最終報告書

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号:9891 (115-210)

試験委託者 厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安金性評価センター

目 次

要	約		5
1.	表題		6
2.	試験目	的	6
3.	遵守し	たGLPおよび準拠したガイドライン	6
4.	試験番	号·	6
5.	試験施	<u>,</u>	6
6.	試験委	託者	6
7.	試験責	任者	7
8.	被験物	質等管理責任者	7
9.	主担当	者および試験従事者	7
10.	資料保	存施設管理責任者	7
11.	試験日	程	7
12.	被験物	質	8
13.	試験材	料および方法	10
14.	試験結	果	18
15.	考察お	よび結論	20
16.	参考文	歓	20
17.	参考と	した資料	21
18.	試験関	系資料の保存	22
19.	予見す	ることができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および	
	試験計	画書に従わなかったこと	22
Figu	res		
Figu	ire 1	Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
		in strain TA100	23
Figu	ire 2	Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
		in strain TA1535	24
Figu	ire 3	Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
		in strain WP2uvrA	25
Figu	ire 4	Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
		in strain TA98	26

Exp. No. 9891 (115-210) FINAL REPORT

Figure 5	Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA1537	27
Figure 6	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA100	28
Figure 7	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA1535	29
Figure 8	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain WP2uvrA	30
Figure 9	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA98	31
Figure 10	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA1537	32
Figure 11	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA100 (Additional study)	33
Figure 12	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA1535 (Additional study)	34
Figure 13	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA98 (Additional study)	35
Figure 14	Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	
	in strain TA1537 (Additional study)	36
Tables		
Table 1	Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	2
	[Non-activation method: –S9]	37
Table 2	Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethano	3
	[Activation method: +S9]	38
Table 3	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-	
	diamino diphenylmethane [Non-activation method: -S9]	39
Table 4	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-	
	diamino diphenylmethane [Non-activation method: +S9]	41
Table 5	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-	
	diamino diphenylmethane (Additional study) [Non-activation method: -S9]	42

要 約

当該試験条件下において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンには 遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判定した.

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌(Salmonella typhimurium)TA100 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌(Escherichia coli)WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、0.610 ~ $5000~\mu g$ /プレートのいずれの用量においても、ラット肝ミクロソーム(S9)添加の有無にかかわらず、陰性対照の 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した.

また、用量設定試験、本試験および本試験(追加試験)により、試験結果の再現性が確認された.

1. 表題

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの細菌を用いる復帰突然変異試 験

2. 試験目的

被験物質の遺伝子突然変異誘発性を細菌を用いた復帰突然変異試験にて検討する.

3. 遵守した GLP および準拠したガイドライン

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号,平成 15・11・17 製局第 3 号,環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17 ガイドライン
- 新規化学物質等に係る試験の方法について(平成15年11月21日薬食発第1121002号)
 デ成15・11・13製局第2号,環保企発第031121002号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

4. 試験番号

9891 (115-210)

5. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

6. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目2番2号

厚生労働省 医薬食品局 審查管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

和名:2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン

英名: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

- 12.2. ロット番号
- 12.3. 純度

99.6%

残り (0.2%: 三量体, 0.2%: 不明)

- 12.4. 被験物質提供者
- **12.5.** 入手年月日 平成 18 年 8 月 9 日
- **12.6.** 入手量 200 g
- 12.7. 保存条件 冷蔵・気密
- 12.8. 保存場所

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72 保存期間:2006年8月9日~同年9月4日 実測値:3.3~7.7°C
- 6 号館 2 階被験物質調製室内バイオマルチクーラー ch. 41 保存期間: 2006 年 9 月 4 日~同年 10 月 4 日 (最終使用日)

実測値:3.3~9.4℃

12.9. 化学名(別名)

ビス (4-アミノ-2,3-ジクロロフェニル) メタン

- 12.10. CAS No. 42240-73-3
- 12.11. 化学構造

- **12.12.** 分子式 C₁₃H₁₀Cl₄N₂
- **12.13.** 分子量 336.04
- **12.14.** 物質の状態 淡黄褐色粉粒体
- **12.15.** 融点 145℃以上
- **12.16.** 比重 1.39(165°C)
- 12.17. 溶解性

水:1 mg/mL以下

DMSO:可溶(400 mg/mL以上)

- 12.18. 安定性 通常の取り扱い条件においては安定.
- 12.19. 取り扱い上の注意

酸化剤との接触に注意する.

取り扱いは換気の良い場所で行い、粉塵が飛散しないように注意する. 適切な保護具を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないようにする.

12.20. 残余被験物質の処理

実験終了後,1gの被験物質を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存した.当該被験物質に関わる全ての実験が終了した後,残余を被験物質提供者に返却した.

12.21. 安定性の確認方法

返却した被験物質について被験物質提供者が分析を実施し、その結果から、実験実施 期間中、被験物質は安定であったと判断した.

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

遺伝毒性ガイドラインの細菌を用いる復帰突然変異試験法で指定されている次の 5 種類の菌株を使用した.

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2uvrA	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は、1983 年 9 月 6 日にカリフォルニア大学 から、 また、大腸菌については 1983 年 3 月 16 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生 研究所) から分与を受けた.

2006 年 8 月 23 日~同年 8 月 25 日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した.

各菌株の保存は、菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO, GC 用、純度 99.9%, Lot No. K30049278, Merck) を容量比 80:7 の割合で添加した後、凍結保存用チューブ に 0.2 mL ずつ分注した.これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー (MDF-U71V、三洋電機;設定値:-80°C、基準値:-60°C以下)に保存した.

13.2. 培地の調製

13.2.1. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

テスメディア AN 培地(2006年7月4日製造,Lot No. ANI680GV,オリエンタル酵母工業)を試験に使用した。本プレートは,Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである.

是小がルコー	ス寒天平板培地の組成を以下に示す.	
ロッソノルー	へ去た人士がおうかりがけななレストレンハリ・	

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天(BA-30A,Lot No. 51115,伊那食品工業)	10.4	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

0.5 w/v%塩化ナトリウム/0.6 w/v%寒天 (Bacto-agar, Lot No. 4246218, BD Diagnostic Systems) 水溶液をオートクレーブで滅菌した. この寒天溶液 10 容量に, ネズミチフス 菌を用いる試験の場合は, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) / 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 702W2180, 関東化学) 水溶液を 1 容量加え, 大腸菌を用いる試験の場合は, 0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 701W2154, 関東化学) 水溶液を 1 容量加えた.

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液 25 mL を分注し, これに融解した 菌懸濁液 50 μ L を接種した. フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し, 培養開始までの間, 設定温度 4° C に静置した. その後, 37° C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した. 試験毎に菌株の培養を実施し, 菌懸濁液は培養終了後速やかに使用された.

ATPフォトメーター (ルミテスターK-100, キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が 1.0×10^9 /mL以上であることを確認した. 生菌数を次の表に示す.

公理生命		生菌	菌数(× 10 ⁹ ∕ml	L)	
試験	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
用量設定試験	4.68	4.47	4.37	3.59	2.21
本試験	4.14	3.76	4.49	2.34	1.48
本試験 (追加試験)	3.78	3.43	~	2.83	1.69

13.4. S9 mix

製造後 6 ヵ月以内の S9 mix(Lot No. FSM-546, キッコーマン)を試験に使用した. 使用時まで超低温フリーザー(設定値:-80°C, 基準値:-60°C 以下)に保存した.

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法等を次の表に示す.

ロット番号	RAA-546				
製造年月日	2006年7月7日 (誘導物質投与開始後5日目)				
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系				
性/週齡	雄/7 週齢				
体重	211~249 g				
臓器	肝脆				
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)				
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1回(1日日) 60 mg/kg 3回(2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回(3日目)				
投与方法	腹腔内投与				
蛋白含量	24.79 mg/mL				

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

S9	0.1	mL
$MgCl_2$	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100	μmol

13.5. 被験物質液の調製

被験物質は、水に不溶で、DMSOには可溶であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSO (SeccoSolv®、純度 \geq 99.5%、Lot No. K35364331、Merck)に溶解させた.

用量設定試験では、使用直前に被験物質 350 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約6 mL を加え、撹拌しながら溶解させた. さらに、DMSO を加えて 7 mLに定容し、50.0 mg/mL 調製原液を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を DMSO 4.5 mL に加えることにより、20.0 mg/mL 液を調製した. 以下同様に希釈を行い、8.00、3.20、1.28、0.512、0.205 および 0.0819 mg/mL 液を調製した.

本試験では、使用直前に被験物質 400 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 6 mL を加え、撹拌しながら溶解させた. さらに、DMSO を加えて 8 mL に定容し、50.0 mg/mL 調製原液を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液 4 mL を DMSO 4 mL に加えることにより、25.0 mg/mL 液を調製した. 以下同様に希釈を行い、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 および 0.00610 mg/mL 液を調製した.

さらに、用量設定試験では、-S9 処理のネズミチフス菌(4 菌株)において、生育阻害作用がみられない用量が 4 用量確保できなかったことから、本試験(追加試験)を実施した. 本試験(追加試験)では、使用直前に被験物質 25 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、撹拌しながら溶解させた. さらに、DMSOを加えて 5 mL に定容し、5.00 mg/mL 調製原液を準備した. この 5.00 mg/mL 調製原液の5 mL を DMSO 4.5 mL に加えることにより、0.500 mg/mL 液を調製した. この 0.500 mg/mL 調製原液 2.5 mL を DMSO 2.5 mL に加えることにより、0.250 mg/mL 液を調製した. 以下同様に希釈を行い、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 および 0.00781 mg/mL 液を調製した. 調製した.

いずれの試験においても、調製後、被験物質液は速やかに使用された. なお、被験物質液(調製後2時間以内)に発熱、発色、発煙等の変化は認められなかった.

13.5.1. 残余被験物質調製液の処理

いずれの試験においても処理終了後、専用の容器(安全廃棄システム、 $NALGENE^{®}$)に廃棄した.

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性(溶媒)対照

被験物質液調製に用いる溶媒である DMSO を使用した.

13.6.2. 陽性対照

下記の陽性対照物質を試験に使用した。AF-2, 9-AAおよび 2-AAは, DMSO (Lot No. K30049278, Merck) を用いて調製し、NaN₃は、注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. 5F77N、大塚製薬工場)を用いて調製した。各調製液を凍結保存用チューブに 0.5 mLずつ分注し、凍結(設定値: -80° C、基準値: -60° C以下)保存したものを試験に用いた(使用期限: 2007 年 12 月 28 日)。

AF-2	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド
	(含量 99.5%, Lot No. PKE1831, 和光純薬工業)
NaN_3	アジ化ナトリウム
	(純度 99.5%, Lot No. KLH1033, 和光純薬工業)
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩
	(純度 99.3%, Lot No. 16323JR, Sigma-Aldrich)
2-AA	2-アミノアントラセン
	(含量 95.0%, Lot No. KLH1058, 和光純薬工業)

《代謝活性化系非存在下:-S9 処理》

菌株	陽性対照 物質	陽性対照 溶液調製日	用量 (μg/ プレート)	陽性対照物 質溶液濃度 (μg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2006.5.29	0.01	0.1
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2006.5.29	0.1	1.0
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2006.5.29	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2006.5.29	80	800
大腸菌 WP2uvrA	AF-2	2006.5.29	0.01	0.1

《代謝活性化系存在下:+S9 処理》

菌株	陽性対照 物質	陽性対照 溶液調製日	用量 (μg/ プレート)	陽性対照物 質溶液濃度 (μg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2006.5.29	1.0	10
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2006.5.29	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2006.5.29	2.0	20
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2006.5.29	2.0	20
大腸菌 WP2uvrA	2-AA	2006.5.29	10	100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインと GLP」 (労働省安全衛生部化学物質調査課編、1991年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液 (調製原液) ならびに S9 mix については無菌試験を実施した. すなわち、 調製原液 $100 \, \mu L$ あるいは S9 mix $500 \, \mu L$ にトップアガー $2 \, m L$ を添加し、プレート上に 注いだ. 37° C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した. 調製原液およ び S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した.

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった.

13.7. 用量設定試験(予備試験)

13.7.1. 用量

用量設定試験における被験物質の用量として,ガイドライン上定められた 5000 μ g/プレートを最高用量とし,以下,2000,800,320,128,51.2,20.5 および 8.19 μ g/プレートを設定した.

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

1用量当たり3枚のプレートを用いた.

油性インクを用いて、試験菌株、S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を $100 \, \mu L$ 、次いで、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合は、 $0.1 \, \text{mol}/\text{L}$ ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4) $500 \, \mu L$ を、代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合は、S9 mix $500 \, \mu L$ を分注した。 さらに、前培養した試験菌株懸濁液 $100 \, \mu L$ を加えた後、ウォーターバスシェーカー (M- 100^N 、タイテック)を用いて、 37° C、 $120 \, \text{回}/分の条件で、<math>20 \, \text{分間振盪した(プレインキュベーション)。振盪終了後、トップアガー2 mLを添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ、一様に広げた。恒温器(SSV-R11DA、池田理化)を用い、各プレートを <math>37^{\circ}$ Cの条件で、 $48 \, \text{時間培養した}$.

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉 眼で観察した.

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株(背景菌)の生育状態について実体顕微鏡(×40)を用いて観察した.次いで、復帰突然変異により生じたコロニー数を計測した.計測に際しては、コロニーアナライザー(CA-II、システムサイエンス)を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した.生育阻害あるいは析出物によりコロニーアナライザーの使用が不適当な場合は、目視でコロニー数を計数した.

本試験 13.8.

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果、いずれの試験菌株においても変異原性が認められなかったため、 試験菌株に対する生育阻害が認められなかった菌株については、ガイドラインで定めら れた 5000 µg/プレートを最高用量として下表に示す 6 用量を設定した。また、生育阻 害が認められた菌株については、生育阻害が認められると考えられる用量を含めた6あ るいは7用量を設定した.

《代謝活性化系非存在下:-S9 処理》

菌株			用量	(μg/プレ	ート)		
TA100	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1
TA1535	_	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1
WP2uvrA	-	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA98	_	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1
TA1537	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1

《代謝拉香性孔	/玉左左	Б.	150	如理》

菌株			用量(μg/	/プレート)		
TA100	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2uvrA	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	78.1	156	313	625	1250	2500

- 13.8.2. 使用プレート数および識別方法 13.7.2.に記載した方法に準じた.
- 13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件 13.7.3.に記載した方法に準じた.
- 13.8.4. 析出等の観察 13.7.4.に記載した方法に準じた.
- 13.8.5. コロニー数計測 13.7.5.に記載した方法に準じた.

13.9. 本試験(追加試験)

用量設定試験の-S9 処理のネズミチフス菌 (4 菌株) において、生育阻害作用を示さない用量が 4 用量得られず、当該菌株について本試験との再現性が確認できなかったことから、本試験(追加試験)を実施した.

13.9.1. 用量

本試験の結果、いずれの試験菌株においても、変異原性は認められなかった。-S9 処理のネズミチフス菌に対する生育阻害作用は、-S9 処理の TA100 株および TA1537 株では 19.5 μg /プレート以上の用量で、TA1535 株および TA98 株は 39.1 μg /プレート以上の用量で認められた。したがって、本試験(追加試験)における被験物質の用量として、生育阻害が認められると考えられる用量を含めた下表に示す 6 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下:-S9 処理》

菌株			用量(μg/	プレート)		
TA100	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0
TA1535	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA98	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA1537	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0

- 13.9.2. 使用プレート数および識別方法 13.7.2.に記載した方法に準じた.
- 13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件 13.7.3.に記載した方法に準じた.
- 13.9.4. 析出等の観察 13.7.4.に記載した方法に準じた.
- 13.9.5. コロニー数計測13.7.5.に記載した方法に準じた.

13.10. 試験成立条件

- a. 陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、背景データから求めた基準 値内であること
- b. 陽性対照のコロニー数は、同時に得られた陰性対照の値の2倍を超えること 上記の条件を満たした場合に、試験は成立したと判断した.

13.11. 結果の解析

平均復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、陽性と判定した.

統計学的手法を用いた検定は、実施しなかった.

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示す.

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、-S9 処理の全菌株の低用量あるいは中用量以上の用量において、+S9 処理のTA100 株および TA1537 株の高用量において、試験菌株に対する生育阻害作用が認められた。

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.2. 被験物質の析出等(用量設定試験)

処理開始時に、-S9 処理および+S9 処理ともに $128 \, \mu g$ /プレート以上の用量で反応液に白濁および白色粉末状の析出物が観察された。プレインキュベーション後、-S9 処理では $128 \, \sim 320 \, \mu g$ /プレートの用量、+S9 処理では $128 \, \mu g$ /プレート以上の用量において、処理開始時に認められた白濁が消失していた。さらに、+S9 処理の $20.5 \, \mu g$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、 $2000 \, \mu g$ /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が認められた。

コロニー数計測時では、-S9 および+S9 処理ともに $128 \mu g/プレート以上の用量で白色粉末状の析出物がみられ、さらに、<math>+S9$ 処理の $5000 \mu g/プレートの用量で白色塊状の析出物が観察された。$

析出物の影響により、-S9 処理の 2000 μg/プレート以上および+S9 処理の 320 μg/プレート以上の用量では、コロニーアナライザーの使用が不適当と判断し、目視によりコロニー数を計数した。

14.3. 本試験

結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示す.

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理の TA100 株および TA1537 株では $19.5 \, \mu g$ /プレート以上の用量で、TA1535 株および TA98 株では $39.1 \, \mu g$ /プレート以上の用量で、WP2uvrA 株では $625 \, \mu g$ /プレートの用量で、

また、+S9 処理の TA100 株および TA1537 株では 1250 μg / プレート以上の用量で認められた.

陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.4. 被験物質の析出等(本試験)

処理開始時に、-S9 処理の $78.1 \, \mu g$ / プレート以上の用量で、また、+S9 処理の $156 \, \mu g$ /プレート以上の用量で反応液に白濁および白色粉末状の析出物が観察された. プレインキュベーション後、-S9 および+S9 処理の処理開始時に認められた白濁は消失していた. さらに、+S9 処理の $39.1 \, \mu g$ / プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、 $1250 \, \mu g$ /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が認められた.

コロニー数計測時では、-S9 および+S9 処理ともに $78.1 \, \mu g$ / プレート以上の用量で白色粉末状の析出物がみられ、さらに、+S9 処理の $2500 \, \mu g$ / プレート以上の用量で白色塊状の析出物が観察された。

析出物の影響により、+S9 処理の 156 μg/プレート以上の用量では、コロニーアナライザーの使用が不適当と判断し、目視によりコロニー数を計数した.

14.5. 本試験(追加試験)

結果を Figure 11~14 および Table 5 に示す.

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、いずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、TA100株およびTA1537株では25.0 μg /プレートの用量で、TA1535株およびTA98株では50.0 μg /プレートの用量で認められた。

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.6. 被験物質の析出等(本試験-追加試験)

処理開始時およびコロニー数計測時において,被験物質の析出等の特筆すべき変化は, 認められなかった.

15. 考察および結論

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌(ネズミチフス菌・大腸菌)を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した.

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 μg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害を示す用量を設定し、試験を行った。その結果、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、-S9 処理および+S9 処理の全ての試験菌株において、陰性対照と比較し、2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、本試験および本試験(追加試験)により、再現性が確認された.

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 1) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判定した.

なお、これまでに被験物質 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンについての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は得られていない.

類縁体である 4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン)は、人において発がん性を示し $1)^{-3}$,遺伝子損傷を引き起こす $4)^{-6}$ ことが報告されている。さらに、細菌を用いる復帰 変異試験で陽性7との報告があり、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で数的異常を誘発する8)ことも報告されている。

16. 参考文献

- IARC: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 57: p.271-303. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Also, 1993, Suppl.7: 246-247.
- 2) Ward E, Smith AB, Haiperin W.: 4,4'-Methylenebis (2-chloroaniline): an unregulated carcinogen. Am J Ind Med. 1987, 12(5): 537-549.
- 3) Ward E, Haiperin W, Thun M, Grossman HB, Fink B, Koss L, Osorio AM, Schulte P.: Bladder tumors in two young males occupationally exposed to MBOCA. Am J Ind Med. 1988, 14(3): 267-272.
- 4) McQueen CA, Williams GM.: Review of the genotoxicity and carcinogenicity of 4,4'-methylene-dianiline and 4,4'-methylene-bis –2-chloroaniline. Mutat. Res. 1990, 239(2): 133-142.

- 5) Kuslikis BI, Trosko JE, Braselton WE Jr.: Mutagenicity and effect on gap-junctional intercellular communication of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) and its oxidized metabolites. Mutagenesis 1991, 6(1): 19-24.
- Segerback D, Kadlubar FF.: Characterization of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) –DNA adducts formed in vivo and in vitro. Carcinogenesis 1992, 13(9): 1587-1592.
- 7) 望月肇, 中村香里, 高部道仁, 園明, 化学物質毒性試験報告 Vol. 12, 203-207, 2005.
- 8) 園明, 石井孝広, 高部道仁, 化学物質毒性試験報告 Vol. 12, 208-214, 2005.

17. 参考とした資料

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Nat Acad Sci 1973; 70: 782-6.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens. a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci USA. 1973; 70 (8): 2281-5.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31: 347-64.
- Yahagi T. [Screening methods using microbes for the environmental carcinogens (author's transl)]. [Article in Japanese]. Protein, Nucleic Acid and Enzyme 1975; 20: 16-27.
- Ministry of Labor, Industrial Safety and Health Department. [Test Guidelines and GLP for Mutagenicity Test using Microorganisms in the Safety and Health Law]. Tokyo; Japan Industrial Safety and Health Association; 1991.
- Ishidate M Jr editor. [The data book for mutagenicity assay using microorganisms]. [Article in Japanese]. Life-science Information Center Press; 1991.

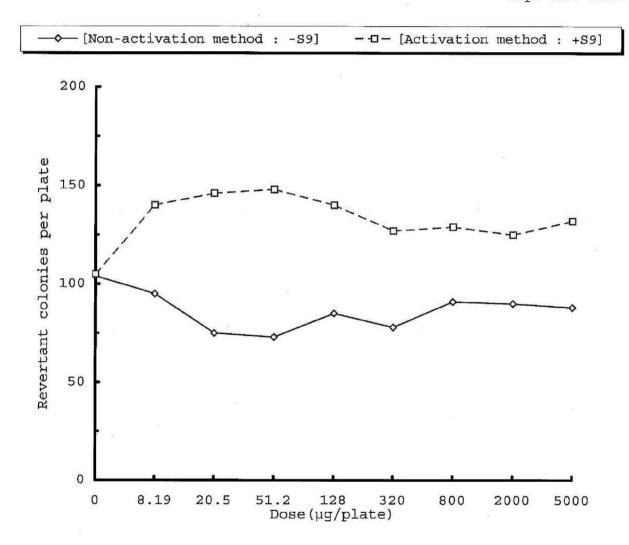


Figure 1. Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA100

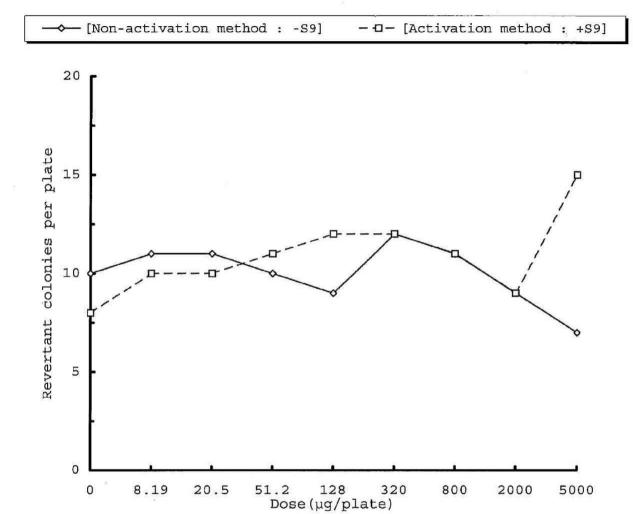
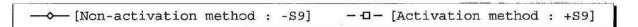


Figure 2. Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA1535



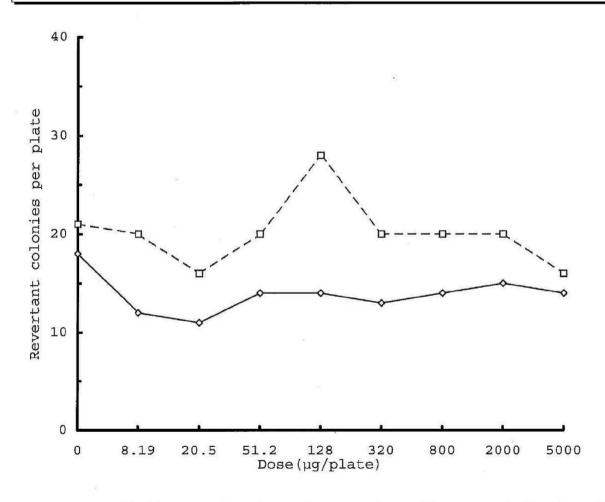


Figure 3. Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain WP2uvrA



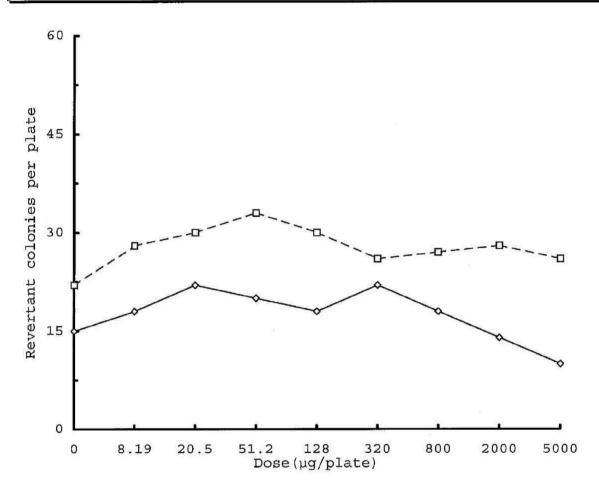


Figure 4. Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA98



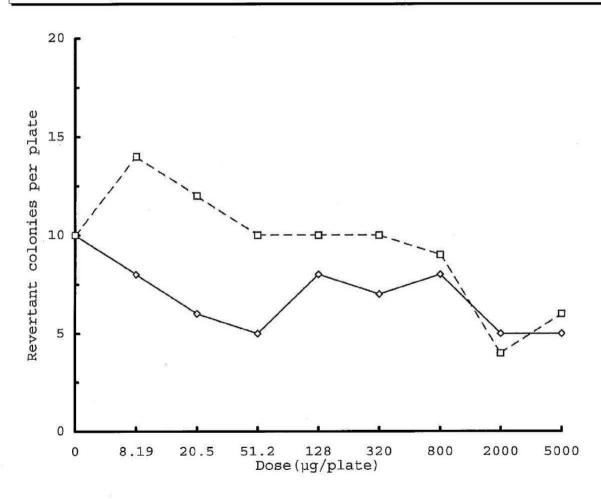


Figure 5. Dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA1537

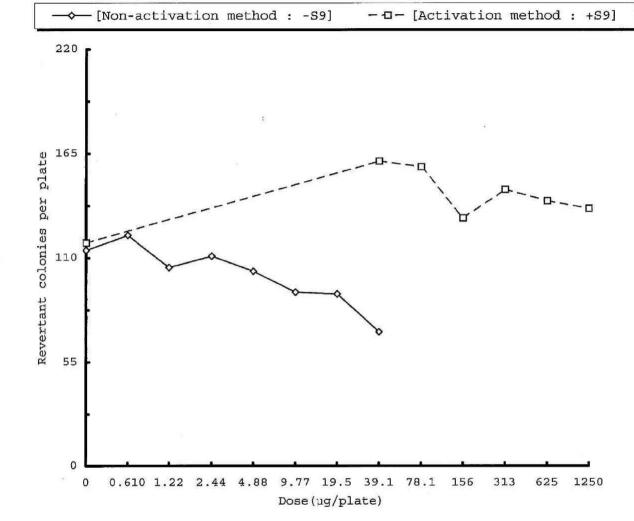


Figure 6. Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA100

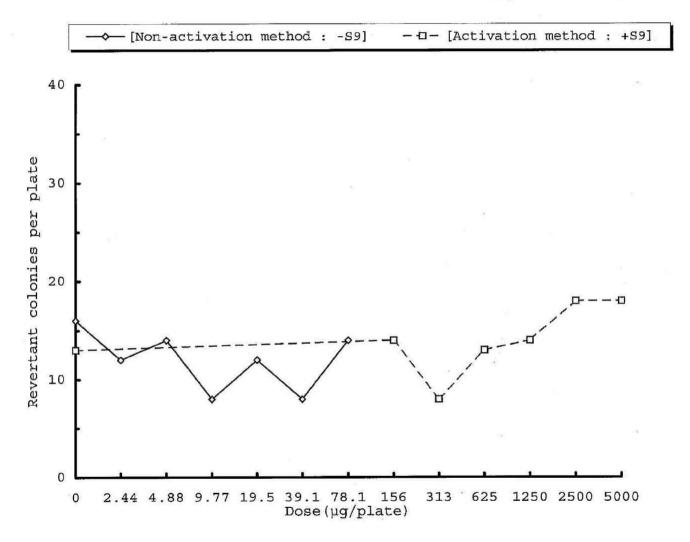


Figure 7. Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA1535



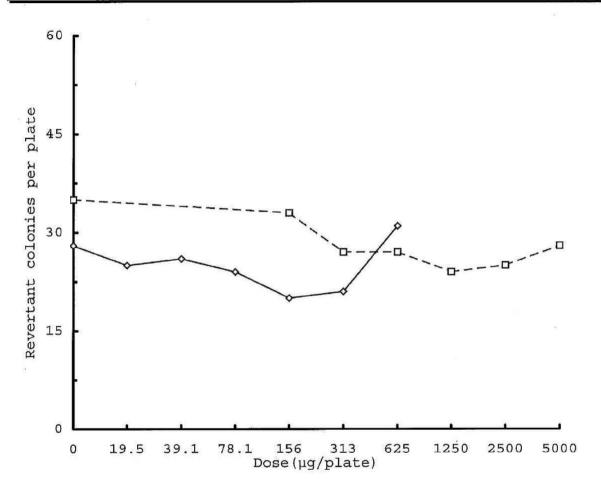


Figure 8. Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain WP2uvrA

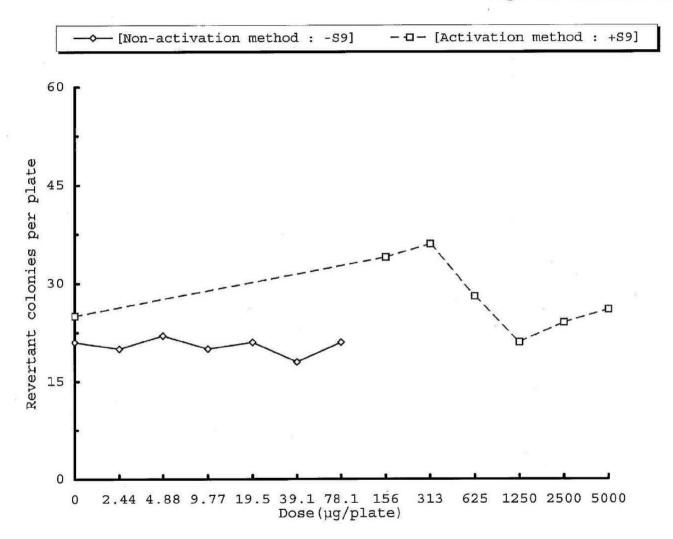


Figure 9. Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA98

- 32 -

Figure 10. Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA1537

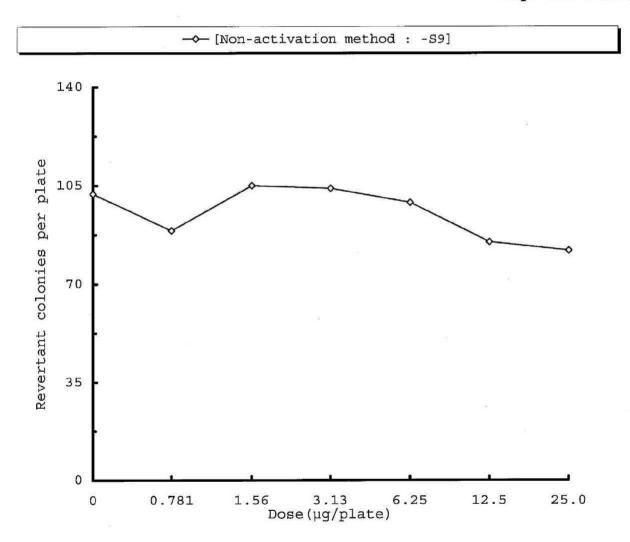


Figure 11. Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA100 (Additional study)

20

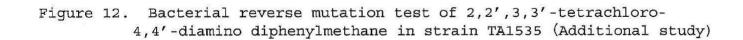
10

0

1.56

3.13

→ [Non-activation method : -S9] 40 Revertant colonies per plate 30



6.25 Dose(μg/plate)

12.5

25.0

50.0

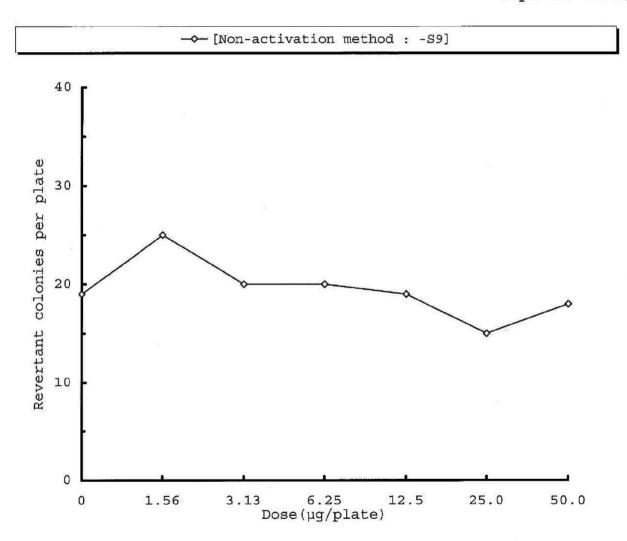
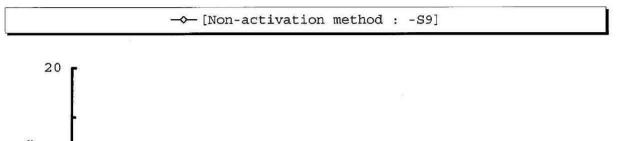


Figure 13. Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA98 (Additional study)



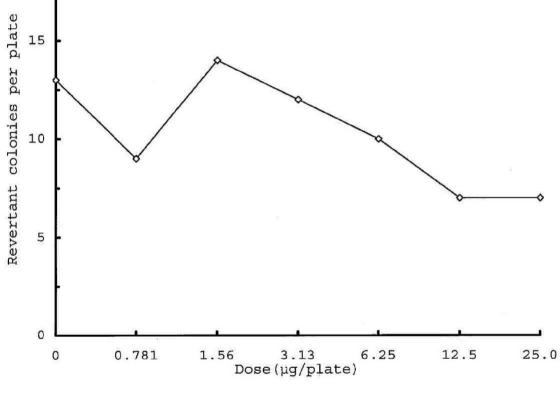


Figure 14. Bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane in strain TA1537 (Additional study)

Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Non-activation method : -S9]

-	D						Rever	tant co	lonies	s per p	plate [M	Mean±S	.D.]	About the state of	0.000		i d Anner -
Compound	Dose (µg/plate)			TA100		Т	'A1535		W	P2uvrA			TA98		J	TA1537	
DMSO a)	0	[90 104	104 ±	117 14][12 10	10 ±	8 2][18 18	19 ±	16 2][12 15	18 ±	15 3][11 10	7 ±	13 3]
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	1	89 95	98 ±	97 5][8 11	12 ±	14 3][14 12	10 ±	13 2][16 18	20 ±	18 2][10 8	7 ±	8 2]
4,4'-diamino diphenylmethan	20.5 ie]	81* 75	70* ±	73* 6][9 11	12 ±	12 2][13 11	9 ±	12 2][23 22	22 ±	21 1][6* 6	6* ±	6* 0]
	51.2	[75* 73	73* ±	70* 3][12* 10	8* ±	9* 2][14 14	16 ±	13 2][23* 20	17* ±	21* 3][7 * 5	4 * ±	5* 2]
	128 +	[87* 85	82* ±	87* 3][8 * 9	12* ±	7* 3][15 14	15 ±	12 2][16* 18	20* ±	18* 2][11* 8	6* ±	6* 3]
	320 +	[84* 78	73* ±	78* 6][10* 12	14* ±	11* 2][11* 13	13* ±	16* 3][24* 22	20* ±	23* 2][8* 7	5* ±	9* 2]
	800 +	Į	86* 91	98* ±	90* 6][11* 11	11* ±	11* 0][12* 14	11* ±	19* 4][20* 18	19* ±	14* 3][6* 8	12* ±	6* 3]
	2000 +	E	91 * 90	99* ±	80* 10][10* 9	* ±	8* 1][16* 15	12* ±	17* 3][16* 14	11* ±	14* 3][6* 5	6* ±	4* 1]
	5000 +	[86# 88	93# ±	86# 4][6# 7	6# ±	10# 2][12# 14	12# ±	19# 4][10# 10	11# ±	9# 1][5# 5	5# ±	4# 1]
Positive contr		d	k i	AF-2 0.01			NaN ₃ 0.5	211		AF-2 0.01	E .		AF-2 0.1			9-AA 80	
Revertant colo		. [743 717	710 ±	697 24][654 599	559 ±	583 49][99 110	110 ±	121 11][67 1 650	638 ±	641 18][282 345	361 ±	391 56]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN3: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

^{* :} Growth inhibition was observed.

^{+ :} Visible precipitation was observed at the end of exposure period.
: The growth of background lawn of bacteria can't be observed by visible precipitation.

Compound	Dose	_					Revei	tant co	lonie	s per	plate [M	Mean±	S.D.J				Illegonyn Stea
Compound	(µg/plate)			TA100			TA1535		V	NP2uvrž	A		TA98		T	A1537	
DMSO a)	0	[113 105	103 ±	100 7][7 8	8 ±	10 2][17 21	23 ±	23 3][22 22	20 ±	24 2][11 10	10 ±	8 2
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19]	149 140	137 ±	133 8][8 10	11 ±	11 2][23 20	20 ±	16 4][27 28	27 ±	31 2][15 14	12 ±	16 2]
4,4'-diamino diphenylmetha:	20.5 ne	I	156 146	143 ±	140 9][9 10	12 ±	9 2][12 16	14 ±	21 5][26 30	32 ±	33 4][8 12	17 ±	12 5]
	51.2	[155 148	149 ±	141 7][12 11	8 ±	14 3][24 20	18 ±	17 4][34 33	32 ±	33 1][11 10	6 ±	14 4
25	128 +	1	145 140	137 ±	137 5][13 12	9 ±	15 3][31 28	25 ±	29 3][32 30	30 ±	29 2][6 10	10 ±	13 4
	320 +	[130 127	121 ±	131 6][11 12	13 ±	12 1][22 20	21 ±	16 3][30 26	25 ±	23 4][8 10	10 ±	12 2
	800 +]	127* 129	134* ±	127* 4][9 11	10 ±	13 2][18 20	21 ±	20 2][24 27	31 ±	26 4][7 9	11 ±	9
	2000 +	[131* 125	121* ±	124* 5][10 9	7 ±	11 2][19 20	19 ±	21 1][26 28	28 ±	30 2][5* 4	5* ±	3* 1
	5000 +	Į	127* 132	135* ±	134* 4][13 15	15 ±	16 2][14 16	19 ±	14 3][27 26	26 ±	24 2][6* 6	7* ±	6* 1]
Positive cont: Dose(µg/plate		đ		2-AA 1		·	2-AA 2			2-AA 10			2-AA 0.5			2-AA 2	
Revertant col			1253 1225	1177 ±	1246 42][394 389	406 ±	367 20][730 762	795 ±	760 33][332 342	371 ±	324 25][210 205	192 ±	213 11]

²⁻AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate) * : Growth inhibition was observed.

^{+ :} Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Exp. No. 9891(115-210)

Table 3. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Non-activation method : -S9]

C	Dose		era e e e				Revert	ant col	lonies	per p	olate [M	lean±S	.D.]			Dark State of the	
Compound	pose (µg/plate)	-		TA100		T.	A1535	2000-020-0-0	WE	2uvrA			TA98		T.	A1537	
DMSO a)	0	ι	113 114	119 ±	109 5][14 16	18 ±	17 2][31 28	31 ±	22 5][19 21	26 ±	19 4][7 8	7 ±	9
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.610	I	121 122	121 ±	123 1]									I	6 6	5 ±	6 1]
4,4'-diamino diphenylmethan	1.22 e	[107 105	99 ±	109 5]									Γ	13 9	8 ±	7 3]
	2.44	1	112 111	113 ±	108 3][13 12	13 ±	11 1]			1	24 20	18 ±	19 3][9 11	9 ±	14 3]
	4.88	I	109 103	97 ±	104 6][12 14	16 ±	13 2]			[30 22	16 ±	20 7][8 8	6 ±	11 3]
	9.77]	84 92	93 ±	99 8][8	7 ±	8 1]			1	18 20	25 ±	18 4][8 10	12 ±	9 2]
	19.5]	106* 91	80* ±	87* 13][10 12	14 ±	11 2][22 25	27 ±	27 3][22 21	22 ±	19 2][5* 5	6* ±	5* 1]
	39.1]	70* 71	68* ±	75* 4][9* 8	9* ±	5* 2][34 26	23 ±	21 7][18* 18	19* ±	17* 1][7* 5	4* ±	3* 2
	78.1 +			053	1	14* 14	17* ±	10* 4][26 24	23 ±	23 2][20* 21	20* ±	24*			
	156 +							Ī	20 20	23 ±	18 3]						
	313 +							Ī	20 21	25 ±	18 4]						
	625 +							Ĩ	36* 31	30* ±	26* 5]						

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

^{* :} Growth inhibition was observed.

^{+ :} Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Continued

	-					Rever	tant co	lonie	s per	plate [N	Mean±	3.D.]				
Compound	Dose - (µg/plate)		TA100			FA1535		W	IP2uvr/	A	-1/20-1-19/4	TA98		,	FA1537	
Positive co	ntrol compound		AF-2			NaN ₃			AF-2			AF-2			9-AA	
Dose (µg/pla	te)		0.01			0.5			0.01			0.1			80	
Revertant c	olonies	639	731	644	663	605	564	127	148	126	697	596	695	295	305	295
	per plate [671	±	52][611	<u>+</u>	50][134	±	12][663	±	58][298	±	6

	Dane						Rever	tant co.	lonie	s per	plate [M	Mean±	s.D.]				
Compound	Dose (µg/plate)	-		TA100			TA1535		V	NP2uvrA	1		TA98		Т	A1537	
DMSO a)	0	[114 118	122 ±	119 4][15 13	11 ±	12 2][26 35	43 ±	36 9][18 25	32 ±	25 7][19 17	17 ±	16 2]
2,2',3,3'- tetrachloro-	39.1	[152 161	177 ±	154 14]												
4,4'-diamino diphenylmethan	78.1 +	E	139 158	168 ±	168 17]									1	20 17	17 ±	14 3]
	156 +	[120 131	136 ±	138 10][15 14	16 ±	11 3][33 33	31 ±	36 3][36 34	30 ±	36 3][10 13	12 ±	18 4]
	313 +	[149 146	140 ±	148 5][9	9 ±	7 1][21 27	29 ±	30 5][36 36	33 ±	38 3][10 12	12 ±.	13 2]
	625 +	[145 140	147 ±	129 10][11 13	13 ±	14 2][26 27	27 ±	29 2][25 28	27 ±	31 3][10 13	13 ±	15 3]
	1250 +	[132* 136	136* ±	139* 4][11 14	14 ±	16 3][20 24	22 ±	30 5][17 21	23 ±	23 3][8* B	8* ±	9* 1]
	2500 +				ſ	18 18	18 ±	17 1][20 25	23 ±	32 6][21 24	22 ±	30 5][5* 6	5* ±	7* 1]
	5000 +				1	20 18	16 ±	18 2][27 28	26 ±	32 3][24 26	30 ±	23 4]			
Positive contr Dose(µg/plate)	col compound	d		2-AA 1			2-AA 2			2-AA 10			2-AA 0.5		***************************************	2-AA 2	
Revertant colo	nies per plate		1490 1367	1290 ±	1320 108][468 480	504 ±	469 21][833 873	876 ±	909 38][499 484	438 ±	514 40][236 206	194 ±	187 27]

²⁻AA: 2-Aminoanthracene

-41

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

^{* :} Growth inhibition was observed.

^{+ :} Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Compound	Dose				Rev	ertant	color	nies per	r plat	e [Mea	an±S.D.]				
compound	(μg/plate)			TA100		T	A1535			TA98		•	ra1537		
DMSO a)	0	ĩ	99 102	111 ±	96 8][17 17	15 ±	20 3][19 19	20 ±	19 1][13 13	10 ±	16 3]	
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.781]	82 89	90 ±	96 7]						Ţ	7 9	10 ±	10 2]	
4,4'-diamino diphenylmethar	1.56 ne	[113 105	92 ±	111 12][13 13	14 ±	11 2][28 25	26 ±	20 4][16 14	15 ±	12 2]	
	3.13	[101 104	98 ±	112 7][11 10	8 ±	10 2][22 20	23 ±	16 4][11 12	10 ±	15 3]	
	6.25	[88 99	93 ±	117 16][12 14	16 ±	15 2][22 20	20 ±	18 2][11 10	12 ±	8 2]	
	12.5	[83 85	76 ±	96 10][9 7	6 ±	7 2][20 19	20 ±	16 2][10 7	6 ±	5 3]	
	25.0	[82* 82	84* ±	79* 3][9	12 ±	5 4][14 15	18 ±	14 2][9* 7	5* ±	7* 2]	
	50.0				£.	8*	9* ±	6* 2][15* 18	22* ±	16* 4]				
Positive contr Dose(µg/plate)		d		AF-2 0.01			NaN ₃			AF-2 0.1			9-AA 80		
Revertant colo		[549 538	553 ±	511 23][610 640	636 ±	674 32][647 622	614 ±	606 22][428 434	452 ±	423 16]	

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaN3: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate) * : Growth inhibition was observed.