

# 最終報告書

*N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの細菌を用いる復帰突然変異試験  
(試験番号: 01-284)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

## 目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 指標菌株	3
3. 指標菌株の検査	3
4. 指標菌株の保存と前培養	3
5. S9 mix	4
6. 被験物質の供試液の調製	5
7. 陰性対照および陽性対照	5
8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製	6
9. 用量設定試験(予備試験)	6
10. 本試験	6
1) 用量設定	6
2) 実験方法	7
(1) プレインキュベーション法 (直接法)	7
(2) プレインキュベーション法 (代謝活性化法)	7
11. 無菌試験	7
12. 試験の有効性	8
13. 結果の判定	8
結果	8
結論および参考事項	9
参考文献	10

表：

表 1-1 S9 mix 非存在下における $N, N'$ -ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの用量設定試験結果 [直接法]	11
表 1-2 S9 mix 存在下における $N, N'$ -ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの用量設定試験結果 [代謝活性化法]	12

表 2-1	S9 mix 非存在下における $N, N'$ -ビス (2-メチルフェニル)	
	グアニジンの復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-直接法] .....	13
表 2-2	S9 mix 存在下における $N, N'$ -ビス (2-メチルフェニル)	
	グアニジンの復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-代謝活性化法] ..	14
表 3-1	S9 mix 非存在下における $N, N'$ -ビス (2-メチルフェニル)	
	グアニジンの復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-直接法] .....	15
表 3-2	S9 mix 存在下における $N, N'$ -ビス (2-メチルフェニル)	
	グアニジンの復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-代謝活性化法] ..	16
図:		
図 1	$N, N'$ -ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの	
	復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目 .....	17
図 2	$N, N'$ -ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの	
	復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目 .....	21

## 要 約

*N, N'*-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在 (直接法) および存在 (代謝活性化法) 下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験 (予備試験) の結果、菌の生育阻害が認められた用量を最高用量とし、直接法においてはTA100 およびTA1537で78.1~2500 $\mu$ g/プレート,TA98, TA1535 および WP2uvrA では156~5000 $\mu$ g/プレートの範囲 (公比2), また、代謝活性化法ではいずれの菌株とも156~5000 $\mu$ g/プレートの範囲 (公比2) で設定した。

試験は2回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法ではTA1537の1250 $\mu$ g/プレート以上,TA100の2500 $\mu$ g/プレート並びにTA98, TA1535 および WP2uvrA の2500 $\mu$ g/プレート以上の用量で、また、代謝活性化法ではいずれの菌株とも2500 $\mu$ g/プレート以上の用量で認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、*N, N'*-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

## 試験目的

この試験は、*N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1, 2)</sup>

### 1. 被験物質

名 称 : *N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジン  
別 名 : ソクシノール DT  
CAS 番号 : 97-39-2  
ロット番号 :  
純 度 : 99.6%〔平成 14 年 3 月 6 日, において分  
析(滴定法)〕

入 手 先 :

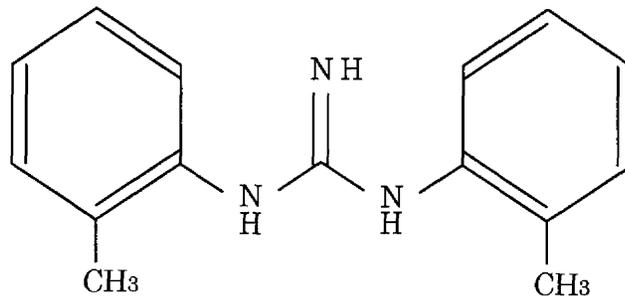
入 手 日 : 平成 14 年 4 月 24 日

入 手 量 : 250 g

物 性 等 :

化学名 *N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジン  
(Guanidine, *N, N'*-bis(2-methylphenyl)-)

構造式



分子式  $C_{15}H_{17}N_3$

分子量 239.32

性状(常温) 白色粉末

融点  $\geq 170^{\circ}C$

引火点  $156^{\circ}C$

- 溶解性 水：ほとんど溶けない，アセトン：5.7 g/100 mL (20°C)  
メタノール：5.9 g/100 mL (20°C)  
エタノール：3.7 g/100 mL (20°C)
- 安定性：安定 [実験終了後，(財)畜産生物科学安全研究所において保管した  
残余被験物質を住友化学工業株式会社において分析（平成 15 年  
2 月 17 日，滴定法）した結果，純度は 99.5% で，実験期間中被験  
物質は安定であったことを確認した。]
- 保管条件：冷暗所 (4°C)，密栓

## 2. 指標菌株

指標菌株は，国立公衆衛生院より入手（平成 6 年 12 月 19 日）した以下の 5 種類  
を用いた。

---

(塩基対置換型)

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535

*Escherichia coli* WP2uvrA

(フレームシフト型)

*Salmonella typhimurium* TA98, TA1537

---

## 3. 指標菌株の検査

次に示す指標菌株の遺伝的特性およびその他の諸性質に関する項目について検査  
し，本来の特性を有することを確認した。

- (1) *S. typhimurium* におけるヒスチジンおよびビオチン要求性  
*E. coli* におけるトリプトファン要求性
- (2) 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- (3) *S. typhimurium* におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- (4) *S. typhimurium* TA100 および TA98 におけるアンピシリン耐性(pKM101)
- (5) 自然突然変異体数
- (6) 陽性対照物質に対する反応性

## 4. 指標菌株の保存と前培養

菌液 0.8 mL にジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番

号 TPK7807, 99.9%) を 0.07 mL の割合で加えて -80°C 以下で保存した。この保存菌株の 25  $\mu$ L をニュートリエントブロス (Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories, ロット番号 44077JK) 液体培地 15mL に接種し, 37°C で 12 時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液については, 分光光度計で吸光度 (OD<sub>660nm</sub>) を測定し, 濁度と生菌数の換算式により 1 mL あたり  $1 \times 10^9$  以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2 <sub>uvrA</sub>	TA98	TA1537
用量設定試験	1.58	1.81	1.38	1.48	1.17
本試験(1回目)	1.62	1.72	1.34	1.33	1.21
本試験(2回目)	1.50	1.62	1.34	1.33	1.14

## 5. S9 mix

代謝活性化法に用いた S9 mix は, ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結された市販品をキッコーマン株式会社から購入し, 使用した (ロット番号 FSM-474・2002 年 11 月 21 日製造・2002 年 12 月 12 日購入)。凍結 S9 mix は -80°C 以下で保存し, 使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL あたりの組成は, 次のとおりである。

### S9 製造法

#### A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体 重: 201~239 g

#### B. 誘導法

- a) 誘導物質: phenobarbital (PB), 5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与方法 (投与開始日起算)
  - 1 日目 - PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目 - PB 60 mg/kg
  - 3 日目 - BF 80 mg/kg

#### C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000 $\times$ g)し, その上清を採取

### S9 mix 1 mL 当たりの組成

MgCl <sub>2</sub>	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADH	4	μmol
NADPH	4	μmol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol
S9	0.1	mL

### 6. 被験物質の供試液の調製

被験物質は水に不溶であり、予備的検討の結果、DMSO に可溶であったことから、溶媒には DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 TCQ7669, 100%) を用いた。被験物質の供試液の調製は、実験の直前に行った。溶媒を用いて最高用量の供試液 (原液) を調製し、ついで、この原液を溶媒で順次希釈して所定の用量の被験物質供試液を作製した。

### 7. 陰性対照および陽性対照

陰性対照 (溶媒対照) には、被験物質用の溶媒である DMSO を用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2 および 2-AA は DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 DWH7397, TCQ7669, 100%) に、SA および 9-AA は蒸留水 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号 K0G81, 局方) に溶解した。

指標菌株	直接法		代謝活性化法	
	(μg/プレート)		(μg/プレート)	
TA100	AF-2	(0.01)	2-AA	(1)
TA1535	SA	(0.5)	2-AA	(2)
WP2uvrA	AF-2	(0.04)	2-AA	(10)
TA98	AF-2	(0.1)	2-AA	(1)
TA1537	9-AA	(80)	2-AA	(2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社, 98%, ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社, >90%, ロット番号 KCM2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 90%, ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company, 98%, ロット番号 07721MZ)

## 8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories, ロット番号 132695XA) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, ロット番号 7001) の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に, *S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン (Sigma Chemical Company, ロット番号 39H0679) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 DLJ5479) 水溶液, *E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 KCK3898) 水溶液を 1/10 容加え, アミノ酸添加軟寒天培地とした。

## 9. 用量設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために, 20~5000 $\mu$ g/プレート の範囲で用量を設定し, 本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果 (表 1-1, 1-2), 直接法の場合は, TA100 および TA1537 では 2000 $\mu$ g/プレート以上, TA98, TA1535 および WP2uvrA では 5000 $\mu$ g/プレートの用量で, また, 代謝活性化法の場合は, いずれの菌株とも 5000 $\mu$ g/プレートの用量で菌の生育阻害が認められた。

## 10. 本試験

本試験は, 同一菌株, 同一用量で 2 回行った。

### 1) 用量設定

用量設定試験の結果から, 被験物質の用量は, 直接法の場合は, TA100 および TA1537 では 2500 $\mu$ g/プレートを最高用量とし, 以下公比 2 で 1250, 625, 313, 156 および 78.1 $\mu$ g/プレート, TA98, TA1535 および WP2uvrA では 5000 $\mu$ g/プレートを最高用量とし, 以下公比 2 で 2500, 1250, 625, 313 および 156 $\mu$ g/プレートのそれぞれ計 6 用量, また, 代謝活性化法の場合は, いずれの菌株とも 5000 $\mu$ g/プレートを最高用量とし, 以下公比 2 で 2500, 125, 625, 313 および 156 $\mu$ g/プレートの計 6 用量とした。

## 2) 実験方法

### (1) プレインキュベーション法（直接法）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (和光純薬工業株式会社, リン酸水素二ナトリウム・十二水塩: ロット番号 CAH3075, リン酸二水素ナトリウム・二水塩: ロット番号 CAJ2723) および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し, 37°C で 20 分間振盪培養後, 45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (プレート) (テスメディア AN 培地, オリエンタル酵母工業株式会社, ロット番号 ANI800KR・2002 年 11 月 26 日製造・2002 年 12 月 12 日購入) は, Vogel-Bonner E 培地 (0.2w/v% クエン酸・一水塩, 1w/v% リン酸二カリウム, 0.192w/v% リン酸一アンモニウム, 0.066w/v% 水酸化ナトリウム, 0.02w/v% 硫酸マグネシウム・七水塩) に寒天粉末を 1.5w/v% およびグルコースを 2w/v% となるように加え, 30 mL ずつ分注したものである。37°C で 48 時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては, 上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり, 溶媒 (DMSO) および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

### (2) プレインキュベーション法（代謝活性化法）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL, S9 mix 0.5 mL および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し, 37°C で 20 分間振盪培養後, 45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37°C で 48 時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては, 上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり, 溶媒 (DMSO) および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

## 11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において, 用いた溶媒, S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について, それぞれ 0.1 mL に 0.6w/v% 軟寒天培地 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地 (テスメディア AN 培地, オリエンタル酵母工業株式会

社、ロット番号 ANI800KR) に重層後、37°Cで 48 時間培養し、菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ 3 枚ずつ使用した。

## 12. 試験の有効性

以下の 3 基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効であると判定した。

- (1) 試験に用いた菌液, 溶媒, 被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- (2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が, 当研究所における背景データの範囲内の値を示す (自然復帰変異体数)。
- (3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が, 当研究所における陽性対照値の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

## 13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の 3 基準を満たす場合を陽性とした。

- (1) 被験物質処理群において陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
  - (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する (用量依存性)。
  - (3) 2 回にわたる本試験の結果から復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。
- 但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定した。

## 結 果

試験を 2 回実施した結果 (表 2-1, 2-2, 3-1, 3-2 および図 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4), 直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の 2 倍を超えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法では、TA1537 の 1250  $\mu$ g/プレート以上, TA100 の 2500  $\mu$ g/プレート並びに TA98, TA1535 および WP2uvrA の 2500  $\mu$ g/プレート以上の用

量で、また、代謝活性化法においては、いずれの菌株とも 2500 $\mu$ g/プレート以上の用量で認められた。

陰性対照群では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められた。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性値を示すものであった。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix などには、雑菌の混入は認められなかった。直接法および代謝活性化法のいずれの場合においても、5000 $\mu$ g/プレートでプレインキュベーション終了時、小試験管内に白色沈殿物が認められたが、プレートに重層後、所定の培養時間終了時には、プレート上に沈殿物等は認められなかった。

#### 結論および参考事項

*N*, *N'*-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンについて遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については、2回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下では *N*, *N'*-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

*N*, *N'*-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの変異原性については、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験において、陰性であったとの報告があるが、指標菌株に対して毒性が認められるほどの高用量を用いた試験結果ではないので、false negative の可能性もある<sup>3)</sup>と報告されている。これに対して、指標菌株に対し毒性の認められる用量を用いて行った今回の試験によって、陰性結果が確認されたものとする。

*N*, *N'*-ビス (2-メチルフェニル) グアニジンの類縁化合物の変異原性について、1,3-ジフェニルグアニジンは、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>3)</sup>、*S. typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>4)</sup>、CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験で陰性<sup>5)</sup>と報告されている。

## 参考文献

- 1) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, 113, 173-215.
- 2) Green, M. H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol. 3, eds. by Kilbey, B. J., Legator, M., Nicols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 161-187.
- 3) Rannug, A., Rannug, U. and Ramel, C. (1984). Genotoxic effects of additives in synthetic elastomers with special consideration to the mechanism of action of thiurames and dithiocarbamates, In : Industrial Hazards of Plastics and Synthetic Elastomers, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 407-419.
- 4) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol. 8 (1)," 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 2001, pp. 418-422.
- 5) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol. 8 (1)," 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 2001, pp. 423-425.

表 1-1 S9 mix 非存在下における*N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの  
用量設定試験結果〔直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
陰性対照〔ジメチルスルホキシド〕	115	12	17	24	11
20	104	11	17	26	5
50	107	7	12	31	8
100	105	15	26	24	5
200	95	5	10	19	9
500	86	9	17	29	4
1000	91	8	16	27	6
2000	107 *	10	20	34	8 *
5000	75 *	4 *	19 *	0 *	0 *
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数 /プレート	745	397	754	521	422

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下におけるN, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの  
用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔ジメチルスルホキシド〕	101	14	25	35	19
20	102	9	18	33	16
50	119	6	24	37	11
100	91	9	19	42	11
200	103	8	19	39	12
500	109	10	17	36	12
1000	108	9	16	40	12
2000	90	9	13	24	13
5000	77 *	4 *	18 *	12 *	7 *
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 /プレート	342	109	561	222	77

\* : 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下における *N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果〔本試験1回目-直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	105	10	25	15	12
[ジメチル スルホキシド]	109	13	23	17	6
	117	7	20	27	8
	( 110 $\pm$ 6 )	( 10 $\pm$ 3 )	( 23 $\pm$ 3 )	( 20 $\pm$ 6 )	( 9 $\pm$ 3 )
78 .1	103	--	--	--	5
	94	--	--	--	6
	90	--	--	--	13
	( 96 $\pm$ 7 )	--	--	--	( 8 $\pm$ 4 )
156	98	10	21	19	11
	96	9	21	23	6
	94	10	14	24	11
	( 96 $\pm$ 2 )	( 10 $\pm$ 1 )	( 19 $\pm$ 4 )	( 22 $\pm$ 3 )	( 9 $\pm$ 3 )
313	108	8	16	15	6
	105	11	21	16	9
	86	12	22	19	9
	( 100 $\pm$ 12 )	( 10 $\pm$ 2 )	( 20 $\pm$ 3 )	( 17 $\pm$ 2 )	( 8 $\pm$ 2 )
625	103	5	18	13	10
	103	14	25	16	13
	83	12	19	20	7
	( 96 $\pm$ 12 )	( 10 $\pm$ 5 )	( 21 $\pm$ 4 )	( 16 $\pm$ 4 )	( 10 $\pm$ 3 )
1250	101	15	14	21	13*
	93	7	21	18	8*
	99	13	17	15	7*
	( 98 $\pm$ 4 )	( 12 $\pm$ 4 )	( 17 $\pm$ 4 )	( 18 $\pm$ 3 )	( 9 $\pm$ 3 )
2500	55*	4*	15*	14*	3*
	60*	10*	17*	20*	0*
	95*	3*	26*	6*	6*
	( 70 $\pm$ 22 )	( 6 $\pm$ 4 )	( 19 $\pm$ 6 )	( 13 $\pm$ 7 )	( 3 $\pm$ 3 )
5000	--	4*	9*	2*	--
	--	0*	11*	0*	--
	--	0*	9*	0*	--
	--	( 1 $\pm$ 2 )	( 10 $\pm$ 1 )	( 1 $\pm$ 1 )	--
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	730	336	785	403	412
コロニー数	701	324	855	471	408
/プレート	717	326	811	475	412
	( 716 $\pm$ 15 )	( 329 $\pm$ 6 )	( 817 $\pm$ 35 )	( 450 $\pm$ 40 )	( 411 $\pm$ 2 )

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2 S9 mix 存在下における *N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの  
 復帰突然変異試験結果〔本試験1回目-代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	112	9	20	17	16
[ジメチル スルホキシド]	99	6	30	27	12
	113	7	21	32	16
	(108 $\pm$ 8)	(7 $\pm$ 2)	(24 $\pm$ 6)	(25 $\pm$ 8)	(15 $\pm$ 2)
156	107	9	15	30	14
	89	8	16	20	13
	115	5	15	32	11
	(104 $\pm$ 13)	(7 $\pm$ 2)	(15 $\pm$ 1)	(27 $\pm$ 6)	(13 $\pm$ 2)
313	88	6	16	23	15
	89	8	25	36	21
	102	7	28	25	8
	(93 $\pm$ 8)	(7 $\pm$ 1)	(23 $\pm$ 6)	(28 $\pm$ 7)	(15 $\pm$ 7)
625	99	9	23	24	10
	94	8	16	25	14
	92	8	21	27	10
	(95 $\pm$ 4)	(8 $\pm$ 1)	(20 $\pm$ 4)	(25 $\pm$ 2)	(11 $\pm$ 2)
1250	103	6	31	21	16
	114	3	18	28	14
	120	7	24	24	12
	(112 $\pm$ 9)	(5 $\pm$ 2)	(24 $\pm$ 7)	(24 $\pm$ 4)	(14 $\pm$ 2)
2500	102*	6*	23*	25*	10*
	108*	3*	20*	23*	12*
	93*	6*	19*	12*	11*
	(101 $\pm$ 8)	(5 $\pm$ 2)	(21 $\pm$ 2)	(20 $\pm$ 7)	(11 $\pm$ 1)
5000	8*	0*	14*	7*	0*
	54*	0*	16*	4*	0*
	0*	0*	14*	19*	1*
	(21 $\pm$ 29)	(0 $\pm$ 0)	(15 $\pm$ 1)	(10 $\pm$ 8)	(0 $\pm$ 1)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	402	135	439	252	100
コロニー数	434	147	463	208	94
/プレート	390	145	491	254	96
	(409 $\pm$ 23)	(142 $\pm$ 6)	(464 $\pm$ 26)	(238 $\pm$ 26)	(97 $\pm$ 3)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1 S9 mix 非存在下におけるN, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの  
 復帰突然変異試験結果〔本試験2回目-直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	102	5	17	18	7
[ジメチル スルホキシド]	104	10	17	14	5
	96	6	17	20	5
	(101 $\pm$ 4)	(7 $\pm$ 3)	(17 $\pm$ 0)	(17 $\pm$ 3)	(6 $\pm$ 1)
78 .1	102	--	--	--	8
	95	--	--	--	6
	116	--	--	--	6
	(104 $\pm$ 11)	--	--	--	(7 $\pm$ 1)
156	92	14	11	9	5
	98	8	21	14	7
	116	7	16	20	4
	(102 $\pm$ 12)	(10 $\pm$ 4)	(16 $\pm$ 5)	(14 $\pm$ 6)	(5 $\pm$ 2)
313	105	13	27	19	6
	115	4	22	21	10
	98	9	22	13	8
	(106 $\pm$ 9)	(9 $\pm$ 5)	(24 $\pm$ 3)	(18 $\pm$ 4)	(8 $\pm$ 2)
625	115	7	20	15	4
	89	8	14	15	6
	104	16	19	22	6
	(103 $\pm$ 13)	(10 $\pm$ 5)	(18 $\pm$ 3)	(17 $\pm$ 4)	(5 $\pm$ 1)
1250	85	9	14	8	4*
	104	7	11	27	4*
	112	9	15	17	4*
	(100 $\pm$ 14)	(8 $\pm$ 1)	(13 $\pm$ 2)	(17 $\pm$ 10)	(4 $\pm$ 0)
2500	71*	10*	17*	17*	9*
	66*	6*	10*	17*	4*
	62*	4*	15*	12*	6*
	(66 $\pm$ 5)	(7 $\pm$ 3)	(14 $\pm$ 4)	(15 $\pm$ 3)	(6 $\pm$ 3)
5000	--	3*	16*	3*	--
	--	3*	11*	5*	--
	--	5*	8*	3*	--
	--	(4 $\pm$ 1)	(12 $\pm$ 4)	(4 $\pm$ 1)	--
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	676	373	822	532	605
コロニー数	663	399	836	509	586
/プレート	705	400	816	503	751
	(681 $\pm$ 22)	(391 $\pm$ 15)	(825 $\pm$ 10)	(515 $\pm$ 15)	(647 $\pm$ 90)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 3-2 S9 mix 存在下における *N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの  
 復帰突然変異試験結果[本試験2回目-代謝活性化法]

用 量 [ $\mu$ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	103	8	23	21	13
[ジメチル スルホキシド]	96	11	28	21	15
	93	10	22	26	10
	( 97 $\pm$ 5 )	( 10 $\pm$ 2 )	( 24 $\pm$ 3 )	( 23 $\pm$ 3 )	( 13 $\pm$ 3 )
156	99	7	21	25	11
	126	8	20	29	9
	126	10	27	22	15
	( 117 $\pm$ 16 )	( 8 $\pm$ 2 )	( 23 $\pm$ 4 )	( 25 $\pm$ 4 )	( 12 $\pm$ 3 )
313	106	5	18	29	12
	120	8	26	24	8
	110	9	20	22	9
	( 112 $\pm$ 7 )	( 7 $\pm$ 2 )	( 21 $\pm$ 4 )	( 25 $\pm$ 4 )	( 10 $\pm$ 2 )
625	102	8	17	13	12
	91	10	20	25	17
	95	9	18	23	15
	( 96 $\pm$ 6 )	( 9 $\pm$ 1 )	( 25 $\pm$ 2 )	( 20 $\pm$ 6 )	( 15 $\pm$ 3 )
1250	106	9	25	33	12
	87	9	17	33	10
	97	8	17	31	13
	( 97 $\pm$ 10 )	( 9 $\pm$ 1 )	( 20 $\pm$ 5 )	( 32 $\pm$ 1 )	( 12 $\pm$ 2 )
2500	80 *	7 *	14 *	20 *	9 *
	82 *	7 *	12 *	26 *	5 *
	93 *	10 *	12 *	19 *	14 *
	( 85 $\pm$ 7 )	( 8 $\pm$ 2 )	( 13 $\pm$ 1 )	( 22 $\pm$ 4 )	( 9 $\pm$ 5 )
5000	71 *	2 *	13 *	15 *	1 *
	79 *	2 *	6 *	7 *	2 *
	58 *	1 *	7 *	0 *	6 *
	( 69 $\pm$ 11 )	( 2 $\pm$ 1 )	( 9 $\pm$ 4 )	( 7 $\pm$ 8 )	( 3 $\pm$ 3 )
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	374	165	420	221	85
コロニー数	396	168	427	212	90
/プレート	401	170	441	255	82
	( 390 $\pm$ 14 )	( 168 $\pm$ 3 )	( 429 $\pm$ 11 )	( 229 $\pm$ 23 )	( 86 $\pm$ 4 )

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

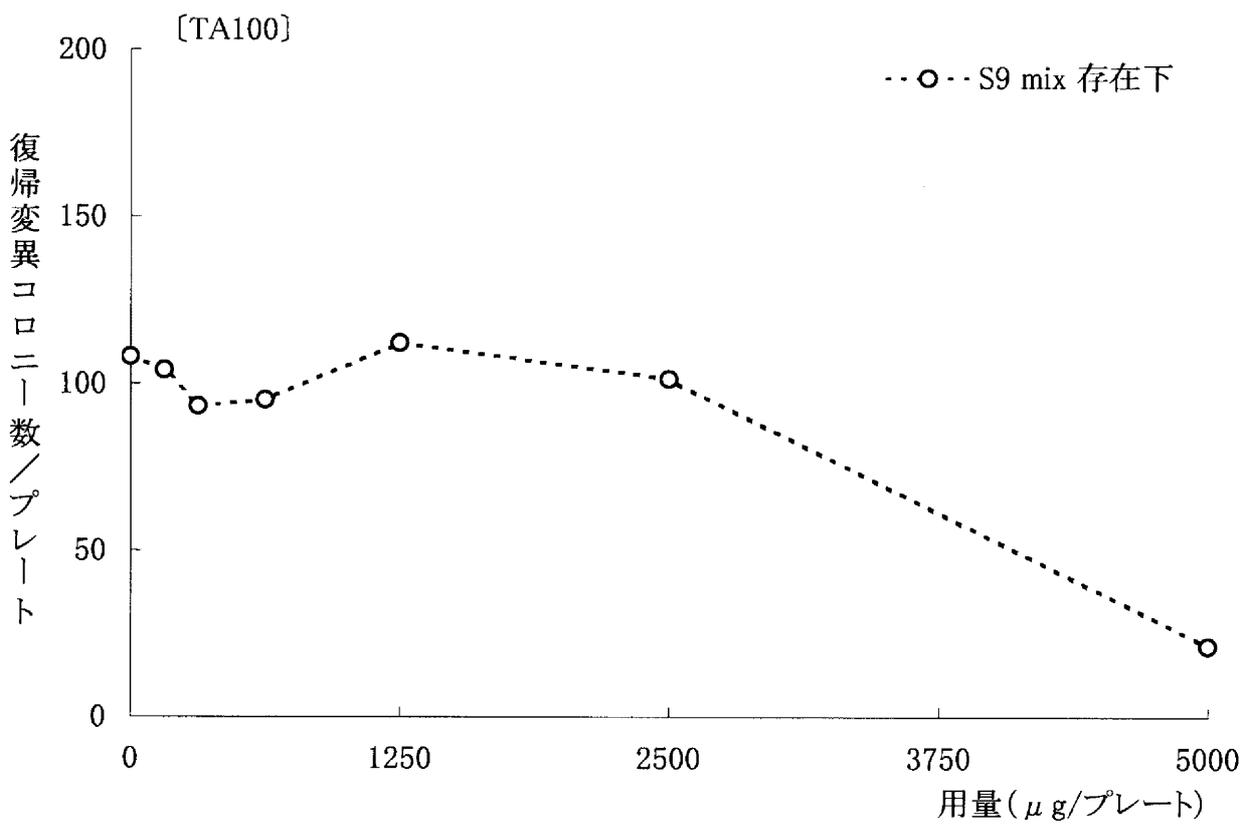
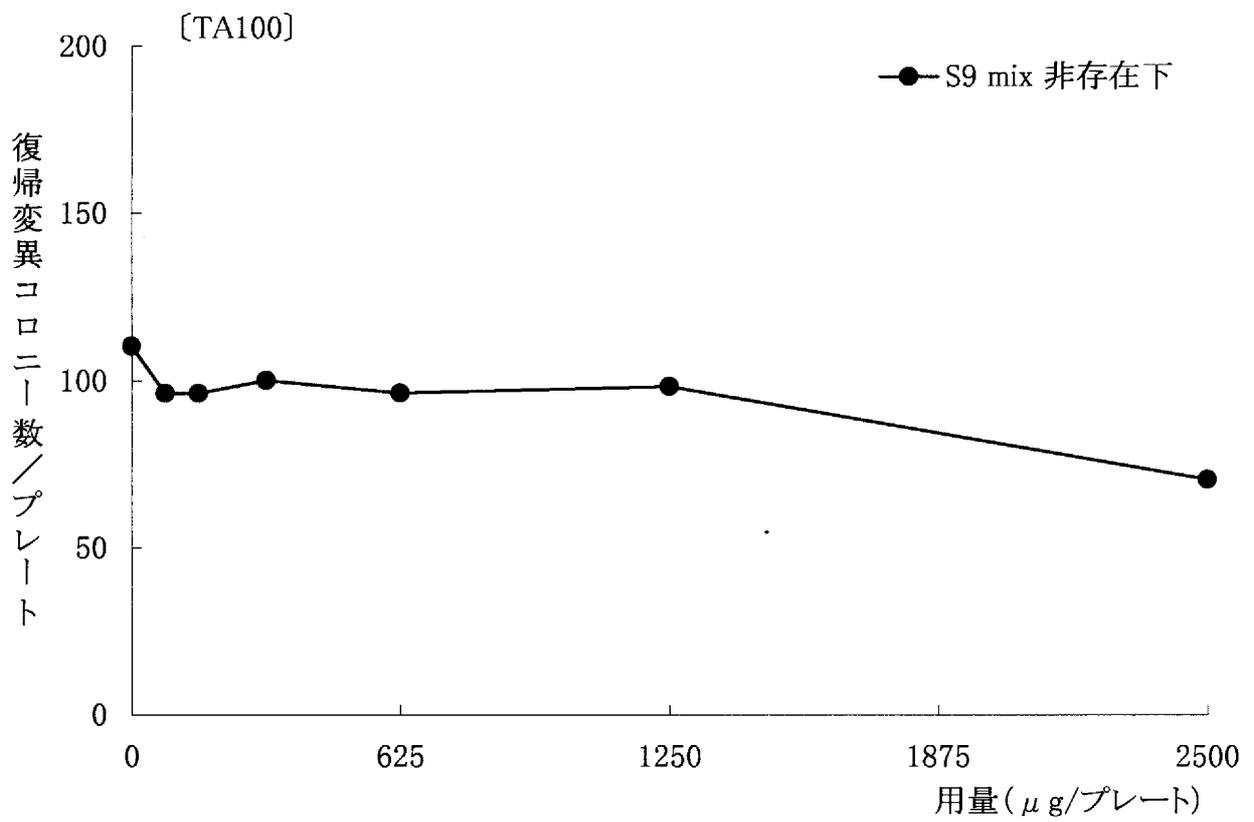


図 1-1  $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

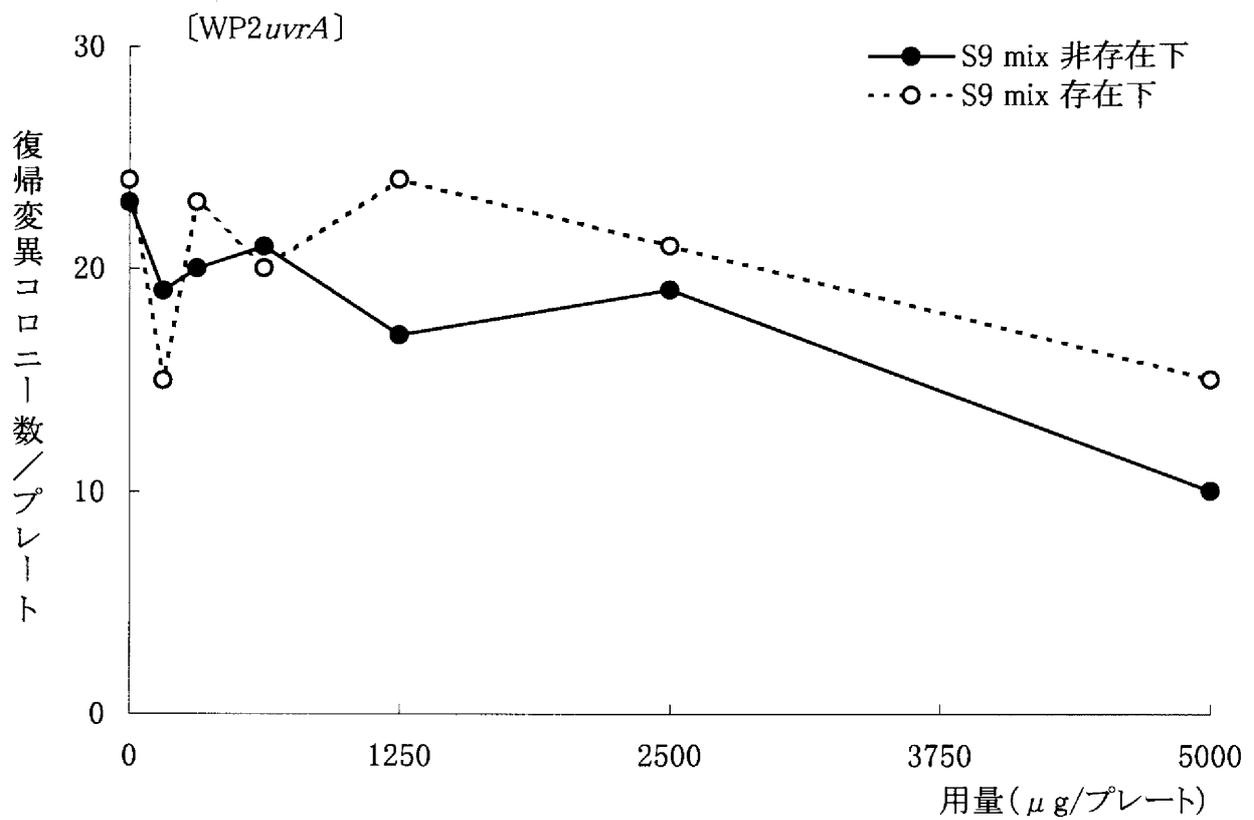
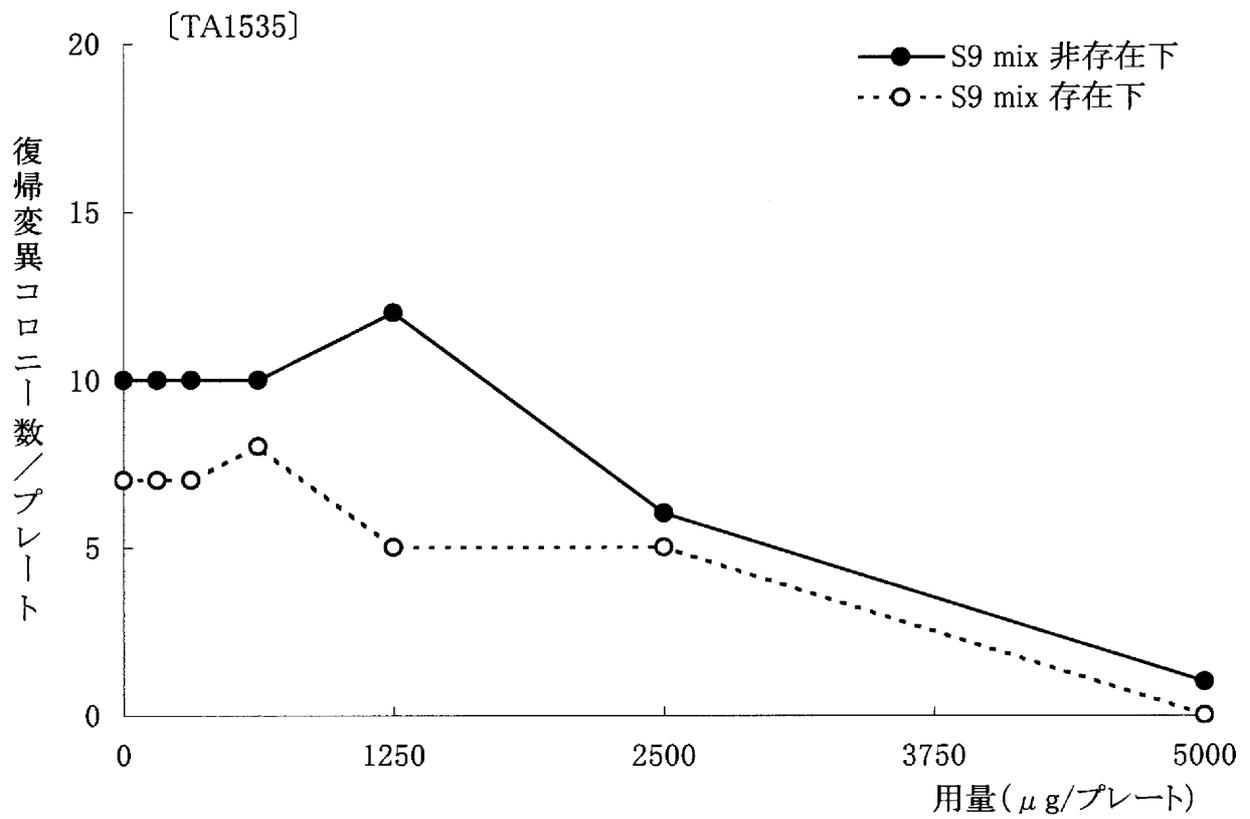


図 1-2  $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

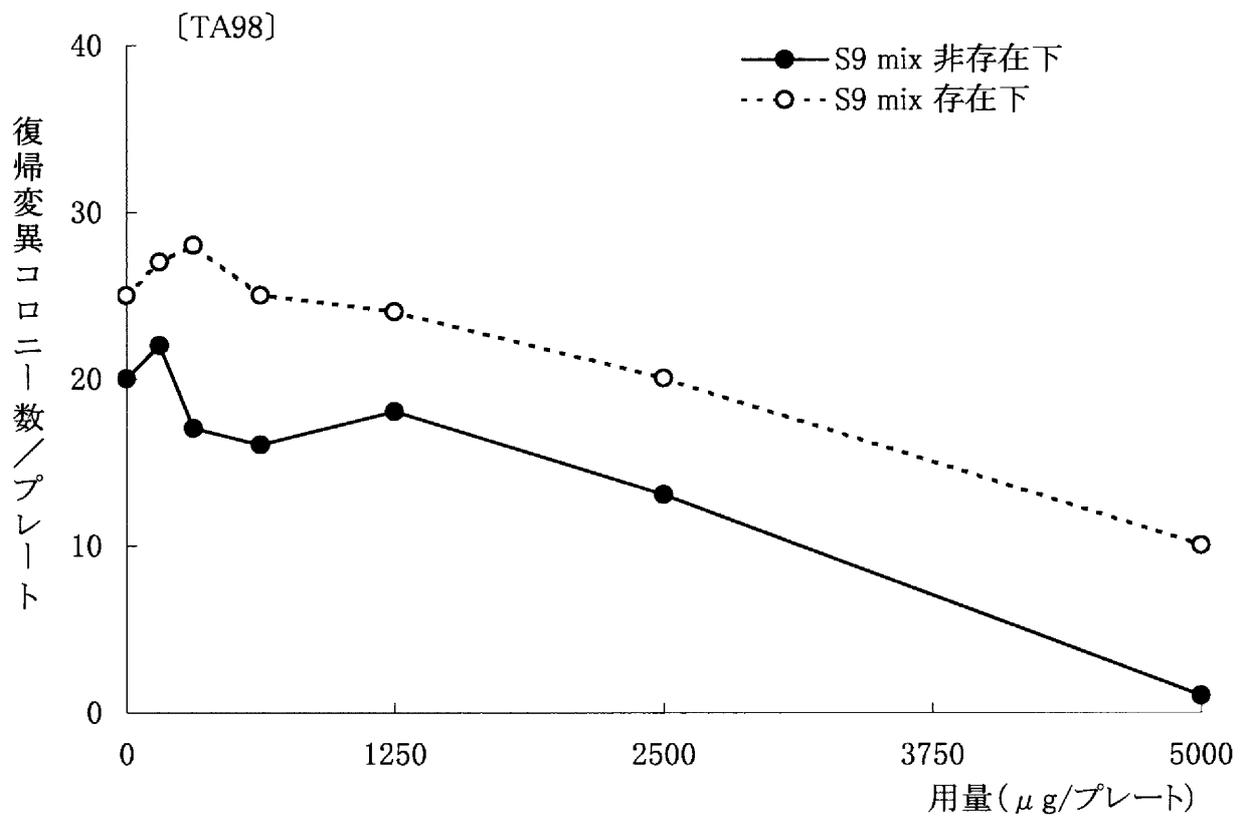


図 1-3 *N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

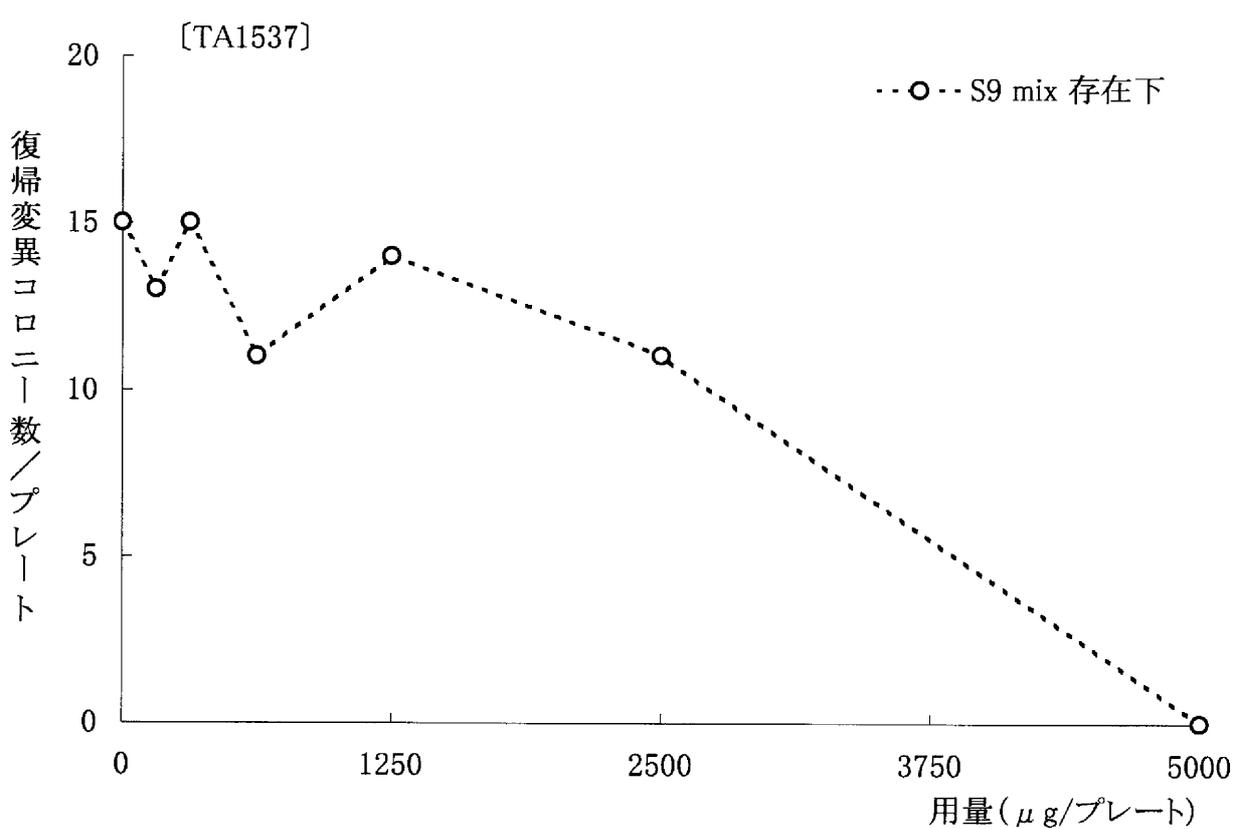
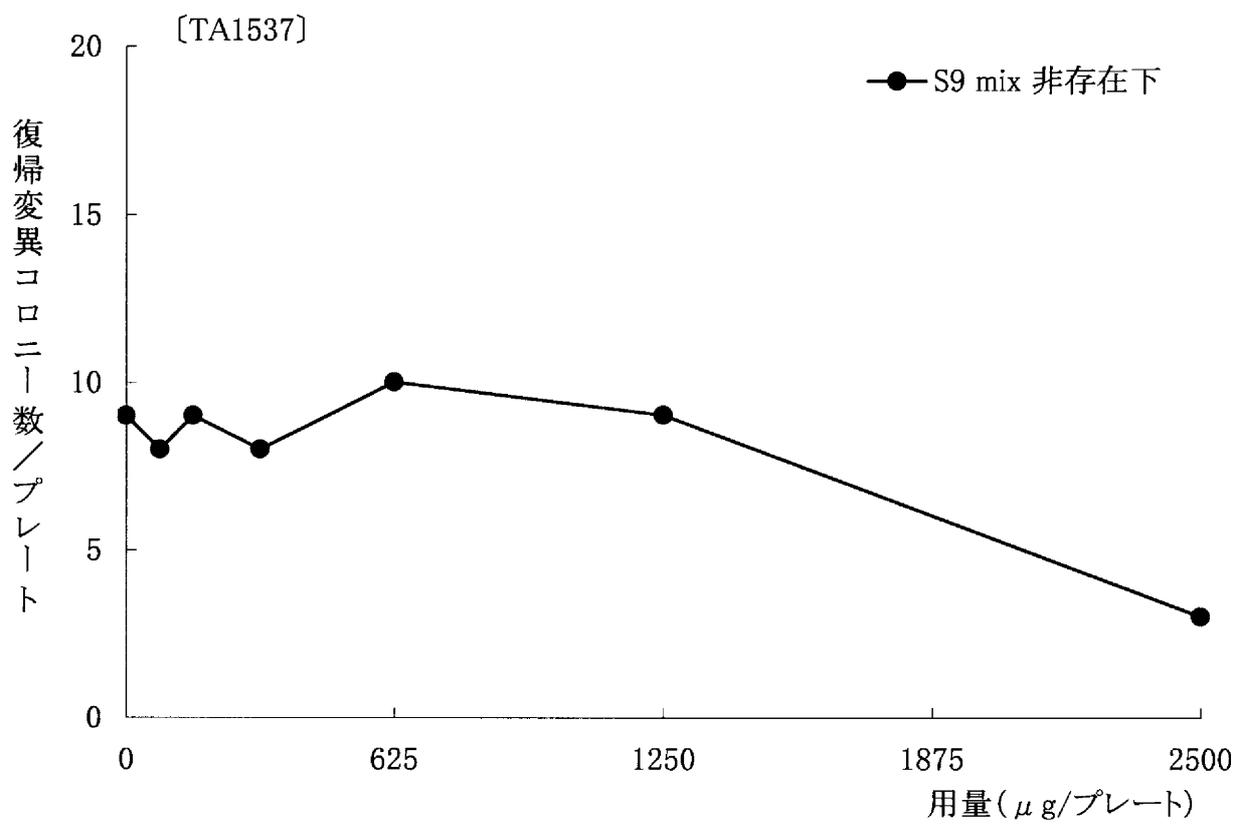


図 1-4 *N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

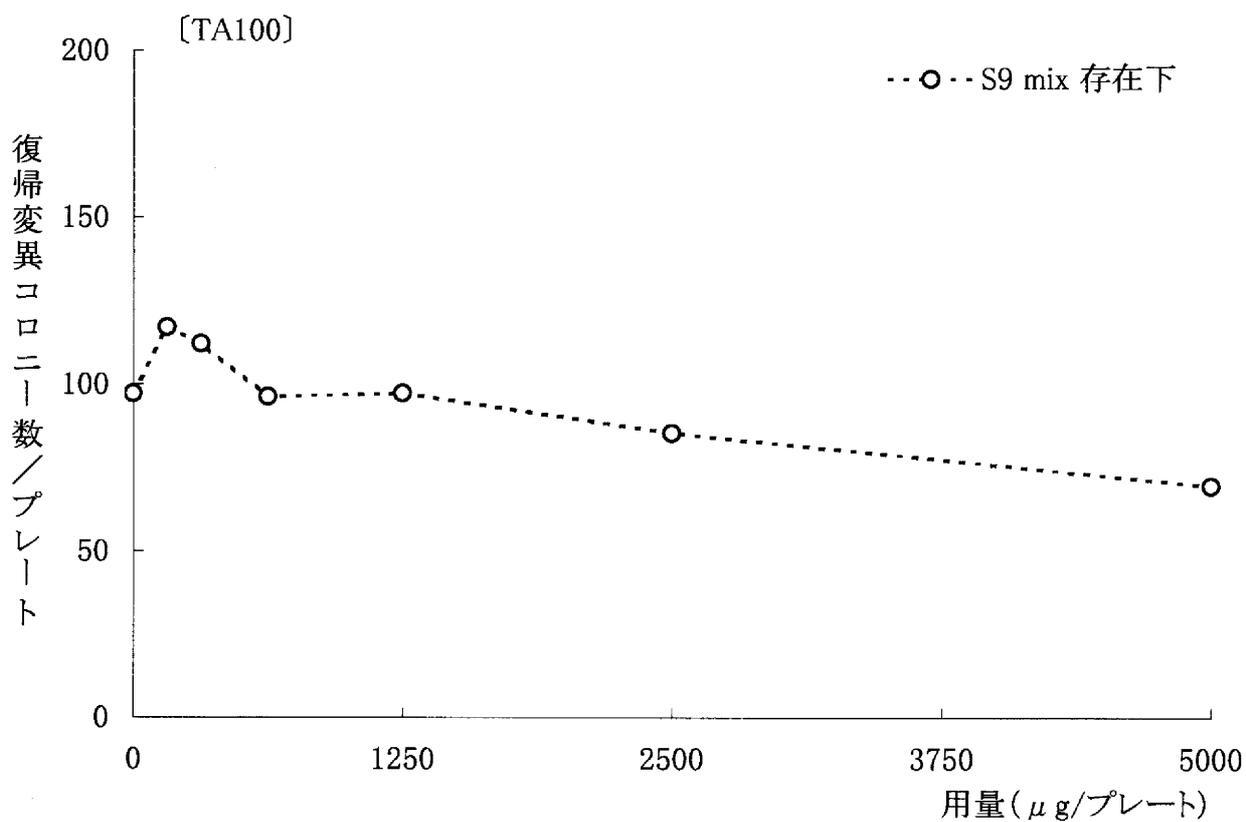
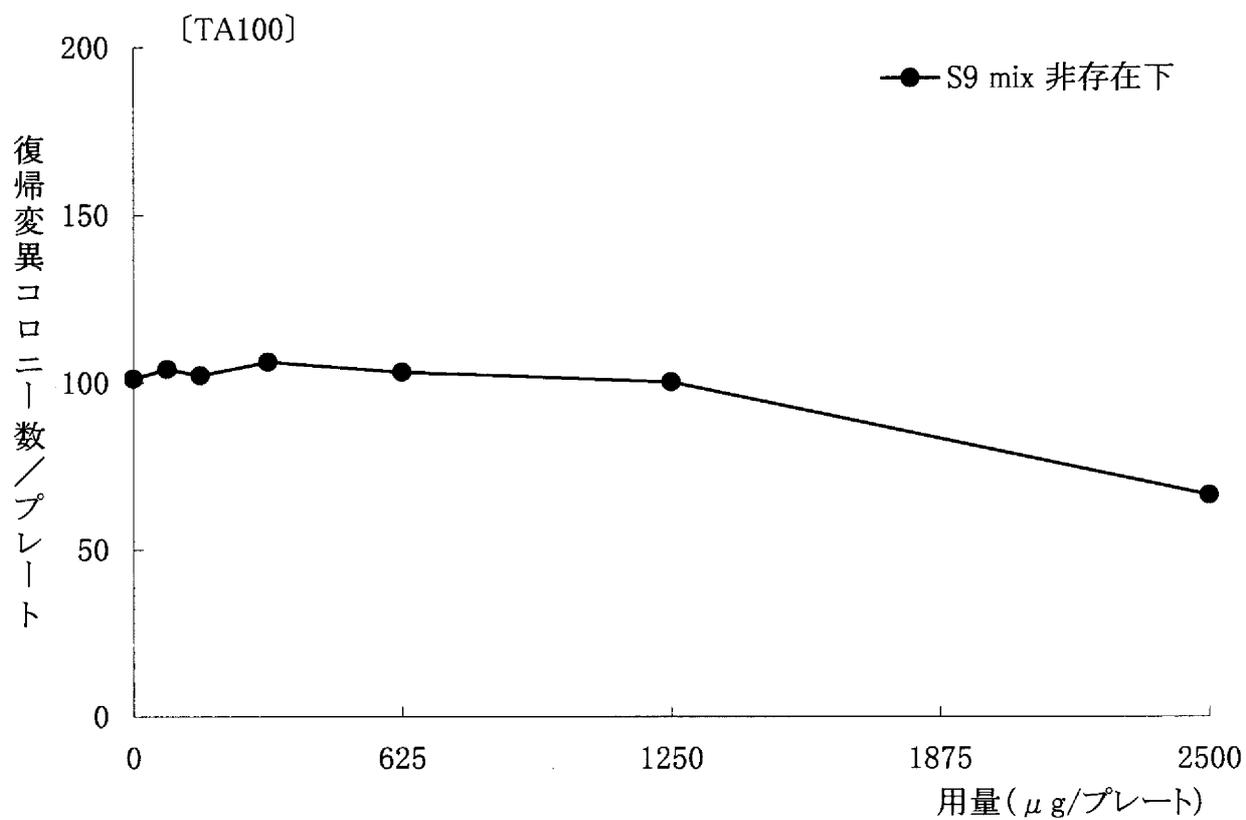


図 2-1  $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

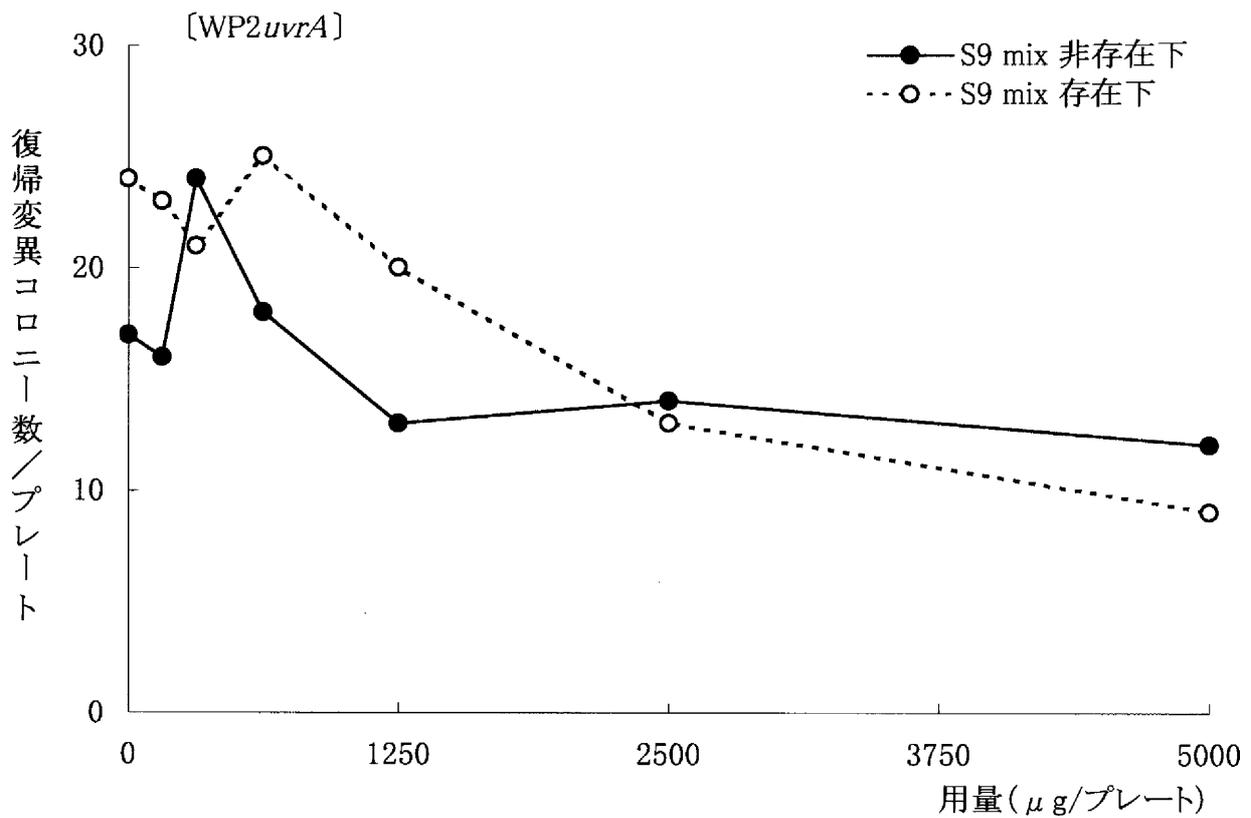
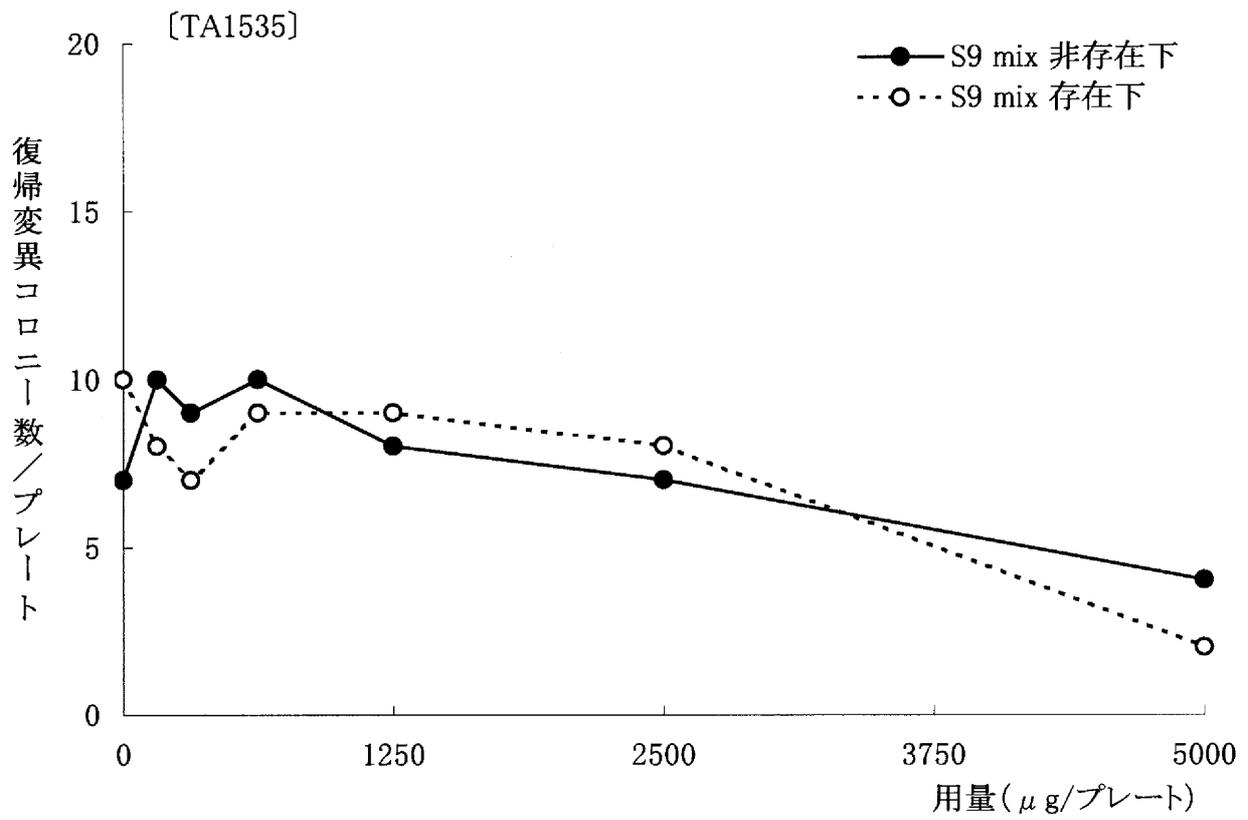


図 2-2  $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

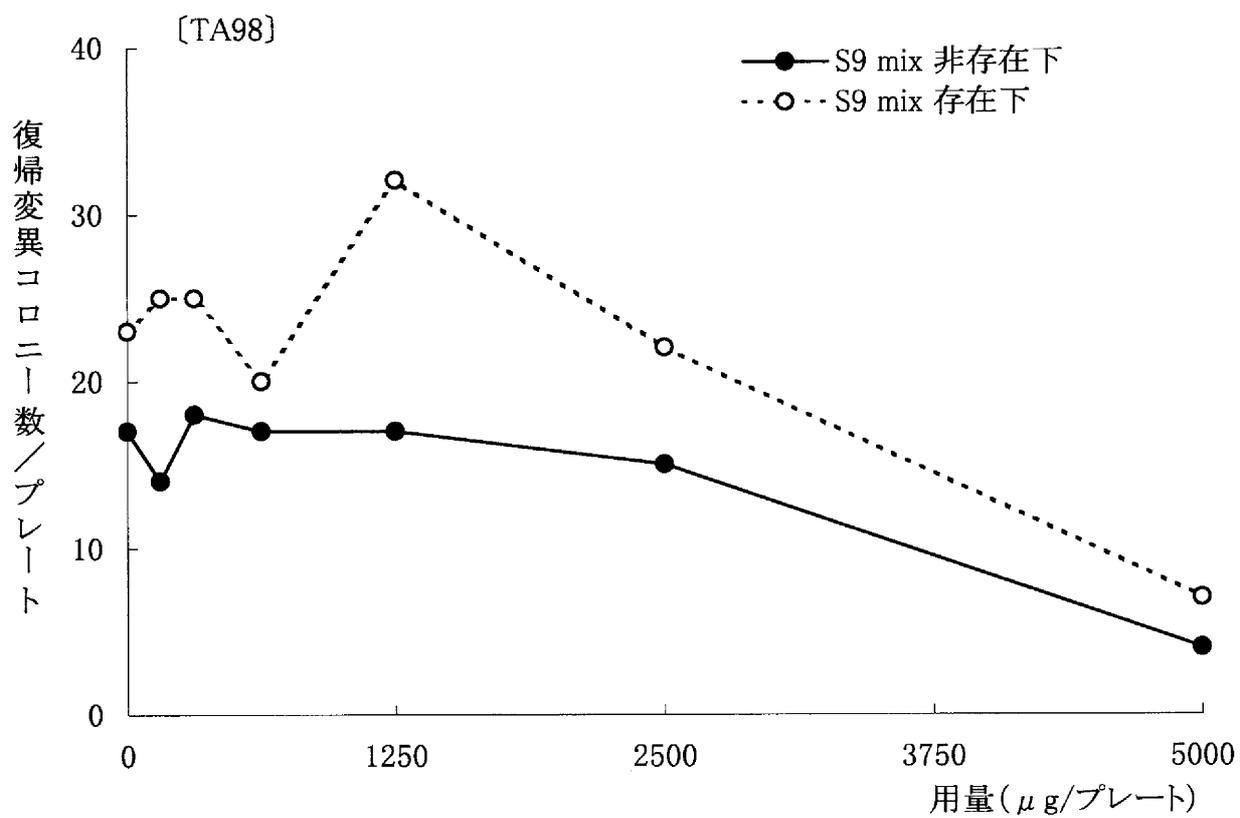


図 2-3  $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

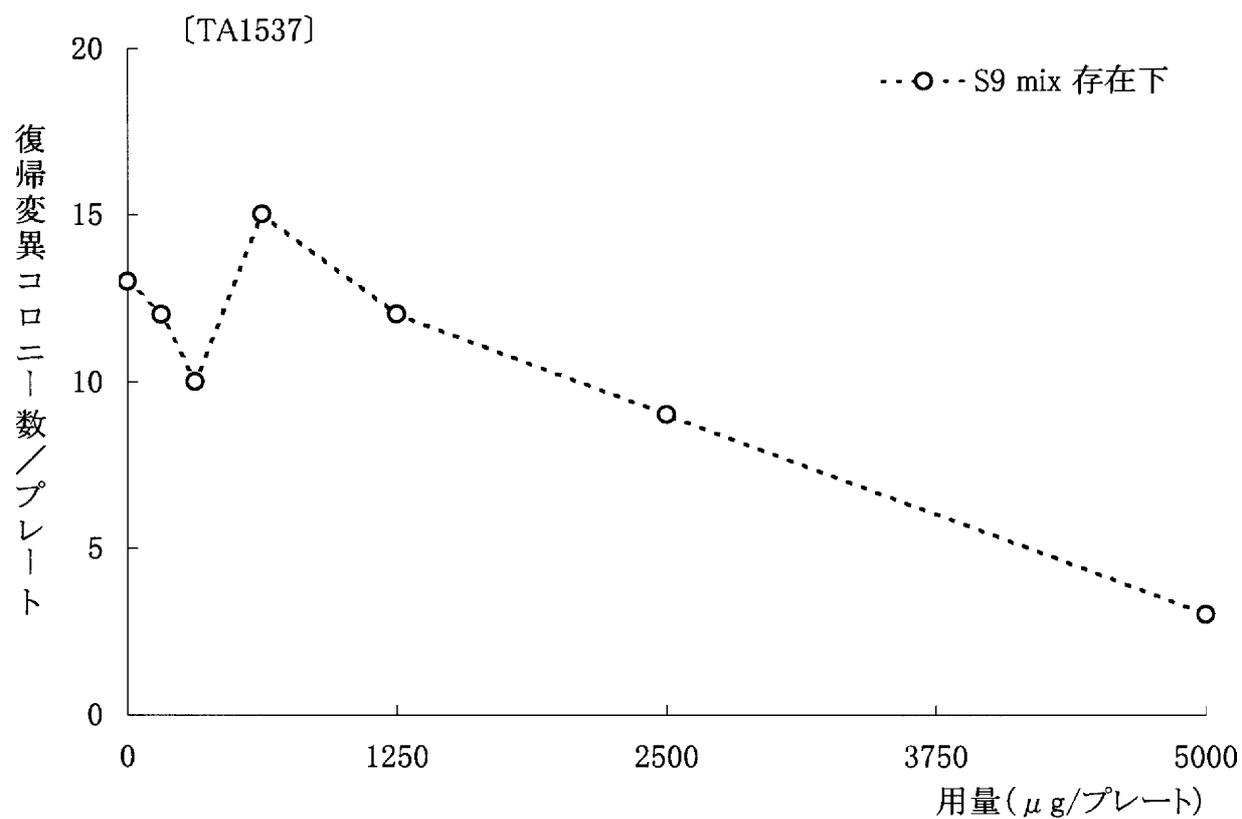
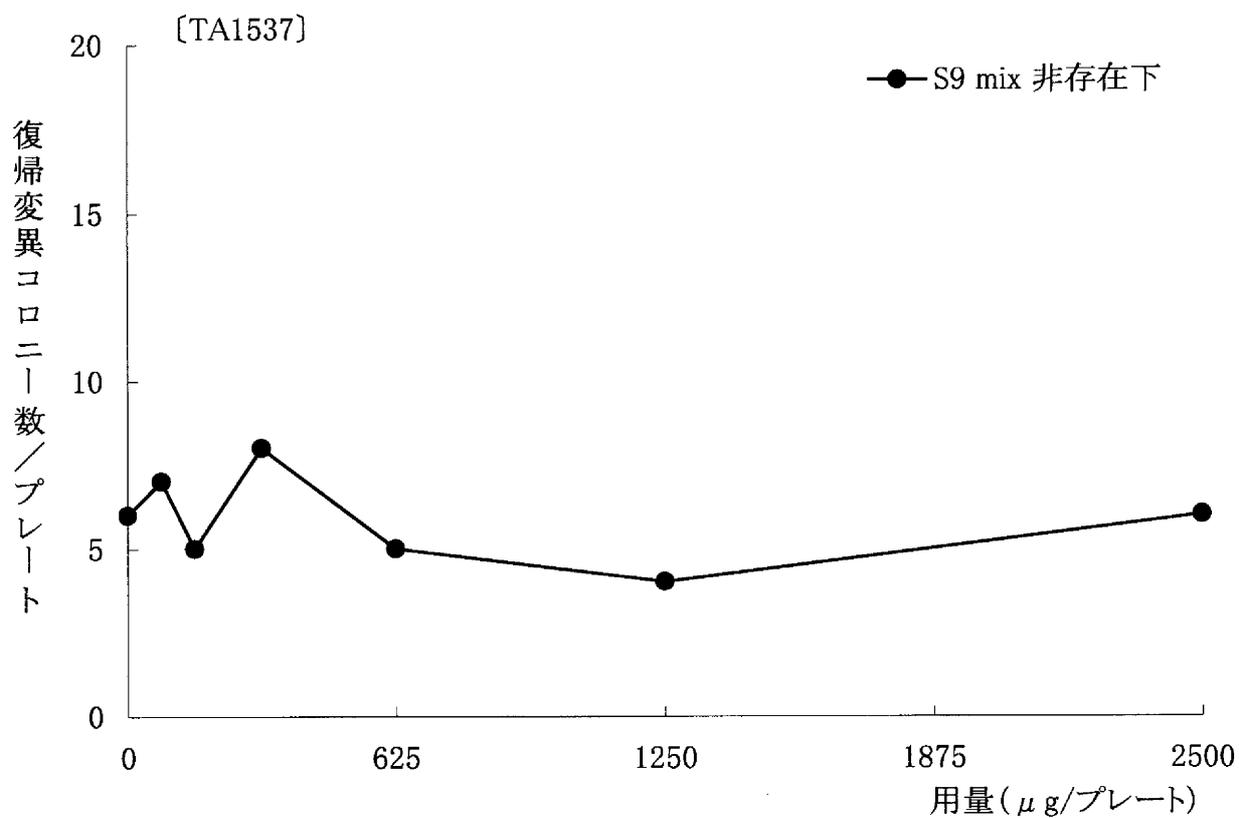


図 2-4  $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目