

## <その5> 特定芳香族アミン5種による細胞形質転換活性の検討

研究協力者 清水 碧、大森 清美 神奈川県衛生研究所

### A. 研究目的

アゾ色素は全色素の60~70%を占める一般的な色素であり、種類が豊富で安価であることから、繊維製品や革製品、おもちゃ、食品等に広く使用されている。アゾ色素は、皮膚表面や腸内の細菌、肝臓等で還元分解され、アミンを生成する。そのうち、コンゴレッドやスーダンレッド等一部のアゾ色素は、発がん性またはそのおそれが指摘されている特定芳香族アミンを生成する可能性がある。アゾ色素には、溶媒に溶ける性質をもつ「アゾ染料」と、溶けずに固体の粒子として分散している「アゾ顔料」がある。欧州、中国、韓国等の諸外国では、皮膚と長時間接触する繊維製品に特定芳香族アミンを生成しうるアゾ染料の使用を規制しており、わが国においても、24種の特定芳香族アミンを容易に生成するアゾ染料が、繊維製品や革製品等の家庭用品に対する法規制<sup>1)</sup>の対象として平成28年4月1日から追加されることとなった<sup>2) 3)</sup>。対象の特定芳香族アミンのうち、4-aminobiphenyl、benzidine、2-naphtylamine、4,4'-methylenbis(2-chloroaniline)、*o*-toluidineの5種は、International Agency for Research on Cancer (IARC; 国際がん研究機関)による発がん性リスク評価でグループ1に分類され、ヒトに対して発がん性があるとされている。

器具・容器包装において、わが国で使用が認められるのは食品衛生法施行規則で食品添加物として指定されている着色料であり<sup>4)</sup>、特定芳香族アミンを容易に生成するアゾ色素の使用は認められていない。しかし、着色料が溶出または浸出して食品に混和するおそれのないように加工されている場合の制限はなく、アゾ色素の汎用性を考慮するとその有害性を評価

することは重要である。

化学物質の発がん性を予測する試験として、安全性評価試験の国際標準であるOECDテストガイドラインでは細菌復帰突然変異試験(Ames試験)や染色体異常試験等の遺伝毒性試験が示されているが、これらの試験法では検出できない発がん性物質(非遺伝毒性発がん物質)の存在が問題視されており、その多くは発がんプロモーターであると予測されている。当所ではこれまでにBhas 42細胞を用いた発がんプロモーション試験法を開発し<sup>5)</sup>、非遺伝毒性発がん物質を検出すべく「Bhas 42細胞形質転換試験法」を確立した<sup>6)</sup>。後に発がんイニシエーション試験法が追加され<sup>7)</sup>、当試験法は平成27年にOECDガイダンスドキュメントとして承認され、同28年に掲載された<sup>8)</sup>。

特定芳香族アミンのうち3化合物については、既にこのBhas 42細胞形質転換試験法を用いた評価がなされており、2,4-diaminotoluene(Cas No. 95-80-7)はイニシエーション活性が、2-naphtylamine(Cas No. 91-59-8)及び*o*-toluidine(Cas No. 95-53-4)はプロモーション活性が認められている<sup>9)</sup>。本研究では、*in vitro*発がんプロモーション試験として唯一のOECDガイダンスドキュメントであるBhas 42細胞形質転換試験法を用いて、特定芳香族アミンの発がんプロモーション活性の有無について検討するとともに、発がんイニシエーション活性の有無を既報の遺伝毒性試験結果と比較した。

### B. 研究方法

#### 1. 被験物質

発がん毒性の有無を評価する観点から、特定芳香族アミンのうち、IARCでグループ2B(ヒ

トに対して発がん性の可能性がある)に分類され、かつ IARC でグループ 1 に分類される benzidine に構造の類似する化学物質を中心に、5 種を選択し対象とした(表 1)。

No. A, C : >98.0%、東京化成工業(株)

No. B : 99.9%、シグマアルドリッチジャパン 合同会社 (SUPELCO)

No. D : >95.0%、東京化成工業(株)

No. E : 一級、>98.0%、和光純薬工業(株)

## 2 . 陽性対照物質

プロモーション試験の陽性対照物質として 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate (TPA ; Cas No. 16561-29-8) : 和光純薬工業(株)、20 及び 50 ng/mL を、イニシエーション試験の陽性対照物質として 3-Methylcholanthrene( MCA ; Cas No. 56-49-5) : 和光純薬工業(株)、1 µg/mL を用いた。

## 3 . 試薬および試液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) 培地 : サーマフィッシャーサイ エンティフィック(株) (Gibco)

ウシ胎児血清 (FBS) : (株)ニチレイバイオサイ エンス

DF5F 培地 : DMEM/F12 培地に FBS を 5%と なるように加えた。

dimethyl sulfoxide (DMSO) : Bio Reagent、 99.9%、シグマアルドリッチジャパン 合同会社

ホルマリン : ホルムアルデヒド液 (37%) 特級、和光純薬工業(株)

メタノール : 特級、和光純薬工業(株)

クリスタルバイオレット : 和光純薬工業(株)

0.1%クリスタルバイオレット染色液 : クリス タルバイオレット 1.0 g をエタノール 50 mL に 溶かし、水を加えて 1000 mL とした。

クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 : 特級、和光 純薬工業(株)

エタノール : 特級、和光純薬工業(株)

色素抽出液 : クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 18 g に水 600 mL を加えて溶かし、0.1 mol/L 塩 酸 100 mL 及びエタノール 1000 mL を加えた。

ギムザ染色液 : メルク(株)

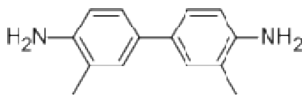
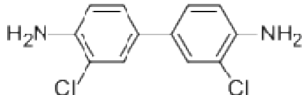
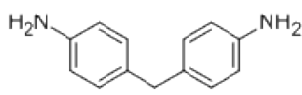
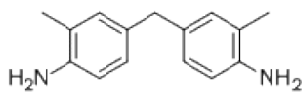
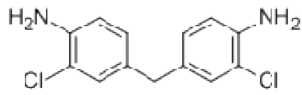
5%ギムザ染色液 : ギムザ染色液 25 mL に水 を加えて 500 mL とした。

## 4 . 器具及び装置

クリーンベンチ NS-13BS : 十慈フィールド(株)

CO<sub>2</sub> インキュベータ BNA-111 : エスペック(株)

表 1 被験物質とした特定芳香族アミン5種

| No. | 化学物質名 (政令 <sup>2)</sup> における名称)                                            | Cas No.  | 構造式                                                                                  | IARC分類 |
|-----|----------------------------------------------------------------------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A   | 3,3'-dimethylbenzidine<br>(3,3'-ジメチルベンジジン (別名オルト-トリジン))                    | 119-93-7 |  | 2B     |
| B   | 3,3'-dichlorobenzidine<br>(3,3'-ジクロロベンジジン)                                 | 91-94-1  |  | 2B     |
| C   | 4,4'-diaminodiphenylmethane<br>(4,4'-メチレンジアニリン)                            | 101-77-9 |  | 2B     |
| D   | 3,3'-dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane<br>(4,4'-ジアミノ-3,3'-ジメチルジフェニルメタン) | 838-88-0 |  | 2B     |
| E   | 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)<br>(3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン)        | 101-14-4 |  | 1      |

コーンカウンター Z1：ベックマンコーンカウンター(株)

iMark マイクロプレートリーダー：バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)

実体顕微鏡 SZX9：オリンパス(株)

## 5. 被験物質を含む培地の調製

培地中の DMSO 濃度を 0.1%以下とするため、被験物質を最終濃度の 1000 倍濃度となるよう DMSO に溶解し、0.03 ~ 300 mg/mL (濃度は試験及び被験物質により異なる) の溶液を調製した。これらを DF5F 培地に添加して 1000 倍希釈し、最終濃度 0.03 ~ 300 µg/mL の被験物質を含む培地を調製し、試験に用いた。また、溶媒対照群として被験物質を含まない (DMSO のみ 0.1%含む) 培地を調製した。

## 6. 濃度設定試験

### 1) プロモーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を経て、対数増殖期 (細胞密度 60 ~ 70%) にある Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて  $7 \times 10^3$  cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 0.5 mL ずつ 24 ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日目とし、4 日目に被験物質 (0.1 ~ 100 µg/mL) を含む培地に交換 (1 濃度群あたり 3 ウェル: n=3) し、7 日目にホルマリンで固定した。0.1% クリスタルバイオレット染色液で染色した後、色素を抽出し、各抽出液の波長 570 nm における吸光度を測定した。

### 2) 相対的細胞生存率

溶媒対照群の吸光度を 100%とし、被験物質の各濃度群における吸光度の比率 (%) を算出した。

## 3) 被験物質の濃度設定

相対的細胞生存率の算出結果から、被験物質を、ア. 溶媒対照群と比較して相対的細胞生存率が 120%以上に増加した物質、イ. 狭い濃度範囲で細胞増殖を抑制する物質、ウ. その他の物質 (弱い増殖抑制作用が認められる、または増殖抑制・促進のいずれも認められない物質) の 3 つに分類し、形質転換試験に用いる濃度を設定した。

## 7. 細胞毒性試験

### 1) プロモーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を経て、対数増殖期 (細胞密度 60 ~ 70%) にある Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて  $7 \times 10^3$  cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6 ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日目とし、4 日目に被験物質を含む培地に交換 (n=3) し、7 日目にホルマリンで固定した。0.1% クリスタルバイオレット染色液で染色した後、色素を抽出し、各抽出液の波長 570 nm における吸光度を測定した。

### 2) イニシエーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を経て、対数増殖期 (細胞密度 60 ~ 70%) にある Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて  $2 \times 10^3$  cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6 ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日目とし、1 日目に被験物質を含む培地に交換 (n=3) し、4 日目に DF5F 培地に交換し、7 日目にホルマリンで固定した。0.1% クリスタルバイオレット染色液で染色した後、色素を抽出し、各抽出液の波長 570 nm における吸光度を測定した。

### 3) 相対的細胞生存率

溶媒対照群の吸光度を 100%とし、被験物質の各濃度群における吸光度の比率(%)を算出した。

## 8. 形質転換試験

### 1) プロモーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を経て、対数増殖期(細胞密度 60~70%)にある Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて  $7 \times 10^3$  cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6 ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日目とし、4、7、11 日目に被験物質を含む培地に交換(1 濃度群あたり 6 ウェル:  $n=6$ )し、14 日目に DF5F 培地に交換し、21 日目にメタノールで固定及び 5%ギムザ染色液で染色を行った。

### 2) イニシエーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を経て、対数増殖期(細胞密度 60~70%)にある Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて  $2 \times 10^3$  cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6 ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日目とし、1 日目に被験物質を含む培地に交換し、4、7、11、14 日目に DF5F 培地に交換( $n=6$ )し、21 日目にメタノールで固定及び 5%ギムザ染色液で染色を行った。

### 3) 形質転換フォーカス数の計数

形質転換頻度の指標として、実体顕微鏡を用いて細胞を観察し、以下の(1)~(6)の基準に合致するものを「形質転換フォーカス」と判断し、ウェルごとに計数した。(1)細胞数が 100 個以上、(2)細胞が紡錘形をなして周囲の細胞とは異なる細胞形態を示す(spindle-shaped)、(3)細胞質がギムザ染色液により強く染まっ

ている(basophilic)、(4)細胞がランダムな配列で互いに交差している(crisscross)、(5)積み重なりあった細胞の増殖(pilling-up)、(6)周囲の単層細胞への浸潤性の増殖

### 4) 結果の判定

1 ウェルあたりの形質転換フォーカス数〔個/ウェル〕を定量単位とし、統計解析を行った。統計解析及び結果の判定は OECD テストガイドンスドキュメント<sup>8)</sup>に従った。各被験物質について、濃度群ごとに溶媒対照群に対する Dunnett 検定を行い、片側  $p < 0.05$  の場合を有意差ありとした。Dunnett 検定により 1 濃度群のみで有意差ありと判定された場合、Jonckheere 傾向検定を行った。それにより、(1)溶媒対照群と比較して連続する 2 濃度以上で有意に形質転換フォーカス数が増加した場合または(2)溶媒対照群と比較して 1 濃度のみで有意に形質転換フォーカス数が増加し、傾向検定で増加傾向が認められた場合の 2 つのうちいずれかを満たす場合、その被験物質を陽性と判定した。溶媒対照群と比較していずれの濃度においても有意な形質転換フォーカス数の増加が認められない場合、その被験物質を陰性と判定し、陽性にも陰性にも含まれない場合を擬陽性とした。

陽性対照群の統計解析には F 検定による等分散性の判定に応じ、Student t 検定または Welch 検定を用い、統計的に有意差があった場合に試験が妥当に遂行されたと判断した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. プロモーション試験

#### 1) 濃度設定試験

特定芳香族アミン 5 種について、プロモーション試験のための濃度設定試験を実施した。その結果、被験物質 C 及び D は、0.1~100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲において細胞増殖への影響は認め

られなかった。被験物質 A は 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の濃度では影響が認められなかったが、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では相対的細胞生存率が 50%未満に低下した。被験物質 B は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の濃度では影響は認められなかったが、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で約 50%、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で約 40%に低下した。被験物質 E は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の濃度では影響が認められなかったが、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では約 70%、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では約 10%に低下した。B . 6 . 3 ) でア ( 溶媒対照群と比較して相対的細胞生存率が 120%以上に増加する ) に分類される被験物質はなかった。被験物質 A、B 及び E は、イ ( 狭い濃度範囲で細胞増殖を抑制する物質 ) に分類され、A 及び B は 50%抑制濃度 ( inhibitory concentration ; IC ) 50 と IC90 の間にある 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高濃度とし、E は IC50 と IC90 の間にあると予測される 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高濃度として形質転換試験を実施した。被験物質 C 及び D はウ ( いずれにも該当しない物質 ) に分類され、C は 0.1%DMSO 溶液への溶解度から最高濃度を変更せず 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、D は 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高濃度として形質転換試験を実施した。

## 2 ) 細胞毒性試験及び形質転換試験

特定芳香族アミン 5 種について、はじめに濃度設定試験の結果から決定した濃度でプロモーション試験を行った。その結果、被験物質 A 及び B については最高濃度とした 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度群で、E については 30 及び 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度群で、濃度設定試験と同程度の細胞増殖抑制が認められ、これらの濃度群においてはいずれのウェルでも形質転換フォーカスの形成が認められなかった。被験物質 D の細胞毒性試験では、最高濃度の 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度群でも細胞増殖抑制は認められなかった。そこで、被験物質ごとに濃度範囲を最適化し、被験物質 A は 1 ~ 3000  $\text{ng}/\text{mL}$ 、B は 0.03 ~ 3000  $\text{ng}/\text{mL}$ 、C は 1 ~ 10000  $\text{ng}/\text{mL}$ 、D は 1 ~ 30000  $\text{ng}/\text{mL}$ 、E は 0.03 ~ 100

$\text{ng}/\text{mL}$  の濃度範囲で公比 10 または  $10^{1/2}$  の 7 ~ 9 濃度群により再度細胞毒性試験及び形質転換試験を実施した ( 図 1 )。

細胞毒性試験の結果、被験物質 A、C、D 及び E は試験した濃度域において明らかな相対的細胞生存率の増加または減少は認められなかった。被験物質 B は 1000  $\text{ng}/\text{mL}$  濃度群で約 80%、3000  $\text{ng}/\text{mL}$  濃度群で約 70%に相対的細胞生存率が低下し、細胞増殖抑制が認められた。

形質転換試験の結果、被験物質 A は 300 ~ 3000  $\text{ng}/\text{mL}$  の連続する 3 濃度群において溶媒対照群と比較して形質転換フォーカス数が有意に増加し、プロモーション活性陽性と判定された。被験物質 B は 0.03 及び 0.1  $\text{ng}/\text{mL}$  の連続する 2 濃度群において溶媒対照群と比較して形質転換フォーカス数が有意に増加し、さらに 1000  $\text{ng}/\text{mL}$  濃度群でも有意に増加した。本試験を行う前に 0.1 ~ 3000  $\text{ng}/\text{mL}$  の濃度範囲で同試験を実施した際にも、0.1 及び 1000  $\text{ng}/\text{mL}$  の 2 濃度において形質転換フォーカス数の有意な増加が認められ、濃度依存性はないものの、これら 2 濃度についての結果の再現性が得られた。これらのことから、被験物質 B はプロモーション活性陽性と判定した。被験物質 C、D 及び E は、いずれの濃度群においても形質転換フォーカス数の有意な増加は認められず、プロモーション活性陰性と判定した。

陽性対照試験においては、いずれの濃度においても有意な形質転換フォーカス数の増加が認められ、妥当な結果が得られた。

## 3 . イニシエーション試験

特定芳香族アミン 5 種について、0.1 ~ 10000  $\text{ng}/\text{mL}$  の濃度範囲で 6 ~ 8 濃度群でイニシエーション試験の細胞毒性試験及び形質転換試験を行った ( 図 2 )。

細胞毒性試験の結果、被験物質 A の 10000  $\text{ng}/\text{mL}$  濃度群において相対的細胞生存率が溶媒

対照群の約 80%に減少し、被験物質 B 及び E は高濃度群で細胞毒性による相対的細胞生存率の顕著な減少が認められた。試験した濃度域における被験物質 C 及び D による相対的細胞生存率の明らかな増加または減少は認められなかった。

形質転換試験の結果、被験物質 A 及び E はいずれの濃度群においても溶媒対照群と比較して形質転換フォーカス数の有意な増加が認められず、イニシエーション活性陰性と判定した。被験物質 B は、1000 及び 3000 ng/mL の連続する 2 濃度群において形質転換フォーカス数の有意な増加が認められたことから、イニシエーション活性陽性と判定した。細胞毒性試験の結果を照合すると、細胞毒性が発現する濃度で形質転換頻度が増加していた。被験物質 C は、10 ng/mL の 1 濃度群にて溶媒対照群と比較して有意な形質転換フォーカス数の増加が認められ、また、傾向検定においても濃度依存的な増加傾向が認められた。同試験を繰り返し実施し、同様に 10 ng/mL 濃度群において形質転換フォーカス数の有意な増加が認められたことから、イニシエーション活性陽性と判定した。被験物質 D は、1 ng/mL の 1 濃度群で溶媒対照群と比較して有意な形質転換フォーカス数の増加が認められた。しかし、傾向検定による濃度依存性は認められなかったことから、擬陽性と判定した。さらに、同試験を繰り返して実施したが、判定結果は同じであった。

陽性対照試験においては、有意な形質転換フォーカス数の増加が認められ、妥当な結果が得られた。

#### 4. 結果のまとめ

プロモーション試験及びイニシエーション試験における形質転換試験の結果を表 2 に示した。本試験において、被験物質 A (3,3'-dimethylbenzidine) にはプロモーション活性が、

被験物質 B (3,3'-dichlorobenzidine) にはプロモーション活性及びイニシエーション活性が、被験物質 C (4,4'-diaminodiphenylmethane) にはイニシエーション活性が認められた。この被験物質 C については、これまでに動物実験でラット甲状腺のプロモーションを引き起こすという報告<sup>10)</sup>があるが、本試験ではプロモーション活性は認められなかった。今回対象とした 5 種のうち、その他の被験物質についてのプロモーション活性に関する報告はなく、本検討により新たに被験物質 A 及び被験物質 B のプロモーション活性が示唆された。特に被験物質 B は、イニシエーション試験において有意な形質転換フォーカス形成の増加が認められた濃度よりもはるかに低濃度においてプロモーション活性が認められ、発がん性リスク評価でのプロモーション試験の重要性が示唆された。

イニシエーション試験においては、これまでも Ames 試験等の遺伝毒性試験による報告があり、被験物質 A では遺伝毒性が認められず被験物質 B では S9 による代謝活性化を経なくとも遺伝毒性を示すこと<sup>11)</sup>や、被験物質 B による遺伝毒性は S9 による代謝活性化で増強すること<sup>12)</sup>、被験物質 C が遺伝毒性を示すこと<sup>13)</sup>等が報告されている。本試験で陽性と判定された被験物質 B 及び被験物質 C の陽性判定については、Ames 試験の判定結果と概ね合致するものと考えられた。

一方、IARC のリスク評価でグループ 1 に分類される被験物質 E (4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)) は、本試験ではプロモーション活性、イニシエーション活性ともに陰性であり、異なる結果となった。被験物質 E は細胞毒性試験において高濃度域で顕著な細胞毒性が認められ、その濃度域における形質転換活性を評価することができなかったため、そのことが結果に影響した可能性がある。また、被験物質 E は S9 による代謝活性化で遺伝毒性を示すという報

告<sup>13)</sup>があるが、Bhas 42 細胞形質転換試験法では Ames 試験のような代謝活性化後の試験が現状では設定されていないため、このことが IARC のリスク分類とは結果が異なった要因である可能性も考えられた。また、被験物質 D (3,3'-dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane) については、プロモーション活性は認められず、イニシエーション活性についても擬陽性であった。

#### D . 結論

特定芳香族アミン 5 種について、Bhas 42 細胞形質転換試験法により、発がんプロモーション活性及びイニシエーション活性の有無を検討した。その結果、3,3'-dimethylbenzidine にプロモーション活性、3,3'-di-chlorobenzidine にプロモーション活性及びイニシエーション活性、4,4'-diaminodiphenylmethane にイニシエーション活性が認められた。

#### E . 参考文献

- 1) 昭和 48 年 10 月 12 日付法律第 112 号「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」
- 2) 平成 27 年 4 月 8 日付政令第 175 号「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律第 2 条第 2 項の物質を定める政令の一部を改正する政令」；平成 28 年 4 月 1 日施行
- 3) 平成 27 年 7 月 9 日付厚生労働省令第 124 号「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則の一部を改正する省令」；平成 28 年 4 月 1 日施行
- 4) 昭和 34 年 12 月 28 日付厚生省告示第 370 号「食品、添加物等の規格基準」
- 5) Ohmori K, et al. An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells. *Mutat Res.* (2004) 557:191-202
- 6) Ohmori K, et al. An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells. *ATLA.* (2005) 33:619-639
- 7) Asada S, et al. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutat Res.* (2005) 588:7-21
- 8) Series on Testing & Assessment No. 231 GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY. ENV/JM/MONO (2016) 1
- 9) Sakai A, et al. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* (2010) 702:100-122
- 10) Hiasa Y, et al. 4,4'-Diaminodiphenylmethane: promoting effect on the development of thyroid tumors in rats treated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J Natl Cancer Inst.* (1984) 72(2):471-6
- 11) Makena P, et al. Evidence that 4-aminobiphenyl, benzidine, and benzidine congeners produce genotoxicity through reactive oxygen species. *Environ Mol Mutagen.* (2007) 48(5):404-13
- 12) Savard S, et al. Synthesis and mutagenicity of 3,3'-dihalogenated benzidines. *Carcinogenesis.* (1986) 7(7):1239-41
- 13) 高木ら ジアミノフェニルメタンおよびその関連化合物の変異原性 環境化学 (1995) 5(4):841-845

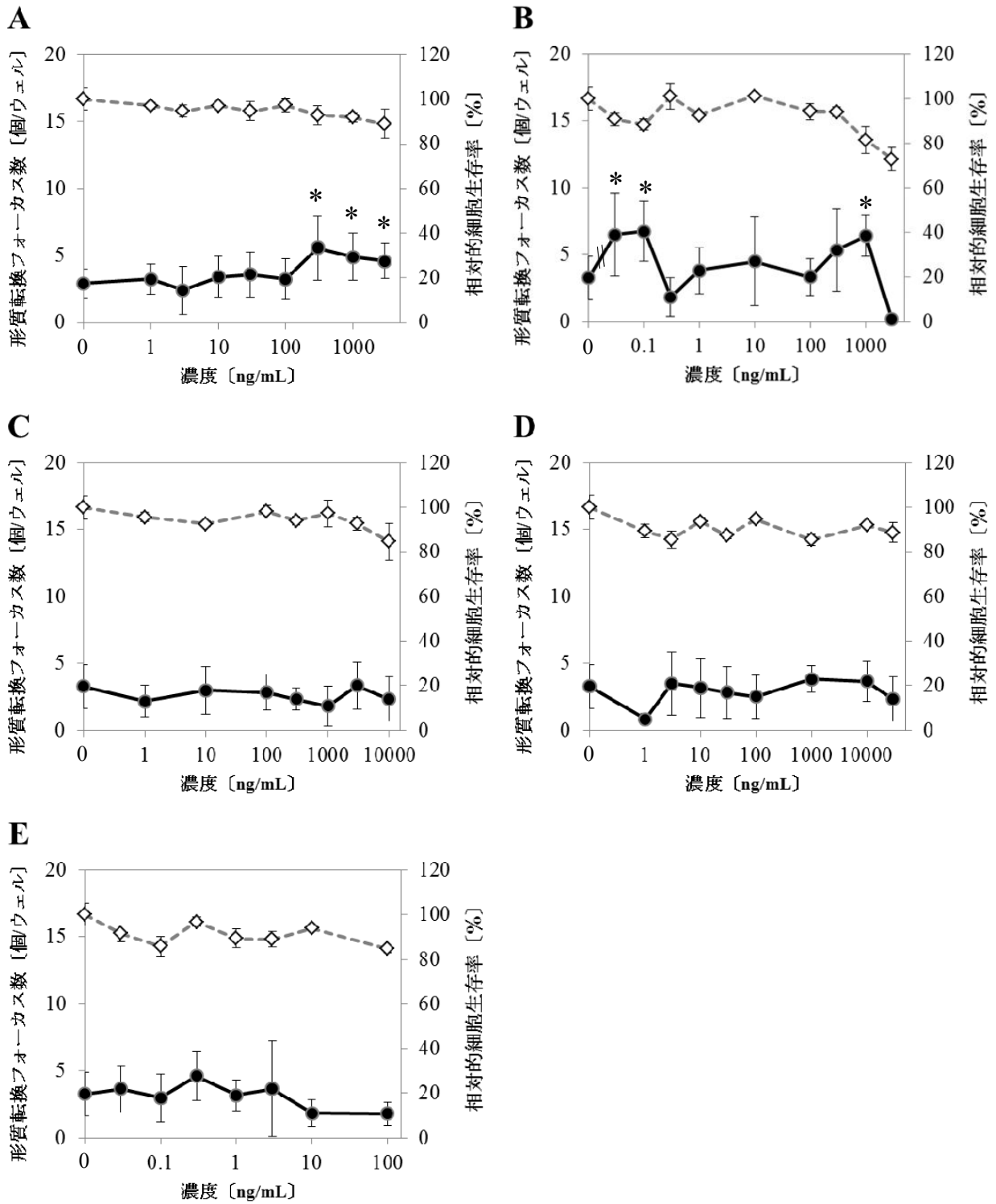


図1 特定芳香族アミン5種によるプロモーション試験における細胞毒性及び形質転換活性  
 A ; 3,3'-dimethylbenzidine、 B ; 3,3'-dichlorobenzidine、 C ; 4,4'-diaminodiphenylmethane、  
 D ; 3,3'-dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane、 E ; 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)

●— 形質転換フォーカス数    -◇- 相対的細胞生存率    \* $p < 0.05$ , Dunnett



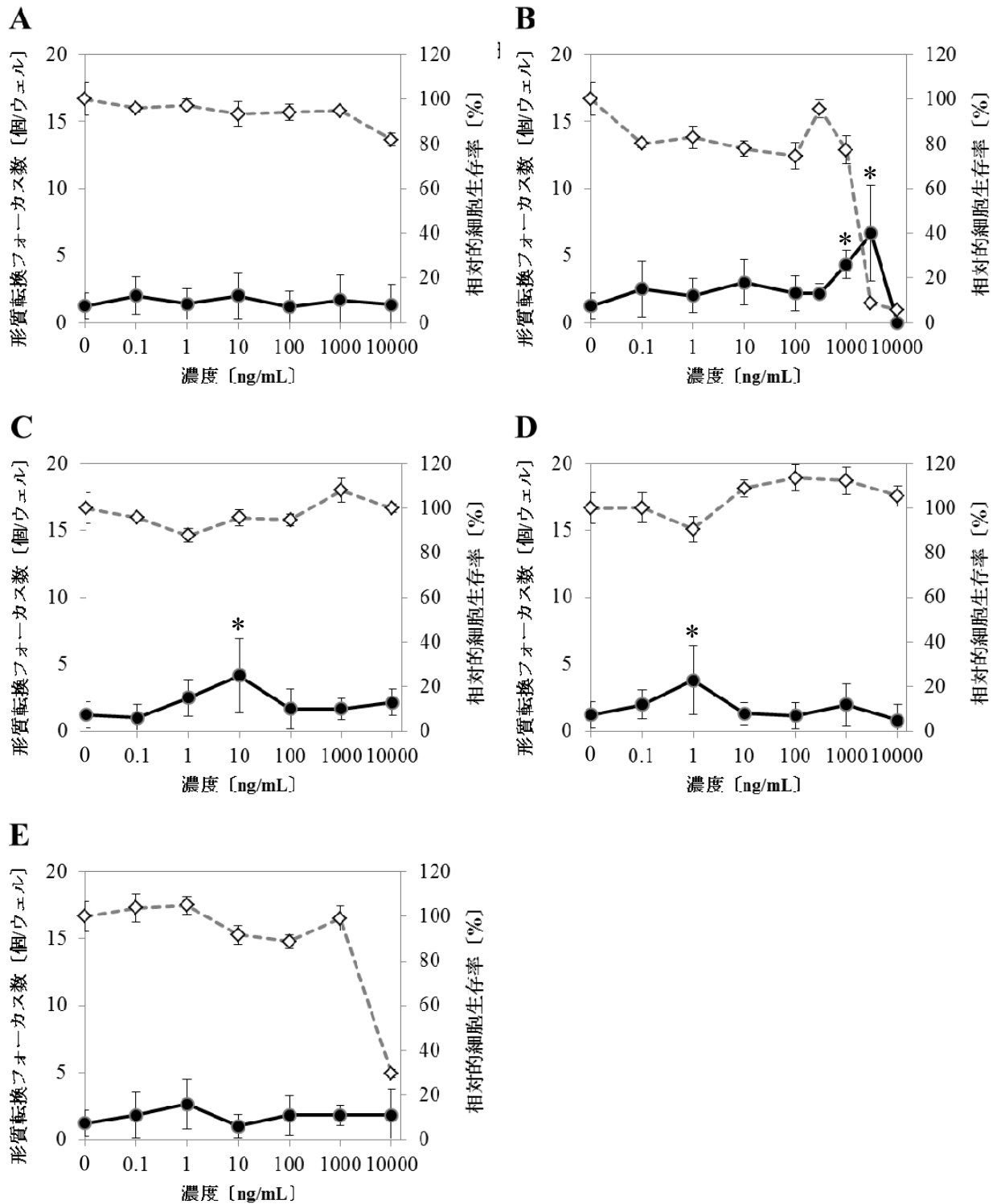


図2 特定芳香族アミン5種によるイニシエーション試験における細胞毒性及び形質転換活性  
 A ; 3,3'-dimethylbenzidine、 B ; 3,3'-dichlorobenzidine、 C ; 4,4'-diaminodiphenylmethane、  
 D ; 3,3'-dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane、 E ; 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)  
 ●— 形質転換フォーカス数    ◇— 相対的細胞生存率    \* $p < 0.05$ , Dunnett

表 2 特定芳香族アミン 5 種による形質転換試験の結果

| No. | 化学物質名                                     | IARC<br>分類 | プロモーション             |    | イニシエーション            |                    |    |
|-----|-------------------------------------------|------------|---------------------|----|---------------------|--------------------|----|
|     |                                           |            | Dunnett<br>検定       | 判定 | Dunnett<br>検定       | Jonckheere<br>傾向検定 | 判定 |
| A   | 3,3'-dimethylbenzidine                    | 2B         | 連続3濃度<br>$p < 0.05$ | +  | $p > 0.05$          | /                  | -  |
| B   | 3,3'-dichlorobenzidine                    | 2B         | 連続2濃度<br>$p < 0.05$ | +  | 連続2濃度<br>$p < 0.05$ | /                  | +  |
| C   | 4,4'-diaminodiphenylmethane               | 2B         | $p > 0.05$          | -  | 1濃度<br>$p < 0.05$   | $p < 0.05$         | +  |
| D   | 3,3'-dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane | 2B         | $p > 0.05$          | -  | 1濃度<br>$p < 0.05$   | $p > 0.05$         | ±  |
| E   | 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)        | 1          | $p > 0.05$          | -  | $p > 0.05$          | /                  | -  |

/ ; 検定対象外、+ ; 陽性、- ; 陰性、± ; 擬陽性