

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、 $101.8 \pm 19.6 \times 10^4/\mu\text{L}^3$ 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血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

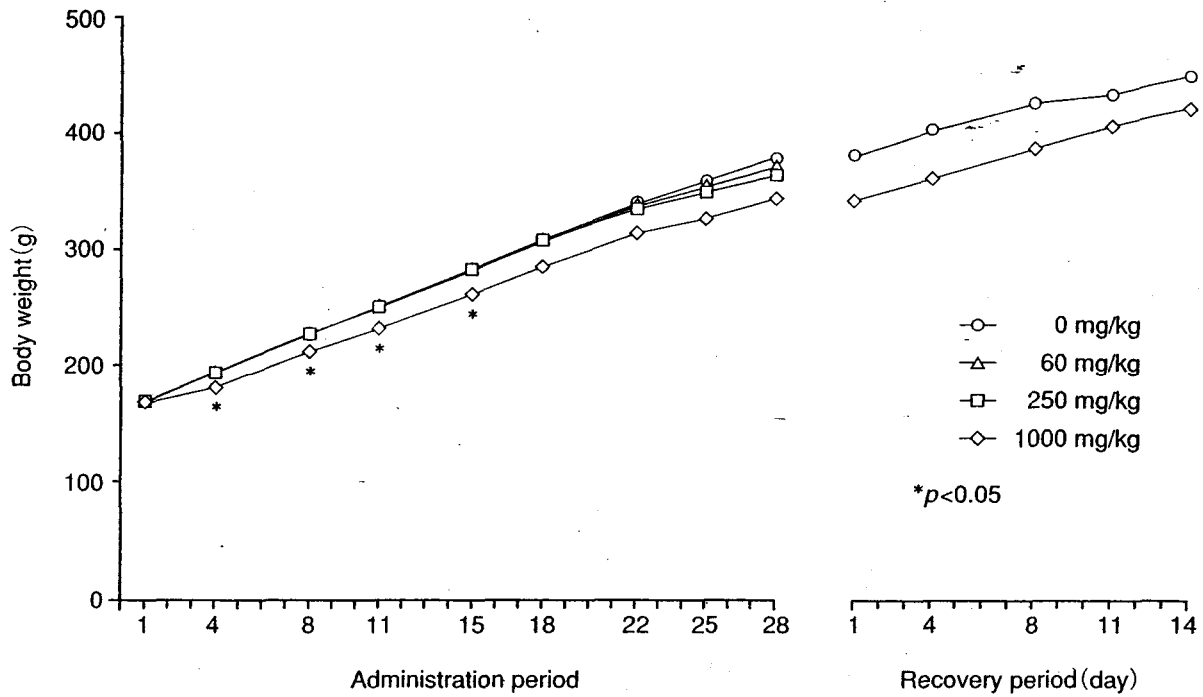


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 4,4'-methylenediphenol in 28-day repeated dose toxicity test

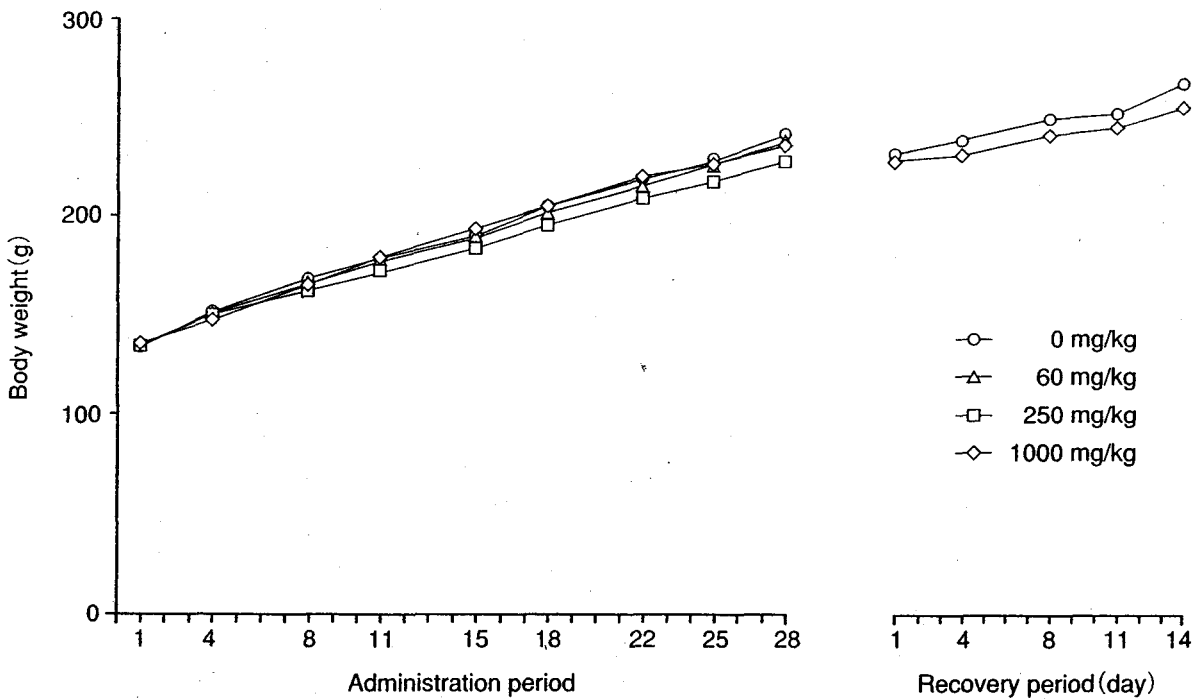


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 4,4'-methylenediphenol in 28-day repeated dose toxicity test

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

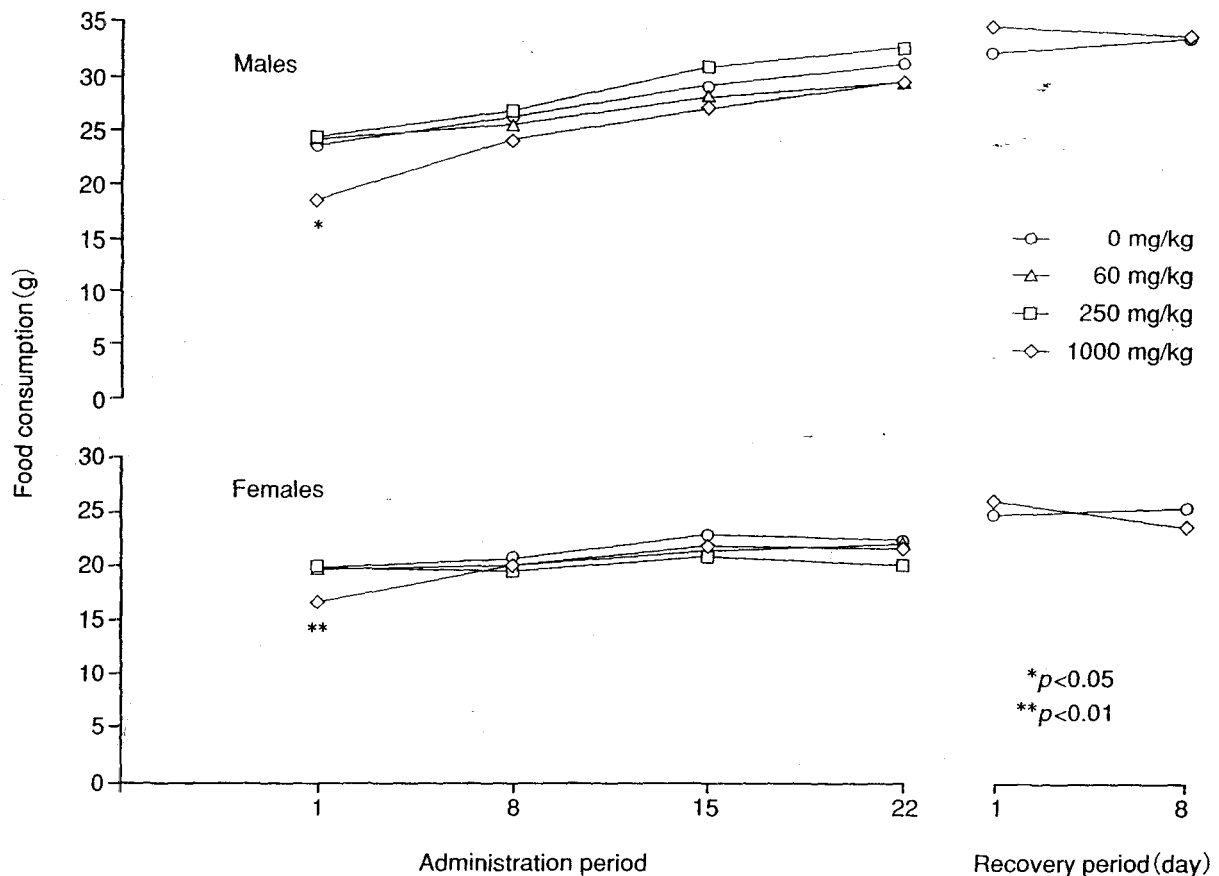


Fig. 3 Food consumption in male and female rats treated orally with 4,4'-methylene-diphenol in 28-day repeated dose toxicity test

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的肥大が観察され、そのうち1000 mg/kg 投与群の変化の程度は、250 mg/kg 投与群と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、髓質に鉍質沈着が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)}					
pH						
	5.5	0	0	0	1	0
	6.0	0	0	0	0	0
	6.5	0	0	0	3	0
	7.0	0	0	2	3	1
	7.5	5	1	3	3	2
	8.0	3	3	0	0	2
	8.5	2	0	0	0	0
	≥9.0	0	1	0	0	0
				**		
Protein ^{b)}	-	0	1	0	4	1
	±	3	2	4	1	2
	+	7	2	1	3	2
	++	0	0	0	2	0
Ketone ^{c)}	-	7	1	1	7	2
	±	3	4	4	3	3
	+	0	0	0	0	0
Occult blood ^{c)}	-	10	5	5	8	5
	+	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	2	0
Urobilinogen ^{d)}	±	10	5	5	9	5
	+	0	0	0	1	0
Microscopic examination of urinary sediment						
Red blood cells ^{e)}	-	10	5	5	8	5
	+	0	0	0	1	0
	++	0	0	0	1	0
Crystal ^{f)}	-	0	0	0	0	1
	±	10	5	5	10	4
						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 ^{d)}					
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 ^{b)}	-	7	5	5	7	3
	±	2	0	0	0	0
	+	1	0	0	1	2
	++	0	0	0	2	0
Ketone ^{c)}	-	9	5	5	10	4
	±	1	0	0	0	1
Bilirubin ^{c)}	-	10	5	5	9	4
	+	0	0	0	1	1
Urobilinogen ^{d)}	±	8	5	5	8	3
	+	2	0	0	2	2
Microscopic examination of urinary sediment						
Crystal ^{e)}	-	0	1	1	1	0
	±	10	4	4	7	5
	+	0	0	0	2	0
Epithelial cells ^{f)}	-	9	4	5	9	5
	±	1	1	0	1	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 ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	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 ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	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'-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
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	448.4 ± 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 ± 2.886**	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'-methylenediphenol 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:WJ4459, 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*)、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、ニュートリエントブロス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・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) *Salmonella typhimurium* 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

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(キッコーマン)を用いた。

5. 試験方法

プレインキュベーション法³⁾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に保温したトッパアガー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, 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).