

# 最終報告書

表 題：1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンのマウスを用いる小核試験

試験番号：SR05384

株式会社 化合物安全性研究所

## 目 次

	頁
表紙	1
目次	5
要約	10
緒言	11
材料および方法	11
成績	19
考察	21
参考文献	22

## Tables

Table 1 General appearance of mice in the preliminary test (retest) with 1,3-di-o-tolyguanidine (SR05384)	24
Table 2 Body weights of mice in the preliminary test (retest) with 1,3-di-o-tolyguanidine (SR05384)	25
Table 3 General appearance of mice in the main test with 1,3-di-o-tolyguanidine (SR05384)	26
Table 4 Body weights of mice in the main test with 1,3-di-o-tolyguanidine (SR05384)	27
Table 5 Results of the micronucleus assay with 1,3-di-o-tolyguanidine in mice (SR05384)	28

## 要 約

1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの *in vivo* での染色体異常誘発性を検討するため、雄性マウスを用いた小核試験を実施した。被験物質群には、予備試験(再試験を含め2回実施)の結果に基づき 20.5、25.6、32、40 および 50 mg/kg/日を約 24 時間間隔で 2 回経口投与した。陰性対照群には、0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を被験物質群と同様の方法で投与した。陽性対照群には、マイトマイシン C の 1 mg/kg を腹腔内に 1 回投与した。最終投与後 23~24 時間に骨髓塗抹標本を作製し、以下の成績を得た。

動物の一般状態観察では、陰性対照群ならびに被験物質の 20.5、25.6 および 32 mg/kg/日群に異常症状の発現はみられなかった。40 mg/kg/日群では 6 例中 2 例が、また、50 mg/kg/日群では 6 例中 1 例が、1 回目の投与で死亡した。

動物の体重では、被験物質各群の投与後の平均値はそれぞれの投与前値と同程度であり、陰性対照群との間にも明確な差はみられなかった。

小核を有する幼若赤血球数の全幼若赤血球数に対する出現頻度(小核出現頻度)では、陰性対照群の  $0.17 \pm 0.06\%$  (平均値 $\pm$ S. D.、n=5)に対し、被験物質の 20.5、25.6、32、40 および 50 mg/kg/日群ではそれぞれ  $0.10 \pm 0.07$  (n=5)、 $0.13 \pm 0.10$  (n=5)、 $0.17 \pm 0.10$  (n=5)、 $0.21 \pm 0.13$  (n=4) および  $0.22 \pm 0.07\%$  (n=5) と同程度で統計学的な有意差もなく、被験物質に小核誘発性はみられなかった。

全赤血球中の幼若赤血球の比率では、陰性対照群の  $46.3 \pm 4.8\%$  (平均値 $\pm$ S. D.、n=5)に対し、被験物質の 20.5、25.6、32、40 および 50 mg/kg/日群ではそれぞれ  $50.0 \pm 6.4$  (n=5)、 $47.1 \pm 5.1$  (n=5)、 $47.7 \pm 6.5$  (n=5)、 $46.7 \pm 1.4$  (n=4) および  $41.2 \pm 4.1\%$  (n=5) と同程度で統計学的な有意差もなく、被験物質に骨髓毒性はみられなかった。

陽性対照群では、小核出現頻度は陰性対照群と比べ  $3.00 \pm 0.50\%$  (n=5) と統計学的に有意な高値となり、本試験が適切に実施されたことが示された。

以上のことから、1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンは、本試験条件下において小核誘発性を示さず、*in vivo* での染色体異常誘発性を有しないものと判断した。

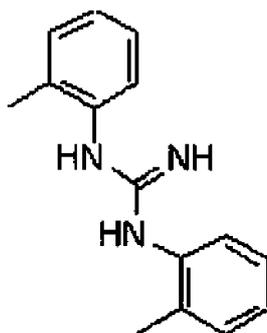
## 緒 言

1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの *in vivo* での染色体異常誘発性を検討するため、雄性マウスを用いて骨髄細胞を対象とした小核試験を実施した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

名称	: 1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジン
英名	: 1,3-di-o-tolyguanidine
CAS No.	: 97-39-2 <sup>1)</sup>
化審法官報公示整理番号	: (3)-2190、(9)-1870 <sup>1)</sup>
構造式	:



化学式	: $(\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NH})_2\text{C}:\text{NH}$ <sup>1)</sup>
分子量	: 239.32 <sup>1)</sup>
物理化学的性質	: 外観 ; 白色の粉末(Appendix1)
	臭い ; データなし <sup>1)</sup>
	pH ; データなし <sup>1)</sup>
	沸点 ; データなし <sup>1)</sup>
	融点 ; 165~171°C <sup>1)</sup>
	引火点 ; データなし <sup>1)</sup>
	発火点 ; データなし <sup>1)</sup>
	爆発限界 ; データなし <sup>1)</sup>

蒸気圧 ; データなし<sup>1)</sup>  
比重 ; 1.10-1.20<sup>1)</sup>  
溶解性 ; クロロホルム、メタノール、エタノールおよびアセ  
トンに易溶<sup>1)</sup>。トルエンおよびベンゼンに微溶<sup>1)</sup>。  
水およびヘキサンに不溶<sup>1)</sup>。

含量 : 99.8% (Appendix 1)  
不純物の名称およびその濃度 : 不明 (データなし)

入手量 : 25 g (Appendix 1) (2006年9月27日受入)  
安定性 : 実験終了後、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入  
手し (Appendix 2) 被験物質の試験期間中の安定性を確認した。  
保存条件 : 遮光、冷所 (実測範囲 : 2~7°C)  
取扱上の注意 : 使用に際しては、手袋、マスク等を着用し、吸入または眼、  
皮膚および衣類に触れないようにして取り扱った。  
最終使用日 : 2006年11月30日  
サンプリング : 適用なし  
残余被験物質の処置 : 残余被験物質は、安定性確認の分析のため製造者へ送付した。

## 2. 対照物質

### (1) 陰性対照物質

陰性対照物質として、0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液 (略  
称 : 0.5% CMC、カルボキシメチルセルロースナトリウム : 日本薬局方カルメロース  
ナトリウム、ロット番号 5610、使用期限 2008年6月、丸石製薬株式会社) を使用し  
た。陰性対照物質は、被験物質投与液の調製媒体としても使用した。

### (2) 陽性対照物質

陽性対照物質として、マイトマイシン C (ロット番号 448ADJ、使用期限 2008年10  
月、協和醗酵工業株式会社) を使用した。

### 3. 被験物質投与液の調製

被験物質投与液は、0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を用いて懸濁調製した。調製液はスターラーを用いて混和し、均一であることを確認後、投与液とした。

予備試験では 12.5、25、50、100 および 200 mg/mL 投与液を、予備試験の再試験では 2.37、3.55、5.33、8 および 12 mg/mL 投与液を、本試験では 2.05、2.56、3.2、4 および 5 mg/mL 投与液を、それぞれ個別に調製した。

被験物質投与液は用時調製し、予備試験では調製後 0.5 時間以内に、予備試験の再試験では調製後 0.8 時間以内に、本試験では調製後 1.6 時間以内に使用した。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

### 4. 対照物質投与液の調製

#### (1) 陰性対照物質

0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液は、カルボキシメチルセルロースナトリウムを、日本薬局方精製水(ロット番号 5XA1、ヤクハン製薬株式会社)に溶解し調製した。調製液は、調製当日に使用した。

#### (2) 陽性対照物質

マイトマイシン C は、1 mg(力価)を 1 mg と換算し、0.1 mg/mL となるように日本薬局方注射用水(ロット番号 5D73、株式会社大塚製薬工場)に溶解させた。調製液は、調製後 1.9 時間以内に使用した。

### 5. 試験方法

#### (1) 試験系

7 週齢の Cr1j:CD1(ICR)系の雄性マウス(SPF、日本チャールス・リバー株式会社)を使用した。この動物は、実験動物として確立された種および系統であり、この種の試験に繁用されていることから選択した。

予備試験では 2006 年 10 月 4 日に動物 22 匹(発注数 21 匹)を、予備試験の再試験では 2006 年 10 月 25 日に動物 22 匹(発注数 21 匹)を、本試験では 2006 年 11 月 22 日に動物 48 匹(発注数 46 匹)をそれぞれ受入れた。これらの動物は 6 週齢であり、受入時体重は予備試験が 26.8~31.6 g、予備試験の再試験が 25.7~29.5 g、本試験が 29.1~33.3 g であった。

## (2) 飼育環境条件

飼育室は、設定温度  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  [実測範囲：予備試験(302号室)； $21 \sim 23^\circ\text{C}$ 、予備試験の再試験(303号室)； $20 \sim 23^\circ\text{C}$ および本試験(303号室)； $20 \sim 24^\circ\text{C}$ ]、設定湿度  $50 \pm 20\%$  [実測範囲：予備試験(302号室)； $43 \sim 60\%$ 、予備試験の再試験(303号室)； $42 \sim 53\%$ および本試験(303号室)； $45 \sim 54\%$ ]、換気回数  $10 \sim 15$  回/時間、照明時間 12 時間(午前 8 時から午後 8 時までの人工照明)に維持した。

動物は、ブラケット式金属製金網床ケージ(260W×380D×180H、mm)に収容した。ケージあたりの収容匹数は、検疫および馴化期間中は 5 匹以内、群分け後は 2 匹以内とした。

ケージおよび給餌器は、群分け時に 1 回交換し、受皿は、週に 2 回の頻度で交換した。自動給水装置は、洗浄のため、水抜きを週に 1 回の頻度で実施した。飼育室内は、毎日清掃および消毒し、消毒には塩素系消毒薬(ピューラックス、株式会社オーヤラックス)およびヨウ素系消毒薬(マイクロクリン、株式会社エコラボ)を 1 週間単位で交互に使用した。

## (3) 飼料

$\gamma$ 線照射固型飼料(CRF-1、ロット番号 060606 および 060706、オリエンタル酵母工業株式会社)を、金属製給餌器により自由に摂取させた。

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、使用したロットの飼料について分析した。汚染物質の分析を財団法人日本食品分析センターが、微生物検査を飼料製造業者がそれぞれ行った。飼料製造業者からロット毎に分析データを入手し、異常のないことを確認した(Appendix 3-1~4-2)。分析項目と許容値は、株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。

## (4) 飲料水

札幌市水道水(ミクロフィルター通過済み)を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に使用した飼育室と同系統配管の最末端(301号室)から、2006年7月3日、2006年10月2日および2007年1月9日に試料水を採取し、試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を分析した。分析は日本衛生株式会社において行い、分析データを入手して異常のないことを確認した(Appendix 5~7)。分析項目と許容値は、株式会社化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。

## (5) 検疫および馴化

動物は、5あるいは6日間の検疫および馴化飼育を行った。検疫および馴化期間中には、1日1回、一般状態を観察した。検疫および馴化期間中に2回、体重を測定した。

## (6) 群分け

検疫および馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定の結果を参考にし、異常症状がみられず、体重が順調に増加している健康な動物を選抜した。予備試験および予備試験の再試験では、低体重の2例および高体重の2例を除外した後に群分けを行った。本試験では、低体重の2例、高体重の3例および背部外傷のみられた1例を除外した後に群分けを行った。

投与開始日の前日に測定した体重に基づき、層化無作為抽出法によって各群の体重が均一になるように群分けを行った。群分け時の動物の体重範囲は、予備試験では32.7～35.9 g、予備試験の再試験では30.0～33.2 g、本試験では33.8～37.0 gであり、いずれの動物の体重も平均体重±20%の範囲内にあった。

選抜から外れた動物は試験から除外して、安楽死させた。

## (7) 標識方法

動物には、受入時ならびに群分け時に、油性フェルトペンを用いて尾部に印を付け個体識別を行った。各ケージの識別は、群分け前には試験番号ならびに検疫および馴化期間の動物番号を、群分け後には試験番号、試験群および動物番号を明記したラベルによって行った。

## (8) 試験方法

## 1) 予備試験

ラットの経口投与におけるLD<sub>50</sub>値(500 mg/kg)<sup>1)</sup>に従って、被験物質の最大耐量を確認するため、ガイドライン上限の2000 mg/kg/日を最高用量に選択し、以下公比2で低下させた計5用量を設定した。設定した試験群を以下に示す。

投与物質名	投与量 (mg/kg/日)	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg/回)	投与回数	動物数 (動物番号)
陰性対照物質	-	-	10	2	3 (101～103)
被験物質	125	12.5	10	2	3 (201～203)
	250	25	10	2	3 (301～303)
	500	50	10	2	3 (401～403)
	1000	100	10	2	3 (501～503)
	2000	200	10	2	3 (601～603)

## 2) 予備試験(再試験)

予備試験の結果、被験物質群では最低用量(125 mg/kg/日)を含む全用量の全動物が投与 1 日目に死亡したことから、再試験を実施した。再試験では、ラットへの単回経口投与毒性試験の資料<sup>2)</sup>を参考に 120 mg/kg/日を最高用量に選択し、以下公比 1.5 で低下させた 4 用量を含む計 5 用量を設定した。設定した試験群を以下に示す。

投与物質名	投与量 (mg/kg/日)	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg/回)	投与回数	動物数 (動物番号)
陰性対照物質	-	-	10	2	3 (1101~1103)
被験物質	23.7	2.37	10	2	3 (1201~1203)
	35.5	3.55	10	2	3 (1301~1303)
	53.3	5.33	10	2	3 (1401~1403)
	80	8	10	2	3 (1501~1503)
	120	12	10	2	3 (1601~1603)

## 3) 本試験

予備試験(再試験)の結果、23.7 および 35.5 mg/kg/日の用量では一般状態への影響ならびに死亡はみられず、53.3、80 および 120 mg/kg/日の用量では 1 回目あるいは 2 回目の投与で全例が死亡した。このように、被験物質による毒性は狭い用量間で急激に生ずると考えられることから、本試験用量は毒性用量と考えられる 50 mg/kg/日を最高用量とし、以下公比 1.25 で低下させた計 5 用量を設定した。設定した試験群を以下に示す。

投与物質名	投与量 (mg/kg/日)	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg/回)	投与回数	動物数 (動物番号)
陰性対照物質	-	-	10	2	6 (111~116)
被験物質	20.5	2.05	10	2	6 (211~216)
	25.6	2.56	10	2	6 (311~316)
	32	3.2	10	2	6 (411~416)
	40	4	10	2	6 (511~516)
	50	5	10	2	6 (611~616)
マイトマイシンC	1 mg/kg	0.1 mg/mL	10	1	6 (711~716)

## (9) 投与方法

予備試験では午前10～11時の間に、予備試験(再試験)では午前9～10時の間に、本試験では午前10～12時の間に投与を実施した。投与前の絶食は行わなかった。

被験物質および陰性対照物質は、本試験法における一般的な投与方法である経口投与とし、約24時間間隔で2回、胃ゾンデを装着したシリンジを用いて胃内に強制的に投与した。陽性対照物質のマイトマイシンCは、単回腹腔内投与した。投与容量は、それぞれの投与前に測定した体重に基づいて算出した。

## (10) 投与後の一般状態観察および体重測定

1回目投与の直前、直後および投与後約6時間まで適宜ならびに2回目投与の直前、直後、投与後約6時間まで適宜および投与後18～24時間の間に、動物の一般状態を観察した。

各投与の前および最終投与後18～24時間(実測時間：最終投与後22～24時間)に、電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて動物の体重を測定した。

死亡例が発見された場合はその死亡体重を測定し、剖検を行った。

## (11) 標本作製および観察

予備試験および予備試験の再試験では標本作製は行わず、最終投与後約24時間の観察終了後に頸椎脱臼により安楽死させた。

本試験では、陰性対照群、20.5、25.6および32 mg/kg/日群ならびに陽性対照群では動物番号順に5匹の動物を、最終投与後22～23時間の観察において生存動物数が4匹であった40 mg/kg/日群ならびに5匹であった50 mg/kg/日群では生存した全動物について、以下の手順に従って骨髄塗抹標本作製した。

最終投与後23～24時間に、動物を頸椎脱臼によって安楽死させた後、両側大腿骨の骨髄細胞を牛胎児血清(ロット番号1299355、GIBCO)で洗い出し、150×g(1000 rpm)で5分間遠心分離(KR-702、株式会社久保田製作所)した。余剰血清を除去した後、再懸濁した細胞浮遊液の一部をスライドガラスに塗抹した。各標本は、室温で一夜風乾後、メタノール(ロット番号801W1028、関東化学株式会社)で固定した。各動物について4枚ずつ標本作製した。

メタノール固定後、各動物につき2枚の標本を、観察者以外の者がブラインド化した。

選抜した各標本を0.005%アクリジンオレンジ染色液(アクリジンオレンジ、ロット番号WAN0424、和光純薬工業株式会社)で染色後、1/15 mol/Lリン酸緩衝液(pH6.8、

ロット番号 A648、株式会社三菱化学ヤトロン)で洗浄し、カバーガラスをかけてエナメルで封入した。

標本観察は、蛍光顕微鏡(BX50:BX-FLA、オリンパス光学工業株式会社)を用いて、総合倍率 1000 倍で実施した。各動物について 2000 個(1 標本あたり 1000 個)の幼若赤血球を観察し、その全幼若赤血球中の小核を有する幼若赤血球の出現頻度(小核出現頻度)を求めた。さらに、各動物について 500 個(1 標本あたり 250 個)の赤血球を観察し、全赤血球中の幼若赤血球の占める比率(幼若赤血球の比率)を求めた。

なお、評価対象としなかった動物については、標本作製を行わず、頸椎脱臼によって安楽死させた。

## 6. 試験結果の評価

### (1) 統計解析

#### 1) 体重

陰性対照群と被験物質群のデータについて、F 検定により、群間における分散の一樣性について検定を行った。その結果、等分散であったことから、Student の t-検定(両側検定)により 2 群間の比較を行った。有意水準は、両側 5%および 1%とした。

#### 2) 小核出現頻度

陰性対照群と他の群(陽性対照群を含む)との小核出現頻度を比較するため、条件付二項検定(Kastenbaum and Bowman の数表による検定<sup>3)</sup>)を行った。検定の有意水準は上側 5%および 1%とした。

#### 3) 幼若赤血球の比率

陰性対照群と被験物質群あるいは陽性対照群のデータについて、F 検定により、群間における分散の一樣性について検定を行った。その結果、等分散であったことから、Student の t-検定(両側検定)により 2 群間の比率の比較を行った。有意水準は、両側 5%および 1%とした。

### (2) 判定基準

条件付二項検定において、試験群の小核出現頻度が陰性対照群に対して有意に高い場合に、陽性と判定した。

## 成績

### 1. 予備試験

陰性対照群の一般状態に異常症状はみられなかった。

被験物質群(125、250、500、1000 および 2000 mg/kg/日)では、全例が1回目の投与後30分以内に死亡した。

### 2. 予備試験(再試験)

投与後の一般状態観察の成績を Table 1 および Individual data 1 に、体重測定の結果を Table 2 および Individual data 2 に示す。

陰性対照群の一般状態に異常症状はみられなかった。

23.7 mg/kg/日群の一般状態に異常症状はみられなかった。

35.5 mg/kg/日群の一般状態に異常症状はみられなかった。

53.3 mg/kg/日群では、1回目の投与において各動物に自発運動の低下、腹臥、呼吸緩除あるいは間代性痙攣のいずれかの症状がみられ、3例中2例が投与後2時間以内に死亡した。2回目の投与では、残りの1例に自発運動の低下、腹臥および呼吸緩除の症状がみられ、投与後1時間以内に死亡した。

80 mg/kg/日群では、1回目の投与において各動物に自発運動の低下、腹臥、横臥、間代性痙攣、呼吸困難あるいは呼吸緩除のいずれかの症状がみられ、3例中1例が投与後30分以内に、他の1例が投与後2時間以内に死亡した。2回目の投与では、残りの1例に腹臥および呼吸困難の症状がみられ、投与後30分以内に死亡した。

120 mg/kg/日群では、1回目の投与において各動物に自発運動の低下、腹臥、横臥、呼吸緩除、呼吸困難あるいは間代性痙攣のいずれかの症状がみられ、投与後30分以内に3例全てが死亡した。

体重の成績では、全例が生存した23.7および35.5 mg/kg/日群の投与前、1回目の投与後24時間および最終投与後18~24時間の体重の平均値は陰性対照群の値と同程度で、統計学的な有意差もみられなかった。

### 3. 本試験

#### (1) 一般状態および体重

投与後の一般状態観察の成績を Table 3 および Individual data 3 に、体重測定の結果を Table 4 および Individual data 4 に示す。

陰性対照群ならびに被験物質の 20.5、25.6 および 32 mg/kg/日群のいずれにおいても、一般状態に異常症状はみられなかった。

40 mg/kg/日群では、1 回目の投与において 6 例中 2 例(動物番号 513 および 516)が投与後 1 時間以内に死亡した。2 回目の投与では、生存した 4 例の一般状態に異常症状はみられなかった。

50 mg/kg/日群では、1 回目の投与において 6 例中 1 例(動物番号 616)が投与後 1 時間以内に死亡した。2 回目の投与では、生存した 5 例の一般状態に異常症状はみられなかった。

被験物質群の投与前、1 回目の投与後 24 時間および最終投与後 18~24 時間の体重の平均値は陰性対照群とほぼ同程度で、統計学的有意差もみられなかった。

陽性対照群では、投与後の一般状態に異常症状はみられず、最終投与後 18~24 時間の体重の平均値は投与前値と同程度であった。

#### (2) 小核出現頻度および幼若赤血球の比率

小核出現頻度および幼若赤血球の比率を Table 5 に示す。

小核出現頻度は、陰性対照群の  $0.17 \pm 0.06\%$  (平均値  $\pm$  S. D.、n=5) に対し、被験物質の 20.5、25.6、32、40 および 50 mg/kg/日群ではそれぞれ  $0.10 \pm 0.07$  (n=5)、 $0.13 \pm 0.10$  (n=5)、 $0.17 \pm 0.10$  (n=5)、 $0.21 \pm 0.13$  (n=4) および  $0.22 \pm 0.07\%$  (n=5) であり、統計学的な有意差はみられなかった。一方、陽性対照群では  $3.00 \pm 0.50\%$  (n=5) と高値であり、陰性対照群に対する統計学的な有意差が認められた。

幼若赤血球の比率は、陰性対照群の  $46.3 \pm 4.8\%$  (平均値  $\pm$  S. D.、n=5) に対し、被験物質の 20.5、25.6、32、40 および 50 mg/kg/日群ではそれぞれ  $50.0 \pm 6.4$  (n=5)、 $47.1 \pm 5.1$  (n=5)、 $47.7 \pm 6.5$  (n=5)、 $46.7 \pm 1.4$  (n=4) および  $41.2 \pm 4.1\%$  (n=5) であり、統計学的な有意差はみられなかった。また、陽性対照群の値は  $43.5 \pm 7.9\%$  (n=5) であり、陰性対照群の値と比べ統計学的な有意差はみられなかった。

## 考 察

1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの *in vivo* における染色体異常誘発性を、雄性マウスの骨髄細胞を対象とした小核試験により検討した。

被験物質の投与量を、予備試験(再試験)の結果に基づき 20.5、25.6、32、40 および 50 mg/kg/日と設定し小核誘発性を検討したところ、被験物質群に小核出現頻度の増加はみられず、結果は陰性であった。

被験物質群に、幼若赤血球の全赤血球に対する比率の低下で示される骨髄毒性はみられなかったものの、評価用量の 40 および 50 mg/kg/日群で死亡例が認められ、被験物質は十分な曝露がなされたものと考えられた。

陽性対照群では小核出現頻度は明確に増加し十分な感度を有することが確認され、小核誘発性は適切に評価されたものと判断した。なお、陰性対照群および陽性対照群の小核出現頻度および幼若赤血球の全赤血球に対する比率は、全て試験施設の背景データ (Appendix 8) の平均値±3SD の範囲内であった。

以上のことから、1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンは、本試験条件下において小核誘発性を示さず、*in vivo* での染色体異常誘発性を有しないものと判断した。

なお、1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの半数致死量(LD<sub>50</sub>)については、ラットを用いた単回経口投与毒性試験において、雄が 85.3 mg/kg および雌が 56.0 mg/kg<sup>2)</sup> と報告されている。

1,3-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* および *Escherichia coli* を用いた復帰変異試験で陰性<sup>4)</sup>、CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験では、代謝活性化系の存在下で陽性<sup>5)</sup> と報告されている。

1,3-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は、1,3-ジフェニルグアニジンについて、*Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰変異試験で陰性<sup>6)</sup>、CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験で陰性<sup>7)</sup> と報告されている。

## 参考文献

- 1) 製品安全データシート (MSDS No. JW040838) : 和光純薬工業株式会社
- 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単回経口投与毒性試験、化学物質毒性試験報告、11 : 123-125 (2004)
- 3) Marvin A. Kastenbaum and K. O. Bowman (1970), Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation Res.*, 9:527-549
- 4) 1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンの細菌を用いる復帰変異試験、化学物質毒性試験報告、11 : 146-150 (2004)
- 5) 1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験、化学物質毒性試験報告、11 : 151-154 (2004)
- 6) 1,3-ジフェニルグアニジンの細菌を用いる復帰変異試験、化学物質毒性試験報告、8 : 418-422 (2001)
- 7) 1,3-ジフェニルグアニジンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験、化学物質毒性試験報告、8 : 423-425 (2001)

Table 1 General appearance of mice in the preliminary test (retest) with 1,3-di-o-tolyguanidine (SR05384)

Compound	Dose <sup>a</sup> (mg/kg/day)	Findings	Incidence <sup>b</sup>			
			0-6 h after 1st ad.	24 h after 1st ad.	0-6 h after final ad.	18-24 h after final ad.
Control <sup>c</sup>	—	No abnormal findings	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
	23.7	No abnormal findings	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
	35.5	No abnormal findings	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
1,3-di-o-tolyguanidine	53.3	No abnormal findings	0 / 3	1 / 1	0 / 1	-
		Decrease in locomotor activity	3 / 3	0 / 1	1 / 1	-
		Prone position	1 / 3	0 / 1	1 / 1	-
		Clonic convulsion	1 / 3	0 / 1	0 / 1	-
		Bradypnea	1 / 3	0 / 1	1 / 1	-
		Dead	2 / 3	0 / 1	1 / 1	-
	80	No abnormal findings	0 / 3	1 / 1	0 / 1	-
		Decrease in locomotor activity	3 / 3	0 / 1	0 / 1	-
		Prone position	1 / 3	0 / 1	1 / 1	-
		Lateral position	1 / 3	0 / 1	0 / 1	-
		Clonic convulsion	1 / 3	0 / 1	0 / 1	-
		Dyspnea	1 / 3	0 / 1	1 / 1	-
		Bradypnea	1 / 3	0 / 1	0 / 1	-
		Dead	2 / 3	0 / 1	1 / 1	-
	120	Decrease in locomotor activity	1 / 3	-	-	-
		Prone position	1 / 3	-	-	-
		Lateral position	2 / 3	-	-	-
		Clonic convulsion	1 / 3	-	-	-
		Dyspnea	1 / 3	-	-	-
		Bradypnea	2 / 3	-	-	-
		Dead	3 / 3	-	-	-

ad. : Administration

a : Two successive oral administration (24 hours apart)

b : Number of animals with findings / number of treated animals

c : 0.5% carboxymethylcellulose sodium (Japanese pharmacopoeia)

- : Blank

Table 2 Body weights of mice in the preliminary test (retest) with 1,3-di-o-tolyguanidine (SR05384)

Compound	Dose <sup>a</sup> (mg/kg/day)	Body weight (g, mean ± S.D.)		
		Pre ad.	24 h after 1st ad.	18-24 h after final ad.
Control <sup>b</sup>	—	31.8 ± 1.0 (n=3)	31.4 ± 1.5 (n=3)	31.5 ± 1.4 (n=3)
	23.7	31.3 ± 0.1 (n=3)	31.2 ± 0.5 (n=3)	31.3 ± 0.4 (n=3)
	35.5	30.8 ± 1.4 (n=3)	30.4 ± 1.6 (n=3)	30.6 ± 1.5 (n=3)
1,3-di-o-tolyguanidine	53.3	31.6 ± 1.5 (n=3)	30.4 (n=1)	-
	80	31.7 ± 1.6 (n=3)	30.3 (n=1)	-
	120	31.8 ± 1.0 (n=3)	-	-

ad. : Administration

a : Two successive oral administration (24 hours apart)

b : 0.5% carboxymethylcellulose sodium (Japanese pharmacopoeia)

- : Blank

Table 3 General appearance of mice in the main test with 1,3-di-o-tolyguanidine (SR05384)

Compound	Dose <sup>a</sup> (mg/kg/day)	Findings	Incidence <sup>b</sup>			
			0-6 h after 1st ad.	24 h after 1st ad.	0-6 h after final ad.	18-24 h after final ad.
Control <sup>c</sup>	—	No abnormal findings	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	20.5	No abnormal findings	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	25.6	No abnormal findings	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	32	No abnormal findings	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
1,3-di-o-tolyguanidine	40	No abnormal findings	4 / 6	4 / 4	4 / 4	4 / 4
		Dead	2 / 6	0 / 4	0 / 4	0 / 4
	50	No abnormal findings	5 / 6	5 / 5	5 / 5	5 / 5
		Dead	1 / 6	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Compound	Dose (mg/kg)	Findings	Incidence			
			0-6 h after ad.	18-24 h after ad.		
Mitomycin C	1	No abnormal findings	6 / 6	6 / 6		

ad. : Administration

a : Two successive oral administration (24 hours apart) except mitomycin C (single intraperitoneal injection)

b : Number of animals with findings / number of treated animals

c : 0.5% carboxymethylcellulose sodium (Japanese pharmacopoeia)

Table 4 Body weights of mice in the main test with 1,3-di-o-tolyguanidine (SR05384)

Compound	Dose <sup>a</sup> (mg/kg/day)	Body weight (g, mean ± S.D.)		
		Pre ad.	24 h after 1st ad.	18-24 h after final ad.
Control <sup>b</sup>	—	35.1 ± 0.9 (n=6)	35.0 ± 1.4 (n=6)	35.2 ± 1.5 (n=6)
	20.5	35.4 ± 1.0 (n=6)	35.1 ± 1.1 (n=6)	35.2 ± 0.9 (n=6)
	25.6	34.7 ± 1.2 (n=6)	34.6 ± 0.8 (n=6)	34.6 ± 1.1 (n=6)
1,3-di-o-tolyguanidine	32	34.7 ± 1.6 (n=6)	35.0 ± 1.3 (n=6)	35.0 ± 1.5 (n=6)
	40	35.0 ± 1.2 (n=6)	34.6 ± 1.2 (n=4)	34.8 ± 1.7 (n=4)
	50	34.8 ± 0.9 (n=6)	34.5 ± 0.7 (n=5)	34.6 ± 0.7 (n=5)
Compound	Dose (mg/kg)	Body weight (g, mean ± S.D.)		
		Pre ad.	18-24 h after ad.	
Mitomycin C	1	35.8 ± 0.7 (n=6)	35.5 ± 0.6 (n=6)	

ad. : Administration

a : Two successive oral administration (24 hours apart) except mitomycin C (single intraperitoneal injection)

b : 0.5% carboxymethylcellulose sodium (Japanese pharmacopoeia)

Table 5 Results of the micronucleus assay with 1,3-di-o-tolylguanidine in mice (SR05384)

Compound	Dose <sup>a</sup> (mg/kg/day)	Animal number	% MNPCE <sup>b</sup>	% PCE <sup>c</sup>
Control <sup>d</sup>	—	111	0.10	53.8
		112	0.20	42.0
		113	0.25	43.6
		114	0.15	43.8
		115	0.15	48.2
		Mean ± S.D.	0.17 ± 0.06	46.3 ± 4.8
20.5	20.5	211	0.15	43.6
		212	0.15	51.4
		213	0.15	51.4
		214	0.05	44.2
		215	0.00	59.2
		Mean ± S.D.	0.10 ± 0.07	50.0 ± 6.4
25.6	25.6	311	0.05	49.6
		312	0.30	41.0
		313	0.15	42.8
		314	0.10	53.6
		315	0.05	48.4
		Mean ± S.D.	0.13 ± 0.10	47.1 ± 5.1
1,3-di-o-tolylguanidine	32	411	0.25	44.2
		412	0.00	40.4
		413	0.20	54.6
		414	0.15	44.6
		415	0.25	54.6
		Mean ± S.D.	0.17 ± 0.10	47.7 ± 6.5
40	40	511	0.05	47.8
		512	0.35	46.8
		514	0.20	47.4
		515	0.25	44.6
		Mean ± S.D.	0.21 ± 0.13	46.7 ± 1.4
		50	50	611
612	0.15			42.0
613	0.15			36.8
614	0.25			46.2
615	0.30			37.2
Mean ± S.D.	0.22 ± 0.07			41.2 ± 4.1
Mitomycin C	1 mg/kg	711	3.30	32.0
		712	3.10	46.2
		713	2.65	42.4
		714	2.35	54.0
		715	3.60	43.0
		Mean ± S.D.	3.00 ± 0.50 **	43.5 ± 7.9

a : Two successive oral administration (24 hours apart) except mitomycin C (single intraperitoneal injection)

b : % MNPCE ; % of micronucleated polychromatic erythrocyte (based on 2000 PCEs per animal)

c : % PCE ; % of polychromatic erythrocyte (based on 500 erythrocytes per animal)

d : 0.5% carboxymethylcellulose sodium (Japanese pharmacopoeia)

\*\* : Statistically significant difference from the control,  $p \leq 0.01$  (the Conditional Binomial test)