

4,4'-メチレンジフェノールのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeated Dose Oral Toxicity Test of 4,4'-Methylenediphenol in Rats

要約

4,4'-メチレンジフェノールは、特殊ポリカーボネートや特殊エポキシ樹脂の原料として用いられている。その毒性については刺激性を有し、ラットにおける急性毒性試験の報告で雄ラットのLD₅₀は経口投与で4950 mg/kgである¹⁾。今回、4,4'-メチレンジフェノールの安全性確認のための資料を得ることを目的としてラットにおける28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を、雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。雌雄とも4群構成とし、1群には媒体である0.1%Tween 80添加0.5%カルメロースナトリウム水溶液を、他の3群には被験物質を、それぞれ60、250および1000 mg/kgの用量で28日間反復強制経口投与した。試験には雌雄とも各群5匹ならびに回復試験用に対照群および1000 mg/kg投与群各5匹を加えた計60匹の動物を使用した。

死亡例はなく、投与期間中、1000 mg/kg投与群の雌雄で投与初日に摂餌量の減少がみられ、雄の1000 mg/kg投与群で体重増加抑制が投与第4日から15日まで認められた。一般状態では、1000 mg/kg投与群の雌雄で投与後に腹臥位姿勢、うずくまり、自発運動の低下、歩行失調および閉眼がみられた。これらの一般状態の異常は大多数の例では投与初日に認められ、投与第7日以降はみられなかった。また、詳細な臨床観察では、被験物質投与によると思われる変化は認められなかった。血液生化学検査では、雌雄の250 mg/kg以上の投与群で総コレステロール濃度に有意な減少が認められ、雌ではA/G比の低下とアルカリ性フォスファターゼ活性の上昇にも有意差が認められた。さらに、雌の1000 mg/kg投与群ではγ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性が有意に上昇し、トリグリセライド濃度の増加とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の低下が認められた。病理学検査では、肝臓の相対重量が250 mg/kg以上の雌雄の投与群で増加しており、そのうち1000 mg/kg投与群の雌雄では小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、また、雌では250 mg/kg以上の投与群で副腎の相対重量が増加し、皮質に束状帯細胞のび慢性肥大が観察された。回復期間終了時には、肝臓および副腎のこれらの変化は認められなかった。

以上の結果、本試験条件下における4,4'-メチレンジフェノールの無作用量は、雌雄とも60 mg/kg/dayと考えられた。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製法

被験物質は、本州化学工業(和歌山)より提供された4,4'-メチレンジフェノール(ロット番号:930903、純度99.91%)を入手後、試験開始まで室温で保管し、使用した。被験物質の安定性は、受領前および返却後(試験終了後)に提供元で被験物質の品質試験を実施することにより確認した。

検体調製では、被験物質の各濃度を乳鉢で粉碎後、媒体を加えて所定濃度の懸濁液を調製した。媒体には、注射用水(光製薬)を溶媒として0.1%Tween 80(和光製薬)添加0.5%に調製したカルメロースナトリウム(丸石製薬)水溶液を使用した。

投与検体は、冷蔵条件下で8日間の安定性が確認されているので1週間に1回の頻度で調製し、使用時まで冷蔵庫にて保管した。また、投与検体中に含まれる被験物質の含量および均一性は、秦野研究所において確認した。

2. 使用動物および飼育方法

試験には、4週齢で購入し、検疫と飼育環境への馴化を兼ねて8日間予備飼育した雌雄のSprague-Dawley系[Crj:CD(SD)IGS, SPF]ラット(日本チャールス・リバー)各30匹を使用した。

群分けは、投与開始日前日の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法により行った。各群の動物数は、雌雄とも対照群および高用量群を各10匹とし、低および中用量群を各5匹とした。

動物は、温度21.0~25.0°C、湿度40.0~75.0%、換気回数約15回/時および照明12時間(7時~19時点灯)に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は、先に実施した予備試験の結果を基に決定した。即ち、4,4'-メチレンジフェノールを0、250、500および1000 mg/kgの用量で雌動物に7日間反復経口投与した結果、250 mg/kg以上の投与群で自発運動の低下が観察され、1000 mg/kg投与群ではよるめき歩行および腹臥位姿勢も認められた。しかし、これらの症状は投与初日のみの変化か、あるいは投与の経過に伴い発現しなくなった。また、250 mg/kg以上の投与群で

は総コレステロール濃度の低下傾向がみられたほか、1000 mg/kg投与群では有意な体重増加抑制が認められた。剖検においては、各群に被験物質の影響と考えられる所見はみられなかったことから、本試験の投与用量は1000 mg/kgを高用量とし、以下、公比約4で除して250および60 mg/kgを中および低用量に設定した。

投与経路は経口とし、1日1回、28日間、ラット用胃管を用いて強制的に投与した。投与容量は10 mL/kgとし、雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に投与液量(mL)を算出した。なお、回復期間は14日間とした。

4. 観察および検査

1) 一般状態

毎日(投与期間中は投与前および投与約2~3時間後)、全例の生死を含む一般状態の観察を行った。

2) 詳細な臨床観察

スコアリング法による詳細な臨床観察を、投与前および投与開始後は回復期間終了日まで1週間に1回、ブラインドで行った。観察は、ケージ越しで、姿勢・体位、自発運動、発声、振戦、痙攣について観察し、ハンドリング時では、取り出し易さ、扱い易さ、心拍動、体温、被毛、皮膚色、可視粘膜、流涙、眼球突出、瞳孔径、流涎について観察し、さらに作業台上の観察で、姿勢・体位、探索行動、身づくろい、発声、拳尾反応、歩行、常同行動、奇妙な行動、振戦、痙攣、呼吸数、立毛、眼裂、排尿回数、排便回数、接触に対する反応、撤去反応、耳介反射を観察した。また、投与第4週には、刺激に対する反応性の観察として、聴覚刺激に対する反応では驚愕反応、視覚刺激に対する反応では視覚定位、瞳孔反射、固有感覚刺激に対する反応では正向反射を合わせて観察した。

3) 体重および摂餌量

体重は、投与第1週には3回、その後は毎週2回の頻度で測定したほか、投与期間終了日、回復期間終了日および剖検日にも測定した。摂餌量は毎週1回の頻度で測定した。

4) 尿検査

投与第4週および回復期間第2週に全例を代謝ケージに収容して蓄尿し、約4および24時間の時点で採尿した。この4時間尿を用いて試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共)によりpH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲンおよびビリルビンの定性試験を行い、光学顕微鏡により沈渣を、視診により色調および混濁度を検査した。さらに、24時間尿の重量を天秤測定し、1 mLの重量から得られた比重で除して24時間における尿量を算出した。

5) 採血

投与期間ないし回復期間終了日から翌日の剖検日にかけて18から24時間絶食させた後、ペントバルビタール

ナトリウムで麻酔し、腹部後大静脈から、血液学検査用としてクエン酸ナトリウムおよびEDTA-2Kを抗凝固剤として採血し、次いで、血液生化学検査用として抗凝固剤にヘパリンを用いて採血した。採血は、対照群、低、中および高用量群の順序で、1匹ずつ動物番号の若い方から選択して行った。

6) 血液学検査

血液自動分析装置(CELL-DYN3500SL, ダイナボット)を用いて、電気抵抗法により赤血球数、平均赤血球容積、血小板数を測定し、白血球数はフローサイトメトリー・レーザー光散乱法/電気抵抗法で、白血球分類はフローサイトメトリー・レーザー光散乱法で、血色素量は吸光度法により測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。また、全自動血液凝固測定装置(CA-1000, 東亜医用電子)を用いて、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間を光散乱検出法により測定した。

7) 血液生化学検査

遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-MIRA plus, ロシュ・ダイアグノステックス)を用いて総蛋白濃度はビウレット法で、アルブミン濃度はBCG法で、総コレステロール濃度はコレステロールオキシダーゼ・HDAOS法で、グルコース濃度はヘキソキナーゼ・G-6-PDH法で、尿素窒素濃度はウレアーゼ・GIDH法で、クレアチニン濃度はJaffé法で、アルカリ性フォスファターゼ(ALP)活性はGSCC法で、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性はIFCC法で、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性はIFCC法で、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(γ-GTP)活性はIFCC法で、トリグリセライド濃度はGPO・HDAOS法(グリセリン消去法)で、総ビリルビン濃度はアゾビリルビン変法で、無機リン濃度はモリブデン酸直接法で、カルシウム濃度はOCPC法で測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, A&T)により、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度をイオン電極法により測定した。

8) 病理学検査

採血終了後、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺した後、器官および組織を肉眼的に観察した。また、各動物の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上体、子宮、卵巣の重量を測定し、各器官重量を剖検日の体重で除してそれぞれの相対重量を算出した。次いで、脳、脊髄、心臓、肺(気管支を含む)、気管、肝臓、腎臓、脾臓、胃、小腸(回腸、パイエル板を含む)、大腸(結腸)、前立腺、精囊(凝固線を含む)、卵巣、子宮、膀胱、甲状腺、副腎、大腿骨および骨髄、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、胸腺、坐骨神経を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に、精巣、精巣上体をブアン液に浸漬固定した。固定後、対照群および高用量群の標

本については、パラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、光学顕微鏡を用いて組織学的に検査した。また、60および250 mg/kg投与群においても変化の認められた器官を同様に検査した。

5. 統計解析

体重、摂餌量、半定量検査を除く尿検査ならびに血液学検査、生化学検査の値および器官重量については、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、3群以上の被験物質投与群について対照群と比較する場合は、Bartlettの方法による分散の一様性の検定の後、一元配置型の分散分析あるいはKruskal-Wallisの順位検定を行い、Dunnnett型の検定法で多重比較を行った。2群間で比較する場合には、F-検定を行い、Studentのt検定法あるいはAspin-Welchのt検定法を用いて有意差検定を行った。その他、尿の半定量的検査成績については、 $m \times n$ の分割表を用いる χ^2 検定を行い、Dunnnett型の検定法により多重比較を行った。病理組織学検査所見のグレード分けしたデータについては、Mann-WhitneyのU検定(両側検定)を行い、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率片側検定を行った。なお、いずれの検定も有意水準を5%とした。

結果

1. 死亡例

投与期間および回復期間中に死亡例はなかった。

2. 一般状態

投与初日に、1000 mg/kg投与群の雌雄のほとんどの例で、投与後に腹臥位姿勢からうずくまりおよび自発運動の低下を示した。この時、歩行失調、閉眼を伴う例も認められた。これらの症状は投与後約3時間には回復したが、雌の1例では3時間以後も継続した。投与第2日では、腹臥位姿勢またはうずくまりと自発運動の低下が1000 mg/kg投与群の雌雄に各4例認められ、雄においては投与第3日以降、認められなかった。一方、雌1例では腹臥位姿勢と自発運動の低下が投与第5日まで見られ、投与第6日には2例で認められたが、これらの症状は投与第7日以降認められなかった。

また、投与直後に一過性の流涎が1000 mg/kg投与群の雌で投与第6日から、雄では投与第8日からみられ、投与期間中に雄で8例、雌で9例に認められた。なお、これらの中には投与直前からの流涎も雌雄各2例にみられた。250 mg/kg投与群にも一過性の流涎が投与期間中、雄2例、雌3例に認められた。その他には、雌の1000 mg/kg投与群の8例、250 mg/kg投与群の1例に下腹部の被毛の汚れが認められ、1000 mg/kg投与群では計3例で回復期間の第3日までみられた。

3. 詳細な臨床観察

試験期間中に週一回の頻度で行ったスコアリング法による観察では、ケージ越しからの観察、作業台上の観察

および接触に対する反応で投与期間中および回復期間中に対照群と各被験物質投与群に差は認められなかった。ハンドリング時では、250および1000 mg/kg投与群で一般状態の観察時に認められた雌雄での流涎と雌に投与第2週から下腹部の被毛の汚れが認められた。その他に対照群と各被験物質投与群に差は認められなかった。

投与第4週に行った刺激に対する反応性の観察では、いずれの観察項目にも対照群と各被験物質投与群に差は認められなかった。

4. 体重 (Fig. 1, 2)

投与期間中、1000 mg/kg投与群の雄に、投与第4日から15日まで体重増加に有意な抑制がみられた。回復期間中、雌雄共に被験物質投与群と対照群との間で体重推移に差は認められなかった。

5. 摂餌量 (Fig. 3)

1000 mg/kg投与群の雌雄において、投与初日に摂餌量の有意な減少がみられた。

回復期間中では、雌雄ともに摂餌量に有意な差は認められなかった。

6. 尿検査 (Table 1)

投与第4週の検査で1000 mg/kg投与群の雌雄に尿pHの有意な低下が認められ、雌では回復期間終了週の検査においても有意な低下がみられた。1000 mg/kg投与群の雌雄において認められたこと、また、1000 mg/kg投与群の雄において腎臓の相対重量が有意に増加していたことから被験物質投与の影響が考えられるが、尿pHは種々の要因を受け変動しやすいことから²⁾、その原因については明らかではなかった。また、雄で潜血反応陽性が1000 mg/kg投与群において投与第4週の検査で2例と回復期間終了週の検査で1例に認められ、これらの例では、沈渣においても赤血球が確認された。しかし、病理組織学検査では、これらに関連づけるような異常所見は認められなかった。その他に投与期間終了週および回復期間終了週の検査では、被験物質投与群と対照群との間に明らかな変化は認められなかった。

7. 血液学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査では、雌の各被験物質投与群で血小板数に有意な増加がみられた。雌ラットの血小板数の生理的範囲が、 $101.8 \pm 19.6 \times 10^4/\mu\text{L}$ ²⁾に対して本試験では、対照群の値が $96.5 \pm 4.8 \times 10^4/\mu\text{L}$ と低い傾向であった。しかし、用量依存的な変化が認められるため被験物質の影響も考えられるが病理組織学検査でこれに関連づけられるような所見は認められず、また、他の血液検査値に異常もみられないことから原因は不明であった。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雌の平均赤血球色素濃度に有意差が認められたが、投与期間終了時にはみられないことから、被験物質投与と関連のない変化と判断した。その他には対照群と比較して

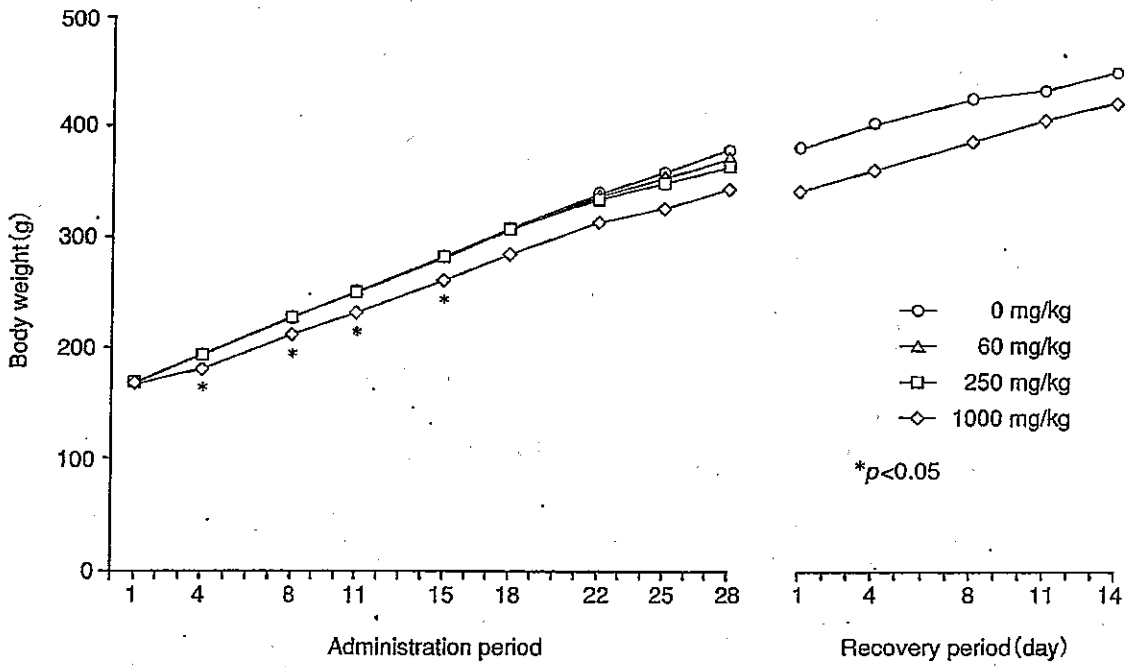


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 4,4'-methylene-diphenol in 28-day repeated dose toxicity test

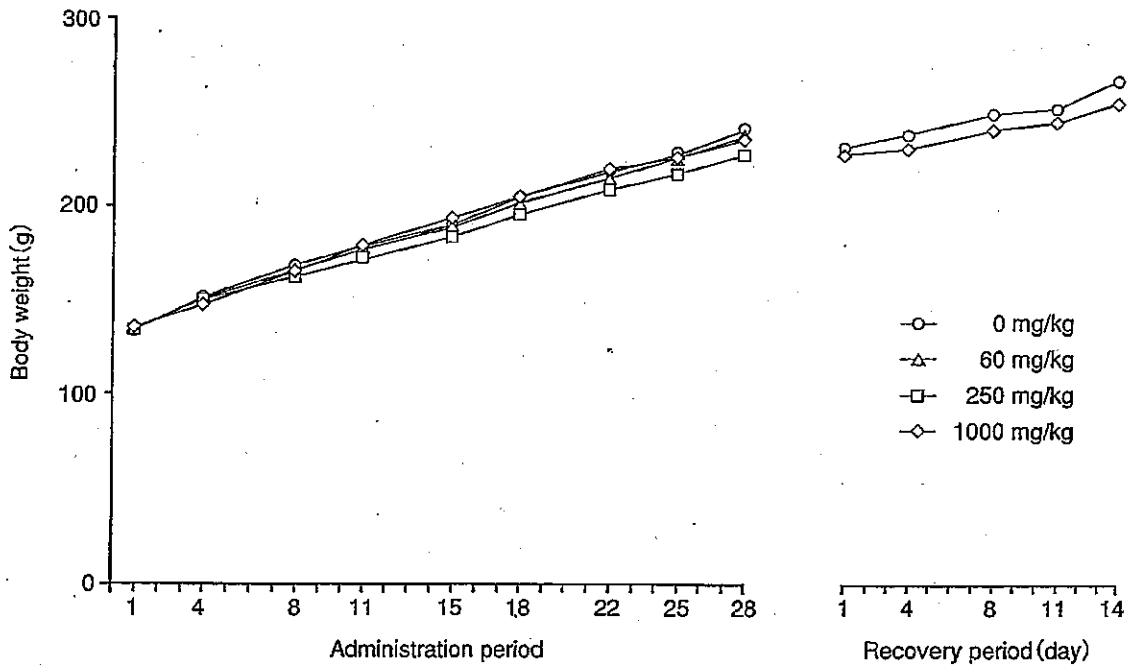


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 4,4'-methylene-diphenol in 28-day repeated dose toxicity test

雌雄いずれにおいても有意な差は認められなかった。

8. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時では、1000および250 mg/kg投与群の雌雄で総コレステロール濃度に有意な減少が認められ、

さらに、雌の1000 mg/kg投与群ではγ-GTP活性およびALP活性が有意に上昇し、トリグリセライド濃度の増加とAST活性およびA/G比の低下が認められた。また、雌の250 mg/kg投与群においてもA/G比の低下とALP活性の上昇に有意差が認められた。雌の250 mg/kg投

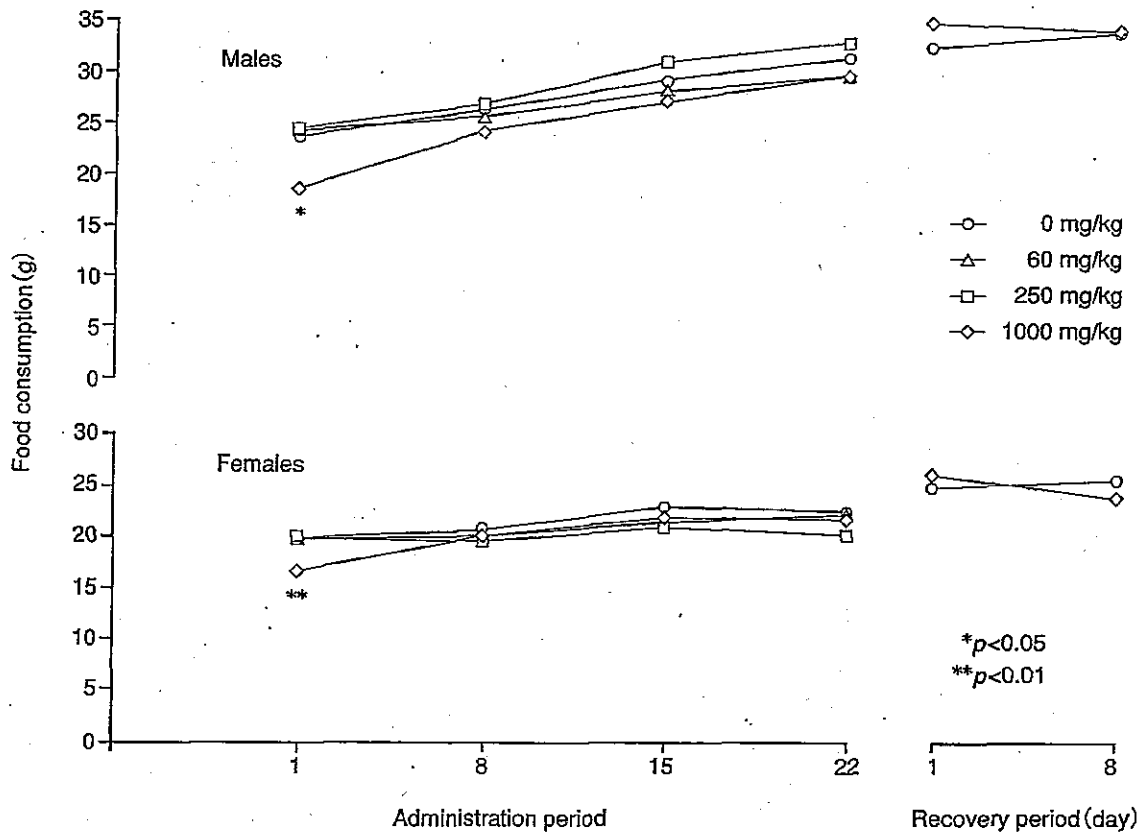


Fig. 3 Food consumption in male and female rats treated orally with 4,4'-methylendiphenol in 28-day repeated dose toxicity test

与群でみられた総ビリルビン濃度の低下は、用量依存的変化もなく被験物質投与の影響ではないと考えた。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雄の総コレステロール濃度の増加と雌の無機リン濃度の増加および塩素濃度の減少が有意に認められたが、生理的変動の範囲内であった。その他には、対照群と比較して雌雄いずれにおいても有意な差は認められなかった。

9. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時では、雌雄の肝臓が1000 mg/kg投与群で実重量および相対重量に、250 mg/kg投与群では相対重量に有意な増加が認められた。さらに雌では副腎が1000 mg/kg投与群で実重量および相対重量が、250 mg/kg投与群では相対重量が有意に増加した。雄では1000および250 mg/kg投与群で腎臓の相対重量が有意に増加した。

回復期間終了時の剖検では、対照群と比較していずれの器官重量にも変化は認められなかった。

2) 剖検所見

投与期間終了時屠殺例では、1000 mg/kg投与群の雄1例に肝臓の腫大が認められた。

回復期間終了時屠殺例では、1000 mg/kg投与群の雄

で1例に脾臓の腫大が認められたほか、異常所見は認められなかった。

3) 組織学検査 (Table 5)

投与期間終了時屠殺例では、以下に示す変化が観察された。

肝臓では、1000 mg/kg投与群の雌雄各2例に小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。また、全例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化が観察されたが、対照群と各被験物質投与群との間には程度の差は認められなかった。

副腎では、1000および250 mg/kg投与群の雌全例の皮質に、束状帯細胞のび慢性の肥大が観察され、そのうち1000 mg/kg投与群の変化の程度は、250 mg/kg投与群に比較して増強する傾向が認められた。一方、雄の1000 mg/kg投与群および対照群には、異常所見は認められなかった。

腎臓では、皮質に塩基性尿細管が1000 mg/kg投与群の雌雄全例、対照群の雄3例、雌4例、髄質に鉾質沈着が1000 mg/kg投与群の雄3例、雌2例、対照群の雄2例、雌3例に観察されたが、いずれの所見も対照群と1000 mg/kg投与群の間に程度の明らかな差は認められなかった。

回復期間終了時屠殺例では、投与期間終了時に1000 mg/kg投与群の雌雄の肝臓に認められた小葉中心性の

肝細胞肥大および雌の副腎の皮質にみられた束状帯細胞の慢性肥大は認められなかった。

肝臓では、1000 mg/kg投与群と対照群の雌雄全例に門脈周囲性の脂肪化が観察されたが、対照群と1000 mg/kg投与群の間に程度の差は認められなかった。

考察

4,4'-メチレンジフェノールを60, 250および1000 mg/kgの用量で雌雄のSprague-Dawley系ラットに28日間反復経口投与した結果、体重では、雄の1000 mg/kg投与群で投与第4日から15日まで増加の抑制が認められ、摂餌量では、雌雄とも投与第1日に減少がみられた。しかし、これらは以後、順調に回復した。一般状態では、1000 mg/kg投与群の雌雄で、投与後に腹臥位姿勢、うずくまり、自発運動の低下、歩行失調および閉眼が認められた。しかし、これらの症状がみられたのは、投与初日に多く、ほとんどの例ではこれ以降、認められなかった。その他、250, 1000 mg/kg投与群で認められた一過性の流涎は、投与直前にもみられていること、および本被験物質が刺激性を有することから物理的的刺激による反応性の流涎と考えられた。

病理学検査では、肝臓重量が250 mg/kg投与群以上の雌雄で増加し、1000 mg/kg投与群の雌雄に、小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。さらに、血液生化学検査では、雌の1000 mg/kg投与群に、 γ -GTP活性の有意な上昇とAST活性の有意な低下、トリグリセライド濃度の増加およびA/G比の減少、250 mg/kg投与群以上でALP活性の有意な上昇もみられた。これらの変化の内、肝臓重量の増加、小葉中心性の肝細胞肥大および γ -GTP活性の有意な上昇は、本被験物質の類似物質であるメチレンジフェノールのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験⁴⁾においても、同様の変化が認められていることから、被験物質投与の影響によるものと考えられた。しかし、AST活性、トリグリセライド濃度、A/G比、ALP活性の変化については、前記の類似物質であるメチレンジフェノールの試験においては認められなかったが、本被験物質投与の影響が考えられた。また、雌では250 mg/kg以上の投与群で副腎の相対重量が有意に増加し、皮質に束状帯細胞の慢性の肥大が観察された。血液生化学検査では、総コレステロール濃度の低下が、雌の250 mg/kg以上の投与群でみられた。これらの変化も、前記のメチレンジフェノールの試験⁴⁾で認められたことから、被験物質投与の影響によるものと考えられた。肝臓および副腎のこれらの変化は、回復期間終了時には認められなかった。

以上のように4,4'-メチレンジフェノールの28日間反復投与によって引き起こされた毒性作用は、雌雄の250 mg/kg以上の投与群で認められた肝臓重量の増加および雌の250 mg/kg以上の投与群で認められた、副腎皮質の束状帯細胞の慢性肥大と総コレステロール濃度の低下であった。従って以上の成績より、4,4'-メチレンジフェノールの28日間反復経口投与毒性試験における無

作用量は雌雄とも60 mg/kg/dayと考えられた。

文献

- 1) Smyth JHF, Carpenter CP et al.: American Industrial Hygiene Association Journal, 23:95-107(1962).
- 2) 谷本義文:「実験動物の血液・尿生化学」ソフトサイエンス, 東京(1988)p.123.
- 3) 田嶋嘉雄(監):「実験動物の生物学的特性データ」ソフトサイエンス, 東京(1989)p.103, 161.
- 4) 須藤雅人ら:メチレンジフェノールのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告, 8(1):949-961(2001).

連絡先

試験責任者: 関 剛幸
 試験担当者: 加藤博康
 (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: Takayuki Seki (Study Director)
 Hiroyasu 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 Urinalysis of rats treated orally with 4,4'-methylenediphenol in 28-day repeated dose toxicity test

Dose (mg/kg)	On day 23 of the administration period				On day 9 of the recovery period	
	0	60	250	1000	0	1000
Male						
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Volume (mL/24 hr) ^{a)}	20.9 ± 4.3	22.8 ± 6.4	20.6 ± 4.6	24.7 ± 6.0	26.0 ± 5.4	20.4 ± 3.8
Specific gravity ^{a)}	1.051 ± 0.005	1.047 ± 0.008	1.051 ± 0.007	1.047 ± 0.009	1.046 ± 0.012	1.055 ± 0.007
Color	ly ^{e)}					
	10	5	5	10	5	5
pH	5.5	0	0	1	0	0
	6.0	0	0	0	0	0
	6.5	0	0	3	0	0
	7.0	0	0	3	1	3
	7.5	5	1	3	2	1
	8.0	3	3	0	2	1
	8.5	2	0	0	0	0
	≥9.0	0	1	0	0	0
				**		
Protein ^{b)}	-	1	0	4	1	0
	±	3	2	1	2	1
	+	7	2	3	2	4
	++	0	0	2	0	0
Ketone ^{c)}	-	7	1	1	7	3
	±	3	4	4	3	1
	+	0	0	0	0	1
Occult blood ^{d)}	-	10	5	5	8	4
	+	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	2	0
Urobilinogen ^{e)}	±	10	5	5	9	5
	+	0	0	0	1	0
Microscopic examination of urinary sediment						
Red blood cells ^{f)}	-	10	5	5	8	4
	+	0	0	0	1	1
	++	0	0	0	1	0
Crystal ^{g)}	-	0	0	0	1	0
	±	10	5	5	10	5

a) Values represent mean ± S.D.

b) -: negative, ±: trace, +: 30 mg/dL, ++: 100 mg/dL

c) -: negative, ±: trace, +: slight, ++: moderate

d) ±: 0.1 EU/dL, +: 1.0 EU/dL

e) -: not observed, +: 10-99, ++: 100-299

f) -: not observed, ±: a few, ++: abundant

g) ly: light yellow

* p < 0.05

** p < 0.01

Table 1 (Continued)

Dose (mg/kg)	On day 23 of the administration period				On day 9 of the recovery period	
	0	60	250	1000	0	1000
Female						
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Volume (mL/24 hr) ^{a)}	11.7 ± 5.4	13.5 ± 5.3	23.4 ± 15.0	23.5 ± 18.3	14.5 ± 4.0	16.0 ± 5.1
Specific gravity ^{a)}	1.051 ± 0.016	1.042 ± 0.010	1.037 ± 0.022	1.038 ± 0.020	1.048 ± 0.019	1.044 ± 0.012
Color	ly ^{g)}					
pH						
	5.0	0	0	2	0	0
	5.5	0	0	1	0	0
	6.0	0	1	3	0	1
	6.5	1	1	2	0	1
	7.0	3	0	2	0	1
	7.5	1	0	0	1	2
	8.0	3	2	0	1	0
	8.5	2	1	0	0	0
	≥9.0	0	0	0	3	0
				**		*
Protein ^{h)}	-	5	5	7	3	4
	±	2	0	0	0	1
	+	1	0	0	2	0
	++	0	0	0	0	0
Ketone ^{h)}	-	9	5	10	4	5
	±	1	0	0	1	0
Bilirubin ^{e)}	-	10	5	9	4	5
	+	0	0	1	1	0
Urobilinogen ^{e)}	±	8	5	8	3	5
	+	2	0	0	2	0
Microscopic examination of urinary sediment						
Crystal ^{f)}	-	0	1	1	0	0
	±	10	4	4	5	5
	+	0	0	0	0	0
Epithelial cells ^{f)}	-	9	4	5	5	5
	±	1	1	0	0	0

a) Values represent mean ± S.D.

b) -: negative, ±: trace, +: 30 mg/dL, ++: 100 mg/dL

c) -: negative, ±: trace, +: slight, ++: moderat

d) ±: 0.1 EU/dL, +: 1.0 EU/dL.

e) -: not observed, +: 10-99, ++: 100-299.

f) -: not observed, ±: a few, +: abundant.

g) ly: light yellow.

*p<0.05.

**p<0.01.

Table 2 Hematological examination of rats treated orally with 4,4'-methylenediphenol in 28-day repeated dose toxicity test

Dose(mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	60	250	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)	798 \pm 30	778 \pm 35	795 \pm 41	765 \pm 17	810 \pm 50	780 \pm 45
Hemoglobin (g/dL)	15.8 \pm 0.9	15.4 \pm 1.0	15.5 \pm 0.8	15.0 \pm 0.4	15.0 \pm 0.5	14.6 \pm 0.9
Hematocrit (%)	47.4 \pm 2.5	46.0 \pm 2.7	46.4 \pm 2.8	45.2 \pm 1.6	45.0 \pm 2.0	44.0 \pm 2.7
MCV (fL)	59.4 \pm 1.5	59.0 \pm 1.3	58.3 \pm 1.1	59.1 \pm 1.3	55.7 \pm 2.4	56.4 \pm 1.6
MCH (pg)	19.8 \pm 0.5	19.8 \pm 0.5	19.5 \pm 0.4	19.7 \pm 0.5	18.6 \pm 0.8	18.7 \pm 0.5
MCHC (g/dL)	33.3 \pm 0.4	33.6 \pm 0.2	33.5 \pm 0.4	33.3 \pm 0.5	33.3 \pm 0.4	33.2 \pm 0.3
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	109.7 \pm 8.1	126.4 \pm 7.7	120.2 \pm 7.0	115.3 \pm 14.5	108.8 \pm 11.6	103.0 \pm 4.7
PT(sec)	20.1 \pm 6.6	22.5 \pm 4.2	24.9 \pm 8.3	24.0 \pm 12.4	17.4 \pm 1.6	14.8 \pm 3.8
APTT(sec)	23.3 \pm 3.1	25.3 \pm 2.3	26.3 \pm 2.7	24.4 \pm 3.7	22.2 \pm 1.5	20.5 \pm 2.9
WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	91.0 \pm 27.9	118.4 \pm 14.1	84.2 \pm 9.5	90.5 \pm 20.8	85.7 \pm 20.0	76.4 \pm 11.3
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophil	5 \pm 2	7 \pm 2	7 \pm 2	8 \pm 3	11 \pm 5	14 \pm 6
Eosinophil	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	3 \pm 3	3 \pm 1	5 \pm 2	5 \pm 2	3 \pm 2	4 \pm 1
Lymphocyte	90 \pm 4	89 \pm 3	88 \pm 2	86 \pm 6	84 \pm 4	81 \pm 7
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	737 \pm 18	722 \pm 25	744 \pm 38	725 \pm 28	762 \pm 20	789 \pm 32
Hemoglobin (g/dL)	14.8 \pm 0.3	14.7 \pm 0.5	14.6 \pm 0.5	14.1 \pm 0.7	14.7 \pm 0.3	15.1 \pm 0.5
Hematocrit (%)	44.2 \pm 1.5	43.5 \pm 1.5	43.2 \pm 1.5	42.3 \pm 1.4	43.9 \pm 0.7	44.3 \pm 1.3
MCV (fL)	60.0 \pm 1.5	60.2 \pm 1.3	58.0 \pm 1.2	58.4 \pm 1.9	57.6 \pm 1.0	56.1 \pm 1.4
MCH (pg)	20.1 \pm 0.4	20.3 \pm 0.3	19.6 \pm 0.3	19.5 \pm 1.0	19.3 \pm 0.4	19.0 \pm 0.4
MCHC (g/dL)	33.6 \pm 0.4	33.8 \pm 0.6	33.8 \pm 0.4	33.5 \pm 0.9	33.5 \pm 0.3	34.0 \pm 0.2*
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	96.5 \pm 4.8	109.3 \pm 9.2*	116.4 \pm 9.4**	123.9 \pm 6.3**	109.4 \pm 10.9	111.9 \pm 10.4
PT(sec)	12.9 \pm 1.0	12.8 \pm 0.7	13.1 \pm 0.5	12.6 \pm 0.4	12.0 \pm 0.1	12.0 \pm 0.7
APTT(sec)	19.1 \pm 1.2	19.4 \pm 0.8	20.1 \pm 0.8	19.4 \pm 1.7	17.8 \pm 1.0	17.1 \pm 1.9
WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	54.3 \pm 12.8	52.8 \pm 17.0	53.0 \pm 19.2	58.6 \pm 12.1	37.7 \pm 13.3	48.1 \pm 18.1
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophil	9 \pm 3	8 \pm 2	9 \pm 4	7 \pm 2	18 \pm 9	12 \pm 5
Eosinophil	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 0	1 \pm 0	2 \pm 1	2 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	4 \pm 1	4 \pm 3	5 \pm 3	5 \pm 2	5 \pm 2	3 \pm 2
Lymphocyte	86 \pm 4	86 \pm 4	86 \pm 6	87 \pm 2	76 \pm 11	83 \pm 7

Values represent mean \pm S.D.* $p < 0.05$.** $p < 0.01$.

Table 3 Blood chemical examination of rats treated orally with 4,4'-methylenediphenol in 28-day repeated dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	60	250	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.3	5.5 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.6 ± 0.2	5.5 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.3 ± 0.3
A/G	1.84 ± 0.14	1.92 ± 0.21	1.80 ± 0.19	1.70 ± 0.13	1.64 ± 0.10	1.52 ± 0.20
BUN (mg/dL)	17 ± 2	16 ± 3	15 ± 2	16 ± 2	19 ± 2	18 ± 4
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	160 ± 34	151 ± 15	151 ± 9	137 ± 22	137 ± 11	129 ± 15
Total cholesterol (mg/dL)	41 ± 6	35 ± 7	21 ± 6**	19 ± 6**	34 ± 5	46 ± 7**
Triglyceride (mg/dL)	29 ± 14	32 ± 11	41 ± 17	33 ± 16	25 ± 4	42 ± 20
Total bilirubin (mg/dL)	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Inorg. phos. (mg/dL)	8.5 ± 1.3	7.6 ± 0.7	8.1 ± 1.0	8.9 ± 0.7	6.9 ± 0.4	7.4 ± 0.4
Ca (mg/dL)	9.2 ± 0.6	9.1 ± 0.3	8.9 ± 0.2	9.2 ± 0.1	8.9 ± 0.2	9.0 ± 0.1
Na (mEq/L)	144.1 ± 1.0	143.7 ± 0.5	143.8 ± 1.0	144.0 ± 1.2	144.7 ± 0.7	144.0 ± 1.3
K (mEq/L)	4.74 ± 1.78	3.99 ± 0.18	4.15 ± 0.13	4.22 ± 0.33	3.80 ± 0.13	3.74 ± 0.16
Cl (mEq/L)	105.7 ± 1.3	105.8 ± 2.8	107.1 ± 1.1	105.4 ± 0.8	107.5 ± 1.1	106.0 ± 1.5
ALP (U/L)	341 ± 111	360 ± 73	337 ± 90	474 ± 77	293 ± 50	288 ± 76
ALT (U/L)	25 ± 4	30 ± 8	35 ± 7	40 ± 16	26 ± 5	33 ± 13
AST (U/L)	66 ± 12	72 ± 20	65 ± 14	61 ± 16	62 ± 5	72 ± 33
γ-GTP (U/L)	1 ± 0	1 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 2
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.6 ± 0.2	5.7 ± 0.3	5.8 ± 0.4	5.8 ± 0.1	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.8 ± 0.3	3.7 ± 0.2
A/G	1.73 ± 0.12	1.60 ± 0.10	1.51 ± 0.12*	1.53 ± 0.12*	1.83 ± 0.21	1.70 ± 0.23
BUN (mg/dL)	20 ± 2	21 ± 6	21 ± 2	18 ± 1	21 ± 2	20 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	119 ± 15	113 ± 22	131 ± 17	126 ± 11	127 ± 12	128 ± 19
Total cholesterol (mg/dL)	50 ± 11	31 ± 12	16 ± 3**	19 ± 2*	56 ± 12	56 ± 8
Triglyceride (mg/dL)	9 ± 5.0	11 ± 4	18 ± 7	34 ± 10**	20 ± 19	18 ± 4
Total bilirubin (mg/dL)	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01*	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Inorg. phos. (mg/dL)	7.4 ± 0.6	7.7 ± 1.3	7.0 ± 0.4	7.2 ± 0.4	5.2 ± 0.4	6.0 ± 0.3*
Ca (mg/dL)	9.1 ± 0.2	9.1 ± 0.3	8.9 ± 0.4	9.1 ± 0.2	8.6 ± 0.2	8.8 ± 0.3
Na (mEq/L)	144.7 ± 0.7	144.2 ± 1.1	143.7 ± 1.3	143.4 ± 0.5	143.8 ± 0.6	143.2 ± 1.3
K (mEq/L)	4.43 ± 0.53	4.18 ± 0.34	4.29 ± 0.46	4.33 ± 0.29	3.60 ± 0.15	3.66 ± 0.11
Cl (mEq/L)	107.6 ± 0.4	106.6 ± 1.6	106.7 ± 1.7	105.2 ± 1.9	108.7 ± 0.3	107.2 ± 1.0*
ALP (U/L)	253 ± 80	304 ± 50	396 ± 98*	394 ± 93*	190 ± 39	166 ± 20
ALT (U/L)	18 ± 1	22 ± 7	21 ± 3	23 ± 4	22 ± 3	23 ± 5
AST (U/L)	70 ± 6	74 ± 16	58 ± 7	53 ± 7*	59 ± 5	56 ± 7
γ-GTP (U/L)	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	4 ± 1**	2 ± 1	2 ± 1

Values represent mean ± S.D.

* $p < 0.05$.** $p < 0.01$.

Table 4 Organ weights of rats treated orally with 4,4'-methylendiphenol in 28-day repeated dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	60	250	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	342.4 ± 29.1	338.3 ± 25.3	327.8 ± 23.5	307.7 ± 22.3	417.7 ± 35.0	388.0 ± 29.6
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1891.6 ± 61.7	1904.0 ± 68.8	1870.0 ± 68.4	1908.4 ± 23.9	2007.0 ± 127.5	1965.2 ± 104.7
Thymus	593.6 ± 78.6	645.3 ± 117.3	561.8 ± 85.7	520.4 ± 103.5	488.3 ± 157.1	443.4 ± 96.0
Heart	1141.5 ± 68.9	1127.6 ± 99.6	1174.2 ± 110.8	1105.7 ± 145.6	1357.0 ± 141.4	1253.1 ± 78.5
Liver	11061.4 ± 992.8	11735.2 ± 1028.1	13013.9 ± 1425.8	13540.0 ± 1497.8*	12147.2 ± 1696.3	12792.0 ± 928.0
Kidneys	2570.8 ± 89.8	3027.0 ± 476.5	2916.4 ± 223.3	2880.6 ± 264.0	2999.9 ± 352.4	2920.5 ± 405.6
Spleen	678.1 ± 76.7	649.3 ± 56.8	654.3 ± 93.2	672.3 ± 115.2	732.6 ± 54.0	1036.0 ± 557.4
Testes	3155.5 ± 80.0	2666.7 ± 738.1	3022.6 ± 370.5	2993.5 ± 316.6	3227.3 ± 228.5	3173.5 ± 262.2
Epididymides	728.0 ± 28.1	693.7 ± 73.0	697.1 ± 73.2	699.3 ± 128.8	955.0 ± 25.5	943.2 ± 36.3
Adrenal glands	59.2 ± 9.6	50.1 ± 8.3	51.8 ± 5.9	52.0 ± 6.8	64.5 ± 8.6	64.0 ± 10.0
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	5.564 ± 0.595	5.647 ± 0.339	5.727 ± 0.436	6.231 ± 0.485	4.816 ± 0.260	5.085 ± 0.392
Thymus	1.738 ± 0.214	1.901 ± 0.249	1.713 ± 0.217	1.698 ± 0.345	1.167 ± 0.352	1.150 ± 0.205
Heart	3.347 ± 0.257	3.334 ± 0.149	3.582 ± 0.216	3.589 ± 0.327	3.252 ± 0.259	3.234 ± 0.092
Liver	32.351 ± 1.969	34.685 ± 1.495	39.647 ± 2.198**	43.940 ± 2.376**	28.976 ± 1.864	33.166 ± 3.977
Kidneys	7.545 ± 0.598	8.935 ± 1.058	8.912 ± 0.648*	9.376 ± 0.764**	7.179 ± 0.549	7.518 ± 0.711
Spleen	1.979 ± 0.114	1.919 ± 0.076	1.990 ± 0.169	2.174 ± 0.265	1.757 ± 0.080	2.768 ± 1.793
Testes	9.277 ± 0.916	7.970 ± 2.372	9.213 ± 0.871	9.736 ± 0.799	7.741 ± 0.427	8.200 ± 0.662
Epididymides	2.136 ± 0.160	2.066 ± 0.315	2.124 ± 0.123	2.273 ± 0.372	2.303 ± 0.259	2.442 ± 0.201
Adrenal glands	0.173 ± 0.029	0.148 ± 0.022	0.159 ± 0.020	0.169 ± 0.020	0.156 ± 0.027	0.166 ± 0.029
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	220.6 ± 11.5	213.3 ± 22.5	203.4 ± 15.9	212.2 ± 7.5	249.6 ± 13.0	235.4 ± 11.4
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1855.5 ± 72.4	1774.0 ± 52.3	1761.4 ± 73.2	1772.6 ± 80.2	1835.5 ± 53.5	1778.6 ± 67.5
Thymus	538.0 ± 64.3	564.2 ± 162.7	454.7 ± 40.5	399.3 ± 32.7**	440.3 ± 60.0	386.8 ± 68.0
Heart	825.5 ± 32.3	762.1 ± 99.9	743.3 ± 34.5	793.4 ± 46.8	886.2 ± 63.4	811.9 ± 74.8
Liver	7379.4 ± 886.4	7393.1 ± 1037.2	7947.5 ± 1101.8	9566.4 ± 353.4**	7508.1 ± 786.8	7705.5 ± 717.3
Kidneys	1929.1 ± 86.3	1951.6 ± 211.4	1857.2 ± 142.2	1900.5 ± 99.1	1794.4 ± 246.3	1877.6 ± 188.3
Spleen	539.4 ± 125.5	496.9 ± 78.9	444.0 ± 92.5	526.9 ± 40.5	481.6 ± 38.0	477.4 ± 56.1
Uterus	501.2 ± 168.1	404.3 ± 159.2	346.5 ± 135.3	355.7 ± 134.0	485.8 ± 95.7	431.4 ± 87.7
Ovaries	82.8 ± 13.8	99.7 ± 8.5	90.5 ± 10.2	95.2 ± 24.6	90.6 ± 9.8	98.1 ± 16.9
Adrenal glands	66.9 ± 4.9	70.0 ± 8.3	77.5 ± 15.7	87.9 ± 6.4**	69.4 ± 6.6	73.9 ± 14.3
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	8.434 ± 0.601	8.374 ± 0.688	8.701 ± 0.713	8.351 ± 0.124	7.368 ± 0.406	7.568 ± 0.463
Thymus	2.447 ± 0.346	2.630 ± 0.595	2.248 ± 0.270	1.885 ± 0.180	1.777 ± 0.343	1.641 ± 0.256
Heart	3.755 ± 0.326	3.568 ± 0.178	3.665 ± 0.188	3.740 ± 0.201	3.548 ± 0.076	3.443 ± 0.171
Liver	33.388 ± 2.773	34.591 ± 1.684	38.975 ± 2.896**	45.106 ± 1.857**	30.038 ± 2.036	32.721 ± 2.439
Kidneys	8.751 ± 0.254	9.150 ± 0.113	9.150 ± 0.635	8.972 ± 0.686	7.170 ± 0.716	7.965 ± 0.551
Spleen	2.431 ± 0.455	2.331 ± 0.276	2.173 ± 0.339	2.485 ± 0.208	1.929 ± 0.099	2.025 ± 0.187
Uterus	2.263 ± 0.709	1.934 ± 0.820	1.685 ± 0.550	1.670 ± 0.604	1.950 ± 0.384	1.826 ± 0.323
Ovaries	0.377 ± 0.071	0.472 ± 0.063	0.446 ± 0.044	0.447 ± 0.104	0.364 ± 0.041	0.419 ± 0.084
Adrenal glands	0.304 ± 0.028	0.328 ± 0.023	0.380 ± 0.063*	0.415 ± 0.038**	0.279 ± 0.031	0.314 ± 0.055

Values represent mean ± S.D.

* $p < 0.05$.** $p < 0.01$.

Table 5 Histopathological findings of rats treated orally with 4,4'-methylene-diphenol in 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	Male						Female					
		End of the administration period				End of the recovery period		End of the administration period				End of the recovery period	
		0	60	250	1000	0	1000	0	60	250	1000	0	1000
Number of animals examined (Liver)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	±	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Fatty change, periportal	±	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Number of animals examined (Kidney)		5	1	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
Basophilic tubule, cortex	±	3	1		4			4			5		
	+	0	0		1			0			0		
	Total	3	1		5			4			5		
Mineralization, medulla	±	2	0		3			2			2		
	+	0	0		0			1			0		
	Total	2	0		3			3			2		
Number of animals examined (Adrenal gland)		5	0	0	5	0	0	5	5	5	5	5	5
Hypertrophy, diffuse, fascicular cell	±	0			0			0	0	5	1	0	0
	+	0			0			0	0	0	4	0	0
	Total	0			0			0	0	5	5	0	0

**, ## **, ##

Grade of histopathological finding; ±: very slight, +: slight

Total: total of positive grade

$p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)** $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

4,4'-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 4,4'-Methylenediphenol in Bacteria

要約

4,4'-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, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5菌株を用いた。用量設定試験において、すべての検定菌のS9 mix無添加および添加条件ともに1500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で生育阻害が認められたことから、本試験はすべての検定菌で78.1~2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、用いた5種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4,4'-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

4,4'-メチレンジフェノールは、白色結晶である。用いた被験物質は、ロット番号:930903, 純度:99.91%, 製造:本州化学工業(和歌山)であり、本州化学工業から供与された。被験物質は、使用時まで密閉、遮光して室温で保管した。本ロットは、実験期間中安定であったことが被験物質提供者により確認されている。

4,4'-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:WAJ4459, 和光純薬工業)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。調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。

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)
アジ化ナトリウム	(SA, 和光純薬工業)
9-アミノアクリジン	(9AA, Sigma Chem.)
2-アミノアントラセン	(2AA, 和光純薬工業)

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

3. 検定菌

試験には、*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°Cで凍結保存したものを、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*)、アンピシリン耐性因子pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の復帰変異コロニー数について調べ、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)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°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、極東製薬工業製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水和物	0.2 g
クエン酸・一水和物	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)	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-ピオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix

S9 mix 1 mL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 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

*: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(キッコマン)を用いた。

5. 試験方法

プレインキュベーション法⁹⁾により、S9 mix無添加条件およびS9 mix添加条件で試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、S9 mix無添加条件では0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mL、S9 mix添加条件では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、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てそれぞれ陰性対照および陽性対照とした。同時に実施した他試験については、陰性および陽性対照の結果を共通とした。

培養は37°Cで48時間行い、発生した復帰変異コロニー数をコロニーアナライザ-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、生育阻害の有無については、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。陰性および陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認をした。

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無添加条件あるいはS9 mix添加条件において、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。

結果及び考察

50.0~5000 μg/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、すべての検定菌のS9 mix無添加および添加条件ともに1500 μg/plate以上の用量で生育阻害が認められた。また、被験物質に由来する沈澱は、用いたいずれの用量においても認められなかった。

したがって、最高用量をすべての検定菌で2500 μg/plateとして、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、S9 mix無添加および添加条件ともに、TA100, TA1535, TA98およびTA1537では1250 μg/plate以上の用量で、WP2 uvrAでは2500 μg/plateの用量で生育阻害が認められた。復帰変異コロニー数は、いずれの検定菌においても、陰性対照値の2倍以上となる増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、4,4'-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4,4'-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構造異常および倍数性ともに陽性の結果が得られている⁴⁾。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、染色体異常試験では疑陽性の結果が報告されている^{5,6)}。4,4'-Sulfonyldiphenolについては復帰変異試験では陰性、染色体異常試験では陽性の結果が報告されている^{7,8)}。フェノールについては復帰変異試験では陰性、*Allium cepa*を用いた染色体異常試験では陰性の結果が報告されている^{9,10)}。メチレンジフェノールについては復帰変異試験では陰性、染色体異常試験では陽性の結果が報告されている¹¹⁾。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res*, 113:173-215(1983).
- 2) Green MHL: Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. In "Handbook of Mutagenicity Test Procedures", Kilbey BJ, Legator M, Nichols W et al. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1984) pp.161-187.
- 3) Matsushima T, Sugimura T, Nagao M et al.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens", Norpoth KH, Garner RC (eds.), Springer, Berlin (1980) pp.273-285.
- 4) 山影康次ら: 4,4'-メチレンジフェノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験。化学物質毒性試験報告, 12:394-398(2005)。

- 5) 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(1986)p.223.
- 6) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999)p.82.
- 7) 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(1986)p.221.
- 8) 澁谷徹ら:4,4'-スルフォニルジフェノールの細菌を用いる復帰変異試験. 化学物質毒性試験報告, 7: 89-92(1999).
- 9) 賀田恒夫, 石館基(監修):「環境変異原性データ集1」, サイエンティスト社, 東京(1980)p.329.
- 10) 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(1986)p.196.
- 11) 澁谷徹ら:メチレンジフェノールの細菌を用いる復帰変異試験. 化学物質毒性試験報告, 8:962-966(2001).

連絡先

試験責任者: 原 巧
試験担当者: 須井 哉, 大山徳子,
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 秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Takumi Hara (Study Director)
Hajime Sui, Noriko Ohyama,
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 4,4'-methylenediphenol in 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	156	156	135	12	17	18	35	30	31	20	23	25	8	9	5
		(149 \pm 12)			(16 \pm 3)			(32 \pm 3)			(23 \pm 3)			(7 \pm 2)		
	78.1	126	130	126	20	19	18	32	24	38	23	32	18	7	13	11
		(127 \pm 2)			(19 \pm 1)			(31 \pm 7)			(24 \pm 7)			(10 \pm 3)		
	156	139	131	145	19	11	16	31	31	27	26	21	31	7	10	7
		(138 \pm 7)			(15 \pm 4)			(30 \pm 2)			(26 \pm 5)			(8 \pm 2)		
	313	135	125	143	9	18	16	32	21	28	15	21	27	4	8	7
	(134 \pm 9)			(14 \pm 5)			(27 \pm 6)			(21 \pm 6)			(6 \pm 2)			
	625	147	128	104	10	14	19	26	31	28	15	17	20	3	5	7
		(126 \pm 22)			(14 \pm 5)			(28 \pm 3)			(17 \pm 3)			(5 \pm 2)		
	1250	77*	68*	76*	3*	1*	3*	20	24	29	10*	11*	17*	3*	3*	3*
		(74 \pm 5)			(2 \pm 1)			(24 \pm 5)			(13 \pm 4)			(3 \pm 0)		
	2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	7*	6*	14*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			(9 \pm 4)			(0 \pm 0)			(0 \pm 0)		
S9 mix (+)	0	146	146	163	12	11	15	34	33	38	34	38	40	16	15	18
		(152 \pm 10)			(13 \pm 2)			(35 \pm 3)			(37 \pm 3)			(16 \pm 2)		
	78.1	209	198	187	19	16	18	31	54	44	44	59	49	15	17	18
		(198 \pm 11)			(18 \pm 2)			(43 \pm 12)			(51 \pm 8)			(17 \pm 2)		
	156	216	235	189	15	14	20	37	43	47	47	40	42	12	16	10
		(213 \pm 23)			(16 \pm 3)			(42 \pm 5)			(43 \pm 4)			(13 \pm 3)		
	313	209	195	158	11	16	12	46	40	31	49	40	38	9	17	10
	(187 \pm 26)			(13 \pm 3)			(39 \pm 8)			(42 \pm 6)			(12 \pm 4)			
	625	116	171	159	7	11	6	34	31	35	34	48	40	14	12	11
		(149 \pm 29)			(8 \pm 3)			(33 \pm 2)			(41 \pm 7)			(12 \pm 2)		
	1250	127*	134*	131*	6*	4*	5*	28	23	22	42*	31*	41*	5*	9*	5*
		(131 \pm 4)			(5 \pm 1)			(24 \pm 3)			(38 \pm 6)			(6 \pm 2)		
	2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	9*	13*	6*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			(9 \pm 4)			(0 \pm 0)			(0 \pm 0)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 ^d			SA ^b			AF2			AF2			9AA ^c		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	347	446	430	516	603	673	196	141	134	331	359	408	215	283	238
	(408 \pm 53)			(597 \pm 79)			(157 \pm 34)			(366 \pm 39)			(245 \pm 35)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA ^a			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	791	833	859	359	355	388	748	740	741	422	426	396	226	204	235
	(828 \pm 34)			(367 \pm 18)			(743 \pm 4)			(415 \pm 16)			(222 \pm 16)			

The purity of the test substance was 99.91 wt%.

Negative control; Dimethyl sulfoxide

a) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, b) Sodium azide, c) 9-Aminoacridine, d) 2-Aminoanthracene

*: Growth inhibition was observed.

Table 2 Mutagenicity of 4,4'-methylenediphenol in 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	157	129	127	11	12	18	17	24	15	23	14	26	5	9	6
		(138 \pm 17)			(14 \pm 4)			(19 \pm 5)			(21 \pm 6)			(7 \pm 2)		
	78.1	146	136	135	10	9	5	23	29	28	23	19	25	11	7	8
		(139 \pm 6)			(8 \pm 3)			(27 \pm 3)			(22 \pm 3)			(9 \pm 2)		
	156	165	155	132	10	14	9	20	19	25	20	12	16	6	10	8
		(151 \pm 17)			(11 \pm 3)			(21 \pm 3)			(16 \pm 4)			(8 \pm 2)		
	313	132	134	115	13	14	8	24	12	17	21	25	22	9	5	7
	(127 \pm 10)			(12 \pm 3)			(18 \pm 6)			(23 \pm 2)			(7 \pm 2)			
625	148	139	146	2	6	7	16	17	17	14	17	19	4	4	7	
	(144 \pm 5)			(5 \pm 3)			(17 \pm 1)			(17 \pm 3)			(5 \pm 2)			
1250	81*	97*	105*	3*	6*	6*	16	15	15	7*	10*	3*	1*	1*	3*	
	(94 \pm 12)			(5 \pm 2)			(15 \pm 1)			(8 \pm 2)			(2 \pm 1)			
2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*	6*	10*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			(7 \pm 3)			(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			
S9 mix (+)	0	154	166	156	19	12	10	14	34	21	36	42	35	14	11	8
		(159 \pm 6)			(14 \pm 5)			(23 \pm 10)			(38 \pm 4)			(11 \pm 3)		
	78.1	196	211	183	18	8	8	34	28	23	41	33	53	14	12	10
		(197 \pm 14)			(11 \pm 6)			(28 \pm 6)			(42 \pm 10)			(12 \pm 2)		
	156	170	186	178	15	11	12	30	29	36	44	35	43	15	9	13
		(178 \pm 8)			(13 \pm 2)			(32 \pm 4)			(41 \pm 5)			(12 \pm 3)		
	313	206	160	168	12	11	10	36	25	35	32	33	38	9	7	8
	(178 \pm 25)			(11 \pm 1)			(32 \pm 6)			(34 \pm 3)			(8 \pm 1)			
625	174	183	196	10	13	8	21	23	14	31	36	35	13	13	12	
	(184 \pm 11)			(10 \pm 3)			(19 \pm 5)			(34 \pm 3)			(13 \pm 1)			
1250	156*	135*	145*	8*	5*	10*	19	10	21	29*	29*	31*	3*	3*	5*	
	(145 \pm 11)			(8 \pm 3)			(17 \pm 6)			(30 \pm 1)			(4 \pm 1)			
2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	7*	10*	10*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			(9 \pm 2)			(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 ^d			SA ^b			AF2			AF2			9AA ^c		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	370	429	398	585	661	601	133	136	141	343	329	364	299	297	548
	(399 \pm 30)			(616 \pm 40)			(137 \pm 4)			(345 \pm 18)			(381 \pm 144)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA ^a			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	787	748	851	425	347	319	888	732	701	455	460	465	225	211	227
	(795 \pm 52)			(364 \pm 55)			(774 \pm 100)			(460 \pm 5)			(221 \pm 9)			

The purity of the test substance was 99.91 wt%.

Negative control; Dimethyl sulfoxide

a) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, b) Sodium azide, c) 9-Aminoacridine, d) 2-Aminoanthracene

*: Growth inhibition was observed.

4,4'-メチレンジフェノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 4,4'-Methylenediphenol in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4,4'-メチレンジフェノールのチャイニーズ・ハムスター肺由来細胞(CHL/IU細胞)を用いる染色体異常試験を実施した。

S9 mix非存在下および存在下で短時間処理(6時間処理後18時間の回復時間)した場合、濃度に依存して増殖率が低下し、50%の増殖抑制濃度は0.18 mg/mLおよび0.19 mg/mLと推定された。24時間連続処理(S9 mix非存在下)した場合は、50%の増殖抑制濃度は0.11 mg/mLと推定された。

これらの結果に基づき、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ともに0.28 mg/mL(50%増殖抑制濃度の約1.5倍)の濃度を最高処理濃度とし、5段階の濃度群(0.055~0.28 mg/mL, 公比1.5)を設定し、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率および分裂指数より、S9 mix非存在下および存在下ともに0.083, 0.12, 0.19 mg/mLについて染色体分析を行った。その結果、S9 mix非存在下で短時間処理した高濃度群において、染色体の構造異常を有する細胞(19.5%)の統計学的な有意差が認められた。また、中濃度群では倍数性細胞(1.8%)の統計学的な有意差が認められた。S9 mix存在下で短時間処理した場合においても、高濃度群で構造異常を有する細胞(7.0%)の統計学的な有意差が認められた。また、中濃度群では、倍数性細胞(3.0%)の統計学的な有意差が認められた。

以上の結果より、4,4'-メチレンジフェノールは、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 細胞

CHL/IU細胞はチャイニーズ・ハムスター、肺由来で、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23代)した。試験には、解凍後継代10代以内で試験に用いた。仔牛血清(CS, Cansera International)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬)培養液を用い、CO₂インキュベーター(37°C, 5% CO₂)内で培養した。

2. S9 mix

S9(キッコーマン)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。S9 mixは使用時に調製し、処理培地に10 vol%添加し、各成分の最終濃度はS9 5 vol%, グルコース-6-リン酸(Sigma Chemical) 0.83 mmol/L, β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(オリエンタル酵母工業) 0.67 mmol/L, MgCl₂ 0.83 mmol/L, KCl 5.5 mmol/L, HEPES緩衝液(pH 7.2) 0.67 mmol/Lとした。

3. 被験物質

被験物質である4,4'-メチレンジフェノール[ロット番号: 930903, 純度: 99.91%, 本州化学工業(和歌山)]は白色結晶であり、本州化学工業から提供された後、密閉し、遮光下で室温保管した。また、被験物質は実験期間中安定であったことが、被験物質提供者において確認された。

4. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業)を用いて原液を調製した(細胞増殖抑制試験では200 mg/mL, 染色体異常試験では28 mg/mL)。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1 vol%になるように加えた。なお、被験物質を溶媒に溶解させた際、発熱、発泡、変色などの変化はなかった。

5. 培養条件

2×10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたプラスチックディッシュ(直径6 cm)に播き、CO₂インキュベーター内で3日間培養した。その後、短時間処理では、血清入りの培地によりS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、リン酸緩衝塩類溶液で洗浄、新鮮な培養液でさらに18時間培養した。また、連続処理では、新鮮培地と交換後、被験物質を加え、24時間処理した。

6. 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およぼす影響を調べた。

いずれの処理条件においても、2.0 mg/mL(10 mmol/L)を最高処理濃度とし、0.063~2.0 mg/mLの濃度範囲(公比2, 6濃度)で処理を行った。なお、処理開始時および処理終了時ともに2.0 mg/mLで肉眼観察による沈殿が認められた。

培養終了後、10 vol%ホルマリン溶液で細胞を固定し、

0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業)を用い、溶媒を添加した溶媒対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。細胞増殖抑制試験では、各用量2枚のディッシュを用いた。処理系列は溶媒対照群と被験物質処理群とした。

その結果、S9 mix非存在下および存在下で短時間処理した場合には、50%の増殖抑制濃度はそれぞれ0.18 mg/mLおよび0.19 mg/mLと推定された(Fig. 1)。また、24時間連続処理した場合、50%の増殖抑制濃度は0.11 mg/mLと推定された(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理群では50%増殖抑制濃度の約1.5倍に相当する0.28 mg/mLを最高処理濃度とし、公比1.5で5濃度(0.055, 0.083, 0.12, 0.19, 0.28 mg/mL)設定した。

陽性対照群については、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理では、マイトマイシンC(MMC, 協和醗酵工業)およびシクロホスファミド(CP, Sigma Chemical)溶液を日局注射用水(大塚製薬工場)で調製し、最終濃度がそれぞれ0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。

染色体異常試験においては、各用量4枚のディッシュ(陽性対照群では2枚)を用いた。陽性対照群以外では2枚のディッシュを用い染色体標本作製し、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を測定した。処理系列は溶媒対照群、陽性対照群および被験物質処理群とした。

8. 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0.1

$\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本の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。作製した標本は3 vol%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

細胞増殖率と分裂指数を細胞毒性の指標として、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), 観察可能な最高濃度は、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ともに0.19 mg/mLであったことから、この濃度を高濃度群として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)¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(染色体数が38本以上)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 判定

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²⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$, 片側)。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³⁾($p < 0.01$, 片側)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

4,4'-メチレンジフェノールは、S9 mix非存在下で短時間処理した場合、高濃度群で構造異常を有する細胞(19.5%)が統計学的に有意に増加し、陽性の結果が得られた(Table 1)。また、倍数性細胞については中濃度群で統計学的に有意に増加(1.8%)した(Table 1)。S9 mix存在下で短時間処理した場合には、高濃度群で構造異常を有する細胞(7.0%)が統計学的に有意に増加した(Table 2)。倍数性細胞については、中濃度群で統計学的に有意に増加(3.0%)した(Table 2)。S9 mix非存在下および存在下の短時間処理した場合ともに、誘発された倍数性細胞については、濃度依存性が認められなかったが、2つの処理条件で同様の出現パターンを示していることや高濃度群では細胞死または細胞周期の遅延により倍数性細胞が検出されない可能性が考えられることから、陽性と判断した。

以上のように、陽性の結果が得られたことから、 D_{20} 値⁴⁾を求めたところ、構造異常については、S9 mix非存

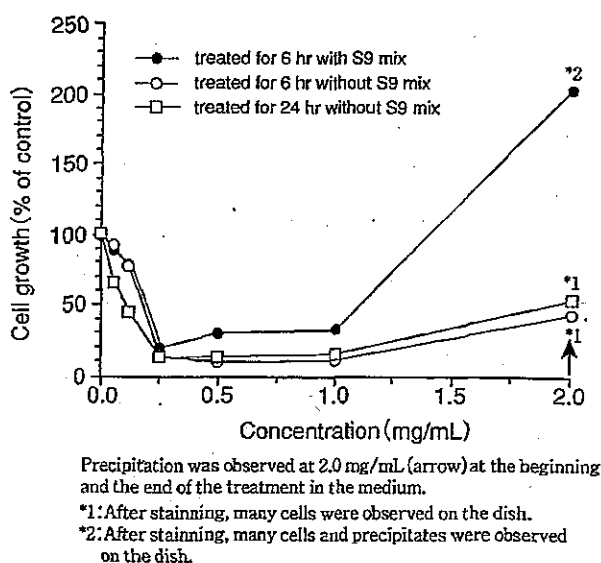


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4,4'-methylenediphenol

在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ0.26 mg/mLおよび0.64 mg/mLとなった。倍数性細胞については、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ13 mg/mLおよび3.5 mg/mLとなったが、染色体分析を行った最高濃度(0.19 mg/mL)の10倍以上の濃度であることから対象外となった。

陽性対照物質として用いたMMCは、S9 mix非存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発し(Table 1)、CPはS9 mix存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発した(Table 2)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

4,4'-メチレンジフェノールについては、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている⁵⁾。また、4,4'-メチレンジフェノールと2,2'-メチレンジフェノールと2,4'-メチレンジフェノールの混合物(混合比はそれぞれ30.2%, 18.8%, 50.0%)の染色体異常試験では、構造異常については陽性、倍数性細胞についてはS9 mix存在下で統計学的な有意差が認められている⁶⁾。このように、4,4'-メチレンジフェノールと3種類の混合物とで類似の結果が得られたことから、3種類のメチレンジフェノールの混合物で認められた染色体異常誘発作用は4,4'-メチレンジフェノールに起因する可能性も考えられる。

また、4,4'-メチレンジフェノールはビスフェノールFとしても知られているが、この関連物質であるビスフェノールA⁷⁾についてはS9 mix非存在下の短時間処理でのみ構造異常および倍数性細胞ともに疑陽性の結果が得られ、4,4'-スルホニルジフェノール(ビスフェノールS)⁸⁾についてはS9 mix非存在下および存在下の短時間処理で倍数性細胞についてのみ低頻度ながら有意差が認められている。

以上の結果より、4,4'-メチレンジフェノールは、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(編):「化学物質による染色体異常アトラス」朝倉書店, 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) 石館基(監修):「<改定>染色体異常試験データ集」エル・アイ・シー, 東京(1987)p.23.
- 5) 原 巧ら:4,4'-メチレンジフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験. 化学物質毒性試験報告, 12:389-393 (2005).

- 6) 日下部博一ら:メチレンジフェノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報, 8:967-970(2001).
- 7) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集改定」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999)p.82
- 8) 田中憲穂ら:4,4'-スルホニルジフェノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報, 7:93-96(1999).

連絡先

試験責任者: 山影康次
 試験担当者: 田中憲穂, 高橋俊孝, 若栗 忍,
 中川ゆづき, 橋本恵子, 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: Kohji Yamakage (Study director)
 Noriho Tanaka, Toshitaka Takahashi,
 Shinobu Wakuri, Yuzuki Nakagawa,
 Keiko Hashimoto, 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 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4,4'-methylenediphenol (MDP)** for 6 hr without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent ^a cell growth (%)	Mitotic ^a index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ^a	Number of cells with aberrations		Number ^b of polyploid cells (%)	Trend test ⁷	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ^a	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ^a	0	-	6-(18)	100	-	100	0	2	0	5	0	0	7	0	3(3.0)	3(3.0)	1(0.3)		
						100	1	2	0	1	0	0	4	0	4(4.0)	3(3.0)	2(0.5)		
						200	1	4	0	6	0	0	11	0	7(3.5)	6(3.0)	3(0.4)		
MDP	0.055	-	6-(18)	98	-		not observed												
MDP	0.083	-	6-(18)	96	-	100	0	1	1	2	0	0	4	1	3(3.0)	3(3.0)	1(0.3)		
						100	2	0	0	0	0	0	2	0	2(2.0)	0(0.0)	1(0.3)		
						200	2	1	1	2	0	0	6	1	5(2.5)	3(1.5)	2(0.3)		
MDP	0.12	-	6-(18)	88	-	100	2	1	1	0	0	10	14	0	5(5.0)	3(3.0)	8(2.0)		
						100	3	3	0	0	0	0	6	0	5(5.0)	3(3.0)	6(1.5)		
						200	5	4	1	0	0	10	20	0	10(5.0)	6(3.0)	14*(1.8)	+	-
MDP	0.19	-	6-(18)	69	2.6, 4.0	100	2	21	47	0	0	10	80	1	28(28.0)	28(28.0)	1(0.3)		
						100	2	9	12	0	0	0	23	0	12(12.0)	11(11.0)	1(0.3)		
						200	4	30	59	0	0	10	103	1	40(20.0)	39*(19.5)	2(0.3)		
MDP	0.28	-	6-(18)	16	-		not observed due to extreme cytotoxicity												
MMC	0.1 µg/mL	-	6-(18)	-	-	100	7	50	70	2	0	10	139	0	70(70.0)	67(67.0)	1(0.3)		
						100	3	32	73	1	0	0	109	1	59(59.0)	58(58.0)	2(0.5)		
						200	10	82	143	3	0	10	248	1	129(64.5)	125*(62.5)	3(0.4)		

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, POL; polyploid, MMC; mitomycin C.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent and added at the level of 1 vol% per dish.

2) Cell confluency representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish.

4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations.

6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$ (one-side).

*: Significantly different from the negative control at $p < 0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

** : Purity was 99.91 %.

染色体異常試験

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4,4'-methylenediphenol (MDP)** for 6 hr with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent ^a cell growth (%)	Mitotic ^a index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations								Others ^a	Number of cells with aberrations		Number ^a of polyploid cells (%)	Trend test ^a		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ^a	total	+gap(%)		-gap(%)	-gap		POL		
Negative ^a	0	+	6-(18)	100	-	100	2	0	0	0	0	0	2	0	2(2.0)	0(0.0)	2(0.5)				
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1(1.0)	1(1.0)	3(0.8)				
						200	2	1	0	0	0	3	0	3(1.5)	1(0.5)	5(0.6)					
MDP	0.055	+	6-(18)	88	-		not observed														
MDP	0.083	+	6-(18)	86	-	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1(1.0)	0(0.0)	1(0.3)				
						100	1	1	0	0	0	0	2	0	2(2.0)	1(1.0)	6(1.5)				
						200	2	1	0	0	0	3	0	3(1.5)	1(0.5)	7(0.9)					
MDP	0.12	+	6-(18)	78	-	100	0	0	3	0	0	0	3	0	1(1.0)	1(1.0)	12(3.0)				
						100	1	3	2	0	0	0	6	1	3(3.0)	2(2.0)	12(3.0)				
						200	1	3	5	0	0	0	9	1	4(2.0)	3(1.5)	24*(3.0)	+	-		
MDP	0.19	+	6-(18)	62	4.4, 1.8	100	0	9	2	0	0	10	21	1	8(8.0)	8(8.0)	9(0.0)				
						100	3	5	7	0	0	0	15	0	8(8.0)	6(6.0)	9(2.3)				
						200	3	14	9	0	0	10	36	1	16(8.0)	14*(7.0)	9(1.1)				
MDP	0.28	+	6-(18)	23	0.0, 0.0	not observed due to the small number of metaphases															
CP	10 µg/mL	+	6-(18)	-	-	100	4	25	30	3	0	0	62	0	35(35.0)	33(33.0)	1(0.3)				
						100	3	14	35	5	0	0	57	0	37(37.0)	36(36.0)	0(0.0)				
						200	7	39	65	8	0	0	119	0	72(36.0)	69*(34.5)	1(0.1)				

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, POL; polyploid, CP; cyclophosphamide.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent and added at the level of 1 vol% per dish.

2) Cell confluency representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish.

4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations.

6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$ (one-side).

*: Significantly different from the negative control at $p < 0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

** Purity was 99.91%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4,4'-methylenediphenol (MDP)** for 6 hr with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent ³⁾ cell growth (%)	Mitotic ⁴⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul*	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	+	6-(18)	100	-	100	2	0	0	0	0	0	2	0	2(2.0)	0(0.0)	2(0.5)		
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1(1.0)	1(1.0)	3(0.8)		
						200	2	1	0	0	0	3	0	3(1.5)	1(0.5)	5(0.6)			
MDP	0.055	+	6-(18)	88	-	not observed													
MDP	0.083	+	6-(18)	86	-	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1(1.0)	0(0.0)	1(0.3)		
						100	1	1	0	0	0	0	2	0	2(2.0)	1(1.0)	6(1.5)		
						200	2	1	0	0	0	3	0	3(1.5)	1(0.5)	7(0.9)			
MDP	0.12	+	6-(18)	78	-	100	0	0	3	0	0	0	3	0	1(1.0)	1(1.0)	12(3.0)		
						100	1	3	2	0	0	0	6	1	3(3.0)	2(2.0)	12(3.0)		
						200	1	3	5	0	0	0	9	1	4(2.0)	3(1.5)	24*(3.0)	+	-
MDP	0.19	+	6-(18)	62	4.4, 1.8	100	0	9	2	0	0	10	21	1	8(8.0)	8(8.0)	9(0.0)		
						100	3	5	7	0	0	0	15	0	8(8.0)	6(6.0)	9(2.3)		
						200	3	14	9	0	0	10	36	1	16(8.0)	14*(7.0)	9(1.1)		
MDP	0.28	+	6-(18)	23	0.0, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
CP	10 µg/mL	+	6-(18)	-	-	100	4	25	30	3	0	0	62	0	35(35.0)	33(33.0)	1(0.3)		
						100	3	14	35	5	0	0	57	0	37(37.0)	36(36.0)	0(0.0)		
						200	7	39	65	8	0	0	119	0	72(36.0)	69*(34.5)	1(0.1)		

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, POL; polyploid, CP; cyclophosphamide.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent and added at the level of 1 vol% per dish.

2) Cell confluency representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish.

4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations.

6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$ (one-side).

*: Significantly different from the negative control at $p < 0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

** : Purity was 99.91%.