



No. 既-1

食薬セ研第3-905号

1992年 8月20日

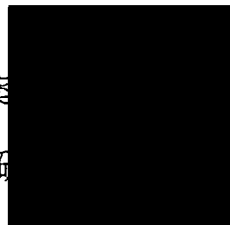
9199819

N-モノ (又はジ) メチルフェニル-N<sup>2</sup>-  
モノ (又はジ) メチルフェニル-p-  
フェレンジアミン の  
細菌を用いる  
復帰変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬

秦野研



試験委託者 : 厚生省生活衛生局

試験計画番号 : M-91-189

試験系識別番号 : M-3791

被験物質名 : N-モノ (又はジ) メチルフェニル-N'-モノ (又はジ)  
メチルフェニル-p-フェニレンジアミン

試験項目 : 細菌を用いる復帰変試験


試験期間 : 1991年 8月19日 ~ 1992年 8月20日

資料保管場所 : 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所資料保管室

資料保管期間 : 試験終了後10年間

試験施設 : 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所  
(所在地) (神奈川県秦野市落合729-5)

運営管理者 : 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所  
所長

 1992年 8月20日

試験責任者  
(報告書作成者)

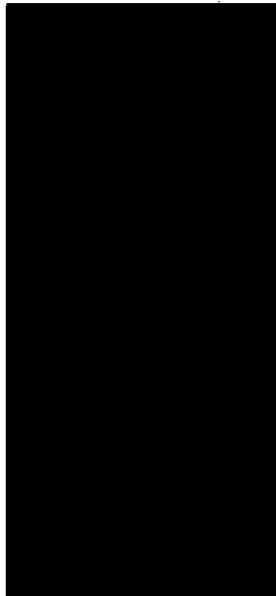
:



1992年8月20日

試験担当者

:



分析担当者

:

陳 述 書

試験の表題 : N-モノ (又はジ) メチルフェニル-N'-モノ (又はジ) メチルフェニル-p-フェニレンジアミンの細菌を用いる復帰変異試験

試験計画番号 : M-91-189

上記の試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECD化学品試験法ガイドライン: 471, 472 に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものであります。

1992年 8月20日

財団法人食品薬品安全センター  
秦野研究所所長 (運営管理者)

氏 名



## 信頼性保証証明

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所信頼性保証部門は、試験計画番号 M-91-189 に関する試験の管理状況について次のとおり査察を行った。

査察日	査察項目	運営管理者および試験責任者への報告日
1991年 8月16日	試験計画書点検査	1991年 8月16日
1992年 1月24日	試験実施状況(2) 査察	1992年 1月24日
1992年 1月28日 ~29日	試験実施状況(1) 含量試験査察	1992年 1月29日
1992年 3月 9日	報告書案点検査	1992年 3月 9日
1992年 8月20日	最終報告書点検査	1992年 8月20日

この報告書は、試験に使用された方法および手順を正確に記述し、報告結果は、生データを正確に反映していることを証明する。

1992年 8月20日

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所 信頼性保証責任者



# 目 次

	頁
要 約 .....	1
緒 言 .....	2
材料および試験方法 .....	3
試験結果および考察 .....	7
参 考 文 献 .....	9
表 1～3	
Appendixes 1～2	

## 要 約

N-モノ（又はジ）メチルフェニル-N'-モノ（又はジ）メチルフェニル-p-フェニレンジアミンの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で、本試験は、312.5～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のうち、TA98の代謝活性化試験について、用量依存性のある復帰変異コロニー数の増加が認められたことから、N-モノ（又はジ）メチルフェニル-N'-モノ（又はジ）メチルフェニル-p-フェニレンジアミンは、用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定された。

## 緒 言

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである、N-モノ（又はジ）メチルフェニル-N'-モノ（又はジ）メチルフェニル-p-フェニレンジアミンについて、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異<sup>(1)</sup>、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異<sup>(2)</sup>を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471, 472 に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。



N-モノ(又はジ)メチルフェニル-N'-モノ  
(又はジ)メチルフェニル-p-フェニ  
レンジアミン

1992. 8. 20付 報告書  
11号正  
(2-4P:1頁)

## 材料および試験方法

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学の B.N.Ames 博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の [ ] から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス (Difco) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

### 〔被験物質〕

N-モノ (又はジ) メチルフェニル-N'-モノ (又はジ) メチルフェニル-p-フェニレンジアミン (既存化学物質番号 3-0146, 以下DMPDと略) は、黒褐色顆粒である。純度 75%以上のもの (ロット番号: AR8、[ ]) を [ ] から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所に遮光して保存した。

DMPDは、ジメチルスルホキシド (ロット番号: DSL 5887、和光純薬、以下DMSOと略) を用いて 50 mg/ml になるように超音波処理 (超音波洗滌器 W-103T 型、藤原製作所製) にて溶解した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたっては、純度換算は行わなかった。

試験の開始に先立って、秦野研究所において、DMPDのDMSO溶液中での安定性試験を行った。安定性試験は、本試験における最高濃度 (50 mg/ml) および最低濃

度 (3 mg/ml) の 2 濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後 3 時間における各 3 サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均 (0 時間) に対して、101 および 98.5% であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準 (初回の測定平均値の 90% 以上) を満たしていた (Appendix 1)。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、93.5~98.1%、3.125 mg/ml 溶液については、102~104% であった。これらの値も当研究所の標準操作手順書の基準 (初回の測定平均値の 85% 以上) を満たしていた (Appendix 2)。

以上の結果から、DMPD は DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

#### [陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF-2 : フリルフラマイド	(上野製薬㈱)	ロット番号 46,	純度 99.9%
SA : アジ化ナトリウム	(和光純薬工業㈱)	ロット番号 TLN5556,	純度 >90%
9-AA : 9-アミノアクリジン	(東京化成工業㈱)	ロット番号 AM 01,	純度 >98%
2-AA : 2-アミノアントラセン	(和光純薬工業㈱)	ロット番号 EDE7881,	純度 >90%

AF-2, 9-AA, 2-AA は DMSO (和光純薬工業㈱) ロット番号 DSL5887 および ECJ7001) に SA は蒸留水に溶解して試験に用いた。

#### [培地および S9 混液の組成]

##### 1) トップアガー (TA 菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ビオチン	0.5 mM

\* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

## 2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社製の最少寒天培地（用量設定試験においては、ロット番号：DJ050GG, 1991年7月9日製造, 本試験においては、ロット番号：DJ070JG, 1991年10月21日製造）を用いた。なお、培地1ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バクト・アガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

## 3) S9 混液（1 ml中下記の成分を含む）

S9 <sup>**</sup>	0.1 ml	NADH	4 μmole
塩化マグネシウム	8 μmole	NADPH	4 μmole
塩化カリウム	33 μmole	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μmole		

\*\* : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-258、1991年8月23日製造) を用いた。PBおよびBFの投与量は1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60 mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したものである。

## 〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに

DMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

#### 〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。

## 試験結果および考察

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

### 〔用量設定試験〕

結果を表1に示した。50～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接試験および代謝活性化試験において、抗菌性は認められなかった。なお、直接試験および代謝活性化試験において、500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で、被験物質に由来する沈殿物が寒天表面に認められた。

したがって、本試験における最高用量を、直接試験および代謝活性化試験ともにすべての検定菌で、5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とし、公比2で5用量を設定することとした。

### 〔本試験〕

結果を表2、3に示した。DMPDについて312.5～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験、代謝活性化試験のうち、TA98の代謝活性化試験においては、ほぼ用量に依存して陰性対照の2～4倍の変異コロニー数が計測され、再現性も得られた。その他の検定菌では、変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての検定菌において抗菌性は認められなかった。なお、直接試験では312.5  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化試験では625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で、被験物質に由来する沈殿物が寒天表面に認められた。

DMPDについて実施した試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群とも計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、DMPDは、用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定した。

## 参 考 文 献

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilby, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier Science Publisher, New York. (1984) pp.161-187.

表 1

## 用量設定試験結果表

被験物質: N-モノ (又はジ) メチルフェニル N-モノ (又はジ) メチルフェニル p-フェニレンジアミン

M-91-189

物質濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	検体の有無	復 帰 変 異															
		塩 基 対 置 換 型									コロニー数/プレート						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
溶媒対照	-	130	143	142	14	13	10	2	15	17	23	28	27	7	7	10	
		(138 ± 7.2)			(12 ± 2.1)			(11 ± 8.1)			(26 ± 2.6)			(8 ± 1.7)			
検 体	50	-	125		15			11			29			5			
	150	-	110		11			21			24			14			
	500	-	108		19			14			23			9			
	1500	-	114		6			13			11			12			
	5000	-	127		15			11			2			15			
溶媒対照	+	138	146	132	11	18	17	16	17	13	38	36	42	10	9	13	
		(139 ± 7.0)			(15 ± 3.8)			(15 ± 2.1)			(39 ± 3.1)			(11 ± 2.1)			
検 体	50	+	161		24			9			36			11			
	150	+	150		7			12			28			9			
	500	+	221		8			17			43			11			
	1500	+	200		10			16			32			8			
	5000	+	181		13			15			32			8			
陽性対照	SSMixを必要としないもの	名 称	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
	コロニー数/プレート	669	699	639	306	313	338	131	128	157	556	548	578	1945	2032	3009	
		(669 ± 30.0)		(319 ± 16.8)		(139 ± 15.9)		(561 ± 15.5)		(2329 ± 590.8)							
SSMixを必要とするもの	名 称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2			
	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2			
コロニー数/プレート	759	857	777	248	238	249	519	505	471	196	201	169	171	203	172		
	(798 ± 52.2)		(245 ± 6.1)		(498 ± 24.7)		(189 ± 17.2)		(182 ± 18.2)								



表 2

## 復帰変異試験結果表 I

M-91-189

被験物質: N-モノ (又はジ) メチルフェニル N-モノ (又はジ) メチルフェニル p-フェニレンジアミン

物質	検体濃度 (µg/プレート)	S Mixの有無	復帰変異										コロニー数/プレート				
			塩基対置換型									フレームシフト型					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
溶媒対照		-	146 (131 ±)	127 120 13.5)	22 (18 ±)	17 15 3.6)	9 (13 ±)	13 16 3.5)	27 (22 ±)	18 21 4.6)	10 (9 ±)	10 6 2.3)					
検体	312.5	-	237 (257 ±)	256 278 20.5)	12 (14 ±)	11 18 3.8)	13 (11 ±)	11 8 2.5)	21 (23 ±)	24 25 2.1)	7 (9 ±)	10 10 1.7)					
	625	-	253 (241 ±)	237 233 10.6)	18 (19 ±)	18 22 2.3)	7 (12 ±)	14 14 4.0)	17 (16 ±)	15 17 1.2)	5 (6 ±)	6 8 1.5)					
	1250	-	218 (227 ±)	250 212 20.4)	19 (15 ±)	12 13 3.8)	16 (11 ±)	7 9 4.7)	18 (20 ±)	20 22 2.0)	9 (7 ±)	6 5 2.1)					
	2500	-	209 (196 ±)	179 201 15.5)	8 (10 ±)	11 12 2.1)	10 (11 ±)	14 8 3.1)	11 (19 ±)	14 33 11.9)	8 (5 ±)	4 4 2.3)					
	5000	-	171 (172 ±)	149 197 24.0)	6 (10 ±)	10 13 3.5)	7 (8 ±)	12 5 3.6)	16 (19 ±)	19 23 3.5)	9 (9 ±)	8 9 0.6)					
溶媒対照		+	163 (137 ±)	125 124 22.2)	15 (12 ±)	13 9 3.1)	19 (17 ±)	19 14 2.9)	45 (42 ±)	45 37 4.6)	10 (10 ±)	9 11 1.0)					
検体	312.5	+	183 (175 ±)	173 168 7.6)	15 (15 ±)	15 16 0.6)	28 (17 ±)	11 13 9.3)	79 (81 ±)	74 90 8.2)	16 (16 ±)	20 11 4.5)					
	625	+	178 (192 ±)	195 204 13.2)	19 (22 ±)	19 28 5.2)	18 (15 ±)	15 11 3.5)	70 (99 ±)	120 106 25.8)	14 (13 ±)	10 15 2.6)					
	1250	+	194 (193 ±)	204 181 11.5)	7 (12 ±)	14 14 4.0)	9 (15 ±)	15 22 6.5)	124 (121 ±)	120 120 2.3)	13 (15 ±)	19 12 3.8)					
	2500	+	164 (201 ±)	225 214 32.5)	21 (18 ±)	12 20 4.9)	11 (16 ±)	19 19 4.6)	122 (135 ±)	142 142 11.5)	10 (12 ±)	9 16 3.8)					
	5000	+	226 (229 ±)	230 230 2.3)	7 (12 ±)	14 16 4.7)	16 (14 ±)	14 11 2.5)	77 (122 ±)	144 145 39.0)	7 (15 ±)	18 21 7.4)					
陽性対照	S Mixを必要としないもの	名称 濃度 (µg/プレート)	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
	S Mixを必要とするもの	名称 濃度 (µg/プレート)	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
		コロニー数/プレート	694 (654 ±)	612 657 41.1)	166 (184 ±)	194 191 15.4)	122 (119 ±)	127 107 10.4)	796 (780 ±)	748 797 28.0)	2750 (3113 ±)	3527 3061 391.1)					
		コロニー数/プレート	991 (1046 ±)	1051 1096 52.7)	231 (203 ±)	196 183 24.8)	899 (866 ±)	897 803 54.9)	463 (372 ±)	345 307 81.3)	198 (205 ±)	225 191 18.0)					

表 3

## 復帰変異試験結果表 II

M-91-189

被験物質: N-モノ(又はジ)メチルフェニルアミン(又はジ)メチルフェニルアミン フェニレンジアミン

物 質	検 体 濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S Mix の 有 無	復 帰 変 異									コロニー数/プレート					
			塩 基 対 置 換 型									フ レーム シフト 型					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
溶 媒 対 照		-	159 (154 $\pm$ )	156 (156 $\pm$ )	147 (6.2)	21 (16 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	13 (4.2)	18 (21 $\pm$ )	17 (17 $\pm$ )	28 (6.1)	22 (29 $\pm$ )	28 (28 $\pm$ )	36 (7.0)	16 (13 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	9 (3.6)
検 体	312.5	-	132 (121 $\pm$ )	130 (130 $\pm$ )	102 (16.8)	26 (17 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	12 (7.8)	11 (16 $\pm$ )	26 (26 $\pm$ )	11 (8.7)	23 (22 $\pm$ )	23 (23 $\pm$ )	21 (1.2)	5 (9 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	13 (4.0)
	625	-	151 (140 $\pm$ )	132 (132 $\pm$ )	138 (9.7)	19 (16 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	14 (2.9)	15 (15 $\pm$ )	16 (16 $\pm$ )	15 (0.6)	18 (15 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	11 (3.5)	8 (8 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )	6 (2.0)
	1250	-	115 (136 $\pm$ )	124 (124 $\pm$ )	170 (29.5)	21 (16 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	12 (4.7)	12 (14 $\pm$ )	16 (16 $\pm$ )	15 (2.1)	14 (15 $\pm$ )	16 (16 $\pm$ )	14 (1.2)	16 (12 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )	12 (4.5)
	2500	-	147 (146 $\pm$ )	145 (145 $\pm$ )	145 (1.2)	13 (15 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	19 (3.5)	11 (10 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )	8 (1.5)	18 (14 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	10 (4.0)	7 (9 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	12 (2.5)
	5000	-	134 (123 $\pm$ )	126 (126 $\pm$ )	110 (12.2)	12 (12 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )	12 (0.0)	12 (14 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	16 (2.0)	19 (18 $\pm$ )	17 (17 $\pm$ )	18 (1.0)	3 (6 $\pm$ )	6 (6 $\pm$ )	9 (3.0)
溶 媒 対 照		+	155 (154 $\pm$ )	138 (138 $\pm$ )	170 (16.0)	15 (16 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	25 (8.5)	16 (14 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	12 (2.0)	33 (32 $\pm$ )	26 (26 $\pm$ )	38 (6.0)	14 (13 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	13 (0.6)
検 体	312.5	+	197 (197 $\pm$ )	209 (209 $\pm$ )	185 (12.0)	24 (22 $\pm$ )	29 (29 $\pm$ )	14 (7.6)	27 (23 $\pm$ )	24 (24 $\pm$ )	17 (5.1)	74 (54 $\pm$ )	67 (67 $\pm$ )	20 (29.4)	15 (14 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	15 (1.2)
	625	+	188 (189 $\pm$ )	185 (185 $\pm$ )	195 (5.1)	19 (24 $\pm$ )	21 (21 $\pm$ )	32 (7.0)	20 (21 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	27 (6.0)	93 (87 $\pm$ )	73 (73 $\pm$ )	95 (12.2)	5 (10 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )	12 (4.0)
	1250	+	202 (199 $\pm$ )	199 (199 $\pm$ )	196 (3.0)	22 (22 $\pm$ )	21 (21 $\pm$ )	24 (1.5)	20 (18 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	19 (2.6)	103 (97 $\pm$ )	90 (90 $\pm$ )	98 (6.6)	14 (12 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	12 (2.5)
	2500	+	194 (202 $\pm$ )	193 (193 $\pm$ )	219 (14.7)	17 (16 $\pm$ )	16 (16 $\pm$ )	14 (1.5)	16 (17 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	23 (5.1)	58 (95 $\pm$ )	114 (114 $\pm$ )	114 (32.3)	11 (11 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	12 (0.6)
	5000	+	203 (199 $\pm$ )	195 (195 $\pm$ )	200 (4.0)	18 (18 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )	23 (5.5)	9 (16 $\pm$ )	22 (22 $\pm$ )	16 (6.5)	126 (125 $\pm$ )	126 (126 $\pm$ )	123 (1.7)	8 (10 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	9 (3.2)
陽 性 対 照	S Mix を 必要と しないも の	名 称	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
	コロニー数 プレート	653 (670 $\pm$ )	675 (675 $\pm$ )	683 (15.5)	184 (159 $\pm$ )	154 (154 $\pm$ )	140 (22.5)	106 (106 $\pm$ )	105 (105 $\pm$ )	106 (0.6)	779 (804 $\pm$ )	781 (781 $\pm$ )	851 (41.0)	2693 (2696 $\pm$ )	2638 (2638 $\pm$ )	2758 (60.1)	
	S Mix を 必要と するもの	名 称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2			
		コロニー数 プレート	1001 (972 $\pm$ )	927 (927 $\pm$ )	987 (39.3)	187 (172 $\pm$ )	160 (160 $\pm$ )	169 (13.7)	748 (766 $\pm$ )	747 (747 $\pm$ )	802 (31.5)	201 (205 $\pm$ )	202 (202 $\pm$ )	213 (6.7)	157 (182 $\pm$ )	180 (180 $\pm$ )	208 (25.5)

## Appendix 1

## Stability of test article in the preparation

Test article : N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-  
methylphenyl-p-phenylenediamine

Lot No. : AR8  
Carrier : DMSO

Date on preparation: Dec. 6, 1991

Date on determination

A : Dec. 6, 1991

B : Dec. 6, 1991

Condition for storage :  
cooling in the dark area

Indicated formulation (mg/mL)	A (0 hr)			B (3 hr)		
	Sample No.	Found-1 (mg/mL)	Content (%) <sup>a)</sup>	Sample No.	Found-2 (mg/mL)	Content (%) <sup>b)</sup>
50	1	49.37	98.7	4	50.55	104
"	2	48.27	96.5	5	49.36	101
"	3	48.44	96.9	6	48.22	99.0
	mean	48.69	97.4	mean		101
3	7	3.190	106	10	3.098	98.0
"	8	3.163	105	11	3.128	98.9
"	9	3.133	104	12	3.118	98.6
	mean	3.162	105	mean		98.5

<sup>a)</sup> : Found-1/Indicated Formulation × 100

<sup>b)</sup> : Found-2/mean Found-1 × 100

Investigator

Director, Chemistry Dept.

## Appendix 2

## Content of test article in the preparation

Test article : N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-  
methylphenyl-p-phenylenediamine

Lot No. : AR8

Date on preparation : Jun. 28, 1992

Carrier : DMSO

Date on determination : Jun. 28, 1992

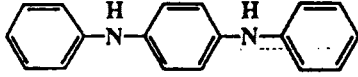
Sample No.	Indicated Formulation (A) (mg/ml)	Found (B) (mg/ml)	B/A×100 (%)	Mean (%)
13	50	48.65	97.3	96.3
14	"	49.06	98.1	
15	"	46.73	93.5	
16	3.125	3.238	104	103
17	"	3.178	102	
18	"	3.188	102	

Investigator

Director, Chemistry Dept.

# 細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

## 1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	N-モノ (又はジ) メチルフェニル-N' -モノ (又はジ) メチルフェニル-p-フェニレンジアミン			
別 名		分子 量	304.58	
構造式又は示性式 (いずれも不明の 場合は、その製法 の概要)		物 理 状 態	常温における性状	黒褐色粒状
		安 定 性	DMSO溶液は3時間安定	
		融 点	80℃以上	
		沸 点	不明	
		蒸 気 圧	——	
		分 配 係 数	——	
		溶 解 性	脂溶性	
		溶 解 度	水	不溶
試験に供した新規化学物質の純度	75%以上	DMSO	5%まで可溶	
不純物の名称及び濃度	—— wt%	アセトン	——	
		その他	——	

## 2. 試験に用いる菌株

### (1) 入手方法等

菌 株	入 手 先	入 手 年 月 日
サルモネラ	カリフォルニア大学 [redacted]	1975年10月31日
大腸菌	国立遺伝学研究所 [redacted]	1979年 5月 9日

### (2) 保存方法

保 存 温 度	組 成
-80℃ 以下	菌懸濁液                      0.8 ml
	DMSO                              0.07 ml
	その他 (                      )                      ml

### 3. S9 Mix

#### (1) S9の入手方法等

(該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること)

1 自製	製造年月日	年 月 日
② 購入	製造元	キッコーマン株式会社
	製造年月日	1991年 8月23日
	購入年月日	1991年 9月 3日
	Lot No.	RAA-258

#### (2) S9の保存温度等

保存温度	-80℃以下	保存機器名及び型式名	サンヨーMDF-U581ATR
------	--------	------------	-----------------

#### (3) S9の調製方法 (S9を購入した場合は、わかっている個所を全て記入すること)

使用動物		誘導物質	
種・系統	Rat: Sprague-Dawley	名称	7α-ホルビタール(PB)、5,6-ベンゾフラボン(BF)
性	雄	投与方法	腹腔内
週令	7週	投与期間及び投与量 (mg/kg体重)	1日目 PB 30mg/kg, 2日目 PB 60mg/kg, 3日目 PB 60mg/kg + BF 80mg/kg, 4日目 PB 60mg/kg
体重	193-245g		

#### (4) S9 Mixの組成

成分	S9 Mix 1ml の量	成分	S9 Mix 1ml 中の量
S9	0.1 ml	NADPH	4 μmol
MgCl <sub>2</sub>	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	0.2Mリン酸緩衝液	0.5ml
グルコース-6-リン酸	5 μmol	その他 ( )	-
グルコース-6-リン酸 脱水素酵素	-		

### 4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法
ジメチルスルホキシド (DMSO)	DMSOに50mg/mlの割合でTHERMO MIXER®で溶解した。

5. 前培養の条件

ニュートリエントブrossの名称 及び製造元	Bacto Nutrient Broth Dehydrated Difco Laboratories
前 培 養 時 間	10時間

6. 最少グルコース寒天平板培地(該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること)

1 自 製	寒 天	名 称	B a c t o - A g a r	
		製 造 元	D i f c o L a b o r a t o r i e s	
		Lot No.	7 8 1 7 3 3	
	寒天平板培地の液量		3 0 m l	
② 購 入	製 造 元		日清製粉株式会社 (特注品)	
	製 造 日		1991年 7月 9日	1991年10月21日
	購 入 日		1991年 9月10日	1991年12月25日
	Lot No.		D J 0 5 0 G G	D J 0 7 0 J G

7. 無菌試験(下欄の有・無のうち該当するものを○で囲むこと)

区 分	菌の増殖の有無	
被 験 物 質 溶 液	有	① 無
S 9 M i x	有	① 無

8. 試験の方法

(1) 試験の方法(該当する番号を○で囲むこと)

1. プレインキュベーション法 ② プレート法
----------------------------

(2) 試験の条件

		プレート法
組    成	菌 懸 濁 液	0. 1 m l
	被 験 物 質 溶 液	0. 1 m l
	N a - リン酸緩衝液	0. 5 m l
	S9Mix(代謝活性化法の場合)	0. 5 m l
	軟 寒 天 溶 液	2. 0 m l
インキュ ベーション	温 度	3 7 ℃
	時 間	4 8 時間

9. 試験結果

- (1) 試験の結果は別表による  
 (2) 結果の判定

判 定  (いずれかを○で囲むこと)	<input checked="" type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性
判定の理由  TA98の代謝活性化試験の625 $\mu$ g/プレート以上の用量において、用量依存性のある変異コロニー数の増加が認められたことから、当該物質は変異原性を有するものと判定した。	

(3) 参考事項

直接試験では312.5 $\mu$ g/プレート、代謝活性化試験では625 $\mu$ g/プレート以上の用量において寒天表面上に、被験物質の沈殿物が認められた。
---

10. その他

復 帰 突 然 変 異 試 験 実 施 機 関	名 称	財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所
	所 在 地	神奈川県秦野市落合729-5 電話(0463)82-4751
試 験 責 任 者	職 氏 名	主任研究員 <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
試 験 実 施 年 月 日	1991年 9月27日 より1992年 1月30日 まで	



## 試 験 結 果 表 (用量設定試験)

被験物質の名称: N-モ/(又はジ)メチルフェニル-N'-モ/(又はジ)メチルフェニル-p-フェニレンジアミン

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	復 帰 変 異 数 コロニー数/プレート (平均 $\pm$ 標準偏差)																
		塩 基 対 置 換 型									フ レ ー ム シ フ ト 型							
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537				
S9 Mix (-)	溶媒対照	130	143	142	14	13	10	2	15	17	23	28	27	7	7	10		
		( 138 $\pm$ 7.2 )			( 12 $\pm$ 2.1 )			( 11 $\pm$ 8.1 )			( 26 $\pm$ 2.6 )			( 8 $\pm$ 1.7 )				
	50	125			15			11			29			5				
	150	110			11			21			24			14				
	500	108			19			14			23			9				
	1500	114			6			13			11			12				
	5000	127			15			11			2			15				
S9 Mix (+)	溶媒対照	138	146	132	11	18	17	16	17	13	38	36	42	10	9	13		
		( 139 $\pm$ 7.0 )			( 15 $\pm$ 3.8 )			( 15 $\pm$ 2.1 )			( 39 $\pm$ 3.1 )			( 11 $\pm$ 2.1 )				
	50	161			24			9			36			11				
	150	150			7			12			28			9				
	500	221			8			17			43			11				
	1500	200			10			16			32			8				
	5000	181			13			15			32			8				
陽性対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	AF2		SA			AF2			AF2			9AA				
		濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.01		0.5			0.01			0.1			80				
		コロニー数/プレート	669	699	639	306	313	338	131	128	157	556	548	578	1945	2032	3009	
			( 669 $\pm$ 30.0 )			( 319 $\pm$ 16.8 )			( 139 $\pm$ 15.9 )			( 561 $\pm$ 15.5 )			( 2329 $\pm$ 590.8 )			
陽性対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	2AA		2AA			2AA			2AA			2AA				
		濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	1		2			10			0.5			2				
		コロニー数/プレート	759	857	777	248	238	249	519	505	471	196	201	169	171	203	172	
			( 798 $\pm$ 52.2 )			( 245 $\pm$ 6.1 )			( 498 $\pm$ 24.7 )			( 189 $\pm$ 17.2 )			( 182 $\pm$ 18.2 )			

(備考) AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

# 試 験 結 果 表 (本試験 I)

被験物質の名称: N-モノ(又はジ)メチルフェニル-N'-モノ(又はジ)メチルフェニル-p-フェニレンジアミン

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	復 帰 変 異 数 コロニー数/プレート (平均 $\pm$ 標準偏差)															
		塩 基 対 置 換 型						フ レ ー ム シ フ ト 型									
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	溶媒対照	146	127	120	22	17	15	9	13	16	27	18	21	10	10	6	
		( 131 $\pm$ 13.5 )			( 18 $\pm$ 3.6 )			( 13 $\pm$ 3.5 )			( 22 $\pm$ 4.6 )			( 9 $\pm$ 2.3 )			
	312.5	237	256	278	12	11	18	13	11	8	21	24	25	7	10	10	
		( 257 $\pm$ 20.5 )			( 14 $\pm$ 3.8 )			( 11 $\pm$ 2.5 )			( 23 $\pm$ 2.1 )			( 9 $\pm$ 1.7 )			
	625	253	237	233	18	18	22	7	14	14	17	15	17	5	6	8	
		( 241 $\pm$ 10.6 )			( 19 $\pm$ 2.3 )			( 12 $\pm$ 4.0 )			( 16 $\pm$ 1.2 )			( 6 $\pm$ 1.5 )			
	1250	218	250	212	19	12	13	16	7	9	18	20	22	9	6	5	
	( 227 $\pm$ 20.4 )			( 15 $\pm$ 3.8 )			( 11 $\pm$ 4.7 )			( 20 $\pm$ 2.0 )			( 7 $\pm$ 2.1 )				
2500	209	179	201	8	11	12	10	14	8	11	14	33	8	4	4		
	( 196 $\pm$ 15.5 )			( 10 $\pm$ 2.1 )			( 11 $\pm$ 3.1 )			( 19 $\pm$ 11.9 )			( 5 $\pm$ 2.3 )				
5000	171	149	197	6	10	13	7	12	5	16	19	23	9	8	9		
	( 172 $\pm$ 24.0 )			( 10 $\pm$ 3.5 )			( 8 $\pm$ 3.6 )			( 19 $\pm$ 3.5 )			( 9 $\pm$ 0.6 )				
S9 Mix (+)	溶媒対照	163	125	124	15	13	9	19	19	14	45	45	37	10	9	11	
		( 137 $\pm$ 22.2 )			( 12 $\pm$ 3.1 )			( 17 $\pm$ 2.9 )			( 42 $\pm$ 4.6 )			( 10 $\pm$ 1.0 )			
	312.5	183	173	168	15	15	16	28	11	13	79	74	90	16	20	11	
		( 175 $\pm$ 7.6 )			( 15 $\pm$ 0.6 )			( 17 $\pm$ 9.3 )			( 81 $\pm$ 8.2 )			( 16 $\pm$ 4.5 )			
	625	178	195	204	19	19	28	18	15	11	70	120	106	14	10	15	
		( 192 $\pm$ 13.2 )			( 22 $\pm$ 5.2 )			( 15 $\pm$ 3.5 )			( 99 $\pm$ 25.8 )			( 13 $\pm$ 2.6 )			
	1250	194	204	181	7	14	14	9	15	22	124	120	120	13	19	12	
	( 193 $\pm$ 11.5 )			( 12 $\pm$ 4.0 )			( 15 $\pm$ 6.5 )			( 121 $\pm$ 2.3 )			( 15 $\pm$ 3.8 )				
2500	164	225	214	21	12	20	11	19	19	122	142	142	10	9	16		
	( 201 $\pm$ 32.5 )			( 18 $\pm$ 4.9 )			( 16 $\pm$ 4.6 )			( 135 $\pm$ 11.5 )			( 12 $\pm$ 3.8 )				
5000	226	230	230	7	14	16	16	14	11	77	144	145	7	18	21		
	( 229 $\pm$ 2.3 )			( 12 $\pm$ 4.7 )			( 14 $\pm$ 2.5 )			( 122 $\pm$ 39.0 )			( 15 $\pm$ 7.4 )				
陽性	S9 Mixを必要とするもの	名称	AF2		SA		AF2		AF2		9AA						
	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.01		0.5		0.01		0.1		80							
対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	2AA		2AA		2AA		2AA		2AA						
	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	1		2		10		0.5		2							
	コロニー数/プレート	694	612	657	166	194	191	122	127	107	796	748	797	2750	3527	3061	
		( 654 $\pm$ 41.1 )			( 184 $\pm$ 15.4 )			( 119 $\pm$ 10.4 )			( 780 $\pm$ 28.0 )			( 3113 $\pm$ 391.1 )			
	コロニー数/プレート	991	1051	1096	231	196	183	899	897	803	463	345	307	198	225	191	
		( 1046 $\pm$ 52.7 )			( 203 $\pm$ 24.8 )			( 866 $\pm$ 54.9 )			( 372 $\pm$ 81.3 )			( 205 $\pm$ 18.0 )			

(備考) AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

試 験 結 果 表 (本試験II)

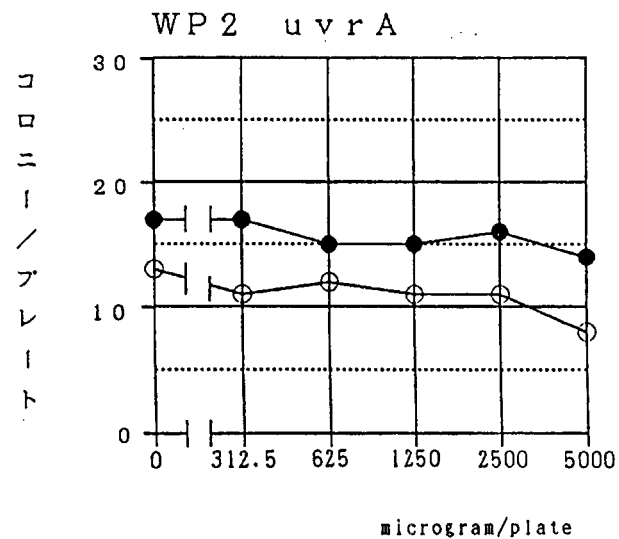
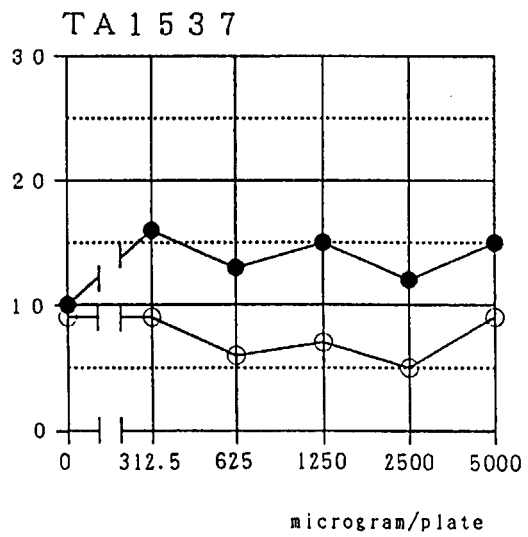
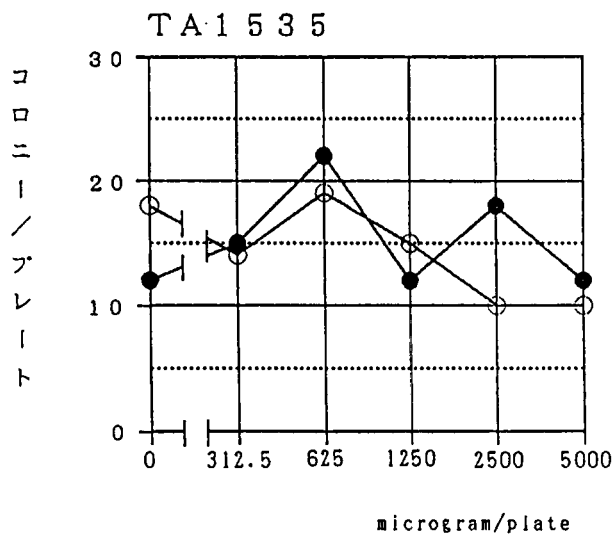
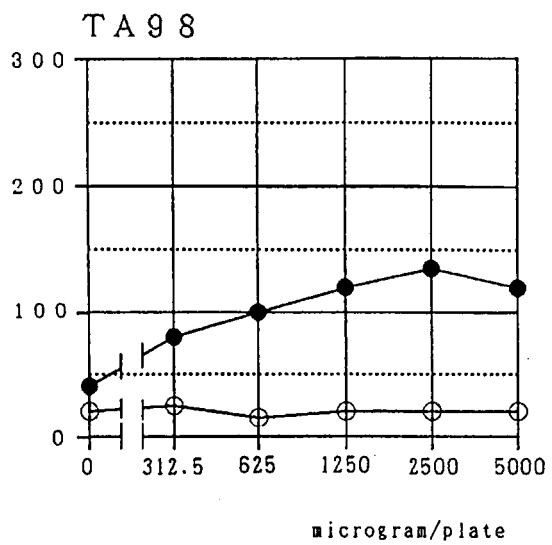
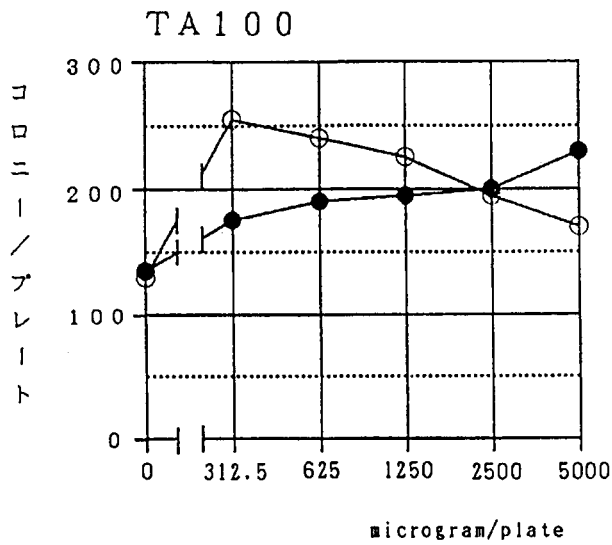
被験物質の名称：N-モノ(又はジ)メチルフェニル-N'-モノ(又はジ)メチルフェニル-p-フェニレンジアミン

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	復 帰 変 異 数 コロニー数/プレート (平均 $\pm$ 標準偏差)																
		塩 基 対 置 換 型						フ レ ー ム シ フ ト 型										
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537				
S9 Mix (-)	溶媒対照	159	156	147	21	15	13	18	17	28	22	28	36	16	14	9		
		( 154 $\pm$ 6.2 )			( 16 $\pm$ 4.2 )			( 21 $\pm$ 6.1 )			( 29 $\pm$ 7.0 )			( 13 $\pm$ 3.6 )				
	312.5	132	130	102	26	13	12	11	26	11	23	23	21	5	8	13		
		( 121 $\pm$ 16.8 )			( 17 $\pm$ 7.8 )			( 16 $\pm$ 8.7 )			( 22 $\pm$ 1.2 )			( 9 $\pm$ 4.0 )				
	625	151	132	138	19	14	14	15	16	15	18	15	11	8	10	6		
		( 140 $\pm$ 9.7 )			( 16 $\pm$ 2.9 )			( 15 $\pm$ 0.6 )			( 15 $\pm$ 3.5 )			( 8 $\pm$ 2.0 )				
	1250	115	124	170	21	14	12	12	16	15	14	16	14	16	7	12		
	( 136 $\pm$ 29.5 )			( 16 $\pm$ 4.7 )			( 14 $\pm$ 2.1 )			( 15 $\pm$ 1.2 )			( 12 $\pm$ 4.5 )					
2500	147	145	145	13	13	19	11	10	8	18	15	10	7	9	12			
	( 146 $\pm$ 1.2 )			( 15 $\pm$ 3.5 )			( 10 $\pm$ 1.5 )			( 14 $\pm$ 4.0 )			( 9 $\pm$ 2.5 )					
5000	134	126	110	12	12	12	12	14	16	19	17	18	3	6	9			
	( 123 $\pm$ 12.2 )			( 12 $\pm$ 0.0 )			( 14 $\pm$ 2.0 )			( 18 $\pm$ 1.0 )			( 6 $\pm$ 3.0 )					
S9 Mix (+)	溶媒対照	155	138	170	15	8	25	16	14	12	33	26	38	14	13	13		
		( 154 $\pm$ 16.0 )			( 16 $\pm$ 8.5 )			( 14 $\pm$ 2.0 )			( 32 $\pm$ 6.0 )			( 13 $\pm$ 0.6 )				
	312.5	197	209	185	24	29	14	27	24	17	74	67	20	15	13	15		
		( 197 $\pm$ 12.0 )			( 22 $\pm$ 7.6 )			( 23 $\pm$ 5.1 )			( 54 $\pm$ 29.4 )			( 14 $\pm$ 1.2 )				
	625	188	185	195	19	21	32	20	15	27	93	73	95	5	12	12		
		( 189 $\pm$ 5.1 )			( 24 $\pm$ 7.0 )			( 21 $\pm$ 6.0 )			( 87 $\pm$ 12.2 )			( 10 $\pm$ 4.0 )				
	1250	202	199	196	22	21	24	20	15	19	103	90	98	14	9	12		
	( 199 $\pm$ 3.0 )			( 22 $\pm$ 1.5 )			( 18 $\pm$ 2.6 )			( 97 $\pm$ 6.6 )			( 12 $\pm$ 2.5 )					
2500	194	193	219	17	16	14	16	13	23	58	114	114	11	11	12			
	( 202 $\pm$ 14.7 )			( 16 $\pm$ 1.5 )			( 17 $\pm$ 5.1 )			( 95 $\pm$ 32.3 )			( 11 $\pm$ 0.6 )					
5000	203	195	200	18	12	23	9	22	16	126	126	123	8	14	9			
	( 199 $\pm$ 4.0 )			( 18 $\pm$ 5.5 )			( 16 $\pm$ 6.5 )			( 125 $\pm$ 1.7 )			( 10 $\pm$ 3.2 )					
陽性対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	AF2		SA			AF2			AF2			9AA				
		濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.01		0.5			0.01			0.1			80				
		コロニー数/プレート	653	675	683	184	154	140	106	105	106	779	781	851	2693	2638	2758	
			( 670 $\pm$ 15.5 )			( 159 $\pm$ 22.5 )			( 106 $\pm$ 0.6 )			( 804 $\pm$ 41.0 )			( 2696 $\pm$ 60.1 )			
	S9 Mixを必要とするもの	名称	2AA		2AA			2AA			2AA			2AA				
		濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	1		2			10			0.5			2				
		コロニー数/プレート	1001	927	987	187	160	169	748	747	802	201	202	213	157	180	208	
			( 972 $\pm$ 39.3 )			( 172 $\pm$ 13.7 )			( 766 $\pm$ 31.5 )			( 205 $\pm$ 6.7 )			( 182 $\pm$ 25.5 )			

(備考) AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

# 量-反応 曲線 I

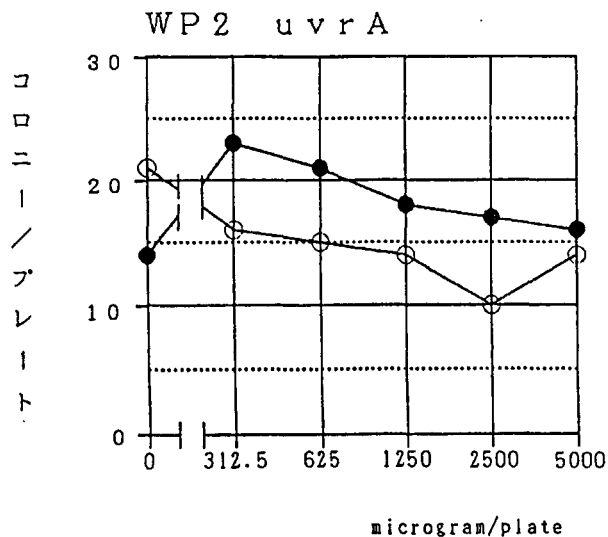
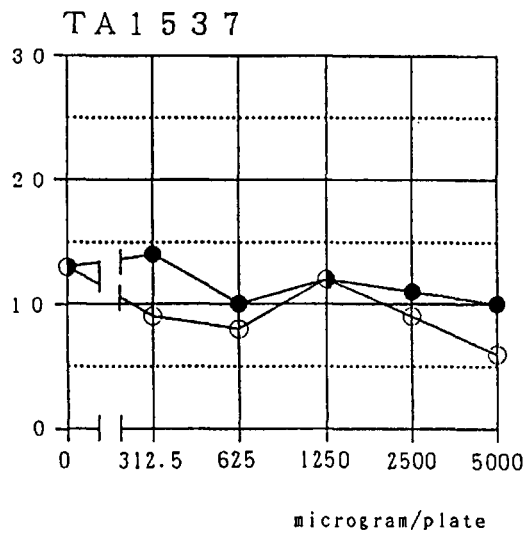
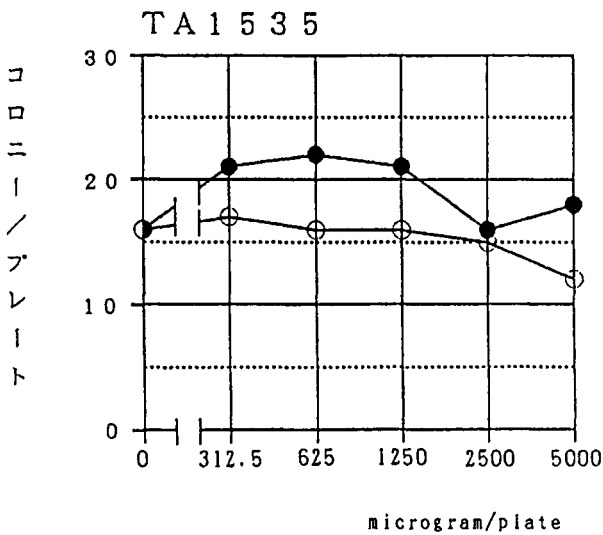
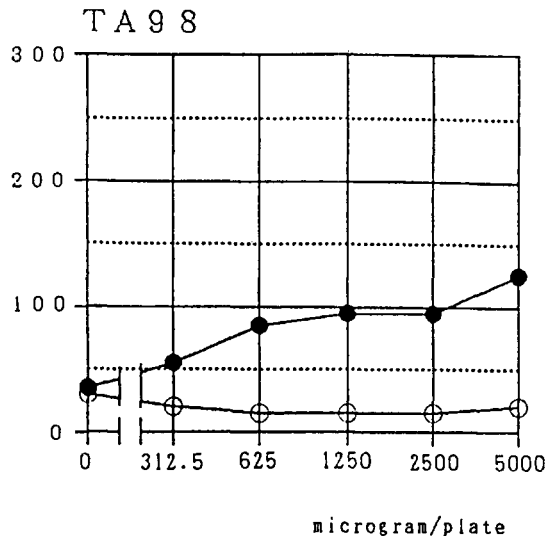
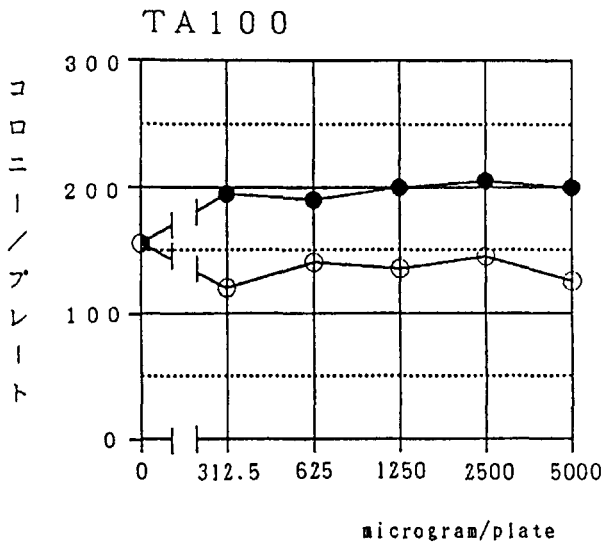
検体名：N-モノ（又はジ）メチルフェニル-N'-モノ（又はジ）メチルフェニル-p-フェニレンジアミン



S-9 mix(-) : ○—○  
S-9 mix(+) : ●—●

# 量-反応 曲線 II

検体名：N-モノ (又はジ) メチルフェニル-N'-モノ (又はジ) メチルフェニル-p-フェニレンジアミン



S-9 mix(-) : ○ — ○

S-9 mix(+) : ● — ●

microgram/plate