



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
ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1127

2004 年 2 月 27 日

株式会社 **ボソリサーチセンター**

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	10
緒 言	11
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び媒体	12
1) 被験物質	12
2) 媒体	13
2. 被験液の調製	13
1) 調製方法	13
2) 保存方法	14
3) 安定性	14
3. 対照物質	14
1) 陰性対照	14
2) 陽性対照	14
4. 使用細胞株	15
1) 供試ほ乳類培養細胞	15
2) 入手先及び入手年月日	15
3) 細胞の選択理由	15
4) 染色体構成	16
5) 増殖様式	16
6) 培養液	16

	頁
7) 培養条件	16
8) 細胞の保存	16
5. S9mix 及び培養液	16
1) S9 mix	16
2) 培養液	17
6. 試験方法	18
1) 識別方法	18
2) 細胞増殖抑制試験	18
3) 染色体異常試験	19
4) 追加確認試験	21
5) 標本の観察	21
6) 染色体異常の分類	21
7) 判定基準	22
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	23
1) 短時間処理法	23
2) 連続処理法	23
2. 染色体異常試験	24
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	24
2) 染色体構造異常	24
3) 倍数性細胞	25
3. 追加確認試験	25
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	25
2) 染色体構造異常	25
3) 倍数性細胞	25
考察	27
参考文献	29

Figures and Tables

- Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test (□) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 2-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 2-2 Results of the cell-growth inhibition test (□) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: -S9 mix]

- Fig. 3-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 3-2 Results of the cell-growth inhibition test (□) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 4-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 48 hr]
- Fig. 4-2 Results of the cell-growth inhibition test (□) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 48 hr]
- Fig. 5-1 Results of the cell-growth inhibition test (□) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[additional confirmative test]
- Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: +S9 mix]
- Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: -S9 mix]
- Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 24 hr]
- Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 48 hr]

Table 1-5 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[additional confirmative test]

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 48 hr]

Table 2-5 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[additional confirmative test]

要 約

4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞株) を用いて染色体異常試験を実施した。

最初に、毒性試験法ガイドラインに定められた 10mM に相当する約 2700 $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度として細胞増殖抑制試験を行った。その結果、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法の代謝活性化では 63.300 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 39.387 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 36.696 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 29.389 $\mu\text{g/mL}$ であった。したがって、染色体異常試験における最高濃度を短時間処理法では 84.4 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法では 42.2 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下短時間処理法では 42.2、21.1、10.6、5.30 及び 2.60 $\mu\text{g/mL}$ の、連続処理法では 21.1、10.6、5.30、2.60 及び 1.30 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 用量を設定し染色体異常誘発能の有無を検討した。なお、媒体にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

染色体異常試験の結果、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに染色体の構造異常の出現率は全く増加せず、また倍数性細胞の増加も認められなかった。さらに、連続処理法においては、24 時間処理では染色体の構造異常の出現率は全く増加せず、倍数性細胞の増加も認められなかったが、48 時間処理では最高濃度の 42.2 $\mu\text{g/mL}$ で染色体の構造異常 (TA 値) が 7.0%を示し疑陽性、倍数性細胞が 10.0%を示し陽性と判定された。これらの結果の再現性を確認するために、48 時間処理について 42.2、35.2、29.3 及び 24.4 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量を設定し追加確認試験を実施した。その結果、染色体の構造異常 (TA 値) が 42.2 及び 35.2 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 7.0 及び 5.0%を示し疑陽性と判定された。なお、SD₂₀ 値は 0.21 mg/mL、TR 値は 140 であった。さらに倍数性細胞が 42.2、35.2 及び 29.3 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 17.0、15.5 及び 7.0%を示し陽性及び疑陽性と判定された。PD₂₀ 値は 0.05 mg/mL であった。なお、各陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

以上の結果から、4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は本試験条件下において染色体異常誘発能を有するものと判定した。

結 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、ほ乳類の培養細胞 (CHL/IU 細胞株) を用いる染色体異常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

被験物質は以下の情報とともに厚生労働省医薬食品局審査管理課より提供された。

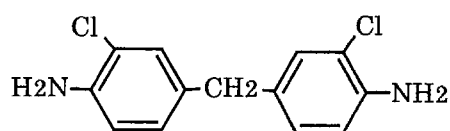
(Attached Data 1)

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

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)

CAS番号 : 101-14-4

構造式 :



示性式 : $C_{13}H_{12}Cl_2N_2$

純度 : 99.76 wt%

性状 : 白色針状粉末結晶

分子量 : 267.16

保存方法 : 冷暗所、遮光、密閉 (保存期間中の実測温度: 機器登録 No. 105
2~6℃、機器登録 No. 1456 3~6℃)

安定性 : 試験終了後に被験物質を返却し、製造者が安定性を測定した。
その結果、被験物質は試験期間中安定であった。

(Attached Data 2)

取り扱い上の注意 : 危険・有害性の評価は必ずしも十分ではなかったため、秤量時
と被験液の調製時にはマスクを着用した。

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

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 : ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略記)
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 : 被験物質は 270 mg/mL の濃度で注射用水には難溶で、DMSO には肉眼的に溶解し、発泡、発熱、吸熱及び変色等は認められなかった。従って DMSO を媒体として選択した。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 1.3499 g を 5 mL メスフラスコに秤取し、適当量の DMSO を徐々に加え目視によって固形物が認められなくなるまで攪拌した。更に DMSO を加えてメスアップし最高濃度の 270 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度 : 2700 µg/mL) を調製した。次いで、270 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 2 mL : DMSO 2 mL) で順次 7 段階希釈し、135、67.5、33.8、16.9、8.44、4.22 及び 2.11 mg/mL の 8 濃度の被験液を調製した。

(2) 染色体異常試験

被験物質 0.0422 g を 5 mL メスフラスコに秤取し、適当量の DMSO を徐々に加え目視によって固形物が認められなくなるまで攪拌した。更に DMSO を加えてメスアップし最高濃度の 8.44 mg/mL 溶液を調製した。次いで、8.44 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 2 mL : DMSO 2 mL) で順次 6 段階希釈し、4.22、2.11、1.06、0.53、0.26 及び 0.13 mg/mL の 7 濃度の被験液を調製した。このうち、短時間処理法では 8.44 から 0.26 mg/mL の 6 濃度を、連続処理法では 4.22 から 0.13 mg/mL の 6 濃度段階を試験に供した。

(3) 追加確認試験

被験物質 0.0210 g を 5 mL メスフラスコに秤取し、適当量の DMSO を徐々に加え目視によって固形物が認められなくなるまで攪拌した。更に DMSO を加えてメスアップし

最高濃度の 4.22 mg/mL 溶液を調製した。次いで、4.22 mg/mL 溶液を公比 1.2（各濃度の被験液 3 mL : DMSO 0.6 mL）で順次 3 段階希釈し、3.52、2.93 及び 2.44 mg/mL の 4 濃度の被験液を調製した。

2) 保存方法

被験液は用時調製とし、保存しなかった。

3) 安定性

4,4'-メチレンビス（2-クロロベンゼナミン）に DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱及び色調変化などは認められなかった。

3. 対照物質

1) 陰性対照

名 称 : DMSO
 ロ ッ ト 番 号 : SEH4223
 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

2) 陽性対照

陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシンCを用いた。

名 称 : シクロフォスファミド（以下 CP と略記）
 ロ ッ ト 番 号 : CKP7428
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 純 度 : 生化学用（97.0%以上）
 保 存 方 法 : 冷蔵（1～8℃）、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

名 称 : マイトマイシン C（以下 MMC と略記）
 ロ ッ ト 番 号 : 319AJD
 製 造 元 : 協和醗酵工業株式会社
 力 価 : 2mg（力価）/瓶
 保 存 方 法 : 室温、遮光

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(1) 調製方法

CP を CORNING ディスポーザブルチューブ (γ 線滅菌済、50 mL) に 0.0149 g を秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K0D95) を 20 mL 加えて溶解し 0.75 mg/mL 溶液 (培養液 4.9 mL に 0.1 mL を加えた時の最終濃度 : 15 µg/mL) を調製した。

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K0D95) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1.00 mg/mL) 。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.25 mL : 生理食塩液 4.75 mL) し、0.05 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.9 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.1 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.05 µg/mL) 。

なお、調製は用時に行い、残余液は全て発癌性物質として廃棄した。

(2) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験法ガイドラインで推奨されている陽性対照物質であること、及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

4. 使用細胞株

1) 供試は乳類培養細胞

細胞は、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 (CHL/IU 細胞株) を用いた。
なお、入手後、液体窒素で凍結保存していた細胞を解凍、再培養して用いた。

2) 入手先及び入手年月日

細胞は、2001 年 12 月 26 日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、継代数の少ない細胞を DMSO (ロット番号 KSH7174、試薬特級 99% 以上、和光純薬工業株式会社) を 10 vol% 添加した培養液で大量に液体窒素中で保存した。試験にはこの保存細胞を解凍し継代培養したものを、性状検査を実施して正しい特性を有していることを確認した後に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で 7 継代目、染色体異常試験では短時間処理法で 9 継代目の、連続処理法で 15 継代目の、追加確認試験で 29 継代目の細胞を用いた。また、入手時の情報でマイコプラズマ陰性であることを確認した。

3) 細胞の選択理由

染色体数が少なく比較的大型で染色体異常の観察に適すること、自然発生の染色体異常発現率が低いこと、更に種々の化学物質に対して感受性が高くバックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

4) 染色体構成

試験に使用した細胞の染色体数分布のモーダルナンバーは 25 本 ($n=20$ 、70%の細胞が 25 本) であり、適切であった。

5) 増殖様式

試験に用いた細胞は、プレート上で単層状に増殖し、使用細胞の倍加時間は 20.13 時間であった。これらは入手時の特性 (単層状に増殖、倍加時間 18~20 時間) と同様に適切な増殖様式であった。

6) 培養液

培養液は Minimum Essential Medium (GIBCO™、Cat.No.11095-080、Invitrogen Co.) を用いた。これに非働化 (56℃, 30 分) した仔牛血清を 10 vol% 添加して培養液を調製した。

7) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37℃ の高湿度条件下で培養し、1~4 日ごとに継代した。

8) 細胞の保存

培養液に DMSO (JIS 規格試薬特級 99% 以上、和光純薬工業株式会社) を 10% を加え、液体窒素タンク (-196℃ 理論値) 中で保存した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

S9 及び補酵素 (S-9/コファクターC セット、Lot No. C030801051、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
 種 系 統 : ラット・SD 系
 性 : 雄

週 齢 : 7 週齢

体 重 : 215.9 ± 9.0 g

誘 導 物 質 : フェノバルビタール (PB) & 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 : 冷凍保存 (−80℃設定の冷凍庫、機器登録番号: 928)

使 用 期 限 : 2004 年 1 月 31 日

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C

ロ ッ ト 番 号 : C03080504

製 造 日 : 2003 年 8 月 5 日

保 存 方 法 : 冷凍保存 (−80℃設定の冷凍庫、機器登録番号: 928)

使 用 期 限 : 2004 年 2 月 4 日

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(3) S9 mix の組成

S9 2 mL

補酵素	4.7 mL	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン	
		ジヌクレオチドリリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

2) 培養液

培養液は Minimum Essential Medium (GIBCO™、Cat. No. 11095-080、Invitrogen Co.) を用いた。これに非働化 (56℃, 30 分) した仔牛血清を 10 vol% 添加して培養液を調製した。調製後の培養液は冷蔵保存した。

(1) 仔牛血清

名 称 : Calf serum

ロット番号 : 411062、364570

製 造 元 : Life Technologies Inc.

保 存 方 法 : 冷凍 (−80℃設定の冷凍庫、機器登録番号 : 928)

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 1167442、1172621

製 造 元 : Invitrogen Corporation

保 存 方 法 : 冷蔵庫 (4℃設定の冷蔵庫、機器登録番号 : 1793、942)

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

6. 試験方法¹⁻⁴⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法・連続処理法	
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化
		非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理
		48 時間処理
3. 追加確認試験		

1) 識別方法

(1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性 (Negative Control) 対照群を「NC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで実験材料等を識別した。

(2) 染色体異常試験及び追加確認試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性 (Positive Control) 対照群は「PC」とした。染色体標本作成に際しては、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの2桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の用量を設定するための予備試験として実施した。いずれの処理法においても最高濃度を 2700 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 1350、675、338、169、84.4、42.2 及び 21.1 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 濃度を設定し、さらに陰性対照群を設けた。また、短時間処理法では代謝活性化群と非代謝活性化群を設けた。

(1) 短時間処理法

プレートは γ 線滅菌済プラスチックプレート（住友ベークライト株式会社、直径 60 mm）を 2 枚とし、プレート 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陰性（媒体）対照群については、培養液 0.883 mL を除き S9 mix 0.833 mL 及び DMSO 0.05 mL を加えた。非代謝活性化では、培養液 0.05 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。更に 6 時間培養した後、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。培養終了後、培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。単層培養細胞密度計（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞の染色の濃淡から細胞密度を測定し、陰性（媒体）対照を 100%とした各処理群の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、肉眼で析出の有無及び培養液の色を、倒立位相差顕微鏡で細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

(2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、培養液 0.05 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05 mL を、陰性（媒体）対照群については DMSO 0.05 mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養した。培養終了後、短時間処理法と同様に培養液の色、細胞の状態及び析出の有無を観察した後に、洗浄、固定、染色し、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

3) 染色体異常試験

(1) 用量設定の根拠

細胞増殖抑制試験の結果、50%以上の細胞毒性が認められたことから、染色体異常試験の短時間処理法では最高用量を 84.4 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で希釈した 42.2、21.1、

10.6、5.30 及び 2.60 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 用量を、連続処理法では最高用量を 42.2 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で希釈した 21.1、10.6、5.30、2.60 及び 1.30 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 用量を設定した。また、さらに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

(2) 短時間処理法

γ 線滅菌済プラスチックプレート（住友ベークライト株式会社、直径 60 mm）のプレート 4 枚を使用し、1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、陰性（媒体）対照群については S9 mix 0.833 mL 及び DMSO 0.05 mL を、被験物質処理群については S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL 及び CP 0.1 mL を加えて、その後 6 時間培養した。非代謝活性化では、培養液 0.05 mL を除き、陰性（媒体）対照群については DMSO 0.05 mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.1 mL を除き、MMC 0.1 mL を加えて培養した。6 時間の培養後、培養液を取り除き生理食塩液で細胞を洗浄し、新たな培養液 5.0 mL を加えて、更に 18 時間培養した。なお、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前に各処理群 2 枚のプレートにコルセミド 0.1 mL（ジメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社、最終濃度：0.2 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液で剥離させた細胞を遠心分離し、0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、カルノア液（メチルアルコール・酢酸=3:1 液）で固定した。その細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所点滴下し、空気乾燥後 2%ギムザ液で染色体標本作製した。染色体標本は、1 枚のプレートから 2 枚作製した。各処理群の残り 2 枚のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じ固定・染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。なお、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

(3) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、培養液 0.05 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05 mL を、陰性（媒体）対照群については DMSO 0.05 mL をそれぞれ加え、24 時間あるいは 48 時間培養した。また陽性対照群については培養液 0.1 mL を取り除き、MMC 0.1 mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。なお、染色体観察用の染色体標本作製は、短時間処理法と同様に行った。各処理群の残り 2 枚のプレートは、細胞増殖抑制

試験に準じ、固定・染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、被験物質処理終了時に、細胞増殖抑制試験と同様、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

4) 追加確認試験

染色体異常試験の連続処理法・48時間処理において、最高用量の 42.2 µg/mL で染色体構造異常が陽性、数的異常が疑陽性と判定されたため、追加確認試験を実施した。試験方法は、染色体異常試験と同様に細胞を播種し3日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、培養液 0.05 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05 mL を、陰性（媒体）対照群については DMSO 0.05 mL をそれぞれ加え、48時間培養した。また陽性対照群については培養液 0.1 mL を取り除き、MMC 0.1 mL を加え、48時間培養した。なお、染色体観察用の標本作製は染色体異常試験と同様に行った。各処理群の残り2枚のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じ固定・染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、被験物質処理終了時に、細胞増殖抑制試験と同様、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

5) 標本の観察

各濃度当たり 200 個（プレート当たり 100 個）のよく展開した分裂中期像について構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の数も記録した（3 倍体を含めた染色体数 37 本以上を有する細胞を倍数体とした）。なお、客観的な観察を行うため染色体標本はすべて盲検法により観察した。

6) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

(1) 構造異常

染色体構造が、その細胞が本来持っている固有の構造（核型）と異なる場合を構造異常と定義した。

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体または染色分体の同軸上に断片があるもの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。

染色分体型切断(ctb) : 切断とは断片が染色分体の同軸上からはずれているもの、

及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れている場合と定義した。

染色分体型交換(cte)： 四放射状交換など。

染色体型切断(csb)

染色体型交換(cse)： 二動原体染色体、環状染色体など

その他(other)： 断片化他(frg)

(2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数体： polyploid（核内倍加体：endoreduplicationを含む）

7) 判定基準

2枚のプレート間で異常細胞の出現頻度に著しいばらつきがないこと、陰性（媒体）対照群で異常細胞の出現頻度が5%未満であること、陽性対照群でギャップ以外の異常細胞の出現頻度が10%以上であること、被験物質処理群の3用量以上における染色体標本の評価が可能であること及び培養条件など試験環境に異常が認められないことを本試験の成立条件とした。

石館らの判定基準^{1,2,3)}に従い、各処理群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定基準を設けた。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性 (－)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常を有する細胞の出現率は、ギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)について集計し、判定はギャップを含まない場合(TA)によって行った。異常細胞の出現が用量の増加に伴って認められた場合又は再現性を示した場合を染色体異常誘発能陽性と判定した^{2,3,4)}。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-1 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では 84.4 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は 63.300 $\mu\text{g/mL}$ であった。また非代謝活性化では 42.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は 39.387 $\mu\text{g/mL}$ であった。なお、代謝活性化の 338 及び 675 $\mu\text{g/mL}$ で細胞増殖抑制率の一過性の減少が認められた。単層培養細胞密度計用標本を顕微鏡で観察した際に、これらの濃度では針状結晶の析出とクリスタルバイオレットによる着色が認められた。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化の有無にかかわらず、培養液の色調の変化は認められなかった。また、代謝活性化では 169 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で、非代謝活性化では 338 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で被験物質と思われる針状結晶の析出が認められた。被験物質処理群の細胞の状態を陰性(媒体)対照群と比較すると、代謝活性化では 169 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、675 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められた。一方、非代謝活性化では 42.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、338 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められた。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 3-1 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 4-1 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理及び 48 時間処理では 42.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は 24 時間処理で 36.696 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理で 29.389 $\mu\text{g/mL}$ であった。なお、24 時間処理の 675 及び 1350 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処

理の 675 $\mu\text{g/mL}$ で細胞増殖抑制率の一過性の減少が認められた。単層培養細胞密度計用標本を観察した際に、これらの濃度では針状結晶の析出とクリスタルバイオレットによる着色が認められた。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理とも、培養液の色調の変化は認められなかった。また、24 時間処理及び 48 時間処理とも 169 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で被験物質と思われる針状結晶の析出が認められた。被験物質処理群の細胞の状態を陰性（媒体）対照群と比較すると、24 時間処理では 42.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で、48 時間処理では 21.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、ともに 169 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められた。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 1-2、2-2、Table 1-1、1-2、2-1 及び 2-2 に、連続処理法の結果を Fig. 3-2、4-2、Table 1-3、1-4、2-3 及び 2-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様であった。すなわち、短時間処理法では代謝活性化の有無にかかわらず培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、被験物質処理群の細胞の状態を陰性（媒体）対照群と比較すると、細胞の不連続性が代謝活性化では 21.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で、非代謝活性化では 42.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。一方、連続処理法では 24 時間及び 48 時間処理とも、培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、被験物質処理群の細胞の状態を陰性（媒体）対照群と比較すると、24 時間及び 48 時間処理とも 42.2 $\mu\text{g/mL}$ 群に細胞の不連続性が 1/2 程度、21.1 $\mu\text{g/mL}$ 群では微少に認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現頻度（TA 値）は、短時間処理法の代謝活性化では 84.4 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5%、42.2 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5%、21.1 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5%、10.6 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.0%、5.30 $\mu\text{g/mL}$ 群で 1.5% 及び 2.60 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.0% と陰性の判定基準である 5% を越えることはなかった。また、非代謝活性化においても、84.4 $\mu\text{g/mL}$ 群で 1.0%、42.2 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5%、21.1 $\mu\text{g/mL}$ 群で 2.0%、10.6 $\mu\text{g/mL}$ 群で 1.5%、5.30 $\mu\text{g/mL}$ 群で 1.0% 及び 2.60 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5% と陰性の判定基準である 5% を越えることはなかった。

連続処理法の 24 時間処理では 42.2 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.0% (TOX)、21.1 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5%、10.6 $\mu\text{g/mL}$ 群で 1.0%、5.30 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5%、2.60 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5% 及び 1.30 $\mu\text{g/mL}$ 群で 0.5% と陰性の判定基準である 5% を越えることはなかった。また、48 時間処理では 21.1 $\mu\text{g/mL}$ 群で 2.0%、10.6 $\mu\text{g/mL}$ 群で 1.5%、5.30 $\mu\text{g/mL}$ 群で 1.0%、2.60 $\mu\text{g/mL}$ 群で 3.0% 及び 1.30 $\mu\text{g/mL}$ 群で 1.5% と陰性の判定基準である 5% を越えることはなかったが、42.2 $\mu\text{g/mL}$ 群で 7.0% と疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満の範囲にあったことから疑陽性と判定された。

3) 倍数性細胞

短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では、いずれの群においても倍数性細胞の出現頻度は陰性の判定基準である 5% を越えることはなかった。一方、連続処理法の 48 時間処理では 21.1 $\mu\text{g/mL}$ 群以下では陰性の判定基準である 5% を越えることはなかったが、42.2 $\mu\text{g/mL}$ 群で 10.0% と陽性の判定基準である 10% を越えたことから陽性と判定された。

3. 追加確認試験

追加確認試験は染色体の構造異常において疑陽性、数的異常（倍数性細胞）において陽性を示した連続処理法・48 時間処理と同様の方法を用いて実施した。結果を Fig. 5-1 及び Table 1-5、2-5 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、染色体異常試験の連続処理法・48 時間処理の場合とほぼ同様であった。すなわち、培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、用量群の細胞の状態を陰性（媒体）対照群と比較すると、細胞の不連続性が 35.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現頻度は、42.2 $\mu\text{g/mL}$ 群で 7.0% 及び 35.2 $\mu\text{g/mL}$ 群では 5.0% と疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満の頻度を示した。一方、29.3 $\mu\text{g/mL}$ 群で 3.5% 及び 24.4 $\mu\text{g/mL}$ 群では 3.5% と陰性の判定基準である 5% を越えることはなかった。

なお、S D₂₀ 値は 0.21 mg/mL、TR 値は 140 と算出された。

3) 倍数性細胞

倍数性細胞の出現頻度は 42.2 $\mu\text{g/mL}$ 群で 17.0% 及び 35.2 $\mu\text{g/mL}$ 群では 15.5% と陽性の判定基準である 10% を越え陽性と判定された。また、29.3 $\mu\text{g/mL}$ 群では 7.0% と疑陽性

の判定基準である 5%以上 10%未満の頻度を示した。一方、24.4 $\mu\text{g/mL}$ 群では 1.0%と陰性の判定基準である 5%を越えることはなかった。

なお、P D₂₀ 値は 0.05 mg/mL と算出された。

考 察

染色体異常試験において、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では染色体の構造異常の出現率は増加せず、倍数性細胞の増加も認められなかった。しかしながら連続処理法の 48 時間処理においては最高用量で染色体の構造異常及び倍数性細胞の出現率が増加し、それぞれ疑陽性及び陽性を示した。そのため、追加確認試験を実施して再現性を確認したところ、用量の増加に伴って染色体の構造異常及び倍数性細胞の出現率の増加が認められ、構造異常では疑陽性を、倍数性細胞では疑陽性又は陽性を示した。一方、陰性（媒体）対照群における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。さらに、2 枚のプレート間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、さらに培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

4,4'-メチレンビス（2-クロロベンゼナミン）は既知発癌物質の 4,4'-アミノビフェニール（ベンチジン）に類似した化学構造を持ち、細菌を用いる復帰突然変異試験⁵⁾、マウスリンフォーマ TK 試験⁶⁾、6-thioguanine 耐性遺伝子突然変異試験⁵⁾、姉妹染色分体交換試験⁷⁾、初代培養肝細胞を用いた DNA 修復試験⁸⁾及びげっ歯類を用いる小核試験⁹⁾で陽性の結果が得られている。染色体異常試験⁷⁾については CASA (Computer Automated Structure Evaluation)法による評価で陰性の結果が報告されている。本試験では染色体構造異常は連続処理法の 48 時間処理及び追加確認試験のいずれにおいても疑陽性の結果であり、総合的に equivocal と判定された。一方、倍数性細胞は連続処理法の 48 時間処理及び追加確認試験のいずれにおいても陽性の結果であったことから、総合的に陽性と判定された。

Kawaguchi ら¹⁰⁾は、ビタミン B₂ の哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験において、ビタミン B₂ を懸濁状態で処理すると倍数性細胞の出現率が増加すること、倍数性細胞の形成機序はビタミン B₂ の針状結晶構造物が細胞膜に物理的な刺激を与え、細胞分裂を阻害するためであることを報告している。更に彼らは、同様に針状結晶構造を示すアスベスト、グラスウール及び種々の医薬品が倍数性細胞を増加させることも報告している。ビタミン B₂ のそのような作用は完全溶解して処理した場合には認められなかったことから、Kawaguchi ら¹⁰⁾はこの倍数性細胞の出現率の増加はビタミン B₂ の本質的な生物学的特性によるものではなく、針状結晶構造に伴う物理的刺激によって生じる偽陽性であること、培養細胞を用いた試験においては被験物質の特性や処理方法に十分注意を払う必要があることを示唆している。

4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は白色針状粉末結晶の性状を持ち、細胞増殖抑制試験では培養液交換前や標本作製前の光学顕微鏡を用いた観察で針状結晶の析出が認められている。染色体異常試験では同様な針状結晶の析出は認められなかったが、前述のビタミン B2 の報告¹⁰⁾では電子顕微鏡レベルの針状結晶が倍数性細胞の出現率を増加させることが証明されていることから、本被験物質の場合も光学顕微鏡では確認出来ない微細な針状結晶によって倍数性細胞の増加が生じた可能性も推察される。

以上の結果から、4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は、本試験条件下において染色体構造異常誘発性は equivocal、倍数性細胞誘発性は陽性とそれぞれ判定され、総合的には染色体異常誘発能を有するものと判定した。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354 (1977)
- 2) 石館基監修：染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 3) 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：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、サイエンティスト社、1992
- 4) Matsuoka, A., *et al.*, Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290 (1979)
- 5) Kugler-Steigmeier, M.E. *et al.*, *Mutation Res.*, 211, 279-289 (1989)
- 6) Mitchell, A.S. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, 12 (Suppl. 13), 37-101 (1988)
- 7) Rosenkranz, H.S. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, 16, 149-177 (1990)
- 8) Mori, H. *et al.*, *Mutation Res.*, 204, 683-688 (1988)
- 9) Salamone, M.F. *et al.*, *Prog. Mutat. Res.*, 1, 682-687 (1981)
- 10) Kawaguchi, Y., Hayashi, H., Sato, M. & Shindo, Y., Needle crystals of vitamin B2 induce polyploidy in Chinese hamster lung (CHL/IU) cells, *Mutation Res.*, 371 (1997) 1-7

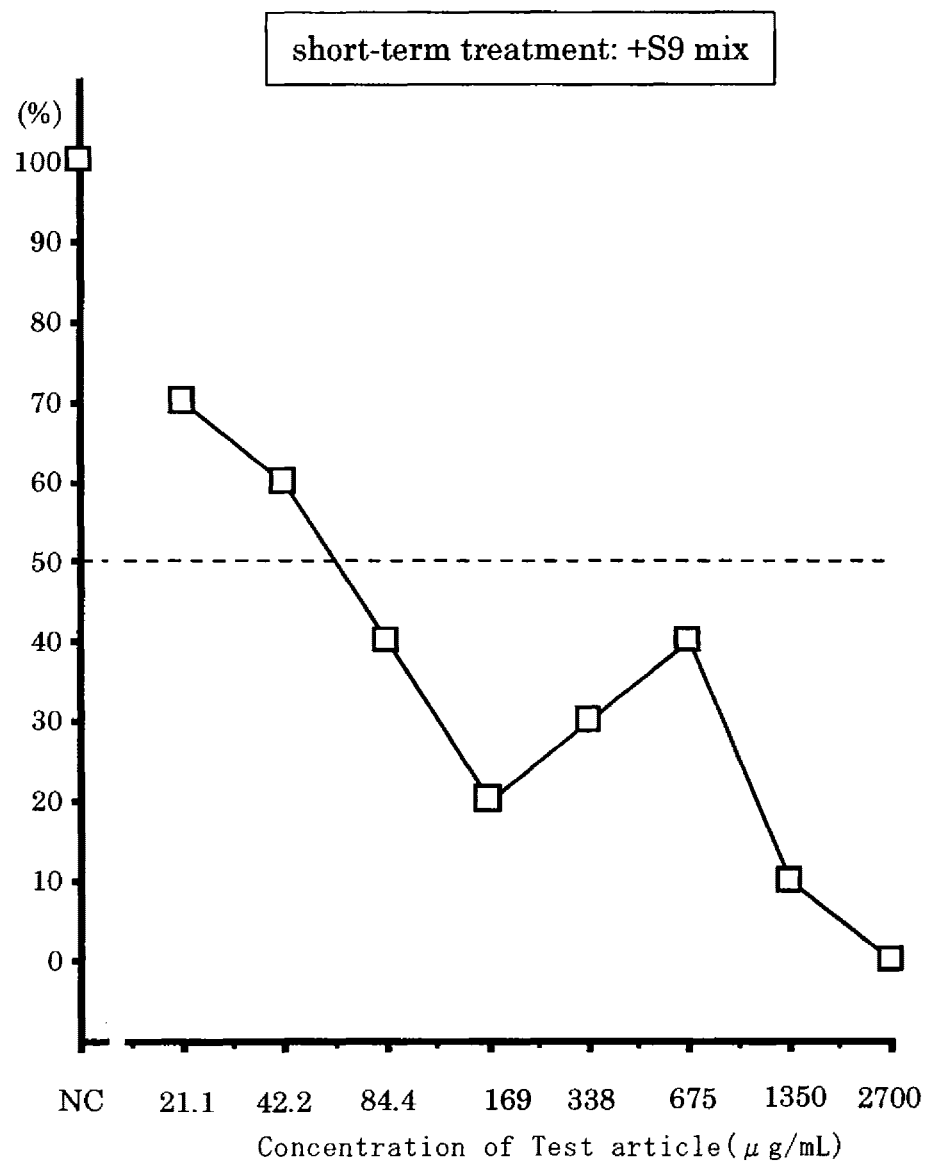


Fig. 1-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
NC:negative control

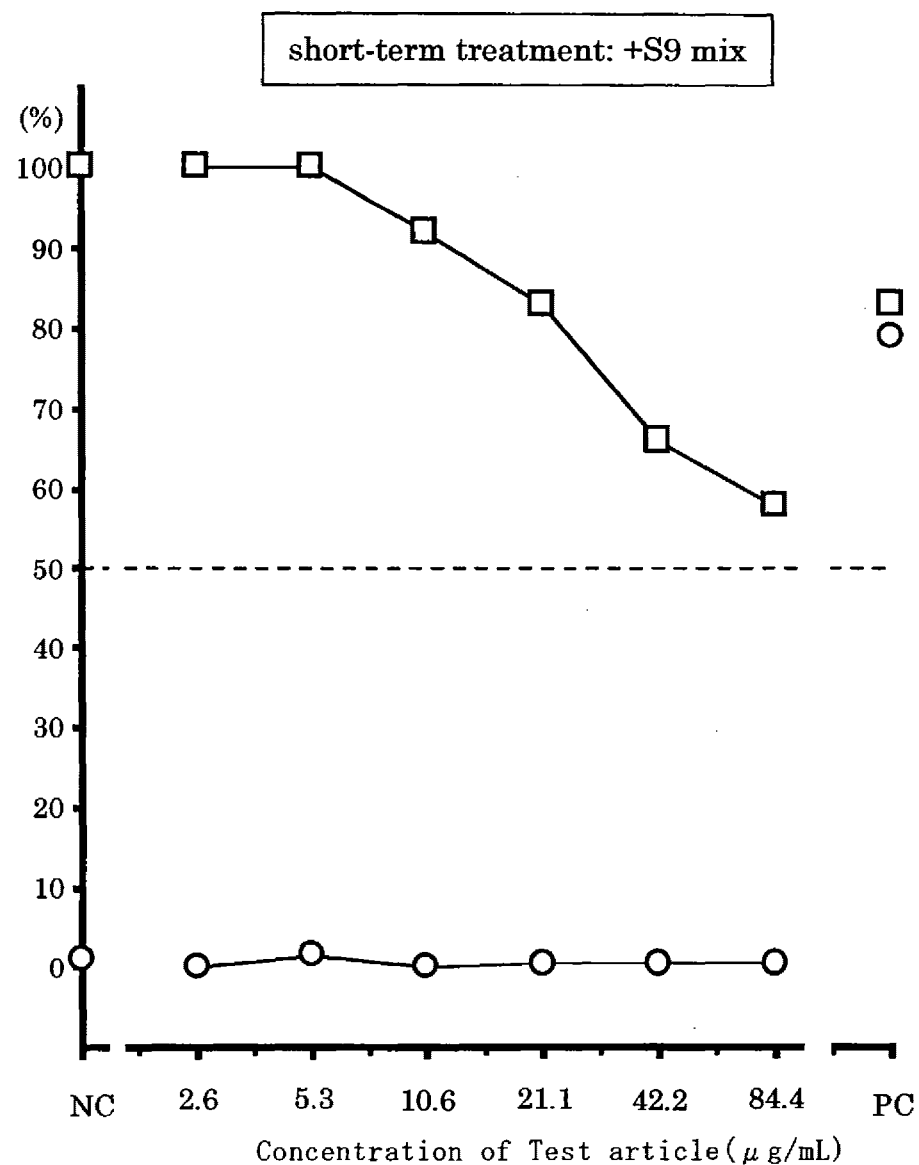


Fig. 1-2 Results of the cell- growth inhibition test ($\square$) and chromosome aberration test (structural $\circ$) treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
NC:negative control PC:positive control

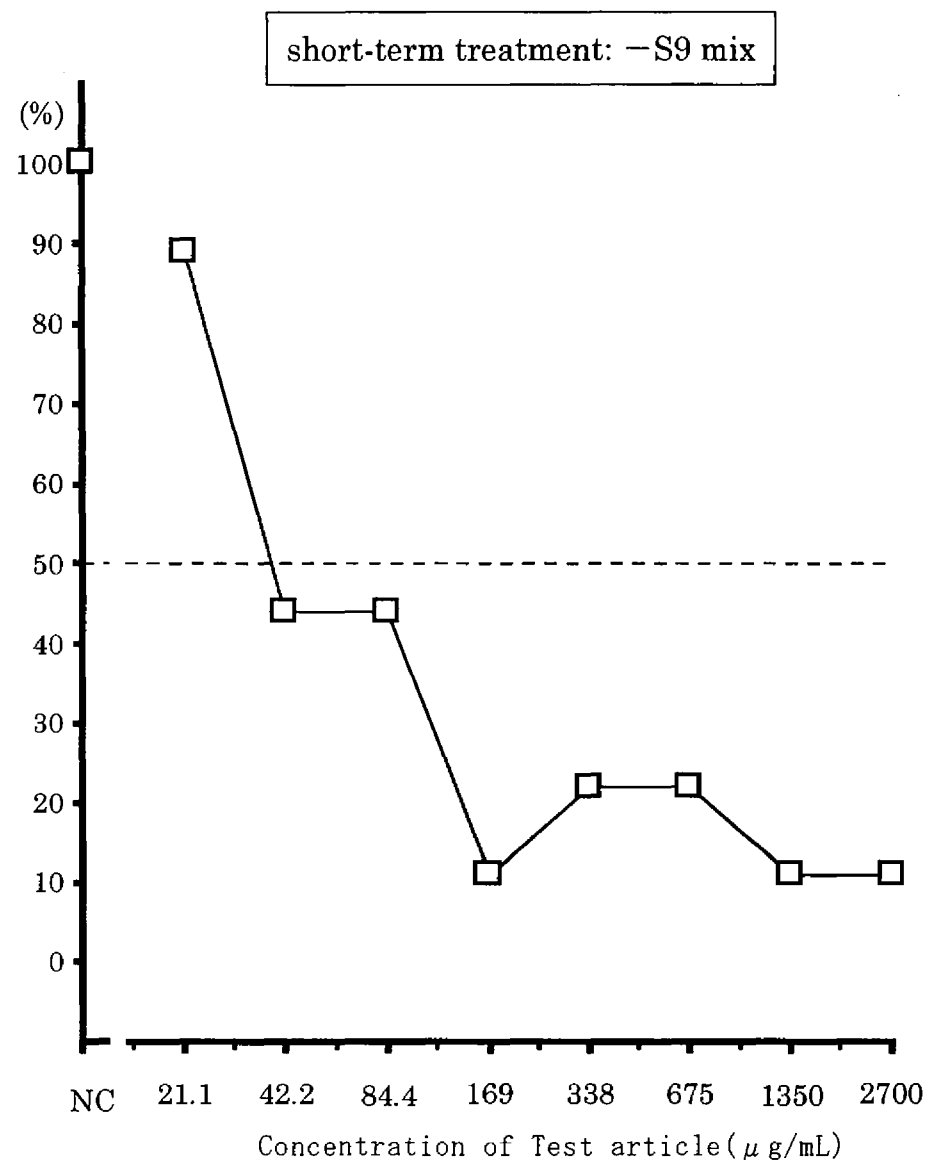


Fig. 2-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
NC:negative control

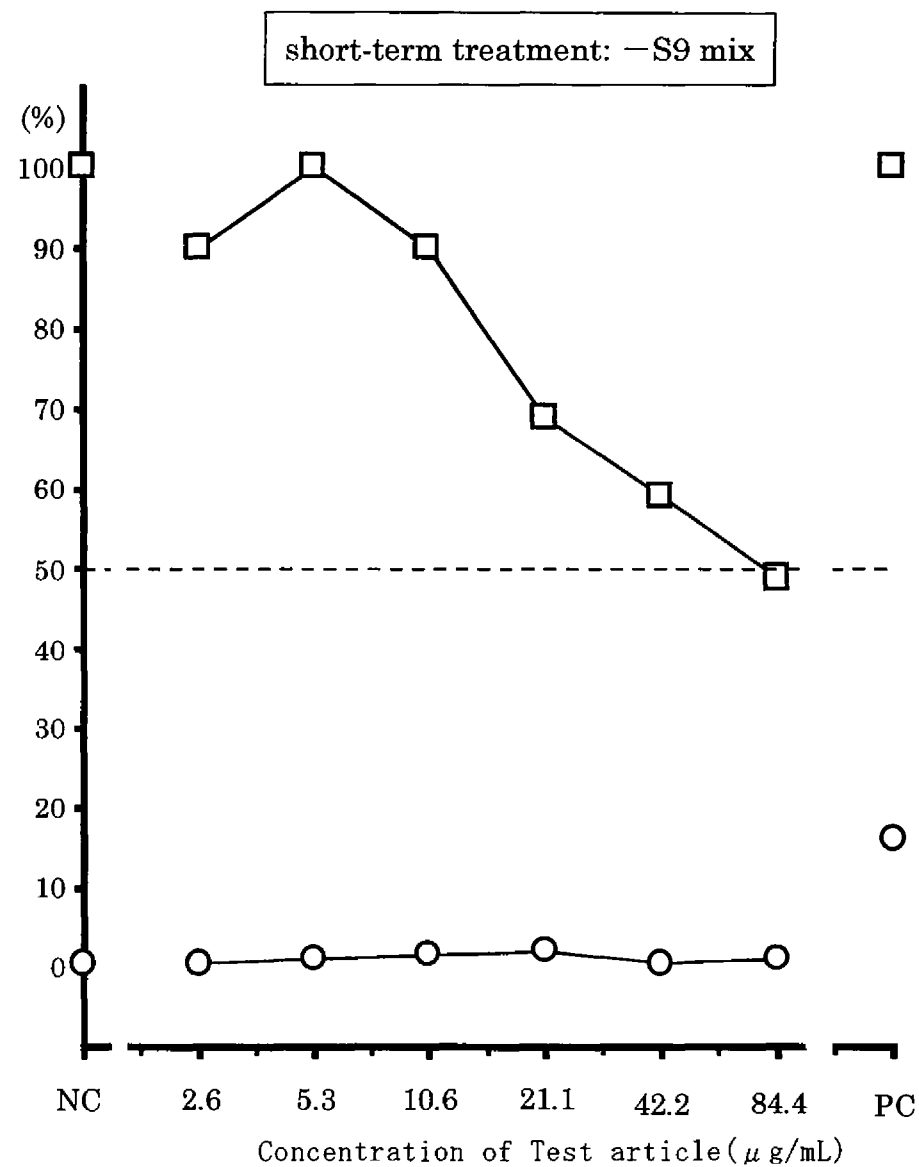


Fig. 2-2 Results of the cell- growth inhibition test ($\square$) and chromosome aberration test (structural O) treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
NC:negative control PC:positive control

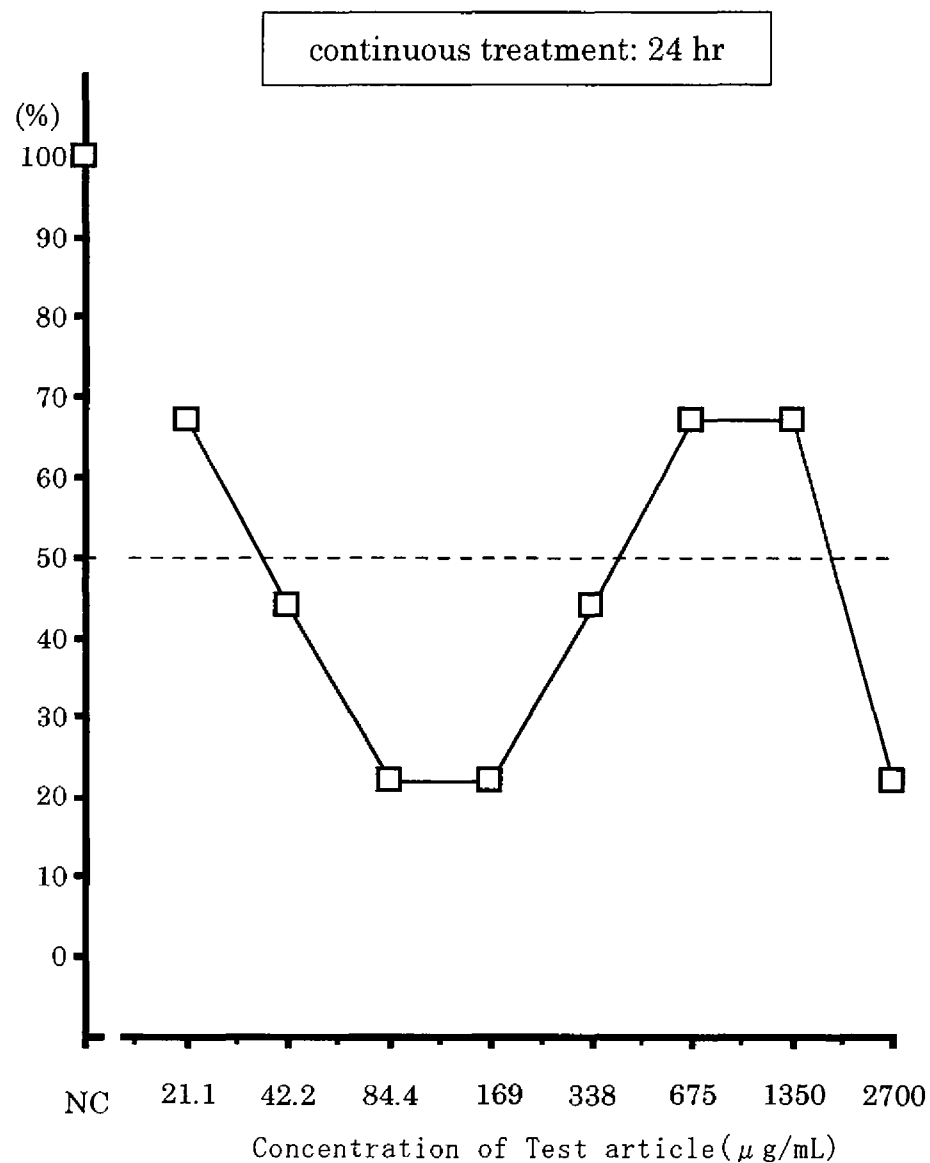


Fig. 3-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
NC:negative control

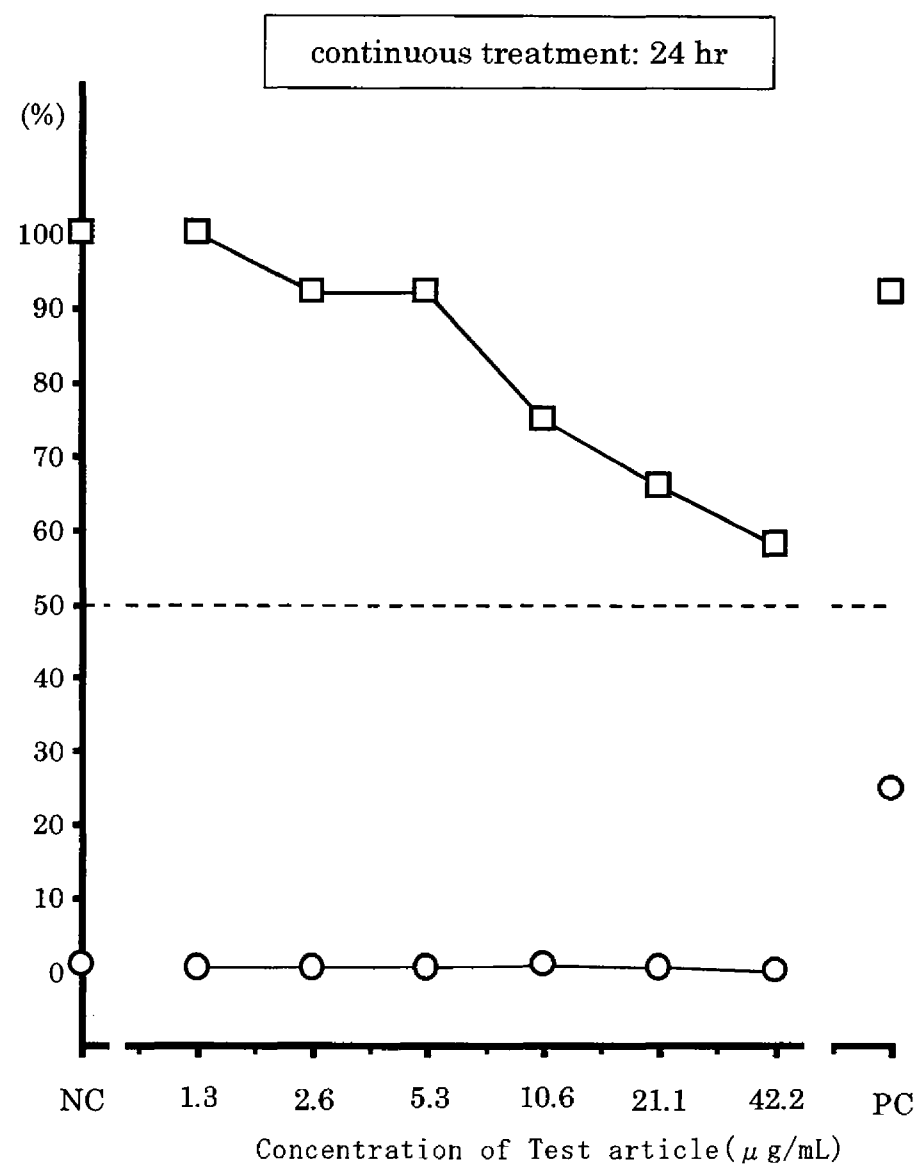


Fig. 3-2 Results of the cell- growth inhibition test ($\square$) and chromosome aberration test (structural $\circ$) treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
NC:negative control PC:positive control

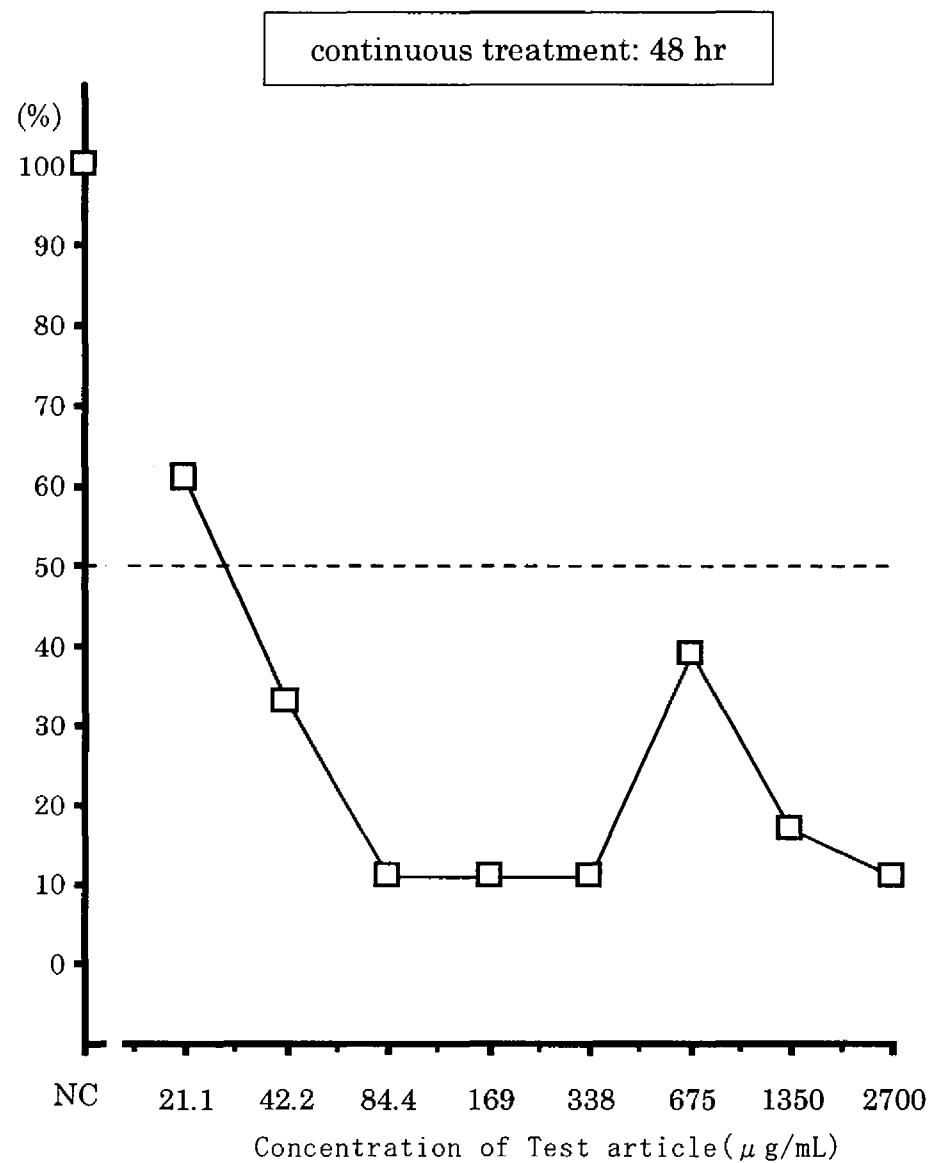


Fig. 4-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
NC:negative control

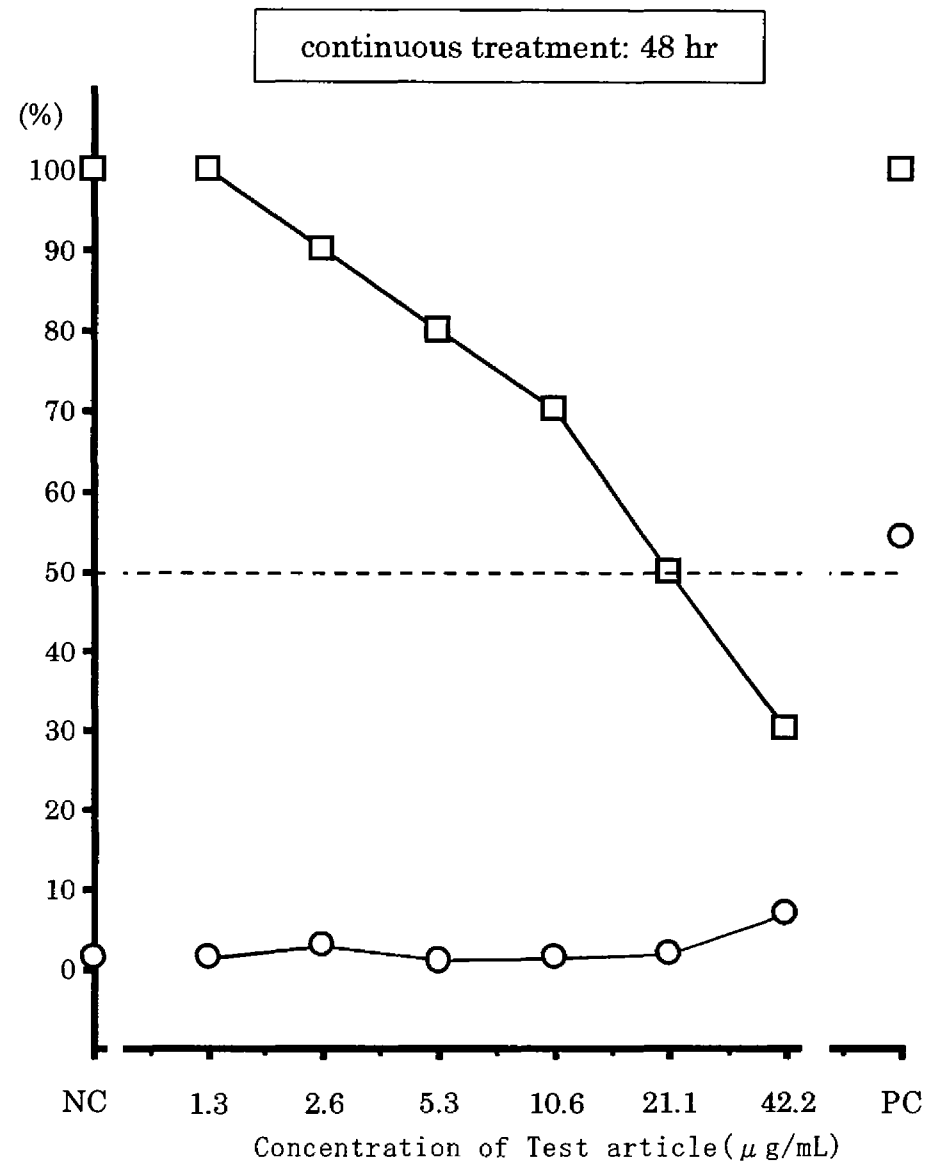


Fig. 4-2 Results of the cell- growth inhibition test ($\square$) and chromosome aberration test (structural O) treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
NC:negative control PC:positive control

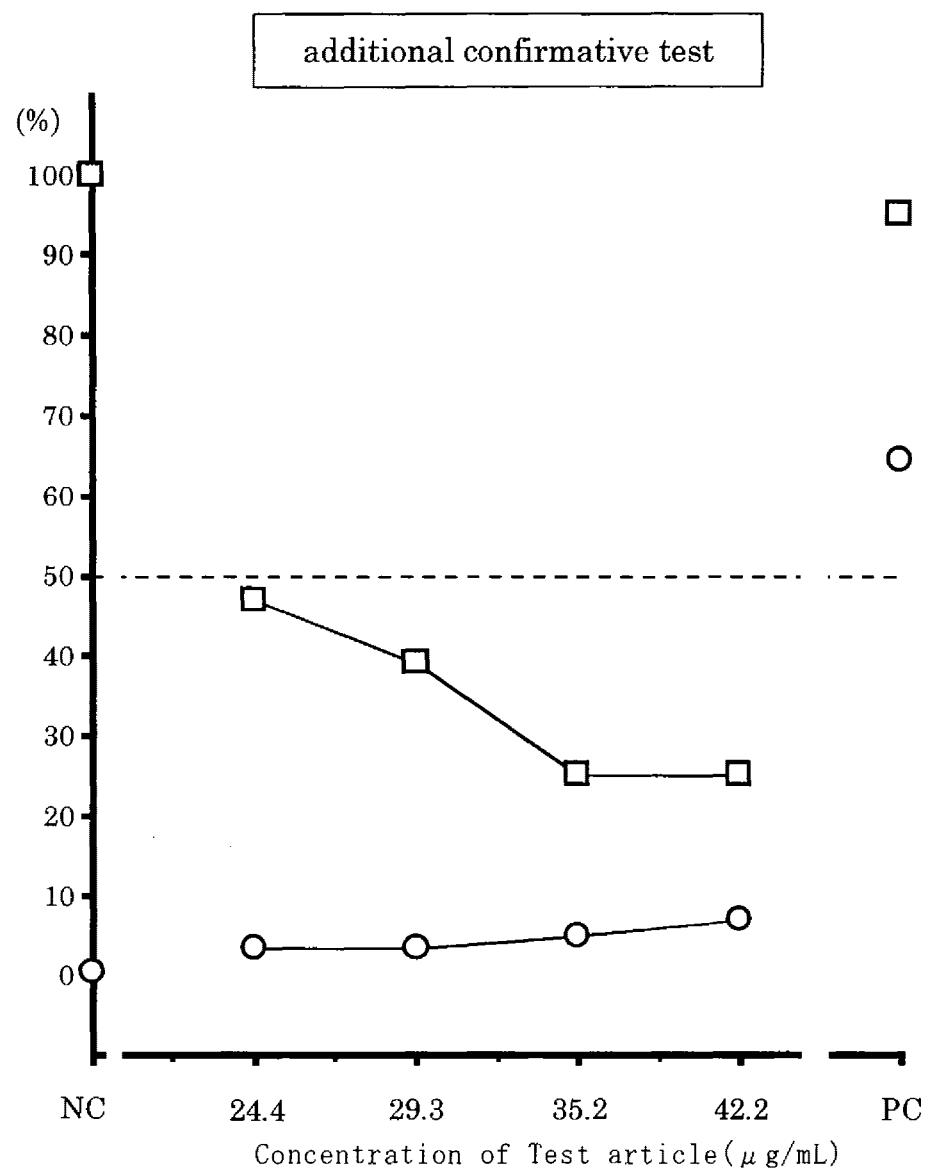


Fig. 5-1 Results of the cell- growth inhibition test (□) and chromosome aberration test (structural ○) treated with 4,4'-methylene bis(2-chlorobenzene amine)
 NC:negative control PC:positive control

Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: +S9 mix]

Study type	Treatment and Concentration	Cell- growth inhibition test				Treatment and Concentration	Chromosome aberration test					
S9 Time mix (hr)	(μ g/mL)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}		(μ g/mL)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}			
		Plate	Mean ^{b)}	Condition	Precipitates		Plate	Mean ^{b)}	Condition			
		1 and 2	(%)	of cells ^{d)}	/Crystals ^{e)}		1 and 2	(%)	of cells ^{d)}			
+ 6-18	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	—	—	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	—			
	Test article	21.1	60 80	70	—	—	Test article					
		42.2	60 60	60	—	—						
		84.4	40 40	40	—	—						
		169	20 20	20	++	+						
		338	40 20	30	+++	+						
		675	40 40	40	TOX	+						
		1350	20 0	10	TOX	+						
		2700	0 0	0	TOX	+						
		PC						PC	83 83	83	—	
		Concentration of 50% cell growth inhibition: 63.300 μ g/mL										

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 15 μ g/mL)

a): This plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): —: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+: There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of surviving cells.

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e): —: Absence of precipitates/crystals

+: Presence of needle-shaped crystals

Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test				Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test				
S9 Time mix (hr)	Plate 1 and 2		Cell growth ratio Mean ^{b)} (%)	Observation ^{a)}		Plate 1 and 2		Cell growth ratio Mean ^{b)} (%)	Observation ^{c)} Condition of cells ^{d)}			
				Condition of cells ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}							
- 6-18	Test article	0 (NC)	100 ^{a)} 125	100	— —	— —	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	— —		
		21.1	100 100	89	— —	— —						
		42.2	50 50	44	+ +	— —						
		84.4	50 50	44	++ ++	— —						
		169	25 0	11	+++ +++	— —						
		338	25 25	22	TOX TOX	+ +						
		675	25 25	22	TOX TOX	+ +						
		1350	25 0	11	TOX TOX	+ +						
		2700	25 0	11	TOX TOX	+ +						
		PC					PC	100 100	100	— —		
		Concentration of 50% cell growth inhibition: 39.387 μ g/mL										

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

a): The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): —: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+: There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of surviving cells.

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e): —: Absence of precipitates/crystals

+: Presence of needle-shaped crystals

Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test				Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test			
S9 Time mix (hr)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}		Cell growth ratio			Observation ^{c)}			
	Plate 1 and 2		Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}	Plate 1 and 2		Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}		
- 24	Test article	0 (NC)	100 ^{a)}	100	—	—	0 (NC)	100 ^{a)}	100	—	
		80		—	—	100		—			
		21.1	60	67	—	—					
			60		—	—					
		42.2	40	44	++	—					
			40		++	—					
		84.4	20	22	+++	—					
			20		+++	—					
		169	20	22	TOX	+					
			20		TOX	+					
		338	40	44	TOX	+					
			40		TOX	+					
		675	80	67	TOX	+					
			40		TOX	+					
		1350	60	67	TOX	+					
			60		TOX	+					
		2700	20	22	TOX	+					
			20		TOX	+					
		PC						PC	100	92	—
									83		—
Concentration of 50% cell growth inhibition: 36.696 μ g/mL											

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

a): The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): —: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+: There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of surviving cells.

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e): —: Absence of precipitates/crystals

+: Presence of needle-shaped crystals

Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment: 48hr]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test				Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test			
S9 Time mix (hr)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}		Cell growth ratio			Observation ^{c)}			
	Plate 1 and 2		Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}	Plate 1 and 2		Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}		
— 48	Test article	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	— —	— —	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	— —	
		21.1	66 55	61	+ +	— —	Test article				
			42.2		33 33	++ ++					— —
		84.4		11 11	11	+++ +++		— —	1.3	100 100	100
			169	11 11		11		TOX TOX		+	2.6
		338		11 11	11			TOX TOX	+	5.3	
			675	22 55		39		TOX TOX	+		10.6
		1350		11 22	17			TOX TOX	+	21.1	
			2700	11 11		11		TOX TOX	+		42.2
		PC						PC	100 100	100	
		Concentration of 50% cell growth inhibition: 29.389 μ g/mL									

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

a): The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): —: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

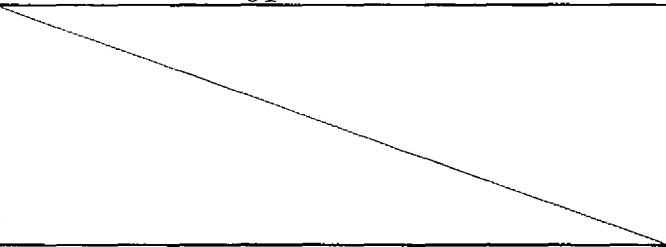
+++ : There was discontinuity among most of surviving cells.

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e): —: Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of needle-shaped crystals

Table 1-5 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[additional confirmative test]

Study type	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Additional confirmative test		
		Cell growth ratio		Observation ^{c)}
S9 Time mix (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}
48	0 (NC)	100 ^{a)} 91	100	— —
	Test article			
	24.4	49 41	47	— —
	29.3	33 41	39	— —
	35.2	24 24	25	+ +
	42.2	24 24	25	++ ++
	PC	91 91	95	— —

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

a): The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): —: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	1.5		5	0	2	0	0	0	1.0	3.5		68-1 03-1
			(100)	(3)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
			(100)	(0)		(4)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(5)		
		2.60	200	0.0		4	0	0	0	0	0	0.0	2.0		63-1 53-1
			(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	
			(100)	(0)		(4)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)		
		5.30	200	0.5		4	2	1	0	0	0	1.5	3.5		42-1 47-1
			(100)	(0)	-	(2)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(4)	-	
			(100)	(1)		(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		
		10.6	200	1.0		2	0	0	0	0	0	0.0	1.0		97-1 28-1
			(100)	(2)	-	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	-	
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		21.1	200	1.5		2	0	1	0	0	0	0.5	1.5		23-1 91-1
			(100)	(1)	-	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	-	
			(100)	(2)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		42.2	200	2.0		4	0	0	0	1	0	0.5	2.5		13-1 79-1
			(100)	(1)	-	(3)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(4)	-	
			(100)	(3)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		84.4	200	4.0		4	0	1	0	0	0	0.5	2.5		35-1 19-1
			(100)	(4)	-	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	-	
			(100)	(4)		(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		
		PC	200	0.0		4	67	140	1	0	0	79.0	79.0		88-1 87-1
			(100)	(0)	-	(3)	(34)	(69)	(0)	(0)	(0)	(79)	(79)	+	
			(100)	(0)		(1)	(33)	(71)	(1)	(0)	(0)	(79)	(79)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other :including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 15 μ g/mL)

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	6-18	NC	200	1.5		2	0	1	0	0	0	0.5	1.5		83-1 69-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(3)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		2.60	200	0.5		3	1	0	0	0	0	0.5	2.0		65-1 11-1
			(100)	(0)	-	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	-	
			(100)	(1)		(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)		
		5.30	200	1.0		2	0	2	0	0	0	1.0	2.0		01-1 18-1
			(100)	(1)	-	(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)	-	
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
-	6-18	10.6	200	1.0		0	3	0	0	0	0	1.5	1.5		86-1 34-1
			(100)	(2)	-	(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)	-	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		21.1	200	0.5		4	2	0	0	2	0	2.0	4.0		64-1 54-1
			(100)	(0)	-	(4)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(5)	-	
			(100)	(1)		(0)	(2)	(0)	(0)	(1)	(0)	(3)	(3)		
		42.2	200	1.5		0	1	0	0	0	0	0.5	0.5		27-1 21-1
			(100)	(0)	-	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	-	
			(100)	(3)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		84.4	200	2.5		2	0	2	0	0	0	1.0	2.0		10-1 04-1
			(100)	(1)	-	(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)	-	
			(100)	(4)		(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)		
		PC	200	1.0		7	13	20	0	0	0	16.0	19.5		29-1 22-1
			(100)	(1)	-	(5)	(5)	(9)	(0)	(0)	(0)	(14)	(19)	+	
			(100)	(1)		(2)	(8)	(11)	(0)	(0)	(0)	(18)	(20)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

other :including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 2-3 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	24-0	NC	200	0.0		3	1	1	0	0	0	1.0	2.5		17-1
			(100)	(0)		(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		59-1
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		1.30	200	0.0		4	1	0	0	0	0	0.5	2.5		67-1
			(100)	(0)	-	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	-	49-1
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		2.60	200	1.0		1	0	1	0	0	0	0.5	1.0		66-1
			(100)	(1)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	98-1
			(100)	(1)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		5.30	200	0.0		1	1	0	0	0	0	0.5	1.0		55-1
			(100)	(0)	-	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	-	62-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		10.6	200	0.5		2	1	0	0	1	0	1.0	2.0		20-1
			(100)	(1)	-	(1)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(3)	-	75-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		21.1	200	0.0		5	0	1	0	0	0	0.5	3.0		96-1
			(100)	(0)	-	(4)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	-	31-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		42.2	174	0.6		3	0	0	0	0	0	0.0	1.7		81-1
			(43)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		81-2
			(19)	(1)	TOX	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	TOX	05-1
			(69)	(0)		(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)		05-2
			(43)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		PC	200	0.5		17	19	34	2	0	0	25.0	31.5		56-1
			(100)	(1)	-	(8)	(9)	(19)	(1)	(0)	(0)	(24)	(31)	+	73-1
			(100)	(0)		(9)	(10)	(15)	(1)	(0)	(0)	(26)	(32)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other :including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

TOX: cell toxicity was observed.

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 2-4 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	48-0	NC	200	0.5		2	1	1	0	1	0	1.5	2.5		39-1 08-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(2)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(4)		
		1.30	200	0.5		0	2	0	0	1	0	1.5	1.5		84-1 51-1
			(100)	(1)	-	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	-	
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(2)		
		2.60	200	1.0		2	2	2	0	2	0	3.0	4.0		15-1 38-1
			(100)	(1)	-	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)	-	
			(100)	(1)		(2)	(1)	(1)	(0)	(2)	(0)	(4)	(6)		
		5.30	200	0.0		0	0	0	1	1	0	1.0	1.0		24-1 14-1
			(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)	-	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		10.6	200	0.0		1	1	0	0	2	0	1.5	2.0		25-1 45-1
			(100)	(0)	-	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(2)	-	
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(2)		
		21.1	200	0.0		1	0	3	0	1	0	2.0	2.5		90-1 77-1
			(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)	-	
			(100)	(0)		(1)	(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(3)	(4)		
		42.2	200	10.0		1	4	2	0	9	0	7.0	7.5		± 07-1 07-2 72-1 72-2
			(32)	(5)		(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(0)	(3)	(3)		
			(42)	(4)	+	(0)	(2)	(1)	(0)	(3)	(0)	(6)	(6)		
			(79)	(7)		(1)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(3)		
			(47)	(4)		(0)	(1)	(1)	(0)	(2)	(0)	(3)	(3)		
		PC	200	0.5		3	37	91	1	8	1	54.5	55.5		+ 82-1 70-1
			(100)	(1)	-	(2)	(12)	(45)	(0)	(3)	(0)	(51)	(53)		
			(100)	(0)		(1)	(25)	(46)	(1)	(5)	(1)	(58)	(58)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other :including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 2-5 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 4,4'-methylene bis (2-chlorobenzene amine)
[additional confirmative test]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	48-0	NC	200	0.0		1	0	0	0	1	0	0.5	1.0		
			(100)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(2)		74-1	
			(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		36-1	
		24.4	200	1.0	—	3	2	3	0	2	0	3.5	4.5	—	48-1
			(100)	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)	(0)	(1)	(0)	(5)	(5)		78-1
			(100)	(1)	(2)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(2)	(4)			
		29.3	200	7.0	±	1	1	2	0	4	0	3.5	4.0	—	33-1
			(100)	(8)	(6)	(1)	(0)	(2)	(0)	(2)	(0)	(4)	(5)		30-1
			(100)	(6)	(1)	(0)	(0)	(2)	(0)	(2)	(0)	(3)	(3)		
		35.2	200	15.5	+	1	3	0	0	7	0	5.0	5.5	±	26-1
			(100)	(15)	(16)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(2)	(2)		12-1
			(100)	(16)	(1)	(3)	(0)	(0)	(5)	(0)	(8)	(9)			
42.2	200	17.0	+	2	3	2	0	10	0	7.0	7.5	±	41-1		
	(100)	(19)	(15)	(1)	(1)	(2)	(0)	(6)	(0)	(8)	(8)		06-1		
	(100)	(15)	(1)	(2)	(0)	(0)	(4)	(0)	(6)	(7)					
PC	200	0.5	—	9	34	117	0	4	0	64.5	65.5	+	89-1		
	(100)	(1)	(4)	(17)	(60)	(0)	(1)	(0)	(66)	(66)		09-1			
	(100)	(0)	(5)	(17)	(57)	(0)	(3)	(0)	(63)	(65)					

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)



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) のほ乳類の培養
細胞を用いる染色体異常試験

M-1127

2004 年 9 月 16 日

株式会社 **ボソリサーチセンター**

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

試験番号 : M-1127

試験表題 : 4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) のほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

訂正箇所 1 : 考察

〔訂正前〕

4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は白色針状粉末結晶の性状を持ち、細胞増殖抑制試験では培養液交換前や標本作製前の光学顕微鏡を用いた観察で針状結晶の析出が認められている。染色体異常試験では同様な針状結晶の析出は認められなかったが、前述のビタミン B2 の報告¹⁰⁾では電子顕微鏡レベルの針状結晶が倍数性細胞の出現率を増加させることが証明されていることから、本被験物質の場合も光学顕微鏡では確認出来ない微細な針状結晶によって倍数性細胞の増加が生じた可能性も推察される。

以上の結果から、4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は、本試験条件下において染色体構造異常誘発性は equivocal、倍数性細胞誘発性は陽性とそれぞれ判定され、総合的には染色体異常誘発能を有するものと判定した。

〔訂正後〕

4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は白色針状粉末結晶の性状を持ち、細胞増殖抑制試験では培養液交換前や標本作製前の光学顕微鏡を用いた観察で針状結晶の析出が認められている。染色体異常試験では同様な針状結晶の析出は認められなかったが、前述のビタミン B2 の報告¹⁰⁾では電子顕微鏡レベルの針状結晶が倍数性細胞の出現率を増加させることが証明されていることから、本被験物質の場合も光学顕微鏡では確認出来ない微細な針状結晶によって倍数性細胞の増加が生じた可能性も推察される。

なお、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、復帰突然変異試験¹¹⁾、染色体異常試験¹²⁾、姉妹染色分体交換試験¹²⁾、不定期 DNA 合成試験¹²⁾、小核試験¹²⁾及びマウスリンフォーマ試験¹³⁾で陽性の結果が、3,3'-dichloro-4,4'-diaminobiphenyl dihydrochloride (CAS Registry No. 612-83-9) は細菌を用いる復帰突然変異試験¹⁴⁾で陽性の結果が、3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenyl ether (CAS Registry No. 28434-86-8) は DNA 修復試験⁸⁾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¹⁵⁾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^{16,17)}及び不定期 DNA 合成試験¹⁵⁾で陽性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の結果から、4,4'-メチレンビス (2-クロロベンゼナミン) は、本試験条件下において染色体構造異常誘発性は *equivocal*、倍数性細胞誘発性は陽性とそれぞれ判定され、総合的には染色体異常誘発能を有するものと判定した。

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

〔訂正前〕

- 5) Kugler-Steigmeier, M.E. *et al.*, Mutation Res., 211, 279-289 (1989)
- 6) Mitchell, A.S. *et al.*, Environ. Mol. Mutagen., 12 (Suppl. 13), 37-101 (1988)
- 7) Rosenkranz, H.S. *et al.*, Environ. Mol. Mutagen., 16, 149-177 (1990)
- 8) Mori, H. *et al.*, Mutation Res., 204, 683-688 (1988)
- 9) Salamone, M.F. *et al.*, Prog. Mutat. Res., 1, 682-687 (1981)
- 10) Kawaguchi, Y., Hayashi, H., Sato, M. & Shindo, Y., Needle crystals of vitamin B2 induce polyploidy in Chinese hamster lung (CHL/IU) cells, Mutation Res., 371 (1997) 1-7

〔訂正後〕

- 5) Kugler-Steigmeier, M.E. *et al.*, Mutation Res., 211, 279-289 (1989)
- 6) Mitchell, A.S. *et al.*, Environ. Mol. Mutagen., 12 (Suppl. 13), 37-101 (1988)
- 7) Rosenkranz, H.S. *et al.*, Environ. Mol. Mutagen., 16, 149-177 (1990)
- 8) Mori, H. *et al.*, Mutation Res., 204, 683-688 (1988)
- 9) Salamone, M.F. *et al.*, Prog. Mutat. Res., 1, 682-687 (1981)
- 10) Kawaguchi, Y., Hayashi, H., Sato, M. & Shindo, Y., Needle crystals of vitamin B2 induce polyploidy in Chinese hamster lung (CHL/IU) cells, Mutation Res., 371 (1997) 1-7
- 11) McCann, J. *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 5135-5139 (1975)
- 12) IARC Monograph Suppl. 6, 96-100 (1987)
- 13) Sarkar, F.H. *et al.*: Mutat. Res. 242, 319-328 (1990)
- 14) Lazear, E.J. *et al.*: Cancer Lett. 4, 21-25 (1977)
- 15) Martin, C.N.: Cancer Res. 38, 2621-2627 (1978)
- 16) Meserely, E.A. *et al.*: Environ. Mol. Mutagen., 10, 263-274 (1987)
- 17) Iba, M.M.: Mutat. Res. 182, 231-241 (1987)

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献を追記する。

訂正年月日 : 2004 年 9 月 16 日