



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最 終 報 告 書

4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) の
細菌を用いる復帰突然変異試験

M-1126

2004 年 3 月 4 日

株式会社 ボンリサーチセンター

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

	頁
目 次	1
要 約	7
緒 言	9
試験材料及び方法	10
1. 被験物質及び媒体	10
1) 被験物質	10
2) 媒体	11
2. 被験液の調製	11
1) 調製方法	11
2) 調製頻度	12
3) 安定性	12
3. 対照物質	12
1) 陰性対照物質	12
2) 陽性対照物質	12
4. 使用菌株	14
1) 菌株	14
2) 菌株の選択理由	15
3) 菌株の保存及び解凍	15
4) 菌株の特性検査	15

頁

5. S9 mix 及び培地の調製	15
1) S9 mix	15
2) 培地	17
6. 試験方法	19
1) 識別方法	19
2) 前培養	19
3) 用量の設定	20
4) プレート数	20
5) 濃度設定試験	20
6) 本試験	21
7) 追加確認試験	21
7. 判定基準	21
試験結果	22
1. 濃度設定試験	22
1) 培養終了後の観察結果	22
2) 復帰突然変異コロニー数	22
3) 試験系の成立条件	22
2. 本試験	23
1) 用量設定理由	23
2) 培養終了後の観察結果	23
3) 復帰突然変異コロニー数	23
4) 試験系の成立条件	23
考察及び結論	25

参考文献	26
------------	----

Tables and Figures

- Table 1 Results of the Dose-Range Finding Test on
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test
- Table 2 Results of the Dose-Range Finding Test on
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test
- Table 3 Results of the Main Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test
- Table 4 Results of the Main Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test
- Figure 1 Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis-
(2-chlorobenzene amine) with *Salmonella typhimurium* TA100
- Figure 2 Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis-
(2-chlorobenzene amine) with *Salmonella typhimurium* TA98
- Figure 3 Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis-
(2-chlorobenzene amine) with *Salmonella typhimurium* TA1535
- Figure 4 Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis-
(2-chlorobenzene amine) with *Salmonella typhimurium* TA1537
- Figure 5 Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis-
(2-chlorobenzene amine) with *Escherichia coli* WP2 *uvrA*

要 約

4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) の遺伝子突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略した) TA100、TA98、TA1535、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略した) WP2 *uvrA* を用いて復帰突然変異誘発試験を実施した。

試験は濃度設定試験及び本試験を実施し、非代謝活性化及び代謝活性化存在下の条件で、プレインキュベーション法によって実施した。被験物質の媒体にはジメチルスルホキシド (以下、DMSO と略した) を用いた。

1. 沈殿/結晶

濃度設定試験において、試験菌株の種類に関わらず、非代謝活性化存在下で 313 µg/plate 以上、代謝活性化存在下で 19.5 µg/plate 以上の被験物質処理群で白色の沈殿物が認められた。本試験では、試験菌株の種類に関わらず、非代謝活性化存在下で最高用量の 313 µg/plate、代謝活性化存在下で 19.5 µg/plate 以上の被験物質処理群で白色の沈殿物が認められた。

2. 生育阻害

濃度設定試験において、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、313 µg/plate 以上の被験物質処理群で試験菌株に対し生育阻害が認められた。本試験では、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、最高用量 313 µg/plate の被験物質処理群で試験菌株に対し生育阻害が認められた。

3. 復帰突然変異コロニー数

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、*S. typhimurium* TA100 及び TA98 の代謝活性化存在下で、19.5 µg/plate 以上の被験物質処理群で陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。一方、代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 及び *E. coli* WP2 *uvrA* では、全被験物質処理群 (濃度設定試験 : 0.0191 ~ 5000 µg/plate、本試験 : 2.44 ~ 313 µg/plate) で、陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、非代謝活性化存在下においては、試験菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群 (濃度設定試験 : 0.0191 ~ 5000 µg/plate、本試験 : 2.44 ~ 313 µg/plate) で、陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下において、4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は復帰突然変異誘発能を示す (陽性) と判定した。

緒 言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、4,4'-メチレンビス(2-クロロベンゼナミン)の安全性試験の一環として、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は、以下の情報とともに

により提供された (Attached Data 1)。特性分析は非 GLP で実施された。

供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製造者 :

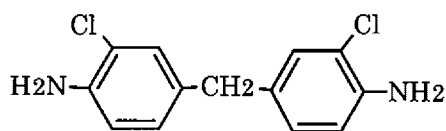
名称 : 4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン)

4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)

3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン

C A S 番号 : 101-14-4

構造式 :



示性式 : $C_{13}H_{12}Cl_2N_2$

純度 : 99.76 wt%

ロット番号 :

性状 : 白色針状粉末結晶

分子量 : 267.16

融点 : 110.5~111.0°C

沸点 : 195~200°C/20~26.7 pa

溶解性 : 水に不溶、DMSO 及びアセトンに易溶。

安定性 : 実験終了後に被験物質を に返却し、
被験物質を分析した結果、品質に問題はなく、実験期間中は安定
であった (Attached Data 2)。

保存方法 : 冷暗所保存 (冷蔵庫保存で保存期間中の実測温度: 機器登録No.
1456: 3~6°C、機器登録No.105: 2~6°C)、遮光、密閉

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室

取扱い上の注意 : 危険・有害性の評価は必ずしも十分ではないので、マスク、帽子及び防塵服を身に着けて取り扱いには十分注意した。

返 却 : 被験物質の残量はすべて試験委託者に返却した。

2) 媒体

名 称 : DMSO

ロット番号 : SEH4223

規 格 : 試薬特級

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保 存 方 法 : 室温

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

媒体の選択理由 : 試験を開始する前にあらかじめ媒体の適正を検討した。その結果、本被験物質は 50.0 mg/mL の濃度で DMSO に肉眼的に溶解し、発泡、発熱、吸熱及び変色等の変化は認められなかった。従って DMSO を媒体として選択した。

使用した主な標準操作手順書

SOP No. TSB-102 : 被験物質の受領・返却

SOP No. MUT-1000 : 細菌（微生物）を用いる復帰突然変異試験

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 濃度設定試験

被験物質 0.2500 g を 5 mL 容メスフラスコに秤取し、DMSO で溶解し、メスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 溶液（最少グルコース寒天平板培地に添加した際の最終用量：5000 µg/plate）を調製した。次いで、50.0 mg/mL 溶液を公比 4 で順次 9 段階希釈（各濃度の被験液 1.50 mL：DMSO 4.50 mL）し、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488、0.0122、0.00305、0.000763 及び 0.000191 mg/mL の計 10 濃度段階の被験液を調製した。

(2) 本試験

被験物質 0.500 g を 10 mL 容メスフラスコに秤取し、DMSO で溶解し、メスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 溶液（最少グルコース寒天平板培地に添加した際の最終用量：5000 µg/plate）を調製した。次いで、濃度設定試験の結果から、試験菌株の種類に関わらず、生育阻害が 3.13 mg/mL 以上の被験物質処理群で認められたため、本試験は、3.13 mg/mL 溶液を最高濃度とし、公比 2 で順次 7 段階希釈（各濃度の被験液 5.0 mL:DMSO 5.0 mL）し、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 mg/mL の計 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 調製頻度 : 使用時に調製し、保存しなかった。

3) 安定性 : 被験物質に DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色の変化、臭気、固化、凝集、乳化、層分離、急速な蒸発及び発光は認められなかった。

使用した主な標準操作手順書

SOP No.TSB-109 : 被験物質の溶液又は懸濁液調製法（媒体調製を含む）

SOP No. MUT-1000 : 細菌（微生物）を用いる復帰突然変異試験

3. 対照物質

1) 陰性対照物質

媒体（DMSO）を陰性対照とした。

2) 陽性対照物質

以下 5 種類の化学物質を陽性対照とした。各陽性対照物質はあらかじめ実験実施日までに秤量しておき、調製時まで -20℃ の冷凍庫で保存した。

(1) 代謝活性化

① 2-Aminoanthracene（以下、2AA と略した）

ロット番号 : M8E7779

製 造 元 : ナカライテスク株式会社
 純 度 : 96.0%
 保 存 方 法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

② Benzo[a]pyrene (以下、B[a]P と略した)

ロット番号 : M2N9306
 製 造 元 : ナカライテスク株式会社
 純 度 : 99.0%
 保 存 方 法 : 室温、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) 非代謝活性化

① 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (以下、AF-2 と略した)

ロット番号 : WAP0369
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 純 度 : 99.0%
 保 存 方 法 : 室温、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

② Sodium azide (以下、SAZ と略した)

ロット番号 : ELP2778
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 純 度 : 98.0%
 保 存 方 法 : 室温、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

③ 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine·2HCl
 (以下、ICR-191 と略した)

ロット番号 : 492624
 製 造 元 : Polysciences, Inc.
 純 度 : 98.0%
 保 存 方 法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(3) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験ガイドラインに準じて選択した。

(4) 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、試薬特級、ロット番号 WAF5040）に溶解し、SAZ は注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 3A75N）に溶解した。それぞれの調製濃度を表 1 に示した。調製後は雑菌を除去するために濾過（使用フィルター：Whatman 0.2 μm 、ロット番号 98393）滅菌して使用した。

表 1 陽性対照物質の調製及び処理濃度

試験菌株	非代謝活性化（-S9 mix）		代謝活性化（+S9 mix）	
	陽性対照物質	調製濃度 $\mu\text{g/mL}$	陽性対照物質	調製濃度 $\mu\text{g/mL}$
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1.0 (0.1)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5.0 (0.5)	2AA	20 (2.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10.0 (1.0)	B[a]P	50 (5.0)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100 (10.0)

() 内の数値は、プレートに処理した時の処理用量($\mu\text{g/plate}$)を示した。

使用した主な標準操作手順書

SOP No. MUT-1000 : 細菌（微生物）を用いる復帰突然変異試験

SOP No. MUT-0404 : 変異原性試験室における発癌性・有毒物質の取り扱い

4. 使用菌株

1) 菌株

次の 5 種類の菌株を用いた。

① 塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

② フレームシフト型

S. typhimurium TA98*S. typhimurium* TA1537

上記菌株は、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より入手（1997 年 10 月 9 日）した。

2) 菌株の選択理由

毒性試験ガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

3) 菌株の保存及び解凍

入手した菌株を培養して得られた菌懸濁液 0.8 mL に対して、DMSO（和光純薬工業株式会社、試薬特級、ロット番号 SEG4422）を 0.07 mL の割合で添加し、 -80°C 設定の超低温フリーザー（日本フリーザー株式会社：CL-312）で保存した。使用する時は室温で解凍した。

4) 菌株の特性検査

凍結保存した菌株について、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬物耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性及び菌増殖率の各特性検査を 2003 年 5 月 26 日から 2003 年 5 月 28 日に実施し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認した。

5. S9 mix 及び培地の調製

1) S9 mix

S9 及び補酵素（S9/コファクターA セット ロット番号 A030801051、オリエンタル酵母工業株式会社）を混合し、S9 mix を調製した。調製は用時に行った。

(1) S9

名 称	: S9
ロット番号	: 03080105
製 造 日	: 2003 年 8 月 1 日
購 入 日	: 2003 年 8 月 28 日

種・系統 : ラット・SD系
 性 : 雄
 週 齢 : 7 週齢
 体 重 : 215.2 ± 8.8 g (Mean $\pm$ S.D.)
 誘導物質 : フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
 投 与 法 : 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight
 BF 1日間 80mg/kg body weight
 保存方法 : 冷凍 (−80℃設定の冷凍庫保存)
 使用期限 : 2004年 1月 31日 (製造後6箇月以内)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) 補酵素

名 称 : コファクターA
 ロット番号 : A03073105
 製 造 日 : 2003年 7月 31日
 購 入 日 : 2003年 8月 28日
 保存方法 : 冷凍 (−80℃設定の冷凍庫保存)
 使用期限 : 2004年 1月 30日 (製造後6箇月以内)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(3) S9 mix の組成

S9	1 mL		
補酵素	9 mL	0.4M 塩化マグネシウム水溶液	0.2 mL
		1.65M 塩化カリウム水溶液	0.2 mL
		1.0M グルコース・6-リン酸水溶液	0.05 mL
		0.1M 還元型ニコチンアミド・アデニン	
		ジヌクレオチドリリン酸(NADPH)水溶液	0.4 mL
		0.1M 還元型ニコチンアミド・アデニン	
		ジヌクレオチド(NADH)水溶液	0.4 mL
		0.2M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)	5.0 mL
		精製水	2.75 mL

2) 培地

(1) 最少グルコース寒天平板培地

最少グルコース寒天平板培地は、オリエンタル酵母工業株式会社から購入したものを用了。

名 称 : 最少グルコース寒天培地 BZ

ロット番号 : BZ020GS

製 造 日 : 2003 年 7 月 17 日

購 入 日 : 2003 年 8 月 25 日

使用期限 : 2004 年 1 月 16 日

保存方法 : 常温

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) ニュートリエントブロス培養液

ニュートリエントブロス 12.50 g を精製水 500 mL に溶解し、オートクレーブによる殺菌処理 (121℃、20 分処理、機器登録No.939) を行い、調製した。調製後、使用時まで室温で保存した。

名 称 : ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No.2)

ロット番号 : 59365

製 造 元 : UNIPATH LTD.

保存方法 : 室温

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(3) 0.1 M ナトリウム - リン酸緩衝液 (pH 7.4)

リン酸二水素ナトリウム二水和物 3.90 g を精製水 250 mL に溶解し、調製した。次に、リン酸水素二ナトリウム 14.20 g を精製水 1000 mL に溶解し、調製した。以上、二つの水溶液を混合し、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) とし、オートクレーブによる殺菌処理 (121℃、20 分処理、機器登録No.939) を行い、調製した。調製後、使用時まで室温で保存した。

① 名 称 : リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

ロット番号 : SEG2423

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保存方法 : 室温保存

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

- ② 名 称 : リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4)
 ロット番号 : MOR2526
 製 造 元 : ナカライテスク株式会社
 保 存 方 法 : 室温保存
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(4) 0.5 mM D-ビオチン-0.5 mM L-ヒスチジン溶液

D-ビオチン 30.5 mg を 1 mol/L 水酸化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、ロット番号 WAL7492) 0.3 mL に溶解し、L-ヒスチジン塩酸一水和物 26.2 mg を加え、精製水 250 mL に溶解し、調製した。調製後は濾過 (IWAKI 0.2 μm 、ロット番号 06502003) 滅菌し、使用時まで冷蔵 (機器登録No.941) 保存した。

- ① 名 称 : D-ビオチン((+)-Biotin, Vitamin H)
 ロット番号 : ELP3763
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 保 存 方 法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

- ② 名 称 : L-ヒスチジン塩酸塩一水和物
 (L-Histidine Hydrochloride Monohydrate)
 ロット番号 : TCN4471
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 保 存 方 法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(5) 0.5mM L-トリプトファン溶液

L-トリプトファン 25.2 mg を精製水 250 mL に溶解し、調製した。調製後は濾過 (IWAKI 0.2 μm 、ロット番号 06502003) 滅菌し、使用時まで冷蔵 (機器登録No.941) 保存した。

- 名 称 : L-Tryptophan
 ロット番号 : TCL2695
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 保 存 方 法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(6) トップアガー

以下に示す寒天を用いて調製した軟寒天液(0.6 % Agar, 0.6 % NaCl:ナカライテスク株式会社、試薬特級、ロット番号 V2F7063)に、*S. typhimurium* TA 株は 0.5 mM D-ビオチン-0.5 mM L-ヒスチジン溶液、*E. coli* 株では 0.5 mM L-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量加え、調製した。

名 称 : BACTO-AGAR
 ロット番号 : 2087878
 製 造 元 : DIFCO LABORATORIES
 保 存 方 法 : 室温
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

6. 試験方法¹⁻⁵⁾

1) 識別方法

(1) 菌株の識別

菌株の種類毎に、以下に示す色のラベルを貼り識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA98	緑
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>S. typhimurium</i> TA1537	赤
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	黄

(2) 濃度の識別

非代謝活性化を「-」、代謝活性化を「+」とし、これに続けて陰性対照 (Solvent Control) を「SC」、陽性対照 (Positive Control) を「PC」、被験物質処理を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を明記したラベルで識別した。

2) 前培養

- (1) ニュートリエントブロス 30 mL を入れた培養用三角フラスコに、*S. typhimurium* TA 株は各 60 μ L、*E. coli* 株は 30 μ L の菌懸濁液を植菌した。
- (2) 試験には、37°C で 8 時間前培養 (振盪培養装置 : BIOSPIN MBS-1、東京理化学器械株式会社) した後の菌懸濁液を用いた。前培養終了時に菌懸濁液の吸光度を測定 (分光光度計 : UVIDEC-66、協和医科器械株式会社) し、生菌数が 1×10^9 個/mL

以上であることを確認した（表 2）。なお、菌懸濁液は、使用まで急激な温度変化を避けるため室温下に放置した。

表 2 菌株の生菌数

菌株	濃度設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	$1.30 \times 10^9/\text{mL}$	$1.32 \times 10^9/\text{mL}$
<i>S. typhimurium</i> TA98	$1.51 \times 10^9/\text{mL}$	$1.66 \times 10^9/\text{mL}$
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$1.14 \times 10^9/\text{mL}$	$1.39 \times 10^9/\text{mL}$
<i>S. typhimurium</i> TA1537	$1.13 \times 10^9/\text{mL}$	$1.15 \times 10^9/\text{mL}$
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	$3.45 \times 10^9/\text{mL}$	$3.45 \times 10^9/\text{mL}$

3) 用量の設定

(1) 濃度設定試験

最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、以下公比 4 で希釈した 1250、313、78.1、19.5、4.88、1.22、0.305、0.0763 及び 0.0191 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の計 10 用量を設定した。

(2) 本試験

濃度設定試験の結果から、試験菌株の種類に関わらず、生育阻害が 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の被験物質処理群で認められたため、本試験は 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、以下公比 2 で 7 段階希釈した 156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88 及び 2.44 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の計 8 用量を設定した。

4) プレート数

濃度設定試験及び本試験は、被験物質処理群当たり 3 枚のプレートを用いた。

5) 濃度設定試験

(1) 非代謝活性化では 0.1M ナトリウムーリン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL を、代謝活性化では S9 mix 0.5 mL を加えた後、被験液を 0.1 mL 添加し、それぞれに各菌懸濁液 0.1 mL を加えた。

(2) 37℃で 20 分間振盪（ブレインキューベーション）し、これにトップアガーを 2.0 mL 加えて攪拌後、最少グルコース寒天平板培地に重層した。

(3) 37℃で 48 時間培養した後、試験菌株の生育阻害並びに沈殿及び結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。この結果、白色沈殿物の析出が認められたため、出現した復帰突然変異コロニーは肉眼により手動で計数した。なお、陽性対照群の

復帰突然変異コロニーは自動コロニーカウンター（バイオマルチスキャナー BMS-400、東洋測器株式会社）を用いて計数した。

6) 本試験

操作は濃度設定試験と同じ手順で行った。

7) 追加確認試験

特に必要性が認められなかったため実施しなかった。

7. 判定基準

結果の判定は、被験物質処理における復帰突然変異コロニー数が自然復帰突然変異コロニー数に対して明らかに増加し（溶媒対照の2倍を目安とする）、この増加に用量反応性が認められ、また濃度設定試験・本試験の各判定に再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

試験結果

1. 濃度設定試験

濃度設定試験の結果を Table 1、2 及び Figure 1～5（上段）に示した。

1) 培養終了後の観察結果

培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察においては、非代謝活性化存在下で 313 µg/plate 以上、代謝活性化存在下で 19.5 µg/plate 以上の被験物質処理群で白色の沈殿物が認められた。一方、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、313 µg/plate 以上の被験物質処理群で試験菌株に対し生育阻害が認められた。

2) 復帰突然変異コロニー数

濃度設定試験において、*S. typhimurium* TA100 及び TA98 の代謝活性化存在下で、19.5 µg/plate 以上の被験物質処理群で溶媒対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。最大復帰突然変異コロニー数は、*S. typhimurium* TA100 の代謝活性化存在下において 78.1 µg/plate で 4.81 倍、TA98 の代謝活性化存在下において 78.1 µg/plate で 3.58 倍を示した。

一方、代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 及び *E. coli* WP2 *uvrA* では、全被験物質処理群（0.0191～5000 µg/plate）で、陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、非代謝活性化存在下においては、試験菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群（0.0191～5000 µg/plate）で、陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

3) 試験系の成立条件

- (1) 陽性対照群では、各菌株の陰性対照に比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。
- (2) すべての用量群について 3 枚のプレートにおける個々の復帰突然変異コロニー数に顕著な差は認められなかった。
- (3) 各菌株の代謝活性化の有無による陰性対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データ管理値（Attached Data 3）の範囲以内であったため、試験系は成立したものと判断した。

2. 本試験

本試験の結果を Table 3、4 及び Figure 1～5（下段）に示した。

1) 用量設定理由

濃度設定試験の結果、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、313 µg/plate 以上の被験物質処理群で試験菌株に対し生育阻害が認められたため、本試験における被験物質用量は、生育阻害が認められた最低用量の 313 µg/plate を最高用量とし、これを公比 2 で 7 段階希釈した 156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88 及び 2.44 µg/plate の計 8 用量を設定した。

2) 培養終了後の観察結果

培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察においては、試験菌株の種類に関わらず、非代謝活性化存在下で最高用量の 313 µg/plate、代謝活性化存在下で 19.5 µg/plate 以上の被験物質処理群で白色の沈殿物が認められた。一方、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、最高用量 313 µg/plate の被験物質処理群で試験菌株に対し生育阻害が認められた。

3) 復帰突然変異コロニー数

本試験において、*S. typhimurium* TA100 及び TA98 の代謝活性化存在下で、19.5 µg/plate 以上の被験物質処理群において、陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。最大復帰突然変異コロニー数は、*S. typhimurium* TA100 の代謝活性化存在下において 156 µg/plate で 5.65 倍、TA98 の代謝活性化存在下において 156 µg/plate で 3.58 倍を示した。

一方、代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 及び *E. coli* WP2 *uvrA* では、全被験物質処理群（2.44～313 µg/plate）で、陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、非代謝活性化存在下においては、試験菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群（2.44～313 µg/plate）で、陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

4) 試験系の成立条件

(1) 陽性対照群では、各菌株の陰性対照に比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロ

ニー数の増加が認められた。

- (2) すべての用量群について3枚のプレートにおける個々の復帰突然変異コロニー数に顕著な差は認められなかった。
- (3) 各菌株の代謝活性化の有無による陰性対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データ管理値 (Attached Data 3) の範囲以内であったため、試験系は成立したものと判断した。

考察及び結論

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、*S. typhimurium* TA100 及び TA98 の代謝活性化存在下で、19.5 µg/plate 以上の被験物質処理群において、陰性対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。この結果より、本被験物質は代謝活性化存在下において、特にプラスミド pKM101 を保持する *S. typhimurium* TA100 の塩基対置換型変異及び TA98 のフレームシフト型変異を誘発する物質であることが示唆された。なお、変異の最大比活性値 (Attached Data 4) は、*S. typhimurium* TA100 の代謝活性化存在下において、19.5 µg/plate の被験物質処理群で、8821 revertants/mg/plate であった。したがって、本被験物質の復帰突然変異試験の結果は陽性であると判断した。

一方、陽性対照群では各菌株の陰性対照群に比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加を示したことから、試験菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認された。更に、各菌株の代謝活性化の有無による陰性対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データと比較して異常と考えられる数値を示さず、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、本被験物質は既に人において長期または反復暴露で、発癌性^{6,7,8)}を示し、遺伝子損傷^{6,9,10,11,12)}を引き起こすと報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下において、4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する (陽性) と判断した。

参考文献

- 1) Bruce N. Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*. 31, 347-364.
- 2) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. 113, 173-215.
- 3) 石館 基 (監修) (1991): 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦、松井道子編集)、株式会社エル・アイ・シー、東京
- 4) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集 (1992): 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q & A、pp.1-21 及び 81-89、サイエンティスト社、東京
- 5) 日本バイオアッセイ研究センター編集 (1999): 微生物を用いる変異原性試験手法解説、pp.1-86、富士オフセット株式会社、東京
- 6) IARC (1993): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol.57, p.271-303. International Agency for Research on Cancer, Lyon.Also Suppl.7, p.246-247.
- 7) E.Ward, et al. (1987): 4,4'-Methylenebis(2-Chloroaniline): An Unregulated Carcinogens, *Am.J.Ind.Med.*, 12, 537-549.
- 8) E.Ward, et al. (1988): Bladder tumors in two young males occupationally exposed to MBOCA. *Am.J.Ind.Med.*, 14, 267-272.
- 9) K.Hayashi, et al. (1987): Study of Mutagenicity of Epoxy Resin Hardeners by Fluctuation Test, *Jpn.J.Ind.Health*, 29, 480-485.

- 10) H.Mori, et al. (1988): Genotoxicity of epoxy resin hardeners in the hepatocyte primary culture/DNA repair test. *Mutation Research*. **204**, 683-688.
- 11) C.A. McQueen, and G.M. Williams, (1990): Review of the genotoxicity and carcinogenicity of 4,4'-methylene-dianiline and 4,4'-methylene-bis 2-chloroaniline. *Mutation Research*. **239**, 133-142.
- 12) B.I. Kuslikis, et al. (1991): Mutagenicity and effects on gap-junctional intercellular communication of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) and its oxidized metabolites. *Mutagenesis*, **6**, 19-24.

Table 1 Results of the Dose-Range Finding Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine) without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of revertant colonies/plate (Mean±Standard Deviation)				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2uvrA	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
Negative control	0		99 94 108 (100 ± 7.1)	18 11 18 (16 ± 4.0)	32 25 38 (32 ± 6.5)	16 16 18 (17 ± 1.2)	17 15 12 (15 ± 2.5)
			92 98 98 (96 ± 3.5)	10 10 7 (9 ± 1.7)	37 34 39 (37 ± 2.5)	16 19 17 (17 ± 1.5)	12 15 18 (15 ± 3.0)
Test article	0.0191	S9 mix (-)	90 97 93 (93 ± 3.5)	8 8 6 (7 ± 1.2)	33 35 35 (34 ± 1.2)	11 10 11 (11 ± 0.6)	12 12 17 (14 ± 2.9)
	0.0763		91 97 90 (93 ± 3.8)	7 12 7 (9 ± 2.9)	31 37 30 (33 ± 3.8)	17 18 15 (17 ± 1.5)	10 10 9 (10 ± 0.6)
	0.305		90 96 90 (92 ± 3.5)	7 8 10 (8 ± 1.5)	28 28 39 (32 ± 6.4)	15 10 15 (13 ± 2.9)	14 16 16 (15 ± 1.2)
	1.22		85 86 84 (85 ± 1.0)	10 10 13 (11 ± 1.7)	26 31 29 (29 ± 2.5)	10 19 17 (15 ± 4.7)	16 17 10 (14 ± 3.8)
	4.88		74 69 76 (73 ± 3.6)	11 8 8 (9 ± 1.7)	42 34 37 (38 ± 4.0)	12 17 18 (16 ± 3.2)	23 21 14 (19 ± 4.7)
	19.5		80 78 76 (78 ± 2.0)	8 10 10 (9 ± 1.2)	45 32 56 (44 ± 12.0)	14 20 20 (18 ± 3.5)	22 24 21 (22 ± 1.5)
	78.1		39 *† 40 *† 48 *† (42 ± 4.9)	3 *† 5 *† 7 *† (5 ± 2.0)	33 *† 27 *† 24 *† (28 ± 4.6)	2 *† 4 *† 4 *† (3 ± 1.2)	7 *† 8 *† 12 *† (9 ± 2.6)
	1250		55 *† 56 *† 51 *† (54 ± 2.6)	6 *† 5 *† 3 *† (5 ± 1.5)	27 *† 33 *† 28 *† (29 ± 3.2)	0 *† 0 *† 0 *† (0 ± 0.0)	4 *† 2 *† 6 *† (4 ± 2.0)
	5000		4 *† 3 *† 7 *† (5 ± 2.1)	4 *† 4 *† 0 *† (3 ± 2.3)	21 *† 14 *† 35 *† (23 ± 10.7)	0 *† 0 *† 0 *† (0 ± 0.0)	3 *† 6 *† 2 *† (4 ± 2.1)
Positive control	Name		AF-2 ^{#1}	SAZ ^{#2}	AF-2 ^{#1}	AF-2 ^{#1}	ICR-191 ^{#3}
	Dose (µg/plate)		0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of revertant colonies/plate		455 489 421 (455 ± 34.0)	259 265 253 (259 ± 6.0)	298 311 281 (297 ± 15.0)	261 277 290 (276 ± 14.5)	1255 1308 1298 (1287 ± 28.2)

Negative control: Dimethylsulfoxide

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, #2: Sodium azide

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl

*: Growth inhibition of tester strains was observed.

†: Deposition of precipitation was observed on the surface of agar plates.

Table 2 Results of the Dose-Range Finding Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine) with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of revertant colonies/plate (Mean±Standard Deviation)				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2uvrA	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
Negative control	0		96	10	30	22	16
			96	11	37	29	12
			98 (97 ± 1.2)	10 (10 ± 0.6)	36 (34 ± 3.8)	21 (24 ± 4.4)	12 (13 ± 2.3)
Test article	0.0191	S9 mix (+)	102	9	36	29	13
			107	9	35	29	9
			106 (105 ± 2.6)	9 (9 ± 0.0)	31 (34 ± 2.6)	22 (27 ± 4.0)	14 (12 ± 2.6)
	0.0763		115	11	36	19	26
			129	9	42	26	21
			127 (124 ± 7.6)	8 (9 ± 1.5)	32 (37 ± 5.0)	17 (21 ± 4.7)	21 (23 ± 2.9)
	0.305		138	7	38	35	18
			152	11	31	23	25
			156 (149 ± 9.5)	8 (9 ± 2.1)	30 (33 ± 4.4)	24 (27 ± 6.7)	24 (22 ± 3.8)
	1.22		166	11	32	20	16
			159	7	26	22	17
			157 (161 ± 4.7)	10 (9 ± 2.1)	31 (30 ± 3.2)	26 (23 ± 3.1)	24 (19 ± 4.4)
	4.88		175	9	43	43	24
			186	8	37	35	10
			189 (183 ± 7.4)	5 (7 ± 2.1)	35 (38 ± 4.2)	33 (37 ± 5.3)	16 (17 ± 7.0)
	19.5		256 †	19 †	27 †	63 †	12 †
			279 †	14 †	35 †	53 †	12 †
			272 † (269 ± 11.8)	12 † (15 ± 3.6)	33 † (32 ± 4.2)	49 † (55 ± 7.2)	18 † (14 ± 3.5)
	78.1		430 †	7 †	33 †	93 †	12 †
			505 †	12 †	31 †	76 †	13 †
			467 † (467 ± 37.5)	13 † (11 ± 3.2)	39 † (34 ± 4.2)	90 † (86 ± 9.1)	13 † (13 ± 0.6)
	313		146 *†	13 *†	49 *†	2 *†	10 *†
			137 *†	12 *†	46 *†	4 *†	6 *†
			140 *† (141 ± 4.6)	9 *† (11 ± 2.1)	37 *† (44 ± 6.2)	6 *† (4 ± 2.0)	6 *† (7 ± 2.3)
	1250		110 *†	14 *†	35 *†	2 *†	8 *†
			106 *†	9 *†	36 *†	6 *†	9 *†
			104 *† (107 ± 3.1)	10 *† (11 ± 2.6)	44 *† (38 ± 4.9)	6 *† (5 ± 2.3)	9 *† (9 ± 0.6)
	5000		92 *†	14 *†	40 *†	0 *†	4 *†
			84 *†	10 *†	40 *†	0 *†	5 *†
			94 *† (90 ± 5.3)	10 *† (11 ± 2.3)	30 *† (37 ± 5.8)	0 *† (0 ± 0.0)	7 *† (5 ± 1.5)
	Positive control		Name		B[a]P ^{#4}	2AA ^{#5}	2AA ^{#5}
Dose (µg/plate)			5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
Number of revertant colonies/plate		499	113	375	312	88	
		527	122	394	356	108	
		512 (513 ± 14.0)	130 (122 ± 8.5)	405 (391 ± 15.2)	329 (332 ± 22.2)	96 (97 ± 10.1)	

Negative control: Dimethylsulfoxide

#4: Benzo[a]pyrene , #5: 2-Aminoanthracene

*: Growth inhibition of tester strains was observed.

†: Deposition of precipitation was observed on the surface of agar plates.

Table 3 Results of the Main Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine) without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of revertant colonies/plate (Mean±Standard Deviation)				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2uvrA	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
Negative control	0		94 93 99 (95 ± 3.2)	8 10 9 (9 ± 1.0)	16 24 20 (20 ± 4.0)	14 11 12 (12 ± 1.5)	12 11 11 (11 ± 0.6)
			104 102 116 (107 ± 7.6)	8 9 6 (8 ± 1.5)	15 18 23 (19 ± 4.0)	15 12 18 (15 ± 3.0)	9 14 9 (11 ± 2.9)
Test article	2.44	S9 mix (-)	92 95 102 (96 ± 5.1)	9 9 9 (9 ± 0.0)	25 21 30 (25 ± 4.5)	11 11 13 (12 ± 1.2)	10 9 10 (10 ± 0.6)
	4.88		88 95 112 (98 ± 12.3)	13 7 7 (9 ± 3.5)	29 27 23 (26 ± 3.1)	16 18 12 (15 ± 3.1)	15 10 7 (11 ± 4.0)
	9.77		92 94 104 (97 ± 6.4)	13 11 9 (11 ± 2.0)	24 21 30 (25 ± 4.6)	14 11 12 (12 ± 1.5)	13 13 10 (12 ± 1.7)
	19.5		94 108 128 (110 ± 17.1)	7 10 7 (8 ± 1.7)	29 24 22 (25 ± 3.6)	14 13 13 (13 ± 0.6)	13 9 11 (11 ± 2.0)
	39.1		93 110 112 (105 ± 10.4)	11 5 8 (8 ± 3.0)	22 16 18 (19 ± 3.1)	11 14 13 (13 ± 1.5)	10 11 10 (10 ± 0.6)
	78.1		68 60 48 (59 ± 10.1)	7 6 8 (7 ± 1.0)	22 18 20 (20 ± 2.0)	14 20 12 (15 ± 4.2)	7 7 6 (7 ± 0.6)
	156		63 *† 63 *† 56 *† (61 ± 4.0)	6 *† 5 *† 5 *† (5 ± 0.6)	16 *† 21 *† 24 *† (20 ± 4.0)	9 *† 6 *† 6 *† (7 ± 1.7)	6 *† 4 *† 4 *† (5 ± 1.2)
	313						
	Name		AF-2 ^{#1}	SAZ ^{#2}	AF-2 ^{#1}	AF-2 ^{#1}	ICR-191 ^{#3}
	Dose (µg/plate)		0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of revertant colonies/plate		492 504 497 (498 ± 6.0)	315 310 289 (305 ± 13.8)	268 297 280 (282 ± 14.6)	367 391 366 (375 ± 14.2)	1109 1097 1041 (1082 ± 36.3)

Negative control: Dimethylsulfoxide

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, #2: Sodium azide

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl

*: Growth inhibition of tester strains was observed.

†: Deposition of precipitation was observed on the surface of agar plates.

Table 4 Results of the Main Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine) with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (μg/plate)	S9 mix	Number of revertant colonies/plate (Mean±Standard Deviation)				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2uvrA	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
Negative control	0		104	7	24	26	13
			104	9	27	22	14
			110 (106 ± 3.5)	7 (8 ± 1.2)	30 (27 ± 3.0)	30 (26 ± 4.0)	15 (14 ± 1.0)
Test article	2.44	S9 mix (+)	110	8	21	32	11
			112	12	27	33	15
			102 (108 ± 5.3)	9 (10 ± 2.1)	20 (23 ± 3.8)	30 (32 ± 1.5)	12 (13 ± 2.1)
	4.88		130	7	28	46	15
			138	11	22	34	14
			139 (136 ± 4.9)	12 (10 ± 2.6)	30 (27 ± 4.2)	36 (39 ± 6.4)	11 (13 ± 2.1)
	9.77		168	11	32	45	14
			183	8	23	44	14
			183 (178 ± 8.7)	8 (9 ± 1.7)	24 (26 ± 4.9)	45 (45 ± 0.6)	12 (13 ± 1.2)
	19.5		264 †	8 †	29 †	49 †	10 †
			280 †	10 †	32 †	54 †	11 †
			285 † (276 ± 11.0)	7 † (8 ± 1.5)	20 † (27 ± 6.2)	52 † (52 ± 2.5)	7 † (9 ± 2.1)
	39.1		410 †	14 †	29 †	61 †	15 †
			434 †	11 †	22 †	61 †	13 †
			398 † (414 ± 18.3)	11 † (12 ± 1.7)	29 † (27 ± 4.0)	60 † (61 ± 0.6)	13 † (14 ± 1.2)
	78.1		518 †	11 †	30 †	89 †	16 †
			600 †	15 †	22 †	85 †	19 †
			566 † (561 ± 41.2)	17 † (14 ± 3.1)	30 † (27 ± 4.6)	84 † (86 ± 2.6)	12 † (16 ± 3.5)
	156		556 †	14 †	34 †	90 †	14 †
			644 †	17 †	32 †	99 †	12 †
			598 † (599 ± 44.0)	8 † (13 ± 4.6)	26 † (31 ± 4.2)	89 † (93 ± 5.5)	7 † (11 ± 3.6)
	313		193 *†	9 *†	23 *†	17 *†	7 *†
			145 *†	8 *†	19 *†	13 *†	9 *†
			180 *† (173 ± 24.8)	8 *† (8 ± 0.6)	22 *† (21 ± 2.1)	26 *† (19 ± 6.7)	9 *† (8 ± 1.2)
Positive control	Name		B[a]P ^{#4}	2AA ^{#5}	2AA ^{#5}	B[a]P ^{#4}	B[a]P ^{#4}
	Dose (μg/plate)		5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of revertant colonies/plate	508	121	380	233	130	
		515	110	390	237	114	
		509 (511 ± 3.8)	117 (116 ± 5.6)	403 (391 ± 11.5)	255 (242 ± 11.7)	119 (121 ± 8.2)	

Negative control: Dimethylsulfoxide

#4: Benzo[a]pyrene 、 #5: 2-Aminoanthracene

*: Growth inhibition of tester strains was observed.

†: Deposition of precipitation was observed on the surface of agar plates.

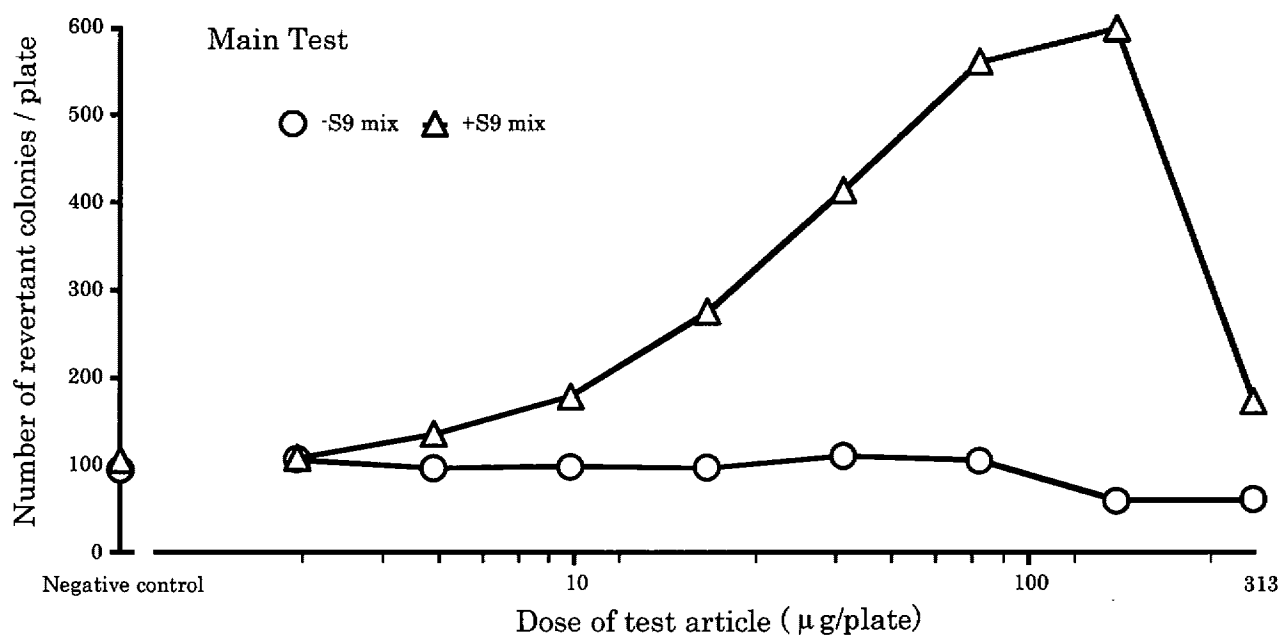
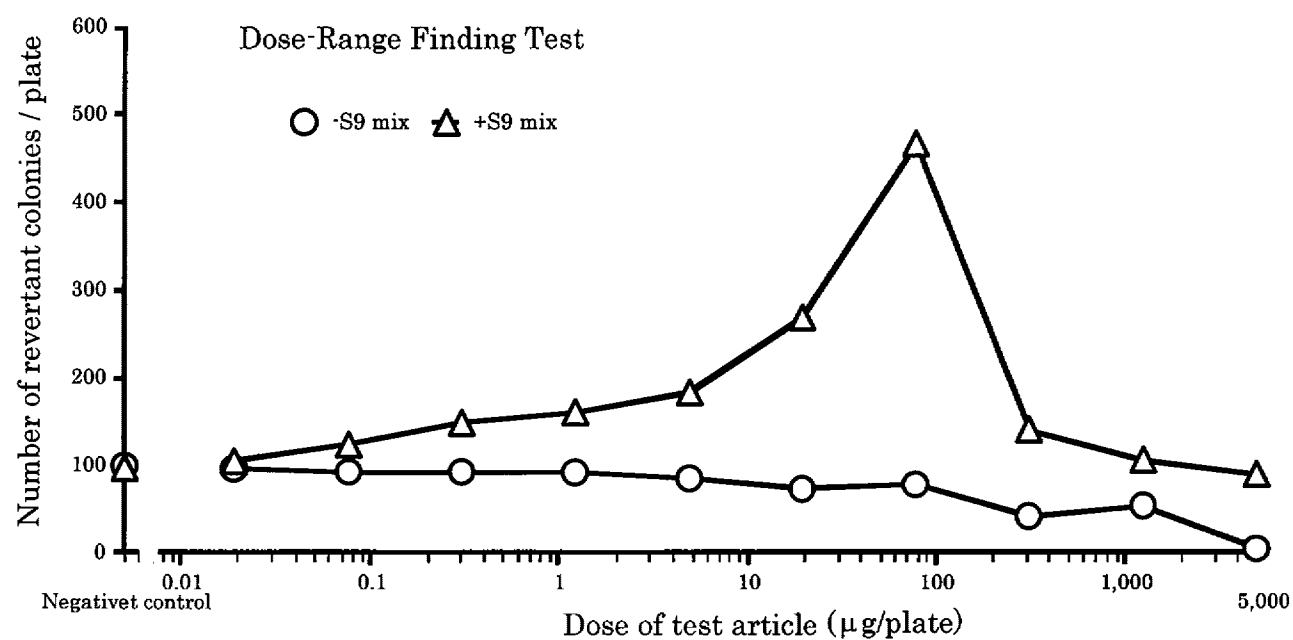
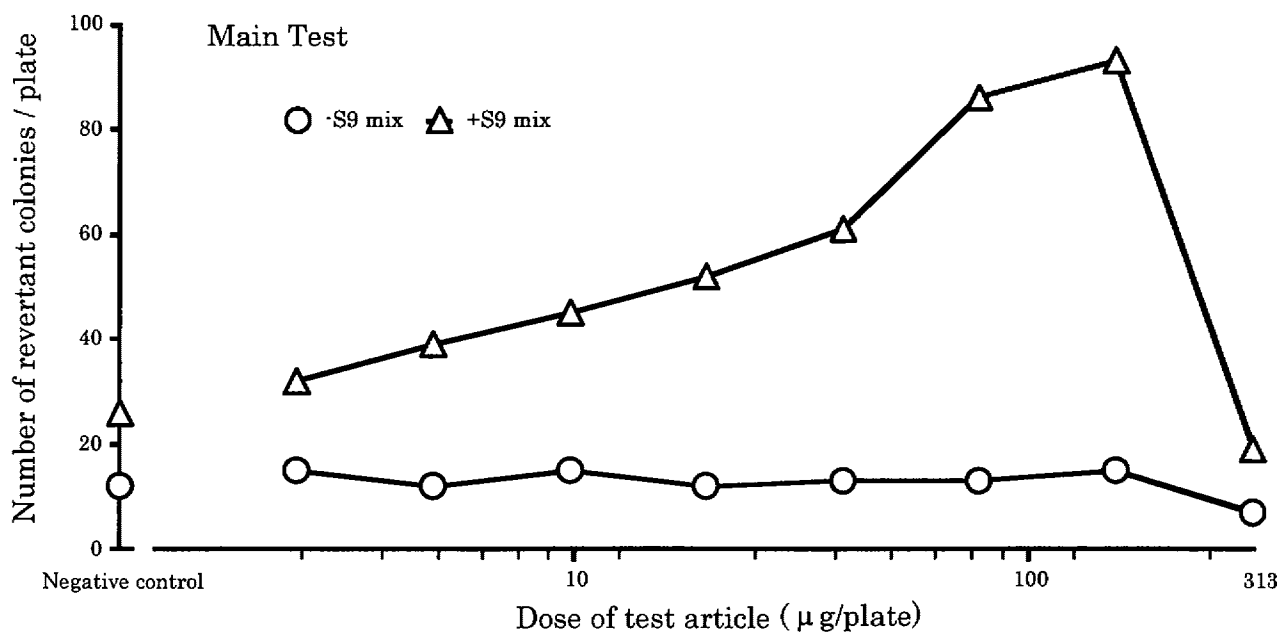
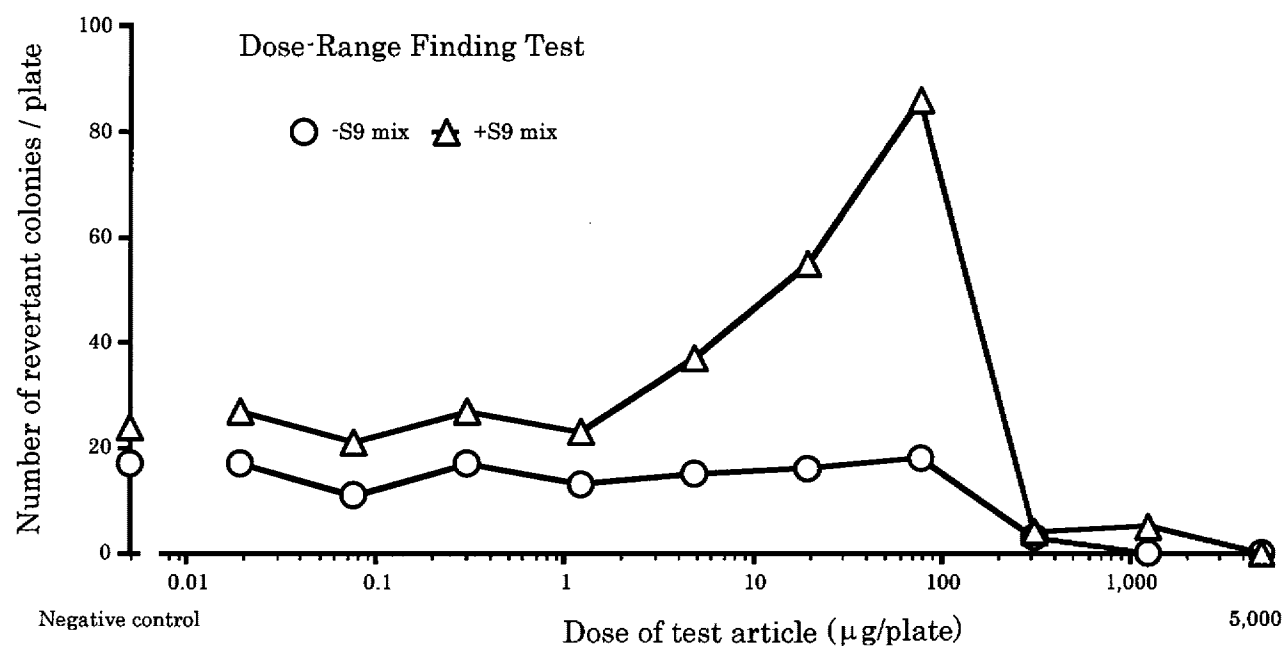


Figure 1

Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine) with *Salmonella typhimurium* TA100

**Figure 2**

Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine) with *Salmonella typhimurium* TA98

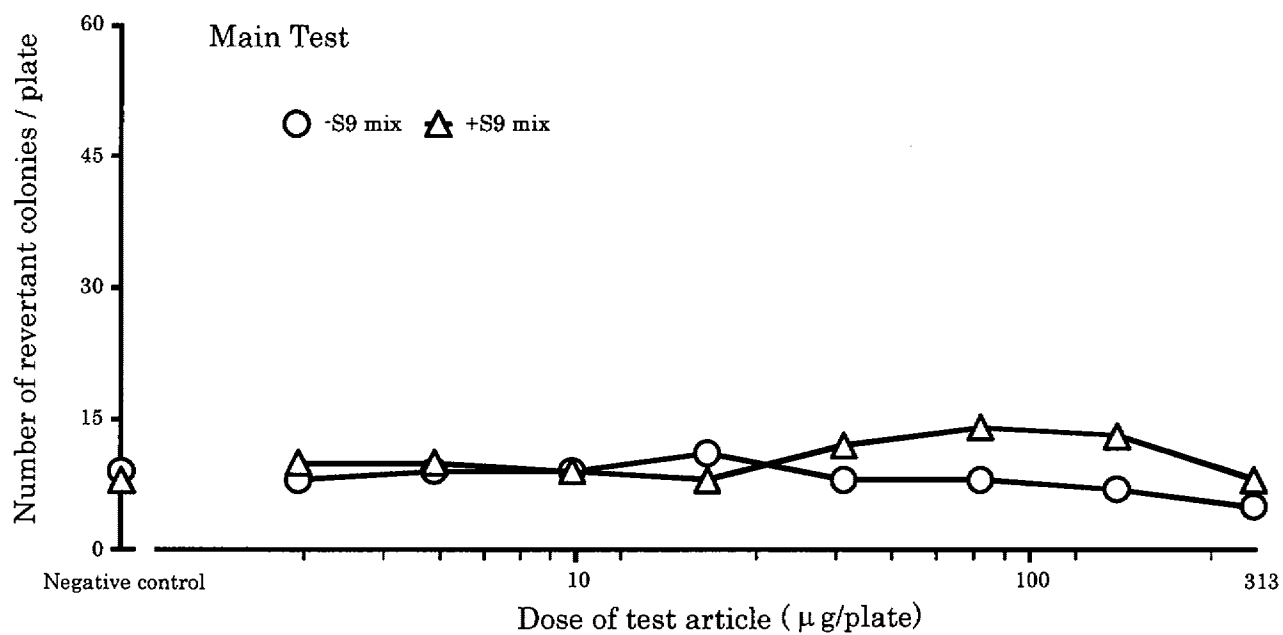
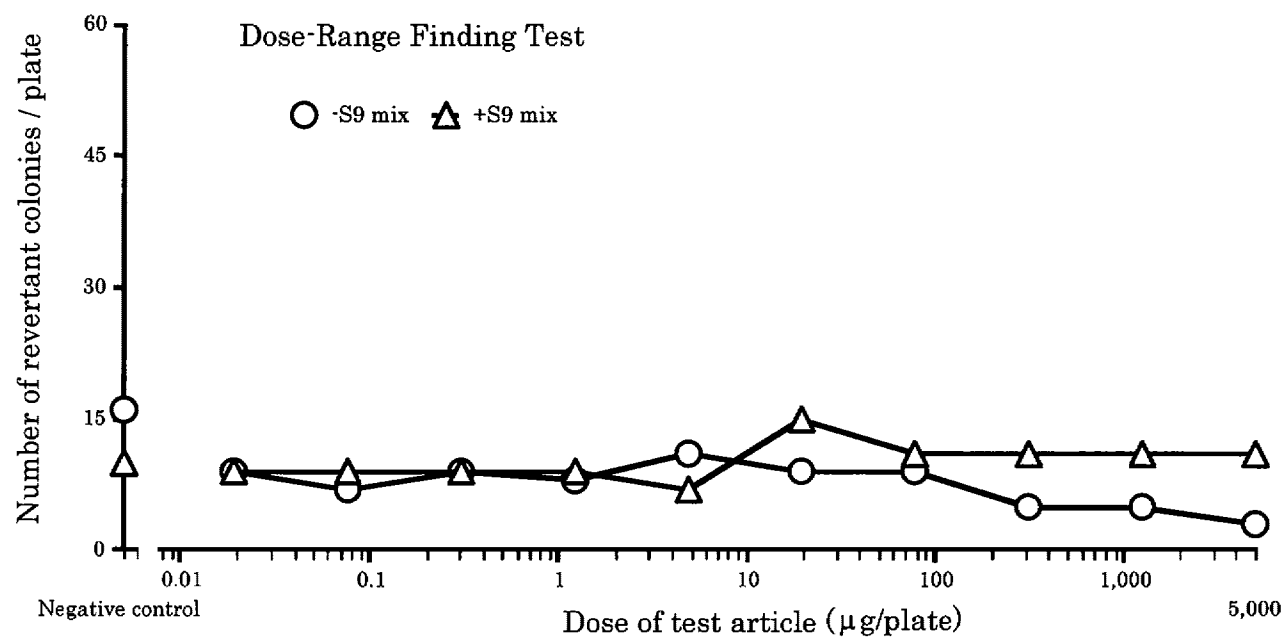


Figure 3

Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine) with *Salmonella typhimurium* TA1535

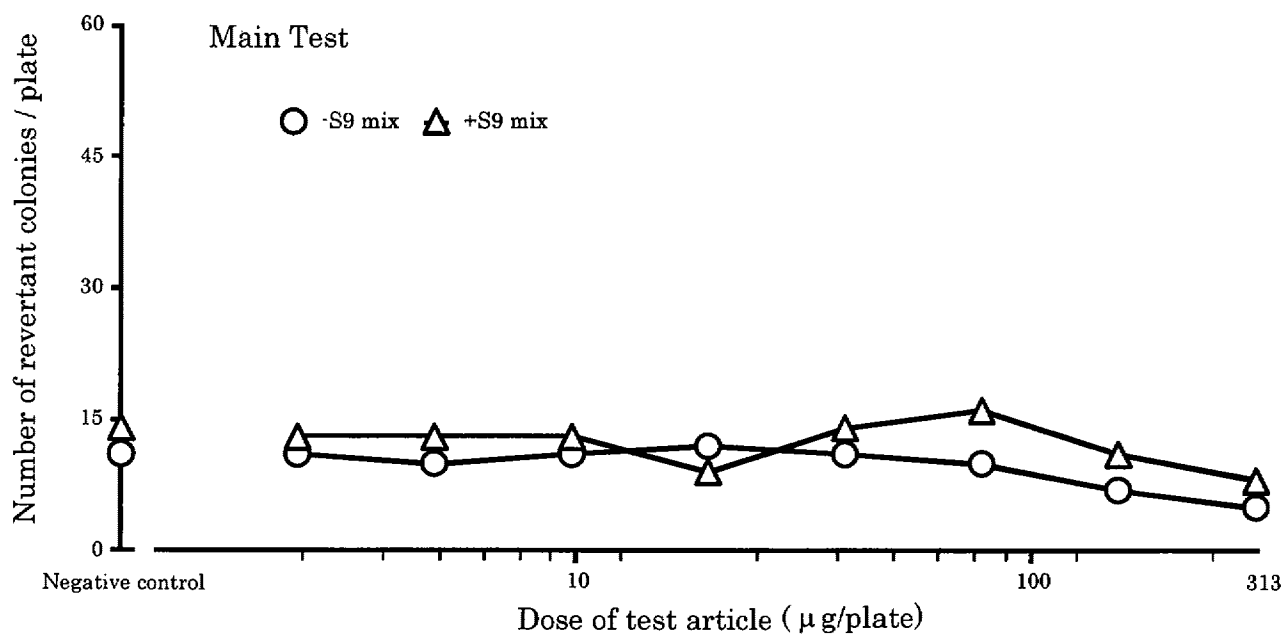
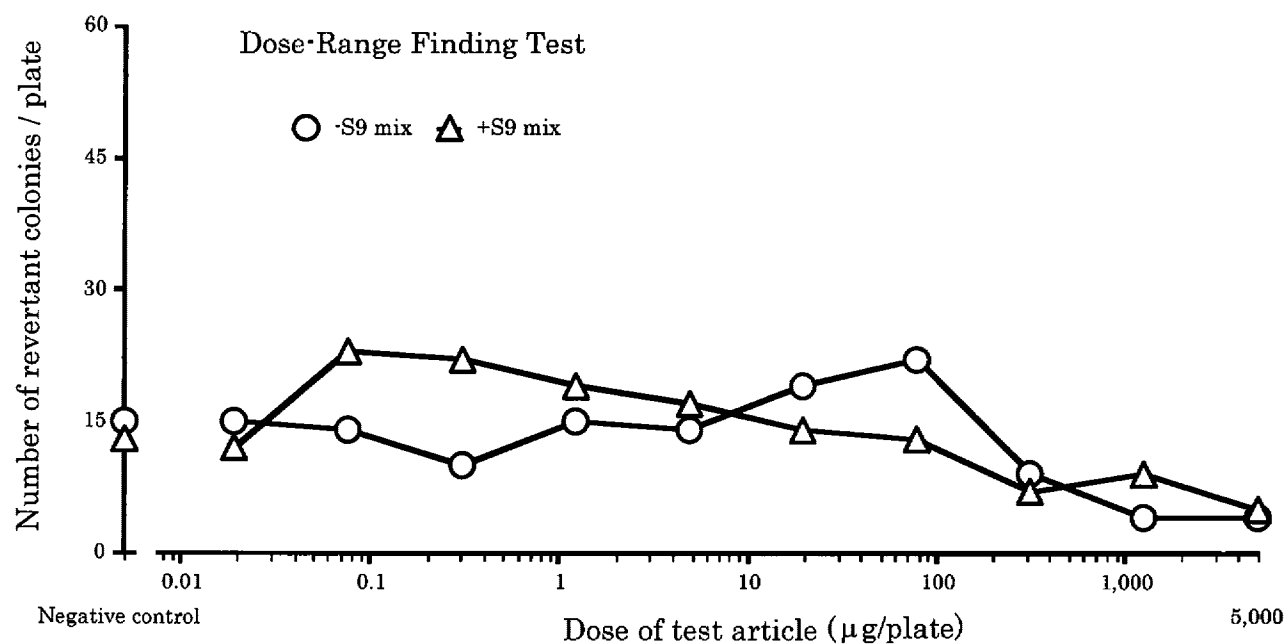


Figure 4

**Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
with *Salmonella typhimurium* TA1537**

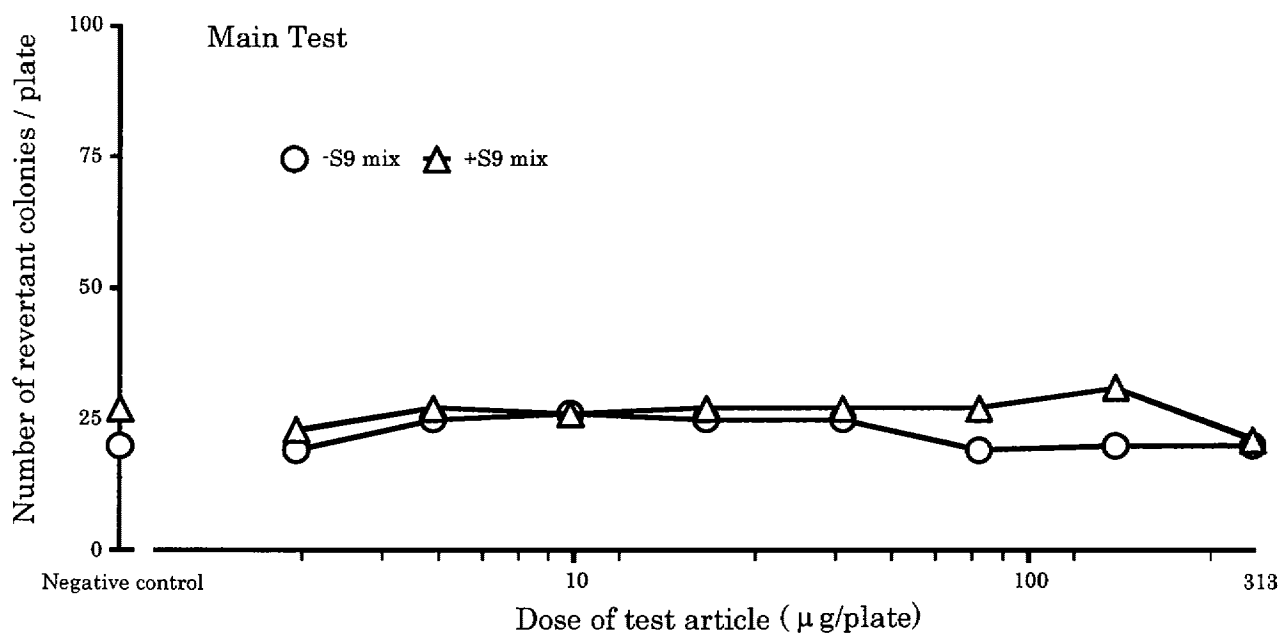
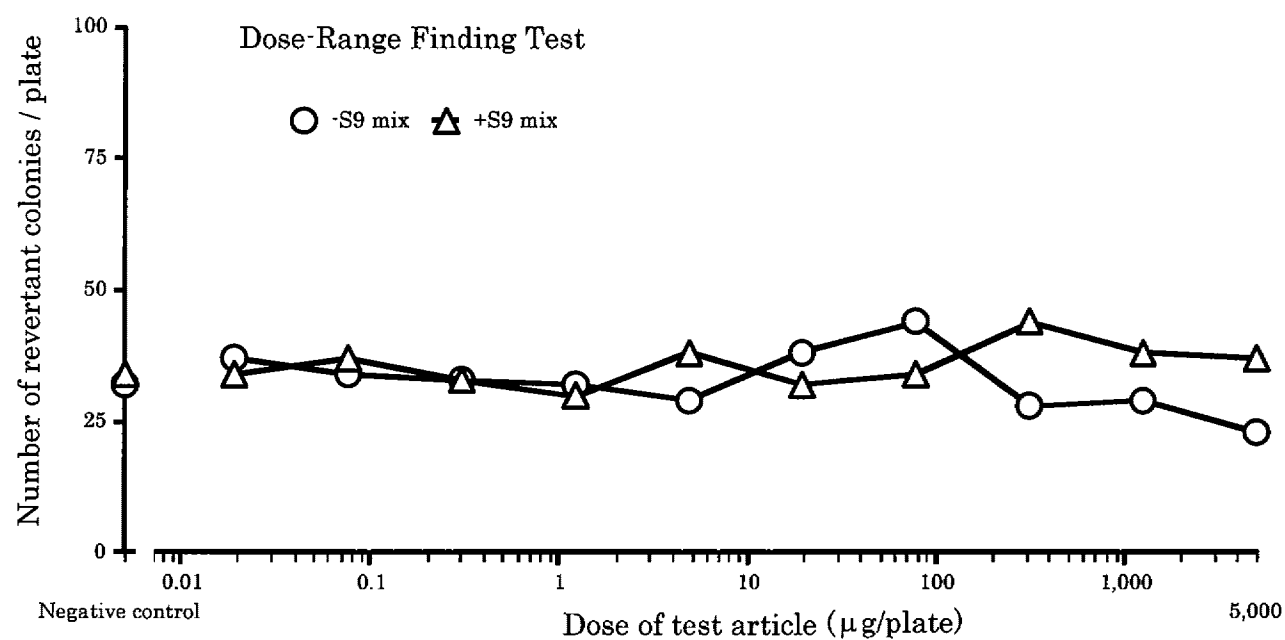


Figure 5

**Results of the Reverse Mutation Test on 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
with *Escherichia coli* WP2 *uvrA***



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最終報告書訂正書(1)

4,4'-メチレンビス(2-クロロベンゼナミン)の
細菌を用いる復帰突然変異試験

M-1126

2004年 12月 6日

株式会社 **ボゾリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまと1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

試験番号 : M-1126

試験表題 : 4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) の細菌を用いる復帰突然変異試験

訂正箇所1 : 考察及び結論

〔訂正前〕

一方、陽性対照群では各菌株の陰性対照群に比較して2倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加を示したことから、試験菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認された。更に、各菌株の代謝活性化の有無による陰性対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データと比較して異常と考えられる数値を示さず、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、本被験物質は既に人において長期または反復暴露で、発癌性^{6,7,8)}を示し、遺伝子損傷^{6,9,10,11,12)}を引き起こすと報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下において、4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する(陽性)と判断した。

〔訂正後〕

一方、陽性対照群では各菌株の陰性対照群に比較して2倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加を示したことから、試験菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認された。更に、各菌株の代謝活性化の有無による陰性対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データと比較して異常と考えられる数値を示さず、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、本被験物質は既に人において長期または反復暴露で、発癌性^{6,7,8)}を示し、遺伝子損傷^{6,9,10,11,12)}を引き起こすと報告されている。また、化学構造的に本被験物質と類似物質である benzidine (CAS Registry No. 92-87-5)は、細菌を用いる復帰突然変異試験¹³⁾、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験¹⁴⁾、姉妹染色分体交換試験¹⁴⁾、不定期 DNA 合成試験¹⁴⁾、小核試験¹⁴⁾及びマウスリンフォーマ試験¹⁵⁾で陽性の結果が、3,3'-dichlorobenzidine dihydrochloride (CAS Registry No. 612-83-9)は細菌を用いる復帰突然変異試験¹⁶⁾で陽性の結果が、2,2'-dichlorobenzidine (CAS Registry No. 84-68-4)は不定期 DNA 合成試験¹⁷⁾で陽性の結果が、3,3'-dichlorobenzidine(CAS Registry No. 91-94-1)は細菌を用いる復帰突然変異試験^{18,19)}及び、不定期 DNA 合成試験¹⁷⁾で陽性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下において、4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する(陽性)と

判断した。

訂正理由 : ピア・レビューの結果を受けて、考察の内容を再考し類似物質についての文献情報を記載することとし、下線を付した部分の文章を追記する。

訂正箇所 2 : 参考文献

〔追加〕 13) J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki and B.N. Ames (1975) : Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 5135-5139.

14) IARC (1987) : IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Monograph Suppl. 6, 96-100.

15) F.H. Sarkar, et al. (1990) : Mutagenic response of mouse lymphoma cells after activation of benzidine and 2-Aminofluorene with Purified Prostaglandin H. Mutation Research. 242, 319-328.

16) Lazear, E.J and Louie S.C (1977) : Mutagenicity of some congeners of benzidine in the Salmonella typhimurium assay system. Cancer Lett. 4, 21-25.

17) C.N. Martin, A.C. McDermid and R.C. Garner (1978) : Testing of known carcinogens and noncarcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells. Cancer Res. 38, 2621-2627.

18) E.A. Meserely. et al. (1987) : Structure-mutagenicity relationships of benzidine analogues. Environ. Mol. Mutagen., 10(3), 263-274.

19) M.M. Iba. (1987) : Comparative activation of 3,3'-dichlorobenzidine and related benzidines to mutagens in Salmonella typhimurium assays by Page 4. 3,3'-Dichlorobenzidine 4 hepatic S9 and microsomes from rats pretreated with different inducers of cytochrome P-450. Mutation Res., 182, 231-241.

訂正理由 : ピア・レビューの結果を受けて、考察の内容を再考し類似物質についての文献情報を追加することとし、上記の文献を追記する。

訂正箇所 3 : Attached Data 4

〔追加〕 比活性値(revertants/mg/plate)の算出は陽性の結果が認められた被験物質の用量

値(mg/plate)について、以下の算出で実施した。

$$\text{比活性値} = \frac{[\text{当該用量平均コロニ数/plate}] - [\text{陰性対照平均コロニ数/plate}]}{\text{当該用量値}}$$

訂正理由：ピア・レビューの結果を受けて、下線を付した部分の文章を比活性の表の下に追記する。

訂正年月日： 2004年12月6日