

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	テトラメチル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)エチルメタクリレート	○	○		○	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/プレートのお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、WP2uvrA 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相当と判断し、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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm 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	\pm	14]	[10	\pm	2]	[18	\pm	2]	[15	\pm	3]	[10	\pm	3]
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	89	98	97	8	12	14	14	10	13	16	20	18	10	7	8
		[95	\pm	5]	[11	\pm	3]	[12	\pm	2]	[18	\pm	2]	[8	\pm	2]
4,4'-diamino diphenylmethane	20.5	81*	70*	73*	9	12	12	13	9	12	23	22	21	6*	6*	6*
		[75	\pm	6]	[11	\pm	2]	[11	\pm	2]	[22	\pm	1]	[6	\pm	0]
	51.2	75*	73*	70*	12*	8*	9*	14	16	13	23*	17*	21*	7*	4*	5*
		[73	\pm	3]	[10	\pm	2]	[14	\pm	2]	[20	\pm	3]	[5	\pm	2]
	128 +	87*	82*	87*	8*	12*	7*	15	15	12	16*	20*	18*	11*	6*	6*
		[85	\pm	3]	[9	\pm	3]	[14	\pm	2]	[18	\pm	2]	[8	\pm	3]
	320 +	84*	73*	78*	10*	14*	11*	11*	13*	16*	24*	20*	23*	8*	5*	9*
		[78	\pm	6]	[12	\pm	2]	[13	\pm	3]	[22	\pm	2]	[7	\pm	2]
	800 +	86*	98*	90*	11*	11*	11*	12*	11*	19*	20*	19*	14*	6*	12*	6*
		[91	\pm	6]	[11	\pm	0]	[14	\pm	4]	[18	\pm	3]	[8	\pm	3]
	2000 +	91*	99*	80*	10*	8*	8*	16*	12*	17*	16*	11*	14*	6*	6*	4*
		[90	\pm	10]	[9	\pm	1]	[15	\pm	3]	[14	\pm	3]	[5	\pm	1]
	5000 +	86#	93#	86#	6#	6#	10#	12#	12#	19#	10#	11#	9#	5#	5#	4#
		[88	\pm	4]	[7	\pm	2]	[14	\pm	4]	[10	\pm	1]	[5	\pm	1]
Positive control compound		AF-2			NaN ₃			AF-2			AF-2			9-AA		
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		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	\pm	24]	[599	\pm	49]	[110	\pm	11]	[650	\pm	18]	[345	\pm	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 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : 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 [105	103 \pm	100 7]	7 8	8 \pm	10 2]	17 21	23 \pm	23 3]	22 22	20 \pm	24 2]	11 10	10 \pm	8 2]
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	149 [140	137 \pm	133 8]	8 10	11 \pm	11 2]	23 20	20 \pm	16 4]	27 28	27 \pm	31 2]	15 14	12 \pm	16 2]
4,4'-diamino diphenylmethane	20.5	156 [146	143 \pm	140 9]	9 10	12 \pm	9 2]	12 16	14 \pm	21 5]	26 30	32 \pm	33 4]	8 12	17 \pm	12 5]
	51.2	155 [148	149 \pm	141 7]	12 11	8 \pm	14 3]	24 20	18 \pm	17 4]	34 33	32 \pm	33 1]	11 10	6 \pm	14 4]
	128 +	145 [140	137 \pm	137 5]	13 12	9 \pm	15 3]	31 28	25 \pm	29 3]	32 30	30 \pm	29 2]	6 10	10 \pm	13 4]
	320 +	130 [127	121 \pm	131 6]	11 12	13 \pm	12 1]	22 20	21 \pm	16 3]	30 26	25 \pm	23 4]	8 10	10 \pm	12 2]
	800 +	127* [129	134* \pm	127* 4]	9 11	10 \pm	13 2]	18 20	21 \pm	20 2]	24 27	31 \pm	26 4]	7 9	11 \pm	9 2]
	2000 +	131* [125	121* \pm	124* 5]	10 9	7 \pm	11 2]	19 20	19 \pm	21 1]	26 28	28 \pm	30 2]	5* 4	5* \pm	3* 1]
	5000 +	127* [132	135* \pm	134* 4]	13 15	15 \pm	16 2]	14 16	19 \pm	14 3]	27 26	26 \pm	24 2]	6* 6	7* \pm	6* 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 per plate		1253 [1225	1177 \pm	1246 42]	394 389	406 \pm	367 20]	730 762	795 \pm	760 33]	332 342	371 \pm	324 25]	210 205	192 \pm	213 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 [114	119 \pm	109 5]	14 [16	18 \pm	17 2]	31 [28	31 \pm	22 5]	19 [21	26 \pm	19 4]	7 [8	7 \pm	9 1]
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.610	121 [122	121 \pm	123 1]										6 [6	5 \pm	6 1]
4,4'-diamino diphenylmethane	1.22	107 [105	99 \pm	109 5]										13 [9	8 \pm	7 3]
	2.44	112 [111	113 \pm	108 3]	13 [12	13 \pm	11 1]				24 [20	18 \pm	19 3]	9 [11	9 \pm	14 3]
	4.88	109 [103	97 \pm	104 6]	12 [14	16 \pm	13 2]				30 [22	16 \pm	20 7]	6 [8	6 \pm	11 3]
	9.77	84 [92	93 \pm	99 8]	8 [8	7 \pm	8 1]				18 [20	25 \pm	18 4]	8 [10	12 \pm	9 2]
	19.5	106* [91	80* \pm	87* 13]	10 [12	14 \pm	11 2]	22 [25	27 \pm	27 3]	22 [21	22 \pm	19 2]	5* [5	6* \pm	5* 1]
	39.1	70* [71	68* \pm	75* 4]	9* [8	9* \pm	5* 2]	34 [26	23 \pm	21 7]	18* [18	19* \pm	17* 1]	7* [5	4* \pm	3* 2]
	78.1 +				14* [14	17* \pm	10* 4]	26 [24	23 \pm	23 2]	20* [21	20* \pm	24* 2]			
	156 +							20 [20	23 \pm	18 3]						
	313 +							20 [21	25 \pm	18 4]						
	625 +							36* [31	30* \pm	26* 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	1490	1290	1320	468	504	469	833	876	909	499	438	514	236	194	187	
per plate	[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 [102	111 \pm	96 8]	17 [17	15 \pm	20 3]	19 [19	20 \pm	19 1]	13 [13	10 \pm	16 3]
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.781	82 [89	90 \pm	96 7]							7 [9	10 \pm	10 2]
4,4'-diamino diphenylmethane	1.56	113 [105	92 \pm	111 12]	13 [13	14 \pm	11 2]	28 [25	26 \pm	20 4]	16 [14	15 \pm	12 2]
	3.13	101 [104	98 \pm	112 7]	11 [10	8 \pm	10 2]	22 [20	23 \pm	16 4]	11 [12	10 \pm	15 3]
	6.25	88 [99	93 \pm	117 16]	12 [14	16 \pm	15 2]	22 [20	20 \pm	18 2]	11 [10	12 \pm	8 2]
	12.5	83 [85	76 \pm	96 10]	9 [7	6 \pm	7 2]	20 [19	20 \pm	16 2]	10 [7	6 \pm	5 3]
	25.0	82* [82	84* \pm	79* 3]	9 [9	12 \pm	5 4]	14 [15	18 \pm	14 2]	9* [7	5* \pm	7* 2]
	50.0				8* [8	9* \pm	6* 2]	15* [18	22* \pm	16* 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 per plate		549 [538	553 \pm	511 23]	610 [640	636 \pm	674 32]	647 [622	614 \pm	606 22]	428 [434	452 \pm	423 16]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaN₃: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)
* : 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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^{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	[82.7]	2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	79.0	[82.9]
		87.3				86.7	
	52.5	104.5	[98.1]		52.5	91.4	[88.5]
		91.6				85.5	
	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.

要 約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン0 (媒体の0.5 w/v%メチルセルロース溶液のみ投与, 対照群), 100, 300 および1,000 mg/kg/day を Cri: CD(SD) 系ラットの雌雄各5匹に28日間反復経口投与した。また、対照群および1,000 mg/kg には、雌雄各5匹の回復群を設け、28日間の反復投与終了後、14日間の休薬による毒性の回復性についても検討した。

試験期間を通じて一般状態の観察、機能観察総合検査 (FOB)、体重および摂餌量の測定を行い、投与期間および回復期間終了時に臨床検査 (血液学検査, 血液凝固能検査, 血液生化学検査, 血清蛋白電気泳動検査および尿検査) および病理学検査 (器官重量測定, 肉眼観察および病理組織学検査) を実施した。

その結果は、次の通りである。

雄の対照群で Day 41 (回復期間13日目) に1例の死亡が認められ、病理所見から死因は持続性の腸閉塞およびこれに伴った全身状態の悪化によるものと考えられた。

一般状態、体重および摂餌量に被験物質投与の影響は認められず、詳細な症状観察、反応性検査、握力および自発運動量にも変化は認められなかった。

血液学検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

血液凝固能検査では、毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

血液生化学検査では、雄の300 および1,000 mg/kg 群で総蛋白が低下し、雌の1,000 mg/kg 群で中性脂肪が上昇した。

血清蛋白電気泳動検査では、雄の300 および1,000 mg/kg 群で α_1 グロブリン分画が低下した。

尿検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学検査では、雌の1,000 mg/kg 群で肝臓相対重量の増加が認められ、対応する所見として、病理組織学的に肝臓の小葉中心帯肝細胞肥大が雌雄の300 および1,000 mg/kg 群で認められた。

以上、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反復経口投与に起因する毒性変化が、雌雄ともに300 mg/kg/day 以上の投与で認められたことから、無毒性量は、雌雄とも100 mg/kg/day と判断された。また、被験物質投与群で認められた変化は、いずれも14日間の休薬により回復性が認められた。

および腹部膨満を示して回復期間 13 日に死亡したが、この動物は対照群の動物であり、被験物質投与とは関係がない偶発的な異常と判断された。したがって、この動物の投与 25 日以降のデータを対照群のデータとして適切ではないと判断し、統計解析あるいは評価の対象から除外した。

15. 試験結果

15.1. 死亡および一般状態 (Table 1, Appendix 1)

雄の対照群で Day 41 (回復期間 13 日目) に 1 例 (動物番号 1010) の死亡が認められた。死亡した動物には、Day 28 から消瘦、Day 36 から腹部膨満が観察されていた。その他の動物では、投与および回復期間を通じて死亡および一般状態の変化は認められなかった。

15.2. 体重 (Figure 1~2, Table 2, Appendix 2)

雄では投与および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与各群との間の体重に有意差は認められなかった。

雌の 1,000 mg/kg 群で投与 42 日に体重の有意な低下が認められたが、投与期間中に変動は認められず、むしろ回復試験用の対照群の体重が一時的に高かったことによるものと考えられた。

15.3. 摂餌量 (Figure 3~4, Table 3, Appendix 3)

雌雄ともに投与および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与各群との間の摂餌量に有意差は認められなかった。

15.4. 機能観察総合検査 (FOB)

15.4.1. 詳細な症状観察 (Table 4, 5, 6, Appendix 4, 5, 6)

投与期間中および回復期間中の観察において、雌雄ともに被験物質投与に起因する変化は認められなかった。また、排糞数および排尿数にも、対照群と被験物質投与各群との間に有意差は認められなかった。なお、回復期間中に死亡した対照群の 1 例に筋緊張の低下が投与 4 週目および回復 1 週目に、被毛粗剛が回復 1 週目に観察された。

15.4.2. 反応性検査 (Table 4, Appendix 4)

投与 4 週目および回復 2 週目に実施した反応性検査において、雌雄ともに被験物質投与に起因する異常反応は認められなかった。

投与 4 週目の反応性検査では、触覚反応検査で「鳴いたり、活発に反応」が 100 mg/kg 群の雄で 1 例に、痛覚反応検査で「刺激から逃げようと前方に歩く」が 300 mg/kg 群の雄で 1 例に認められたが、これらは、対照群でもみられている反応であり、同用量の雌には認められていない反応であることから、被験物質とは関連性のない偶発的な変化と

考えられた。

回復2週目の反応性検査では、痛覚反応検査で「身を固くする」が1,000 mg/kg 群の雄で1例に認められたが、投与4週目に同じ反応は認められておらず、同用量の雌には認められない反応であることから、被験物質とは関連性のない偶発的な変化と考えられた。

15.4.3. 握力（前後肢）（Table 7, Appendix 7）

雌雄とも、投与4週目および回復2週目のいずれの検査においても、対照群と被験物質投与各群との間で前肢および後肢の握力に差は認められなかった。

15.4.4. 自発運動量（Table 8, Appendix 8）

雄では、投与4週目および回復2週目のいずれの検査においても、対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、投与4週目の検査において、100, 300 および 1,000 mg/kg 群で測定開始後10～20分の自発運動量が、100 mg/kg 群ではさらに測定開始後40～50分の自発運動量がそれぞれ有意な高値を示したが、いずれも一過性の変化であり、1時間の総運動量には、群による差は認められなかった。回復2週目の検査では、対照群と1,000 mg/kg 群との間で差は認められなかった。

15.5. 臨床検査

15.5.1. 血液学検査

15.5.1.1. 投与期間終了時（Table 9-1, Appendix 9-1）

雄では、いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で白血球数が有意に増加したが、1例（動物番号2304）が異常高値を示したことによる変化であった。また、100 mg/kg 群でMCVが有意に低下したが、雄では認められず、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.5.1.2. 回復期間終了時（Table 9-2, Appendix 9-2）

雄では、1,000 mg/kg 群で好中球数の有意な低下が認められた。

雌では、1,000 mg/kg 群で網赤血球率の有意な増加が認められた。

15.5.2. 血液凝固能検査

15.5.2.1. 投与期間終了時（Table 10-1, Appendix 10-1）

雌雄ともにいずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

15.5.2.2. 回復期間終了時 (Table 10-2, Appendix 10-2)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群でPTが有意に短縮した。

15.5.2.3. 血液生化学検査

15.5.2.4. 投与期間終了時 (Table 11-1, Appendix 11-1)

雄では、300 および 1,000 mg/kg 群で総蛋白の有意な減少、1,000 mg/kg 群でカリウムの有意な増加が認められた。また、100 mg/kg 群でナトリウム、カリウムおよび塩素が有意に増加したが、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で中性脂肪が有意に上昇した。

15.5.2.5. 回復期間終了時 (Table 11-2, Appendix 11-2)

雌雄ともにいずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

15.5.3. 血清蛋白電気泳動検査

15.5.3.1. 投与期間終了時 (Table 12-1, Appendix 12-1)

雄では、300 および 1,000 mg/kg 群で α_1 グロブリン分画比率および濃度が有意に低下した。

雌では、300 mg/kg 群で α_2 グロブリン分画比率および濃度が有意に増加したが、用量依存性のない変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.5.3.2. 回復期間終了時 (Table 12-2, Appendix 12-2)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で α_2 グロブリン分画濃度が有意に増加したが、軽微な変化であり、毒性学的意義は低いと判断した。

15.5.4. 尿検査

15.5.4.1. 投与期間終了時 (Table 13-1, Appendix 13-1)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、100 mg/kg 群でナトリウム、カリウムおよび塩素総排泄量の有意な減少、300 mg/kg 群でナトリウム総排泄量の有意な減少、1,000 mg/kg 群でカリウムおよび塩素総排泄量の有意な減少が認められた。

15.5.4.2. 回復期間終了時 (Table 13-2, Appendix 13-2)

雄では、1,000 mg/kg 群で浸透圧が有意に低下したが、同群の有意ではない尿量の増加に伴った変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。また、ナトリウム、カリウムおよび塩素濃度が有意に減少したが、総排泄量に変化は認められないことから、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に差は認められなかった。

15.6. 病理学検査

15.6.1. 器官重量

15.6.1.1. 投与期間終了時 (Table 14-1, 15-1, Appendix 14-1, 15-1)

雄では、いずれの測定器官においても対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で肝臓の相対重量の有意な増加および絶対重量の増加傾向が認められた。また、100 および 300 mg/kg 群で脾臓の絶対および相対重量の有意な低下が、100 mg/kg 群で卵巣の絶対重量の有意な低下が認められたが、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.6.1.2. 回復期間終了時 (Table 14-2, 15-2, Appendix 14-2, 15-2)

雄では、いずれの測定器官においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で心臓および卵巣の相対重量の有意な増加が認められたが、同群での偶発的な低体重に起因した変化と考えられ、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.6.2. 剖検所見

15.6.2.1. 投与期間終了時 (Table 16-1, Appendix 16)

被験物質投与群において、対照群に比し発生数が明らかに増減した所見は認められなかった。被験物質投与群で認められた所見は、いずれも単発性あるいは散発性の発生であり、また、ラットにしばしば自然発生する所見であることから、被験物質投与による変化とは考えられなかった。

15.6.2.2. 回復期間終了時 (Table 16-2, Appendix 16)

対照群および 1,000 mg/kg 群で観察された所見は、いずれも単発性の発生であり、自然発生性の変化と考えられた。

15.6.2.3. 死亡動物 (Appendix 16)

回復期間中に死亡した対照群の 1 例 (動物番号 1010) では、回腸の閉塞、空腸および回腸の内腔拡張、膀胱の赤色斑、脾臓の小型化、胸腺の萎縮、精囊の萎縮および全身の削瘦が認められた。

15.6.3. 組織所見

15.6.3.1. 投与期間終了時 (Table 17-1, Appendix 17)

被験物質投与の関与が疑われた変化が肝臓に認められた。

肝臓では、小葉中心帯肝細胞肥大 (Photo. 1, 2) が雌雄の 300 および 1,000 mg/kg 群に認められ、雌雄ともに 1,000 mg/kg 群で発生数が有意に増加した。肝細胞肥大は、細胞質の好酸性化を伴っていた。なお、肝細胞巣状壊死が、雄の 1,000 mg/kg 群に 1 例発生した。

その他、散発的に軽度の変化が対照群を含めた各群に観察されたが、用量に関連した発生数の増減も認められず、いずれも自然発生病変と考えられた。

15.6.3.2. 回復期間終了時 (Table 17-2, Appendix 17)

投与期間終了時に、雌雄の 300 および 1,000 mg/kg 群に認められた肝細胞の肥大および巣状壊死は観察されなかった。

その他、散発的に軽度の変化が対照群および 1,000 mg/kg 群に観察されたが、その種類および発生数からいずれも自然発生病変と考えられた。

15.6.3.3. 死亡動物 (Appendix 17)

回復期間中に死亡した対照群の 1 例 (動物番号 1010) では、空腸および回腸の内腔拡張、漿膜のうっ血、水腫および単核細胞浸潤、筋層の肥大、回腸の閉塞、潰瘍、漿膜の線維化および出血がみられ、死亡の主因と考えられた。その他、骨髄のうっ血および重度の造血低下、脾臓および胸腺における重度の萎縮、リンパ節の赤血球貪食像および洞組織球症、肺の泡沫細胞集簇、肝臓の肝細胞巣状壊死、腎臓の尿細管好塩基化、膀胱の出血、前立腺および精囊の萎縮、皮膚の浮腫が観察され、二次的な一般状態の悪化と栄養障害が推察された。死因は持続性の腸閉塞であると判断した。