

## 4-(1-メチルプロピル)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 (回復15日間)

### Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 4-(1-Methylpropyl)phenol in Rats

#### 要約

4-(1-メチルプロピル)フェノール [4-(1-methyl propyl)phenol, 別名 p-(sec-butyl)phenol] は、化学産業の分野において、フェノール樹脂や塗料の原材料として利用されている化合物である。本化合物の毒性については、マウスの腹腔内投与によるLD<sub>50</sub>値が66 mg/kg, 静脈内投与によるLD<sub>50</sub>値が40 mg/kgであること<sup>1)</sup>のほか、ラットでは24か月間の混餌投与による毒性試験結果が報告されている<sup>2)</sup>。

本試験では、OECDによる既存化学物質の安全点検に係わる毒性調査事業の一環として、4-(1-メチルプロピル)フェノールの28日間の反復経口投与毒性 (回復15日間) を雌雄のSprague-Dawley系 (Crj:CD) ラットを用いて検討した。投与量は、0 (溶媒対照群), 100, 300 および 1000 mg/kgとし、溶媒対照群と1000 mg/kg投与群には雌雄各10匹 (回復試験例を含む), 100と300 mg/kg投与群には雌雄各5匹を配した。

その結果、一般状態の変化として、被験物質投与群の雌雄全例において、投与直後に被験物質の刺激性に起因したと考えられる一過性の流涎が観察され、1000 mg/kg投与群では、投与の保定時から流涎が認められることもあった。その他、1000 mg/kg投与群の雌雄で、散発的に呼吸音の異常、粗大呼吸および開口呼吸が観察された。さらに、1000 mg/kg投与群では、雌雄各1例がいずれも誤投与に起因したと思われる呼吸障害によって死亡した。また、投与開始日を除き全期間を通して、1000 mg/kg投与群の雄の体重は、溶媒対照群と比較して低い値となり、同群の雄では投与開始日に摂餌量の減少も認められた。投与期間終了時の血液生化学的検査では、1000 mg/kg投与群の雌において、GPT活性およびGOT活性の上昇がみられ、1000 mg/kg投与群の雄においては、ブドウ糖およびカリウム濃度の低下、ナトリウム濃度、GPT活性およびγ-GTP活性の上昇が認められた。一方、回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群において、雌で尿素窒素濃度の上昇がみられ、雄でブドウ糖濃度の低下およびナトリウム濃度の上昇が認められた。

投与期間終了時の病理学的検査において、1000 mg/kg投与群の雌雄全例で、前胃粘膜上皮の過形成が認められ、雌の3例および雄の2例では腎乳頭壊死も観察された。また、300 mg/kg投与群の雄の1例では、腎乳頭壊死および前胃粘膜上皮の過形成が認められた。さらに、腎乳頭壊死のみられなかった1000 mg/kg投与群の雄の1例および300 mg/kg投与群の雌雄各1例では、腎乳頭先端部の間質にエオジンに染色する小塊状あるいは微細顆粒状

を呈する物質が少量認められた。一方、回復試験期間終了時の検査でも、1000 mg/kg投与群の雄の1例で腎乳頭先端部の間質に変性した細胞が認められ、同群の雌の1例では、前胃の粘膜上皮にごく軽度な過形成が認められた。

以上のことから、本試験条件下における4-(1-メチルプロピル)フェノールの無影響量は、雌雄とも100mg/kgであると考えられた。

#### 方法

##### 1. 被験物質および投与検体の調製

被験物質として、大日本インキ化学工業(株)より提供された4-(1-メチルプロピル)フェノール [ロット番号: C-119, 淡黄色の液体, 比重: 0.78, 純度: 66 wt%, 不純物としてメタセカンダリーブチルフェノールを33 wt%含有] を用い、入手後は室温遮光にて保管した。

投与検体は、被験物質を20% (w/v) の濃度 (但し、純度換算は行っていない) になるよう日局ゴマ油 [ロット番号: 092744, 692546, ヨシダ製薬(株)に溶解し、さらに、この20%溶液を6および2% (w/v) 濃度となるように階段希釈して調製した後、褐色ガラス瓶に分注し、投与時まで室温遮光の条件下で保管した。調製は1週間に1回の頻度で行った。なお、投与開始前に4-(1-メチルプロピル)フェノールの安定性試験および含量試験を実施した結果、0.6 および 20.0% (w/v) ゴマ油溶液中の被験物質は、室温遮光の条件下で7日間は安定であることが確認され、投与検体中の被験物質の平均含量は、所定濃度の106~111%であることが確認された。

##### 2. 動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄のSprague-Dawley系ラット (Crj:CD; SPF, 日本チャールス・リバー(株), 厚木飼育センター生産) を8日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各30匹を供試した [投与開始時体重: 雌118.4g~131.3g (平均125.8g), 雄134.7g~150.2g (平均142.6g)]。動物は、全飼育期間を通じて、温度24±1℃, 湿度55±5%, 換気回数約15回/時間, 照明時間12時間 (7~19時点灯) に設定されたバリアシステムの飼育室内で、金属製金網床ケージ (日本ケージ(株)製) に1匹ずつ収容し、固型飼料 (CE-2, 日本クレア(株)製) および水道水を自由に摂取させて飼育した。

## 3. 投与量, 投与方法, 群構成および群分け

本試験における投与量は, 予備試験として4-(1-メチルプロピル)フェノールのラットにおける7日間反復経口投与毒性試験を実施し, この成績を参考にして決定した。4-(1-メチルプロピル)フェノールを100, 300および1000 mg/kgの用量で雄のSprague-Dawley系ラットに7日間反復投与した結果, 投与直後に一過性の流涎が観察され, 1000 mg/kg投与群でわずかな体重増加抑制傾向が認められたが, 死亡例はなく, また, 投与第7日に行った剖検においても, 被験物質投与に起因すると思われる異常所見は認められなかった。従って, 本試験では, 化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」に従い, 雌雄とも最高投与用量を1000 mg/kgとし, 以下300および100 mg/kgの投与量を設定した。なお, 雌雄とも1群を溶媒対照群として日局ゴマ油のみを経口投与した。

投与経路は, 前述の化審法ガイドラインに従い経口投与とした。投与は, 1日1回, 28日間, ラット用胃管を用いて強制的に行い, 投与液量は, 雌雄とも5 ml/kgとして, 各投与時に最も近い時点で測定された体重値を基準にして個別に算出した。

群分けは, 投与開始前日の体重に基づいて, 体重別層化無作為抽出法により行った。また, 28日間の投与試験の後に行った15日間の回復試験には, 溶媒対照群の雌雄各5匹, および1000 mg/kg投与群の各4匹(雌雄各1匹が死亡したため)を各群とも動物番号の若いほうから選択し, 供試した。

## 4. 検査項目

## 1) 一般状態の観察

投与期間および回復試験期間を通じて, 死亡例の有無を調べたほか, 生存例全例について一般状態を毎日1回(投与期間中は投与後)観察した。

## 2) 体重および摂餌量の測定

全例について, 1週間に2回(各週の第1日と第5日)の頻度で体重を測定し, 投与期間あるいは回復試験期間終了日および剖検日にも体重の測定を行った。また, 1週間に1回の頻度で1日当たりの摂餌量の測定も行った。

## 3) 尿検査

投与期間終了週(投与第26日~27日)に各群とも動物番号の若い方から5匹を選択し, また回復試験期間終了週(回復第13日~14日)には回復試験例全例を約24時間代謝ケージ(夏目製作所製)に収容して採尿した。その後, 尿量は天秤測定した尿重量を比重で除して算出し, 色調および混濁は視診によって, 比重は糖度計を用いて測定した。また, マルティステックスSG/エームス・クリニテックシステム(マイルス・三共)を用いた試験紙法によるpH, 潜血, 総蛋白, 糖, ケトン体ビリルビン, ウロビリノーゲンの測定および光学顕微鏡を用いての沈渣の検査には, 代謝ケージに収容して約4時間以内に採取した新鮮尿を用いた。

## 4) 血液学的検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検に先立ち, 約18ないし24時間絶食させた後, ベントバルビ

タール麻酔下でEDTAを抗凝固剤として腹部後大静脈より採血した。得られた血液について, Coulter Counter Model S-PLUS IV(コルターエレクトロニクス社製)を用い赤血球数(RBC), 白血球数(WBC), 血色素濃度(Hb), 平均赤血球容積および血小板数を測定し, この値をもとにヘマトクリット値(Ht;  $0.001 \times RBC \times MCV$ ), 平均赤血球血色素量( $Hb \times 1000/RBC$ )および平均赤血球血色素濃度( $Hb \times 100/Ht$ )を算出した。また, 白血球分類は血液塗抹標本にWright-Giemsa染色を施し, 光学顕微鏡にて視算した。網状赤血球比率(Ri)は光学顕微鏡を用いBrecher法にて視算した。さらに, クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液を用い, CA-3000(東亜医用電子(株)製)にてプロトロンビン時間(PT; シンプラスチンオート試薬使用)および活性部分トロンボプラスチン時間(APTT; プラテリンAオート試薬使用)の測定を行った。

## 5) 血液生化学的検査

前述の血液学的検査のための採血に引き続き, ヘパリンを抗凝固剤として採血し, それぞれ血漿を分離し, 遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(Hoffmann-La Roche社製)を用いて, 総蛋白濃度(ビウレット法), アルブミン濃度(BCG法), 総コレステロール濃度(COD-DAOS法), ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法), 尿素窒素濃度(ウレアーゼ・GLDH法), クレアチニン濃度(Jaffe法), アルカリフォスファターゼ活性(p-ニトロフェニルリン酸基質法), GOT活性(SSCC法), GPT活性(SSCC法), LDH活性(Wroblewski-La Due法),  $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法), カルシウム濃度(OCPC法), 無機リン濃度(モリブデン直接法)およびトリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)を測定し, Na-K-Clアナライザー-IT-3型(常光)を用いて, ナトリウム濃度, カリウム濃度(イオン電極法)および塩素濃度(電量滴定法)を測定した。また, 総蛋白濃度とアルブミン濃度をもとにA/G比の算出を行った。

## 6) 病理学的検査

上記の採血に引き続き, 必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺したのち, 器官および組織の肉眼的観察を行った。また, 各動物の脳, 肝臓, 腎臓, 副腎, 卵巣または精巣について重量測定を行い, 各器官重量を剖検日の体重で除して, それぞれの相対重量を算出した。また, 重量測定を行った器官および下垂体, 眼球, 甲状腺, 上皮小体, 心臓, 肺, 脾臓, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸, 直腸, 膀胱, 大腿骨骨髓を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液(pH7.2)で固定し, 肝臓, 腎臓, 副腎, 心臓, 脾臓および剖検時に肉眼的変化の認められた器官について, パラフィン包埋後, ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。病理組織学的検査は, 雌雄とも投与期間終了時の溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の肝臓, 腎臓, 副腎, 心臓, 脾臓および剖検時に肉眼的変化の認められた器官について行い, その後, 病組織学的変化の認められた肝臓, 腎臓および前胃については, 雌雄とも他の2群および回復試験期間終了時の全群についても実施した。途中死亡例については, 剖検後, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎および肉眼的に変化の認められた器官について同様に病理組織学的検査を実施した。

## 5. 統計処理法

体重、摂餌量、半定量検査を除く尿検査および定期解剖例の血液学的検査、血液生化学的検査ならびに器官重量の値について、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群の構成が溶媒対照群を含め3群以上ある場合は、多重比較 (Bartlettの方法による分散の一様性の検定、一元配置型の分散分析、DunnnettあるいはScheffeの方法による多重比較) を行った。また、試験群が溶媒対照群を含め2群となる場合には、溶媒対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は、等分散であれば Studentの t 検定、不等分散であれば Aspin-Welch 検定を行った。

## 試験結果

## 1. 一般状態

被験物質投与群の雌雄全例で、投与直後に一過性の流涎が観察された (Table 1)。また、その多くは投与第2日以降に発現し、投与を重ねるに従って流涎のみられる例

数が増加する傾向にあった。特に1000 mg/kg投与群では雌雄ともに全例で、投与第6日以降から毎日一過性の流涎が認められるようになり、投与時に保定するだけで流涎が観察される例もあった。また、1000 mg/kg投与群では雌雄ともに、被験物質投与に際して投与操作に抵抗を示す傾向がみられ、しばしば呼吸音の異常、粗大呼吸、開口呼吸が認められたほか、一部の例では半眼状態、下腹部被毛に黄色ないし褐色の汚染があり、一過性の振戦などが認められた。

投与期間中、1000 mg/kg投与群の雌1例が投与第13日に、同群の雄1例が投与第9日に死亡した。雌の死亡例では、先に述べた流涎の他に、投与第4日からは呼吸音に異常が認められた。さらに、投与第12日からは口部周囲と両前肢の被毛が褐色に汚れ、腹囲膨満、粗大呼吸および開口呼吸がみられるようになり、投与第13日には排便量の減少とともに灰白色調の軟便の排泄が観察され、同日の被験物質投与後に死亡した。雄の死亡例では、投与第1日から投与直後に一過性の流涎が観察され、投与第6日からは呼吸音の異常が認められるようになり、投与第9日に死亡した。

Table 1 Incidence of salivation of rats treated orally with 4-(1-methylpropyl)phenol in the 28-day repeated dose toxicity study

Sex	Dose	Number of animals	Number of rats with salivation study days				Incidence
			1~7	8~14	15~21	22~28	
Male	0 mg/kg	10	0	0	0	0	0/0
	100 mg/kg	5	4	5	5	5	5/5
	300 mg/kg	5	5	5	5	5	5/5
	1000 mg/kg	10 <sup>a)</sup>	10	10	9	9	10/10
Female	0 mg/kg	10	0	0	0	0	0/0
	100 mg/kg	5	1	3	5	4	5/5
	300 mg/kg	5	5	5	5	5	5/5
	1000 mg/kg	10 <sup>a)</sup>	10	10	9	9	10/10

a) One male and one female rat died on the 9th day and the 13th day, respectively.

2. 体重 (Fig.1, 2) および摂餌量

雌では、投与期間および回復試験期間を通して、溶媒対照群と被験物質投与群との間で体重および摂餌量に差は認められなかったが、雄は1000 mg/kg投与群において、投与第5日以降から回復試験期間終了日まで体重が低い値を示し、投与開始日に摂餌量も低下が認められた。

3. 尿検査 (Table 2, 3)

投与期間終了週の検査では、1000 mg/kg投与群の雌において尿量が増加し、個体別に比較すると5例中2例で著しい増加がみられた。また、300 mg/kg 投与群の雄では、比重が上昇した。その他、一部の例でビリルビン、

蛋白質、ケトン体が陽性または疑陽性となることがあり、尿沈渣中に上皮細胞または結晶が観察されることもあったが、いずれも、その出現例数あるいは程度に用量依存性は認められなかった。回復試験期間終了週の検査では、1000 mg/kg投与群の雌の1例でビリルビンが陽性であった。

4. 血液学的検査 (Table 4, 5)

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雌において、プロトロンビン時間の延長が認められた。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雄において網状赤血球比率の上昇が認められた。

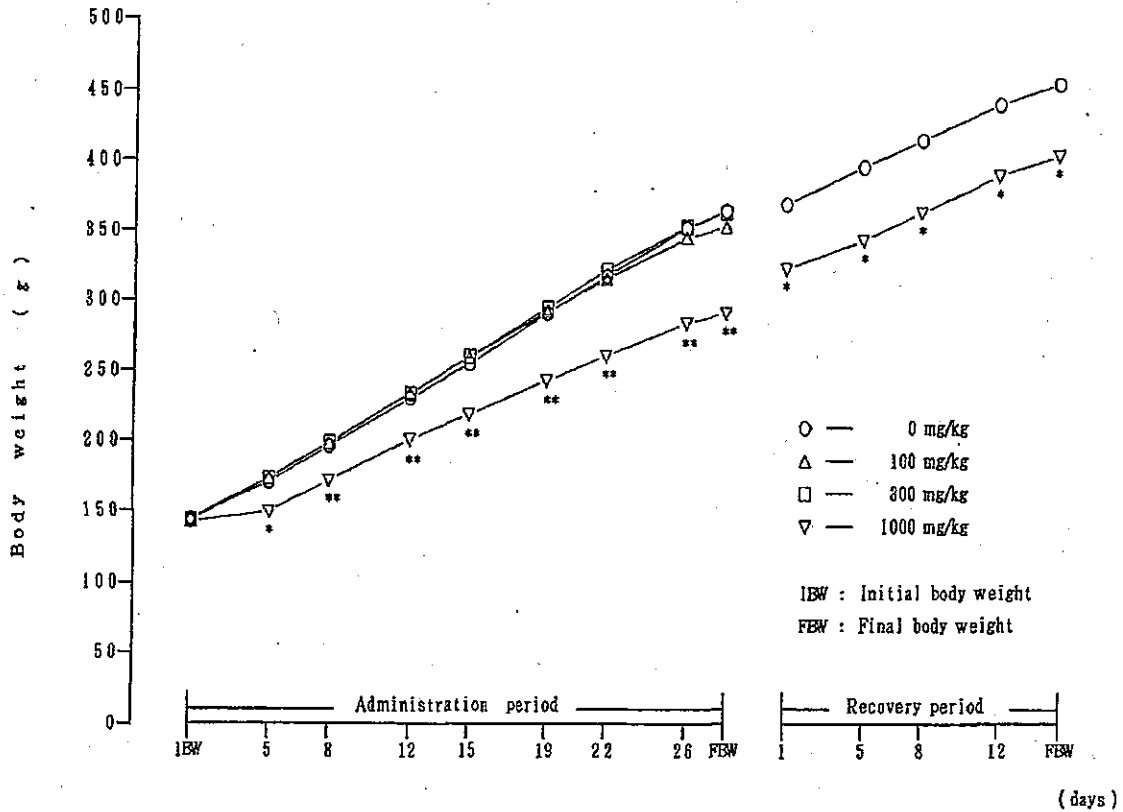


Fig.1 Body weight changes of male rats treated orally with 4-(1-methylpropyl)phenol in 28-day repeated dose toxicity study

\* and \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

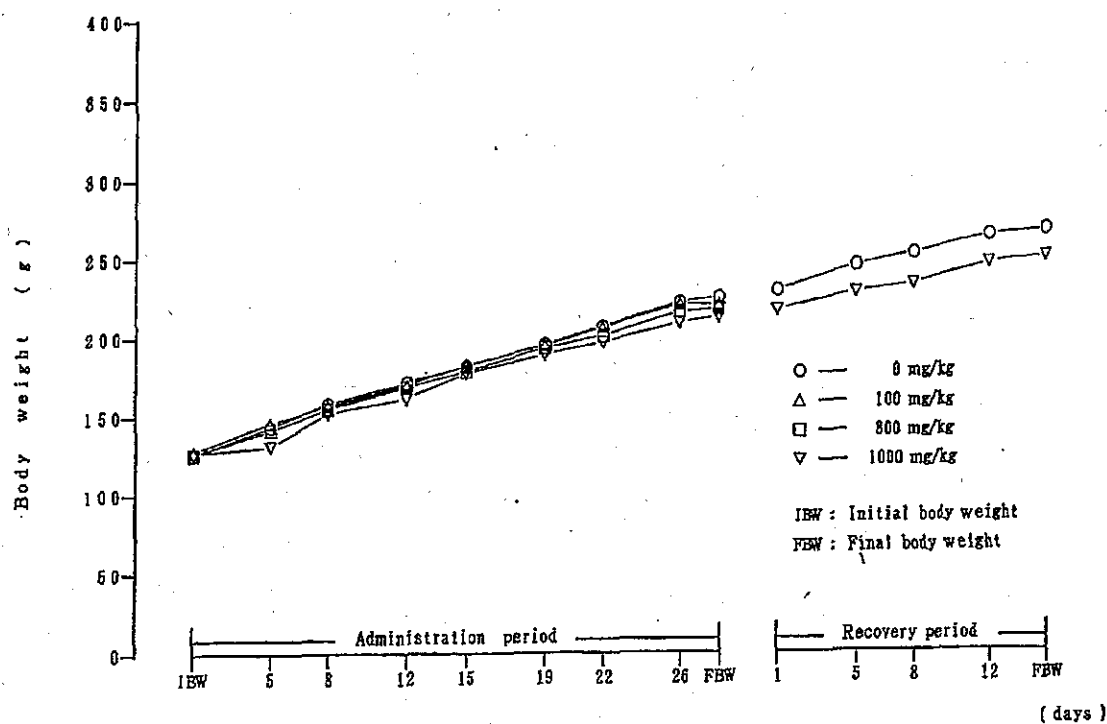


Fig.2 Body weight changes of female rats treated orally with 4-(1-methylpropyl)phenol in 28-day repeated dose toxicity study

Table 2 Results of urinalysis of rats treated orally with 4-(1-methylpropyl)phenol at 26th day of the administration period in the 28-day repeated dose toxicity study

Sex	Dose	Number of animals	Volume <sup>a)</sup> (ml/24hr)	Specific gravity	pH			Protein <sup>b)</sup>	Ketone <sup>c)</sup>	Bilirubin <sup>d)</sup>	Crystal <sup>e)</sup>	Epithelium cell <sup>e)</sup>								
					-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+				
Male	0 mg/kg	5	24.7 ± 11.2	1.034 ±0.010	1	0	2	0	3	1	1	2	4	1	0	5	0			
	100 mg/kg	5	16.0 ± 3.7	1.042 ±0.012	1	2	2	0	0	1	3	1	2	2	1	4	1	1		
	300 mg/kg	5	14.4 ± 1.6	1.052* ±0.005	0	4	1	0	0	0	2	3	1	3	1	5	0	5		
	1000 mg/kg	5	27.0 ± 4.1	1.030 ±0.005	3	2	0	0	0	3	2	0	5	0	0	5	0	2	3	
Female	0 mg/kg	5	11.4 ± 3.4	1.044 ±0.010	0	3	1	1	3	2	0	0	4	1	5	0	5	4	1	
	100 mg/kg	5	11.8 ± 6.6	1.042 ±0.011	0	2	3	0	5	0	0	0	5	0	5	0	2	3	4	1
	300 mg/kg	5	15.5 ± 5.8	1.036 ±0.006	1	4	0	0	4	1	0	0	5	0	5	0	2	3	2	3
	1000 mg/kg	5	24.5* ± 8.9	1.029 ±0.005	2	3	0	0	3	2	0	0	5	0	5	0	5	0	3	2

a) mean±S.D.

\* Significantly different from the control at p<0.05

b) - Negative; ± Trace; + 30 mg/dl; ++ 100 mg/dl

c) - Negative; ± 5 mg/dl; + 15 mg/dl

d) - Negative; + Slight

e) - Not observed; ± A few; + Abundant

28日間反復投与毒性試験

Table 3 Results of urinalysis of rats treated orally with 4-(1-methylpropyl)phenol at 13th day of the recovery period in the 28-day repeated dose toxicity study

Sex	Dose	Number of animals	Volume <sup>a)</sup> (ml/24hr)	Specific gravity	pH			Protein <sup>b)</sup>	Ketone <sup>c)</sup>	Bilirubin <sup>d)</sup>	Crystal <sup>e)</sup>	Epithelium cell <sup>e)</sup>						
					6	7	8	9	- ±	+++	- ±	+	-	+				
Male	Control	5	27.0 ± 7.7	1.037 ±0.009	0	4	1	0	1	3	1	0	3	2				
	1000 mg/kg	4	25.2 ± 3.4	1.034 ±0.009	0	3	1	0	1	2	1	0	4	0	1	3		
Female	0 mg/kg	5	12.9 ± 3.2	1.042 ±0.006	0	3	2	0	4	1	0	0	5	0	1	4		
	1000 mg/kg	4	14.0 ± 7.8	1.047 ±0.009	1	3	0	0	2	1	1	0	4	0	3	1	0	2

a) mean ± S.D.

b) - Negative; ± Trace; + 30 mg/dl; ++ 100 mg/dl

e) - Not observed; ± A few; + Abundant

c) - Negative; ± 5 mg/dl; + 15 mg/dl

d) - Negative; + Slight

Table 4 Results of hematological examination of rats treated orally with 4-(1-methyl propyl)phenol at termination of administration period in the 28-day repeated dose toxicity study

Sex	Dose	Number of animals	RBC	Hb	Ht	Rt	WBC	Platelet	PT	APT
			(×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	(g/dl)	(%)	(%)	(×100/mm <sup>3</sup> )	(×10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	(sec)	(sec)
Male	0 mg/kg	5	714 ±33	14.2 ±0.5	40.5 ±1.0	3.1 ±0.4	62 ± 6	121.3 ±16.4	22.4 ±2.7	25.1 ±2.0
	100 mg/kg	5	681 ±13	14.4 ±0.4	40.8 ±1.2	2.9 ±0.6	71 ±17	115.1 ± 8.3	21.6 ±3.9	23.9 ±0.9
	300 mg/kg	5	685 ±28	13.9 ±0.2	39.5 ±0.6	3.6 ±0.4	56 ±18	123.1 ±20.2	23.0 ±3.6	26.0 ±2.5
	1000 mg/kg	5	721 ±60	14.0 ±0.6	40.1 ±1.6	2.6 ±1.0	53 ±17	107.4 ± 9.9	21.5 ±3.8	24.4 ±2.4
Female	0 mg/kg	5	681 ±27	13.6 ±0.5	37.4 ±1.3	2.5 ±0.5	50 ±19	105.7 ± 4.7	15.5 ±0.4	19.3 ±1.3
	100 mg/kg	5	689 ±42	13.9 ±0.7	38.2 ±1.5	2.3 ±0.5	79 ±30	105.4 ±14.1	15.8 ±0.7	20.3 ±1.3
	300 mg/kg	5	665 ±21	13.4 ±0.6	37.2 ±1.1	2.0 ±0.7	50 ±17	103.0 ± 6.4	15.3 ±0.4	19.6 ±1.4
	1000 mg/kg	5	679 ±28	13.5 ±0.6	38.0 ±1.8	1.8 ±0.8	45 ±20	99.0 ±11.8	16.7 * ±1.0	20.6 ±0.8

Parameter: mean ± S.D.

\*: Significantly different from control at p<0.05

Table 5 Results of hematological examination of rats treated orally with 4-(1-methyl propyl)phenol at termination of the recovery period in the 28-day repeated dose toxicity study

Sex	Dose	Number of animals	RBC	Hb	Ht	Rt	WBC	Platelet	PT	APTT
			(×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	(g/dl)	(%)	(%)	(×100/mm <sup>3</sup> )	(×10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	(sec)	(sec)
Male	0 mg/kg	5	767 ±18	14.8 ±0.3	40.8 ±0.6	2.5 ±0.4	102 ±27	109.9 ± 8.5	30.8 ±3.8	29.4 ±1.0
	1000 mg/kg	4	747 ±33	14.9 ±0.7	40.8 ±1.4	3.2 * ±0.2	100 ± 8	120.2 ±10.6	25.0 ±5.7	26.0 ±3.1
Female	0 mg/kg	5	725 ±27	14.7 ±0.6	39.3 ±1.6	3.0 ±0.8	73 ±12	104.1 ± 8.0	16.0 ±1.2	20.8 ±1.7
	1000 mg/kg	4	724 ± 9	14.4 ±0.4	38.8 ±1.4	2.8 ±0.8	84 ±34	112.3 ± 7.3	16.9 ±1.3	22.1 ±0.7

Parameter: mean ± S.D.

\*: Significantly different from control, p<0.05

## 5. 血液生化学的検査 (Table 6, 7)

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群で雌雄ともに GPT活性の上昇が認められ、また、雌では GOT活性の上昇が、雄では $\gamma$ -GTP活性およびナトリウム濃度の上昇、ブドウ糖濃度およびカリウム濃度の低下が認められた。さらに、300 mg/kg投与群の雌で尿素窒素濃度の低下が、雄ではアルカリフォスファターゼ活性の低下が認められた。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群において、雌で尿素窒素濃度が上昇し、雄ではブドウ糖濃度の低下、およびナトリウム濃度の上昇が認められた。

## 6. 病理学的検査

## 1) 器官重量

投与期間終了時屠殺剖検例では、1000 mg/kg投与群の雌において、肝臓の相対重量の増加がみられ、雄においては、肝臓の絶対重量の減少および脳、腎臓、精巣の相対重量の増加が認められた。また、1000 mg/kg投与群の雄において、左右の副腎で相対重量の増加が認められたが、合計重量に有意差はなかった。

回復試験期間終了時屠殺剖検例では、雄の1000 mg/kg投与群における脳および肝臓の絶対重量および肝臓の相対重量が減少した。

Table 6 Results of blood chemical examination of rats treated orally with 4-(1-methylpropyl)phenol at termination of the administration period in the 28-day repeated dose toxicity study

Sex	Dose	Number of animals	Total protein (g/dl)	BUN (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	$\gamma$ -GPT (U/l)
Male	0 mg/kg	5	5.2 $\pm 0.3$	14 $\pm 3$	118 $\pm 8$	140.9 $\pm 0.8$	3.90 $\pm 0.11$	103.7 $\pm 1.3$	28 $\pm 7$	67 $\pm 10$	0 $\pm 0$
	100 mg/kg	5	5.3 $\pm 0.1$	13 $\pm 1$	117 $\pm 12$	141.5 $\pm 0.6$	3.83 $\pm 0.15$	104.1 $\pm 1.2$	25 $\pm 4$	60 $\pm 6$	0 $\pm 0$
	300 mg/kg	5	5.1 $\pm 0.2$	13 $\pm 2$	119 $\pm 10$	141.3 $\pm 0.5$	3.74 $\pm 0.15$	103.9 $\pm 0.9$	31 $\pm 7$	64 $\pm 11$	0 $\pm 0$
	1000 mg/kg	5	5.3 $\pm 0.3$	13 $\pm 4$	91 ** $\pm 12$	142.3 * $\pm 0.8$	3.60 * $\pm 0.18$	102.7 $\pm 4.8$	57 ** $\pm 9$	77 $\pm 9$	1 ** $\pm 0$
Female	0 mg/kg	5	5.3 $\pm 0.3$	20 $\pm 3$	115 $\pm 11$	139.9 $\pm 0.7$	3.80 $\pm 0.14$	104.0 $\pm 1.7$	21 $\pm 3$	56 $\pm 5$	1 $\pm 1$
	100 mg/kg	5	5.3 $\pm 0.3$	17 $\pm 2$	121 $\pm 13$	139.7 $\pm 0.5$	3.63 $\pm 0.32$	102.8 $\pm 1.7$	21 $\pm 3$	52 $\pm 3$	1 $\pm 1$
	300 mg/kg	5	5.2 $\pm 0.2$	14 * $\pm 4$	106 $\pm 12$	140.9 $\pm 1.3$	3.72 $\pm 0.21$	103.7 $\pm 1.7$	24 $\pm 3$	57 $\pm 6$	1 $\pm 1$
	1000 mg/kg	5	5.1 $\pm 0.2$	15 $\pm 2$	109 $\pm 5$	139.3 $\pm 2.9$	3.62 $\pm 0.51$	102.1 $\pm 2.1$	46 ** $\pm 3$	71 ** $\pm 7$	1 $\pm 1$

Parameter : mean  $\pm$  S.D.

\* :Significantly different from the control at  $p < 0.05$

\*\* :Significantly different from the control at  $p < 0.01$

Table 7 Results of blood chemical examination of rats treated orally with 4-(1-methyl propyl)phenol at termination of the recovery period in 28-day repeated dose toxicity study

Sex	Dose	Number of animals	Total protein (g/dl)	BUN (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	$\gamma$ -GPT (U/l)
Male	0 mg/kg	5	5.7 $\pm 0.1$	17 $\pm 2$	137 $\pm 7$	141.0 $\pm 0.8$	3.76 $\pm 0.18$	103.0 $\pm 0.4$	23 $\pm 3$	53 $\pm 5$	0 $\pm 0$
	1000 mg/kg	4	5.5 $\pm 0.3$	18 $\pm 1$	107 ** $\pm 17$	142.7 * $\pm 0.7$	3.67 $\pm 0.11$	104.5 $\pm 1.1$	23 $\pm 3$	53 $\pm 4$	1 $\pm 1$
Female	0 mg/kg	5	5.6 $\pm 0.3$	16 $\pm 2$	120 $\pm 5$	139.5 $\pm 0.4$	3.73 $\pm 0.09$	103.6 $\pm 0.9$	20 $\pm 1$	52 $\pm 4$	1 $\pm 1$
	1000 mg/kg	4	5.4 $\pm 0.2$	22 * $\pm 3$	112 $\pm 12$	140.1 $\pm 0.7$	3.67 $\pm 0.20$	103.6 $\pm 0.7$	19 $\pm 2$	51 $\pm 7$	1 $\pm 1$

Parameter : mean  $\pm$  S.D.

\*:Significantly different from the control at  $p < 0.05$

\*\* :Significantly different from the control at  $p < 0.01$

## 2) 剖検所見

投与期間終了時屠殺剖検例では、1000 mg/kg投与群の雄の2例に前胃粘膜の肥厚が認められ、そのうち1例には幽門部粘膜の潰瘍が認められた。

回復期間終了時屠殺剖検例では1000 mg/kg投与群の雄の1例に膵胃部の白濁が、他の1例で肝臓に黄白色斑が認められた。

投与第13日に死亡した1000 mg/kg投与群の雌では、肺の出血、胃から腸にかけてガスの貯留および頭部の骨膜の出血が認められた。一方、投与第9日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄では、肺のうっ血、生殖器の萎縮、耳介のうっ血、胃および腸におけるガスの貯留、皮下および腹腔内脂肪組織の減少、胸腺の出血および肝臓の萎縮などが認められた。

## 3) 病理組織学的所見 (Table 8, 9)

投与期間終了時屠殺剖検例では、300 mg/kg投与群の雄の1例と1000 mg/kg投与群の雌の3例および雄の2例の腎臓において、腎乳頭壊死が認められ、そのうち1000 mg/kg投与群の雄の1例では、集合管上皮細胞の肥大および間質への好中球の浸潤が、また、他の1例では壊死部付近の腎乳頭に石灰の沈着が認められた。さらに、腎乳頭壊死のみられなかった1000 mg/kg投与群の雄の1例および300 mg/kg投与群の雌雄の各1例においても、腎乳頭先端部の間質に、エオジンに淡染する小塊状あるいは微細顆粒状を呈する少量の物質が認められたほか、これらの変化が認められなかった1000 mg/kg投与群の雄の2例でも、腔内にエオジン淡染物を含む集合管の軽度な拡張が認められた。また、1000 mg/kg投与群の上記以外の雄の

Table 8 Results of histopathological examination of rats treated orally with 4-(1-methylpropyl)phenol at termination of the administration period in the 28-day repeated dose toxicity study

Sex	Organ and findings	Dose (number of animals)			
		0 mg/kg (n=5)	100 mg/kg (n=5)	300 mg/kg (n=5)	1000 mg/kg (n=5)
		- ± + ++ +++	- ± + ++ +++	- ± + ++ +++	- ± + ++ +++
	(Liver)				
	fatty change in periperal zone	0 3 2 0 0	1 4 0 0 0	0 4 1 0 0	2 3 0 0 0
	(Kidney)				
	papillary necrosis	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 1 0 0 0	3 0 2 0 0
	cell debris in papillary interstitium	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 1 0 0 0	4 0 1 0 0
	calcification in papilla	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 0 1 0 0
	swelling of epithelial cells of				
Male	collecting duct	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 0 1 0 0
	flocculent material in the lumen				
	of collecting duct	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	3 1 1 0 0
	hyperplasia of pelvic epithelium	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
	cell debris in pelvis	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
	infiltration of neutrophils	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 0 1 0 0
	infiltration of lymphocytes				
	in subepithelial layer of pelvis	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
	(Forestomach)				
	diffuse hyperplasia of mucous epithelium	5 0 0 0 5	0 0 0 0 4	1 0 0 0 0	0 5 0 0
	(Liver)				
	fatty change in periperal zone	0 3 2 0 0	0 5 0 0 0	1 2 2 0 0	2 3 0 0 0
	(Kidney)				
	papillary necrosis	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	2 3 0 0 0
	cell debris in papillary interstitium	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 1 0 0 0	5 0 0 0 0
	calcification in papilla	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
	swelling of epithelial cells of				
Female	collecting duct	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
	flocculent material in the lumen				
	of collecting duct	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
	hyperplasia of pelvic epithelium	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 0 1 0 0
	cell debris in pelvis	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 1 0 0 0
	infiltration of neutrophils	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
	infiltration of lymphocytes				
	in subepithelial layer of pelvis	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 0 0 1 0
	(Forestomach)				
	diffuse hyperplasia of mucous epithelium	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0	0 1 4 0 0

Grade: - Negative; ± Very slight; + Slight; ++ Moderate; +++ Severe.



Table 9 Results of histopathological examination of rats treated orally with 4-(1-methyl propyl)phenol at termination of the recovery period in the 28-day repeated dose toxicity study

Organ and findings	Sex/Dose (number of animals)									
	Male				Female					
	0 mg/kg (n=5)		1000 mg/kg (n=4)		0 mg/kg (n=5)		1000 mg/kg (n=4)			
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Liver)										
fatty change in periperal zone	0	0	5	0	0	1	3	0	0	0
(Kidney)										
papillary necrosis	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0
cell debris in papillary interstitium	5	0	0	0	0	3	0	1	0	0
calcification in papilla	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0
swelling of epithelial cells of collecting duct	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0
flocculent material in the lumen of collecting duct	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0
hyperplasia of pelvic epithelium	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0
cell debris in pelvis	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0
infiltration of neutrophils	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0
infiltration of lymphocytes	5	0	0	0	0	3	0	1	0	0
(Forestomach)										
diffuse hyperplasia of mucous epithelium	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0

Grade: - Negative; ± Very slight; + Slight; ++ Moderate; +++ Severe.

1例では、腎盂粘膜上皮下に顕著なリンパ球の浸潤があり、腎盂内には少量の変性した細胞の残屑が含まれ、腎盂粘膜上皮の過形成と粘膜上皮のびまん性の肥厚が認められた。前胃においては、1000 mg/kg投与群の全例および腎乳頭壊死がみられた300 mg/kg投与群の雄の1例に粘膜上皮のびまん性の過形成がみられ、上皮および角化層の肥厚が認められた。肝臓においては1000 mg/kg投与群の雌雄ともに、溶媒対照群と比較して小葉周辺部の肝細胞脂肪変性がやや軽度であった。

回復期間終了時屠殺剖検例では、肝臓において、1000 mg/kg投与群の雄の1例でリンパ球の浸潤が観察され、他の1例で、腎乳頭先端部の間質に変性した細胞が認められた。肝臓においては、1000 mg/kg投与群の雌雄ともに溶媒対照群と比較して小葉周辺部肝細胞の脂肪変性がやや軽度であった。さらに1000 mg/kg投与群の雌の1例で、前胃粘膜上皮のごく軽度なびまん性の過形成があった。途中死亡した1000 mg/kg投与群の雌では、腎臓に両側性の腎乳頭壊死、尿細管の拡張、集合管上皮細胞の腫脹および集合管腔内変性物が認められ、前胃に粘膜上皮のびまん性の過形成が、脾臓には濾胞の萎縮および褐色色素の沈着が観察されたほか、肺に出血、頭部の骨膜に出血および線維化が認められた。また、同じく途中死亡した1000 mg/kg投与群の雄では、片側の腎臓にごく軽度の腎乳頭壊死があり、前胃に粘膜上皮のびまん性の明らかな過形成がみられ、肺にはうっ血が、鼻腔内にはうっ血、出血、好中球の浸潤、粘膜上皮細胞の壊死および脱落が認められた。一方、肉眼的に萎縮が観察された精巣および副生殖器では、組織学的に未成熟な状態であった他に変化は認められず、その他には、耳介のうっ血、胸腺の出血、肝臓の巣状壊死、脾臓の濾胞の萎縮などが認められた。

#### 考察

1000 mg/kg投与群の雄で体重増加抑制と摂餌量の減少があり、同群の雌雄各1例が投与期間中に死亡した。死亡例の病理学的所見としていずれも腎乳頭壊死、角化層の肥厚を伴った前胃粘膜上皮の過形成、胃あるいは腸管のガス充満による拡張、脾臓の萎縮が認められたほか、雌では肺および頭部骨膜の出血、雄では皮下および腹腔内脂肪の減少、肝臓の萎縮、鼻腔粘膜の炎症、肝臓の巣状壊死があり、生殖器は未成熟であった。しかし、これらの病理学的所見からは死亡例の死亡原因を明らかにすることは出来なかった。

一般状態の変化として、雌雄ともに被験物質投与群の全例で、投与直後から一過性の流涎が観察され、特に300および1000 mg/kg投与群では、被験物質投与時に保定するだけで流涎が認められる例もあった。一方、病理組織学的検査では、死亡例のみならず1000 mg/kg投与群の投与終了時屠殺剖検例においても前胃粘膜の肥厚が観察された。この前胃粘膜の肥厚は、しばしば軽度の刺激に対する非特異的な反応として観察されることが明らかにされており<sup>3)</sup>、また、被験物質投与に際しては、投与操作を拒否して抵抗する傾向が認められたことから、被験物質が局所刺激作用を有している可能性が示唆された。従って、被験物質投与群に観察された流涎は、被験物質の薬理作用によるものではなく、被験物質が有する何らかの刺激によって誘発されたものであり、反復投与によって条件反射が成立したものと考えられる。さらに、1000 mg/kg投与群の一部の例では、呼吸音の異常、粗大呼吸あるいは開口呼吸が観察された。本試験において、これらの異常呼吸の原因を特定することは出来なかったが、死亡例の1例に鼻腔粘膜の炎症が認められたことか

ら、動物が投与操作に抵抗したため、投与検体が逆流して鼻腔内に流入したことに起因している可能性も考えられる。なお死亡例に認められた胃あるいは腸管のガスによる拡張は、開口呼吸時に吸入した空気が消化管内に貯留したためではないかと考えられる。

投与期間中に死亡した2例では、腎臓に集合管上皮細胞の腫脹あるいは腎乳頭壊死が認められ、投与終了時屠殺剖検例においても300および1000 mg/kg投与群の一部の例で腎乳頭壊死のほか、集合管上皮細胞の腫脹、乳頭部間質細胞の変性があり、これに伴って集合管の拡張、腎盂粘膜上皮のびまん性の肥厚等が認められた。これらの変化は、本試験で使用したSD系の6~9週齢のラットにおける自然発生病変としてはきわめてまれである。一方、Kawasakiら<sup>2)</sup>は4-(1-メチルプロピル)フェノールの混餌投与による毒性試験において、腎臓の近位尿管および集合管上皮に変性がおこることを明らかにしていることから、本試験で認められた腎乳頭壊死あるいは変性は被験物質投与に起因した変化であると判断される。なお上述の4-(1-メチルプロピル)フェノールの混餌投与による毒性試験においても、前胃粘膜の肥厚および角化亢進が報告されている。一方、尿検査において、投与期間終了週に1000 mg/kg投与群の雌で尿量の増加が認められ、特に2例で著しい高値を示したが、この2例はともに回復試験例であり、病理組織学的検査時には腎臓に著変が認められなかったことから、本試験においては被験物質投与の影響によるものであるのか否かは明らかに出来なかった。血液生化学的検査所見として、投与期間終了時において、1000 mg/kg投与群の雌雄ともにGPT活性の上昇があり、さらに雌ではGOT活性の上昇、雄ではブドウ糖濃度の低下が認められた。しかし、病理組織学的検査では1000 mg/kg投与群の雌雄ともに、肝臓の小葉辺縁帯における肝細胞の脂肪の蓄積が溶媒対照群と比較して軽度ではあったが、その他に肝臓での著変が認められなかったことから、GPTあるいはGOT活性の上昇の原因を明らかにすることは出来なかった。なお、溶媒対照群と1000 mg/kg投与群との間で認められた肝細胞の脂肪蓄積量の差は、体重および摂餌量の差がみられなかった雌においても認められたことから、その原因は摂餌量の差によるカロリー摂取量の差に起因するものではなく、1000 mg/kg投与群と比較すると、対照群においてより大量の溶媒であるゴマ油が投与されたことが原因である可能性が示唆された。

その他投与期間終了時の種々の検査において、溶媒対照群と被験物質投与群との間で統計学的に有意差の認められる項目もあったが、いずれも生理的変動範囲を越えるものではなく、また、用量依存性も認められなかったことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。回復試験期間終了時屠殺剖検例において、1000 mg/kg投与群の雄の1例で腎乳頭先端部の間質に変性した細胞が認められ、雌の1例では、前胃の粘膜上皮にごく軽度の過形成が認められたが、その他の検査所見に用量依存性が明らかで生理的変動範囲を越える変化は認められなかった。従って、腎臓乳頭部の壊死性変化以外で被験物質投与の影響であると示唆される変化は、休薬により速やかに回復し得るものと考えられた。

以上の結果から、本試験条件下における4-(1-メチルプロピル)フェノールの無影響量は、雌雄とも100mg/kgであると考えられる。

## 文献

- 1) R. James. J.B Glen.:  
*J. Med. Chem.*, 23, 350-1357 (1980)
- 2) Y.Kawasaki, K.Sekita, K.Matamoto, et al,  
*J. Toxicol.*, 13, 331(1988)
- 3) J.R.Glaister, "毒性病理学の基礎," 高橋道人監訳, ソフトサイエンス社, 東京, 1992.

## 連絡先

試験責任者: 今井 清  
試験担当者: 森村智美, 山口一喜, 小島幸一,  
吉村慎介, 関 剛幸  
(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

Authors: Kiyoshi Imai (Study director)  
Tomomi Morimura,  
Kazuki Yamaguchi, Kohichi Kojima,  
Shinsuke Yoshimura, Takayuki Seki  
Harano 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

# 4-(1-メチルプロピル)フェノールの細菌を用いる 復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 4-(1-Methylpropyl)phenol on Bacteria

### 要約

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、4-(1-メチルプロピル)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ート法により実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 uvr A を用い、用量設定試験では直接法および代謝活性化法のいずれも、50~5000 µg/プレート の用量で、本試験は直接法では 6.25~200 µg/プレート、代謝活性化法では 12.5~400 µg/プレート の用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰突然変異コロニー数の増加が認められなかったことから、4-(1-メチルプロピル)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。

### 方法

#### [検定菌]

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 uvr A  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* 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。

*E. 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、ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、約12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]

4-(1-メチルプロピル)フェノール (CAS No 99-71-8) は、分子量 150.24 のフェノール臭を有する淡黄色固体である。純度 66%のもの(ロット番号:C-119、不純物としてメタセカンダリーブチルフェノール 33%を含む、大日本インキ化学工業(株)製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温にて遮光して保管した。

4-(1-メチルプロピル)フェノールは、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略、ロット番号:TWP5445およびTWP5887、和光純薬工業(株))に50 mg/mlあるいは40 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。な

お、調製にあたって、純度換算は行わなかった。

秦野研究所において4-(1-メチルプロピル)フェノールのDMSO溶液中での安定性試験を高濃度(15 mg/ml)および低濃度(60 µg/ml)の2濃度について、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)の平均に対して、いずれも101%であった。

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、4mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、108~110%、62.5 µg/ml溶液は、109~110%であった。

以上の結果から、4-(1-メチルプロピル)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 (Sigma Chem.Co.)  
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))  
AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを、-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

#### [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
ピチオン	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)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸水素アンモニウムナトリウム ・4水和物	3.5 g

グルコース	20 g
バクトアガー (Difco)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 ml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
NADH	4 $\mu$ mol
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
0.2M リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 $\mu$ mol

\*\* : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノールピタール(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〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッブアガー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 Table に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた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。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、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、陰性対照のそれに比べて2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〕

4-(1-メチルプロピル)フェノールについて、50~5000  $\mu$ g/プレートの範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、WP2 の代謝活性化法を除いて、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において 500  $\mu$ g/プレート以上の用量で抗菌性が認められ、TA1537 の代謝活性化法では 150  $\mu$ g/プレートの用量でも認められた。そのため、200 および 400  $\mu$ g/プレートの用量で追加試験を行ったところ、直接法ではすべての検定菌において 200  $\mu$ g/プレートでも抗菌性が認められ、代謝活性化法では TA100 と TA1537 においては 200  $\mu$ g/プレートで、それ以外の検定菌では 400  $\mu$ g/プレートの用量で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌で、直接法では 200  $\mu$ g/プレート、代謝活性化法では 400  $\mu$ g/プレートとし、公比2で、6用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Table 1, 2 に示した。4-(1-メチルプロピル)フェノールについて、直接法では 6.25~200  $\mu$ g/プレート、代謝活性化法では 12.5~400  $\mu$ g/プレートの範囲で試験を実施した。

2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての検定菌において抗菌性が直接法では 200  $\mu$ g/プレート、代謝活性化法では 400  $\mu$ g/プレートの用量で認められた。

以上の結果に基づき、4-(1-メチルプロピル)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.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp161-187.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹  
 試験担当者: 坂本京子, 原 巧, 加藤基恵  
 石原尚古, 川上久美子  
 松木容彦, 北嶋美似子  
 (財) 食品薬品安全センター薬野研究所  
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study director)  
 Kyoko Sakamoto, Takumi Hara,  
 Motoe Katoh, Naoko Ishihara  
 Kumiko Kawakami,  
 Yasuhiko Matsuki, Miiko Kitashima  
 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 I Results of reverse mutation test (I) of 4-(1-methylpropyl) phenol \*\* on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ / plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)												
		Base - pair substitution type						Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA v rA			TA98			TA1537
S9 Mix (-)	0	99 95 91 ( 95 $\pm$ 4.0)	9 21 14 ( 15 $\pm$ 6.0)	13 15 17 ( 15 $\pm$ 2.0)	21 18 26 ( 22 $\pm$ 4.0)	7 10 12 ( 10 $\pm$ 2.5)								
	6.25	125 122 121 ( 123 $\pm$ 2.1)	7 16 10 ( 11 $\pm$ 4.6)	20 11 23 ( 18 $\pm$ 6.2)	18 17 30 ( 22 $\pm$ 7.2)	5 4 9 ( 6 $\pm$ 2.6)								
	12.5	124 130 124 ( 126 $\pm$ 3.5)	17 18 11 ( 15 $\pm$ 3.8)	21 16 18 ( 18 $\pm$ 2.5)	22 18 16 ( 19 $\pm$ 3.1)	8 8 6 ( 7 $\pm$ 1.2)								
	25	122 118 125 ( 122 $\pm$ 3.5)	23 15 17 ( 18 $\pm$ 4.2)	21 13 14 ( 16 $\pm$ 4.4)	20 21 29 ( 23 $\pm$ 4.9)	8 5 5 ( 6 $\pm$ 1.7)								
	50	138 139 112 ( 130 $\pm$ 15.3)	14 15 12 ( 14 $\pm$ 1.5)	21 23 19 ( 21 $\pm$ 2.0)	20 22 23 ( 22 $\pm$ 1.5)	8 9 8 ( 8 $\pm$ 0.6)								
	100	137 124 116 ( 126 $\pm$ 10.6)	25 14 12 ( 17 $\pm$ 7.0)	8 17 22 ( 16 $\pm$ 7.1)	17 17 21 ( 18 $\pm$ 2.3)	9 15 9 ( 11 $\pm$ 3.5)								
	200	133 * 105 * 118 * ( 119 $\pm$ 14.0)	13 * 5 * 10 * ( 9 $\pm$ 4.0)	14 * 19 * 24 * ( 19 $\pm$ 5.0)	21 * 25 * 16 * ( 21 $\pm$ 4.5)	9 * 5 * 6 * ( 7 $\pm$ 2.1)								
S9 Mix (+)	0	118 117 120 ( 118 $\pm$ 1.5)	15 17 13 ( 15 $\pm$ 2.0)	20 20 18 ( 19 $\pm$ 1.2)	26 35 30 ( 30 $\pm$ 3.5)	15 9 11 ( 12 $\pm$ 3.1)								
	12.5	137 153 141 ( 144 $\pm$ 8.3)	11 13 12 ( 12 $\pm$ 1.0)	21 23 26 ( 23 $\pm$ 2.5)	33 31 41 ( 35 $\pm$ 5.3)	16 15 12 ( 14 $\pm$ 2.1)								
	25	152 146 147 ( 148 $\pm$ 3.2)	8 16 14 ( 13 $\pm$ 4.2)	19 22 20 ( 20 $\pm$ 1.5)	32 24 48 ( 35 $\pm$ 12.2)	12 12 10 ( 11 $\pm$ 1.2)								
	50	159 137 158 ( 151 $\pm$ 12.4)	13 17 10 ( 13 $\pm$ 3.5)	28 23 29 ( 27 $\pm$ 3.2)	28 34 39 ( 34 $\pm$ 5.5)	14 17 11 ( 14 $\pm$ 3.0)								
	100	169 127 159 ( 152 $\pm$ 21.9)	18 8 20 ( 15 $\pm$ 6.4)	26 25 29 ( 27 $\pm$ 2.1)	34 39 30 ( 34 $\pm$ 4.5)	16 18 13 ( 16 $\pm$ 2.5)								
	200	160 149 165 ( 158 $\pm$ 8.2)	20 16 20 ( 19 $\pm$ 2.3)	22 21 19 ( 21 $\pm$ 1.5)	32 37 32 ( 34 $\pm$ 2.9)	20 20 12 ( 17 $\pm$ 4.6)								
	400	127 * 120 * 124 * ( 124 $\pm$ 3.5)	14 * 14 * 9 * ( 12 $\pm$ 2.9)	30 * 26 * 24 * ( 27 $\pm$ 3.1)	24 * 26 * 31 * ( 27 $\pm$ 3.6)	8 * 12 * 14 * ( 11 $\pm$ 3.1)								
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA								
	Dose ( $\mu\text{g}$ / plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80								
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	512 557 536 ( 535 $\pm$ 22.5)	254 285 294 ( 278 $\pm$ 21.0)	106 116 112 ( 111 $\pm$ 5.0)	581 533 515 ( 543 $\pm$ 34.1)	2966 2181 2986 ( 2711 $\pm$ 459.1)								
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA								
	Dose ( $\mu\text{g}$ / plate)	1	2	10	0.5	2								
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	576 636 595 ( 602 $\pm$ 30.7)	154 174 178 ( 169 $\pm$ 12.9)	605 564 576 ( 582 $\pm$ 21.1)	254 200 151 ( 202 $\pm$ 51.5)	205 182 216 ( 201 $\pm$ 17.3)								

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 66% and melastandary buthyl phenol (33%) was contained as impurity.

## 4-メチル-1-ペンテンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

### Single Dose Oral Toxicity Test of 4-Methyl-1-pentene in Rats

#### 要約

4-メチル-1-ペンテンの300および2000 mg/kgを1群3匹のCrj:CD(SD)IGS雌ラットに単回経口投与した時の毒性の概要を検討し、以下の成績を得た。

一般状態、体重推移および剖検所見のいずれにおいても被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下において4-メチル-1-ペンテンはGHS(Globally Harmonized Classification System)のCategory 5(>2000-5000 mg/kg)に属すると結論された。

#### 方法

##### 1. 被験物質の調製

4-メチル-1-ペンテン[ロット番号:3B24A, 純度:98.36%, 提供者:三井化学(山口)]は、沸点が54°C, 蒸気圧が35.6 kPa(267 mmHg)/25°C, 融点が-154°C, 比重が0.664(20/4°C), 蒸気密度が2.9(空気=1), 引火点が-25°C, 発火点が300°C, 溶解性が水にほとんど不溶等の物理化学的性状を示す無色透明の液体である。4-メチル-1-ペンテンは強酸化剤と接触すると激しい反応が起こりうる引火性の物質であることから、受入後は直射日光を避け、火気、熱源より遠ざけて、通風をよくし、蒸気が滞留しないようにして室温、気密条件下で保存した。取り扱い、眼、皮膚および衣服にふれないように、適切な保護具を着用して行った。4-メチル-1-ペンテンは、水に不溶であることから、媒体にはトウモロコシ油を選んだ。

被験物質の調製液中における安定性を分析し、室温保存で8日間安定であることを確認した。投与液は、被験物質を所定の濃度となるように媒体中に混和し、均一化させ速やかに遮光気密容器に入れ、投与に用いた。投与液の調製は用時に4回行った。投与液の各濃度をGC法で分析し、規定の濃度であることを確認した。

##### 2. 試験動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー厚木飼育センター生産のSPF Crj:CD(SD)IGS雌ラットを用いた。6および7週齢の雌ラット各8匹を購入し、馴化飼育後、各3匹を投与前日の体重に基づいて投与日毎に選抜し8週齢で試験に供した。

動物は温度22 ± 3°C, 湿度50 ± 20%, 換気回数10 ~ 15回/時間, 照明時間8時 ~ 20時に設定された飼育室で、

ブラケット式金属製金網床ケージに、群分け前は3匹、群分け後は1匹収容した。飼料はγ線照射固型飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業)を金属製給餌器により、飲料水は札幌市水道水を自動給水装置により、それぞれ自由摂取させた。

##### 3. 投与量および投与方法

被験物質に関する毒性情報がないため、本試験では300 mg/kgを第1群の投与用量に設定した。

投与後3日までの死亡率に基づいて次の投与用量を決定した。第1および2群において死亡例がみられなかったことから、第3群には2000 mg/kgを設定した。第3群でも死亡例がみられなかったため、第4群にも2000 mg/kgを設定した。

一晚(17~18時間)の絶食後、9:30から10:30の間に胃ゾンデを用いて強制的に胃内に5 mL/kgの投与容量で経口投与し、投与後約4時間を経過した時点で給餌を再開した。

##### 4. 検査項目

###### 1) 一般状態観察

全例について動物の生死、外観、行動等を、投与日(0日)の投与直後から投与後1時間までは連続して観察し、以降は投与後2および4時間に観察した。投与後1日から投与後13日までは、午前・午後の1日2回、投与後14日は午前中に1回観察した。

###### 2) 体重測定

全例について、0日(投与日の投与前)、投与後1, 3, 5, 7, 10および14日(剖検日)に、電子式上皿天秤を用いて測定した。

###### 3) 剖検

全例について投与後14日に体外表を観察後、エーテル麻酔下で腹部大動脈から放血して安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

##### 5. 統計解析

体重について平均値および標準偏差を算出した。

#### 結果および考察

##### 1. 死亡状況

300および2000 mg/kgのいずれにも投与後14日間に

# 4-(1-メチルプロピル)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 4-(1-Methylpropyl)phenol on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

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、4-(1-メチルプロピル)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/IU, 以下CHLと略す)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行ったところ、直接法48時間処理における約50%の増殖抑制を示す濃度は0.049 mg/mlであった。また、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ0.067 mg/mlおよび0.040 mg/mlであった。従って染色体異常試験において、直接法では0.049 mg/ml、代謝活性化法のS9mix存在下では0.067 mg/mlの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、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設定した。また、代謝活性化法のS9mix非存在下では、約50%の増殖抑制濃度が直接法における濃度に近い値であることから、0.049 mg/mlの濃度を高濃度とした。

直接法により、CHL細胞を24時間処理したすべての処理群において、染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかった。しかしながら、48時間処理した最高処理濃度の0.049 mg/mlでは、観察した細胞の5.5%に染色体異常が認められた。一方、代謝活性化法においては、S9mix非存在下における処理群では、染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかったが、S9mix存在下では、中濃度(0.034 mg/ml)の処理群で観察した細胞の7%に染色体異常が認められた。これらの結果より、直接法の48時間処理群と代謝活性化法のS9mix存在下群について、in vitro小核試験による追加試験を実施したところ、再現性は認められなかった。

以上の結果より4-(1-メチルプロピル)フェノールは、上記の試験条件下で、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。

### 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: JRH BIOSCIENCES, ロット番号: 1C2073)を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

直接法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、代謝活性化法では、細胞播種3日目にS9mixの存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. 被験物質

4-(1-メチルプロピル)フェノール(CAS No.: 99-71-8, ロット番号: C-119, 大日本インキ化学工業(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は淡黄色固体で、水に難溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアセトンに易溶である。分子式C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O, 分子量150.24, 融点53°C, 沸点242°C, 蒸気圧135.4~136.5°C/mmHgの物質で、純度は66%である。原体は熱、光、酸素等に対して安定であり、溶媒中(DMSO)での安定性試験では、0.06~15 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。溶媒はDMSO(Sigma Chemical Co., ロット番号: 30H0608)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5% (v/v)になるように加えた。染色体異常試験および小核試験の直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群の調製液の濃度は、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。なお、濃度については、純度換算は行わなかった。

#### 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(Monocellater, オリンパス光学工業(株))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、4-(1-メチルプロピル)フェノールの約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、直接法では0.049 mg/mlであった。また、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ0.067 mg/mlおよび0.040 mg/mlであった(Fig. 1, 2)。

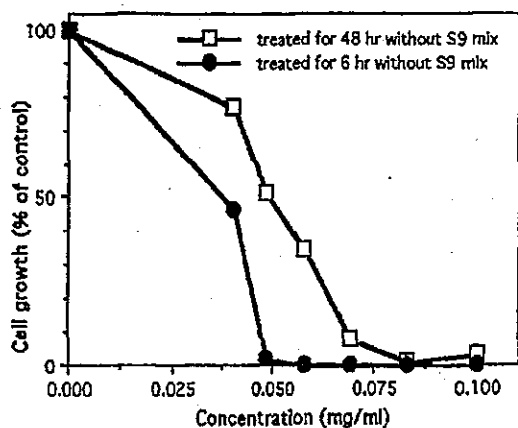


Fig. 1 Growth inhibition of CHL cells treated with 4-(1-methylpropyl)phenol without S9 mix

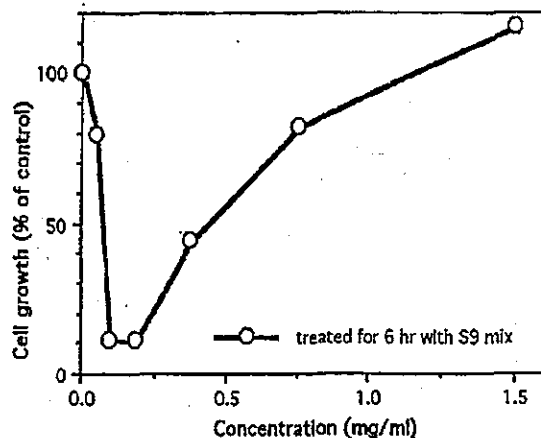


Fig. 2 Growth inhibition of CHL cells treated with 4-(1-methylpropyl)phenol with S9 mix

### 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高濃度群を、直接法では0.049 mg/ml、代謝活性化法のS9mix存在下では0.067 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。なお、代謝活性化法のS9mix非存在下においては、約50%の増殖抑制を示す濃度が、直接法におけるその濃度に近い値であったことから、直接法と同様に0.049 mg/mlの濃度を高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。

*In vitro* 小核試験による追加試験では、直接法、S9mix存在下における代謝活性化法ともに最高処理濃度を0.049 mg/mlとし、公比を1.5とする4つの処理群を設定した。

### 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枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で約10分間染色した。

### 9. 染色体分析

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、複数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(MMS)分科会<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(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. 小核標本作製法

培養終了後、ディッシュより細胞を剥離し、遠心して得られた細胞を0.15 M KCl水溶液で約20分間低張処理した。メタノール:氷酢酸(5:1)の固定液で細胞を固定後スライド上に1滴滴下し、スライド標本作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で約10分間染色した。

### 11. 小核標本の観察

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、二人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。観察は、60倍以上の対物レンズ(接眼10倍)をつけた顕微鏡を用いて行った。細胞質を含み、細胞質周辺の明瞭な間期細胞1000個について観察し、小核(直径が主核の1/3以下であり、色調により明らかに核由来と判定できるもの<sup>2)</sup>)をもった細胞を算定した。

### 12. 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は、石館ら<sup>3)</sup>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%以上を陽性としたが、疑陽性の結果が得られた場合、*in vitro* 小核試験を実施し再現性を確認して最終判定を行うこととした。*in vitro* 小核試験に関しては、Kastenbaum and Bowmanの方法<sup>4)</sup>(1970)に従って有意差検定( $p < 0.05$ )を行い、小核誘発の判定を行った。



## 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。4-(1-メチルプロピル)フェノールを加えて 24 時間処理したいずれの群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。また、48 時間処理した中濃度群および低濃度群でも、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。しかしながら、最高処理濃度群 (0.049mg/ml) では、観察した細胞の 5.5% に染色体異常が認められた。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 2 に示した。4-(1-メチルプロピル)フェノールを加えて S9mix 存在下および非存在下で 6 時間処理した最高処理濃度群では、分裂抑制のため染色体分析ができなかった。その他の処理群では、S9mix 非存在下において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。しかし、S9mix 存在下では、中濃度 (0.034 mg/ml) の処理群で、観察した細胞の 7% に染色体異常が認められた。

以上の結果より、疑陽性の結果が得られた直接法 48 時間処理と代謝活性化法 S9 mix 存在下群については、再現性を確認するため *in vitro* 小核試験を追加試験として実施した (Table 3)。その結果、いずれの処理群においても小核の誘発は見られず、染色体異常誘発性に関して再現性が得られなかった。

従って、今回実施した試験条件下では 4-(1-メチルプロピル)フェノールの染色体異常誘発性はないものと判断した。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 4-(1-methylpropyl)phenol \*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>6)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>		
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>		total	TAG (%)		TA (%)	SA	NA
Control			200	1	0	0	2	0	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	2	0	1	0	3	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75		
MPP	0.012	24	200	0	0	0	1	0	0	0	1	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	-	-
MPP	0.025	24	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	-	-
MPP	0.049	24	200	0	1	1	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00	-	-
MC	0.005	24	200	7	44	82	5	2	3	0	143	7	89 * (44.5)	87 * (43.5)	0.13	+	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	2	1	0	0	1	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.25		
MPP	0.017	48	200	1	0	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00	-	-
MPP	0.034	48	200	1	0	2	3	0	0	0	6	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.13	-	-
MPP	0.067	48	200	2	1	4	1	0	5	0	13	2	11 (5.5)	10 * (5.0)	0.98 <sup>6)</sup>	±	-
MC	0.005	48	200	8	21	74	13	5	8	0	129	23	74 * (37.0)	71 * (35.5)	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 : acentric fragment (chromatid type), 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. 1) Dimethyl sulfoxide 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 analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Six hundred and thirty-one cells were analysed. \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 66%, and meta secondary butyl phenol (33%) was contained as impurity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 4-(1-methylpropyl)phenol \*\* with and without S9 mix

Group	Concent-ration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>2)</sup>	No. of cells with aberrations			Polyploid <sup>3)</sup> (%)	Judgement <sup>4)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>5)</sup>	total		TAG	(%)	TA		(%)	SA
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	2	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25			
MPP	0.012	-	6-(18)	200	3	0	2	0	0	1	0	6	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.25			
MPP	0.025	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	10	11	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.50			
MPP	0.049	-	6-(18)														Tox	Tox	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	2	1	0	0	2	3	0	8	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.25			
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	2	6	7	11	0	0	0	26	1	8 (4.0)	6 (3.0)	0.38			
MPP	0.017	+	6-(18)	200	0	0	4	0	0	0	4	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25			
MPP	0.034	+	6-(18)	200	3	5	13	0	1	0	22	1	14 (7.0)	13 (6.5)	1.00	±			
MPP	0.067	+	6-(18)	0													Tox	Tox	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	73	198	6	0	7	50	339	2	133 * (66.5)	132 * (66.0)	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 : acentric fragment (chromatid type), 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) Dimethyl sulfoxide 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 analysed 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 66%, and meta secondary butyl phenol (33%) was contained as impurity.

Table 3 In vitro micronucleus test of Chinese hamster cells (CHL) treated with 4-(1-methylpropyl)phenol\*\* with and without S9 mix

Group	Concent-ration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with MN	%	Judgement <sup>2)</sup>
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	48	1000	3	0.3	
MPP	0.015	-	48	1000	3	0.3	-
MPP	0.022	-	48	1000	7	0.7	-
MPP	0.033	-	48	1000	3	0.3	-
MPP	0.049	-	48	1000	1	0.1	-
MC	0.00005	-	48	1000	271	27.1*	+
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	1000	10	1.0	
MPP	0.015	+	6-(18)	1000	5	0.5	-
MPP	0.022	+	6-(18)	1000	5	0.5	-
MPP	0.033	+	6-(18)	1000	3	0.3	-
MPP	0.049	+	6-(18)	1000	9	0.9	-
CPA	0.005	+	6-(18)	1000	192	19.2*	+

Abbreviations : MN : micronuclei, MC : mitomycin C, CPA : cyclophosphamide. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) Judgement was done by statistical method of Kastenbaum and Bowman (1970). \* : Significantly different from solvent control at p<0.05. \*\* : Purity was 66%, and meta secondary butyl phenol (33%) was contained as impurity.

## 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) 日本組織培養学会編, “細胞トキシコロジー試験  
法,” P.247-251, 朝倉書店, 1991.
- 3) 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.
- 4) Kastenbaum M. A. and K. O. Bowman, *Mutat. Res.*,  
9, 527-549, 1970.

## 連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
試験担当者: 山影康次, 佐々木澄志,  
若栗 忍, 日下部博一,  
橋本恵子

(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

Authors : Noriho Tanaka ( Study director )  
Kohji Yamakage, Kiyoshi Sasaki,  
Shinobu Wakuri,  
Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627