

2004年11月10日

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

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

## 【目 次】

|                     | 頁  |
|---------------------|----|
| 要 約 -----           | 1  |
| 試験目的 -----          | 2  |
| 材料および方法 -----       | 3  |
| 1. 被験物質 -----       | 3  |
| 2. 陽性対照物質 -----     | 3  |
| 3. 検定菌 -----        | 3  |
| 4. 試験材料 -----       | 4  |
| 5. 被験物質調製液の調製 ----- | 5  |
| 6. 試験操作 -----       | 6  |
| 7. 判定 -----         | 6  |
| <br>                |    |
| 結果および考察 -----       | 8  |
| 1. 用量設定試験 -----     | 8  |
| 2. 本試験 -----        | 8  |
| 参考文献 -----          | 10 |
| Tables       1～3    |    |
| Figures      1、2    |    |

## 【要 約】

4,4'-メチレンジフェノールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *wvrA* の5菌株を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加および添加条件で試験を行った。

用量設定試験を50.0～5000 µg/plate の範囲に公比約3で5用量を設定して行ったところ、用いたすべての検定菌のS9 mix 無添加および添加条件ともに、1500 µg/plate 以上の用量において生育阻害が認められた。

これらの結果に基づき、最高用量をすべての検定菌について2500 µg/plate とし、いずれについても公比2で6用量（78.1～2500 µg/plate）を設定して、2回の本試験を行った。その結果、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、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。

## 【試 験 目 的】

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、4,4'-メチレンジフェノールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法<sup>1)</sup>により実施した。

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（昭和 62 年 3 月 31 日、環  
保業第 237 号、薬発第 306 号、62 基局第 303 号、一部改正平成 9 年 10 月 31 日、環保安第  
287 号、衛生第 127 号、平成 09・10・31 基局第 2 号）および「OECD 化学物質試験法ガイ  
ドライン 471／細菌を用いる復帰突然変異試験」（1997 年 7 月 21 日採択）に基づき、「化  
学物質 GLP」（平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・  
14 基局第 1 号）を遵守して実施した。

## 【材料および方法】

### 1. 被験物質

被験物質である 4,4'-メチレンジフェノール [英名: 4,4'-Methylenediphenol、ロット番号：  
、製造： ] は白色結晶であり、 から提供  
を受けた。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は、使用時まで密  
閉、遮光して室温で保管した。

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。なお、  
被験物質に関する資料 (非 GLP データ) は、被験物質提供者の責任に基づき確認、提供さ  
れた資料であることから、試験結果の信頼性を損なうものではないと判断した。

### 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、それぞれを結果の各 Table 中に示した。

| 名称                                   | 略称  | 製造者             | ロット番号 (購入日)               | 純度    |
|--------------------------------------|-----|-----------------|---------------------------|-------|
| 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-<br>2-フリル)アクリルアミド | AF2 | 和光純薬工業(株)       | CKQ1402<br>(2001年9月13日)   | 99.0% |
| アジ化ナトリウム                             | SA  | 和光純薬工業(株)       | ELE2329<br>(2001年5月15日)   | 99.2% |
| 9-アミノアクリジン                           | 9AA | Sigma Chem. Co. | 106F06681<br>(2001年5月15日) | 97%以上 |
| 2-アミノアントラセン                          | 2AA | 和光純薬工業(株)       | DWK5667<br>(2001年9月13日)   | 97.4% |

AF2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業(株)、ロット番号：  
WAR5208 および WAJ4459) に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製した後-20℃で  
凍結保存し、調製後 6 か月以内のものを用時に解凍して用いた。

### 3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従って、*Salmonella typhimurium* (以下、  
*S. typhimurium*) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* (以下、*E. 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、いずれも日本バイオアッセイ研究センターから分与された。

*S. typhimurium* の4菌株を用いる試験は、サルモネラ菌（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異<sup>2)</sup>、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異<sup>3)</sup>を指標とした変異原性の検出系である。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを用い、特性確認は各菌株の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変異コロニー数について調べた。

試験に際して、ニュートリエントブロス No.2 (Oxoid Ltd.) を12 mL入れたL字型試験管に解凍した種菌を12 μL (TA100、TA98 および TA1535) あるいは6 μL (TA1537 および WP2 *uvrA*) 接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを試験菌液とした。分光光度計 (株島津製作所、型式: UV-120-02) により660 nmの吸光度を測定し、試験菌液の増殖を確認した。試験に用いた検定菌の生菌数を段階希釈法により求め、Appendix 2に示した。

#### 4. 試験材料

##### 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 [ロット番号: DZA39D01、2002年9月13日製造 (用量設定試験) および、ロット番号: DZA41N01、2003年1月23日製造 (本試験IおよびII)] を用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりで、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。

|                |        |
|----------------|--------|
| 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(株)) | 15 g   |

## 2) トップアガー

下記の水溶液 (A) に (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) <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、用時氷冷下で混合して調製した。

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

\* : 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および 5,6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン株、ロット番号 : RAA-475、2002 年 12 月 6 日製造) を購入し、-80°C で凍結保存し、用時に解凍して用いた。PB および BF の投与量は 1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したもので、肝臓の摘出および S9 の調製は 5 日目であった。

## 5. 被験物質調製液の調製

被験物質は、50 mg/mL の濃度で水には溶解しないが、DMSO には溶解することから、試験に際しては、DMSO (和光純薬工業株、ロット番号 : WAJ4459) に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して、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。

## 6. 試験操作

試験は、プレインキュベーション法により、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加条件および哺乳動物（ラット）のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する S9 mix 添加条件で行った。

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、試験菌液 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、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 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。陰性および陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

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（システムサイエンス㈱、CA-11）または目視により算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により観察した。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。

なお、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ合成培地平板上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

上記の方法により、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、結果の再現性を確認した。

## 7. 判定

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、陰性対照値のそれに比べて 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、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。



## 【結果および考察】

### 1. 用量設定試験

「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471／細菌を用いる復帰突然変異試験」に従って、最高用量を 5000 µg/plate とし、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 5 段階の用量を設定して用量設定試験を行った (Table 1)。その結果、用いたすべての検定菌の S9 mix 無添加および添加条件ともに、1500 µg/plate 以上の用量において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。

以上の結果から、本試験における最高用量を、用いるすべての検定菌について 2500 µg/plate とした。

### 2. 本試験

上記の最高用量に基づき、公比 2 で 6 用量 (78.1～2500 µg/plate) を設定して、いずれも 2 回の本試験を行った (Table 2, 3, Figure 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* では最高用量の 2500 µg/plate の用量において生育阻害が認められた。

復帰変異コロニー数は、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

すべての試験において、最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データ (Appendix 3) の変動範囲内 (平均値 ± 3 × 標準偏差) であったことから、本試験系の有効性が確認された。

なお、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<sup>4)</sup>結果が得られている。また、関連物質である Bisphenol A については、復帰突然変異試験では陰性、染色体異常試験では疑陽性の結果が報告されている<sup>5, 6)</sup>。4,4'-Sulfonyldiphenol については復帰突然変異試験では陰性、染色体異常試験では陽性の結果が報告されている<sup>7, 8)</sup>。Phenol については復帰突然変異試験では陰性、*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<sup>9, 10)</sup>。Methylenediphenol については復帰突然変異試験では陰性、染色体異常試験では陽性の結果が報告されている<sup>11)</sup>。

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。

## 【参 考 文 献】

- 1) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagano, 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.
- 2) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 3) 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.
- 4) 「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」, 試験計画番号 : G-02-043 (2004) .
- 5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修 : 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 社団法人化学物質安全・情報センター, 東京, p. 223 (1986).
- 6) 祖父尼俊雄 監修 : 染色体異常試験データ集改訂 1998 年版, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p. 82 (1999).
- 7) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修 : 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 社団法人化学物質安全・情報センター, 東京, p. 221 (1986).
- 8) 厚生省生活衛生局企画課生活安全対策室 監修 : 化学物質毒性試験報告 vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p. 67-96 (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, p. 329 (1980).

- 10) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修：労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 社団法人化学物質安全・情報センター, 東京, p. 196 (1986).
  
- 11) 厚生省生活衛生局企画課生活安全対策室 監修：化学物質毒性試験報告 vol. 8 (2), 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p. 941-970 (2001).

Table 1. Cytotoxicity of 4,4'-methylenediphenol in bacteria

| With (+) or without (-)<br>S9 mix | Test substance dose<br>( $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) | 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   | 128  | 114 | 106 | 11               | 13  | 9   | 38               | 32  | 32  | 17               | 21  | 16  | 9                | 10  | 5   |
|                                   |   | ( 116 $\pm$ 11 )   |     |     | ( 11 $\pm$ 2 )   |     |     | ( 34 $\pm$ 3 )   |     |     | ( 18 $\pm$ 3 )   |     |     | ( 8 $\pm$ 3 )    |     |     |
|                                   | 50.0  | 124  |     |     | 5                |     |     | 30               |     |     | 12               |     |     | 10               |     |     |
|                                   | 150   | 120  |     |     | 9                |     |     | 29               |     |     | 18               |     |     | 7                |     |     |
|                                   | 500   | 132  |     |     | 6                |     |     | 23               |     |     | 15               |     |     | 8                |     |     |
|                                   | 1500  | 53 *   |     |     | 4 *              |     |     | 10 *             |     |     | 1 *              |     |     | 2 *              |     |     |
| 5000                              | 0 *   |  |     | 0 * |                  |     | 0 * |                  |     | 0 * |                  |     | 0 * |                  |     |     |
| S9 mix (+)                        | 0   | 136  | 159 | 116 | 8                | 7   | 6   | 34               | 36  | 45  | 35               | 29  | 24  | 12               | 16  | 16  |
|                                   |   | ( 137 $\pm$ 22 )   |     |     | ( 7 $\pm$ 1 )    |     |     | ( 38 $\pm$ 6 )   |     |     | ( 29 $\pm$ 6 )   |     |     | ( 15 $\pm$ 2 )   |     |     |
|                                   | 50.0  | 126  |     |     | 7                |     |     | 38               |     |     | 31               |     |     | 10               |     |     |
|                                   | 150   | 147  |     |     | 12               |     |     | 35               |     |     | 20               |     |     | 9                |     |     |
|                                   | 500   | 144  |     |     | 9                |     |     | 33               |     |     | 27               |     |     | 11               |     |     |
|                                   | 1500  | 87 *   |     |     | 12 *             |     |     | 8 *              |     |     | 13 *             |     |     | 4 *              |     |     |
| 5000                              | 0 *   |  |     | 0 * |                  |     | 0 * |                  |     | 0 * |                  |     | 0 * |                  |     |     |
| Positive control                  | Chemical  | AF2  |     |     | SA               |     |     | AF2              |     |     | AF2              |     |     | 9AA              |     |     |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )                   | 0.01   |     |     | 0.5              |     |     | 0.01             |     |     | 0.1              |     |     | 80               |     |     |
| S9 mix (-)                        | Number of colonies / plate                            | 488  | 429 | 408 | 553              | 606 | 574 | 161              | 165 | 155 | 430              | 407 | 483 | 356              | 442 | 286 |
|                                   |   | ( 442 $\pm$ 41 )   |     |     | ( 578 $\pm$ 27 ) |     |     | ( 160 $\pm$ 5 )  |     |     | ( 440 $\pm$ 39 ) |     |     | ( 361 $\pm$ 78 ) |     |     |
| Positive control                  | Chemical  | 2AA  |     |     | 2AA              |     |     | 2AA              |     |     | 2AA              |     |     | 2AA              |     |     |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )                   | 1  |     |     | 2                |     |     | 10               |     |     | 0.5              |     |     | 2                |     |     |
| S9 mix (+)                        | Number of colonies / plate                            | 752  | 803 | 884 | 365              | 346 | 336 | 961              | 857 | 793 | 422              | 465 | 491 | 217              | 254 | 260 |
|                                   |   | ( 813 $\pm$ 67 )   |     |     | ( 349 $\pm$ 15 ) |     |     | ( 870 $\pm$ 85 ) |     |     | ( 459 $\pm$ 35 ) |     |     | ( 244 $\pm$ 23 ) |     |     |

The purity of the test substance was 99.91 wt%.

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

\*: Growth inhibition was observed.

Table 2. Mutagenicity of 4,4'-methylene-diphenol in bacteria (I)

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (µg/plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± 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 ± 12 )   |      |            | ( 16 ± 3 )   |     |            | ( 32 ± 3 )      |     |            | ( 23 ± 3 )      |     |            | ( 7 ± 2 )    |     |     |
|                                | 78.1                           | 126  | 130  | 126        | 20           | 19  | 18         | 32              | 24  | 38         | 23              | 32  | 18         | 7            | 13  | 11  |
|                                |                                | ( 127 ± 2 )  |      |            | ( 19 ± 1 )   |     |            | ( 31 ± 7 )      |     |            | ( 24 ± 7 )      |     |            | ( 10 ± 3 )   |     |     |
|                                | 156                            | 139  | 131  | 145        | 19           | 11  | 16         | 31              | 31  | 27         | 26              | 21  | 31         | 7            | 10  | 7   |
|                                |                                | ( 138 ± 7 )  |      |            | ( 15 ± 4 )   |     |            | ( 30 ± 2 )      |     |            | ( 26 ± 5 )      |     |            | ( 8 ± 2 )    |     |     |
|                                | 313                            | 135  | 125  | 143        | 9            | 18  | 16         | 32              | 21  | 28         | 15              | 21  | 27         | 4            | 8   | 7   |
|                                | ( 134 ± 9 )                    |  |      | ( 14 ± 5 ) |              |     | ( 27 ± 6 ) |                 |     | ( 21 ± 6 ) |                 |     | ( 6 ± 2 )  |              |     |     |
|                                | 625                            | 147  | 128  | 104        | 10           | 14  | 19         | 26              | 31  | 28         | 15              | 17  | 20         | 3            | 5   | 7   |
|                                |                                | ( 126 ± 22 )   |      |            | ( 14 ± 5 )   |     |            | ( 28 ± 3 )      |     |            | ( 17 ± 3 )      |     |            | ( 5 ± 2 )    |     |     |
|                                | 1250                           | 77*  | 68*  | 76*        | 3*           | 1*  | 3*         | 20              | 24  | 29         | 10*             | 11* | 17*        | 3*           | 3*  | 3*  |
|                                |                                | ( 74 ± 5 )   |      |            | ( 2 ± 1 )    |     |            | ( 24 ± 5 )      |     |            | ( 13 ± 4 )      |     |            | ( 3 ± 0 )    |     |     |
|                                | 2500                           | 0*   | 0*   | 0*         | 0*           | 0*  | 0*         | 7*              | 6*  | 14*        | 0*              | 0*  | 0*         | 0*           | 0*  | 0*  |
|                                |                                | ( 0 ± 0 )  |      |            | ( 0 ± 0 )    |     |            | ( 9 ± 4 )       |     |            | ( 0 ± 0 )       |     |            | ( 0 ± 0 )    |     |     |
| S9 mix (+)                     | 0                              | 146  | 146  | 163        | 12           | 11  | 15         | 34              | 33  | 38         | 34              | 38  | 40         | 16           | 15  | 18  |
|                                |                                | ( 152 ± 10 )   |      |            | ( 13 ± 2 )   |     |            | ( 35 ± 3 )      |     |            | ( 37 ± 3 )      |     |            | ( 16 ± 2 )   |     |     |
|                                | 78.1                           | 209  | 198  | 187        | 19           | 16  | 18         | 31              | 54  | 44         | 44              | 59  | 49         | 15           | 17  | 18  |
|                                |                                | ( 198 ± 11 )   |      |            | ( 18 ± 2 )   |     |            | ( 43 ± 12 )     |     |            | ( 51 ± 8 )      |     |            | ( 17 ± 2 )   |     |     |
|                                | 156                            | 216  | 235  | 189        | 15           | 14  | 20         | 37              | 43  | 47         | 47              | 40  | 42         | 12           | 16  | 10  |
|                                |                                | ( 213 ± 23 )   |      |            | ( 16 ± 3 )   |     |            | ( 42 ± 5 )      |     |            | ( 43 ± 4 )      |     |            | ( 13 ± 3 )   |     |     |
|                                | 313                            | 209  | 195  | 158        | 11           | 16  | 12         | 46              | 40  | 31         | 49              | 40  | 38         | 9            | 17  | 10  |
|                                | ( 187 ± 26 )                   |  |      | ( 13 ± 3 ) |              |     | ( 39 ± 8 ) |                 |     | ( 42 ± 6 ) |                 |     | ( 12 ± 4 ) |              |     |     |
|                                | 625                            | 116  | 171  | 159        | 7            | 11  | 6          | 34              | 31  | 35         | 34              | 48  | 40         | 14           | 12  | 11  |
|                                |                                | ( 149 ± 29 )   |      |            | ( 8 ± 3 )    |     |            | ( 33 ± 2 )      |     |            | ( 41 ± 7 )      |     |            | ( 12 ± 2 )   |     |     |
|                                | 1250                           | 127*   | 134* | 131*       | 6*           | 4*  | 5*         | 28              | 23  | 22         | 42*             | 31* | 41*        | 5*           | 9*  | 5*  |
|                                |                                | ( 131 ± 4 )  |      |            | ( 5 ± 1 )    |     |            | ( 24 ± 3 )      |     |            | ( 38 ± 6 )      |     |            | ( 6 ± 2 )    |     |     |
|                                | 2500                           | 0*   | 0*   | 0*         | 0*           | 0*  | 0*         | 9*              | 13* | 6*         | 0*              | 0*  | 0*         | 0*           | 0*  | 0*  |
|                                |                                | ( 0 ± 0 )  |      |            | ( 0 ± 0 )    |     |            | ( 9 ± 4 )       |     |            | ( 0 ± 0 )       |     |            | ( 0 ± 0 )    |     |     |
| Positive control S9 mix (-)    | Chemical                       | AF2  |      |            | SA           |     |            | AF2             |     |            | AF2             |     |            | 9AA          |     |     |
|                                | Dose (µg/plate)                | 0.01   |      |            | 0.5          |     |            | 0.01            |     |            | 0.1             |     |            | 80           |     |     |
| Positive control S9 mix (+)    | Chemical                       | 2AA  |      |            | 2AA          |     |            | 2AA             |     |            | 2AA             |     |            | 2AA          |     |     |
|                                | Dose (µg/plate)                | 1  |      |            | 2            |     |            | 10              |     |            | 0.5             |     |            | 2            |     |     |
| S9 mix (+)                     | Number of colonies / plate     | 347  | 446  | 430        | 516          | 603 | 673        | 196             | 141 | 134        | 331             | 359 | 408        | 215          | 283 | 238 |
|                                |                                | ( 408 ± 53 )   |      |            | ( 597 ± 79 ) |     |            | ( 157 ± 34 )    |     |            | ( 366 ± 39 )    |     |            | ( 245 ± 35 ) |     |     |
| S9 mix (+)                     | Number of colonies / plate     | 791  | 833  | 859        | 359          | 355 | 388        | 748             | 740 | 741        | 422             | 426 | 396        | 226          | 204 | 235 |
|                                |                                | ( 828 ± 34 )   |      |            | ( 367 ± 18 ) |     |            | ( 743 ± 4 )     |     |            | ( 415 ± 16 )    |     |            | ( 222 ± 16 ) |     |     |

The purity of the test substance was 99.91 wt%.

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

\*: Growth inhibition was observed.

Table 3. Mutagenicity of 4,4'-methylenediphenol in bacteria (II)

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (µg/ plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± 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 ± 17 )   |       |              | ( 14 ± 4 ) |      |               | ( 19 ± 5 )      |      |              | ( 21 ± 6 )      |      |               | ( 7 ± 2 ) |     |     |
|                                | 78.1                            | 146  | 136   | 135          | 10         | 9    | 5             | 23              | 29   | 28           | 23              | 19   | 25            | 11        | 7   | 8   |
|                                |                                 | ( 139 ± 6 )  |       |              | ( 8 ± 3 )  |      |               | ( 27 ± 3 )      |      |              | ( 22 ± 3 )      |      |               | ( 9 ± 2 ) |     |     |
|                                | 156                             | 165  | 155   | 132          | 10         | 14   | 9             | 20              | 19   | 25           | 20              | 12   | 16            | 6         | 10  | 8   |
|                                |                                 | ( 151 ± 17 )   |       |              | ( 11 ± 3 ) |      |               | ( 21 ± 3 )      |      |              | ( 16 ± 4 )      |      |               | ( 8 ± 2 ) |     |     |
|                                | 313                             | 132  | 134   | 115          | 13         | 14   | 8             | 24              | 12   | 17           | 21              | 25   | 22            | 9         | 5   | 7   |
|                                | ( 127 ± 10 )                    |  |       | ( 12 ± 3 )   |            |      | ( 18 ± 6 )    |                 |      | ( 23 ± 2 )   |                 |      | ( 7 ± 2 )     |           |     |     |
| S9 mix (+)                     | 625                             | 148  | 139   | 146          | 2          | 6    | 7             | 16              | 17   | 17           | 14              | 17   | 19            | 4         | 4   | 7   |
|                                |                                 | ( 144 ± 5 )  |       |              | ( 5 ± 3 )  |      |               | ( 17 ± 1 )      |      |              | ( 17 ± 3 )      |      |               | ( 5 ± 2 ) |     |     |
|                                | 1250                            | 81 *   | 97 *  | 105 *        | 3 *        | 6 *  | 6 *           | 16              | 15   | 15           | 7 *             | 10 * | 8 *           | 1 *       | 1 * | 3 * |
|                                |                                 | ( 94 ± 12 )  |       |              | ( 5 ± 2 )  |      |               | ( 15 ± 1 )      |      |              | ( 8 ± 2 )       |      |               | ( 2 ± 1 ) |     |     |
|                                | 2500                            | 0 *  | 0 *   | 0 *          | 0 *        | 0 *  | 0 *           | 4 *             | 6 *  | 10 *         | 0 *             | 0 *  | 0 *           | 0 *       | 0 * | 0 * |
|                                |                                 | ( 0 ± 0 )  |       |              | ( 0 ± 0 )  |      |               | ( 7 ± 3 )       |      |              | ( 0 ± 0 )       |      |               | ( 0 ± 0 ) |     |     |
|                                | 0                               | 154  | 166   | 156          | 19         | 12   | 10            | 14              | 34   | 21           | 36              | 42   | 35            | 14        | 11  | 8   |
|                                | ( 159 ± 6 )                     |  |       | ( 14 ± 5 )   |            |      | ( 23 ± 10 )   |                 |      | ( 38 ± 4 )   |                 |      | ( 11 ± 3 )    |           |     |     |
| 78.1                           | 196                             | 211  | 183   | 18           | 8          | 8    | 34            | 28              | 23   | 41           | 33              | 53   | 14            | 12        | 10  |     |
|                                | ( 197 ± 14 )                    |  |       | ( 11 ± 6 )   |            |      | ( 28 ± 6 )    |                 |      | ( 42 ± 10 )  |                 |      | ( 12 ± 2 )    |           |     |     |
| 156                            | 170                             | 186  | 178   | 15           | 11         | 12   | 30            | 29              | 36   | 44           | 35              | 43   | 15            | 9         | 13  |     |
|                                | ( 178 ± 8 )                     |  |       | ( 13 ± 2 )   |            |      | ( 32 ± 4 )    |                 |      | ( 41 ± 5 )   |                 |      | ( 12 ± 3 )    |           |     |     |
| 313                            | 206                             | 160  | 168   | 12           | 11         | 10   | 36            | 25              | 35   | 32           | 33              | 38   | 9             | 7         | 8   |     |
|                                | ( 178 ± 25 )                    |  |       | ( 11 ± 1 )   |            |      | ( 32 ± 6 )    |                 |      | ( 34 ± 3 )   |                 |      | ( 8 ± 1 )     |           |     |     |
| 625                            | 174                             | 183  | 196   | 10           | 13         | 8    | 21            | 23              | 14   | 31           | 36              | 35   | 13            | 13        | 12  |     |
|                                | ( 184 ± 11 )                    |  |       | ( 10 ± 3 )   |            |      | ( 19 ± 5 )    |                 |      | ( 34 ± 3 )   |                 |      | ( 13 ± 1 )    |           |     |     |
| 1250                           | 156 *                           | 135 *  | 145 * | 8 *          | 5 *        | 10 * | 19            | 10              | 21   | 29 *         | 29 *            | 31 * | 3 *           | 3 *       | 5 * |     |
|                                | ( 145 ± 11 )                    |  |       | ( 8 ± 3 )    |            |      | ( 17 ± 6 )    |                 |      | ( 30 ± 1 )   |                 |      | ( 4 ± 1 )     |           |     |     |
| 2500                           | 0 *                             | 0 *  | 0 *   | 0 *          | 0 *        | 0 *  | 7 *           | 10 *            | 10 * | 0 *          | 0 *             | 0 *  | 0 *           | 0 *       | 0 * |     |
|                                | ( 0 ± 0 )                       |  |       | ( 0 ± 0 )    |            |      | ( 9 ± 2 )     |                 |      | ( 0 ± 0 )    |                 |      | ( 0 ± 0 )     |           |     |     |
| Positive control S9 mix (-)    | Chemical                        | AF2  |       |              | SA         |      |               | AF2             |      |              | AF2             |      |               | 9AA       |     |     |
|                                | Dose (µg / 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 ± 30 )                    |  |       | ( 616 ± 40 ) |            |      | ( 137 ± 4 )   |                 |      | ( 345 ± 18 ) |                 |      | ( 381 ± 144 ) |           |     |     |
| Positive control S9 mix (+)    | Chemical                        | 2AA  |       |              | 2AA        |      |               | 2AA             |      |              | 2AA             |      |               | 2AA       |     |     |
|                                | Dose (µg / 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 ± 52 )                    |  |       | ( 364 ± 55 ) |            |      | ( 774 ± 100 ) |                 |      | ( 460 ± 5 )  |                 |      | ( 221 ± 9 )   |           |     |     |

The purity of the test substance was 99.91 wt%.

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

\*: Growth inhibition was observed.

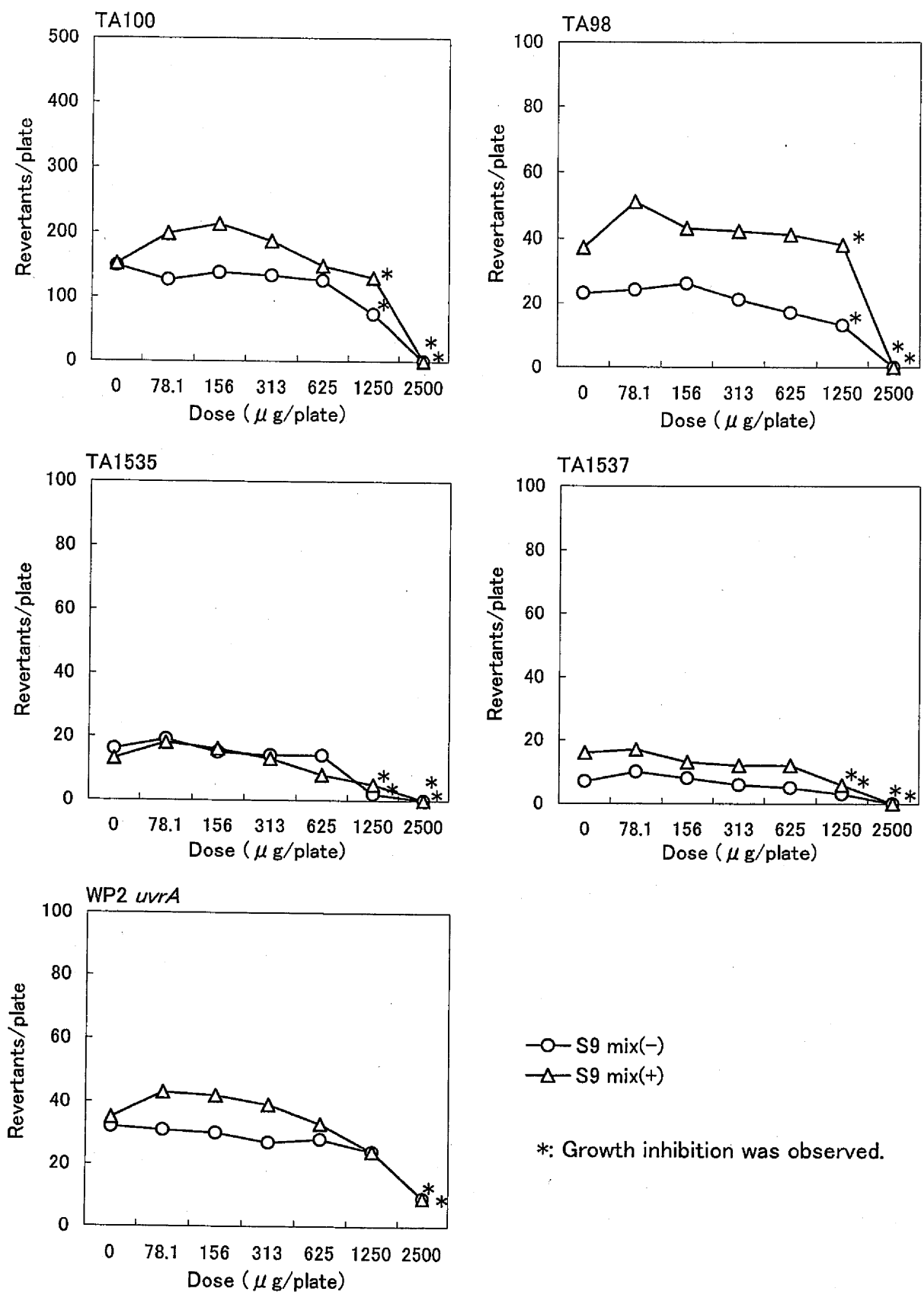


Figure 1. Dose response curves in mutagenicity test (I) of 4,4'-methylene-diphenol in bacteria



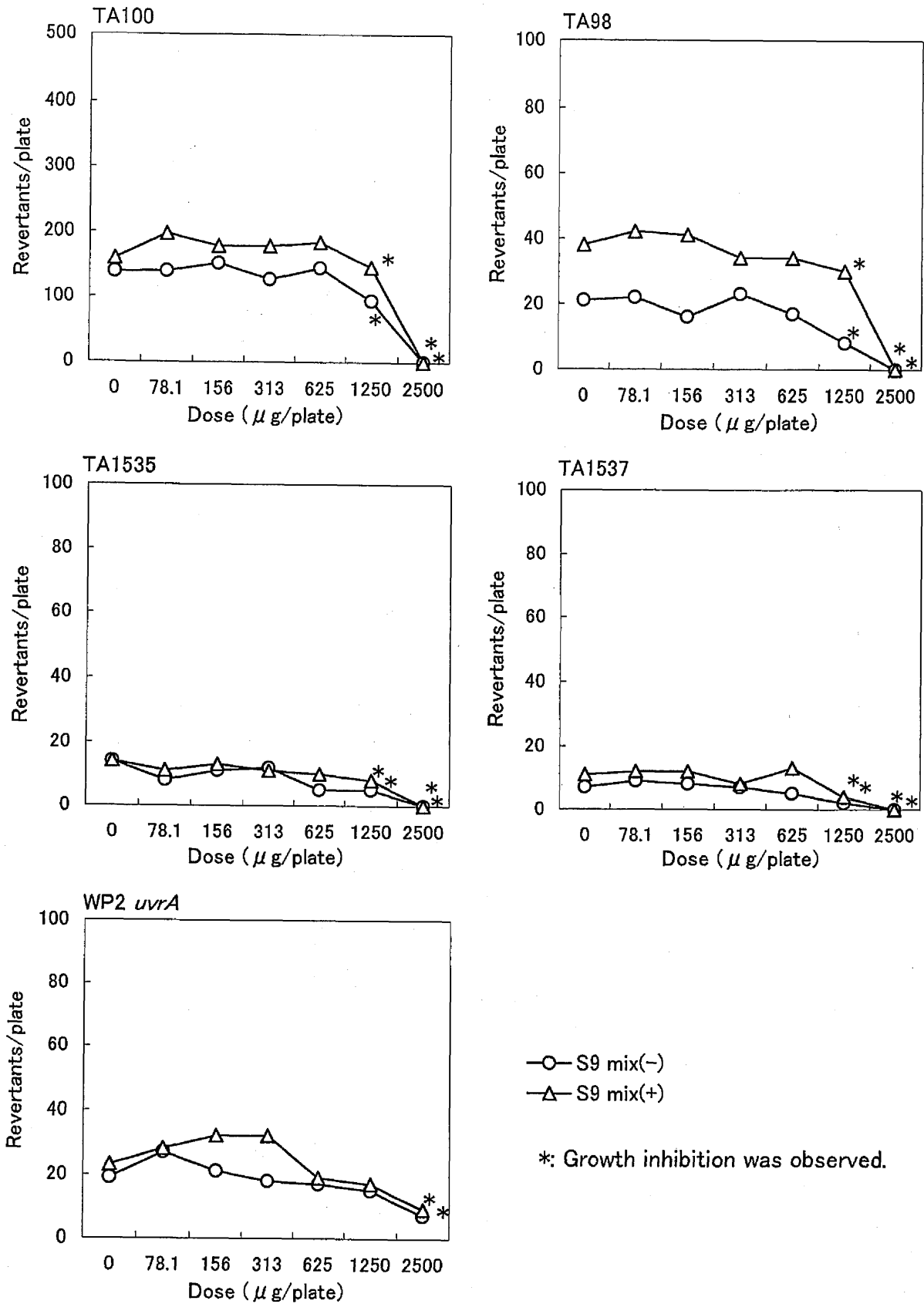


Figure 2. Dose response curves in mutagenicity test (II) of 4,4'-methylene-diphenol in bacteria