

Exp. No. 9892 ( 115-211 )  
FINAL REPORT

# 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ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：9892（115-211）

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

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. 試験施設.....	6
6. 試験委託者.....	6
7. 試験責任者.....	6
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.....	19
15. 考察および結論.....	22
16. 参考文献.....	22
17. 参考とした資料.....	23
18. 試験関係資料の保存.....	24

Figures

Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Short-term treatment].....	25
Figure 2	Growth inhibition of CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Continuous treatment].....	26

Tables

Table 1	Results of growth inhibition test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Short-term treatment].....	27
Table 2	Results of growth inhibition test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Continuous treatment].....	28

Table 3	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment: -S9].....	29
Table 4	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment: +S9].....	30
Table 5	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Continuous treatment: 24h].....	31

Appendices

Appendix 1	Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment: -S9] .....	32
Appendix 2	Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment: +S9] .....	33
Appendix 3	Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Continuous treatment: 24h].....	34
Appendix 4	Historical control data (Chromosome aberration test using CHL/IU cells) .....	35

## 要 約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンは、染色体異常を誘起しないものと判定された

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染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果に基づいて染色体異常試験 (本試験) の濃度を設定したが、いずれの処理法においても、相対細胞増殖率が 50%未滿の処理濃度では、重度の細胞増殖抑制あるいは分裂細胞の減少により、顕微鏡観察が不可能であった。したがって、本結果に基づいて、染色体異常試験 (追加試験) を実施した。短時間処理法-S9 処理では 68.6, 98.0 および 140 µg/mL, 同+S9 処理では 63.7, 91.0 および 130 µg/mL のそれぞれ 3 濃度について顕微鏡観察を実施した。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、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

以上の結果より、連続処理法 24 時間処理群では 31.2, 44.6, 63.7 および 91.0 µg/mL の 4 濃度について顕微鏡観察を実施したが、当条件下においても 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による染色体異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) では、いずれも染色体構造異常を陰性対照と比較して高頻度に誘発した。

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ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的

被験物質の染色体異常誘発性をほ乳類培養細胞を用いて検討する。

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, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

4. 試験番号

9892 ( 115-211 )

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 審査管理課 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

### 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16日 (最終使用日)

実測値：3.3～9.4°C

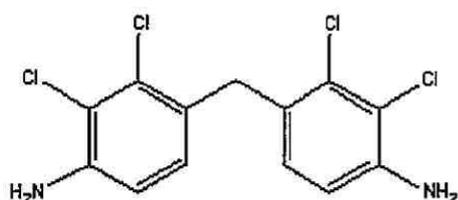
(温度集中監視システム通信異常：2006年10月12日, 8:40:10に通信異常が発生し, 同測定点の温度は採取されなかったことから, 庫内の温度をサーモレコーダーで記録した。：実測値：1.7～6.1°C)

### 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  
 $C_{13}H_{10}Cl_4N_2$

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°C 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、1 g 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。残りは被験物質提供者に返却された。

12.21. 安定性の確認方法

返却した被験物質について実施した被験物質提供者の分析結果を入手し、確認したところ、実験実施期間中、被験物質は安定であったと判断された。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験細胞株

遺伝毒性ガイドラインほ乳類培養細胞を用いる染色体試験法で指定されている、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/TU 細胞) を使用した。CHL/TU 細胞は、1984 年 11 月 15 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、ジメチルスルホキシド (DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K31758278, Merck) を容量比で 10% 添加された後、液体窒素中に保存された。試験には、凍結した細胞を融解した後、3~5 日ごとに継代し、細胞増殖抑制試験では継代数 10 代の細胞を、染色体異常試験では継代数 15 代を、染色体異常試験 (追加試験) では継代数 20 代の細胞を用いた。

なお、凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査を独立行政法人 医薬基盤研究所で実施した結果、汚染は認められなかった (細胞 Lot No. CLC-004, 2005 年 6 月 27 日, 試験結果報告書 NB-0001)。さらに、当該試験に使用した細胞は、2005 年 5 月 30 日~同年 6 月 1 日および 2005 年 6 月 6~8 日に特性検査が実施され、倍加時間 (15.2 時間)、染色体数 (25 本保有細胞 84%) 等に異常は認められていない。

13.2. 培養液の調製

MEM 液体培地 (Lot No. 1335043 【細胞増殖抑制試験】, Lot No. 1342506 【染色体異常試験および追加試験】, Invitrogen) に非働化 (56°C, 30 分) 済みの仔牛血清 (Lot No. 542384 【細胞増殖抑制試験】, Lot No. 605022 【染色体異常試験および追加試験】, Invitrogen) を最終濃度で 10% になるよう添加した。調製後の培養液は、使用時まで冷蔵所 (15°C 以下) に保存された。

13.3. 培養条件

CO<sub>2</sub> インキュベーター (三洋電機) を用い、CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 温度 37°C の条件で細胞を培養した。

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-545, 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を下表に示す。

ロット番号	RAA-545
製造年月日	2006年6月9日（誘導物質投与開始後5日目）
使用動物	ラット：Sprague-Dawley系
性/週齢	雄/7週齢
体重	218～257g
臓器	肝臓
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日目） 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	26.54 mg/mL

#### 13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

S9	0.3	mL
MgCl <sub>2</sub>	5	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADP	4	μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4	μmol

#### 13.5. 被験物質液の調製

被験物質は，DMSOに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<sup>®</sup>，純度≥99.5%，Lot No. K35364331，Merck）に溶解させた。

細胞増殖抑制試験では，使用直前に被験物質 1680 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，攪拌しながら溶解させた。次いで，DMSO を加えて 5 mL に定容し，336.0 mg/mL 調製原液を準備した。この 336.0 mg/mL 調製原液 1 mL を DMSO 1 mL に加えることにより，168.0 mg/mL 液を調製した。以下，同様に希釈を行い，84.0，42.0，21.0，10.5，5.25 および 2.63 mg/mL 液を調製した。

染色体異常試験（本試験）では、使用直前に被験物質 200 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 3 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。次いで、DMSO を加えて 4 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 2 mL を DMSO 2 mL に加えることにより、25.0 mg/mL 液を調製した。以下、同様な希釈を行い、12.5, 6.25, 3.13, 1.56 および 0.781 mg/mL 液を調製した。

染色体異常試験（追加試験）において、短時間処理法-S9 処理では、使用直前に被験物質 28.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 1.5 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。次いで、DMSO を加えて 2 mL に定容し、14.0 mg/mL 調製原液を準備した。この 14.0 mg/mL 調製原液 1.4 mL を DMSO 0.6 mL に加えることにより、9.80 mg/mL 液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、6.86 mg/mL 液を調製した。短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、使用直前に被験物質 52.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 3 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 4 mL に定容し、13.0 mg/mL 調製原液を準備した。この 13.0 mg/mL 調製原液 2.8 mL を DMSO 1.2 mL に加えることにより、9.10 mg/mL 液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、6.37, 4.46 および 3.12 mg/mL 液を調製した。

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）に発熱、発泡、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

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（短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理）

注射用水（日本薬局方注射用水，Lot No. K5F73，大塚製薬工場）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC，2 mg 力価/バイアル，Lot No. 459AEA，協和発酵工業）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液，Lot No. 4C87N，大塚製薬工場）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、短時間処理法で 0.1 µg/mL，連続処理法で 0.05 µg/mL とした。

#### 13.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K5F73）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP，100 mg/バイアル，Lot No. 4066，塩野義製薬）を生理食塩液（Lot No. 4C87N）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、12.5 µg/mL とした。

13.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

13.7.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験における被験物質の濃度として、ガイドラインで定められた 3360 µg/mL (10 mM 相当) を最高濃度とし、以下、1680, 840, 420, 210, 105, 52.5 および 26.3 µg/mL を設定した。

13.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 濃度当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

13.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F, 住友ベークライト）の各ウェルに培養液を用いて  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 016K2433, Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 µL を加え、さらに 18 時間培養を続けた。

13.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った。

その後の操作は、13.7.3. に記載した方法に準じた。

13.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた。次いで、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 016K2433, Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。

13.7.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	600 µL	-	6 µL
+S9 処理	500 µL	100 µL	6 µL
24 時間処理	600 µL	-	6 µL

13.7.7. 析出等の観察

各処理法において、処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用，Lot No. DPM9271，和光純薬工業）を加えて10分間細胞を固定した。次いで、クリスタル・バイオレット（Lot No. K31134240，Merck）の0.1%水溶液で10分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）3 mLを加え、5分間放置した。各ウエルの溶出液を96ウエルのプレート（アッセイプレート，IWAKI）に各々300 μL分注し、マイクロプレートリーダー（モデル450，BIO・RAD）を用いて570 nmでの吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（相対細胞増殖率）を各濃度群について求めた。

細胞増殖抑制が認められたため、プロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

13.8. 染色体異常試験（本試験）

13.8.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法-S9処理，短時間処理法+S9処理および連続処理法24時間処理で細胞毒性が認められ，50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ123，459および61.2 μg/mLと算出された。したがって，染色体異常試験では，細胞の増殖を50%以上抑制すると推定される用量，すなわち，-S9処理では250 μg/mL，+S9処理では500 μg/mL，24時間処理では125 μg/mLをそれぞれ最高用量とし，下表に示す5濃度を設定した。

処理法	濃度 (μg/mL)						
-S9 処理	—	15.6	31.3	62.5	125	250	—
+S9 処理	—	—	31.3	62.5	125	250	500
24 時間処理	7.81	15.6	31.3	62.5	125	—	—

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

1濃度当たり2枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて，試験番号，処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

13.8.3. 短時間処理法-S9処理

直径60 mmのプレート（細胞培養用シャーレ，住友ベークライト）に $8 \times 10^3$ 細胞/mLに調製した細胞浮遊液5 mL ( $4 \times 10^4$ 細胞)を播種し，3日間培養した。培養終了後，

13.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 016K2433, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は、13.8.3.に記載した方法に準じた。

13.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.8.6. 処理量一覧

	溶媒および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

13.8.7. 析出等の観察

各処理法において、処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

13.8.8. 標本の作製

染色体標本作製のおよそ 2 時間前に、最終濃度 0.2  $\mu\text{g/mL}$  となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1305832, Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1300409, Invitrogen) を用いてプレートより細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液 5 mL を加え、37°C の条件下で 16 分間の低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を 1 枚作製した。染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を 1 滴滴下し、染色体

標本を2枚作製した。スライド標本は十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Lot No. TP794874, Merck) を用いて1.2 v/v%に希釈したギムザ液 (Lot No. OB540248, Merck) で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

### 13.8.9. 相対細胞増殖率の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスターC-100LU, キッコーマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理を開始した細胞液 50  $\mu$ L を添加し、攪拌した。測定用チューブにこの混合液 100  $\mu$ L を分注した。細胞液添加から約 20 分経過後、測定用チューブに ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250, キッコーマン) の発光試薬液 100  $\mu$ L を添加し、相対発光量 (Relative Light Unit : RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (相対細胞増殖率) を各濃度群について求めた。

## 13.9. 染色体異常試験 (追加試験)

### 13.9.1. 処理濃度

染色体異常試験 (本試験) の結果、いずれの処理法においても、相対細胞増殖率が 50%未滴を示した処理濃度では、重度の細胞増殖抑制あるいは分裂細胞の減少のために染色体観察ができなかった。したがって、全ての処理法について追加試験を実施した。追加試験では、細胞の増殖を 50%以上抑制すると推定される用量、すなわち、-S9 処理では 140  $\mu$ g/mL, +S9 処理では 130  $\mu$ g/mL, 24 時間処理では 91.0  $\mu$ g/mL をそれぞれ最高用量とし、下表に示す 3 または 4 濃度を設定した。

処理法	濃度 ( $\mu$ g/mL)				
-S9 処理	—	—	68.6	98.0	140
+S9 処理	—	—	63.7	91.0	130
24 時間処理	31.2	44.6	63.7	91.0	—

全ての濃度について染色体異常の観察を実施した。

### 13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.8.2.に記載した方法に準じた。

### 13.9.3. 短時間処理法-S9 処理

13.8.3.に記載した方法に準じた。ただし、ダルベッコリン酸緩衝液 (Sigma-Aldrich) については、Lot No. 036K2418 を使用した。

13.9.4. 短時間処理法+S9 処理

13.8.4.に記載した方法に準じた。ただし、ダルベッコリン酸緩衝液 (Sigma-Aldrich) については、Lot No. 036K2418 を使用した。

13.9.5. 連続処理法 24 時間処理

13.8.5.に記載した方法に準じた。

13.9.6. 処理量一覧

13.8.6.に記載した方法に準じた。

13.9.7. 析出等の観察

13.8.7.に記載した方法に準じた。

13.9.8. 標本の作製

13.8.8.に記載した方法に準じた。

13.9.9. 相対細胞増殖率の測定

13.8.9.に記載した方法に準じた。

13.9.10. 評価対象

短時間処理法では、13.9.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の 50%未満になる最も低い濃度を最高濃度とした 3 濃度を評価対象 (観察濃度) とした。連続処理法 24 時間処理では、相対細胞増殖率が陰性対照群の 50%未満になる濃度 (91.0  $\mu\text{g/mL}$ ) では観察可能な分裂像の減少が認められていたため、91.0  $\mu\text{g/mL}$  を最高濃度とし、連続する 4 濃度を評価対象 (観察濃度) とした。

13.9.11. 染色体の観察

短時間処理法および連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。短時間処理法について染色体の観察を実施し、陰性結果が得られたため、引き続き連続処理法の標本についても観察を行った。

各プレート当たり 100 個、すなわち、1 濃度当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 ( $\times 600$ ) で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色分体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合は、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ、本来の軸からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 濃度当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

13.10. 試験成立条件

- a. 陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は、背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも5%未満であること
  - b. 陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は、上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること
- 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

異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満、かつ、再現性が認められた場合に疑陽性、10%以上、かつ、再現性あるいは被験物質の濃度に依存性が認められた場合は、陽性と判定した。なお、ギャップのみ保有する細胞については、異常細胞数から除外して判定した。

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. 細胞増殖抑制試験

14.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示す。

短時間処理法-S9 処理および+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理の全てにおいて、濃度依存的に細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 123, 459 および 61.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と算出された。

14.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 420～1680  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において白濁、420  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色粉末状、さらに、1680  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理では、840～1680  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において白濁、840  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色粉末状、さらに、1680  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。

被験物質処理終了時、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 105  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度においては白色粉末状、さらに、210  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理では、210～1680  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において白色膜状、210  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色粉末状、さらに、420  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。

14.2. 染色体異常試験（本試験）

各処理法の相対細胞増殖率を下記に示す。相対細胞増殖率が 50%未満を示した処理濃度において、短時間処理法では重度の細胞増殖抑制のために、連続処理法 24 時間処理では重度の分裂細胞の減少のために染色体観察ができなかった。したがって、染色体異常試験（追加試験）を実施することとし、本試験の標本は観察しなかった。

-S9 処理		+S9 処理		24 時間処理	
処理濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	相対細胞増殖率 (%)	処理濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	相対細胞増殖率 (%)	処理濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	相対細胞増殖率 (%)
15.6	94.5	31.3	90.8	7.81	98.1
31.3	78.3	62.5	89.4	15.6	105.6
62.5	81.7	125	54.0	31.3	102.5
125	53.0	250	1.2	62.5	66.5
250	2.6	500	0.1	125	19.1

14.2.1. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法+S9 処理の 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において白濁が認められた。

被験物質処理終了時、短時間処理法の 125 µg/mL 以上および連続処理法 24 時間処理の 62.5 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、短時間処理法-S9 処理の 250 µg/mL 以上および短時間処理法+S9 処理の 500 µg/mL 濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理の 250 µg/mL 以上の濃度において白色膜状の析出物が認められた。

### 14.3. 染色体異常試験 (追加試験)

#### 14.3.1. 短時間処理法-S9 処理

結果を Table 3 および Appendix 1 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の染色体構造異常出現頻度は、68.6, 98.0 および 140 µg/mL でそれぞれ 1.0, 1.0 および 2.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、68.6, 98.0 および 140 µg/mL でそれぞれ 0.5, 2.0 および 1.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 140 µg/mL での細胞増殖率は 46.4% であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 56.0% であった。

#### 14.3.2. 短時間処理法+S9 処理

結果を Table 4 および Appendix 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の染色体構造異常出現頻度は、63.7, 91.0 および 130 µg/mL でそれぞれ 0.0, 0.0 および 1.5% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、63.7, 91.0 および 130 µg/mL でそれぞれ 1.5, 0.5 および 0.5% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 130 µg/mL での細胞増殖率は 40.7% であった。

陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 29.5% であった。

#### 14.3.3. 連続処理法 24 時間処理

結果を Table 5 および Appendix 3 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の染色体構造異常出現頻度は、31.2, 44.6, 63.7 および 91.0 µg/mL でそれぞれ 1.5, 1.0, 1.0 および 0.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現

頻度は、31.2, 44.6, 63.7 および 91.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でそれぞれ 0.5, 0.5, 1.5 および 2.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 91.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  での細胞増殖率は 48.5% であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 47.5% であった。

#### 14.3.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時、いずれの処理法においても、析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

被験物質処理終了時、短時間処理法-S9 処理の 98.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、短時間処理法+S9 処理の 91.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上および連続処理法 24 時間処理の 63.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた。

## 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染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では, 細胞の増殖を 50%以上抑制する濃度まで検討した。

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, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても, 染色体異常の誘発頻度は, 陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果, いずれの濃度においても明確な染色体異常の誘発は認められなかった。

陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度は, いずれも背景データ (Appendix 4) 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なされたと判断された。

以上の試験結果から, 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のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定された。

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<sup>1)~3)</sup>, 遺伝子損傷を引き起こす<sup>4)~6)</sup>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<sup>7)</sup>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<sup>8)</sup>ことも報告されている。

## 16. 参考文献

- 1) 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.
- 6) 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

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. *Chemical Mutagens*. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat Res* 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 269-275.

Exp. No. 9892 (115-211)

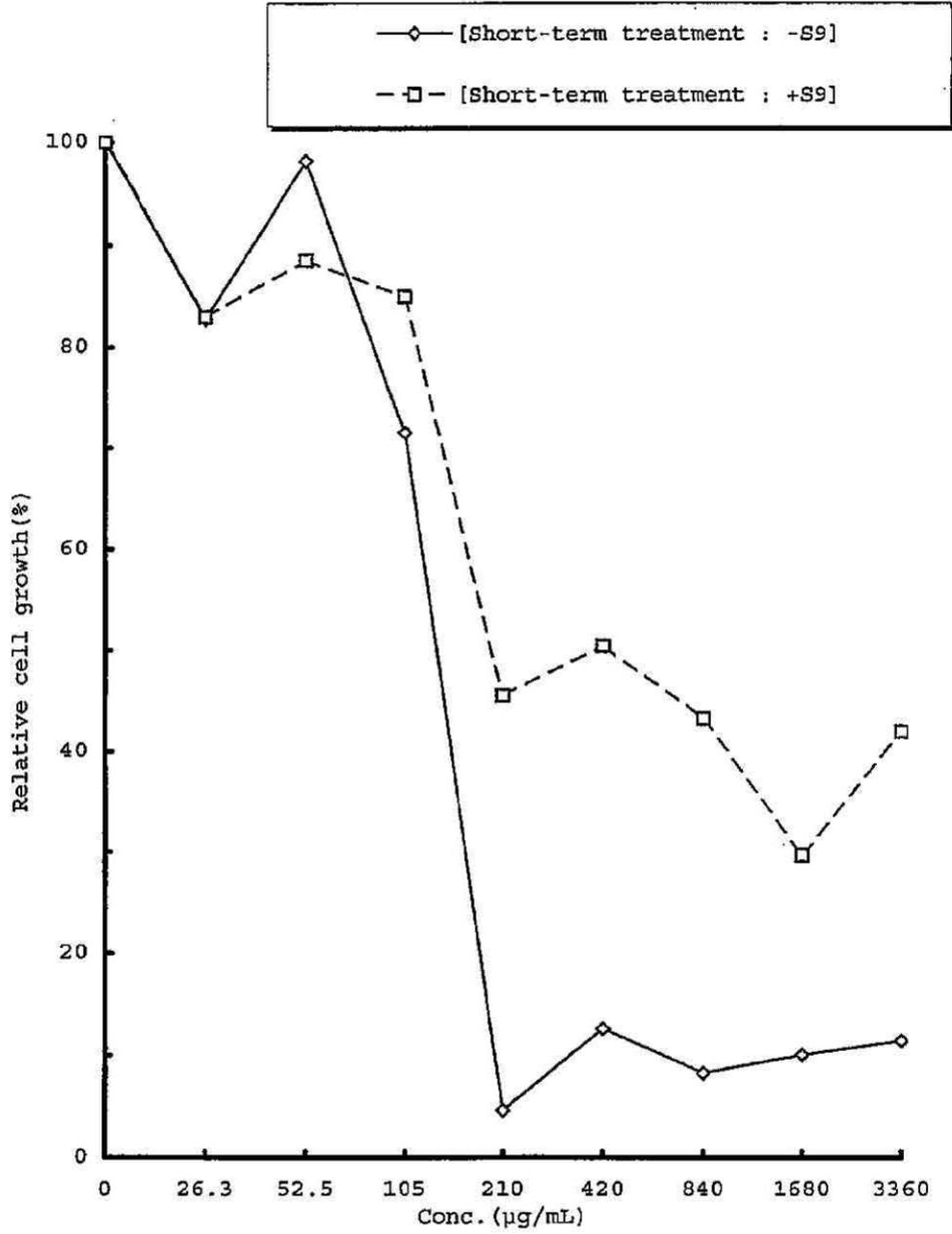


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Short-term treatment]

Exp. No. 9892 (115-211)

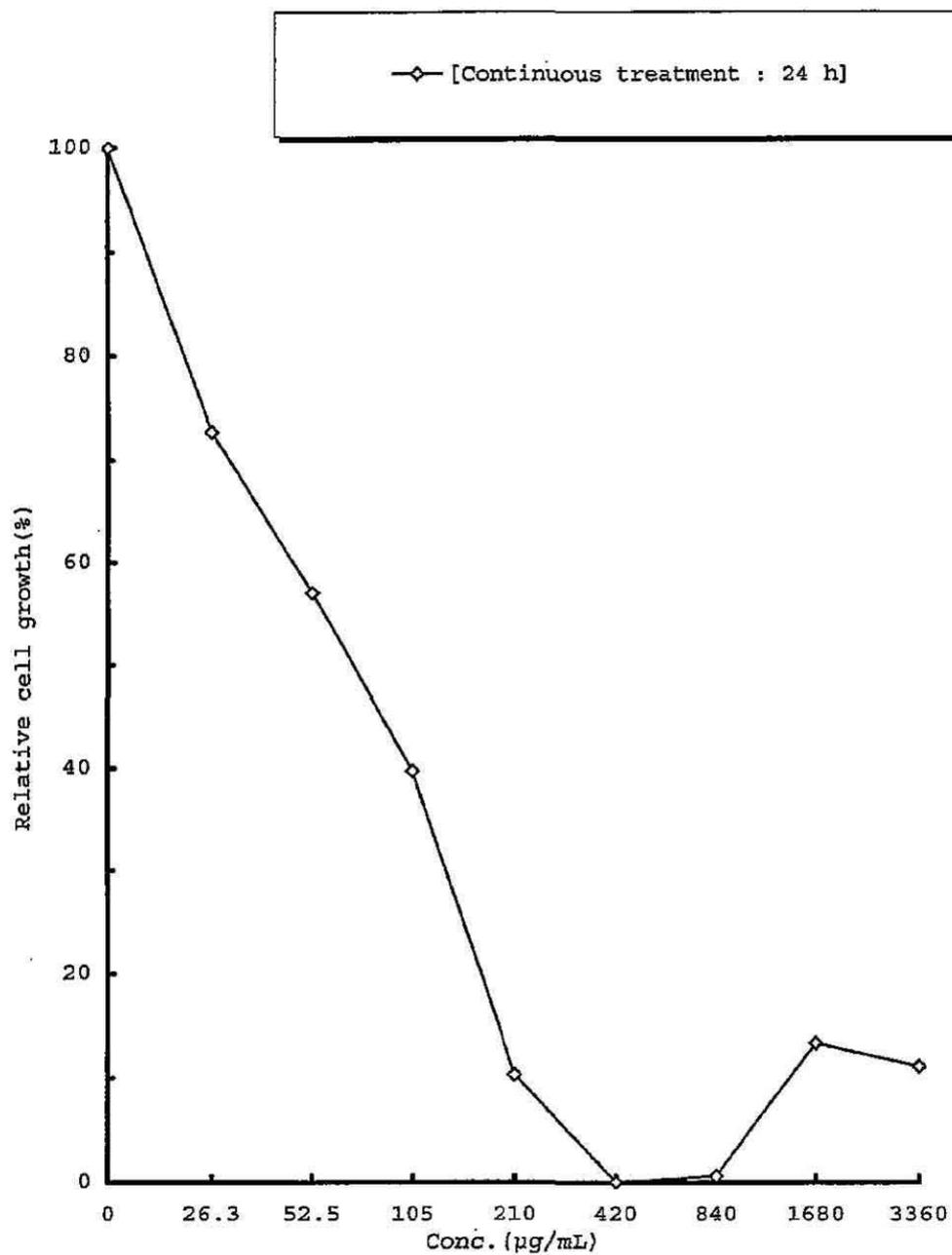


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Continuous treatment]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Conc. (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[ Mean ]	Compound	Conc. (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[ Mean ]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	78.0 87.3	[ 82.7 ]	2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	79.0 86.7	[ 82.9 ]
	52.5	104.5 91.6	[ 98.1 ]		52.5	91.4 85.5	[ 88.5 ]
	105 d)	70.3 72.7	[ 71.5 ]		105	78.7 91.0	[ 84.9 ]
	210 d)	2.0 7.2	[ 4.6 ]		210 d)	48.2 42.8	[ 45.5 ]
	420 d)	20.1 5.1	[ 12.6 ]		420 d)	46.9 53.8	[ 50.4 ]
	840 d)	15.7 0.7	[ 8.2 ]		840 d)	41.0 45.3	[ 43.2 ]
	1680 d)	12.5 7.4	[ 10.0 ]		1680 d)	25.8 33.4	[ 29.6 ]
	3360 d)	9.2 13.6	[ 11.4 ]		3360 d)	44.5 39.2	[ 41.9 ]

Fifty % growth inhibition concentration was as follows;

[Short-term treatment : -S9] --- 123 µg/mL

[Short-term treatment : +S9] --- 459 µg/mL

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 2. Results of growth inhibition test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Conc. (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[ Mean ]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	86.2 59.1	[ 72.7 ]
	52.5	58.5 55.5	[ 57.0 ]
	105 d)	43.0 36.3	[ 39.7 ]
	210 d)	3.8 16.7	[ 10.3 ]
	420 d)	0.0 0.0	[ 0.0 ]
	840 d)	1.1 0.0	[ 0.6 ]
	1680 d)	11.2 15.4	[ 13.3 ]
	3360 d)	18.6 3.5	[ 11.1 ]

Fifty % growth inhibition concentration was as follows:  
[Continuous treatment : 24 h] --- 61.2 µg/mL

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment : -S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	68.6	6	78.8	200	1	0	2	0	0	0	2 ( 1.0)	200	1 ( 0.5)
	98.0 d)	6	61.1	200	1	0	2	0	0	0	2 ( 1.0)	200	4 ( 2.0)
	140 d)	6	46.4	200	1	1	3	0	0	0	4 ( 2.0)	200	2 ( 1.0)
MMC b)	0.1	6	85.9	200	12	48	100	1	0	0	112 ( 56.0)	200	2 ( 1.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	1	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	63.7	6	84.2	200	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	3 ( 1.5)
	91.0 d)	6	76.4	200	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	1 ( 0.5)
	130 d)	6	40.7	200	0	0	3	0	0	0	3 ( 1.5)	200	1 ( 0.5)
CP b)	12.5	6	122.7	200	3	15	48	0	1	0	59 ( 29.5)	200	0 ( 0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Cyclophosphamide

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Continuous treatment : 24 h]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	24	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	31.2	24	85.1	200	1	2	1	0	0	0	3 ( 1.5)	200	1 ( 0.5)
	44.6	24	83.2	200	0	1	1	0	0	0	2 ( 1.0)	200	1 ( 0.5)
	63.7 d)	24	55.4	200	2	1	1	0	0	0	2 ( 1.0)	200	3 ( 1.5)
	91.0 d)	24	48.5	200	1	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	4 ( 2.0)
MMC b)	0.05	24	71.6	200	6	31	81	0	0	0	95 ( 47.5)	200	0 ( 0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 1. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Short-term treatment : -S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
		6	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	1.0
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	68.6	6	68.4	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
		6	89.2	100	1	0	2	0	0	0	1.0	2.0	100	1.0
	98.0 d)	6	62.7	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	4.0
		6	59.5	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
	140 d)	6	47.6	100	1	1	2	0	0	0	1.0	3.0	100	1.0
		6	45.2	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0
MMC b)	0.1	6	78.8	100	7	25	53	0	0	0	0.0	58.0	100	1.0
		6	92.9	100	5	23	47	1	0	0	1.0	54.0	100	1.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 2. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	6	100.0	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	63.7	6	82.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	3.0
		6	85.7	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
	91.0 d)	6	74.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
		6	78.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
	130 d)	6	42.7	100	0	0	2	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0
		6	38.7	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0
CP b)	12.5	6	125.0	100	2	7	18	0	0	0	1.0	24.0	100	0.0
		6	120.3	100	1	8	30	0	1	0	1.0	35.0	100	0.0

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Cyclophosphamide

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 3. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Continuous treatment : 24 h]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	24	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0
		24	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	31.2	24	81.3	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0
		24	88.9	100	0	2	0	0	0	0	0.0	2.0	100	1.0
	44.6	24	80.4	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0
		24	86.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
	63.7 d)	24	54.5	100	1	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	3.0
		24	56.2	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0
	91.0 d)	24	50.4	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	2.0
		24	46.5	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	2.0
MMC b)	0.05	24	77.0	100	3	17	44	0	0	0	0.0	53.0	100	0.0
		24	66.1	100	3	14	37	0	0	0	1.0	42.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap  
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)  
b): Positive control: Mitomycin C  
d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

## Appendix 4. Historical control data (Chromosome aberration test using CHL/IU cells)

Historical control values of structural aberrations					
Group	Test system	n	Incidence of structural aberrations [%] (Mean $\pm$ S.D.)	Range	
				Lower	Upper
Negative control	Short-term treatment (-S9)	157	0.6 $\pm$ 0.8	0.0	2.9*
	Short-term treatment (+S9)	166	0.4 $\pm$ 0.6	0.0	2.3*
	Continuous treatment (24h)	135	0.6 $\pm$ 0.7	0.0	2.8*
Positive control	Short-term treatment (-S9) <sup>a</sup>	157	39.0 $\pm$ 9.7	10.0	68.2*
	Short-term treatment (+S9) <sup>b</sup>	164	29.2 $\pm$ 10.5	10.0	60.8*
	Continuous treatment (24h) <sup>c</sup>	133	30.3 $\pm$ 8.2	10.0	54.9*

Historical control values of polyploid cells					
Group	Test system	n	Incidence of polyploid cells [%] (Mean $\pm$ S.D.)	Range	
				Lower	Upper
Negative control	Short-term treatment (-S9)	157	0.3 $\pm$ 0.5	0.0	1.9*
	Short-term treatment (+S9)	166	0.2 $\pm$ 0.5	0.0	1.7*
	Continuous treatment (24h)	135	0.4 $\pm$ 0.7	0.0	2.4*

Negative control: Including Saline, DMSO, 1.0% CMC, etc.

a: MMC, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$       b: CP, 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$       c: MMC, 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$

The above historical control values are obtained from the data pooled from January 22, 2003 to December 29, 2005.

The range was set according to the criteria for valid assay.

\*:The range is calculated by Mean  $\pm$  3  $\times$  S.D.