

# 最終報告書

*N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの  
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験  
(試験番号: 01-285)

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. 対照物質 .....	3
3. 溶媒 .....	3
4. 試験細胞株 .....	3
5. 培養液 .....	4
6. 培養条件 .....	4
7. S9 mix .....	4
8. 細胞増殖抑制試験 .....	5
1) 被験物質の供試液の調製 .....	5
2) 細胞の処理 .....	5
3) 細胞増殖率の測定 .....	6
9. 染色体異常試験 .....	7
1) 被験物質および陽性対照物質の用量 .....	7
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製 .....	7
3) 細胞の処理 .....	7
4) 試験群の構成および使用シャーレ数 .....	8
5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定 .....	8
6) 染色体の観察 .....	9
7) 染色体異常の分類および集計 .....	9
8) 試験結果の判定 .....	9
結果 .....	10
1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下） .....	10
2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下） .....	10
3. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）－確認試験 .....	10
4. D <sub>20</sub> 値 .....	11
結論および参考事項 .....	12

参考文献	12
表：	
表1-1 $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの染色体異常試験 結果(短時間処理法：S9 mix 非存在下)	14
表1-2 $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの染色体異常試験 結果(短時間処理法：S9 mix 存在下)	15
表2 $N, N'$ -ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの染色体異常試験 結果(短時間処理法：S9 mix 存在下) - 確認試験	16
図：	
図1 構造異常を有する細胞の出現頻度	17
図2 数的異常を有する細胞の出現頻度	18

## 要約

*N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いて *In vitro* における短時間処理法による染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、37.5~2400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、S9 mix 非存在および存在下ともに 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における用量は、75, 150, 300, 450 および 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

試験の結果、S9 mix 存在下の 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。400, 600 および 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量を設定して行った S9 mix 存在下の確認試験においても 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で染色体構造異常細胞の有意な増加が確認され、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

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 CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本被験物質の  $D_{20}$  値は 2.73 mg/mL であった。

## 試験目的

この試験は、*N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常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 :

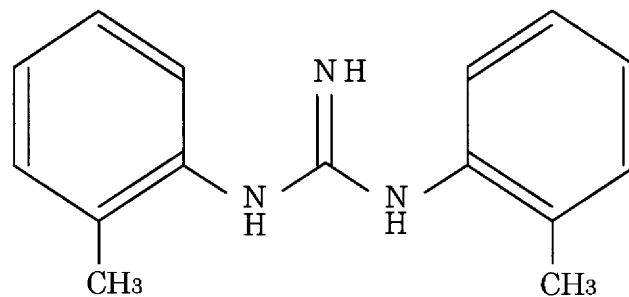
入 手 日 : 平成 14 年 4 月 24 日

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. 対照物質

陰性対照物質は、被験物質の溶媒として使用した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 DWH7397，100%) を用いた。陽性対照物質は、短時間処理法 S9 mix 非存在下では 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG，Aldrich Chemical Company，ロット番号 00613PN，純度 97%) を，S9 mix 存在下では 3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P，Sigma Chemical Company，ロット番号 57F-3434，純度 98%) を用いた。

## 3. 溶媒

被験物質は水に不溶であり，予備的検討の結果，DMSO に可溶 (240mg/mL) であったことから，溶媒には DMSO を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P については，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 DWP7008：純度 99.9%，ロット番号 DWH7397：純度 100%) を用いた。

## 4. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 (元：国立衛生試験所 変異原性部) から昭和 60 年 1 月 13 日に分与を受けたチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/ IU) を使用した。供試細胞は，細胞懸濁液に 10% の割合で DMSO を添加し，液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し，解凍後の継代数が 4 回までのものを使用した。

## 5. 培養液

Eagle-MEM 粉末培地 (Gibco Laboratories, ロット番号 1095488, 1127566) を常法に従い調製し, これに非動化 (56°C, 30 分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 1116523, 1129825) を 10% の割合で添加したものをを用いた。

## 6. 培養条件

供試細胞は, CO<sub>2</sub> インキュベーター (Napco 社) を用い, CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 空気 95%, 温度 37°C, 加湿条件下で培養した。

## 7. S9 mix

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ものをキッコーマン株式会社から購入 (ロット番号: CAM-470, 2002 年 9 月 13 日製造, 2002 年 10 月 23 日購入) し, -80°C 以下で保存したものを, 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: 212~238g

#### 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×g) し, その上清を採取

### S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3	mL
MgCl <sub>2</sub>	5	μmol/0.1 mL
KCl	33	μmol/0.1 mL
G-6-P	5	μmol/0.1 mL
NADP	4	μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4	μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1	mL

## 8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、短時間処理法および連続処理法ともに 37.5, 75, 150, 300, 600, 1200 および 2400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (10 mM 相当) の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。試験には各用量について 2 枚のシャーレを使用した。

### 1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に懸濁して最高用量の供試液 (原液) を調製し、次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液 (最高用量以外、すべて溶解液) を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

### 2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に  $4 \times 10^5$  個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO (陰性対照) または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新鮮培養液で細胞表面を 1 回洗浄し、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

なお、短時間処理法および連続処理法ともに 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量では、被験物質の供試液を培養液中に添加すると直ちに粒状またはうろこ様の被験物質の析出が認められ、所定の培養時間終了時においては、短時間処理法の 2400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および連続処理法 24 時間の 2400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  用量でのみ被験物質のわずかな残存が認められた。



### 3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計（モノセレーターII，MI-60，オリンパス光学工業株式会社）を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合は、600 $\mu$ g/mL 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は 300~600 $\mu$ g/mL の用量域にあると判断された。連続処理法の場合は、24 時間処理では 150 $\mu$ g/mL 以上、48 時間処理では 75 $\mu$ g/mL 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制はそれぞれ 75~150 $\mu$ g/mL および 37.5~75 $\mu$ g/mL の用量域にあるものと判断された。

#### 〔短時間処理法〕

用 量 ( $\mu$ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
37.5	96	102	[ 99.0 ]	95	96	[ 95.5 ]
75	103	96	[ 99.5 ]	105	109	[ 107.0 ]
150	98	98	[ 98.0 ]	105	104	[ 104.5 ]
300	79	94	[ 86.5 ]	95	97	[ 96.0 ]
600	17	22	[ 19.5 ]	46	40	[ 43.0 ]
1200	0	9	[ 4.5 ]	25	19	[ 22.0 ]
2400	10	14	[ 12.0 ]	23	21	[ 22.0 ]

[ ]: 平均値

#### 〔連続処理法〕

用 量 ( $\mu$ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
37.5	79	76	[ 77.5 ]	85	84	[ 84.5 ]
75	61	61	[ 61.0 ]	37	31	[ 34.0 ]
150	39	34	[ 36.5 ]	12	2	[ 7.0 ]
300	17	15	[ 16.0 ]	8	5	[ 6.5 ]
600	8	7	[ 7.5 ]	7	7	[ 7.0 ]
1200	6	10	[ 8.0 ]	3	5	[ 4.0 ]
2400	9	11	[ 10.0 ]	7	4	[ 5.5 ]

[ ]: 平均値

## 9. 染色体異常試験

### 1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は、50%細胞増殖抑制用量の前  
後が含まれ、かつ、3用量以上のデータが得られることを考慮して設定した。す  
なわち、短時間処理法において600 $\mu$ g/mLを最高用量とし、以下公比2で300、  
150および75 $\mu$ g/mLの4用量、並びに300 $\mu$ g/mLと600 $\mu$ g/mL間で細胞増殖  
率に急激な変化が認められたことを考慮して、その中間量の450 $\mu$ g/mLを加え  
た計5用量とした。陽性対照物質のMNNGは2.5 $\mu$ g/mL、B[a]Pは10 $\mu$ g/mL  
の用量を用いた。

### 2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質をDMSOに溶解して最高用量の供試  
液を調製した。次いで、原液の一部をDMSOで順次希釈し、所定用量の供試液  
を調製した。陽性対照物質のMNNGは0.5 mg/mL、B[a]Pは2.0 mg/mLの供  
試液を調製した。

### 3) 細胞の処理

4 $\times$ 10<sup>3</sup>個/mLの細胞を含む培養液5 mLを直径6 cmの円形プラスチック製  
シャーレ (Becton Dickinson 社) に加え、3日間培養後、下記の方法で処理し  
た。培養には1用量当たり4枚のシャーレを用い、そのうち2枚は染色体標本作  
製用に、残りの2枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群につい  
ては細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製の2枚とし  
た。

短時間処理法のS9 mix非存在下の場合は、各シャーレとも3 mLを残して培  
養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液およびMNNGの供試液をそれぞれ  
0.015 mLずつ各シャーレに添加して培養した。また、S9 mix存在下の場合は、  
各シャーレとも2.5 mLを残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mLを加え、  
続いて、DMSO、被験物質供試液およびB[a]Pの供試液をそれぞれ0.015 mLず  
つ各シャーレに添加して培養した。S9 mix非存在および存在下のいずれの場合  
も、培養6時間後に培養液を取り除き、新鮮培養液で細胞表面を1回洗浄し、新  
しい培養液5 mLを加え、さらに18時間培養した。

#### 4) 試験群の構成および使用シャーレ数

〔短時間処理法〕

用量( $\mu\text{g/mL}$ )	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) <sup>a</sup>	4	4
75	4	4
150	4	4
300	4	4
450	4	4
600	4	4
2 (陽性対照) <sup>b</sup>	2	--
10 (陽性対照) <sup>c</sup>	--	2

a : DMSO, b : MNNG, c : B[a]P, 使用シャーレ数 : 52

#### 5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の2時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド(Gibco Laboratories, ロット番号 1114485, 1125546)を最終濃度として $0.2\mu\text{g/mL}$ となるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、 $0.2\text{w/v}\%$ トリブシン水溶液2 mLで処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液5 mLを入れた遠沈管に移し、 $1000\text{rpm}$ 、5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の $75\text{mM}$ 塩化カリウム水溶液4 mLを加えて懸濁し、 $37^\circ\text{C}$ で15分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液(v/v)1 mLを添加して固定した。 $1000\text{rpm}$ で5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液4 mLで懸濁・固定した。この操作を3回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの2ヶ所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、S $\phi$ rensen 緩衝液(pH6.8, 株式会社ヤトロン, ロット番号 1478)を用いて希釈した $1.4\text{vol}\%$ ギムザ液で約15分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本とした。標本は、1シャーレ当たり3枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を2回洗浄し、 $10\text{vol}\%$ ホルマリン水溶液を加えて約10分間固定した。固定後水洗し、 $0.1\text{w/v}\%$ クリスタルバイオレット水溶液で約10分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計(モノセレーターII, MI-60, オリンパス光学工業株式会社)を用いて陰性(溶媒)対照群の細胞増殖率を100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

## 6) 染色体の観察

染色体の観察は 60 倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600 倍で検鏡した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が  $25 \pm 2$  本の分裂中期像について、1 シャーレ当たり 100 個、すなわち、1 用量当たり 2 枚のシャーレの合計 200 個について観察した。

## 7) 染色体異常の分類および集計<sup>3)</sup>

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

## 8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料  $\chi^2$  検定を行って、有意差（有意水準 5% 以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5% または 1% を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、陰性対照群と比較して、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が 2 用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。なお、単一用量でのみ有意な増加が認められた場合は、それに近い用量を用いて確認試験を行い、その結果、再現性のある結果が認められた場合には、染色体異常誘発性は陽性とした。

## 結 果

### 1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 2.0%と低値であった。被験物質群では 0.5~4.0%の範囲の出現頻度であり、陰性対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 97.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体については、陰性対照群では 0.5%の低い出現頻度で認められた。被験物質群では 0~1.0%の範囲の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では、倍数体は認められなかった。

なお、600  $\mu\text{g/mL}$  用量では被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

### 2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.5%と低値であった。被験物質群では 75, 150, 300, 450 および 600  $\mu\text{g/mL}$  でそれぞれ 0.5, 0, 0.5, 0.5 および 7.0%の出現頻度で認められ、600  $\mu\text{g/mL}$  の出現頻度は陰性対照群と比べて有意に増加した。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 55.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群においては、0~1.5%の範囲の低い出現頻度で認められた。

### 3. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下—確認試験）

短時間処理法 S9 mix 存在下において、1 用量（600  $\mu\text{g/mL}$ ）でのみ構造異常を有する細胞の有意な増加が認められたため、400, 600 および 800  $\mu\text{g/mL}$  の 3 用量を設定し、短時間処理法 S9 mix 存在下による確認試験を行った。

結果は表 2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。被験物質群では 400 および 600  $\mu\text{g/mL}$  でそれぞれ 2.5

および 9.0%の出現頻度で認められ、600 $\mu$ g/mL でのみ出現頻度の有意な増加が確認された。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 52.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では 0.5%の低い出現頻度であった。被験物質群では、1.0 および 2.5%の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では、倍数体は認められなかった。

なお、800 $\mu$ g/mL では細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

#### 4. D<sub>20</sub> 値<sup>4)</sup>

短時間処理法 S9 mix 存在下において、陽性値を示す染色体構造異常細胞の増加が認められたため、D<sub>20</sub> 値〔分裂中期像の 20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量 (mg/mL)〕を算出した。

その結果は次表に示したとおりであり、S9 mix 存在下の構造異常に関する D<sub>20</sub> 値は、S 値が最も小さい 2.73 mg/mL を採用した。

短時間処理法	回帰曲線	D <sub>20</sub> 値 ( $\mu$ g/mL)	S 値 $\left[ S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right]$
S9 mix 存在下	y = 0.074386x - 0.285965 (r = 0.646855)	<u>2727.12</u>	<u>117.11</u>
	y = 2.74759x - 4.56528 (r = 0.461773)	8.72323 × 10 <sup>8*</sup>	5.24743 × 10 <sup>7</sup>
S9 mix 存在下 〔確認試験〕	y = 0.0128571x - 0.285712 (r = 0.883851)	1577.78	198.346
	y = 24.1366x - 58.8047 (r = 0.956351)	1840.57	213.842

S 値：対象となった D<sub>20</sub> 値のうち、相関係数 r が大きく、陰性対照群を含む群数 n が多いものほどより妥当性が高いとする考えに基づく指標。

\* : D<sub>20</sub> 値が最高用量の 10 倍以上の値を示し、用量依存性がないものとして対象外とした。

## 結論および参考事項

*N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの変異原性については *Salmonella 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>1)</sup>と報告されている。

*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>1)</sup>、*S. typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>2)</sup>、CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験で陰性<sup>3)</sup>と報告されている。

今回、*N, N'*-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンについて染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 存在下において染色体構造異常細胞の有意な増加が認められ、結果の再現性も確認された。

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 CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本被験物質の染色体の構造異常誘発に関する  $D_{20}$  値は、S9 mix 存在下において 2.73 mg/mL であった。本試験結果は、CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とする生物学的判断基準<sup>4)</sup>からすると疑陽性と判断されるものであった。

なお、試験を通して顕著な細胞周期の遅延が疑われる所見は認められなかったため、連続処理法 48 時間処理などの確認試験は行わなかった。

## 参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, **48**, 337-354.

- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, **66**, 277-290.
- 3) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス", 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説改訂版", 化学工業日報社, 東京, 1992, pp. 51-52.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 石館 基 監修, "改定増補 染色体異常試験データ集", エル・アイ・シー, 東京, 1987. p. 19.



表 1-1 N, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)					総異常 細胞数	ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他		出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	1	0	0	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	100	1	1	0	0	0	2	0		100	1	0	1
	200	2	2	0	0	0	4	0		200	1	0	1
		( 1.0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 2.0 )	( 0 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	
75	100	0	0	0	0	0	0	0	96.5	100	0	0	0
	100	1	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	
150	100	0	0	0	0	0	0	0	97.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0		100	1	0	1
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	1	0	1
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	
300	100	0	1	0	0	0	1	0	89.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	2	0	2
		( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )	
450	100	1	0	0	0	0	1	0	69.5	100	1	0	1
	100	2	5	0	0	0	7	0		100	0	0	0
	200	3	5	0	0	0	8	0		200	1	0	1
		( 1.5 )	( 2.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 4.0 )	( 0 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	
600 #	--	--	--	--	--	--	--	--	32.0	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )		( -- )	( -- )	( -- )	
陽性対照	100	45	93	2	1	0	96	1	--	100	0	0	0
	100	39	98	0	0	0	99	1		100	0	0	0
	200	84	191	2	1	0	195	2		200	0	0	0
		( 42.0 )	( 95.5 )	( 1.0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 97.5 )**	( 1.0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

\*\*: $p < 0.01$ .

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-2 N, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)					キヤップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)				
		染色分体		染色体		その他			総異常 細胞数	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	100	0	2	0	0	0	2	0		100	0	0	0
	200	1	3	0	0	0	3	0		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 1.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.5 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	
75	100	1	0	0	0	0	1	0	78.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
	200	1	0	0	0	0	1	1		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0.5 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	
150	100	0	0	0	0	0	0	1	69.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	1		200	0	0	0
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	
300	100	0	0	0	0	0	0	0	64.5	100	0	1	1
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	1	1
		( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 0 )	( 0.5 )	( 0.5 )	
450	100	0	0	0	0	0	0	0	63.5	100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	2	0	2
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	3	0	3
		( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 1.5 )	( 0 )	( 1.5 )	
600	100	3	8	0	0	0	8	0	44.0	100	0	0	0
	100	3	4	1	1	0	6	0		100	3	0	3
	200	6	12	1	1	0	14	0		200	3	0	3
		( 3.0 )	( 6.0 )	( 0.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 7.0 )*	( 0 )		( 1.5 )	( 0 )	( 1.5 )	
陽性対照	100	8	58	0	0	0	58	0		100	0	0	0
10	100	5	50	0	1	0	52	0	—	100	0	0	0
	200	13	108	0	1	0	110	0		200	0	0	0
		( 6.5 )	( 54.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 55.0 )**	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

\*:p<0.05, \*\*:p<0.01.

表2 N, N'-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)-確認試験

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)					ギャップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)				
		染色分体		染色体		その他			総異常 細胞数	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0	100.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	1	0	1
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	
400	100	0	2	0	1	0	3	0	69.5	100	1	0	1
	100	0	2	0	0	0	2	0		100	1	0	1
	200	0	4	0	1	0	5	0		200	2	0	2
		( 0 )	( 2.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 2.5 )	( 0 )		( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )	
600	100	3	6	0	1	0	7	0	34.5	100	2	0	2
	100	7	8	0	1	0	11	0		100	3	0	3
	200	10	14	0	2	0	18	0		200	5	0	5
		( 5.0 )	( 7.0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 9.0 )**	( 0 )		( 2.5 )	( 0 )	( 2.5 )	
800 #	—	—	—	—	—	—	—	—	14.5	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )		( — )	( — )	( — )	
陽性対照	100	13	50	0	0	0	53	0	—	100	0	0	0
	100	9	47	0	0	0	51	0		100	0	0	0
	200	22	97	0	0	0	104	0		200	0	0	0
		( 11.0 )	( 48.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 52.0 )**	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

\*:p<0.05, \*\*:p<0.01.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

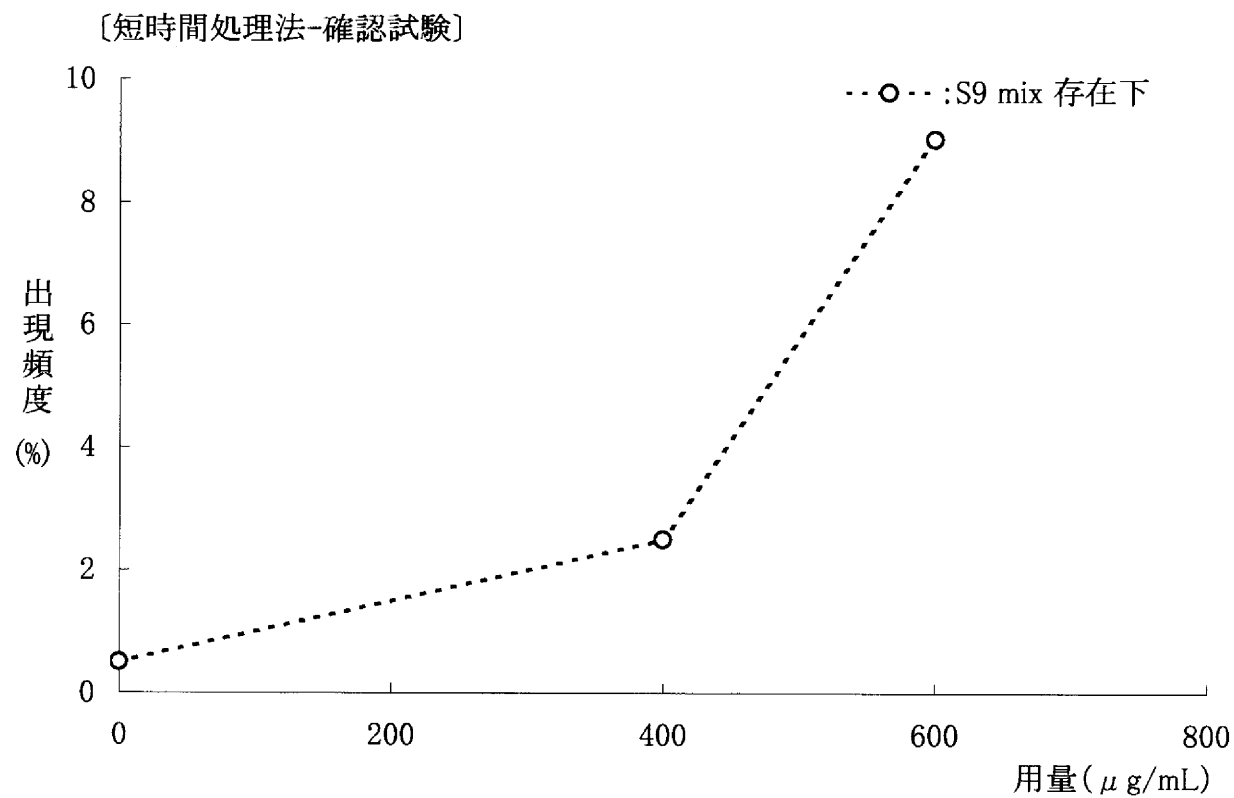
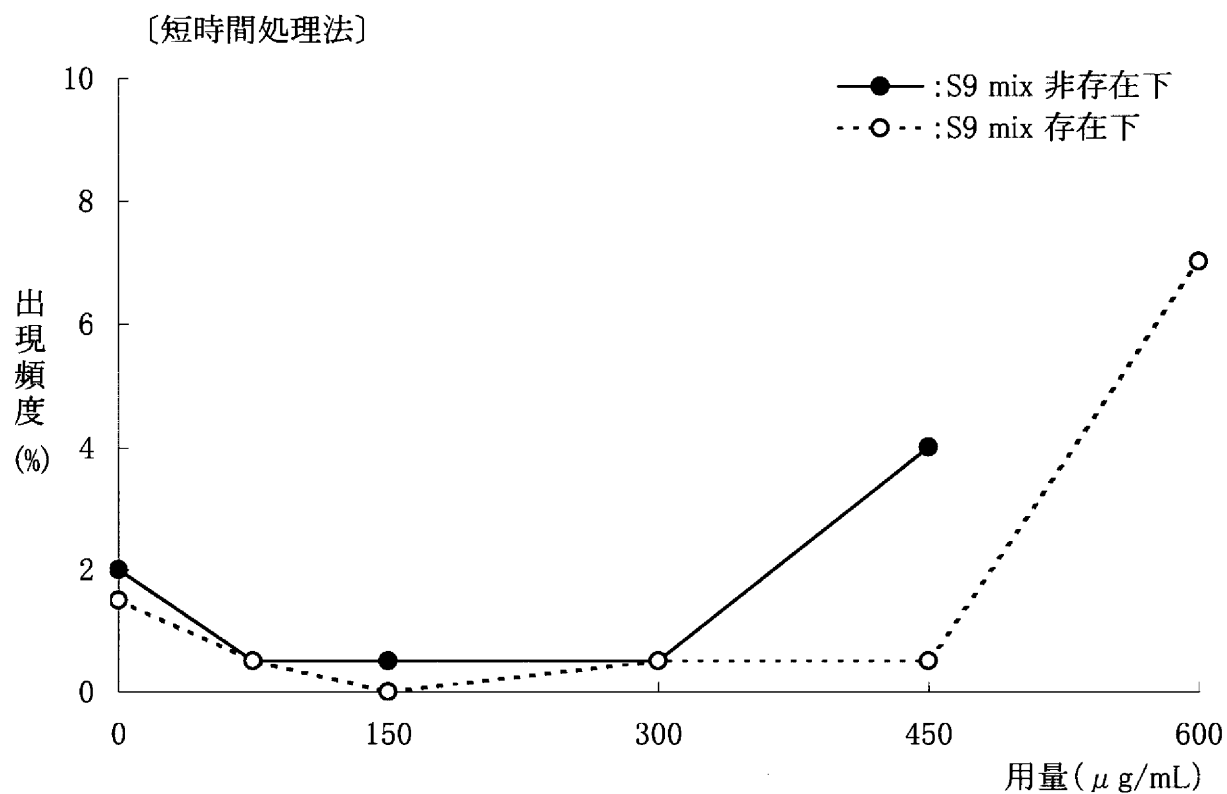


図1 構造異常を有する細胞の出現頻度

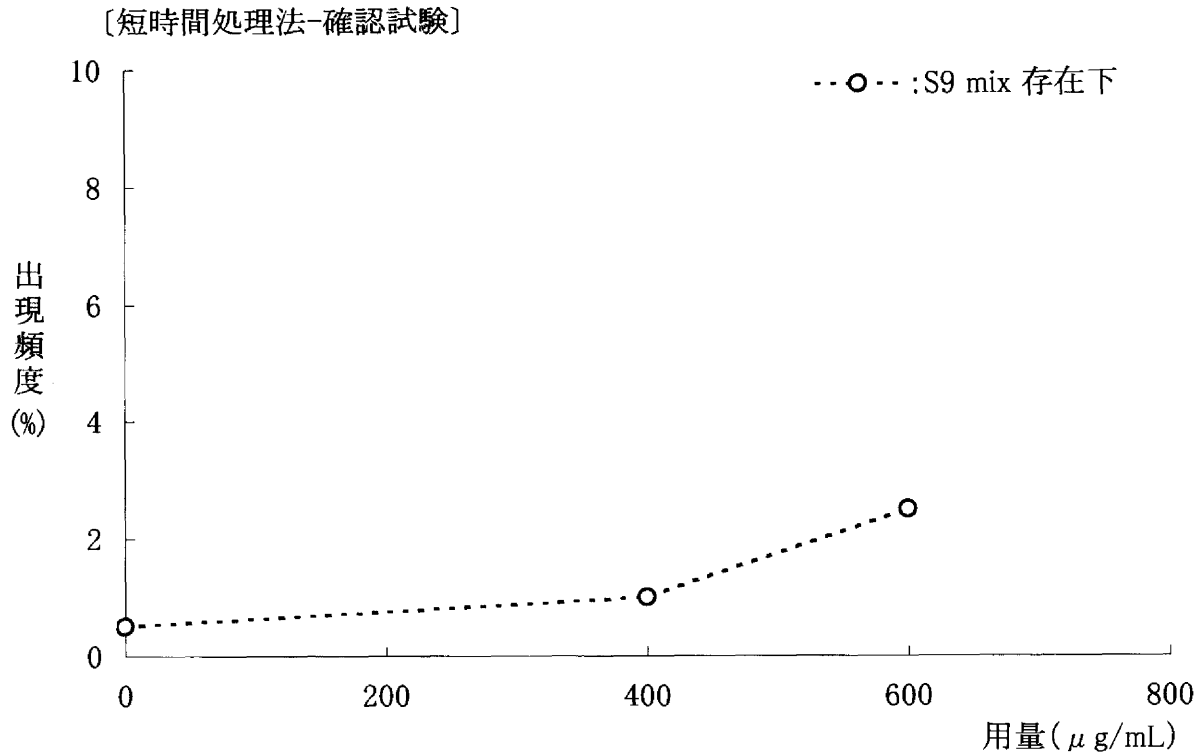
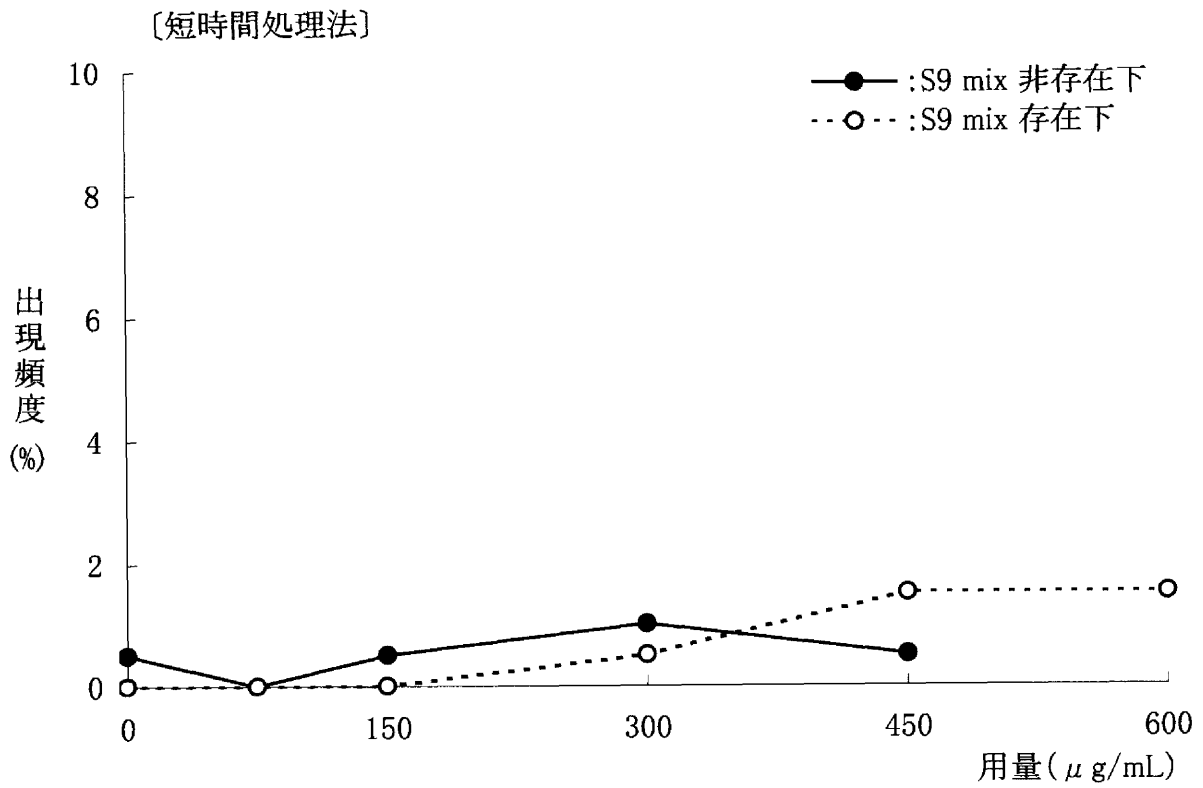


図2 数的異常を有する細胞の出現頻度