

既存化学物質の人健康影響に関する情報

(平成21年12月18日開催)

官報公示 整理番号	CAS No.	物質名称	試験名				頁
			Ames	染色体	28日間	Reprotax	
4-96	42240-73-3	2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン	○	○	○		1
2-140	75-50-3	トリメチルアミン	○	○		○	77
2-186	75-59-2	テトラメチルアンモニウムヒドロキシド	○	○	○		103
2-1065	79-39-0	メタクリルアミド	○	○	○		122
2-608	88-09-5	2-エチル酪酸	○	○		○	144
3-1183	90-02-8	2-ヒドロキシベンズアルデヒド	○	○		○	167
5-56	97-99-4	テトラヒドロフルフリルアルコール	○	○	○		188
3-2259	101-83-7	ジシクロヘキシルアミン	○	○	○		209
2-235	110-63-4	1,4-ブタンジオール	○	○		○	231
3-959	118-79-6	2,4,6-トリブロモフェノール	○	○		○	255
3-500	123-07-9	4-エチルフェノール	○	○	○		282
2-1541	126-98-7	メタクリロニトリル	○	○		○	303
2-1291 2-2709	683-10-3	N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシン (N-カルボキシメチル-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウム)	○	○		○	325
2-1044	868-77-9	メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステル	○	○		○	351
2-2583	2439-35-2	アクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチルエステル	○	○		○	374
2-1047	2867-47-2	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラート	○	○		○	396

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 μg /プレート of 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。

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 μg /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 128~320 μg /プレートの用量、+S9 処理では 128 μg /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 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、2000 μg /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 μg /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 5000 μg /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相当と判断し、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 μg /プレート以上の用量で、TA1535 株および TA98 株では 39.1 μg /プレート以上の用量で、WP2*uvrA* 株では 625 μg /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 μg /プレート以上の用量で、また、+S9 処理の 156 μg /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 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、1250 μg /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 μg /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 μg /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

- 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.

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	90	104	117	12	10	8	18	19	16	12	18	15	11	7	13
		[104	±	14]	[10	±	2]	[18	±	2]	[15	±	3]	[10	±	3]
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	89	98	97	8	12	14	14	10	13	16	20	18	10	7	8
		[95	±	5]	[11	±	3]	[12	±	2]	[18	±	2]	[8	±	2]
4,4'-diamino diphenylmethane	20.5	81*	70*	73*	9	12	12	13	9	12	23	22	21	6*	6*	6*
		[75	±	6]	[11	±	2]	[11	±	2]	[22	±	1]	[6	±	0]
	51.2	75*	73*	70*	12*	8*	9*	14	16	13	23*	17*	21*	7*	4*	5*
		[73	±	3]	[10	±	2]	[14	±	2]	[20	±	3]	[5	±	2]
	128 +	87*	82*	87*	8*	12*	7*	15	15	12	16*	20*	18*	11*	6*	6*
		[85	±	3]	[9	±	3]	[14	±	2]	[18	±	2]	[8	±	3]
	320 +	84*	73*	78*	10*	14*	11*	11*	13*	16*	24*	20*	23*	8*	5*	9*
		[78	±	6]	[12	±	2]	[13	±	3]	[22	±	2]	[7	±	2]
	800 +	86*	98*	90*	11*	11*	11*	12*	11*	19*	20*	19*	14*	6*	12*	6*
		[91	±	6]	[11	±	0]	[14	±	4]	[18	±	3]	[8	±	3]
	2000 +	91*	99*	80*	10*	8*	8*	16*	12*	17*	16*	11*	14*	6*	6*	4*
		[90	±	10]	[9	±	1]	[15	±	3]	[14	±	3]	[5	±	1]
	5000 +	86#	93#	86#	6#	6#	10#	12#	12#	19#	10#	11#	9#	5#	5#	4#
		[88	±	4]	[7	±	2]	[14	±	4]	[10	±	1]	[5	±	1]
Positive control compound		AF-2			NaN ₃			AF-2			AF-2			9-AA		
Dose (µg/plate)		0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Revertant colonies		743	710	697	654	559	583	99	110	121	671	638	641	282	361	391
per plate		[717	±	24]	[599	±	49]	[110	±	11]	[650	±	18]	[345	±	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.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	113	103	100	7	8	10	17	23	23	22	20	24	11	10	8
		[105	\pm 7]	[8	\pm 2]	[21	\pm 3]	[22	\pm 2]	[10	\pm 2]					
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	149	137	133	8	11	11	23	20	16	27	27	31	15	12	16
		[140	\pm 8]	[10	\pm 2]	[20	\pm 4]	[28	\pm 2]	[14	\pm 2]					
4,4'-diamino diphenylmethane	20.5	156	143	140	9	12	9	12	14	21	26	32	33	8	17	12
		[146	\pm 9]	[10	\pm 2]	[16	\pm 5]	[30	\pm 4]	[12	\pm 5]					
	51.2	155	149	141	12	8	14	24	18	17	34	32	33	11	6	14
		[148	\pm 7]	[11	\pm 3]	[20	\pm 4]	[33	\pm 1]	[10	\pm 4]					
	128 +	145	137	137	13	9	15	31	25	29	32	30	29	6	10	13
		[140	\pm 5]	[12	\pm 3]	[28	\pm 3]	[30	\pm 2]	[10	\pm 4]					
	320 +	130	121	131	11	13	12	22	21	16	30	25	23	8	10	12
		[127	\pm 6]	[12	\pm 1]	[20	\pm 3]	[26	\pm 4]	[10	\pm 2]					
	800 +	127*	134*	127*	9	10	13	18	21	20	24	31	26	7	11	9
		[129	\pm 4]	[11	\pm 2]	[20	\pm 2]	[27	\pm 4]	[9	\pm 2]					
	2000 +	131*	121*	124*	10	7	11	19	19	21	26	28	30	5*	5*	3*
		[125	\pm 5]	[9	\pm 2]	[20	\pm 1]	[28	\pm 2]	[4	\pm 1]					
	5000 +	127*	135*	134*	13	15	16	14	19	14	27	26	24	6*	7*	6*
		[132	\pm 4]	[15	\pm 2]	[16	\pm 3]	[26	\pm 2]	[6	\pm 1]					
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)		1			2			10			0.5			2		
Revertant colonies		1253	1177	1246	394	406	367	730	795	760	332	371	324	210	192	213
per plate		[1225	\pm 42]	[389	\pm 20]	[762	\pm 33]	[342	\pm 25]	[205	\pm 11]					

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

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

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

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	113	119	109	14	18	17	31	31	22	19	26	19	7	7	9
		[114	\pm	5]	[16	\pm	2]	[28	\pm	5]	[21	\pm	4]	[8	\pm	1]
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.610	121	121	123										6	5	6
		[122	\pm	1]										[6	\pm	1]
4,4'-diamino diphenylmethane	1.22	107	99	109										13	8	7
		[105	\pm	5]										[9	\pm	3]
	2.44	112	113	108	13	13	11				24	18	19	9	9	14
		[111	\pm	3]	[12	\pm	1]				[20	\pm	3]	[11	\pm	3]
	4.88	109	97	104	12	16	13				30	16	20	6	6	11
		[103	\pm	6]	[14	\pm	2]				[22	\pm	7]	[8	\pm	3]
	9.77	84	93	99	8	7	8				18	25	18	8	12	9
		[92	\pm	8]	[8	\pm	1]				[20	\pm	4]	[10	\pm	2]
	19.5	106*	80*	87*	10	14	11	22	27	27	22	22	19	5*	6*	5*
		[91	\pm	13]	[12	\pm	2]	[25	\pm	3]	[21	\pm	2]	[5	\pm	1]
	39.1	70*	68*	75*	9*	9*	5*	34	23	21	18*	19*	17*	7*	4*	3*
		[71	\pm	4]	[8	\pm	2]	[26	\pm	7]	[18	\pm	1]	[5	\pm	2]
	78.1 +				14*	17*	10*	26	23	23	20*	20*	24*			
					[14	\pm	4]	[24	\pm	2]	[21	\pm	2]			
	156 +							20	23	18						
								[20	\pm	3]						
	313 +							20	25	18						
								[21	\pm	4]						
	625 +							36*	30*	26*						
								[31	\pm	5]						

a) : Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

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

Table 3. Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]													
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537					
Positive control compound	AF-2	AF-2		NaN ₃		AF-2		AF-2		9-AA					
Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.01		0.5		0.01		0.1		80					
Revertant colonies per plate [639	731	644	663	605	564	127	148	126	697	596	695	295	305	295
	671	\pm	52]	611	\pm	50]	134	\pm	12]	663	\pm	58]	298	\pm	6]
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide		NaN ₃ : Sodium azide				9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride									

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

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	114	122	119	15	11	12	26	43	36	18	32	25	19	17	16
		[118	\pm	4]	[13	\pm	2]	[35	\pm	9]	[25	\pm	7]	[17	\pm	2]
2,2',3,3'- tetrachloro-	39.1	152	177	154												
		[161	\pm	14]												
4,4'-diamino diphenylmethane	78.1 +	139	168	168										20	17	14
		[158	\pm	17]										[17	\pm	3]
	156 +	120	136	138	15	16	11	33	31	36	36	30	36	10	12	18
		[131	\pm	10]	[14	\pm	3]	[33	\pm	3]	[34	\pm	3]	[13	\pm	4]
	313 +	149	140	148	9	9	7	21	29	30	36	33	38	10	12	13
		[146	\pm	5]	[8	\pm	1]	[27	\pm	5]	[36	\pm	3]	[12	\pm	2]
	625 +	145	147	129	11	13	14	26	27	29	25	27	31	10	13	15
		[140	\pm	10]	[13	\pm	2]	[27	\pm	2]	[28	\pm	3]	[13	\pm	3]
	1250 +	132*	136*	139*	11	14	16	20	22	30	17	23	23	8*	8*	9*
		[136	\pm	4]	[14	\pm	3]	[24	\pm	5]	[21	\pm	3]	[8	\pm	1]
	2500 +				18	18	17	20	23	32	21	22	30	5*	5*	7*
					[18	\pm	1]	[25	\pm	6]	[24	\pm	5]	[6	\pm	1]
	5000 +				20	16	18	27	26	32	24	30	23			
					[18	\pm	2]	[28	\pm	3]	[26	\pm	4]			
Positive control compound	2-AA	2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2			10			0.5			2					
Revertant colonies per plate	1490	1290	1320	468	504	469	833	876	909	499	438	514	236	194	187	
	[1367	\pm	108]	[480	\pm	21]	[873	\pm	38]	[484	\pm	40]	[206	\pm	27]	

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

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

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]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]											
		TA100			TA1535			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	99	111	96	17	15	20	19	20	19	13	10	16
		[102	\pm	8]	[17	\pm	3]	[19	\pm	1]	[13	\pm	3]
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.781	82	90	96							7	10	10
		[89	\pm	7]							[9	\pm	2]
4,4'-diamino diphenylmethane	1.56	113	92	111	13	14	11	28	26	20	16	15	12
		[105	\pm	12]	[13	\pm	2]	[25	\pm	4]	[14	\pm	2]
	3.13	101	98	112	11	8	10	22	23	16	11	10	15
		[104	\pm	7]	[10	\pm	2]	[20	\pm	4]	[12	\pm	3]
	6.25	88	93	117	12	16	15	22	20	18	11	12	8
		[99	\pm	16]	[14	\pm	2]	[20	\pm	2]	[10	\pm	2]
	12.5	83	76	96	9	6	7	20	20	16	10	6	5
		[85	\pm	10]	[7	\pm	2]	[19	\pm	2]	[7	\pm	3]
	25.0	82*	84*	79*	9	12	5	14	18	14	9*	5*	7*
		[82	\pm	3]	[9	\pm	4]	[15	\pm	2]	[7	\pm	2]
	50.0				8*	9*	6*	15*	22*	16*			
					[8	\pm	2]	[18	\pm	4]			
Positive control compound		AF-2			NaN ₃			AF-2			9-AA		
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01			0.5			0.1			80		
Revertant colonies		549	553	511	610	636	674	647	614	606	428	452	423
per plate		[538	\pm	23]	[640	\pm	32]	[622	\pm	22]	[434	\pm	16]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaN₃: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloridea): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

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%未満の処理濃度では、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 $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理では 63.7, 91.0 および 130 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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。

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 µg/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 µg/mL の濃度において白濁、420 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、1680 µg/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 µg/mL の濃度において白濁、840 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、1680 µg/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 µg/mL 以上の濃度においては白色粉末状、さらに、210 µg/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 µg/mL の濃度において白色膜状、210 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、420 µg/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 (µg/mL)	相対細胞増殖率 (%)	処理濃度 (µg/mL)	相対細胞増殖率 (%)	処理濃度 (µg/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 µg/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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 以上、短時間処理法+S9 処理の 91.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上および連続処理法 24 時間処理の 63.7 $\mu\text{g/mL}$ 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^{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

- 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.

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.