

# メチレンジフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Methylenediphenol on Bacteria

### 要約

メチレンジフェノールについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験は用量範囲をS9 mix無添加試験においてはすべての検定菌で39.1~1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、S9 mix添加試験においてはTA100, TA1535およびTA1537では39.1~1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、TA98では78.1~2500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、WP2 *uvrA*では156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ として実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果からメチレンジフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

### 方法

#### 1. 被験物質

メチレンジフェノールは主に3種の異性体からなり、10  $\phi$  ストランド状(固体)である。用いた被験物質は、ロット番号S980013、純度99.0%、製造 三井化学(株)(愛知)であり、三井化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵、暗所で保管した。本ロットについては、試験期間中安定であることが確認された。

メチレンジフェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:ACL5008, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

#### 2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	(AF2, 和光純薬工業(株))
アジ化ナトリウム	(SA, 和光純薬工業(株))
9-アミノアクリジン	(9AA, Sigma Chem. Co.)
2-アミノアントラセン	(2AA, 和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20  $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

#### 3. 検定菌

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は-80  $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存したのを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid Ltd.)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37  $^{\circ}\text{C}$ で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

#### 4. 培地およびS9 mixの組成

##### 1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

##### 2) トップアガー

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

(A) バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v %
塩化ナトリウム	0.5 w/v %
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L

(C) *Escherichia coli*用

L-トリプトファン

0.5 mmol/L

結果および考察

## 3) S9 mix

S9 mix 1mLあたりの組成は下記のとおりである。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol

\*:7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製したS9(キッコーマン株)を用いた。

## 5. 試験方法

プレインキュベーション法<sup>3)</sup>により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、約45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37°Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により確認した。また、抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

## 6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

50.0~5000  $\mu$ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、S9 mix無添加試験においてはすべての検定菌で1500  $\mu$ g/plate以上で、S9 mix添加試験においてはSalmonellaの4菌株では1500  $\mu$ g/plate以上で、WP2 *uvrA*では5000  $\mu$ g/plateで抗菌性が認められた。また、被験物質に由来する沈澱は、すべての用量で認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験においてはすべての検定菌で1250  $\mu$ g/plate、S9 mix添加試験においてはTA100、TA1535およびTA1537では1250  $\mu$ g/plate、TA98では2500  $\mu$ g/plate、WP2-*uvrA*では5000  $\mu$ g/plateとした。

上記の最高用量に基づいて、公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、メチレンジフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なおメチレンジフェノールは、当研究所で本試験と並行して実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では染色体の構造異常が誘発され、陽性であった<sup>4)</sup>。また、関連物質であるビスフェノールAについては、復帰変異試験で陰性の結果が得られている<sup>5)</sup>。

## 文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp.273-285.
- 4) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 967(2001).
- 5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課, "労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集," 日本化学物質安全・情報センター, 東京, 1996, pp.223-224.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：川上久美子, 原 巧, 須井 哉,  
山本明子, 三枝克彦, 加藤初美  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Kumiko Kawakami, Takumi Hara,  
Hajime Sui, Akiko Yamamoto,  
Katsuhiko Saegusa, Hatsumi Kato  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,  
Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Mutagenicity of methylenediphenol on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	149	148	138	9	14	7	24	27	32	21	14	24	7	6	6
		(145 $\pm$ 6.1)			(10 $\pm$ 3.6)			(28 $\pm$ 4.0)			(20 $\pm$ 5.1)			(6 $\pm$ 0.6)		
	39.1	157	131	125	17	11	11	29	25	16	25	19	19	5	6	9
		(138 $\pm$ 17.0)			(13 $\pm$ 3.5)			(23 $\pm$ 6.7)			(21 $\pm$ 3.5)			(7 $\pm$ 2.1)		
	78.1	152	156	153	20	15	18	37	26	20	18	17	24	5	8	8
		(154 $\pm$ 2.1)			(18 $\pm$ 2.5)			(28 $\pm$ 8.6)			(20 $\pm$ 3.8)			(7 $\pm$ 1.7)		
	156	142	128	136	14	18	16	20	29	28	16	21	31	9	5	5
		(135 $\pm$ 7.0)			(16 $\pm$ 2.0)			(26 $\pm$ 4.9)			(23 $\pm$ 7.6)			(6 $\pm$ 2.3)		
313	144	139	149	13	8	18	22	37	15	18	20	26	6	4	4	
	(144 $\pm$ 5.0)			(13 $\pm$ 5.0)			(25 $\pm$ 11.2)			(21 $\pm$ 4.2)			(5 $\pm$ 1.2)			
625	129	153	142	14	14	18	27	20	17	18	17	14	4	2	12	
	(141 $\pm$ 12.0)			(15 $\pm$ 2.3)			(21 $\pm$ 5.1)			(16 $\pm$ 2.1)			(6 $\pm$ 5.3)			
1250	22*	0*	0*	2*	0*	0*	11*	17*	13*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(7 $\pm$ 12.7)			(1 $\pm$ 1.2)			(14 $\pm$ 3.1)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			
S9 mix (+)	0	110	121	113	9	7	10	34	27	39	20	27	25	11	15	13
		(115 $\pm$ 5.7)			(9 $\pm$ 1.5)			(33 $\pm$ 6.0)			(24 $\pm$ 3.6)			(13 $\pm$ 2.0)		
	39.1	181	168	186	12	14	15	NT			NT			8	19	10
		(178 $\pm$ 9.3)			(14 $\pm$ 1.5)			NT			NT			(12 $\pm$ 5.9)		
	78.1	170	171	155	13	9	11	NT			26	22	39	12	10	13
		(165 $\pm$ 9.0)			(11 $\pm$ 2.0)			NT			(29 $\pm$ 8.9)			(12 $\pm$ 1.5)		
	156	167	154	194	15	8	14	54	38	49	22	31	28	16	4	14
		(172 $\pm$ 20.4)			(12 $\pm$ 3.8)			(47 $\pm$ 8.2)			(27 $\pm$ 4.6)			(11 $\pm$ 6.4)		
313	163	189	182	17	9	10	44	40	32	28	33	23	10	15	17	
	(178 $\pm$ 13.5)			(12 $\pm$ 4.4)			(39 $\pm$ 6.1)			(28 $\pm$ 5.0)			(14 $\pm$ 3.6)			
625	125	148	184	15	9	8	28	41	35	24	21	13	12	17	6	
	(152 $\pm$ 29.7)			(11 $\pm$ 3.8)			(35 $\pm$ 6.5)			(19 $\pm$ 5.7)			(12 $\pm$ 5.5)			
1250	80*	147*	156*	0*	0*	0*	22	20	24	32	21	18	10*	8*	2*	
	(128 $\pm$ 41.5)			(0 $\pm$ 0.0)			(22 $\pm$ 2.0)			(24 $\pm$ 7.4)			(7 $\pm$ 4.2)			
2500	NT			NT			0*	0*	0*	0*	0*	0*	NT			
	NT			NT			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			NT			
5000	NT			NT			0*	0*	0*	NT			NT			
	NT			NT			(0 $\pm$ 0.0)			NT			NT			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	502	501	530	682	632	703	194	239	227	623	601	555	435	335	489
	(511 $\pm$ 16.5)			(672 $\pm$ 36.5)			(220 $\pm$ 23.3)			(593 $\pm$ 34.7)			(420 $\pm$ 78.1)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	814	843	823	474	486	489	1069	1065	1163	435	426	346	341	281	262
	(827 $\pm$ 14.8)			(483 $\pm$ 7.9)			(1099 $\pm$ 55.5)			(402 $\pm$ 49.0)			(295 $\pm$ 41.2)			

The purity of the test substance was 99.0 %.

This substance contained phenol, formaldehyde and acids (oxalic acid and formic acid) as impurities.

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

\*: Growth inhibition was observed.

NT: Not tested

Table 2 Mutagenicity of methylenediphenol on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	122	105	105	9	10	8	33	39	34	25	25	21	7	8	11
		(111 $\pm$ 9.8)			(9 $\pm$ 1.0)			(35 $\pm$ 3.2)			(24 $\pm$ 2.3)			(9 $\pm$ 2.1)		
	39.1	128	104	119	13	14	12	39	33	34	19	16	17	9	5	9
		(117 $\pm$ 12.1)			(13 $\pm$ 1.0)			(35 $\pm$ 3.2)			(17 $\pm$ 1.5)			(8 $\pm$ 2.3)		
	78.1	122	122	150	9	16	13	37	31	53	22	18	25	11	6	9
		(131 $\pm$ 16.2)			(13 $\pm$ 3.5)			(40 $\pm$ 11.4)			(22 $\pm$ 3.5)			(9 $\pm$ 2.5)		
	156	154	119	129	17	13	17	27	30	25	22	25	27	3	7	8
		(134 $\pm$ 18.0)			(16 $\pm$ 2.3)			(27 $\pm$ 2.5)			(25 $\pm$ 2.5)			(6 $\pm$ 2.6)		
313	136	157	142	14	13	14	36	28	17	27	15	26	7	16	8	
	(145 $\pm$ 10.8)			(14 $\pm$ 0.6)			(27 $\pm$ 9.5)			(23 $\pm$ 6.7)			(10 $\pm$ 4.9)			
625	123	140	132	8	10	15	28	24	28	17	20	18	6	6	7	
	(132 $\pm$ 8.5)			(11 $\pm$ 3.6)			(27 $\pm$ 2.3)			(18 $\pm$ 1.5)			(6 $\pm$ 0.6)			
1250	0*	0*	0*	0*	0*	0*	19*	18*	18*	3*	2*	7*	0*	0*	0*	
	(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(18 $\pm$ 0.6)			(4 $\pm$ 2.6)			(0 $\pm$ 0.0)			
S9 mix (+)	0	100	108	104	12	15	14	33	44	35	36	25	37	16	16	15
		(104 $\pm$ 4.0)			(14 $\pm$ 1.5)			(37 $\pm$ 5.9)			(33 $\pm$ 6.7)			(16 $\pm$ 0.6)		
	39.1	167	174	177	7	7	9	NT			NT			13	18	19
		(173 $\pm$ 5.1)			(8 $\pm$ 1.2)									(17 $\pm$ 3.2)		
	78.1	171	188	178	14	10	9	NT			25	46	43	9	18	15
		(179 $\pm$ 8.5)			(11 $\pm$ 2.6)						(38 $\pm$ 11.4)			(14 $\pm$ 4.6)		
	156	157	165	157	13	13	13	48	52	42	25	45	29	16	13	13
		(160 $\pm$ 4.6)			(13 $\pm$ 0.0)			(47 $\pm$ 5.0)			(33 $\pm$ 10.6)			(14 $\pm$ 1.7)		
313	170	204	170	17	19	23	65	46	45	34	32	45	15	16	14	
	(181 $\pm$ 19.6)			(20 $\pm$ 3.1)			(52 $\pm$ 11.3)			(37 $\pm$ 7.0)			(15 $\pm$ 1.0)			
625	159	160	179	7	7	8	46	36	39	39	35	33	15	16	13	
	(166 $\pm$ 11.3)			(7 $\pm$ 0.6)			(40 $\pm$ 5.1)			(36 $\pm$ 3.1)			(15 $\pm$ 1.5)			
1250	107*	107*	80*	8*	6*	5*	17	21	14	18	30	20	5*	6*	10*	
	(98 $\pm$ 15.6)			(6 $\pm$ 1.5)			(17 $\pm$ 3.5)			(23 $\pm$ 6.4)			(7 $\pm$ 2.6)			
2500	NT			NT			0*	0*	0*	0*	0*	0*	NT			
							(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)						
5000	NT			NT			0*	0*	0*	NT			NT			
							(0 $\pm$ 0.0)									
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	480	437	551	742	672	681	200	199	204	546	579	561	679	436	534
	(489 $\pm$ 57.6)			(698 $\pm$ 38.1)			(201 $\pm$ 2.6)			(562 $\pm$ 16.5)			(550 $\pm$ 122.3)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	853	933	921	374	430	408	775	799	894	442	419	452	382	384	354
	(902 $\pm$ 43.1)			(404 $\pm$ 28.2)			(823 $\pm$ 62.9)			(438 $\pm$ 16.9)			(373 $\pm$ 16.8)			

The purity of the test substance was 99.0 %.

This substance contained phenol, formaldehyde and acids (oxalic acid and formic acid) as impurities.

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

\*:Growth inhibition was observed

NT:Not tested

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of Methylenediphenol on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

メチレンジフェノールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.057 mg/mL, S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理ではそれぞれ0.091 mg/mLおよび0.0094 mg/mLであった。従って、各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理では0.060 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では0.090 mg/mLおよび0.0090 mg/mLであったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した群では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix非存在下および存在下の短時間処理では、どちらの系列でも高濃度群(S9 mix非存在下:0.090 mg/mL, S9 mix存在下:0.0090 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度はそれぞれ14.0%および19.5%(gapを除く)であった。S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下の短時間処理では倍数性細胞の誘発に関して有意差( $p < 0.01$ )が認められたが、その出現頻度が低いことから、陰性と判定した。

以上の結果より、本試験条件下でメチレンジフェノールは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月, 入手時:継代4代, 現在21代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、仔牛血清(CS, Cansera International)を10

vol%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. S9

S9(キッコマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

#### 5. 被験物質

メチレンジフェノール(ロット番号:S980013, 三井化学(株)(名古屋))は、10φストランド状の固体で、水に対しては100 mmol/L未満、DMSOでは2 mol/L以上、アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、融点100°C, 沸点360-370°C(102 kPa), 蒸気圧402 Pa(200°C)で、純度99.0%(本品は3種類の異性体, 2,4'-ジヒドロキシジフェニルメタン50.0%, ビス(*m*-ヒドロキシフェニル)メタン30.2%, ビス(*o*-ヒドロキシフェニル)メタン18.8%の混合物で、不純物はフェノール, ホルムアルデヒド, シュウ酸, 蟻酸を含む)の物質で、暗所において冷蔵保存した。被験物質原体は、冷蔵保存下で安定であった。

#### 6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はDMSO(ロット番号:ACL5008, 和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒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、すべての試験において培養液の0.5 vol%になるように加えた。

#### 7. 細胞増殖抑制試験

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。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))

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、連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.057 mg/mL、S9 mix非存在下および存在下における短時間処理では、それぞれ0.091 mg/mLおよび0.0094 mg/mLであった(Fig. 1, 2)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(連続処理:0.0075, 0.015, 0.030, 0.060, 0.12 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理:0.011, 0.023, 0.045, 0.090, 0.18 mg/mL, S9 mix存在下での短時間処理:0.0011, 0.0023, 0.0045, 0.0090, 0.018 mg/mL)。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

9. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mLになるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2)、連続処理では0.060 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下での短時間処理では0.090 mg/mLおよび0.0090 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、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。

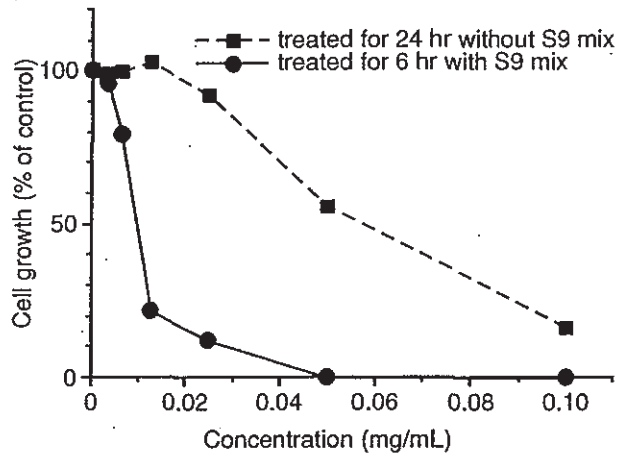


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methylenediphenol

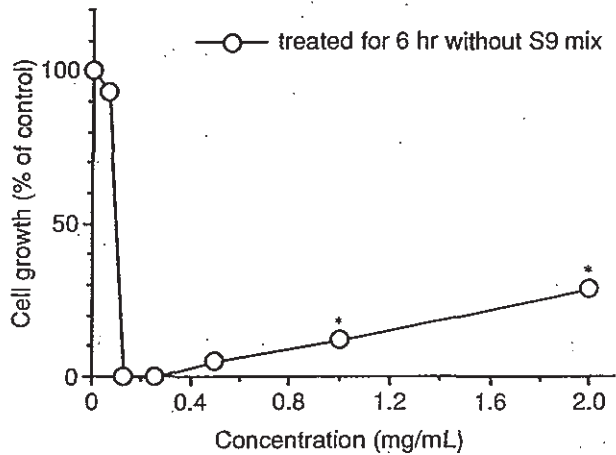


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methylenediphenol

\*: The increased percentage represents adhesion of test substance onto culture dishes

11. 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、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法<sup>2)</sup>により、有意差検定を実施した(p<0.01)。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup>(p<0.01)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。メチレンジフェノールを加えて24時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。メチレンジフェノールを加え、S9 mix非存在下で6

時間処理した群では、高濃度群(0.090 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度は14.0%(gapを除く)であった。一方、いずれの処理群においても有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。S9 mix存在下で6時間処理した場合は、高濃度群(0.0090 mg/mL)で有意な染色体の構造異常の増加が認められ、その頻度は19.5%(gapを除く)であった。また、高濃度群(0.0090 mg/mL)で倍数性細胞の出現頻度に有意差が認められ、傾向性検定( $p < 0.01$ )でも有意差が認められたが、その出現頻度が1.50%と低いことから、陰性と判定した。

従って、メチレンジフェノールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

メチレンジフェノールの関連物質としては、様々なビスフェノール類があげられる。ビスフェノールAについては、復帰変異試験で陰性の結果が報告されている<sup>4)</sup>が、分裂装置である紡錘糸の形成を阻害し、異数性細胞(染色体の数的異常)を誘発することが、CREST染色法(キネトコア抗体を用いる動原体の蛍光抗体染色法)を用いた小核の分析結果から示唆されている<sup>5)</sup>。本試験で使用した被験物質中には、異性体としてビス(*p*-ヒドロキシフェニル)メタン(異性体の混合比率:30.2%)を含んでおり、この物質については異数性細胞を誘発しないことが報告されている<sup>5)</sup>。本試験では異数性細胞誘発の指標となる倍数細胞の誘発は認められなかったが、構造異常が増加したことから、他の2種類の異性体によって構造異常が誘発された可能性が考えられる。また、ホルマリン(37%ホルムアルデヒド溶液)は、0.015 mg/mL以上の濃度でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発することが報告されている<sup>6)</sup>。しかしながら、被験物質におけるホルムアルデヒド含有量は1%未満であり、今回誘発された染色体異常は被験物質中のホルムアルデヒドに起因しないものと考えられる。

## 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，東京，1988，pp.16-37.
- 2) 吉村功編，“毒性・薬効データの統計解析，事例研究によるアプローチ”，サイエンティスト社，東京，1987，pp.76-78.
- 3) 吉村功，大橋靖夫編，“毒性試験講座14，毒性試験データの統計解析”，地人書館，東京，1992，pp.218-223.
- 4) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修，“労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集”，日本化学物質安全・情報センター編集・発行，東京，1996.
- 5) E. Pfeiffer *et al.*, *Mutat. Res.*, **390**, 21(1997).
- 6) 石館基監修，“改訂増補染色体異常試験データ集”，エル・アイ・シー，東京，1987，p.197.

## 連絡先

試験責任者：日下部博一  
 試験担当者：田中憲穂，山影康次，高橋俊孝，  
 若栗 忍，橋本恵子  
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

## Correspondence

Authors: Hirokazu Kusakabe (Study director)  
 Noriho Tanaka, Kohji Yamakage,  
 Toshitaka Takahashi, Shinobu Wakuri,  
 Keiko Hashimoto  
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
 Center  
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japar  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627



染色体異常試験

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with methylenediphenol (HPMP)<sup>a)</sup> without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others <sup>d)</sup>	No. of cells with aberrations		POL <sup>e)</sup> (%)	Trend test <sup>f)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>g)</sup> (%)	Mitotic index <sup>h)</sup> (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>i)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent <sup>b)</sup> 0		24	200	3	1	5	1	0	0	10	0	10 ( 5.0)	7 ( 3.5)	0.13	-	-	100.0	—
HPMP 0.015		24	200	0	0	0	2	0	0	2	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.00	-	-	103.5	—
HPMP 0.030		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13	-	-	87.5	—
HPMP 0.060		24	200	0	5	1	0	0	0	6	3	5 ( 2.5)	5 ( 2.5)	0.00	-	-	47.0	3.6, 6.6
HPMP 0.12 <sup>i)</sup>		24	—											—			11.5	—
MC 0.05 µg/mL		24	200	4	44	111	5	4	0	168	0	95* (47.5)	93* (46.5)	0.00	-	-	—	—

Abbreviations; gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, POL:polyploid, MC:mitomycin C.

a) Purity was 99.0 %. Phenol, formaldehyde and acids (oxalic acid and formic acid) were contained as impurities. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran - Armitage's trend test was done at p<0.01. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater<sup>TM</sup>. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity.

\*:Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methylenediphenol (HPMP)<sup>a)</sup> with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others <sup>d)</sup>	No. of cells with aberrations		POL <sup>e)</sup> (%)	Trend test <sup>f)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>g)</sup> (%)	Mitotic index <sup>h)</sup> (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>i)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment				200	0	1	1	4	0	0	6	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.00	-	-	—	—
Solvent <sup>b)</sup> 0		-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	10	11	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.00	-	-	100.0	—
HPMP 0.023		-	6-(18)	200	2	1	0	2	0	0	5	0	4 ( 2.0)	2 ( 1.0)	0.25	-	-	112.0	—
HPMP 0.045		-	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.38	+	-	112.5	—
HPMP 0.090		-	6-(18)	200	3	15	35	1	0	0	54	0	31*(15.5)	28*(14.0)	0.38	-	-	72.0	11.6, 11.6
HPMP 0.18 <sup>i)</sup>		-	6-(18)	—											—		0.0	—	
MC 0.1 µg/mL		-	6-(18)	200	10	69	150	3	8	20	260	1	121*(60.5)	119*(59.5)	0.13	-	-	—	—
Solvent <sup>b)</sup> 0		+	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.00	-	-	100.0	—
HPMP 0.0023		+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.13	-	-	94.5	—
HPMP 0.0045		+	6-(18)	200	0	3	5	0	0	0	8	0	6 ( 3.0)	6 ( 3.0)	0.63	+	+	99.5	—
HPMP 0.0090		+	6-(18)	200	4	35	55	1	1	20	116	0	39*(19.5)	39*(19.5)	1.50*	-	-	35.5	3.8, 3.4
HPMP 0.018 <sup>i)</sup>		+	6-(18)	—											—		28.5	Tox, Tox	
CPA 5 µg/mL		+	6-(18)	200	3	17	64	2	3	0	89	0	60*(30.0)	60*(30.0)	0.00	-	-	—	—

Abbreviations; gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, POL:polyploid, MC:mitomycin C, CPA:cyclophosphamide, Tox:cytotoxic.

a) Purity was 99.0 %. Phenol, formaldehyde and acids (oxalic acid and formic acid) were contained as impurities. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group.

f) Cochran - Armitage's trend test was done at p<0.01. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater<sup>TM</sup>.

h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity. j) Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

\*:Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact probability test.