

- 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」, サイエントリスト社, 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.) <sup>a</sup>														
		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 <sup>d</sup>			SA <sup>b</sup>			AF2			AF2			9AA <sup>c</sup>		
	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 <sup>d</sup>			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*	8*	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 <sup>a)</sup>			SA <sup>b)</sup>			AF2			AF2			9AA <sup>c)</sup>		
	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 <sup>d)</sup>			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.

*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、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)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, MgCl<sub>2</sub> 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

2×10<sup>4</sup>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、CO<sub>2</sub>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 μg/mLおよび10 μg/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

μg/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)<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、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<sup>2)</sup>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ラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup>( $p < 0.01$ , 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<sup>4)</sup>を求めたところ、構造異常については、S9 mix非存

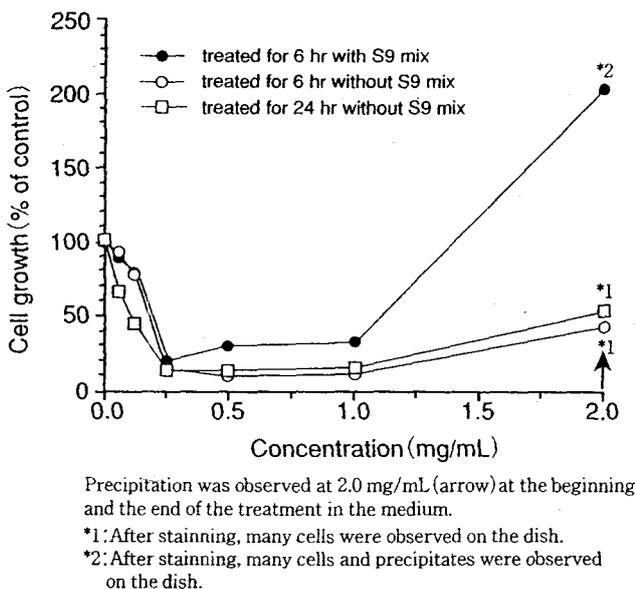


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4,4'-methylenediphenol

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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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A<sup>7)</sup>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)<sup>8)</sup>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'-methylendiphenol (MDP)\*\* for 6 hr without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent <sup>a)</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>b)</sup> index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations										Number of cells with aberrations		Number <sup>c)</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>d)</sup>	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>e)</sup>	total	Others <sup>f)</sup>	+gap (%)	-gap (%)	-gap	POL			
Negative <sup>b)</sup>	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 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 %.

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 <sup>a</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>b</sup> index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others <sup>c</sup>	Number of cells with aberrations		Number <sup>d</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>e</sup>	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>f</sup>	total		+gap(%)	-gap(%)		-gap	POL
Negative <sup>g</sup>	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	1	0	1(1.0)	0(0.0)	1(0.3)			
						100	1	1	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	3	0	1(1.0)	1(1.0)	12(3.0)			
						100	1	3	2	0	0	6	1	3(3.0)	2(2.0)	12(3.0)			
						200	1	3	5	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	15	0	8(8.0)	6(6.0)	9(2.3)			
						200	3	14	9	0	0	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	57	0	37(37.0)	36(36.0)	0(0.0)			
						200	7	39	65	8	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 <sup>a</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>b</sup> index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations										Number of cells with aberrations		Number <sup>c</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>d</sup>
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>e</sup>	total	Others <sup>f</sup>	+gap (%)	-gap (%)	-gap	POL		
Negative <sup>h</sup>	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	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	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%.