胎児数 / 着床数) × 100

胚・胎児死亡率(%) = (死亡胚および死亡胎児数 / 着床数) × 100

性比 = 雄生存胎児数 / 生存胎児数

7) 生存胎児の個体識別

腹毎に、全ての生存胎児の腹部に子宮内の位置が書かれたラベルを装着して個体識別を行った。

8) 胎児検査

① 外表検査

生存胎児全例について、妊娠末期観察時に胎児の外表異常の有無を検査した。検査終了後の胎児は、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射によって安楽死させた後、1 腹の生存胎児の約 1/2 を内部器官・組織検査用としてブアン液で固定した。残りの約 1/2 は内臓除去後、骨格検査用として 70%エタノールで固定した。

以下の指標を算出した。

外表異常胎児出現率(%) = (外表異常胎児数 / 検査胎児数) × 100

外表異常胎児を持つ腹の頻度 = 外表異常胎児を持つ腹数 / 検査腹数

② 内部器官・組織検査

各用量群の、ブアン液で固定した胎児全例について、肉眼または実体顕微鏡下で異常の有無を検査した。頭部については Wilson の粗大切片法⁴⁾、胸部については西村の顕微解剖法⁵⁾に準じて検査した。検査終了後、これらの胎児を個体別に保存した。

以下の指標を算出した。

内部器官・組織異常胎児出現率(%) = (内部器官・組織異常胎児数 / 検査胎児数) × 100

内部器官・組織異常胎児を持つ腹の頻度 = 内部器官・組織異常胎児を持つ腹数 / 検査腹数

③骨格検査

各用量群の 70%エタノールで固定した胎児全例について、アリザリンレッド S およびアルシアンブルーで骨・軟骨二重染色を施し、80%グリセリン水溶液に浸漬して透明骨格標本作製した。これらの標本を、実体顕微鏡下で化骨数を計測し、変異および異常の有無を検査した。検査終了後、骨格標本を腹毎に保存した。

以下の指標を算出した。

化骨進行度（頸椎椎体、胸椎椎体、腰椎椎体、仙尾椎椎体、胸骨分節、中手骨および中足骨の化骨数）

骨格変異胎児出現率(%) = (骨格変異胎児数 / 検査胎児数) × 100

骨格異常胎児出現率(%) = (骨格異常胎児数 / 検査胎児数) × 100

骨格変異胎児を持つ腹の頻度 = 骨格変異胎児を持つ腹数 / 検査腹数

骨格異常胎児を持つ腹の頻度 = 骨格異常胎児を持つ腹数 / 検査腹数

5. 統計学的方法

母動物の体重、補正体重、体重増加量、摂餌量、妊娠子宮重量、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数、雌雄別生存胎児体重、胎盤重量および化骨進行度については、まず Bartlett の等分散性検定を行なった（有意水準 5%）。その結果、各群の分散が等しい場合は、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べ（有意水準 10%）、群間に有意差が認められる場合は、Dunnett の検定法を用いて投与群と対照群の間の有意差を判定した（有意水準 5%および 1%）。一方、各群の分散が等しくない場合は、Kruskal-Wallis の順位和検定法を用いて群間の有意差の有無を調べ（有意水準 10%）、群間に有意差が認められる場合は、Mann-Whitney の U 検定法を用いて投与群と対照群の間の有意差を判定した（有意水準 5%および 1%）。雌雄別生存胎児体重、胎盤重量および化骨進行度は、1 腹の平均値を標本単位として処理した。以上の統計処理は、株式会社安全研究所が開発した統計解析システムを用いて実施した。

着床率、胎児生存率、胚・胎児死亡率、生存胎児の性比および異常または変異を認めた胎児の出現率は、1 腹を標本単位として、Wilcoxon の順位和検定法を用いて投与群と対照群の間の有意差を判定した（有意水準 5%および 1%）。これらの統計処理は SAS システム（株式会社 SAS インスティテュートジャパン）を使用した。

異常および変異のみられた胎児を持つ腹の頻度については、Fisher の正確確率検定法を用いた（有意水準 5%および 1%）。統計処理は SAS システムを使用した。

成 績

1. 母動物に対する影響

(1) 一般状態および死亡 (Table 1 および 2; INDIVIDUAL DATA 1-1~1-4)

投与開始前の一般状態観察では、いずれの動物にも異常は観察されなかった。

投与期間中の母動物の一般状態観察では、対照群および 10 mg/kg 群では脱毛がそれぞれ 2 例にみられたのみであった。20 および 40 mg/kg 群では、それぞれ 12 および 24 例に、投与後 10 分から 50 分の間に散腫が発現し、続いて自発運動の低下がそれぞれ、1 および 11 例に観察された。40 mg/kg 群ではさらに、腹臥位 (3 例)、呼吸緩徐 (2 例) および振戦 (2 例) の症状が現れ、4 例 (動物番号 451、463、468 および 471) が投与後 30 分以内に死亡した (それぞれ妊娠 8、8、19 および 7 日)。生存した動物では、これらの症状はおよそ 10 分から 2 時間後に回復した。その他の症状として、40 mg/kg 群では、流涎が 2 例、外尿道口周囲被毛汚染が 4 例 および脱毛が 2 例みられた。20 mg/kg 群では、流涎が 2 例、外尿道口周囲被毛汚染が 1 例 および脱毛が 3 例みられたが、母動物の死亡は認められなかった。

(2) 体重 (Figure 1; Table 3; INDIVIDUAL DATA 2-1~2-4)

母動物の平均体重および補正体重には、10 mg/kg 群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。20 mg/kg 群では、妊娠 20 日 (剖検日) の体重に有意な低値がみられた。40 mg/kg 群では、妊娠 8 日 (投与 3 日) 以降 20 日 (剖検日) までの体重および補正体重に有意な低値がみられた。

(3) 体重増加量 (Table 4; INDIVIDUAL DATA 3-1~3-4)

母動物の平均体重増加量には、10 mg/kg 群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。20 mg/kg 群では、妊娠 0-10 日ならびに 0-12 日以降 0-20 日までのすべての値が有意に低かった。40 mg/kg 群では、妊娠 0-7 日から妊娠 0-20 日まで投与期間を通じて有意な低値がみられた。20 および 40 mg/kg 群では、投与期間中 (妊娠 6-20 日) の体重増加量も有意な低値であった。

(4) 摂餌量 (Figure 2; Table 5; INDIVIDUAL DATA 4-1~4-4)

母動物の平均摂餌量には、10 および 20 mg/kg 群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。40 mg/kg 群では、投与期間中の妊娠 6-9 日、9-12 日、12-15 日、15-18 日および 18-20 日に有意な低値がみられた。

(5) 剖検所見 (Table 6; INDIVIDUAL DATA 5-1~5-4)

妊娠 20 日に実施した母動物の剖検では、対照群で内臓逆位が 1 例、脱毛が 2 例、10 および 20 mg/kg 群で、脱毛が各 1 例、40 mg/kg 群で、脱毛が 2 例、胸腺の萎縮が 2 例、嚢胞腎が 1 例観察された。

(6) 卵巣および子宮内容の検査結果 (Table 1、3 および 7; INDIVIDUAL DATA 2-1~2-4 および 6-1~6-4)

交尾の成立した各群 24 匹の雌の全例に妊娠が確認され、これらの妊娠した雌の、40 mg/kg 群で途中死亡した雌を除く全例に生存胎児が得られた。

妊娠子宮重量では、40 mg/kg 群で有意な低値がみられた。着床率に、10 mg/kg 群で有意な高値がみられた。妊娠黄体数および着床数には、いずれの被験物質投与群においても対照群との間に有意な差はみられなかった。

2. 胎児に対する影響

(1) 死亡胚・胎児数、胚・胎児死亡率、生存胎児数および胎児生存率 (Table 7; INDIVIDUAL DATA 6-1~6-4)

死亡胚・胎児数、胚・胎児死亡率、生存胎児数および胎児生存率に、10 および 20 mg/kg 群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。40 mg/kg 群では死亡胚・胎児数（早期段階および合計）および胚・胎児死亡率に有意な高値が、生存胎児数および胎児生存率に有意な低値がみられた。

(2) 性比、胎児体重および胎盤重量 (Table 7; INDIVIDUAL DATA 6-1~6-4)

胎児の性比には、すべての被験物質投与群において有意な低値がみられた。雌雄の胎児体重および胎盤重量には、10 および 20 mg/kg 群では対照群と比較して有意な差はみられなかったが、40 mg/kg 群ではいずれにも有意な低値がみられた。

(3) 外表検査における所見 (Table 8; INDIVIDUAL DATA 7-1~7-4)

生存胎児の外表検査では、20 および 40 mg/kg 群において、短指がそれぞれ 8 および 31 例（腹毎の外表異常胎児出現率から算出した群平均：2.17% および 14.38%）、短尾がそれぞれ 7 および 10 例（1.84% および 4.37%）観察され、短指および短尾胎児の出現率および腹の頻度は、40 mg/kg 群において対照群の値と比較して有意な高値であった。20 mg/kg 群でも、統計学的に有意な差はみられないが、高値傾向を示した。40 mg/kg 群ではこのため、外表異常胎児の総出現率ならびに腹の総頻度も有意な高値であった。その他に、口蓋裂が 10 mg/kg 群で 1 例（0.28%）観察されたが、この異常の胎児出現率あるいは腹の頻度には、対照群の値と比較し

て有意な差は認められなかった。

(4) 内部器官・組織検査における所見 (Table 9; INDIVIDUAL DATA 8-1~8-4)

内部器官・組織異常として、小眼球が対照群および 20 mg/kg 群でそれぞれ 1 例 (0.60% および 0.52%)、側脳室拡張が対照群で 1 例 (0.60%)、精巣下降不全が 40 mg/kg 群で 1 例 (0.83%) 観察された。しかし、被験物質投与群におけるこれらの内部器官・組織異常の胎児出現率あるいは腹の頻度には、いずれも対照群の値と比較して有意な差は認められなかった。

内部器官・組織変異は、対照群を含むすべての試験群で観察された。その種類と胎児例数 (腹毎の内部器官・組織変異胎児出現率から算出した群平均) は、胸腺頸部残留が対照群、10、20 および 40 mg/kg 群でそれぞれ、13 (7.52%)、8 (4.63%)、12 (6.87%) および 17 例 (14.80%)、左側臍動脈がそれぞれ、1 (0.69%)、1 (0.60%)、1 (0.60%) および 2 例 (1.63%)、腎盂拡張が対照群および 10 mg/kg 群でそれぞれ、2 (1.22%) および 2 例 (1.35%) であった。しかし、被験物質投与群におけるこれらの内部器官・組織変異の胎児出現率あるいは腹の頻度には、いずれも対照群の値と比較して有意な差は認められなかった。

(5) 骨格検査における所見 (Table 10 および 11; INDIVIDUAL DATA 9-1~9-4、10-1~10-4 および 11-1~11-4)

骨格異常として、20 および 40 mg/kg 群において、尾椎の欠損、癒合または位置異常がそれぞれ 8 および 10 例 (腹毎の骨格異常胎児出現率から算出した群平均: 4.17% および 8.56%)、指節骨の欠損または癒合がそれぞれ 5 および 18 例 (2.60% および 16.02%) 観察され、骨格異常の胎児出現率および腹の頻度は、40 mg/kg 群において対照群と比較して有意な高値であった。20 mg/kg 群でも、統計学的に有意な差はみられないが、高値傾向を示した。40 mg/kg 群では、さらに中手骨または中足骨と指節骨の癒合が 2 例 (1.55%)、中手骨の欠損または癒合が 4 例 (3.38%)、脛骨および腓骨の短縮が 1 例 (1.25%) 観察され、中手骨の欠損または癒合の胎児出現率および腹の頻度が有意な高値であった。このため、20 および 40 mg/kg 群では、骨格異常胎児の総出現率に有意な高値がみられ、40 mg/kg 群ではさらに、腹の総頻度も有意な高値であった。その他として、胸椎椎体軟骨分離が、20 および 40 mg/kg 群でそれぞれ 1 例 (0.60% および 0.83%)、頸椎椎弓軟骨癒合が 10、20 および 40 mg/kg 群でそれぞれ 1 例 (0.46%、0.69% および 1.25%)、肋軟骨癒合が対照群で 1 例 (0.60%) 観察されたが、これらの骨格異常の胎児出現率あるいは腹の頻度には、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。

骨格変異は、対照群を含むすべての試験群で観察された。その種類と胎児例数 (腹毎の骨格変異胎児出現率から算出した群平均) は、短小過剰肋骨が対照群、10、20 および 40 mg/kg 群でそれぞれ、9 (4.94%)、12 (6.73%)、14 (8.06%) および 4 例 (2.89%)、胸椎椎体未化骨が対照群、10 および 40 mg/kg 群でそれぞれ、1 (0.60%)、1 (0.83%) および 1 例 (0.83%)、

腰椎数の変異が対照群および 40 mg/kg 群でそれぞれ、1 例 (0.60%) および 2 例 (1.43%)、胸椎椎体化骨核分離が 10 および 20 mg/kg 群でそれぞれ、2 (0.93%) および 1 例 (0.60%)、波状肋骨が 10 および 20 mg/kg 群でそれぞれ 1 例 (0.60% および 0.52%)、胸骨分節の分離が 20 および 40 mg/kg 群でそれぞれ 1 例 (0.60% および 1.25%) であった。その他に、10 mg/kg 群で胸椎椎体化骨核歪鈴型が 1 例 (0.52%)、40 mg/kg 群で第 13 肋骨の短小が 2 例 (1.43%)、腰椎の仙椎化が 2 例 (1.43%) および胸骨分節の非対称が 1 例 (0.83%) 観察された。しかし、これらの骨格変異の胎児出現率あるいは腹の頻度には、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。

胎児の椎骨椎体、胸骨分節、中手骨および中足骨の化骨数の平均には、10 および 20 mg/kg 群で対照群と比較して有意な差は認められなかった。40 mg/kg 群では、仙尾椎椎体、胸骨分節、中手骨および中足骨の化骨数に有意な低値がみられた。

考 察

N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンのラットに対する胚・胎児発生毒性の有無を検討するために催奇形性試験を実施した。N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンを0(対照群)、10、20 および 40 mg/kg/day の用量で、1 群当たり 24 匹の交尾を認めた Crj:CD (SD) IGS 雌ラットに妊娠 6 日から 19 日まで胃ゾンデを用いて経口投与した。妊娠 20 日の母動物の剖検時に、胎児を子宮から摘出して、外表、内部器官・組織および骨格検査を実施した。

母動物に対する被験物質投与の影響は、20 および 40 mg/kg 群において認められた。臨床症状として投与後 10 分から 50 分の間に散瞳が、20 mg/kg 群では半数例に、40 mg/kg 群では全例に発現し、続いて自発運動の低下がそれぞれ 1 および 11 例に観察された。40 mg/kg 群ではさらに、腹臥位、呼吸緩徐または振戦の症状が現れ、24 例中 4 例が投与後 30 分以内に死亡した。20 mg/kg 群では、母動物の死亡は認められなかった。生存した動物では、これらの症状はおよそ 10 分から 2 時間後に回復した。その他の症状として、流涎または外尿道口周囲被毛汚染が数例みられた。これらの症状はいずれも、先に実施された 28 日間反復経口投与毒性試験²⁾ならびに簡易生殖毒性試験³⁾において観察されたものと同じであった。途中死亡例を含むこれらの母動物の剖検では、被験物質投与に関連すると思われる変化は観察されなかった。

母動物の体重および体重増加量では、投与期間を通じて 20 および 40 mg/kg 群で用量に依存して有意な低値が認められた。40 mg/kg 群では、妊娠 20 日の補正体重も有意に低かった。摂餌量については、40 mg/kg 群において、投与期間を通じて有意な低値がみられた。

妊娠 20 日の剖検時における卵巣と子宮内容の検査では、40 mg/kg 群においてのみ被験物質投与に起因すると考えられる変化が認められた。妊娠子宮重量に有意な低値がみられ、胚・胎児死亡率の増加と胎児体重の低値と関連した変化と考えられた。着床率に、10 mg/kg 群で有意な高値がみられたが、用量相関性がないことと、高値であることから毒性学的に意味のない変化と考えられた。

胚・胎児に対する被験物質投与の影響は、20 および 40 mg/kg 群において認められた。死亡胚・胎児数および胚・胎児死亡率に、20 mg/kg 群では変化はみられなかったが、40 mg/kg 群において有意な増加が認められた。40 mg/kg 群ではさらに、生存胎児数および胎児生存率に有意な低値がみられた。胎児の性比に、すべての被験物質投与群において有意な低値がみられた。しかし、その値(それぞれ 0.487、0.457 および 0.456)は当試験施設で過去 6 年間に実施した試験の背景データ(範囲 0.429~0.521)の範囲内にあることから、対照群における値(0.562)が高値であったことによる変動であり、毒性学的に意味のない変化と考えられた。胎児体重および胎盤重量には、40 mg/kg 群においていずれにも有意な低値がみられた。

生存胎児の外表検査では、短指および短尾の胎児出現率および腹の頻度が 20 および 40 mg/kg 群において用量に依存して増加し、40 mg/kg 群では対照群と比較して有意な高値であった。この異常の出現は自然発生では極めて低い（当試験施設で過去 6 年間に実施した 13 試験の背景データでは出現していない）ことから、この変化は被験物質投与に関連すると考えられた。その他の外表異常では、口蓋裂が 10 mg/kg 群で 1 例観察されたのみであり、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

内部器官・組織検査では、異常として、小眼球が対照群および 20 mg/kg 群でそれぞれ 1 例、側脳室拡張が対照群で 1 例、精巣下降不全が 40 mg/kg 群で 1 例観察されたが、いずれの異常も単一の発生であり、その出現頻度に被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられないことから、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

内部器官・組織変異として、胸腺頸部残留、腎盂拡張および左側臍動脈が各試験群で散見されたが、いずれの変異の出現頻度あるいはそれらの総出現頻度にも被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられず、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

骨格異常として、尾椎の欠損、癒合または位置異常ならびに指節骨の欠損または癒合の胎児出現率および腹の頻度が、20 および 40 mg/kg 群において用量に依存して増加し、40 mg/kg 群では対照群と比較して有意な高値であった。40 mg/kg 群では、さらに中手骨または中足骨と指節骨の癒合、中手骨の欠損または癒合または脛骨および腓骨の短縮が 1~4 例に観察された。これらの尾椎および肢指骨の異常は、外表異常として得られた所見を裏付ける所見であり、被験物質投与に起因する変化と考えられた。20 および 40 mg/kg 群では、骨格異常胎児の総出現率に有意な高値がみられ、40 mg/kg 群ではさらに、腹の総頻度も有意な高値であった。その他の骨格異常では、胸椎椎体軟骨分離、頸椎椎弓軟骨癒合等が散見されたが、これらの異常の出現頻度には被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられず、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

骨格変異については、短小過剰肋骨、胸椎椎体未化骨、胸骨分節の分離等が対照群を含むすべての試験群で散見されたが、いずれの変異の出現頻度あるいはそれらの総出現頻度にも被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられず、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

胎児の化骨進行度に関しては、10 および 20 mg/kg 群では検査したいずれの骨の化骨数にも対照群と比較して有意な差はみられなかったが、40 mg/kg 群では、仙尾椎椎体、胸骨分節、中手骨および中足骨の化骨数に有意な低値がみられ、胎児体重の低値と関連した変化と考えられた。

以上の結果から、本試験条件下における N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンのラットの母動物および胎児に対する無毒性量は、10 mg/kg/day であり、一方、20 および 40 mg/kg/day の用量は母動物に対して明確な毒性を現し、胎児に対しては四肢および尾の異常を誘発する用量であると考えられる。さらに、40 mg/kg/day の用量は母動物の死亡および胚・胎児の死亡率を増加させる用量であると考えられる。

参考文献

- 1) 0.1w/v%Tween80 添加 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液中 N,N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの均一性および安定性試験 最終報告書、株式会社パナファーム・ラボラトリーズ、2003 年.
- 2) 1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (2004) 本田久美子 他、化学物質毒性試験報告 11 : 126-138、化学物質点検推進連絡協議会.
- 3) 1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験 (2004) 木村栄介 他、化学物質毒性試験報告 11 : 139-145、化学物質点検推進連絡協議会
- 4) Wilson J.G. (1965) Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson J.G. and Warkany J., editors. Teratology, Principles and Techniques, pp. 262-277, The University of Chicago Press, Chicago and London.
- 5) Nishimura K. (1974) A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. Cong. Anom., 14: 23-40.

Teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (Study no. SR04223)

Figures

- 1 Body weights of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)
- 2 Food consumption of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

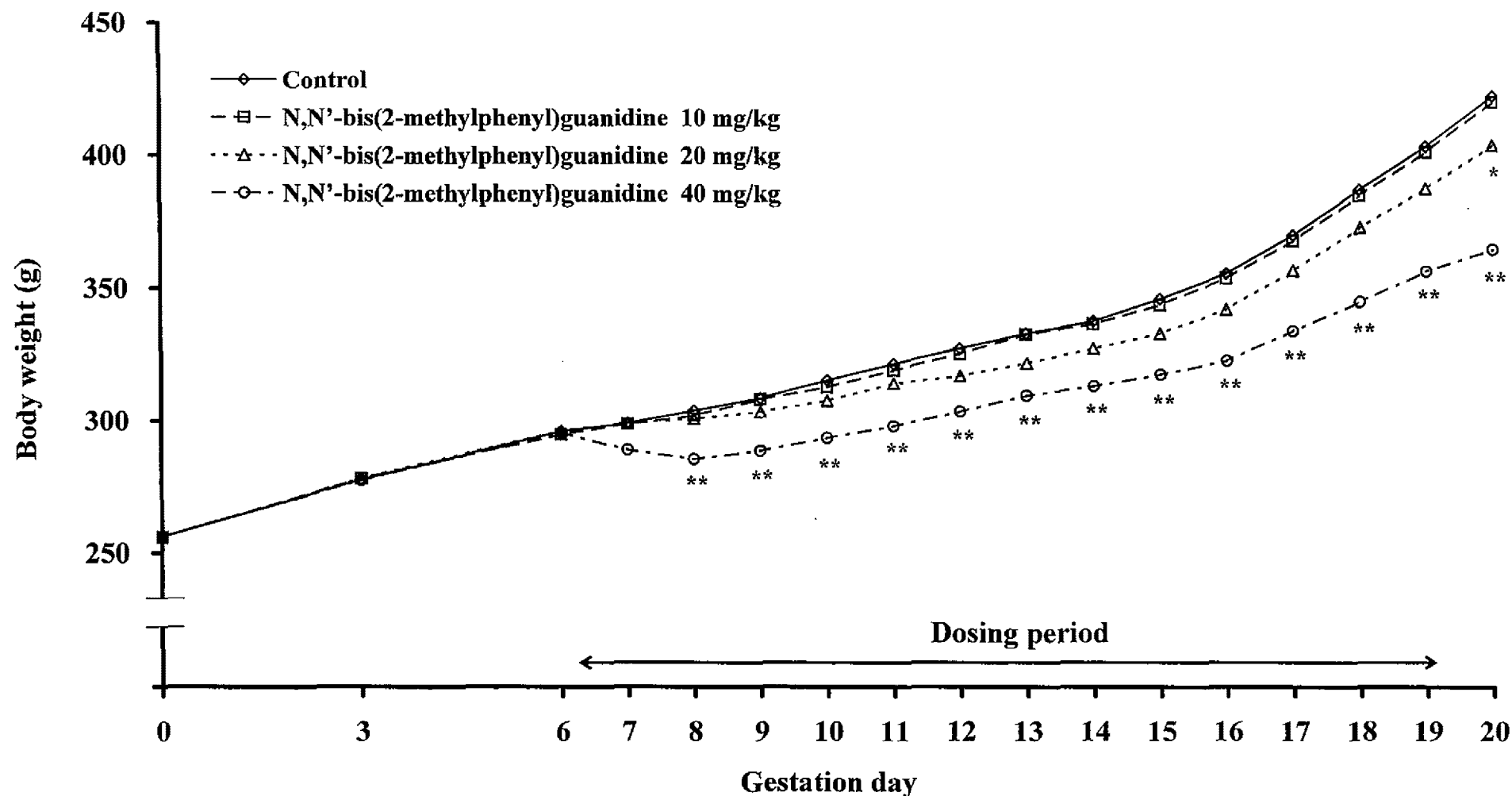


Figure 1 Body weights of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

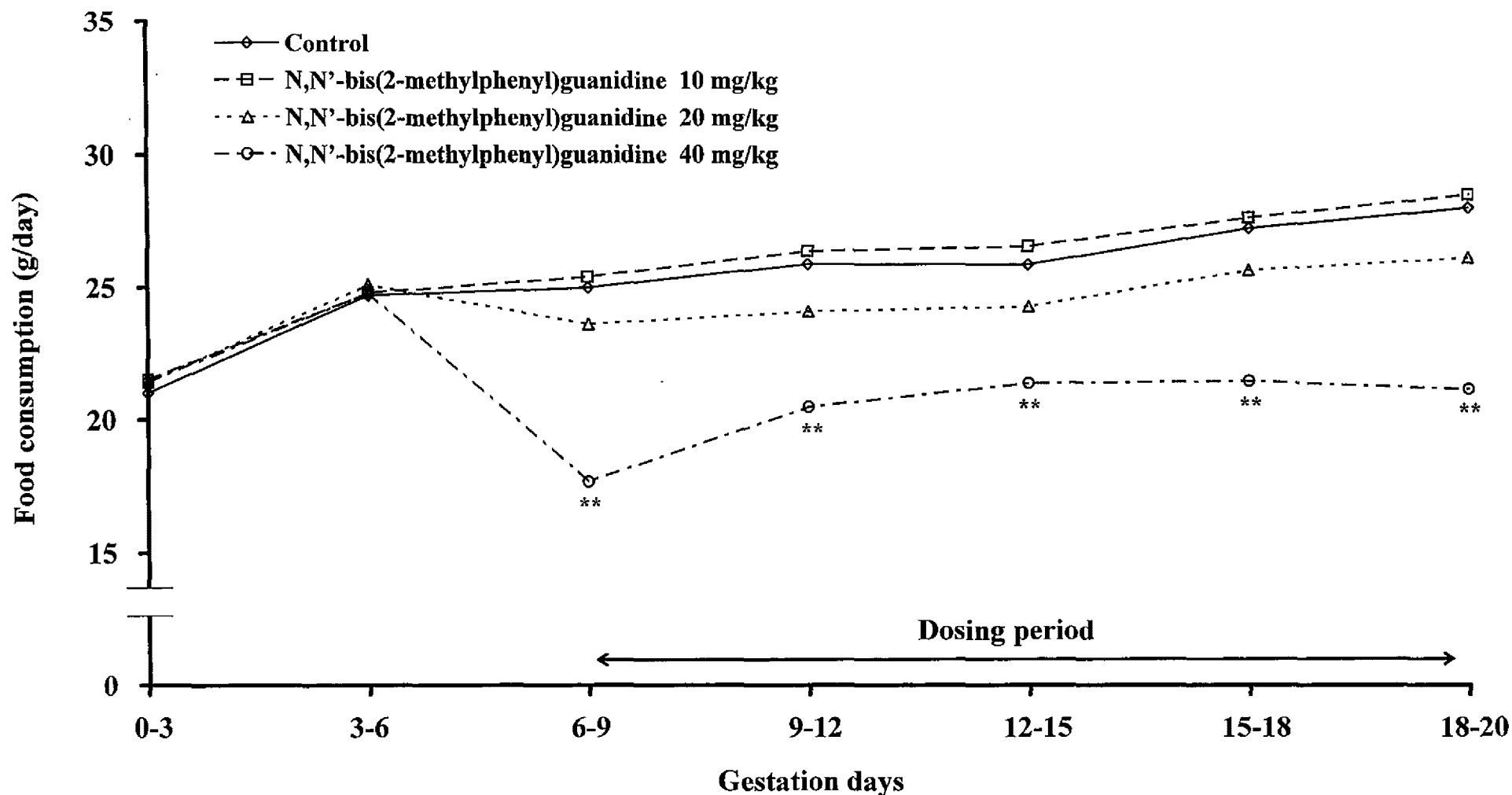


Figure 2 Food consumption of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

** : Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

Teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (Study no. SR04223)

Tables

- 1 Experimental design, and summary of survival and pregnancy status in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)
- 2 General appearance in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)
- 3 Body weights and gravid uterine weights of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)
- 4 Body weight gains of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)
- 5 Food consumption of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)
- 6 Autopsy findings in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)
- 7 Observations at term of pregnancy of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)
- 8 Incidences of fetal external anomalies in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)
- 9 Incidences of fetal visceral anomalies in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)
- 10 Incidences of fetal skeletal anomalies and variations in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)
- 11 Fetal skeletal development in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)

Table 1 Experimental design, and summary of survival and pregnancy status in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

Group	Concentration of N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine ^a (mg/mL)	Volume (mL/kg)	Number of mated females ^b (Animal number)	Number of dead or euthanized animals during the study		Number of surviving animals at autopsy ^c	
				Pregnant	Non-pregnant	Pregnant	Non-pregnant
Control ^d	0	5	24 (151-174)	0	0	24	0
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 10 mg/kg	2	5	24 (251-274)	0	0	24	0
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 20 mg/kg	4	5	24 (351-374)	0	0	24	0
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 40 mg/kg	8	5	24 (451-474)	4 ^e	0	20	0

a: N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine was suspended in 0.5% aqueous sodium carboxymethylcellulose with 0.1% tween 80.

b: N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine was orally administered to Crj:CD(SD)IGS female rats once a day on days 6 through 19 of gestation.

c: Animals were autopsied on day 20 of gestation.

d: Control females only received 0.5% aqueous sodium carboxymethylcellulose with 0.1% tween 80.

e: Deaths after dosing were observed in 1, 2 and 1 animals on day 7, 8 and 19 of gestation, respectively.

Table 2 General appearance in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

Item	Gestation days 0-5				Dosing period ^a			
	Control	N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (mg/kg)			Control	Gestation days 6-20		
		10	20	40		N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (mg/kg)		
						10	20	40
Number of animals examined	24	24	24	24	24	24	24	24
Number of animals with abnormal findings	0	0	0	0	2	2	16	24
Findings ^b								
Alopecia	0	0	0	0	2	2	3	2
Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	2
Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	1	11
Mydriasis	0	0	0	0	0	0	12	24
Prone position	0	0	0	0	0	0	0	3
Salivation	0	0	0	0	0	0	2	2
Soil of perigenital fur	0	0	0	0	0	0	1	4
Tremor	0	0	0	0	0	0	0	2
Died in 30 minutes after dosing	0	0	0	0	0	0	0	4

a: Includes the day of autopsy (gestation day 20; not dosed).

b: Values represent the number of animals with abnormal findings.

Table 3 Body weights and gravid uterine weights of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

Group		Number of animals	Dosing period																	Gravid uterine weight (g)	Adjusted body weight (g)
			Body weight (g) on gestation day																		
			0	3	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Control	24	Mean	255.9	277.6	295.8	299.1	303.8	308.7	315.4	321.7	327.5	333.2	337.8	346.2	355.7	370.1	387.2	403.5	422.8	79.1	343.6
		S.D.	13.4	13.9	15.8	15.6	16.1	15.5	16.4	17.5	17.4	18.3	19.6	19.2	20.1	20.5	21.5	22.5	24.6	10.1	19.4
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 10 mg/kg	24	Mean	255.9	278.0	294.7	298.7	302.0	308.2	312.8	319.3	325.5	332.9	336.8	343.9	354.0	368.0	385.0	401.4	420.5	77.8	342.7
		S.D.	13.1	11.8	12.5	14.1	14.6	14.6	15.0	15.0	16.6	17.6	17.7	18.6	19.9	21.4	22.2	23.7	25.1	10.9	20.1
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 20 mg/kg	24	Mean	255.8	278.1	296.1	299.0	300.8	303.5	307.7	314.3	317.1	322.0	327.5	333.3	342.3	356.9	373.0	387.7	404.1 *	71.6	332.5
		S.D.	13.5	14.8	17.4	16.7	18.2	18.1	19.1	20.5	20.2	21.1	23.9	25.0	24.2	25.7	27.1	28.3	29.5	14.8	23.1
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 40 mg/kg	24	Mean	255.9	277.3	295.3	288.9	(23) 285.4 **	(21) 288.6 **	(21) 293.4 **	(21) 298.0 **	(21) 303.6 **	(21) 309.7 **	(21) 313.3 **	(21) 317.8 **	(21) 323.0 **	(21) 334.3 **	(21) 345.2 **	(21) 356.7 **	(20) 365.0 **	(20) 59.5 **	(20) 305.5 **
		S.D.	13.4	13.4	14.8	13.8	14.9	12.4	14.0	16.1	14.5	15.5	16.6	17.0	19.1	19.9	19.9	21.6	25.8	9.5	21.3

Values in parentheses represent the number of animals determined.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

Table 4 Body weight gains of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

Group	Number of animals		Dosing period																
			Body weight gain (g) on gestation days																
			0-3	0-6	0-7	0-8	0-9	0-10	0-11	0-12	0-13	0-14	0-15	0-16	0-17	0-18	0-19	0-20	6-20
Control	24	Mean	21.7	39.8	43.2	47.9	52.8	59.5	65.8	71.6	77.3	81.8	90.3	99.8	114.2	131.3	147.5	166.8	127.0
		S.D.	6.0	8.0	8.7	7.9	8.5	8.8	10.0	11.0	11.7	12.0	11.6	12.4	13.2	14.2	14.9	17.2	13.7
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 10 mg/kg	24	Mean	22.1	38.8	42.8	46.1	52.3	56.9	63.4	69.6	77.0	81.0	88.0	98.1	112.2	129.1	145.5	164.6	125.8
		S.D.	5.8	7.9	9.6	10.0	10.2	11.2	11.3	12.6	14.0	13.6	15.0	15.6	17.4	18.6	19.9	20.6	15.7
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 20 mg/kg	24	Mean	22.3	40.3	43.2	45.0	47.7	51.9 *	58.4	61.3 **	66.2 *	71.7 *	77.5 **	86.5 **	101.0 *	117.1 *	131.8 *	148.3 **	108.0 **
		S.D.	3.8	7.9	7.6	9.4	10.2	10.9	12.3	12.8	13.6	16.6	17.2	17.5	18.7	20.5	22.2	23.7	18.4
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 40 mg/kg	24	Mean	21.4	39.4	33.0 **	(23) 30.2 **	(21) 32.6 **	(21) 37.4 **	(21) 42.0 **	(21) 47.5 **	(21) 53.7 **	(21) 57.2 **	(21) 61.8 **	(21) 67.0 **	(21) 78.3 **	(21) 89.2 **	(21) 100.6 **	(20) 108.9 **	(20) 70.6 **
		S.D.	4.6	7.5	8.6	9.1	9.3	9.8	11.1	10.3	11.8	13.3	12.0	15.1	16.2	15.7	17.6	21.3	20.3

Values in parentheses represent the number of animals determined.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

Table 5 Food consumption of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

Group	Number of animals		Dosing period						
			Food consumption (g/day) on gestation days						
			0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-20
Control	24	Mean	21.0	24.7	25.0	25.9	25.9	27.3	28.1
		S.D.	2.0	2.2	2.1	2.5	2.7	1.9	2.7
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 10 mg/kg	24	Mean	21.5	24.8	25.4	26.4	26.6	27.7	28.6
		S.D.	1.9	1.6	2.3	2.6	2.7	2.8	3.0
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 20 mg/kg	24	Mean	21.4	25.1	23.6	24.1	24.3	25.7	26.2
		S.D.	1.9	2.4	3.0	3.1	3.2	2.4	2.5
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 40 mg/kg	24	Mean	21.4	24.8	(21) 17.7 **	(21) 20.5 **	(21) 21.4 **	(21) 21.5 **	(20) 21.2 **
		S.D.	2.0	2.6	2.6	2.9	2.8	2.9	4.0

Values in parentheses represent the number of animals determined.

** : Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

Table 6 Autopsy findings in maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

Item	Control	N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (mg/kg)		
		10	20	40
Number of animals examined	24	24	24	24
Number of animals with abnormal findings	3	1	1	5
<Animals found dead during the study>				
Number of animals examined	0	0	0	4
Number of animals with abnormal findings	-	-	-	0
<Animals euthanized on day 20 of gestation>				
Number of animals examined	24	24	24	20
Number of animals with abnormal findings	3	1	1	5
Findings ^a				
General: Situs inversus viscerum	1	0	0	0
Skin: Alopecia	2	1	1	2
Thymus: Atrophy	0	0	0	2
Kidney: Cystic kidney	0	0	0	1

a: Values represent the number of animals with abnormal findings.

-: Not applicable.

Table 7 Observations at term of pregnancy of maternal rats treated orally with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine in the teratogenicity study (SR04223)

Group	Number of pregnant animals		Number of corpora lutea	Number of implantations	Implantation index (%) ^a	Dead or resorbed embryos and fetuses				Number of live fetuses	Viability index of fetuses (%) ^c	Sex ratio ^f	Live fetuses		Placental weight (g) ^h
						Early stage ^b	Late stage ^c	Total	Incidence (%) ^d				Body weight (g) ^e	Female	
Control	24	Mean	15.7	15.3	97.6	0.5	0.0	0.5	3.5	14.8	96.5	0.562	3.638	3.423	0.475
		S.D.	2.1	1.9	3.4	0.6	0.0	0.6	3.9	1.9	3.9	0.112	0.167	0.164	0.035
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 10 mg/kg	24	Mean	14.8	14.7	99.1 [#]	0.4	0.0	0.5	3.4	14.2	96.6	0.487 [#]	3.722	3.529	0.468
		S.D.	1.6	1.8	3.3	0.7	0.2	0.7	5.0	2.1	5.0	0.143	0.182	0.250	0.035
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 20 mg/kg	24	Mean	14.9	14.2	94.5	0.5	0.0	0.5	4.8	13.7	95.2	0.457 ^{##}	3.586	3.409	0.500
		S.D.	1.9	2.7	12.4	0.7	0.0	0.7	10.5	2.9	10.5	0.113	0.237	0.183	0.162
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 40 mg/kg	20	Mean	15.3	15.2	99.1	2.5 ^{\$\$}	0.2	2.6 ^{\$\$}	16.4 ^{##}	12.6 ^{**}	83.6 ^{##}	0.456 ^{##}	3.187 ^{\$\$}	3.035 ^{**}	0.401 ^{\$\$}
		S.D.	1.5	1.4	2.2	2.5	0.5	2.5	14.4	1.9	14.4	0.115	0.313	0.260	0.044

a: (Number of implantations/number of corpora lutea) x 100.

b: Includes implantation sites and placental remnant.

c: Includes macerated fetuses and dead term fetuses.

d: (Number of dead or resorbed embryos and fetuses/number of implantations) x 100.

e: (Number of live fetuses/number of implantations) x 100.

f: Number of live male fetuses/number of live fetuses.

a, d, e, f, g and h: The litter is the unit evaluated.

[#]: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Wilcoxon rank-sum test.^{##}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Wilcoxon rank-sum test.^{\$\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney *U*-test.^{**}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

Table 8 Incidences of fetal external anomalies in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)

Item	Control	N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (mg/kg)		
		10	20	40
Number of litters examined	24	24	24	20
Number of fetuses examined	354	341	328	251
Number of fetuses with anomalies (%)	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.28) [1 / 24]	12 (3.21) [3 / 24]	33 (15.18)** [11 / 20] ^{##}
Cleft palate	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.28) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 20]
Brachydactyly	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	8 (2.17) [3 / 24]	31 (14.38)** [11 / 20] ^{##}
Short tail	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	7 (1.84) [2 / 24]	10 (4.37)** [7 / 20] ^{##}

Values in parentheses represent the means of incidences of fetal external anomalies (the litter is the unit evaluated).

Values in square brackets represent incidences of litters with fetal external anomalies.

** : Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Wilcoxon rank-sum test.

^{##} : Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Fisher's exact probability test.

Table 9 Incidences of fetal visceral anomalies and variations in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)

Item	Control	N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (mg/kg)		
		10	20	40
Number of litters examined	24	24	24	20
Number of fetuses examined	170	165	158	121
Number of fetuses with anomalies (%)	1 (0.60) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.52) [1 / 24]	1 (0.83) [1 / 20]
Microphthalmia	1 (0.60) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.52) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 20]
Dilatation of lateral ventricle	1 (0.60) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 20]
Undescended testis	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.83) [1 / 20]
Number of fetuses with variations (%)	16 (9.42) [10 / 24]	11 (6.58) [9 / 24]	13 (7.47) [7 / 24]	19 (16.42) [12 / 20]
Thymic remnant in neck	13 (7.52) [10 / 24]	8 (4.63) [7 / 24]	12 (6.87) [7 / 24]	17 (14.80) [11 / 20]
Dilatation of renal pelvis	2 (1.22) [2 / 24]	2 (1.35) [2 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 20]
Left umbilical artery	1 (0.69) [1 / 24]	1 (0.60) [1 / 24]	1 (0.60) [1 / 24]	2 (1.63) [2 / 20]

Values in parentheses represent the means of incidences of fetal visceral anomalies or variations (the litter is the unit evaluated).

Values in square brackets represent incidences of litters with fetal visceral anomalies or variations.

Table 10 Incidences of fetal skeletal anomalies and variations in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)

Item	Control	N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (mg/kg)		
		10	20	40
Number of litters examined	24	24	24	20
Number of fetuses examined	184	176	170	130
Number of fetuses with anomalies (%)	1 (0.60) [1 / 24]	1 (0.46) [1 / 24]	13 (7.02)* [6 / 24]	26 (22.87)** [12 / 20] ^{##}
Split cartilage of thoracic centrum	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.60) [1 / 24]	1 (0.83) [1 / 20]
Fused cartilage of cervical vertebral arches	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.46) [1 / 24]	1 (0.69) [1 / 24]	1 (1.25) [1 / 20]
Fused cartilage of ribs	1 (0.60) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 20]
Absence, fusion or malposition of caudal vertebrae	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	8 (4.17) [3 / 24]	10 (8.56)** [8 / 20] ^{##}
Absence or fusion of phalanges	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	5 (2.60) [3 / 24]	18 (16.02)** [9 / 20] ^{##}
Fusion of metacarpal/metatarsal and phalanx	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	2 (1.55) [2 / 20]
Absence or fusion of metacarpals	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	4 (3.38)* [4 / 20] [#]
Shortening of tibia and fibula	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	1 (1.25) [1 / 20]
Number of fetuses with variations (%)	10 (5.54) [7 / 24]	16 (9.14) [9 / 24]	16 (9.25) [11 / 24]	12 (9.38) [8 / 20]
Bipartite ossification center of thoracic centrum	0 (0.00) [0 / 24]	2 (0.93) [1 / 24]	1 (0.60) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 20]
Dumbbell ossification of thoracic centrum	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.52) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 20]
Unossified thoracic centrum	1 (0.60) [1 / 24]	1 (0.83) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.83) [1 / 20]
Variation of number of lumbar vertebrae	1 (0.60) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	2 (1.43) [1 / 20]
Wavy ribs	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.60) [1 / 24]	1 (0.52) [1 / 24]	0 (0.00) [0 / 20]
Short supernumerary rib	9 (4.94) [6 / 24]	12 (6.73) [7 / 24]	14 (8.06) [10 / 24]	4 (2.89) [4 / 20]
Short 13th rib	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	2 (1.43) [2 / 20]
Sacralization of lumbar vertebra	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	2 (1.43) [1 / 20]
Bipartite ossification of sternebra	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.60) [1 / 24]	1 (1.25) [1 / 20]
Asymmetry of sternebra	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	0 (0.00) [0 / 24]	1 (0.83) [1 / 20]

Values in parentheses represent the means of incidences of fetal skeletal anomalies or variations (the litter is the unit evaluated).

Values in square brackets represent incidences of litters with fetal skeletal anomalies or variations.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Wilcoxon rank-sum test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Wilcoxon rank-sum test.

[#]: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Fisher's exact probability test.

^{##}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Fisher's exact probability test.

Table 11 Fetal skeletal development in the teratogenicity study in rats with N,N'-bis(2-methylphenyl)guanidine (SR04223)

Group	Number of litters examined	Number of fetuses examined		Number of ossification ^a											
				Vertebral body					Sternebra	Metacarpus			Metatarsus		
				Cervical	Thoracic	Lumbar	Sacrocaudal	Total		Right	Left	Total	Right	Left	Total
Control	24	184	Mean	0.5	13.0	6.0	7.3	26.8	4.6	3.1	3.1	6.1	4.0	4.0	8.0
			S.D.	0.4	0.0	0.0	0.5	0.7	0.4	0.1	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 10 mg/kg	24	176	Mean	0.6	13.0	6.0	7.5	27.1	4.8	3.0	3.0	6.0	4.0	4.0	7.9
			S.D.	0.7	0.0	0.0	0.5	0.9	0.5	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.3
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 20 mg/kg	24	170	Mean	0.5	13.0	6.0	7.5	27.0	4.6	3.1	3.0	6.1	3.9	3.9	7.8
			S.D.	0.3	0.0	0.0	0.5	0.6	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4
N,N'-bis(2-methylphenyl) guanidine 40 mg/kg	20	130	Mean	0.5	13.0	6.0	7.0 *	26.4	4.2 *	2.7 ^{##}	2.6 ^{##}	5.3 ^{##}	3.4 ^{##}	3.3 ^{##}	6.7 ^{##}
			S.D.	0.6	0.0	0.1	0.6	0.9	0.4	0.4	0.5	0.9	0.7	0.7	1.4

a: The litter is the unit evaluated.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.^{##}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney *U*-test.