

p-tert-オクチルフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of p-tert-Octylphenol on Bacteria

要約

p-tert-オクチルフェノールの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は50~5000 µg/プレートの用量で試験を行ったが、すべての検定菌において抗菌性が認められた。抗菌性は*S. typhimurium* 4検定菌の直接試験において強く認められた。そのため、*S. typhimurium*の4検定菌について、TA100とTA98では20~200 µg/プレート、TA1535およびTA1537では10~100 µg/プレートの用量で直接試験のみについて再試験を実施したが、いずれの検定菌において

も抗菌性は強く認められた。

本試験は、*S. typhimurium*の4検定菌では直接試験を1.56~50 µg/プレート、代謝活性化試験を6.25~200 µg/プレートの用量で、WP2については直接試験および代謝活性化試験のいずれも125~2000 µg/プレートの用量で実施した。

その結果、2回の本試験ともに、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、p-tert-オクチルフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

緒言

OECD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、日本が独自に選定した既存化学物質のつである、p-tert-オクチルフェノールについて、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ(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変異¹⁾、ならびに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変異²⁾を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素(S9混液)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代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質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)およびOECD化学品試験法ガイドライン: 471、472に準拠し、化学物質GLP(昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号)に基づいて実施した。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

Salmonella typhimurium TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

Escherichia coli WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス(Difco)を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

p-tert-オクチルフェノール(CAS No. 3780-50-5、p-tert-Octylphenol)は、分子量206.33、融点79~82℃、沸点175℃の白色結晶状固体である。純度97%以上のもの(ロット番号:C162、大日本インキ化学工業株式会社製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。p-tert-オクチルフェノールは、ジメチルスルホキシド(ロット番号:DSL 5887、和光純薬工業(株))を用いて50あるいは20 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてp-tert-オクチルフェノールのDMSO溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度(20 mg/ml)および最低濃度以下の濃度(12.5 µg/ml)について、室温遮光条件下で、実施した。その結果、調製後3時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値(0時間)に対して、101および102%であった。これらの値は当研究所の標準操作手順書の基準(初回の測定平均値の90%以上)を満たしていた。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、20 mg/ml溶液については、92.6~97.6%、15.6 µg/ml溶液については、103~104%の回収率が得られ

復帰変異試験

た。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の85%以上）を満たしていた。

以上の結果から、p-tert-オクチルフェノールはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

- AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬 (株))
- SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業 (株))
- 9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業 (株))
- 2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業 (株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業 (株)) に、SAは蒸留水に溶解して試験に用いた。

〔培地およびS9混液の組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクト・アガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
ビオチン	0.5 mM

* WP2用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社の最少寒天培地を用いた。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	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30mlを流して固めてある。

3) S9混液 (1 ml中下記の成分を含む)

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
0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml

** : 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)) を用いた。

〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2ml、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (代謝活性化試験においてはS9混液0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのち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DMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37°Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

〔判定基準〕

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が、陰性対照のそれに比べて倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは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 (陽性) と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50~5000 μg/プレートの範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接試験および代謝活性化試験において、抗菌性が強く認められた。抗菌性は、*S. typhimurium*の検定菌でWP2より強く認められ、また直接試験において著しかった。そのため、*S. typhimurium*の4検定菌について、TA100とTA98では20~200 μg/プレート、TA1535とTA1537は10~100 μg/プレートの用量で直接試験のみについて追加試験を実施した。抗菌性はいずれの検定菌においても高用量の2~3用量群で認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量を *S. typhimurium*の4検定菌の直接試験では50 μg/プレート、代謝活性化試験では、200 μg/プレート、WP2については、直接試験、代謝活性化試験ともに2000 μg/プレートとし、*S. typhimurium*の4検定菌においては6用量、WP2については5用量を公比2で設けた。

〔本試験〕

本試験の結果をTables 1~4に示した。p-tert-オクチルフェノールについて、上記の用量範囲で試験を実施した。その結果、すべての検定菌において、直接試験および代謝活性化試験のいずれにおいても、高用量の1~2用量群において抗菌性が認められたものの、用量依存性のある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、p-tert-オクチルフェノールは、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。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel, eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

連絡先：試験責任者 澁谷徹
 (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence : Shibuya, Tohru
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan
 Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I-1) with p-octylphenol**

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean \pm S.D.)														
			Base-pair substitution type						Frameshift type								
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537						
Solvent control	-	-	123 (124 \pm 7.5)	132 (117 \pm 7.5)	117 (13 \pm 14)	13 (15 \pm 2.1)	14 (15 \pm 2.1)	17 (15 \pm 2.1)	19 (22 \pm 3.0)	22 (22 \pm 3.0)	25 (16 \pm 9)	8 (9 \pm 1.0)	9 (8 \pm 1.2)	10 (11 \pm 1.7)			
Test substance	1.56	-	153 (141 \pm 14.3)	144 (140 \pm 6.1)	125 (152 \pm 11.4)	15 (15 \pm 4.6)	15 (15 \pm 4.6)	13 (14 \pm 4.6)	22 (23 \pm 7.6)	27 (25 \pm 4.6)	16 (29 \pm 4.6)	9 (15 \pm 12)	7 (12 \pm 9)	9 (11 \pm 3.0)			
	3.13	-	128 (133 \pm 6.1)	132 (140 \pm 6.1)	140 (152 \pm 11.4)	19 (15 \pm 4.6)	10 (15 \pm 4.6)	16 (14 \pm 4.6)	30 (23 \pm 7.6)	15 (25 \pm 4.6)	25 (29 \pm 4.6)	14 (15 \pm 12)	14 (12 \pm 9)	11 (11 \pm 3.0)			
	6.25	-	146 (143 \pm 11.4)	130 (140 \pm 6.1)	152 (152 \pm 11.4)	14 (15 \pm 4.6)	20 (15 \pm 4.6)	11 (14 \pm 4.6)	20 (25 \pm 4.6)	26 (25 \pm 4.6)	29 (29 \pm 4.6)	15 (15 \pm 12)	12 (12 \pm 9)	9 (11 \pm 3.0)			
	12.5	-	133 (124 \pm 10.8)	112 (133 \pm 6.1)	127 (152 \pm 11.4)	18 (15 \pm 4.6)	14 (15 \pm 4.6)	14 (14 \pm 4.6)	27 (22 \pm 4.7)	20 (22 \pm 4.7)	18 (29 \pm 4.6)	11 (15 \pm 12)	8 (12 \pm 9)	11 (11 \pm 3.0)			
	25	-	138 (125 \pm 17.4)	131 (140 \pm 6.1)	105 (152 \pm 11.4)	15* (11 \pm 3.2)	9* (15 \pm 4.6)	10* (14 \pm 4.6)	16 (22 \pm 5.3)	24 (25 \pm 4.6)	26 (29 \pm 4.6)	10* (15 \pm 12)	4* (12 \pm 9)	10* (11 \pm 3.0)			
	50	-	109* (117 \pm 9.2)	115* (140 \pm 6.1)	127* (152 \pm 11.4)	9* (15 \pm 4.6)	9* (15 \pm 4.6)	11* (14 \pm 4.6)	16* (23 \pm 5.9)	25* (25 \pm 4.6)	27* (29 \pm 4.6)	9* (15 \pm 12)	2* (12 \pm 9)	6* (11 \pm 3.0)			
Solvent control		+	187 (157 \pm 26.3)	142 (149 \pm 4.6)	141 (152 \pm 11.4)	15 (16 \pm 2.6)	10 (16 \pm 2.6)	14 (16 \pm 2.6)	39 (48 \pm 2.5)	42 (48 \pm 2.5)	37 (45 \pm 2.5)	11 (12 \pm 4.7)	13 (10 \pm 4.7)	19 (17 \pm 3.6)			
Test substance	6.25	+	148 (149 \pm 4.6)	154 (162 \pm 12.7)	145 (152 \pm 11.4)	15 (18 \pm 3.6)	19 (18 \pm 3.6)	14 (21 \pm 3.6)	50 (48 \pm 2.5)	48 (60 \pm 11.1)	45 (47 \pm 11.1)	8 (9 \pm 2.6)	10 (13 \pm 8)	17 (8 \pm 3.6)			
	12.5	+	178 (164 \pm 12.7)	162 (142 \pm 3.1)	153 (139 \pm 3.1)	14 (17 \pm 7.1)	19 (16 \pm 7.1)	21 (25 \pm 7.1)	38 (36 \pm 3.0)	60 (36 \pm 3.0)	47 (39 \pm 3.0)	13 (11 \pm 2.6)	6 (13 \pm 8)	8 (8 \pm 3.6)			
	25	+	143 (142 \pm 3.1)	145 (156 \pm 7.1)	139 (150 \pm 7.1)	11 (15 \pm 0.6)	16 (15 \pm 0.6)	25 (15 \pm 0.6)	33 (38 \pm 2.1)	36 (36 \pm 2.1)	39 (40 \pm 2.1)	12 (10 \pm 3.5)	13 (7 \pm 10)	8 (10 \pm 2.5)			
	50	+	155 (144 \pm 12.6)	164 (131 \pm 12.6)	150 (156 \pm 12.6)	14 (16 \pm 9.9)	15 (9 \pm 9.9)	15 (27 \pm 9.9)	39 (37 \pm 5.1)	36 (31 \pm 5.1)	40 (41 \pm 5.1)	14 (7 \pm 5)	7 (5 \pm 4)	10 (10 \pm 2.3)			
	100	+	146 (144 \pm 12.6)	131 (131 \pm 12.6)	156 (156 \pm 12.6)	11 (16 \pm 4.0)	9 (12 \pm 4.0)	27 (8 \pm 4.0)	38 (27 \pm 3.5)	31 (31 \pm 3.5)	41 (27 \pm 3.5)	7 (5 \pm 4)	5 (8 \pm 4)	10 (4 \pm 2.3)			
	200	+	94* (94 \pm 3.5)	91* (91 \pm 3.5)	98* (98 \pm 3.5)	16* (12 \pm 4.0)	12* (12 \pm 4.0)	8* (8 \pm 4.0)	24* (27 \pm 3.5)	31* (31 \pm 3.5)	27* (27 \pm 3.5)	4* (5 \pm 4)	8* (8 \pm 4)	4* (4 \pm 2.3)			
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		649 (626 \pm 20.2)	618 (611 \pm 20.2)	611 (214 \pm 228)	214 (225 \pm 15.2)	225 (244 \pm 15.2)	244 (228 \pm 15.2)	572 (560 \pm 54.0)	607 (501 \pm 54.0)	501 (3360 \pm 3533)	3360 (3605 \pm 150.9)	3605 (3533 \pm 150.9)	3635 (150.9)			
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		725 (750 \pm 26.1)	748 (777 \pm 26.1)	777 (216 \pm 207)	216 (212 \pm 4.6)	207 (213 \pm 4.6)	213 (212 \pm 4.6)	286 (294 \pm 24.6)	275 (322 \pm 24.6)	322 (171 \pm 170)	171 (164 \pm 152)	170 (164 \pm 152)	152 (10.7)			

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Inhibition was observed against growth of the bacteria.
 **:Purity was above 97%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (I-2) with p-octylphenol**

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean \pm S.D.)				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Solvent control	-	-			11 (11 \pm 5)	17 (6.0)	
Test substance	125	-			13 (12 \pm 10)	14 (2.1)	
	250	-			7 (7 \pm 6)	9 (1.5)	
	500	-			8 (8 \pm 8)	7 (0.6)	
	1000	-			2 (3 \pm 0)	6 (3.1)	
	2000	-			8* (10 \pm 11*)	10* (1.5)	
	Solvent control		+			15 (17 \pm 12)	24 (6.2)
Test substance	125	+			14 (16 \pm 15)	18 (2.1)	
	250	+			16 (15 \pm 15)	13 (1.5)	
	500	+			12 (10 \pm 9)	8 (2.1)	
	1000	+			7 (4 \pm 3)	2 (2.6)	
	2000	+			7 (8 \pm 7)	9 (1.2)	
	Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate				190 (195 \pm 191)	203 (7.2)	
Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate				288 (273 \pm 285)	247 (22.9)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Inhibition was observed against growth of the bacteria.
 **:Purity was above 97%

Table 3 Results of bacterial reverse mutation assay (II-1) with p-octylphenol**

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean \pm S.D.)														
			Base-pair substitution type						Frameshift type								
			TA100		TA1535		WP2avrA		TA98		TA1537						
Solvent control	-	-	168 (150 \pm)	141 (155 \pm)	142 (15.3)	18 (16 \pm)	17 (16 \pm)	14 (2.1)	20 (21 \pm)	22 (1.0)	21 (1.0)	9 (8 \pm)	8 (8 \pm)	7 (1.0)			
Test substance	1.56	-	162 (155 \pm)	172 (155 \pm)	130 (21.9)	23 (21 \pm)	24 (21 \pm)	15 (4.9)	25 (29 \pm)	32 (29 \pm)	31 (3.8)	6 (9 \pm)	9 (9 \pm)	12 (3.0)			
	3.13	-	156 (152 \pm)	141 (152 \pm)	160 (10.0)	19 (16 \pm)	12 (16 \pm)	18 (3.8)	15 (21 \pm)	23 (21 \pm)	25 (5.3)	5 (12 \pm)	14 (12 \pm)	16 (5.9)			
	6.25	-	151 (143 \pm)	138 (143 \pm)	141 (6.8)	13 (14 \pm)	12 (14 \pm)	18 (3.2)	21 (26 \pm)	32 (26 \pm)	26 (5.5)	16 (13 \pm)	13 (13 \pm)	11 (2.5)			
	12.5	-	149 (148 \pm)	150 (148 \pm)	145 (2.6)	17 (11 \pm)	8 (11 \pm)	9 (4.9)	36 (28 \pm)	23 (28 \pm)	26 (6.8)	7 (8 \pm)	7 (8 \pm)	9 (1.2)			
	25	-	139 (143 \pm)	142 (143 \pm)	147 (4.0)	19 (19 \pm)	23 (19 \pm)	15 (4.0)	17 (24 \pm)	23 (24 \pm)	31 (7.0)	6* (7 \pm)	10* (7 \pm)	5* (2.6)			
	50	-	123* (114 \pm)	115* (114 \pm)	105* (9.0)	15* (18 \pm)	17* (18 \pm)	23* (4.2)	23* (25 \pm)	31* (25 \pm)	22* (4.9)	2* (5 \pm)	5* (5 \pm)	8* (3.0)			
Solvent control	+	+	169 (160 \pm)	141 (160 \pm)	170 (16.5)	12 (16 \pm)	16 (16 \pm)	21 (4.5)	56 (50 \pm)	46 (50 \pm)	48 (5.3)	11 (12 \pm)	15 (12 \pm)	10 (2.6)			
Test substance	6.25	+	149 (150 \pm)	153 (150 \pm)	147 (3.1)	13 (20 \pm)	26 (20 \pm)	21 (6.6)	41 (41 \pm)	43 (41 \pm)	38 (2.5)	11 (13 \pm)	11 (13 \pm)	18 (4.0)			
	12.5	+	197 (173 \pm)	161 (173 \pm)	160 (21.1)	14 (16 \pm)	20 (16 \pm)	13 (3.8)	45 (49 \pm)	57 (49 \pm)	44 (7.2)	11 (13 \pm)	15 (13 \pm)	14 (2.1)			
	25	+	167 (158 \pm)	132 (158 \pm)	174 (22.5)	17 (16 \pm)	17 (16 \pm)	15 (1.2)	38 (47 \pm)	52 (47 \pm)	50 (7.6)	11 (12 \pm)	10 (12 \pm)	15 (2.6)			
	50	+	156 (159 \pm)	167 (159 \pm)	155 (6.7)	24 (21 \pm)	24 (21 \pm)	14 (5.8)	58 (48 \pm)	41 (48 \pm)	44 (9.1)	12 (14 \pm)	13 (14 \pm)	17 (2.6)			
	100	+	151 (156 \pm)	151 (156 \pm)	167 (9.2)	12 (14 \pm)	16 (14 \pm)	13 (2.1)	38 (38 \pm)	46 (38 \pm)	31 (7.5)	17* (14 \pm)	14* (14 \pm)	11* (3.0)			
	200	+	120* (116 \pm)	113* (116 \pm)	114* (3.8)	7* (13 \pm)	19* (13 \pm)	19* (6.0)	34* (32 \pm)	32* (32 \pm)	31* (1.5)	7* (7 \pm)	11* (7 \pm)	3* (4.0)			
Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		709 (700 \pm)	678 (700 \pm)	714 (19.5)	178 (175 \pm)	185 (175 \pm)	163 (11.2)	753 (759 \pm)	747 (759 \pm)	776 (15.3)	4447 (4064 \pm)	4216 (4064 \pm)	3528 (478.1)			
Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		919 (922 \pm)	904 (922 \pm)	942 (19.1)	241 (228 \pm)	213 (228 \pm)	229 (14.0)	334 (304 \pm)	289 (304 \pm)	288 (26.3)	196 (203 \pm)	208 (203 \pm)	204 (6.1)			

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Inhibition was observed against growth of the bacteria.
 **:Purity was above 97%

Table 4 Results of bacterial reverse mutation assay (II-2) with p-octylphenol**

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean \pm S.D.)						
			Base-pair substitution type			Frameshift type			
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		
Solvent control	-	-			15 (15 \pm 4.0)	19 (19 \pm 4.0)	11 (11 \pm 4.0)		
Test substance	125	-			21 (14 \pm 6.2)	9 (9 \pm 6.2)	12 (12 \pm 6.2)		
	250	-			7 (10 \pm 2.6)	12 (12 \pm 2.6)	11 (11 \pm 2.6)		
	500	-			6 (7 \pm 1.2)	6 (6 \pm 1.2)	8 (8 \pm 1.2)		
	1000	-			6 (4 \pm 2.0)	2 (2 \pm 2.0)	4 (4 \pm 2.0)		
	2000	-			10* (12 \pm 3.2)	11* (11 \pm 3.2)	16* (16 \pm 3.2)		
Solvent control		+			16 (17 \pm 0.6)	17 (17 \pm 0.6)	17 (17 \pm 0.6)		
Test substance	125	+			21 (18 \pm 2.9)	16 (16 \pm 2.9)	16 (16 \pm 2.9)		
	250	+			17 (13 \pm 4.0)	9 (9 \pm 4.0)	13 (13 \pm 4.0)		
	500	+			7 (7 \pm 1.0)	8 (8 \pm 1.0)	6 (6 \pm 1.0)		
	1000	+			7 (6 \pm 1.5)	4 (4 \pm 1.5)	6 (6 \pm 1.5)		
	2000	+			2* (3 \pm 1.0)	3* (3 \pm 1.0)	4* (4 \pm 1.0)		
Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate				174 (162 \pm 10.8)	157 (157 \pm 10.8)	154 (154 \pm 10.8)		
Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate				761 (711 \pm 51.6)	658 (658 \pm 51.6)	715 (715 \pm 51.6)		

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Inhibition was observed against growth of the bacteria.
 **:Purity was above 97%

p-tert-オクチルフェノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In vitro Chromosomal Aberration Test of *p*-tert-Octylphenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

p-tert-オクチルフェノールの染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

1) 細胞増殖抑制試験

直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は16 µg/ml 代謝活性化法では40 µg/mlであった。

従って、染色体異常試験において、直接法では16 µg/ml 代謝活性化法では40 µg/mlの処理濃度を高濃度とし、それぞれその1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、高濃度では分裂抑制のため染色体観察ができなかったが、中濃度および低濃度では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。また、代謝活性化法においても、S9 mix存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかった。なお、S9 mix非存在下の5 µg/ml以上の群では分裂抑制が顕著であった。

3) 結論

p-tert-オクチルフェノールは、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

緒言

OECD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、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである *p*-tert-オクチルフェノールの、培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

上記の試験は、「新規化学物質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) およびOECDガイドライン: 473に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものである。

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) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL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、牛胎児血清 (FCS; J.R.Scientific; ロット番号C019407, Bocknek; ロット番号SF70521) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (径6cm, Corning) に播き、37°CのCO₂インキュベーター (5% CO₂) 内で培養した。

4. 被験物質

p-tert-オクチルフェノール (CAS No. 3780-50-5, C162, 大日本インキ化学工業 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は白色結晶状で、DMSO (ジメチルスルホキシド) に535.2 mg/mlまで可溶、水に1.7% (w/w) まで溶ける。分子式C₁₄H₂₂O₂, 分子量206.4, 融点84°Cの物質で、純度は97%以上である (大日本インキ化学工業 (株) 資料)。本実験では被験物質がDMSOに可溶であることから、溶媒としてDMSOを用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施したエームス試験 (試験計画番号: M-91-187) におけるDMSO中での安定性試験では0.0125~20.0 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体をDMSO (Sigma Chemical Co., ロット番号: 129F0413) に溶解して原液を調製し、ついで原液をDMSO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、全ての試験において培養液の0.5% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた最高濃度群と最低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、回帰直線式より算出した直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は16 µg/ml、代謝活性化法では40 µg/mlであった（Fig.1）。

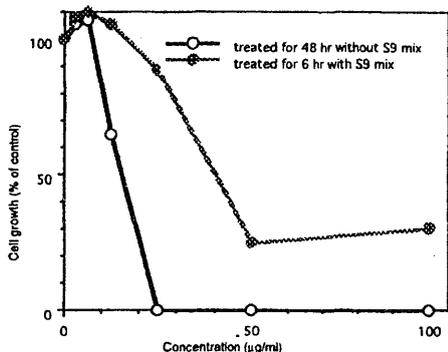


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with p-tert-octylphenol in CHL cells

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の最高処理濃度を、直接法（24および48時間連続処理）では16 µg/ml、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）では40 µg/mlとし、それぞれ最高処理濃度の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。

上記濃度にしたがって試験を実施したところ、S9 mix非存在下の処理群では、低濃度群（10 µg/ml）においても、分裂抑制のため染色体の分析が不可能であった。そこで、S9 mix非存在下の低濃度群の濃度（5.0 µg/ml）を高濃度として、以下の濃度群を設定して追加試験を実施した。

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約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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会¹¹による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）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. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら²¹の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

p-tert-オクチルフェノールを加えて24時間および48時間処理した低濃度および中濃度の各群において、いずれも染色体の構造異常と倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。一方、高濃度群については、分裂抑制のため、観察可能な分裂中期細胞がみられなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

p-tert-オクチルフェノールを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した各濃度群においては、いずれも分裂抑制のため、観察可能な分裂中期細胞がみられなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度において倍数性細胞が有意（p=0.0192）に増加したが、染色体の構造異常については全ての処理群で有意な増加は認められなかった。分裂抑制のため観察不能であったS9 mix非存在下の群については、さらに低い濃度を設定して追加試験を実施した（Table 3）。その結果、5.0 µg/mlの濃度では、分裂抑制のため、ほとんど分裂中期細胞が得られなかったが、1.3 µg/mlおよび2.5 µg/mlの濃度では、構造異常および倍数性細胞ともに有意な増加はみられなかった。従って、代謝活性化法における最終判定は、全ての処理群で陰性となった。

上記の試験において、直接法（24時間および48時間）における8 µg/mlの処理濃度では染色体分析は可能であったが、代謝活性化法におけるS9 mix非存在下の5 µg/mlの処理濃度では分裂細胞が得られなかった。その理由としては、S9 mix存在下ではp-tert-オクチルフェノールによる細胞毒性が著しく低減されることから、直接法の処理培養液中に含まれている10%の血清が代謝的に作用していることや、5~8 µg/mlの濃度付近が分裂抑制のかかる限界であることなどが考えられる。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9 mix存在下でのCPA処理群では染色体体交換（cte）や染色体体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

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, 1988.
- 2) 石館基監修：“<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 1987.

連絡先：試験責任者 田中憲穂

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence : Tanaka, Noriho

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan
Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with p-tert-octylphenol ** by direct method

Group	Concentration (µg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.38		
Solvent ¹⁾	0	24	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	0 (0.0)	0.75		
PO	4	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-
PO	8	24	200	7	0	0	0	0	0	0	7	0	7 (3.5)	0 (0.0)	0.13	-	-
PO	16	24	0													Tox	Tox
MC	0.05	24	200	30	40	40	0	1	0	10	121	0	69* (34.5)	57* (28.5)	0.38	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.75		
PO	4	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	-	-
PO	8	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25	-	-
PO	16	48	0													Tox	Tox
MC	0.05	48	200	18	24	33	2	2	0	10	89	1	52* (26.0)	39* (19.5)	0.13	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was more than 97%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with p-tert-octylphenol ** by metabolic activation method

Group	Concentration (µg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50		
PO	10	-	6-(18)	0													Tox	Tox
PO	20	-	6-(18)	0													Tox	Tox
PO	40	-	6-(18)	0													Tox	Tox
CPA	5	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13			
PO	10	+	6-(18)	200	5	0	0	0	0	0	5	0	5 (2.5)	0 (0.0)	0.00	-	-	
PO	20	+	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	1.00*	-	-	
PO	40	+	6-(18)	200	5	8	1	0	0	0	14	0	8 (4.0)	4 (2.0)	0.25	-	-	
CPA	5	+	6-(18)	200	23	11	28	0	0	0	62	0	48* (24.0)	33* (16.5)	0.63	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was more than 97%.

染色体異常試験

Table 3 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with p-tert-octylphenol ** by metabolic activation method

Group	Concentration (µg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations										No. of cells with aberrations			Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾			
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total	Others ³⁾	TAG	(%)	TA	(%)		SA	NA		
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0	(0.0)	0.25		
Solvent ¹⁾	0	—	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0	(0.0)	0.25		
PO	1.3	—	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	(0.5)	0	(0.0)	0.00	—	—	
PO	2.5	—	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0	(0.0)	0.25	—	—	
PO	5.0	—	6-(18)	4	0	2	1	0	0	0	0	3	0	2	2	(50.0)	2	(50.0)	0.00 ⁶⁾	Tox	Tox	
MC	0.1	—	6-(18)	200	12	21	40	0	1	0	0	74	0	52*	26.0	46*	23.0	0.13	+	—		

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Four cells were analyzed.

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was more than 97%.