

食薬セ研第4-038号

1992年9月29日

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-
フェニレンジアミン のチャイニーズ・
ハムスター 培養細胞を
用いる染色体異常試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品

秦 野 研



食薬セ研第4-038号

試験委託者 : 厚生省生活衛生局 (1992年2月10日)

試験計画番号 : H-91-497

試験系識別番号 : CH-748

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 : 染色体異常試験

試験内容 : チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

試験期間 : 1992年2月10日～1992年9月28日

資料保管場所 : 秦野研究所資料保管室

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 9月29日

試験責任者 :  1992 年 9 月 28 日

試験担当主任者 :  1992 年 9 月 28 日

試験担当者 :



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チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

試 験 計 画 書 : H-91-497

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ガイドライン: 473 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る。

1992年 9月29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 H-91-497 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
1992年 2月10日	試験計画書点検査	1992年 2月10日
1992年 4月17日	含量試験・ 被験物質による細胞処理査察	1992年 4月17日
1992年 4月28日	標本観察査察	1992年 4月28日
1992年 8月18日	報告書案点検査	1992年 8月18日
1992年 9月28日	最終報告書点検査	1992年 9月28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、データを正確に反映していることを証明する。

1992年 9月28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	3
材料および方法	4
1. 使用した細胞	4
2. 培養液の調製	4
3. 培養条件	4
4. 被験物質	4
5. 被験物質の調製	5
6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定	5
6.1 試験条件	5
6.2 標本作製法	6
6.3 増殖抑制の指標とその結果	6
7. 実験群の設定	7
7.1 直接法	7
7.2 代謝活性化法	8
7.3 追加試験	8
8. 染色体標本作製法	9
9. 染色体分析	10
10. 記録と判定	10
結果と考察	12
結 論	13
文 献	13

Tables 1~5, Figure 1, 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染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL）を用いて検討した。結果は、以下のように要約される。

1) 細胞増殖抑制試験

直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は 25 $\mu\text{g/ml}$ 、代謝活性化法では 68 $\mu\text{g/ml}$ であった。

従って、染色体異常試験において、直接法では 25 $\mu\text{g/ml}$ 、代謝活性化法では 68 $\mu\text{g/ml}$ の処理濃度を高濃度とし、それぞれその $\frac{1}{2}$ の濃度を中濃度、 $\frac{1}{4}$ の濃度を低濃度として用いた。

2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、48時間処理の中濃度群（12.5 $\mu\text{g/ml}$ ）において、11.5%の細胞に染色体の構造異常が誘発され陽性となった。高濃度群では分裂抑制のため十分な分裂中期細胞が得られなかった。その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、代謝活性化法においては、S9mix 存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかったが、S9mix 非存在下の 34 $\mu\text{g/ml}$ 以上の群では、分裂抑制のため、染色体分析が不可能であった。そこで、処理濃度をさらに低くして追加試験を実施したところ、全ての処理群で染色体異常の誘発は認められなかった。

3) 結 論

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、今回実施した試験条件下で、試験管内の CHL細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

結 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の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL）を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

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ガイドライン：473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る。

材料および方法

1. 使用した細胞

から入手 (1988年2月、入手時：継代4代) したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

この CHL細胞株は、染色体異常試験の検出感度にすぐれているため常用されている。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS: J.R.Scientific ; ロット番号 C019407および Bocknek ; ロット番号 SF70521) を10%添加したイーグル MEM培養液を用いた。MEM培養液は、イーグル MEM培地「ニッスイ」①粉末 (日水製薬) 9.4 g を1 ℓ の蒸留水に溶解し、121℃で15分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン (滅菌済み、日水製薬) 300 mg と10% NaHCO₃ 溶液 12.5 ml を加えて調製した。2倍濃度の MEM培養液は、上記の培地 9.4 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、以下 MEM培養液と同様に調製した。

3. 培養条件

2 × 10⁴個の CHL細胞を、培養液 5 mlを入れたシャーレ (径6 cm、Corning) に播き、37℃の CO₂インキュベーター (5% CO₂) 内で培養した。

4. 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, 別名: ノンフレックスDT, 略称:

DMPD, ロット番号: AR8, [REDACTED] は黒褐色粒状で、DMSO (ジメチルスルホキシド)、アセトン、ベンゼンに可溶、水に溶けない。融点80℃以上の物質で、純度は75%以上である(精工化学㈱資料)。本実験では、被験物質がDMSOに 345 mg/ml まで可溶であることから、溶媒としてDMSOを用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施したエームス試験(試験計画番号: M-91-189)におけるDMSO中での安定性試験では3~50 mg/ml の濃度範囲で3時間は安定であった。また、後日実施したDMSO中での安定性試験では、0.850 mg/ml の濃度の被験物質調製液は3時間は安定であった(Appendix 1)。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体をDMSO (Sigma Chemical Co.、ロット番号: 129F0413) に溶解して原液を調製し、ついで原液をDMSOで順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の 0.5% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた最高濃度群と最低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内(平均含量が添加量の85%以上)の値であった(Appendixes 2-1, 2-2)。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

6.1 試験条件

直接法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、シャーレに培養液

5.0 ml と各濃度の被験物質調製液 25 μ l を加え、48時間処理した。代謝活性化法においては、細胞を4日間培養したのち培養液を捨て、シャーレに、MEM培養液 2.0 ml、S9mix (組成を以下に示す) 0.5 ml と2倍濃度の MEM培養液 0.5 ml を加え、更に 15 μ l の被験物質調製液を加えて6時間処理した。処理後、新鮮な培養液に交換し、更に18時間培養した。処理濃度は、直接法では3~100 μ g/ml、代謝活性化法では6~200 μ g/ml の範囲で試験を行った。

シャーレは1濃度について2枚用いた。

S9mix の組成

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM MgCl ₂	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1
Total	10 ml

* S9 : Sprague-Dawley 系ラットにフェノバルビタールと 5, 6-ベンゾフラボンを投与して調製したキッコーマン(株)製の S9 (ロット番号:RAA-260, 1991年9月製造, RAA-265, 1991年11月製造および RAA-271, 1992年2月製造)を購入し、使用時まで-80℃の超低温槽内に保存した。製造後6か月以内に使用した。

6.2 標本作製法

培養終了後、培養液を捨てたのち、リン酸緩衝液 (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺を含む) で洗い、細胞がシャーレに付着した状態で10%中性ホルマリン溶液を加えて固定した。固定後、0.1%クリスタルバイオレットで染色した。

6.3 増殖抑制の指標とその結果

被験物質の CHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計 (オリンパス) を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞

増殖の比をもって指標とした。

その結果、回帰直線式より算出した直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は 25 $\mu\text{g/ml}$ 、代謝活性化法では 68 $\mu\text{g/ml}$ であった (Tables 1、2 および Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の最高処理濃度を、直接法では 25 $\mu\text{g/ml}$ 、代謝活性化法では 68 $\mu\text{g/ml}$ の処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その $\frac{1}{2}$ の濃度を中濃度、 $\frac{1}{4}$ の濃度を低濃度とした。

7.1 直接法

直接法では、3段階の処理濃度群に対照群を含め下記の11群を設けた。試験の条件は細胞増殖抑制試験と同様とした。各群2枚のシャーレを用いた。

群	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	処理時間(hours)
1) 無処理対照	—	—
2) 溶媒対照*	0	24
3) DMPD	6.3	24
4) DMPD	12.5	24
5) DMPD	25.0	24
6) 陽性対照(MC)**	0.05	24
7) 溶媒対照*	0	48
8) DMPD	6.3	48
9) DMPD	12.5	48
10) DMPD	25.0	48
11) 陽性対照(MC)**	0.05	48

* 溶媒はDMSOを用い、培養液に 0.5% (v/v) 量添加した。

** MC: Mitomycin C (協和醗酵工業(株)、ロット番号 703AJK) は注射用蒸留水 (株)大塚製薬工場、ロット番号 K1G70) に溶解して調製した。この処理濃度で染色体異常を誘発することが知られている。

7.2 代謝活性化法

代謝活性化法では、対照群として S9mix を加えない群を含め、下記の11群を設けた。試験の条件は細胞増殖抑制試験と同様とした。各群2枚のシャーレを用いた。

群	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	S9mix の有無	処理時間(hours)
1) 無処理対照	—	—	—
2) 溶媒対照*	0	—	6-(18)
3) DMPD	17	—	6-(18)
4) DMPD	34	—	6-(18)
5) DMPD	68	—	6-(18)
6) 陽性対照 (CPA) **	5	—	6-(18)
7) 溶媒対照*	0	+	6-(18)
8) DMPD	17	+	6-(18)
9) DMPD	34	+	6-(18)
10) DMPD	68	+	6-(18)
11) 陽性対照 (CPA) **	5	+	6-(18)

* 溶媒はDMSOを用い、培養液に 0.5% (v/v) 量添加した。

** CPA: Cyclophosphamide (Sigma Chemical Co., ロット番号 67F-0155) は注射用蒸留水 (株)大塚製薬工場、ロット番号 K1G70) に溶解して調製した。この処理濃度で染色体異常を誘発することが知られている。

7.3 追加試験

前項 7.2にしたがって試験を実施したところ、S9mix 非存在下の処理群では、中・高濃度群 (34 および 68 $\mu\text{g}/\text{ml}$) において、分裂抑制のため染色体の分析が不可能であった。そこで、前回実施した S9mix 非存在下の低濃度群 (17.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を高濃度として、以下の濃度群を設定して追加試験を実施した。

試験条件は 7.2と同様とし、S9mix 非存在下であることから、陽性対照としてMC (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いた。

群	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	S9mix の有無	処理時間(hours)
1) 無処理対照	—	—	—
2) 溶媒対照*	0	—	6-(18)
3) DMPD	4.3	—	6-(18)
4) DMPD	8.5	—	6-(18)
5) DMPD	17.0	—	6-(18)
6) 陽性対照(MC)**	0.1	—	6-(18)

* 溶媒はDMSOを用い、培養液に 0.5% (v/v) 量添加した。

** MC: Mitomycin C (協和醗酵工業(株)、ロット番号 703AJK) は注射用蒸留水 (株)大塚製薬工場、ロット番号 K1G70) に溶解して調製した。この処理濃度で染色体異常を誘発することが知られている。

8. 染色体標本作製法

- 1) 培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培養液に加え、培養終了後各群の細胞をリン酸緩衝液 (Ca^{++} , Mg^{++} を含まない) で洗い、0.25%トリプシン溶液を用いてはがし、10 ml の遠沈管に集めた。
- 2) 1,000~1,200 rpm で5分間遠沈し、上清を捨てたのち沈澱した細胞に3 ml の 0.075M KCl 溶液を加えることにより約30分間低張処理を行った。
- 3) 低張処理後、低張液の上層にカルノア液 (酢酸:メタノール=1:3 v/v) 約6 mlを加え、下方から静かにピペッティングして混和させて固定し、その後 1,000~1,200 rpm で5分間遠沈した。
- 4) 遠沈後上清を除き、再び新鮮なカルノア液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ 1,000~1,200 rpm で5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。
- 5) 遠沈して得た白色の細胞沈澱物に、0.2~0.5 ml のカルノア液を加え十分に懸濁させた。

- 6) 細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドガラス上に滴下し、そのまま風乾した。
- 7) スライド標本は各シャーレにつき6枚作製した。
- 8) スライドガラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。
- 9) 乾燥したスライドは、ギムザ原液 (Merck) 4.5 ml を M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.8) 150 ml に溶かした染色液で約8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。
- 10) 染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。すなわち、染色体が分散していないよく広がった分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験 (MMS) 分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞 (polyploid) の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の

値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館らの判定基準²⁾に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果と考察

直接法による染色体分析の結果を Table 3 に示した。

DMPD を加えて24時間処理した各群において、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。一方、48時間処理の低・中濃度群では、構造異常が有意に増加し、中濃度 ($12.5 \mu\text{g/ml}$) では観察細胞の 11.5% ($p=8.05 \times 10^{-7}$) に染色分体ギャップ(gap)を中心とする異常が誘発され、陽性と判定された。 $25 \mu\text{g/ml}$ の高濃度群では、分裂抑制のため十分な観察細胞が得られなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 4 に示した。

DMPD を加えて S9mix 存在下で6時間処理した各濃度群において、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。S9mix 非存在下では、中・高濃度処理群で分裂抑制のため十分な観察細胞が得られなかったことから、さらに低い濃度を設定して追加試験を実施した (Table 5)。その結果、処理した全ての濃度群において、染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。従って、代謝活性化法における最終判定は陰性であった。なお、エームス試験では、TA98 を用いた +S9 の系で陽性となっている (M-91-189) が、S9mix 存在下の CHL細胞を用いる染色体異常試験では陰性であった。

陽性対照として用いた直接法での MC 処理群、および S9mix 存在下での CPA 処理群では染色分体交換 (cte) や染色分体切断 (ctb) などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

結 論

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、直接法48時間処理の 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理群で、11.5%の細胞に構造異常を誘発した。

従って、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、上記の試験条件下で染色体異常を誘発すると結論した。

文 献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店 1988
- 2) 石館 基 監修：＜改訂＞染色体異常試験データ集，エル・アイ・シー社，1987

Table 1 Inhibition of cell growth treated with N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine(DMPD) for 48 hours by direct method in CHL cells

Concentration of DMPD (μ g/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100,	100	100.0
3	96,	94	95.0
6	94,	98	96.0
13	82,	90	86.0
25	41,	41	41.0
50	0,	0	0.0
100	0,	0	0.0

Cell growth was counted by Monocellater TM (OLYMPUS)

Table 2 Inhibition of cell growth treated with N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine(DMPD) for 6 hours by metabolic activation method in CHL cells

Concentration of DMPD (μ g/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100,	100	100.0
6	103,	100	101.5
13	103,	97	100.0
25	96,	96	96.0
50	60,	59	59.5
100	25,	22	23.5
200	29,	29	29.0

Cell growth was counted by Monocellater TM (OLYMPUS)

Table 3 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine(DMPD) by direct method

Group	Concentration (μ g/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
DMPD	6.3	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
DMPD	12.5	24	200	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.00	—	—
DMPD	25.0	24	100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0.65 ⁶⁾	—	—
MC	0.05	24	200	25	68	91	0	1	0	0	185	0	98 *(49.0)	86 *(43.0)	0.50	+	—
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25		
DMPD	6.3	48	200	6	0	0	0	0	0	0	6	0	6 *(3.0)	0 (0.0)	0.00	—	—
DMPD	12.5	48	200	20	5	3	0	0	0	0	28	0	23 *(11.5)	6 *(3.0)	0.00	+	—
DMPD	25.0	48	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 ⁷⁾	Tox	Tox
MC	0.05	48	200	30	55	73	0	5	1	10	174	0	94 *(47.0)	82 *(41.0)	0.13	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Three hundred and ten cells were analyzed. 7) Three cells were analyzed. * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$

Table 4 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine(DMPD) by metabolic activation method

Group	Concent- ration (µg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38		
Solvent ¹⁾	0	—	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
DMPD	17	—	6 - (18)	200	2	1	1	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.14 ⁶⁾	—	—
DMPD	34	—	6 - (18)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 ⁷⁾	Tox	Tox
DMPD	68	—	6 - (18)	0													Tox	Tox
CPA	5	—	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	—	—
Solvent ¹⁾	0	+	6 - (18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38		
DMPD	17	+	6 - (18)	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
DMPD	34	+	6 - (18)	200	4	0	1	0	0	0	0	5	0	5 (2.5)	1 (0.5)	0.13	—	—
DMPD	68	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	—	—
CPA	5	+	6 - (18)	200	11	24	39	0	0	0	0	74	0	50 *(25.0)	45 *(22.5)	0.50	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Seven hundred and fifteen cells were analyzed. 7) Two cells were analyzed. * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$

Table 5 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine(DMPD) by metabolic activation method

Group	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50		
Solvent ¹⁾	0	—	6 - (18)	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63		
DMPD	4.3	—	6 - (18)	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
DMPD	8.5	—	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	—	—
DMPD	17.0	—	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	—	—
MC	0.1	—	6 - (18)	200	15	13	33	0	2	0	0	63	0	50 *(25.0)	38 *(19.0)	0.38	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. 1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10.

3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations.

4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$

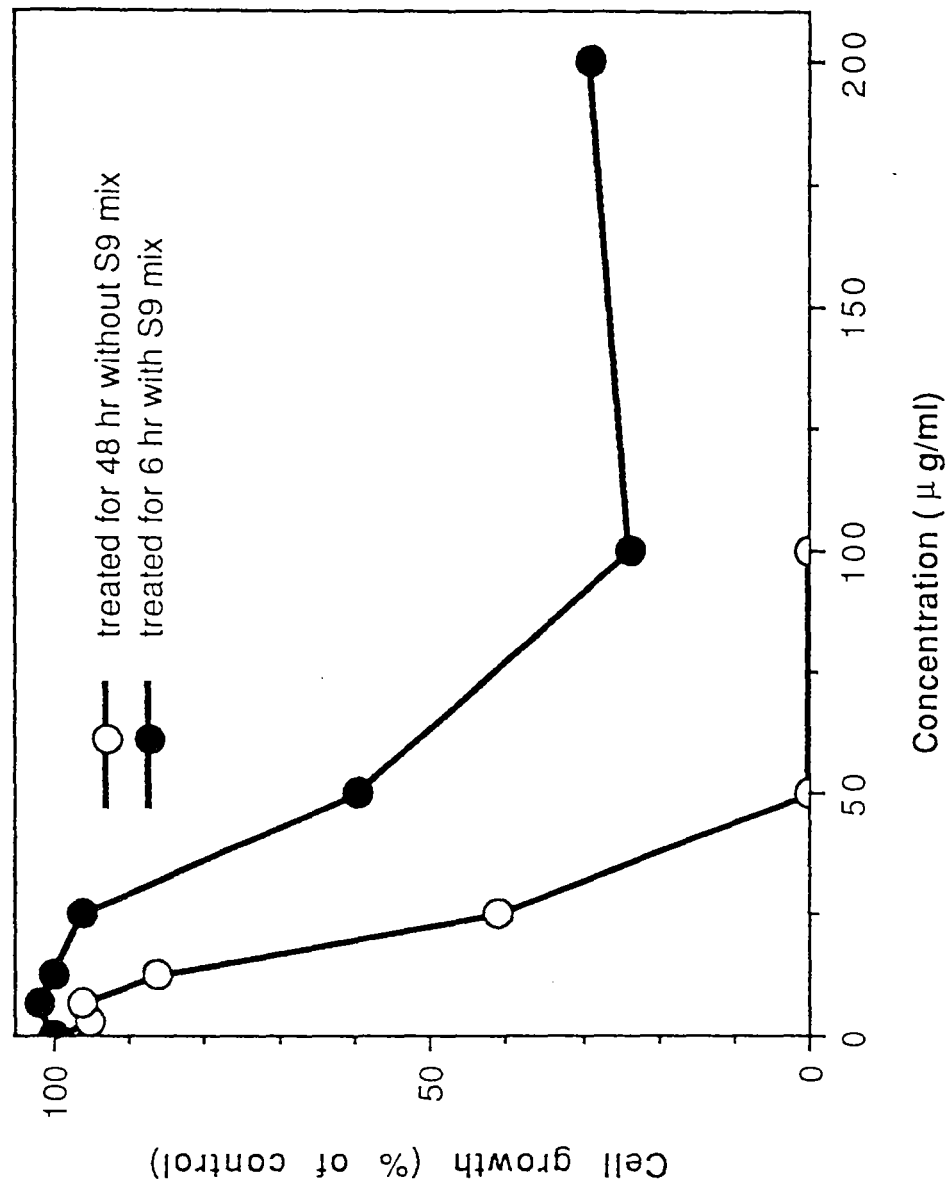


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine in CHL cells

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: Jun. 29, 1992

Date on determination

A : Jun. 29, 1992

B : Jun. 29, 1992

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 (%) ^{a)}	Sample No.	Found-2 (mg/ml)	Content (%) ^{b)}
0.850	1	0.8745	103	4	0.8490	98.3
"	2	0.8680	102	5	0.8580	99.4
"	3	0.8480	99.8	6	0.8465	98.0
	mean	0.8635	102	mean		98.6

^{a)} : Found-1/Indicated Formulation × 100

^{b)} : Found-2/mean Found-1 × 100

Investigator

Director, Chemistry Dept.

Appendix 2-1

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 : Apr. 17, 1992

Carrier : DMSO

Date on determination : Apr. 17, 1992

Sample No.	Indicated Formulation (A) (mg/mL)	Found (B) (mg/mL)	B/A×100 (%)	Mean (%)
1	1.25	1.182	94.6	93.6
2	"	1.189	95.1	
3	"	1.140	91.2	
4	5.00	4.660	93.2	91.8
5	"	4.592	91.8	
6	"	4.514	90.3	
7	3.40	3.150	92.6	91.9
8	"	3.114	91.6	
9	"	3.115	91.6	
10	13.6	12.14	89.3	88.6
11	"	12.14	89.3	
12	"	11.85	87.1	

Investigator

Director, Chemistry Dept.

Appendix 2-2

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. 24, 1992

Carrier : DMSO

Date on determination : Jun. 24, 1992

Sample No.	Indicated Formulation (A) (mg/ml)	Found (B) (mg/ml)	B/A×100 (%)	Mean (%)
1	0.850	0.8275	97.4	96.0
2	"	0.8120	95.5	
3	"	0.8075	95.0	
4	3.40	3.240	95.3	95.8
5	"	3.282	96.5	
6	"	3.248	95.5	

Investigator

Director, Chemistry Dept.

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

既存化学物質の名称 (IUPACの命名法による)		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	ノンフレックスDT	物 理 化 学 的 性 状	分 子 量	不明	
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)			常温における性状	黒褐色粒状	
			安 定 性	DMSO溶液中で3時間安定	
			融 点	80 ℃ 以上	
			沸 点	NT	
			蒸 気 圧	NT	
			分 配 係 数	NT	
			溶 解 性	油溶性	
			試験に供した既存化学物質の純度	75 wt% 以上	溶 解 度
DMSO	室温で345.0mg/mlまで可溶				
アセトン	可溶				
不純物の名称及び濃度				その他()	ベンゼンに可溶

[備考]物理化学的性状は参考資料であるので、可能な限り記入すること。

1. 「安定性」の欄には、水、その他の溶媒、熱、光等に対する安定性を記入すること。
2. 「蒸気圧」の欄には、摂氏25度における被験物質の蒸気圧を記入すること。
3. 「分配係数」の欄には、分配係数、測定温度及び分配係数の測定に用いた溶媒名を記入すること。
4. 「溶解性」の欄には、水溶性又は油溶性の別等を記入すること。
5. 「溶解度」の欄には、それぞれの溶媒に対する摂氏25度の溶解度を記入すること。

2. 細胞の種類—培養条件

細胞名	CHL	入手先		JCRB
種	チャイニーズ・ハムスター	入手年月日		1988年 2月8日
培養液	イーグルMEM	製造元		日水製薬
血清	牛胎児 10 %	製造元(Lot No.)		J.R.Scientific(C019407),Bocknek(SF70521)
細胞倍加時間	約15 h	凍結条件		-196℃ (液体窒素)
継代数	解凍後10代以内	培養条件	容器	プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25本		温度	37℃
			CO ₂	5%
備考				

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	平成 年 月 日製造
② 購 入	製 造 元	キッコーマン
	製 造 年 月 日	①1991年9月13日、② 1991年11月22日、③ 1992年2月21日製造
	購 入 年 月 日	①1991年10月18日、② 1992年2月27日、③ 1992年3月3日購入
	Lot No.	①RAA-260、② RAA-265、③ RAA-271

(2) S9の保存温度等

保 存 温 度	-80℃	保存機器名及び型式名	エバラ・ディープフリーザー
---------	------	------------	---------------

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

使 用 動 物		誘 導 物 質	
種・系 統	Sprague-Dawley系ラット	名 称	フェノバルビタール(PB) 5,6-ベンゾフラボン(BF)
性	雄	投 与 方 法	腹腔内投与
週 齢	7 週	投 与 期 間 及 び 投 与 量 (g / kg 体重)	1日目：PB 30 mg/kg 2日目：PB 60 mg/kg 3日目：PB 60mg/kg+BF 80 mg/kg 4日目：PB 60 mg/kg
体 重	183～235 g		

(4) S9 Mix の組成

成 分	S9 Mix 1ml 中の量	成 分	S9 Mix 1ml 中の量
S9	0.3 ml	NADP	4 μ mol
Mg Cl ₂	5 μ mol	NADPH	— μ mol
KCl	33 μ mol	緩衝液 (HEPES)	4 μ mol
グルコース		そ の 他	
－6－リン酸	5 μ mol	(蒸留水)	0.1 ml

(5) S9 Mix の処理条件 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

	① プ レ ー ト 法	2 浮 遊 細 胞 法
S 9 量 (最 終 濃 度)	5 %	%
S 9 蛋 白 量 (最 終 濃 度)	1.36~1.445 mg/ml	mg/ml
処 理 時 間	6 h	h
被 験 物 質 処 理 後 の 培 養 時 間	18 h	h
備 考		

4. 細胞増殖抑制試験

(1) 試験の条件及び被験物質溶液の調製

実 験 期 間		1992年2月28日 自	1992年3月5日 至
		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10 ³ 個 / ml	4×10 ³ 個 / ml
	培 養 開 始 後 日 数	3日目	4日目
培 養 器	形 状	円形	円形
	大 き さ	60 mm 径	60 mm 径
	製 造 元	コーニング	コーニング
	1 濃度当たりの培養器数 (プ レ ー ト 数)	2	2
	培 養 液 量	5 ml / 培養器	3 ml / 培養器
被 験 物 質 溶 液 の 調 製	溶 媒 の 種 類	ジメチルスルホキシド	ジメチルスルホキシド
	被験物質原液の濃度	20 mg / ml	40 mg / ml
	被 験 物 質 量	59.8 mg	120 mg
	溶 媒 量	3 ml	3 ml
	被験物質溶液の性状 (○ で 囲 む)	溶解、懸濁、その他 ()	溶解、懸濁、その他 ()
	調 製 後 の 時 間	1時間以内	1時間以内
	保 存 方 法	保存しない	保存しない
	滅 菌 方 法	滅菌しない	滅菌しない
被 験 物 質 処 理	調製溶液添加量	0.025 ml / 培養器	0.015 ml / 培養器
	処 理 時 間	48 h	6 h
	S9 Mix 添加量		0.5 ml / 培養器
細胞数計測方法		PBS(Ca ⁺⁺ ,Mg ⁺⁺ を含む) で洗浄し、10%中性ホルマリンで固定する。 水洗後、0.1%クリスタルバイオレットで染色する。 モノセレータで測定する。	
備 考			

[注] 「細胞数計測方法」は標本作製の方法(測定法、固定法、染色法)を記入すること。

(2) 細胞増殖率 (溶媒処理群を増殖率 100%とし、濃度の低い順に記入する。)

	濃 度 (ug/ml)	増 殖 率 (%)
代謝活性化法によ らない場合	0	100.0
	3	95.0
	6	96.0
	13	86.0
	25	41.0
	50	0.0
	100	0.0
代謝活性化法によ る場合	0	100.0
	6	101.5
	13	100.0
	25	96.0
	50	59.5
	100	23.5
	200	29.0

5. 染色体異常試験

(1) -1 試験の条件及び被験物質溶液の調製

実 験 期 間		1992年4月13日 自	1992年4月20日 至
		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
細胞	播 種 細 胞 数	4×10 ³ 個 / ml	4×10 ³ 個 / ml
	培 養 開 始 後 日 数	3日目	4日目
培 養 器	形 状	円形	円形
	大 き さ	60 mm 径	60 mm 径
	製 造 元	コーニング	コーニング
	1濃度当たりの培養器数 (プ レ ー ト 数)	2	2
	培 養 液 量	5 ml / 培養器	3 ml / 培養器
被 験 物 質 溶 液 の 調 製	溶 媒 の 種 類	ジメチルスルホキシド	ジメチルスルホキシド
	被験物質原液の濃度	5 mg / ml	13.6 mg / ml
	被 験 物 質 量	90.4 mg	244.8 mg
	溶 媒 量	18 ml	18 ml
	被験物質溶液の性状 (○ で 囲 む)	溶解、懸濁、その他 ()	溶解、懸濁、その他 ()
	調 製 後 の 時 間	1時間以内	1時間以内
	保 存 方 法	保存しない	保存しない
	滅 菌 方 法	滅菌しない	滅菌しない
被 験 物 質 処 理	調製溶液添加量	0.025 ml / 培養器	0.015 ml / 培養器
	処 理 時 間	48 h	6 h
	S9 Mix 添加量		0.5 ml / 培養器
分 裂 阻 害 剤	種 類	コルセミド	コルセミド
	濃 度	0.0001 mg/ml	0.0001 mg/ml
	処 理 時 間	約2h	約2h
備 考			

5. 染色体異常試験

(1) -2 試験の条件及び被験物質溶液の調製 (追加試験)

実 験 期 間		1992年6月20日 自	1992年6月26日 至
			代謝活性化法による場合
細胞	播 種 細 胞 数		4×10^3 個 / ml
	培 養 開 始 後 日 数		4日目
培 養 器	形 状		円形
	大 き さ		60 mm 径
	製 造 元		コーニング
	1 濃度当たりの培養器数 (プ レ ー ト 数)		2
	培 養 液 量		3 ml / 培養器
被 験 物 質 溶 液 の 調 製	溶 媒 の 種 類		ジメチルスルホキシド
	被験物質原液の濃度		3.4 mg / ml
	被 験 物 質 量		68 mg
	溶 媒 量		20 ml
	被験物質溶液の性状 (○ で 囲 む)		溶解、懸濁、その他 ()
	調 製 後 の 時 間		1時間以内
	保 存 方 法		保存しない
	滅 菌 方 法		滅菌しない
被 験 物 質 処 理	調製溶液添加量		0.015 ml / 培養器
	処 理 時 間		6 h
	S9 Mix 添 加 量		
分 裂 阻 害 剤	種 類		コルセミド
	濃 度		0.0001 mg/ml
	処 理 時 間		約2h
備 考 ; 追加試験			

(2) 試驗結果

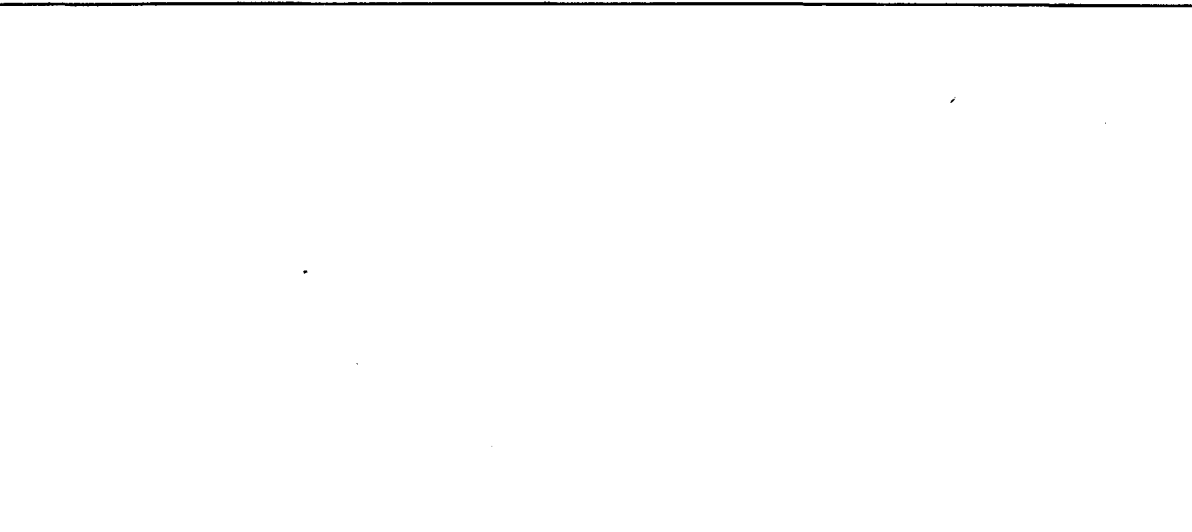
別表 1、2、3 による。

(3) 結果の判定

判	定	陽 性	陰 性
(いずれかを○でかこむこと)			
判定の理由 直接法48時間処理群で染色体異常の誘発頻度に濃度依存性が認められ、更に、12.5 ug/ml処理群では、観察した細胞の11.5%に染色体異常が見られたことによる。			
D ₂₀ 値*	代謝活性化 あり なし	0.023	mg / ml

*中期分裂像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度 (mg/ml)

(4) 參考事項



〔備考〕 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

6. その他

染色体異常 試験実施 機関	名 称	(財)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	細胞毒性学研究室長 [Redacted Name]
試験実施 年 月 日	1992年2月10日から1992年9月28日まで	

[備考]

「試験責任者」は「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施設について（昭和59年3月31日環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号通達）」に定める「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施設に関する基準」第5条に定義するものであること。

別表1 染色体異常試験結果 (代謝活性化法によらない場合)

被験物質: N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine

処 理	処理時間 (h)	処理濃度 (ug/ml)	観察細胞数	倍 数 体 数 ²		染 色 体 構 造 異 常 細 胞 の 出 現 数 と 出 現 頻 度 (%)										判 定
				(800細胞 観察した)	判 定	ギャップ	染 色 分 体 型			染 色 体 型		その他 (fragment, multiple aberration etc.)	合 計			
							g	cib	cte	csb	cse		-g	+g		
溶 媒 [DMSO]	24	0	100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	1		1	0	0	0	0	0	0	1			
			200	2 (0.25)		1 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.50)			
	48	0	100	0		0	1	0	0	0	0	1	1			
			100	2		0	0	0	0	0	0	0				
			200	2 (0.25)		0 (0.00)	1 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.50)	1 (0.50)			
被 験 物 質	24	6.3	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
			100	2		0	0	0	0	0	0	0				
			200	2 (0.25)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)				
		12.5	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-		
			100	0		2	0	0	0	0	0	2				
			200	0 (0.00)		3 (1.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (1.50)				
		25.0	100	2/310	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-		
			0													
			100	2/310 (0.65)		1 (1.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.00)				
	48	6.3	100	0	-	2	0	0	0	0	0	0	2	-		
			100	0		4	0	0	0	0	0	4				
			200	0 (0.00)		6 (3.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	6 (3.00)				
		12.5	100	0	-	14	4	2	0	0	0	4	17	+		
			100	0		4	1	1	0	0	0	2	6			
			200	0 (0.00)		18 (9.00)	5 (2.50)	3 (1.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	6 (3.00)	23 (11.50)			
		25.0	2	0/3	Tox	0	0	0	0	0	0	0	0	Tox		
			0													
			2	0/3 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)				
陽 性 対 照 [マイマイシロC]	24	0.05	100	2	-	13	21	29	0	0	0	39	46	+		
			100	2		10	25	35	0	1	0	47	52			
			200	4 (0.50)		23 (11.50)	46 (23.00)	64 (32.00)	0 (0.00)	1 (0.50)	0 (0.00)	86 (43.00)	98 (49.00)			
	48	0.05	100	1	-	13	12	30	0	3	2	42	48	+		
			100	0		10	25	22	0	2	0	40	46			
			200	1 (0.13)		23 (11.50)	37 (18.50)	52 (26.00)	0 (0.00)	5 (2.50)	2 (1.00)	82 (41.00)	94 (47.00)			

*1: 処理濃度は低濃度から高濃度の順に記載する。

*2: 処理濃度毎に各々の培養系列 (プレート) の観察細胞数、倍数体数及び染色体構造異常をもつ細胞の出現数を1及び2行目に記載し、その合計を3行目に表示し、それから求めた異常をもつ細胞の出現頻度%を () に示す。

ギャップ (g) には染色分体型と染色体型の両者を含める。合計 (-g) にはギャップのみをもつ細胞を除いた総数と (%) を示す。1個の細胞中に複数の異常をもつ場合でも、1個の異常細胞として計算する。

例えば、1個の細胞中に切断が2、交換が2ある場合には、異常細胞としては1、切断をもつ細胞としても1、交換をもつ細胞としても1として計算する。

clb: 染色分体型切断, clc: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, その他: 断片化など (細胞死は除く)

*3: 溶媒、陽性対照物質名を () に記載する。 Tox: Toxicity

別表2 染色体異常試験結果(代謝活性化法による場合)

被験物質: N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine

処 理	S 9 M i x 有 無	処理濃度 (ug/ml)	観察細胞数	倍 数 体 数		染 色 体 構 造 異 常 細 胞 の 出 現 数 と 出 現 頻 度 (%)									判 定
				(800細胞 観察した)	判 定	ギャップ	染 色 分 体 型		染 色 体 型		その他 (fragment, multiple aberration etc.)	合 計			
							g	cib	cic	csb		csc	-g	+g	
溶 媒 [DMSO]	-	0	100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	1		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	2 (0.25)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		
	+	0	100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	2		1	0	0	0	0	0	0	1		
			200	3 (0.38)		1 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.50)		
被 験 物 質	-	17	100	1/362	-	2	0	0	0	0	0	0	0	2	-
			100	0/353		0	1	1	0	0	0	2	2		
			200	1/715 (0.14)		2 (1.00)	1 (0.50)	1 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (1.00)	4 (2.00)		
		34	0	Tox											Tox
			2		0/2	0	0	0	0	0	0	0	0		
			2		0/2 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		
		68	0	Tox											Tox
			0												
			0		()	()	()	()	()	()	()	()	()		
	+	17	100	2	-	3	0	0	0	0	0	0	0	3	-
			100	0		1	0	0	0	0	0	0	1		
			200	2 (0.25)		4 (2.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (2.00)		
		34	100	1	-	3	0	0	0	0	0	0	0	3	-
			100	0		1	0	1	0	0	0	1	2		
			200	1 (0.13)		4 (2.00)	0 (0.00)	1 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.50)	5 (2.50)		
		68	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		
陽 性 対 照 [シクロスファミド]	-	5	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		
	+	5	100	2	-	5	8	18	0	0	0	24	27	+	
			100	2		5	11	14	0	0	0	21	23		
			200	4 (0.50)		10 (5.00)	19 (9.50)	32 (16.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	45 (22.50)	50 (25.00)		

S9の用量(5%),被験物質処理時間(6h),被験物質処理後の細胞回復時間(18h)

各項目への記入は表1に準ずる。Tox: Toxicity

別表3 染色体異常試験結果(代謝活性化法による場合)

被験物質: N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine

処 理	S 9 Mix 有 無	処理濃度 (ug/ml)	観察細胞数	倍 数 体 数		染 色 体 構 造 異 常 細 胞 の 出 現 数 と 出 現 頻 度 (%)								判 定		
				(800細胞 観察した)	判 定	ギャップ g	染 色 分 体 型		染 色 体 型		その他 (fragment, multiple aberration etc.)	合 計				
							ctb	cte	csb	cse		-g	+g			
溶 媒 [DMSO]	-	0	100	2		0	0	1	0	0	0	1	1			
			100	3		0	0	0	0	0	0	0	0			
			200	5 (0.63)		0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.50)	1 (0.50)			
	+															
被 験 物 質	-	4.3	100	1	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-		
			100	1		3	0	0	0	0	0	0	3			
			200	2 (0.25)		4 (2.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (2.00)			
		8.5	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
			100	0		1	0	0	0	0	0	0	1			
			200	1 (0.13)		1 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.50)			
		17.0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0			
			200	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)			
		+														
	陽 性 対 照 [7417472C]	-	0.1	100	1	-	6	5	12	0	0	0	15	20	+	
				100	2		8	6	19	0	2	0	23	30		
				200	3 (0.38)		14 (7.00)	11 (5.50)	31 (15.50)	0 (0.00)	2 (1.00)	0 (0.00)	38 (19.00)	50 (25.00)		
+																

S9の用量(5%),被験物質処理時間(6h),被験物質処理後の細胞回復時間(18h)

各項目への記入は表1に準ずる。

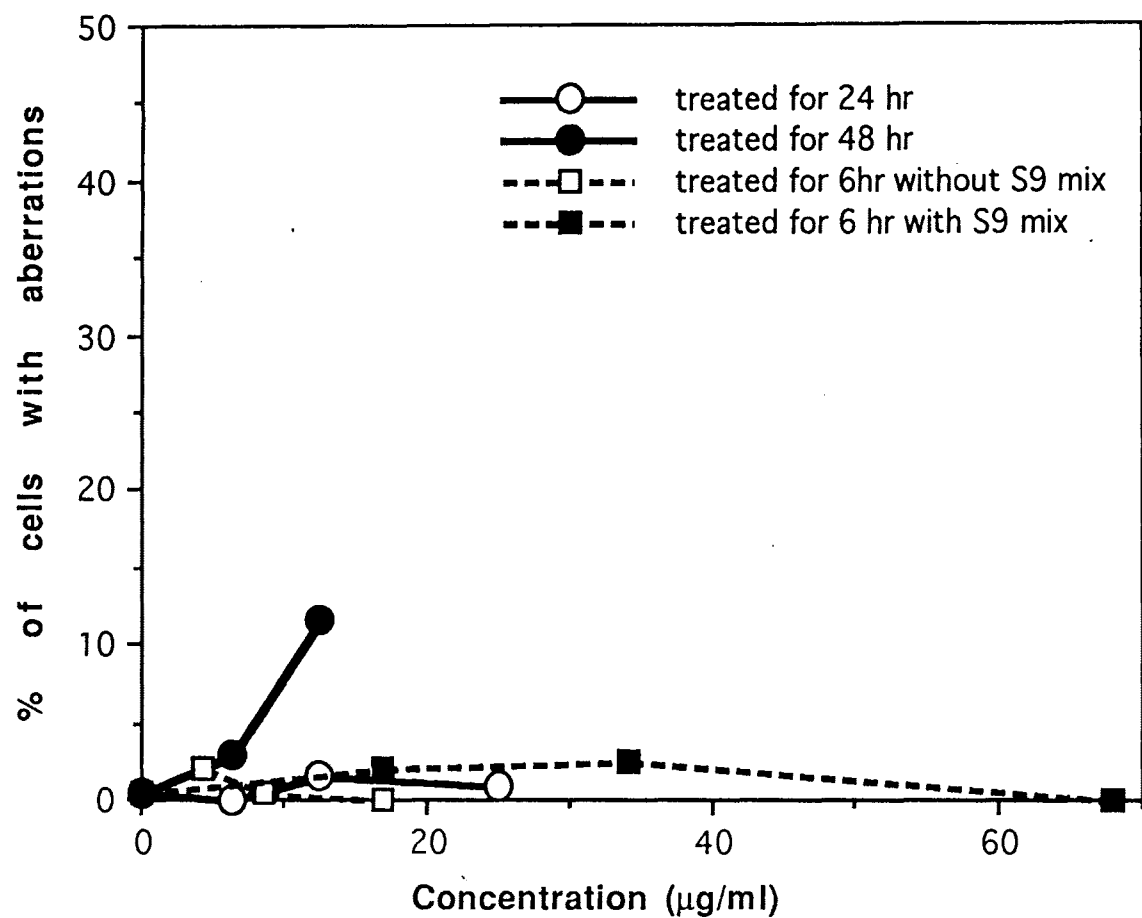


Fig. 1 Induction of chromosome aberration treated with N-mono(or di)-methylphenyl-N'-mono(or di)-methylphenyl-p-phenylenediamine in CHL cells