B010047

最終報告書

N-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンのほ乳類培養細胞を用いる

染色体異常試験

（試験番号：B010047）

2002年2月28日

株式会社三菱化学安全科学研究所

目次

要約 ····· 5

材料および方法 ····· 6

1. 試験物質 ····· 6

2. 細胞 ····· 7

3. 培地 ····· 7

4. S9 mix ····· 8

5. 試験物質溶液の調製 ····· 8

6. 細胞増殖抑制試験 ····· 9

7. 染色体異常試験 ····· 10

8. 結果のまとめ ····· 12

結果 ····· 14

考察および結論 ····· 16

参考文献 ····· 16

表 1　染色体異常試験の結果（短時間処理法）[本試験] ····· 18

表 2　染色体異常試験の結果（短時間処理法）[確認試験 1] ····· 19

表 3　染色体異常試験の結果（短時間処理法）[確認試験 2] ····· 20

表 4　染色体異常試験の結果（連続処理法） ····· 21

図 1　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの細胞毒性
（短時間処理法・－S9 mix） ····· 22

図 2　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの細胞毒性
（短時間処理法・＋S9 mix） ····· 22

図 3　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの細胞毒性
（連続処理法） ····· 23

図 4　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの構造異常細胞出現頻度
（短時間処理法） ····· 24

図 5　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの数的異常細胞出現頻度
（短時間処理法）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
図 6　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの構造異常細胞出現頻度
（連続処理法）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
図 7　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの数的異常細胞出現頻度
（連続処理法）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い，*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの *in vitro* における染色体異常試験を実施した．

予備試験の結果に基づいて，細胞増殖抑制試験の用量は，短時間処理法の S9 mix 非共存下（以下－S9 mix）および連続処理法の 24 時間処理（以下 24 時間処理）において，0.5，1，2，3，4，5 μg/mL，短時間処理法の S9 mix 共存下（以下＋S9 mix）において，0.5，1，2，3，4，5，10，20，40 μg/mL を設定した．その結果，被験物質による 50％細胞増殖抑制用量は－S9 mix および 24 時間処理で共に 2 μg/mL，＋S9 mix で 7 μg/mL であった．

この結果に基づき，短時間処理法の染色体異常試験（本試験）は，－S9 mix で 0.25，0.5，1，2，4 μg/mL，＋S9 mix で 1，2，4，8，16 μg/mL を設定した．

短時間処理法の本試験の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，＋S9 mix の 16 μg/mL において 9.5％であり，疑陽性となった．この結果から，再現性を確認するために，＋S9 mix で 8，10，12，14，16 μg/mL を設定して確認試験 1 を実施した．

確認試験 1 の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，10，12，14，16 μg/mL において，それぞれ 5.5，9.5，16.0，18.5％となり，染色体異常誘発の再現性が確認された．

しかしこの結果より，代謝活性化系非存在下でも，細胞増殖率が 50％以下となる用量で染色体異常誘発が認められる可能性が考えられた．このため，引き続き－S9 mix についても 3，4，5，6 μg/mL を設定して確認試験を実施した．また併せて，24 時間処理についても 0.5，1，2，3，4 μg/mL を設定して本試験を実施した．

その結果，－S9 mix の 3，4，5，6 μg/mL で，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度はそれぞれ 12.0，14.5，6.5，12.0％であった．また 24 時間処理においても，2，3，4 μg/mL で染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度はそれぞれ 10.0，11.0，16.0％であった．

一方，数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの処理条件のいずれの被験物質処理群においても 5％未満であった．

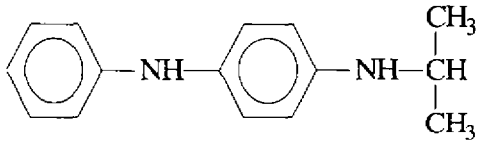
従って，*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンは，本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有すると結論した．

材料および方法

1. 試験物質

1.1 被験物質

から2001年2月8日に提供された*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンを冷蔵，暗所で保存した．被験物質の純度，組成および物理化学的性質等は以下の通りである．

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミン		
別　　名	1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノベンゼン		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は，その製法の概要)			
試験に供した新規化学物質の純度	99.5 wt%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	
不純物の名称及び濃度	*N*-フェニル-*N'*-ジイソプロピル-*p*-フェニレンジアミン：0.34% 4-アミノジフェニルアミン：0.04%		
CAS 番号	101-72-4	蒸　気　圧	0.00343 mmHg (90℃)
分　子　量	226.32	分配係数	－
融　　点	76.5℃～78.5℃	常温における性状	紫褐色フレーク
沸　　点	220℃（10 mmHg）		
安　定　性	通常の取扱いにおいては安定． 長期間，光にさらすと変色する．		
溶媒に対する溶解度等	溶　媒	溶　解　度	溶媒中の安定性
	水	1 mg/mL（18℃）	－
	DMSO	1～10 mg/mL（18℃）	*1
	ｱｾﾄﾝ	10～50 mg/mL（20℃）	－
	95%ｴﾀﾉｰﾙ	1～10 mg/mL（18℃）	－

DMSO：ジメチルスルホキシド

*1：被験物質溶液調製時に，発熱，発泡，変色は認められなかった．

1.2 陰性対照物質（被験物質の溶媒）

ジメチルスルホキシド

（以下 DMSO，関東化学㈱，ロット番号 207G1672，207G1673，純度 99.7%以上）

1.3 陽性対照物質

マイトマイシン C（以下 MMC，協和発酵工業㈱，ロット番号 328AJF，含量 100%
ロット番号 337AJG，含量 103%）

ベンゾ〔a〕ピレン（以下 BP，東京化成工業㈱，ロット番号 GG01，含量 95.6%）

2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した．この細胞は，染色体数のモードが 25 本と少なく，染色体が比較的大きいため標本観察が容易である等の利点があり，培養細胞を用いる染色体異常試験で広く使用されている．

細胞は①2001 年 2 月 14 日および②2001 年 7 月 17 日に大日本製薬㈱から購入し，細胞懸濁液に対し最終 10 v/v%の割合で DMSO（関東化学㈱，ロット番号①204G1360，②210G1441）を添加したものを 1 mL に小分けし，液体窒素中で凍結保存した．試験には，これを融解して培養し，融解後 4 週間以内のものを使用した．細胞の培養には，プラスチックプレート（直径 6 cm または 10 cm；Becton Dickinson and Company）を用い，炭酸ガス細胞培養装置内（炭酸ガス 5%，温度 37℃に設定，加湿，NAPCO 社, 7300 型）で培養した．

3. 培地

3.1 MEM

イーグル MEM 培地「ニッスイ」①（日水製薬㈱，ロット番号 436011，439011，43910311）約 8.3 g を精製水 880 mL に溶解し，オートクレーブ滅菌（121℃，15 分間）後，別に滅菌処理した 2.92w/v% L-グルタミン水溶液と 10 w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ 8.8 mL，11.2 mL 添加した．以下この溶液を MEM とする．

3.2 MEM 培地

MEM 900 mL に，非働化（56℃, 30 分間加熱処理）した仔牛血清（GIBCO BRL，ロット番号 1027934，296130）を 100 mL 添加した．

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目に 30 mg/kg を 1 回腹腔内投与，2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与）と 5, 6-ベンゾフラボン（3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9（キッコーマン㈱，ロット番号 RAA-441，2001 年 3 月 9 日製造［本試験 2］，ロット番号 RAA-445，2001 年 5 月 25 日製造［確認試験 1］）を購入したものを使用した．購入した S9 は使用時まで-80℃以下（実測値；－88～－81℃ [RAA-441]，－84～－82℃ [RAA-445]）に設定した超低温冷凍庫で保存した．

4.2 S9 mix

S9 mix 1 mL あたり以下の組成で用時調製し，使用時まで氷中に保存した．

S9	0.3 mL
D グルコース 6-リン酸	5 μmol
β-NADP⁺	4 μmol
HEPES（pH 7.2）	4 μmol
塩化マグネシウム六水和物	5 μmol
塩化カリウム	33 μmol
精製水	残量

5. 試験物質溶液の調製

5.1 被験物質溶液の調製

溶媒検討の結果，本被験物質は局方生理食塩液（以下生食）に 50 mg/mL で不溶であった．DMSO には 500 mg/mL で溶解し，発熱，発泡，変色は認められなかった．これらの結果より，本被験物質の溶媒には DMSO を用いた．

被験物質を秤量し，DMSO を加え，振盪撹拌および超音波処理により溶解させて，下記の濃度の被験物質溶液を調製し，これを最高濃度溶液とした．

短時間処理法（本試験，確認試験 1）：4 mg/mL

短時間処理法（確認試験 2），連続処理法：3 mg/mL

最高濃度溶液を DMSO で段階希釈し，各処理用量の 100 倍濃度の被験物質溶液を調製した．被験物質溶液は，用時調製とした．

5.2 陽性対照物質溶液の調製

MMC は，2 mg 入りバイヤル瓶の内容物を，注射用水（㈱大塚製薬工場，ロット番号 K9I83）5 mL に用時溶解した（400 μg/mL 溶液）．これを生食（㈱大塚製薬工場，ロット番号 K0E00［短時間処理法（本試験）］，K1B75［短時間処理法（確認試験 2），連続処

理法］）で段階希釈し，各処理条件で使用する最終用量の 10 倍溶液を調製した（短時間処理法：1μg/mL，連続処理法：0.3μg/mL).

BP は, 処理用量の 200 倍濃度の溶液を調製(DMSO(関東化学㈱, ロット番号 207G1673) に 4 mg/mL で溶解）した．使用時まで凍結保存した.

6. 細胞増殖抑制試験

6.1 被験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち，－S9 mix および＋S9 mix ならびに 24 時間処理において，50，500，5000μg/mL で予備試験 1 を実施した．この試験では，1 用量あたり 1 枚のプレートを用いた．位相差倒立顕微鏡でプレートを観察し，陰性対照物質処理プレートの細胞密度を 100％として，被験物質処理プレートの細胞密度を相対的に判断した．その結果，いずれの処理群においても，すべての用量の被験物質処理プレートで，生存細胞は認められなかった.

このため，0.5，5，50μg/mL で予備試験 2 を実施した．その結果，被験物質処理プレートの細胞密度は下記の通りであった.

用量（μg/mL） 処理群	0.5	5	50
－S9 mix	100％	10％	0％
＋S9 mix	100％	50％	0％
24 時間処理	100％	10％	0％

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は下記の用量を設定した.

－S9 mix：0.5，1，2，3，4，5μg/mL

＋S9 mix：0.5，1，2，3，5，10，20，40μg/mL

24 時間処理：0.5，1，2，3，4，5μg/mL

6.2 細胞処理

4×10^3個/mL に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き, 3 日間前培養した.

MEM 培地を除去した後，下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加え，連続処理法では 24 時間，短時間処理法では 6 時間細胞を処理した．短時間処理法で

は 6 時間後，MEM で細胞表面を 1 回洗浄し，新たに MEM 培地 5 mL を加え，さらに 18 時間培養した．陰性対照物質として溶媒を用い，下記条件で同様に処理した．

	被験物質溶液 または陰性対照物質	S9 mix	MEM培地
－S9 mix	0.03 mL	—	3.0 mL
＋S9 mix	0.03 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.05 mL	—	5.0 mL

6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+}，Mg^{2+}フリーのリン酸緩衝液（以下 PBS(-)，ダルベッコ PBS「ニッスイ」，日水製薬㈱）で洗浄後，メタノールで 10 分間固定し，3％ギムザ液で 10 分間染色した後，軽く水洗し乾燥した． 染色した各プレートについて単層培養細胞密度計（モノセレーター，オリンパス光学工業㈱）を用いて細胞増殖率を測定した．

6.4 50％細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について，陰性対照値を100％として生存曲線を作成し，被験物質の50％細胞増殖抑制用量（IC_{50}）を算出した．なお，IC_{50}は，細胞増殖率が50％を示す用量を挟む2点を結ぶ直線式より算出した．

7. 染色体異常試験

染色体異常試験は，まず，短時間処理法のみを実施した．その結果，＋S9 mix で陽性結果が得られたが，代謝活性化系非存在下における染色体異常誘発性を確認する必要があると考えられたため，連続処理法についても染色体異常試験を実施した．

7.1 被験物質用量および陽性対照物質用量

細胞増殖抑制試験の結果は図1，2に示すごとく，IC_{50}は－S9 mixで2μg/mL，＋S9 mixで7μg/mL，24時間処理で2μg/mLであった．

この結果より，短時間処理法の染色体異常試験（本試験）は，下記の用量を設定した．

－S9 mix：0.25，0.5，1，2，4g/mL

＋S9 mix：1，2，4，8，16μg/mL

本試験の結果に基づいて，確認試験 1 は下記の用量を設定した（詳細は「結果」参照）．

＋S9 mix：8，10，12，14，16μg/mL

確認試験 1 の結果に基づいて，確認試験 2 は下記の用量を設定した（詳細は「結果」

参照）.

－S9 mix：3，4，5，6μg/mL

また 24 時間処理の本試験は，下記の用量を設定した.

24 時間処理：0.5，1，2，3，4μg/mL

陽性対照物質の用量は，－S9 mix では MMC を 0.1μg/mL，24 時間処理では MMC を 0.03μg/mL とした．＋S9 mix では BP を 20μg/mL とした．これらは，いずれも染色体異常誘発性が知られている用量である.

7.2 細胞処理

細胞増殖抑制試験と同様に細胞を処理した.

陽性対照については，下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した.

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	MEM 培地
－S9 mix	0.3 mL	－	－	2.7 mL
＋S9 mix	－	0.015 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.5 mL	－	－	4.5 mL

陰性対照群および被験物質処理群については，各処理条件あたり 4 枚のプレートを用い，2 枚を標本作製に，2 枚を細胞増殖率の測定に使用した．陽性対照群については，細胞増殖率測定を実施しないので，各処理条件あたり 2 枚のプレートを用いた.

7.3 標本作製

標本作製用プレートに，標本作製の 2 時間前にコルセミドを最終用量が 0.1μg/mL となるように加え，分裂中期細胞を蓄積した．処理終了後，細胞表面を PBS(-)で洗浄し，0.25 w/v%トリプシン処理にて細胞を剥離した後，遠心管に回収し，遠心分離（1000 rpm，5 分間；以下同様）により細胞を集めた．上清を除去後，各遠心管に 0.075 mol/L 塩化カリウム溶液 4 mL を加えて低張処理（37℃，15 分）を行った．次に，冷却したメタノール・酢酸 (3:1)(v/v)混合液(固定液) 0.5 mL を加え細胞を半固定した後，遠心分離し，上清を除去した．さらに，同固定液 4 mL を加え，同様の操作を 2 回繰り返した．その後，適量の固定液で細胞を懸濁させ，濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴下して乾燥させた．これを 3 v/v%ギムザ溶液で 20 分間染色し，水洗，乾燥後，封入して染色体標本とした．なお，標本は，各プレートにつき 2 枚作製した.

7.4 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した．細胞増殖率測定用のプレー

トを用いて，細胞増殖抑制試験と同様に実施した．陽性対照群については測定を実施しなかった．

7.5 観察

(1) 予備鏡検

標本作製後，試験の適否確認のため予備鏡検を行い，各プレートから作製した2枚の標本で合わせて50個以上の分裂中期細胞が得られる標本を観察の対象とした．また，陰性対照および陽性対照については，構造異常細胞の有無が適切であることを確認した．

(2) 構造異常および数的異常

標本はすべてコード化し，盲検法で観察した．なお，短時間処理法－S9 mix の確認試験2と連続処理法は並行して実施したため，合わせてコード化し，観察した．

プレート1枚につき100個，すなわち1用量200個の分裂中期細胞を観察した．分裂中期細胞は，染色体がよく拡がった細胞を観察した．

構造異常は以下の分類[1]に従って観察した．ただし，動原体数が25±2または35以上でない細胞は除外した．

染色分体型切断
染色分体型交換
染色体型切断
染色体型交換　　（二動原体，環状染色体など）
断片化

ギャップは染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした．他の異常と区別して記録し，構造異常には含めなかった．

数的異常は動原体数が35以上のものとし，核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた．

7.6 試験結果の判定基準

構造異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞として集計した．

被験物質の染色体異常誘発性の判定は，各処理条件において，構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に5%未満を陰性（－），いずれか一方または両方が5%以上10%未満を疑陽性（±），いずれか一方または両方が10%以上を陽性（＋）とした．

結果が疑陽性の場合または用量依存性が認められない場合，あるいは染色体異常試験結果から再検討が必要と考えられる場合は，確認試験を実施した．確認試験の結果，再現性が認められた場合は陽性と判定し，再現性が認められない場合は陰性と判定した．

8. 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度（%）を表示した．染色体異常は種類別に細胞数を表示した．また，細胞増殖抑制試験および染色体異常試験結果を図示した．

陽性となった試験条件毎に，D_{20} 値（分裂中期細胞の 20%に異常を誘発させるために必要な用量，mg/mL）を算出した．また，その代表的な染色体異常像の写真を本報告書に添付した．

結果

細胞増殖抑制試験の結果，－S9 mix および＋S9 mix ならびに 24 時間処理における被験物質の 50％細胞増殖抑制用量はそれぞれ 2，7，2μg/mL であった（図 1～3）．

短時間処理法の本試験の予備鏡検の結果，すべての用量でプレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため，すべてのプレートの標本を観察対象とした．

短時間処理法の本試験の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，＋S9 mix の 16μg/mL において 9.5％であった（表 1，図 4）．－S9 mix では，いずれの用量においても，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 5％未満であった．ただし，最高用量である 4μg/mL においても，細胞増殖率は 50％以上（58％）であった（表 1，図 1，4）．

本試験の結果より，＋S9 mix における染色体異常誘発の再現性を確認するために，＋S9 mix について 8，10，12，14，16μg/mL で確認試験を実施した．

確認試験 1 の予備鏡検の結果，すべての用量でプレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため，すべてのプレートの標本を観察対象とした．

確認試験 1 の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，＋S9 mix の 10，12，14，16μg/mL において 5.5，9.5，16.0，18.5％であった（表 2，図 4）．

確認試験 1 の結果より，代謝活性化系非存在下でも，細胞増殖率が 50％以下となる用量で染色体異常誘発が認められる可能性が考えられた．このため，引き続き－S9 mix についても 3，4，5，6μg/mL で確認試験を実施した．また併せて，24 時間処理についても 0.5，1，2，3，4μg/mL で本試験を実施した．

確認試験 2 の予備鏡検の結果，すべての用量でプレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため，すべてのプレートの標本を観察対象とした．

確認試験 2 の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 3，4，5，6μg/mL において 12.0，14.5，6.5，12.0％であった．これらの用量における細胞増殖率は，それぞれ 53，34，16，10％であった（表 3，図 1，4）．

連続処理法の予備鏡検の結果，すべての用量でプレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため，すべてのプレートの標本を観察対象とした．

連続処理法の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，2，3，4μg/mL において 10.0，11.0，16.0％であった（表 4，図 6）．

各処理条件について算出した D_{20} 値は，以下の通りであった．

－S9 mix（確認試験 2）：0.0014 mg/mL

＋S9 mix（確認試験 1）：0.018 mg/mL

24 時間処理　　：0.0053 mg/mL

染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの処理条件のいずれの被験物質処理群においても 5%未満であった（表 1～4，図 5，7）．

陰性対照群における染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった（表 1～4，図 4～7）．また，陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 10%以上であった（表 1～4）．

考察および結論

N-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの染色体異常誘発性を検討するため，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した．

その結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix および＋S9 mix ならびに 24 時間処理において 10%以上であった．

－S9 mix の確認試験 2 において，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度に用量依存性は認められなかった．しかし，細胞増殖率が 50%付近となる用量においても，10%以上の異常誘発が認められていることから，本被験物質が染色体異常誘発性を有することは間違いないと考えられた．

一方，陰性対照および陽性対照群では染色体異常細胞の出現頻度は期待通りの値を示し，本試験が技術的に成立していることが示された．

従って，*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンは，本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有すると結論した．

なお，本物質および類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料にまとめた．

参考文献

1. 日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 第 3 分科会 遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社，東京，2000

表 1　染色体異常試験の結果(短時間処理法)[本試験]

被験物質の名称　N-フェニル-N'-イソプロピル-p-フェニレンジアミン

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量(μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 − 18	−	陰性対照(DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	101	100	0	0	0
			100	0	2	0	0	0	2	1	99	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	1	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	0.25	100	1	0	1	1	0	3	1	104	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	101	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	1	102	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	0.5	100	1	0	0	0	0	1	1	104	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	104	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	104	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	1	100	1	0	0	0	0	1	1	96	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	96	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	96	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	2	100	0	1	1	1	0	3	0	90	100	0	0	0
			100	3	0	1	0	0	4	0	82	100	0	0	0
			200	3 (1.5)	1 (0.5)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	7 (3.5)	0	86	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	4	100	2	1	0	0	0	3	0	59	100	0	0	0
			100	1	2	0	0	0	3	0	56	100	0	0	0
			200	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0	58	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	陽性対照(MMC 0.1)	100	6	35	0	0	0	39	0		100	0	0	0
			100	11	25	1	0	0	35	1		100	0	0	0
			200	17 (8.5)	60 (30.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	74 (37.0)	1		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	陰性対照(DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	117	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	1	100	0	0	0	0	0	0	0	76	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	90	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	83	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	2	100	0	0	0	0	0	0	0	72	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	58	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	65	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	4	100	1	0	0	0	0	1	0	45	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1	58	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	52	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	8	100	2	4	0	0	0	5	0	58	100	0	0	0
			100	0	2	0	0	0	2	0	52	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (3.5)	0	55	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	16	100	3	9	1	0	0	10	1	0	100	1	0	1
			100	4	8	0	0	0	9	0	0	100	0	0	0
			200	7 (3.5)	17 (8.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (9.5)	1	0	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	陽性対照(BP 20)	100	8	73	0	0	0	75	1		100	0	0	0
			100	11	71	1	0	0	76	0		100	0	0	0
			200	19 (9.5)	144 (72.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	151 (75.5)	1		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO:ジメチルスルホキシド

BP:ベンゾ[a]ピレン

MMC:マイトマイシンC

表 2　染色体異常試験の結果(短時間処理法)[確認試験1]

被験物質の名称　N-フェニル-N'-イソプロピル-p-フェニレンジアミン

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量(μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 − 18	+	陰性対照(DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	105	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	95	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	8	100	0	2	0	0	0	2	0	51	100	0	0	0
			100	1	0	0	3	0	4	0	39	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	6 (3.0)	0	45	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	10	100	0	6	0	0	0	6	0	47	100	0	0	0
			100	3	4	0	0	0	5	0	43	100	0	1	1
			200	3 (1.5)	10 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (5.5)	0	45	200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)
6 − 18	+	12	100	1	6	0	0	0	7	0	31	100	0	0	0
			100	6	7	0	0	0	12	0	36	100	0	1	1
			200	7 (3.5)	13 (6.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (9.5)	0	34	200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)
6 − 18	+	14	100	4	12	0	0	0	14	0	3	100	1	0	1
			100	3	16	0	0	0	18	0	12	100	2	0	2
			200	7 (3.5)	28 (14.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	32 (16.0)	0	8	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6 − 18	+	16	100	6	15	0	0	0	19	0	6	100	2	0	2
			100	7	16	0	0	0	18	0	2	100	2	0	2
			200	13 (6.5)	31 (15.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (18.5)	0	4	200	4 (2.0)	0 (0.0)	4 (2.0)
6 − 18	+	陽性対照(BP 20)	100	14	83	0	1	0	86	1		100	0	0	0
			100	7	77	0	0	0	78	0		100	0	0	0
			200	21 (10.5)	160 (80.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	164 (82.0)	1		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO:ジメチルスルホキシド

BP:ベンゾ[a]ピレン

B010047

表 3　染色体異常試験の結果(短時間処理法)[確認試験2]

被験物質の名称　N-フェニル-N'-イソプロピル-p-フェニレンジアミン

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量(μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 − 18	−	陰性対照(DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			100	0	2	1	0	0	3	0	100	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	3	100	7	3	0	0	1	11	0	53	100	0	0	0
			100	7	3	1	2	0	13	0	53	100	0	0	0
			200	14 (7.0)	6 (3.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	1 (0.5)	24 (12.0)	0	53	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	4	100	7	8	1	0	0	12	0	27	100	0	0	0
			100	6	8	4	2	0	17	3	41	100	0	0	0
			200	13 (6.5)	16 (8.0)	5 (2.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	29 (14.5)	3	34	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	5	100	3	1	0	0	0	4	1	12	100	0	0	0
			100	5	3	0	1	0	9	0	20	100	1	0	1
			200	8 (4.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	13 (6.5)	1	16	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	−	6	100	6	2	2	0	0	9	0	12	100	0	0	0
			100	5	7	2	2	0	15	1	8	100	0	0	0
			200	11 (5.5)	9 (4.5)	4 (2.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	24 (12.0)	1	10	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	陽性対照(MMC 0.1)	100	14	23	2	3	0	38	0		100	0	0	0
			100	23	31	1	0	0	50	1		100	0	0	0
			200	37 (18.5)	54 (27.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	88 (44.0)	1		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO:ジメチルスルホキシド

MMC:マイトマイシンC

表 4　染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称　N-フェニル-N'-イソプロピル-p-フェニレンジアミン

処理-回復時間(h)	被験物質の用量(μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常の細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 − 0	陰性対照(DMSO)	100	0	0	1	0	0	1	0	99	100	0	0	0
		100	2	0	3	0	0	5	1	101	100	0	0	0
		200	2 (1.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	1	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	0.5	100	2	0	1	0	0	3	0	111	100	0	0	0
		100	2	0	0	0	0	2	1	124	100	0	0	0
		200	4 (2.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	1	118	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	1	100	2	2	0	2	0	5	1	116	100	0	0	0
		100	0	0	2	1	0	3	0	92	100	0	0	0
		200	2 (1.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	8 (4.0)	1	104	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	2	100	8	3	0	1	0	10	1	103	100	1	0	1
		100	5	4	1	0	0	10	0	80	100	0	0	0
		200	13 (6.5)	7 (3.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	20 (10.0)	1	91	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 − 0	3	100	6	5	0	1	0	11	0	50	100	0	0	0
		100	2	7	2	0	0	11	0	54	100	0	0	0
		200	8 (4.0)	12 (6.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	22 (11.0)	0	52	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	4	100	6	12	1	1	0	15	0	25	100	1	0	1
		100	9	8	0	3	0	17	0	36	100	0	0	0
		200	15 (7.5)	20 (10.0)	1 (0.5)	4 (2.0)	0 (0.0)	32 (16.0)	0	30	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 − 0	陽性対照(MMC 0.03)	100	11	16	2	2	0	28	3		100	0	0	0
		100	9	10	0	0	0	18	0		100	0	0	0
		200	20 (10.0)	26 (13.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	46 (23.0)	3		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO:ジメチルスルホキシ

MMC:マイトマイシンC

図１　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの細胞毒性(短時間処理法・－S9 mix)

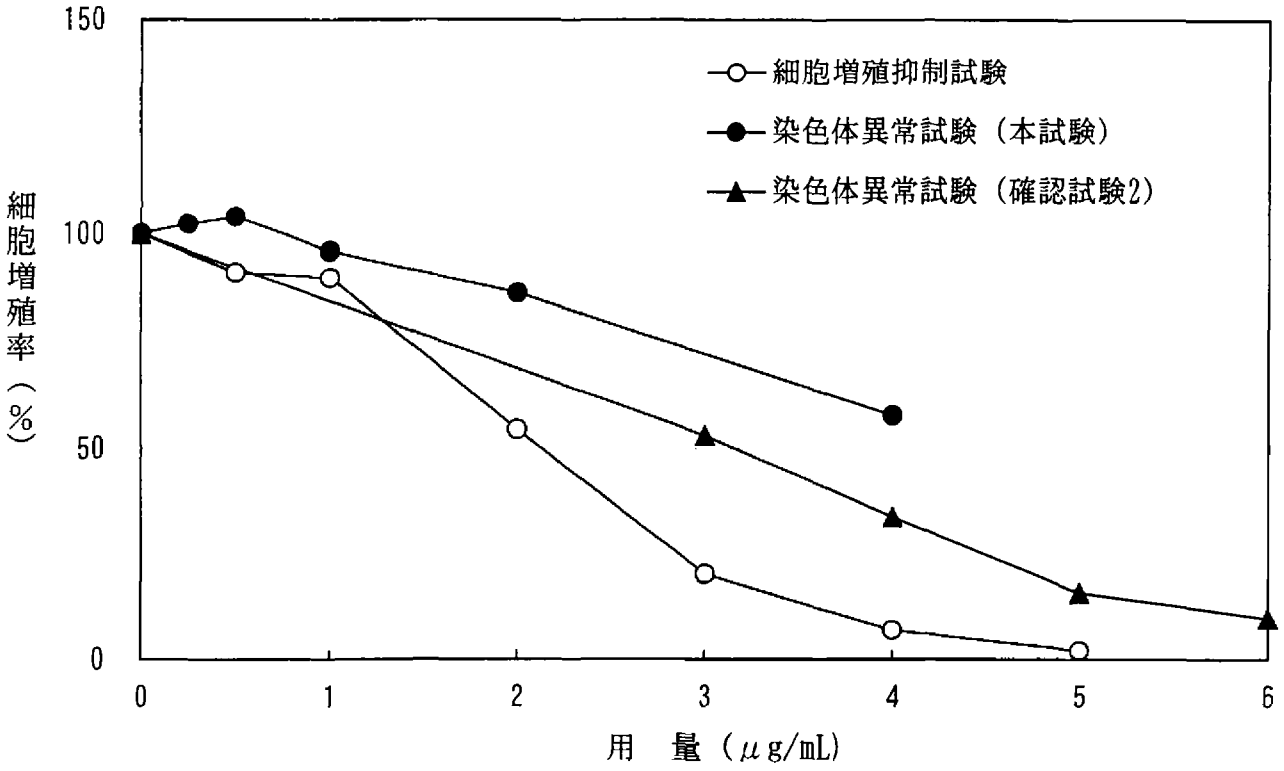


図２　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの細胞毒性(短時間処理法・＋S9 mix)

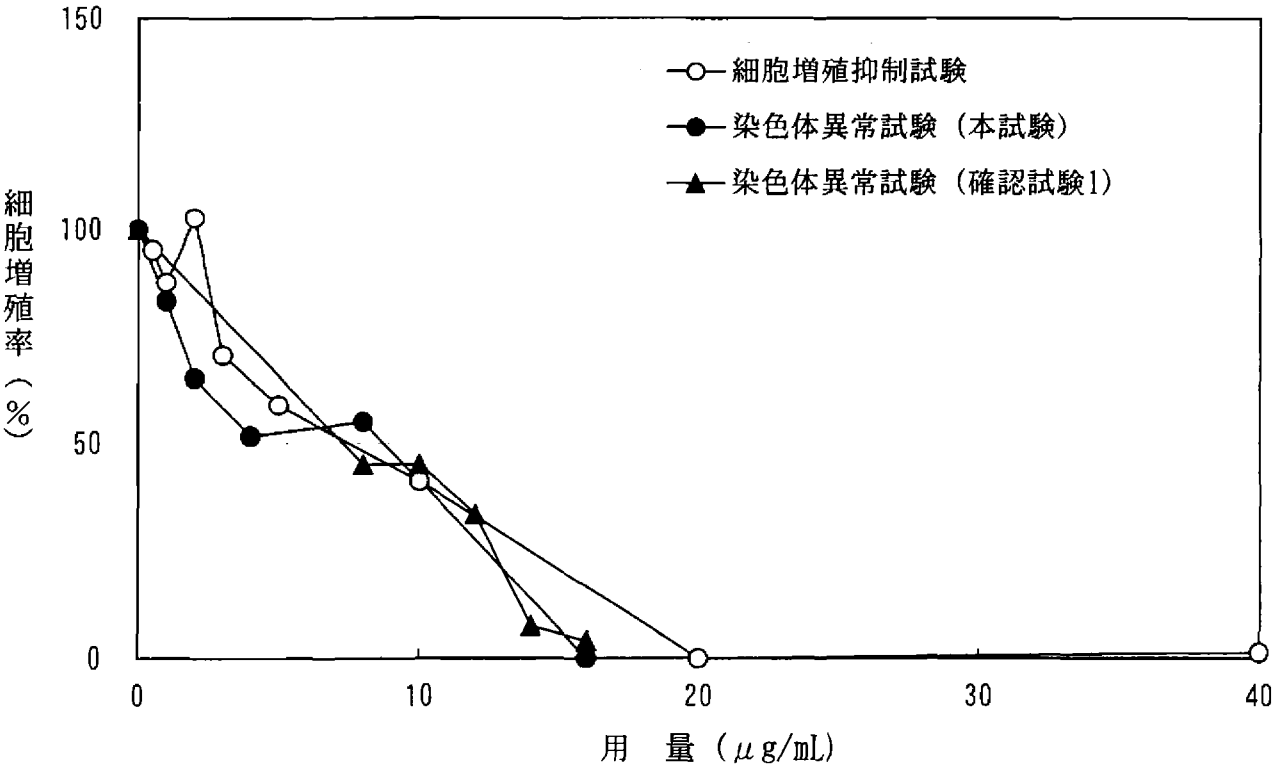


図３　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの細胞毒性（連続処理法）

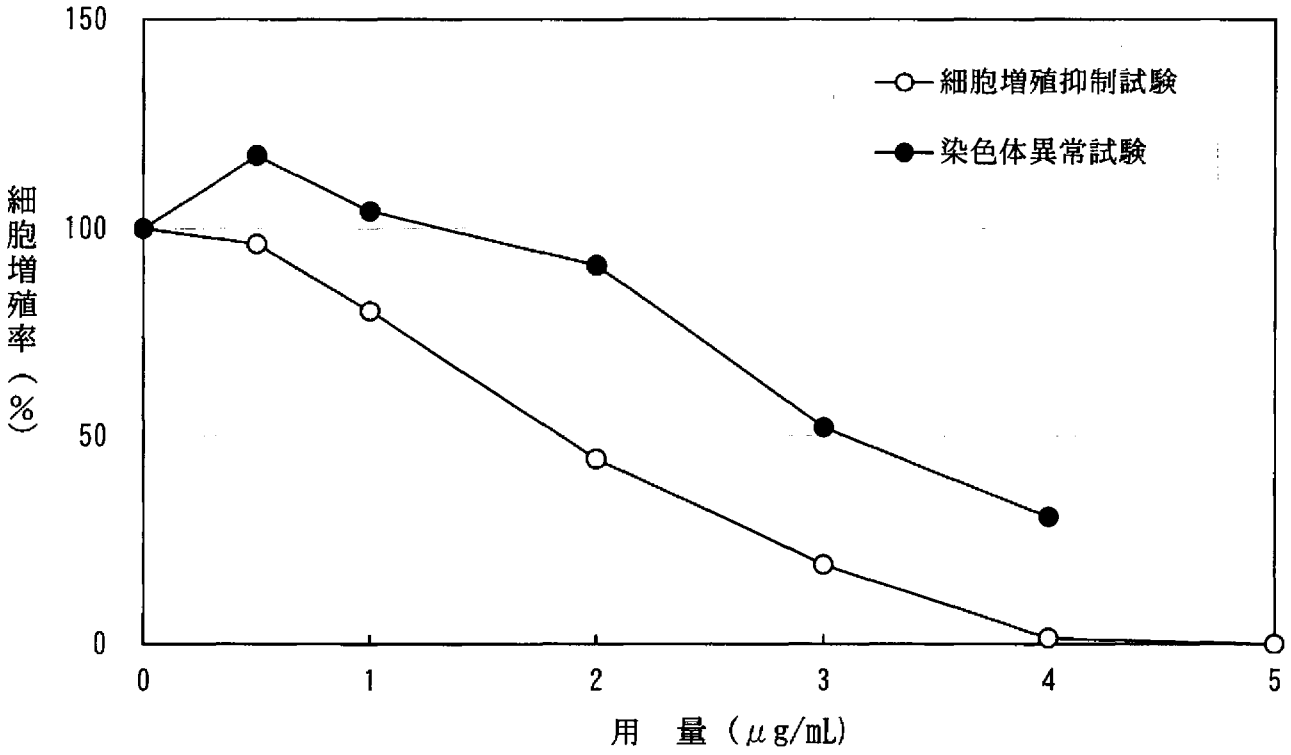


図４ *N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの構造異常細胞出現頻度（短時間処理法）

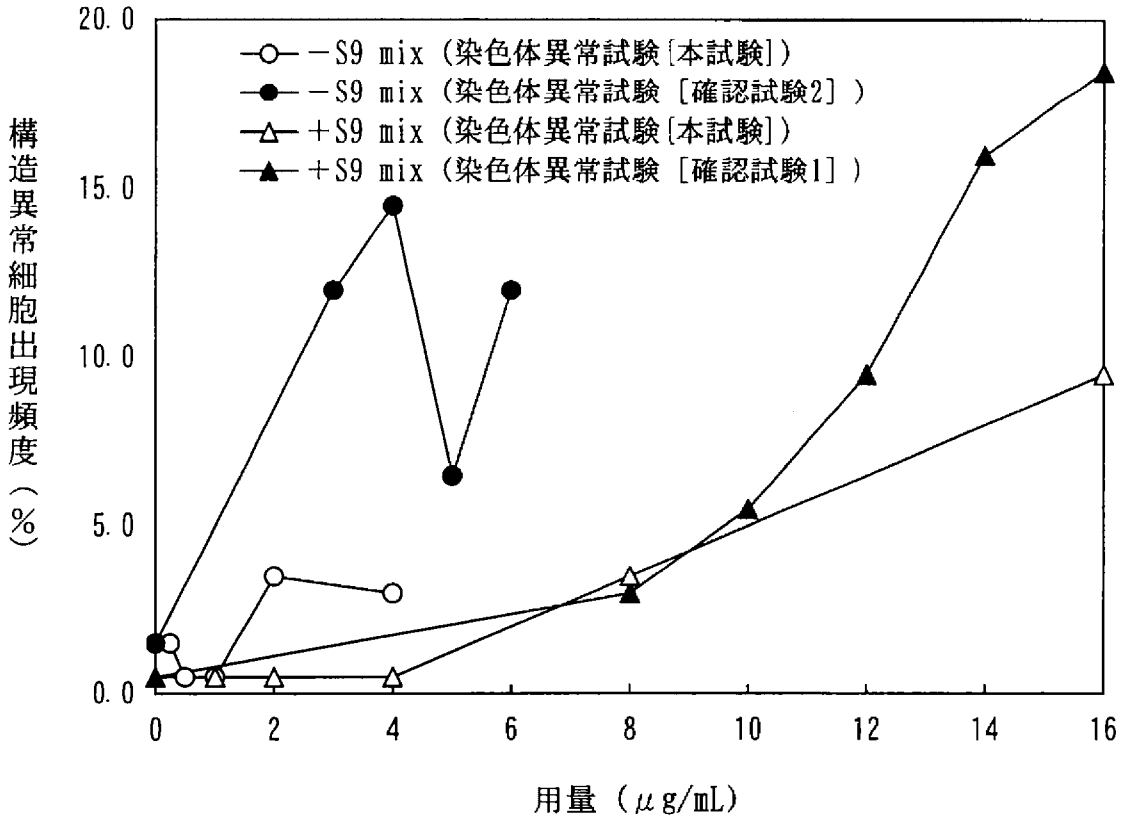


図５ *N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの数的異常細胞出現頻度（短時間処理法）

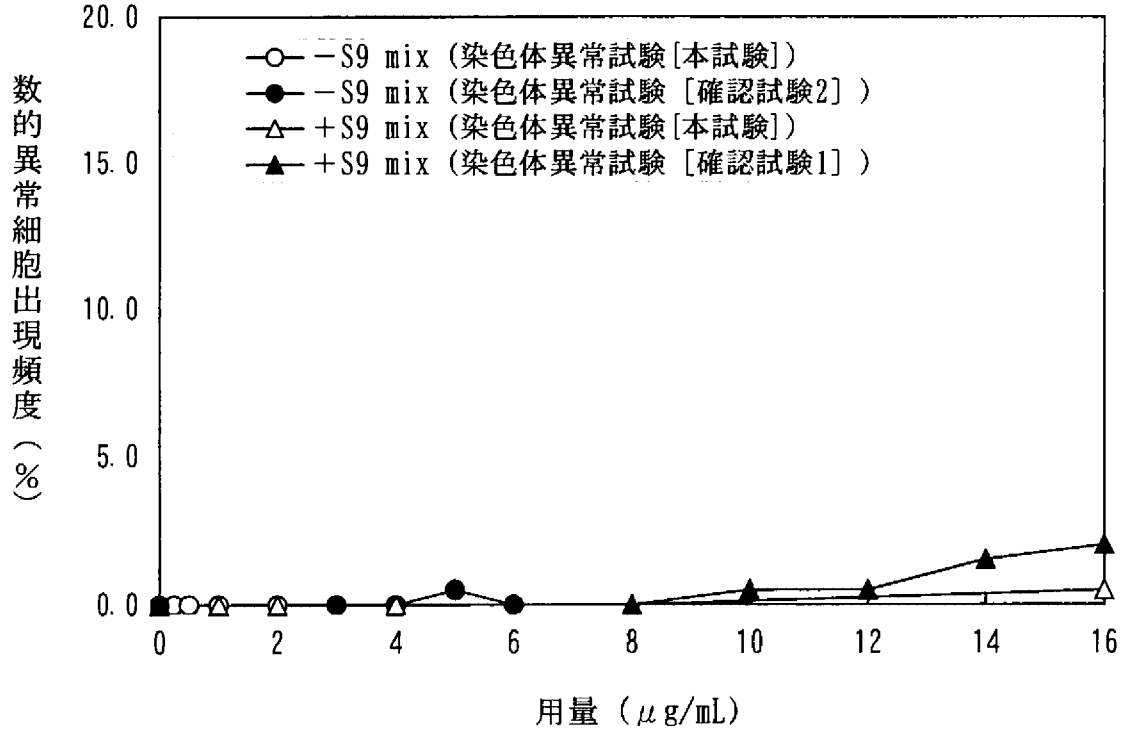


図6　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの構造異常細胞出現頻度（連続処理法）

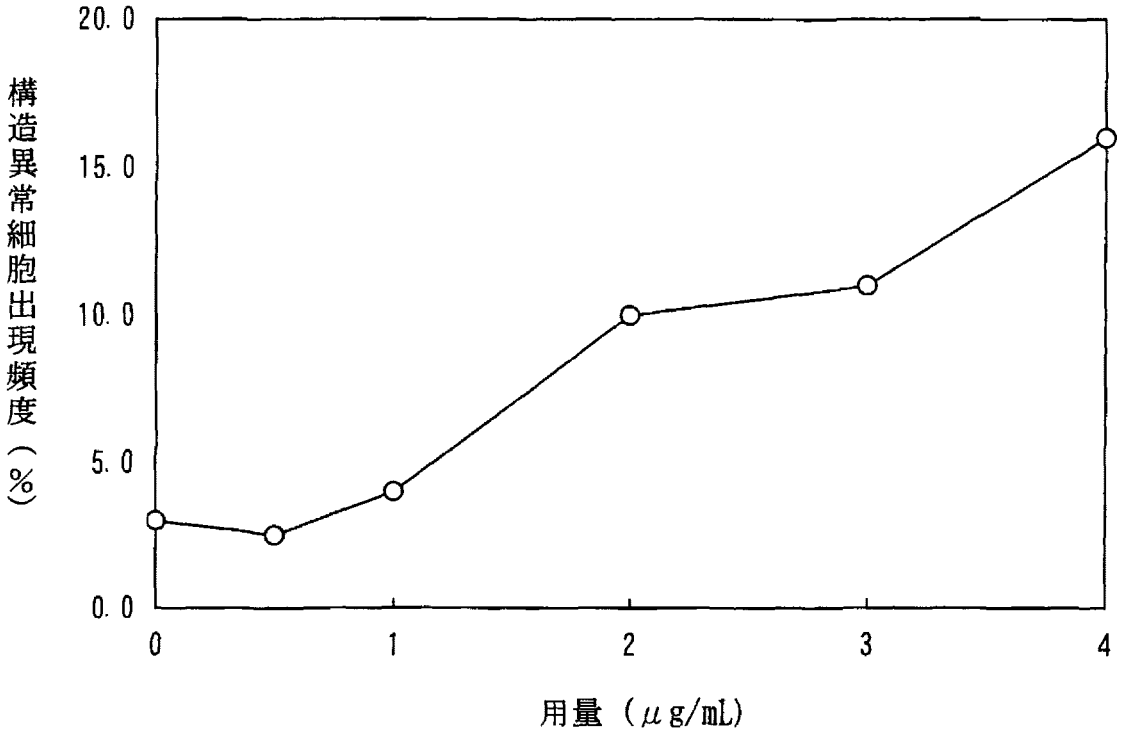
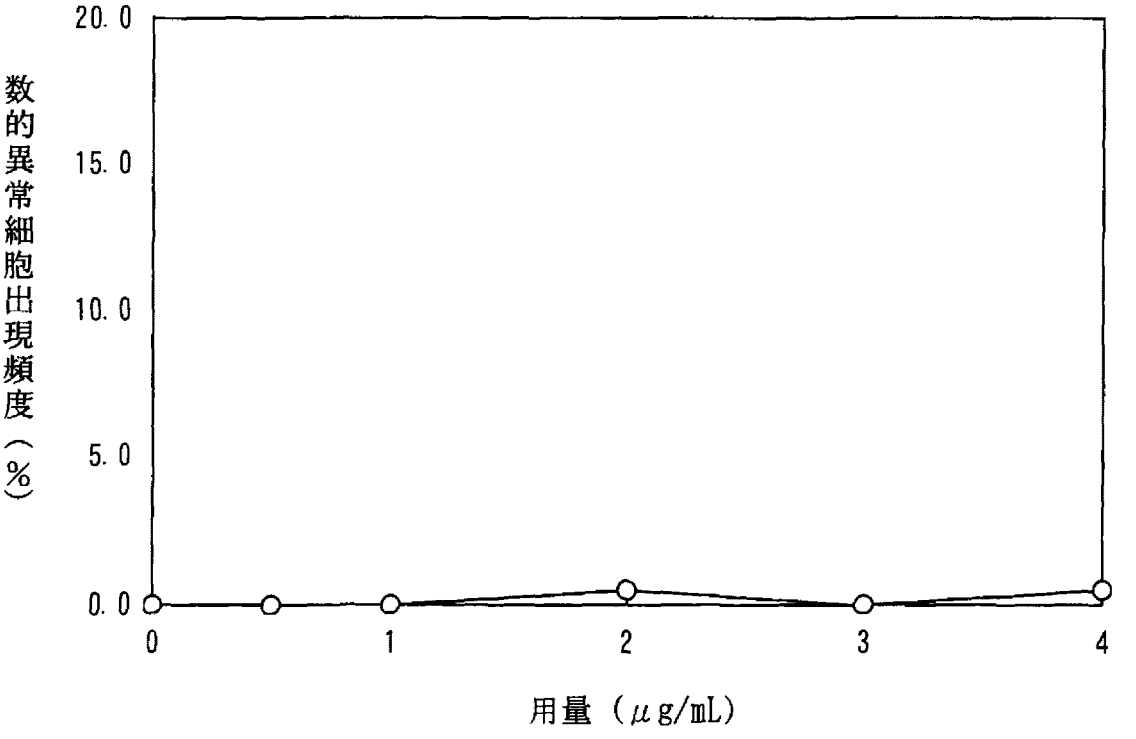



図7　*N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミンの数的異常細胞出現頻度（連続処理法）