

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with methylenediphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administraion period					Recovery period		
		0	8	40	200	1000	0	200	1000
Male									
Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	
GOT(U/L)	81.5 ± 10.0	77.3 ± 6.7	83.0 ± 10.9	68.7 ± 3.8	81.8 ± 17.2	94.8 ± 16.3	82.7 ± 9.7	94.0 ± 6.9	
GPT(U/L)	37.0 ± 5.7	38.0 ± 8.0	38.2 ± 4.6	33.8 ± 2.8	41.5 ± 2.9	36.0 ± 4.9	36.0 ± 5.3	37.0 ± 2.9	
γ-GTP(U/L)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
ALP(U/L)	857.2 ± 79.8	893.7 ± 243.9	920.0 ± 188.8	880.0 ± 153.2	913.0 ± 222.2	642.8 ± 121.7	648.8 ± 126.5	777.2 ± 147.8	
Total bilirubin (mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
Urea nitrogen (mg/dL)	18.12 ± 2.22	17.43 ± 1.05	18.72 ± 1.08	14.27 ± 0.95**	16.23 ± 2.09	18.43 ± 2.10	18.50 ± 0.85	16.88 ± 1.87	
Creatinine (mg/dL)	0.47 ± 0.05	0.45 ± 0.05	0.45 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	
Glucose (mg/dL)	145.3 ± 7.5	146.8 ± 8.7	138.2 ± 4.4	141.7 ± 13.9	134.7 ± 7.1	142.2 ± 5.3	151.2 ± 9.1	147.2 ± 9.1	
Total chol. (mg/dL)	57.5 ± 7.2	63.2 ± 7.3	66.3 ± 10.9	51.2 ± 7.0	41.0 ± 9.2**	64.7 ± 10.1	62.2 ± 8.9	57.5 ± 5.6	
Triglyceride (mg/dL)	118.3 ± 50.6	119.3 ± 42.3	124.0 ± 72.1	184.0 ± 47.1	130.8 ± 47.9	145.2 ± 57.8	151.0 ± 42.6	138.5 ± 46.4	
Total protein (g/dL)	6.58 ± 0.33	6.80 ± 0.18	6.75 ± 0.33	6.80 ± 0.26	6.87 ± 0.21	6.95 ± 0.35	6.92 ± 0.26	6.85 ± 0.30	
Albumin (g/dL)	3.38 ± 0.10	3.40 ± 0.11	3.45 ± 0.10	3.45 ± 0.10	3.47 ± 0.10	3.55 ± 0.12	3.50 ± 0.06	3.53 ± 0.10	
A/G ratio	1.060 ± 0.052	1.000 ± 0.046	1.050 ± 0.084	1.033 ± 0.079	1.020 ± 0.041	1.047 ± 0.051	1.028 ± 0.067	1.070 ± 0.081	
Calcium (mg/dL)	9.87 ± 0.26	10.00 ± 0.32	10.13 ± 0.22	9.75 ± 0.24	9.90 ± 0.28	9.92 ± 0.25	9.98 ± 0.15	9.83 ± 0.25	
Inorganic phos. (mg/dL)	7.98 ± 0.48	7.92 ± 0.23	8.10 ± 0.30	7.78 ± 0.26	8.15 ± 0.37	8.50 ± 0.46	8.60 ± 0.31	8.50 ± 0.60	
Na (mmol/L)	143.5 ± 0.8	143.8 ± 0.8	143.5 ± 1.2	143.3 ± 0.8	142.7 ± 0.8	142.5 ± 0.5	143.0 ± 0.6	143.2 ± 0.8	
K (mmol/L)	4.37 ± 0.21	4.27 ± 0.10	4.53 ± 0.31	4.58 ± 0.16	4.65 ± 0.28	4.47 ± 0.25	4.47 ± 0.14	4.52 ± 0.28	
Cl (mmol/L)	98.5 ± 1.4	98.2 ± 1.5	98.2 ± 1.2	97.7 ± 1.4	96.8 ± 2.2	95.5 ± 1.6	95.0 ± 0.9	96.8 ± 2.5	
Female									
Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	
GOT(U/L)	76.5 ± 16.3	78.2 ± 8.5	79.7 ± 7.9	77.7 ± 4.7	75.8 ± 9.2	90.7 ± 21.9	80.5 ± 15.1	85.0 ± 16.9	
GPT(U/L)	31.7 ± 3.0	29.8 ± 3.7	28.3 ± 5.3	30.5 ± 3.4	36.3 ± 7.2	27.2 ± 3.8	31.8 ± 4.7	27.2 ± 4.3	
γ-GTP(U/L)	0.2 ± 0.4	0.7 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5	2.3 ± 1.0**	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	
ALP(U/L)	481.2 ± 172.6	551.5 ± 85.7	519.7 ± 135.2	662.0 ± 134.4	691.5 ± 209.7	426.2 ± 145.8	386.2 ± 41.3	410.0 ± 97.7	
Total bilirubin (mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.05	0.00 ± 0.00	
Urea nitrogen (mg/dL)	17.00 ± 1.91	16.62 ± 4.19	16.10 ± 3.07	17.95 ± 4.53	22.18 ± 5.80	20.77 ± 7.43	24.05 ± 1.74	17.48 ± 2.45	
Creatinine (mg/dL)	0.52 ± 0.04	0.52 ± 0.04	0.53 ± 0.05	0.48 ± 0.04	0.50 ± 0.00	0.55 ± 0.05	0.58 ± 0.08	0.54 ± 0.05	
Glucose (mg/dL)	152.3 ± 8.4	151.2 ± 10.0	161.3 ± 31.3	140.2 ± 7.3	136.8 ± 6.8*	149.3 ± 12.8	160.5 ± 16.5	154.4 ± 10.9	
Total chol. (mg/dL)	79.0 ± 9.7	70.3 ± 14.3	64.7 ± 8.4*	43.3 ± 4.6**	39.0 ± 7.2**	65.2 ± 8.7	65.8 ± 14.3	76.0 ± 9.4	
Triglyceride (mg/dL)	34.8 ± 23.1	31.0 ± 9.4	14.7 ± 4.5	69.3 ± 65.6	38.2 ± 16.3	57.5 ± 54.0	48.2 ± 41.9	65.6 ± 35.5	
Total protein (g/dL)	6.90 ± 0.29	6.68 ± 0.28	6.62 ± 0.40	6.87 ± 0.35	6.77 ± 0.18	7.00 ± 0.31	6.85 ± 0.30	6.98 ± 0.40	
Albumin (g/dL)	3.55 ± 0.16	3.53 ± 0.15	3.43 ± 0.16	3.52 ± 0.16	3.43 ± 0.05	3.70 ± 0.11	3.65 ± 0.14	3.70 ± 0.25	
A/G ratio	1.063 ± 0.057	1.123 ± 0.050	1.082 ± 0.060	1.053 ± 0.060	1.032 ± 0.059	1.127 ± 0.077	1.147 ± 0.085	1.128 ± 0.036	
Calcium (mg/dL)	9.70 ± 0.28	9.67 ± 0.32	9.42 ± 0.58	9.53 ± 0.45	9.50 ± 0.37	9.50 ± 0.23	9.63 ± 0.19	9.72 ± 0.24	
Inorganic phos. (mg/dL)	7.23 ± 0.44	7.63 ± 0.38	7.47 ± 0.45	7.40 ± 0.45	7.77 ± 0.43	7.57 ± 0.60	8.03 ± 0.74	8.12 ± 0.33	
Na (mmol/L)	142.5 ± 0.8	142.3 ± 0.5	143.2 ± 1.5	143.3 ± 1.0	142.5 ± 1.0	142.3 ± 1.0	143.2 ± 1.0	142.2 ± 0.8	
K (mmol/L)	4.03 ± 0.23	4.38 ± 0.15	4.08 ± 0.34	4.18 ± 0.31	4.27 ± 0.16	4.03 ± 0.24	4.15 ± 0.88	4.22 ± 0.19	
Cl (mmol/L)	97.8 ± 1.3	98.5 ± 1.6	99.2 ± 1.8	99.0 ± 2.2	97.7 ± 1.2	96.5 ± 2.1	99.0 ± 1.1*	97.2 ± 1.1	

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with methylenediphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period									
		Male					Female				
		0	8	40	200	1000	0	8	40	200	1000
Number of animals		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
pH	6.5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	7.0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2
	7.5	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	8.0	3	2	4	2	5	2	1	1	1	2
	8.5	2	4	1	3	1	2	5	4	3	1
	≥9	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
Protein	-	0	0	0	0	0	2	1	2	4	4
(mg/dL)	+/-	0	0	0	0	1	1	3	2	1	2
	30	0	4	2	2	3	2	2	0	1	0
	100	6	2	4	4	2	1	0	2	0	0
	≥300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucose	-	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
(g/dL)	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	≥1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketones	-	0	0	0	0	0	3	3	4	4	2
(mg/dL)	5	1	3	2	4	4	3	3	2	2	4
	15	5	3	4	2	2	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	≥80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen	0.1	5	6	4	6	6	4	5	4	5	6
(EU/dL)	1.0	1	0	2	0	0	2	1	2	1	0
	2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	≥8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Grade; -:negative, +/-:trace, 1+:slight, 2+:moderate, 3+:severe.

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with methylenediphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administraion period					Recovery period		
		0	8	40	200	1000	0	200	1000
Male									
Number of animals		6	6	6	6	6	6	6	6
Final body weight (g)		391.8 ± 18.1	388.8 ± 31.0	392.0 ± 29.0	386.7 ± 25.8	345.7 ± 25.4*	462.3 ± 20.0	475.5 ± 33.9	446.5 ± 34.0
Absolute organ weight									
Brain (g)		2.043 ± 0.053	2.033 ± 0.064	2.022 ± 0.105	2.002 ± 0.087	1.997 ± 0.074	2.058 ± 0.050	2.077 ± 0.091	2.022 ± 0.051
Pituitary (mg)		15.23 ± 1.92	13.32 ± 1.14	12.67 ± 1.22*	13.08 ± 1.21*	12.70 ± 1.40*	15.47 ± 1.20	15.27 ± 1.71	14.60 ± 1.07
Thyroids (mg)		24.80 ± 5.97	25.42 ± 4.61	25.02 ± 2.57	26.80 ± 2.79	23.47 ± 4.14	26.30 ± 3.49	24.30 ± 5.35	26.37 ± 1.44
Thymus (mg)		676.3 ± 114.3	770.0 ± 204.6	749.7 ± 107.8	726.5 ± 126.9	555.0 ± 89.1	610.2 ± 96.2	533.7 ± 95.0	482.3 ± 101.3
Lungs (g)		1.445 ± 0.079	1.462 ± 0.117	1.493 ± 0.138	1.407 ± 0.123	1.300 ± 0.073	1.522 ± 0.097	1.607 ± 0.061	1.532 ± 0.084
Heart (g)		1.320 ± 0.061	1.250 ± 0.152	1.412 ± 0.247	1.342 ± 0.125	1.223 ± 0.124	1.408 ± 0.092	1.405 ± 0.099	1.525 ± 0.126
Liver (g)		15.385 ± 1.082	15.387 ± 1.612	15.295 ± 2.349	16.757 ± 1.980	15.987 ± 2.155	16.833 ± 0.635	16.603 ± 1.355	16.932 ± 2.281
Spleen (g)		0.823 ± 0.062	0.810 ± 0.078	0.875 ± 0.078	0.803 ± 0.092	0.810 ± 0.085	0.828 ± 0.078	0.860 ± 0.073	0.885 ± 0.092
Kidneys (g)		2.898 ± 0.239	2.732 ± 0.284	2.762 ± 0.253	2.812 ± 0.145	2.650 ± 0.203	2.917 ± 0.162	3.005 ± 0.252	2.968 ± 0.280
Adrenals (mg)		59.05 ± 7.54	55.70 ± 10.10	52.25 ± 3.42	51.17 ± 6.10	52.33 ± 4.81	57.45 ± 4.51	59.55 ± 10.59	52.25 ± 5.06
Testes (g)		3.048 ± 0.133	2.943 ± 0.154	3.158 ± 0.323	2.933 ± 0.237	3.037 ± 0.240	3.483 ± 0.230	3.325 ± 0.236	3.167 ± 0.175
Epididymides (g)		0.813 ± 0.096	0.843 ± 0.097	0.823 ± 0.106	0.813 ± 0.074	0.778 ± 0.050	1.087 ± 0.065	1.127 ± 0.096	1.037 ± 0.061
Relative organ weight									
Brain (%)		0.523 ± 0.022	0.527 ± 0.033	0.520 ± 0.046	0.520 ± 0.039	0.580 ± 0.040*	0.447 ± 0.024	0.438 ± 0.038	0.455 ± 0.036
Pituitary (×10 ⁻³ %)		3.88 ± 0.33	3.42 ± 0.10*	3.25 ± 0.25**	3.38 ± 0.30**	3.68 ± 0.23	3.35 ± 0.26	3.18 ± 0.20	3.30 ± 0.38
Thyroids (×10 ⁻³ %)		6.32 ± 1.44	6.50 ± 0.80	6.40 ± 0.62	6.95 ± 0.82	6.77 ± 0.95	5.70 ± 0.74	5.08 ± 0.95	5.95 ± 0.75
Thymus (×10 ⁻³ %)		172.57 ± 27.93	197.47 ± 47.00	190.95 ± 21.00	187.30 ± 25.03	160.32 ± 21.40	132.18 ± 21.36	112.67 ± 20.80	107.83 ± 21.25
Lungs (%)		0.368 ± 0.017	0.375 ± 0.022	0.382 ± 0.023	0.362 ± 0.025	0.377 ± 0.021	0.330 ± 0.018	0.338 ± 0.023	0.343 ± 0.022
Heart (%)		0.337 ± 0.023	0.322 ± 0.019	0.358 ± 0.045	0.348 ± 0.039	0.355 ± 0.031	0.303 ± 0.008	0.297 ± 0.010	0.345 ± 0.027*
Liver (%)		3.923 ± 0.149	3.953 ± 0.200	3.888 ± 0.387	4.322 ± 0.225	4.610 ± 0.352**	3.645 ± 0.161	3.493 ± 0.129	3.778 ± 0.246
Spleen (%)		0.210 ± 0.015	0.208 ± 0.012	0.223 ± 0.023	0.208 ± 0.020	0.235 ± 0.018	0.180 ± 0.018	0.183 ± 0.020	0.200 ± 0.017
Kidneys (%)		0.738 ± 0.040	0.700 ± 0.026	0.703 ± 0.044	0.730 ± 0.040	0.767 ± 0.019	0.632 ± 0.027	0.635 ± 0.054	0.665 ± 0.045
Adrenals (×10 ⁻³ %)		15.05 ± 1.67	14.38 ± 2.60	13.33 ± 0.77	13.32 ± 2.10	15.17 ± 0.94	12.43 ± 1.32	12.53 ± 2.04	11.77 ± 1.58
Testes (%)		0.778 ± 0.038	0.760 ± 0.053	0.805 ± 0.079	0.763 ± 0.097	0.882 ± 0.080	0.753 ± 0.029	0.703 ± 0.077	0.713 ± 0.062
Epididymides (%)		0.208 ± 0.031	0.218 ± 0.028	0.210 ± 0.043	0.212 ± 0.026	0.227 ± 0.014	0.235 ± 0.008	0.238 ± 0.038	0.233 ± 0.020
Female									
Number of animals		6	6	6	6	6	6	6	5
Final body weight (g)		228.3 ± 24.2	246.0 ± 17.9	224.8 ± 13.7	223.5 ± 10.4	215.2 ± 12.7	266.2 ± 15.9	253.0 ± 24.3	255.2 ± 21.4
Absolute organ weight									
Brain (g)		1.868 ± 0.051	1.852 ± 0.061	1.898 ± 0.092	1.897 ± 0.055	1.805 ± 0.040	1.898 ± 0.044	1.933 ± 0.073	1.904 ± 0.019
Pituitary (mg)		14.17 ± 2.08	15.67 ± 1.44	14.55 ± 2.17	14.65 ± 1.88	11.58 ± 1.04	15.45 ± 1.84	16.23 ± 3.41	15.84 ± 2.23
Thyroids (mg)		17.97 ± 1.72	16.92 ± 1.21	18.18 ± 2.59	17.60 ± 2.26	18.23 ± 2.71	19.30 ± 2.34	21.67 ± 3.28	19.76 ± 1.01
Thymus (mg)		525.8 ± 128.9	565.5 ± 167.8	477.2 ± 97.8	536.2 ± 81.8	382.0 ± 33.7	475.5 ± 107.1	426.5 ± 57.9	440.0 ± 69.6
Lungs (g)		1.110 ± 0.064	1.118 ± 0.055	1.098 ± 0.101	1.077 ± 0.049	1.035 ± 0.051	1.177 ± 0.088	1.077 ± 0.099	1.132 ± 0.070
Heart (g)		0.863 ± 0.068	0.870 ± 0.078	0.830 ± 0.049	0.797 ± 0.075	0.785 ± 0.035	0.917 ± 0.067	0.932 ± 0.069	0.902 ± 0.071
Liver (g)		8.017 ± 1.451	8.538 ± 1.024	7.688 ± 0.693	8.808 ± 0.530	9.575 ± 0.926*	8.370 ± 0.909	8.093 ± 0.842	9.394 ± 1.295
Spleen (g)		0.533 ± 0.082	0.545 ± 0.052	0.535 ± 0.054	0.517 ± 0.047	0.515 ± 0.059	0.550 ± 0.124	0.533 ± 0.068	0.592 ± 0.096
Kidneys (g)		1.635 ± 0.172	1.708 ± 0.104	1.672 ± 0.132	1.752 ± 0.089	1.605 ± 0.133	1.772 ± 0.065	1.707 ± 0.117	1.712 ± 0.135
Adrenals (mg)		56.55 ± 3.66	63.77 ± 5.57	68.47 ± 7.26	70.70 ± 13.22	66.62 ± 7.50	62.77 ± 7.64	69.07 ± 7.45	73.86 ± 12.73
Ovaries (mg)		84.12 ± 4.57	91.38 ± 7.90	94.53 ± 11.52	82.48 ± 10.07	90.95 ± 17.59	90.08 ± 14.20	96.95 ± 11.92	86.92 ± 16.27
Uterus (g)		0.568 ± 0.210	0.402 ± 0.085	0.523 ± 0.214	0.757 ± 0.325	0.377 ± 0.094	0.485 ± 0.192	0.465 ± 0.106	0.484 ± 0.188
Relative organ weight									
Brain (%)		0.827 ± 0.081	0.753 ± 0.041	0.848 ± 0.065	0.850 ± 0.043	0.840 ± 0.054	0.717 ± 0.046	0.768 ± 0.056	0.750 ± 0.060
Pituitary (×10 ⁻³ %)		6.30 ± 1.34	6.40 ± 0.70	6.47 ± 0.81	6.55 ± 0.71	5.37 ± 0.22	5.85 ± 0.94	6.47 ± 1.59	6.22 ± 0.92
Thyroids (×10 ⁻³ %)		7.93 ± 1.19	6.93 ± 0.90	8.12 ± 1.28	7.85 ± 0.84	8.48 ± 1.21	7.22 ± 0.49	8.65 ± 1.71	7.76 ± 0.46
Thymus (×10 ⁻³ %)		231.83 ± 61.54	227.88 ± 57.66	212.63 ± 44.11	239.97 ± 34.87	177.63 ± 13.74	177.92 ± 33.20	169.12 ± 23.04	174.54 ± 37.44
Lungs (%)		0.490 ± 0.030	0.457 ± 0.019	0.490 ± 0.037	0.483 ± 0.027	0.482 ± 0.029	0.442 ± 0.031	0.428 ± 0.050	0.444 ± 0.026
Heart (%)		0.380 ± 0.038	0.353 ± 0.026	0.372 ± 0.016	0.357 ± 0.040	0.367 ± 0.022	0.345 ± 0.027	0.368 ± 0.017	0.352 ± 0.011
Liver (%)		3.488 ± 0.266	3.468 ± 0.298	3.413 ± 0.139	3.942 ± 0.175*	4.445 ± 0.271**	3.140 ± 0.220	3.203 ± 0.200	3.668 ± 0.212**
Spleen (%)		0.233 ± 0.021	0.222 ± 0.017	0.238 ± 0.017	0.230 ± 0.021	0.242 ± 0.018	0.207 ± 0.039	0.210 ± 0.022	0.230 ± 0.027
Kidneys (%)		0.718 ± 0.037	0.697 ± 0.059	0.742 ± 0.043	0.787 ± 0.043	0.745 ± 0.053	0.667 ± 0.042	0.677 ± 0.039	0.672 ± 0.043
Adrenals (×10 ⁻³ %)		25.07 ± 3.55	25.98 ± 2.00	30.50 ± 3.35	31.72 ± 6.18*	30.93 ± 2.87*	23.70 ± 3.40	27.37 ± 2.52	28.84 ± 3.54*
Ovaries (×10 ⁻³ %)		37.03 ± 2.72	37.35 ± 4.40	42.13 ± 5.21	36.88 ± 3.99	42.23 ± 7.50	34.00 ± 5.98	38.78 ± 7.21	34.02 ± 5.13
Uterus (%)		0.252 ± 0.095	0.162 ± 0.029	0.233 ± 0.098	0.337 ± 0.140	0.175 ± 0.042	0.180 ± 0.065	0.188 ± 0.048	0.190 ± 0.075

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 5 Summary of histopathological findings of rats treated orally with methylenediphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period					Recovery period		
			0	8	40	200	1000	0	200	1000
	Finding	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Male		(Grade)								
	Mandibular lymph node		<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<1>
	Blood absorption	1+								1
	Nasal cavity		<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>
	Inflammatory cell infiltration, respiratory epithelium	2+	0	0	0	0	1	0	0	0
	Inflammatory cell infiltration, respiratory epithelium, focal	1+	0	0	0	0	0	0	0	1
	Lung		<0>	<2>	<0>	<1>	<0>	<0>	<0>	<0>
	Hemorrhage, focal	1+		2		1				
	Stomach		<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>
	Hyperplasia, squamous, forestomach, diffuse	2+	0	0	0	0	2	0	0	0
	Hyperplasia, squamous, limiting ridge	total	0	0	0	0	6**	0	0	1
		1+	0	0	0	0	4	0	0	1
		2+	0	0	0	0	2	0	0	0
	Ulcer, forestomach	2+	0	0	0	0	2	0	0	0
	Liver		<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>
	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total	0	0	0	2	4*	0	0	2
		1+	0	0	0	2	2	0	0	2
		2+	0	0	0	0	2	0	0	0
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+	0	1	0	0	0	0	0	0
	Microgranuloma	total	4	6	5	6	2	6	5	5
		1+	3	5	5	5	1	6	5	3
		2+	1	1	0	1	1	0	0	2
	Kidney		<6>	<0>	<1>	<2>	<6>	<2>	<0>	<0>
	Basophilic tubule, distal	1+	2		0	2	3	2		
	Cyst	1+	0		0	0	0	1		
		2+	0		0	2	0	0		
	Dilatation, tubule, distal	1+	0		0	0	1	0		
	Fibrosis, focal	total	0		1	2	1	1		
		1+	0		0	2	1	1		
		2+	0		1	0	0	0		
	Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal	total	6		1	2	6	2		
		1+	5		1	0	4	1		
		2+	1		0	2	2	1		

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, total: total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

Sex	Organ Finding	Dose level (mg/kg) Number of animals	Administration period					Recovery period		
			0	8	40	200	1000	0	200	1000
			6	6	6	6	6	6	6	5
Female			(Grade)							
Stomach			<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<5>
	Hyperplasia, squamous, forestomach, diffuse	2+	0	0	0	0	3	0	0	0
	Hyperplasia, squamous, limiting ridge	total	0	0	0	0	6**	0	0	1
		1+	0	0	0	0	5	0	0	1
		2+	0	0	0	0	1	0	0	0
	Ulcer, forestomach	total	0	0	0	0	2	0	0	0
		1+	0	0	0	0	1	0	0	0
		2+	0	0	0	0	1	0	0	0
Liver			<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<6>	<5>
	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total	0	0	0	2	4*	0	0	1
		1+	0	0	0	2	1	0	0	1
		2+	0	0	0	0	3	0	0	0
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+	1	0	0	0	0	0	0	0
	Microgranuloma	total	5	6	6	6	5	3	6	5
		1+	5	6	5	6	5	3	5	4
		2+	0	0	1	0	0	0	1	1
	Proliferation, bile duct	1+	0	0	0	0	0	0	1	0
	Vacuolation, hepatocyte	1+	0	0	0	0	1	0	0	0
Kidney			<6>	<0>	<1>	<0>	<6>	<0>	<0>	<0>
	Basophilic tubule, distal	1+	3		1		1			
	Dilatation, tubule, distal	1+	1		0		0			
	Fibrosis, focal	total	2		1		0			
		1+	1		1		0			
		2+	1		0		0			
Cerebrum			<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<1>	<0>
	Dilatation, cerebral ventricle	2+							1	

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, total: total of positive grade.

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

Moribund animal

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				
			0	8	40	200	1000
	Finding	Number of animals	0	0	0	0	1
Female		(Grade)					
	Thymus		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Atrophy, acute	1+					1
	Spleen		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Atrophy, white pulp	2+					1
	Stomach		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Hemorrhage, glandular stomach, diffuse	1+					1
	Hyperplasia, squamous, forestomach, diffuse	2+					1
	Hyperplasia, squamous, limiting ridge	1+					1
	Ulcer, forestomach	2+					1
	Duodenum		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Atrophy, mucosa	1+					1
	Jejunum		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Atrophy, mucosa	1+					1
	Ileum		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Atrophy, mucosa	1+					1
	Hyperplasia, lymphoid tissue	1+					1
	Liver		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Atrophy, hepatocyte	1+					1
	Ovary		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Atrophy	1+					1
	Adrenal		<#>	<#>	<#>	<#>	<1>
	Congestion	2+					1

<>: Number of animals examined; #: Not examined.
Grade; 1+: slight, 2+: moderate

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, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾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 ϕ 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℃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℃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*)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、ニュートリエントブロス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℃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 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ 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(キッコマン(株))を用いた。

5. 試験方法

ブレインキューベーション法³⁾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℃で20分間ブレインキューベーションしたのち、約45℃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℃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 μ 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 μ g/plate以上で、S9 mix添加試験においては*Salmonella*の4菌株では1500 μ g/plate以上で、WP2 *uvrA*では5000 μ 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 μ g/plate、S9 mix添加試験においてはTA100、TA1535およびTA1537では1250 μ g/plate、TA98では2500 μ g/plate、WP2-*uvrA*では5000 μ 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の結果が得られている⁵⁾。

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		
S9 mix (-)	0	149	148	138	9	14	7	24	27	32	21	14	24
		(145 $\pm$ 6.1)			(10 $\pm$ 3.6)			(28 $\pm$ 4.0)			(20 $\pm$ 5.1)		
	39.1	157	131	125	17	11	11	29	25	16	25	19	19
		(138 $\pm$ 17.0)			(13 $\pm$ 3.5)			(23 $\pm$ 6.7)			(21 $\pm$ 3.5)		
	78.1	152	156	153	20	15	18	37	26	20	18	17	24
		(154 $\pm$ 2.1)			(18 $\pm$ 2.5)			(28 $\pm$ 8.6)			(20 $\pm$ 3.8)		
	156	142	128	136	14	18	16	20	29	28	16	21	31
		(135 $\pm$ 7.0)			(16 $\pm$ 2.0)			(26 $\pm$ 4.9)			(23 $\pm$ 7.6)		
	313	144	139	149	13	8	18	22	37	15	18	20	26
		(144 $\pm$ 5.0)			(13 $\pm$ 5.0)			(25 $\pm$ 11.2)			(21 $\pm$ 4.2)		
S9 mix (+)	625	129	153	142	14	14	18	27	20	17	18	17	14
		(141 $\pm$ 12.0)			(15 $\pm$ 2.3)			(21 $\pm$ 5.1)			(16 $\pm$ 2.1)		
	1250	22*	0*	0*	2*	0*	0*	11*	17*	13*	0*	0*	0*
		(7 $\pm$ 12.7)			(1 $\pm$ 1.2)			(14 $\pm$ 3.1)			(0 $\pm$ 0.0)		
	0	110	121	113	9	7	10	34	27	39	20	27	25
		(115 $\pm$ 5.7)			(9 $\pm$ 1.5)			(33 $\pm$ 6.0)			(24 $\pm$ 3.6)		
	39.1	181	168	186	12	14	15	NT			NT		
S9 mix (+)		(178 $\pm$ 9.3)			(14 $\pm$ 1.5)						(12 $\pm$ 5.9)		
	78.1	170	171	155	13	9	11	NT			26	22	39
		(165 $\pm$ 9.0)			(11 $\pm$ 2.0)						(29 $\pm$ 8.9)		
	156	167	154	194	15	8	14	54	38	49	22	31	28
		(172 $\pm$ 20.4)			(12 $\pm$ 3.8)			(47 $\pm$ 8.2)			(27 $\pm$ 4.6)		
	313	163	189	182	17	9	10	44	40	32	28	33	23
		(178 $\pm$ 13.5)			(12 $\pm$ 4.4)			(39 $\pm$ 6.1)			(28 $\pm$ 5.0)		
	625	125	148	184	15	9	8	28	41	35	24	21	13
		(152 $\pm$ 29.7)			(11 $\pm$ 3.8)			(35 $\pm$ 6.5)			(19 $\pm$ 5.7)		
Positive control S9 mix (-)	1250	80*	147*	156*	0*	0*	0*	22	20	24	32	21	18
		(128 $\pm$ 41.5)			(0 $\pm$ 0.0)			(22 $\pm$ 2.0)			(24 $\pm$ 7.4)		
	2500	NT			NT			0*	0*	0*	0*	0*	0*
								(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)		
Positive control S9 mix (+)	5000	NT			NT			0*	0*	0*	NT		
								(0 $\pm$ 0.0)					
	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies/plate	502	501	530	682	632	703	194	239	227	623	601	555
		(511 $\pm$ 16.5)			(672 $\pm$ 36.5)			(220 $\pm$ 23.3)			(593 $\pm$ 34.7)		
	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies/plate	814	843	823	474	486	489	1069	1065	1163	435	426	346
		(827 $\pm$ 14.8)			(483 $\pm$ 7.9)			(1099 $\pm$ 55.5)			(402 $\pm$ 49.0)		

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

2×10^4 個の CHL/IU 細胞を、培養液 5 mL を入れたデイスコ (径 6 cm, Corning) に播き、37 °C の CO₂ インキュベーター (5 % CO₂) 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-ベンゾフラボンとを投与した雄 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、10 ϕ 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))