

2-tert-ブチルフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2-tert-Butylphenol on Bacteria

要約

2-tert-ブチルフェノールの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験の結果から菌の生育阻害が認められる用量を最高用量とし、直接法および代謝活性化法ともに6.25~200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲(公比2)で設定した。

試験を2回行った結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、*S. typhimurium* では100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で、WP2 *uvrA* では200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められ、代謝活性化法の場合は、TA100 および TA1535 では100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で、TA98, TA1537 および WP2 *uvrA* では200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められた。

以上の成績から、2-tert-ブチルフェノールの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

方法

1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および *E. coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その25 μL をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液は濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

2. 被験物質

2-tert-ブチルフェノール(ロット番号C169, 大日本イソキ化学工業(株)(東京)提供)は、無色透明の液体で、水に難溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アルコールおよびアセトンに易溶であり、純度99.97%(不純物として、フェノール0.03%を含む)の物質である。被験物質は、冷暗所(4℃)で密栓(窒素充填)保管した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

3. 被験物質供試液の調製

溶媒にDMSO(和光純薬工業(株))を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2:2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

2-AA:2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN₃: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(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に、NaN₃ および 9-AA は蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解した。

5. 培地

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トッパアガー)

0.6 w/v% 寒天粉末(Difco Laboratories) および 0.5 w/v% 塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、

*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液, *E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え, トップアガーとした。

6. S9 mix

エームステスト用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し, 製造後6ヶ月以内に使用した。S9は, 誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

7. 試験方法

試験は, プレインキューベーション法で行った。

試験管に使用溶媒, 被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL入れ, 次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL, 代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え, 続いて試験菌液0.1 mLを分注し, 37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後, 45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは, 用量設定試験では各用量とも1枚, 本試験では3枚を使用した。本試験は, 同一用量を用いて2回行った。

8. 結果の判定

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が溶媒対照値の2倍以上を示し, 用量依存性および結果の再現性が認められる場合を陽性とした。

但し, 明確な用量依存性が認められない場合においても, 陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定することとした。

結果および考察

50~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で行った用量設定試験においては, 代謝活性化の有無にかかわらず, いずれの菌株においても200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で菌の生育阻害が認められ, また, TA100, TA1535およびTA1537では直接法における100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ でも軽度な生育阻害が認められた。したがって, 本試験における被験物質の用量は, 最高用量を200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし, 以下公比2で, 100, 50, 25, 12.5および6.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。

試験を2回行った結果(Tables 1~4), 直接法および代謝活性化法のいずれの場合も, 供試した全ての菌株において復帰変異コロニー数は, 溶媒対照値の2倍を越えることはなかった。菌の生育阻害については直接法の場合, *S. typhimurium*では100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で, WP2 *uvrA*では200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められ, 代謝活性化法の場合, TA100およびTA1535では100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で, TA98, TA1537およびWP2 *uvrA*では200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められた。

以上の成績から, 本実験条件下では, 2-tert-ブチルフ

エノールの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

2-tert-ブチルフェノールの類縁化合物である4-tert-ブチルフェノール^{3,4)}, 2-sec-ブチルフェノール^{5,6)}, 4-sec-ブチルフェノール⁷⁾, 2,4-ジ-tert-ブチルフェノール⁸⁾, 2,6-ジ-tert-ブチルフェノール⁹⁾, 2,4,6-トリ-tert-ブチルフェノール⁹⁾, 6-tert-ブチル-*m*-クレゾール¹⁰⁾, 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-*m*-クレゾール)¹¹⁾および2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-*p*-クレゾール)¹²⁾は, いずれも*S. typhimurium*および*E. coli*, または*S. typhimurium*を用いた復帰変異試験で陰性と報告されている。また, 4-tert-ブチルフェノールおよび2,6-ジ-tert-ブチルフェノールにおいては酵母を用いた遺伝子突然変異試験でも陰性³⁾と報告されている。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol. 3, eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) B. J. Dean, T. M. Brooks, G. Hadson-Walker, D. H. Hutson, *Mutat. Res.*, **153**, 57(1985).
- 4) 澁谷徹, 坂本京子, 川上久美子, 原巧, 堀谷尚古, 松木容彦, 中込まどか, 飯田さやか, 化学物質毒性試験報告, **4**, 295(1996).
- 5) K. Mortelmans, S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer, E. Zeiger, *Environ. Mutagen.*, **8**(suppl.7), 1 (1986).
- 6) 野田篤, 昆尚美, 化学物質毒性試験報告, **7**, 227 (1999).
- 7) 澁谷徹, 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, 化学物質毒性試験報告, **2**, 343(1995).
- 8) 野田篤, 昆尚美, 化学物質毒性試験報告, **8**, 387 (2001).
- 9) 石館基監修, "微生物を用いる変異原性試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1991, pp.560-561.
- 10) 野田篤, 昆尚美, 化学物質毒性試験報告, **7**, 195 (1999).
- 11) 澁谷徹, 原巧, 坂本京子, 川上久美子, 清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか, 中尾美津男, 飯田さやか, 化学物質毒性試験報告, **4**, 239(1996).
- 12) 澁谷徹, 原巧, 坂本京子, 川上久美子, 清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか, 中尾美津男, 飯田さやか, 化学物質毒性試験報告, **4**, 423(1996).

連絡先

試験責任者：野田 篤
試験担当者：野田 篤, 昆 尚美
(財)畜産生物科学安全研究所
〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)
Naomi Kon
Research Institute for Animal Science in
Biochemistry and Toxicology 3-7-11
Hashimotodai, Sagamihara-shi, kanagawa, 229-
1132 Japan
Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Results of reverse mutation test of 2-tert-butylphenol on bacteria (1st trial)
[direct method:-S9 mix]

Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	97	103	125	8	15	9	21	13	12	15	18	18	10	6	6
	[108 \pm 15]			[11 \pm 4]			[15 \pm 5]			[17 \pm 2]			[7 \pm 2]		
6.25	116	100	115	14	15	9	16	10	18	20	17	16	9	7	6
	[110 \pm 9]			[13 \pm 3]			[15 \pm 4]			[18 \pm 2]			[7 \pm 2]		
12.5	116	114	107	11	14	5	14	12	14	14	28	18	15	6	13
	[112 \pm 5]			[10 \pm 5]			[13 \pm 1]			[20 \pm 7]			[11 \pm 5]		
25	104	139	120	9	9	10	17	9	13	18	29	19	10	9	10
	[121 \pm 18]			[9 \pm 1]			[13 \pm 4]			[22 \pm 6]			[10 \pm 1]		
50	126	110	98	11	11	15	17	8	13	22	25	27	12	9	14
	[111 \pm 14]			[12 \pm 2]			[13 \pm 5]			[25 \pm 3]			[12 \pm 3]		
100	96*	90*	72*	7*	4*	9*	15	16	9	12*	16*	17*	3*	3*	2*
	[86 \pm 12]			[7 \pm 3]			[13 \pm 4]			[15 \pm 3]			[3 \pm 1]		
200	0*	0*	0*	0*	1*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 \pm 0]			[0 \pm 1]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]		
Positive control	1018	994	925*	426	454	434*	703	721	789*	369	402	347*	506	410	499*
	[979 \pm 48]			[438 \pm 14]			[738 \pm 45]			[373 \pm 28]			[472 \pm 54]		

*: Growth inhibition was observed.

a) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) AF-2, 0.04 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

e) 9-AA: 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of reverse mutation test of 2-tert-butylphenol on bacteria (1st trial)
[activation method:+S9 mix]

Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	98	109	96	10	9	7	24	20	23	25	38	29	14	13	15
	[101 \pm 7]			[9 \pm 2]			[22 \pm 2]			[31 \pm 7]			[14 \pm 1]		
6.25	142	139	124	14	8	8	16	17	10	23	27	33	10	12	13
	[135 \pm 10]			[10 \pm 3]			[14 \pm 4]			[28 \pm 5]			[12 \pm 2]		
12.5	127	128	139	8	10	10	20	20	12	25	32	41	10	11	12
	[131 \pm 7]			[9 \pm 1]			[17 \pm 5]			[33 \pm 8]			[11 \pm 1]		
25	152	139	133	8	11	11	4	22	14	38	36	30	7	14	10
	[141 \pm 10]			[10 \pm 2]			[13 \pm 9]			[35 \pm 4]			[10 \pm 4]		
50	130	138	127	5	12	4	17	18	18	32	46	35	6	7	16
	[132 \pm 6]			[7 \pm 4]			[18 \pm 1]			[38 \pm 7]			[10 \pm 6]		
100	104*	112*	127*	8*	4*	4*	28	18	16	31	26	34	5	5	8
	[114 \pm 12]			[5 \pm 2]			[21 \pm 6]			[30 \pm 4]			[6 \pm 2]		
200	8*	0*	74*	4*	0*	0*	14*	10*	10*	22*	6*	28*	0*	0*	0*
	[27 \pm 41]			[1 \pm 2]			[11 \pm 2]			[19 \pm 11]			[0 \pm 0]		
Positive control	536	554	498*	179	125	245*	708	697	796*	319	375	327*	87	83	100*
	[529 \pm 29]			[150 \pm 27]			[734 \pm 54]			[340 \pm 30]			[90 \pm 9]		

*: Growth inhibition was observed.

a) 2-AA: 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Results of reverse mutation test of 2-tert-butylphenol on bacteria (2nd trial)
[direct method: -S9 mix]

Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	106	118	121	16	13	12	16	14	17	22	28	27	7	8	8
	[115 \pm 8]			[14 \pm 2]			[16 \pm 2]			[26 \pm 3]			[8 \pm 1]		
6.25	113	118	117	15	15	10	12	12	14	30	28	29	7	7	9
	[116 \pm 3]			[13 \pm 3]			[13 \pm 1]			[29 \pm 1]			[8 \pm 1]		
12.5	131	127	145	22	10	11	21	16	12	17	20	28	9	7	14
	[134 \pm 9]			[14 \pm 7]			[16 \pm 5]			[22 \pm 6]			[10 \pm 4]		
25	109	138	125	18	15	17	7	14	14	22	30	39	7	6	10
	[124 \pm 15]			[17 \pm 2]			[12 \pm 4]			[30 \pm 9]			[8 \pm 2]		
50	105	98	101	10	7	6	12	13	11	24	26	22	13	12	12
	[101 \pm 4]			[8 \pm 2]			[12 \pm 1]			[24 \pm 2]			[12 \pm 1]		
100	105*	80*	80*	14*	6	11*	10	16	13	15*	16*	15*	5*	4*	4*
	[88 \pm 14]			[10 \pm 4]			[13 \pm 3]			[15 \pm 1]			[4 \pm 1]		
200	0*	0*	0*	0*	0	0*	0*	0*	11*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[4 \pm 6]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]		
Positive control	985	894	906*	409	521	442*	912	868	818*	405	372	383*	688	550	508*
	[928 \pm 49]			[457 \pm 58]			[866 \pm 47]			[387 \pm 17]			[582 \pm 94]		

*:Growth inhibition was observed.

a) AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) NaN_3 : Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) AF-2, 0.04 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 9-AA:9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 4 Results of reverse mutation test of 2-tert-butylphenol on bacteria (2nd trial)
[activation method: +S9 mix]

Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	114	113	110	11	8	9	21	16	19	27	29	35	9	12	17
	[112 \pm 2]			[9 \pm 2]			[19 \pm 3]			[30 \pm 4]			[13 \pm 4]		
6.25	157	147	131	10	10	9	26	22	14	52	37	30	16	8	12
	[145 \pm 13]			[10 \pm 1]			[21 \pm 6]			[40 \pm 11]			[12 \pm 4]		
12.5	129	131	140	11	9	9	22	24	28	33	35	32	9	10	14
	[133 \pm 6]			[10 \pm 1]			[25 \pm 3]			[33 \pm 2]			[11 \pm 3]		
25	143	138	131	17	8	12	14	20	16	42	28	27	6	10	13
	[137 \pm 6]			[12 \pm 5]			[17 \pm 3]			[32 \pm 8]			[10 \pm 4]		
50	152	134	119	7	8	13	21	15	21	36	25	34	13	6	13
	[135 \pm 17]			[9 \pm 3]			[19 \pm 3]			[32 \pm 6]			[11 \pm 4]		
100	100*	87*	109*	5*	3*	5*	20	20	21	28	34	34	7	16	8
	[99 \pm 11]			[4 \pm 1]			[20 \pm 1]			[32 \pm 3]			[10 \pm 5]		
200	48*	1*	111*	0*	0*	0*	4*	9*	10*	13*	16*	6*	0*	0*	6*
	[53 \pm 55]			[0 \pm 0]			[8 \pm 3]			[12 \pm 5]			[2 \pm 3]		
Positive control	670	589	644*	162	164	162*	831	783	811*	318	330	367*	72	73	80*
	[634 \pm 41]			[163 \pm 1]			[808 \pm 24]			[338 \pm 26]			[75 \pm 4]		

*:Growth inhibition was observed.

a) 2-AA:2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$

2-tert-ブ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 2-tert-Butylphenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-tert-ブチルフェノールの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を用いて *in vitro* における短時間処理法による染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、細胞増殖抑制試験を行った結果、S9 mix 非存在下では120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、S9 mix 存在下では10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。したがって、染色体異常試験における用量は、S9 mix 非存在下では40, 60, 80, 100, 110および120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix 存在下では1.25, 2.5, 5, 7.5, 10および20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

試験の結果、S9 mix 非存在下では、染色体異常細胞の増加は認められなかった。S9 mix 存在下では用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、7.5および10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加(出現頻度5.5および11.0%)は統計学的に有意なものであった。また、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で数的異常細胞(倍数性細胞)の有意な増加(出現頻度5.0%)も認められた。S9 mix 非存在下の110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、S9 mix 存在下の20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、2-tert-ブチルフェノールは、CHL/IU細胞に対し染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部(元:国立衛生試験所変異原性部)から昭和60年1月13日に分与を受けたチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10 vol%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業株)を添加し、液体窒素条件下で保存したものを培養液に戻し、解凍後の継代数が3回までのものを使用した。

2. 培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を10 vol%の割合で添加したものをを用いた。

3. 培養条件

4 $\times 10^3$ 個/mLの細胞を含む培養液5 mLをディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、37 $^{\circ}\text{C}$ のCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

培養開始3日後にS9 mix 非存在および存在下で被験物質を6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。

4. S9 mix

染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコマン株)を購入し、製造後6ヶ月以内に使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

5. 被験物質

2-tert-ブチルフェノール(ロット番号C169, 大日本インキ化学工業株(東京)提供)は、無色透明の液体で、水に難溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アルコールおよびアセトンに易溶であり、純度99.97%(不純物として、フェノール0.03%を含む)の物質である。被験物質は、冷暗所(4 $^{\circ}\text{C}$)で密栓(窒素充填)保管した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質供試液の調製

溶媒にDMSO(和光純薬工業株)を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、そのディッシュ内への添加量は培養液量の0.5 vol%とした。

7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の用量を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(モノセレーターII, MI-60, オリンパス光学工業株)を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Fig. 1), S9 mix 非存在下では120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、S9 mix 存在下では10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は、それぞれ100~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用

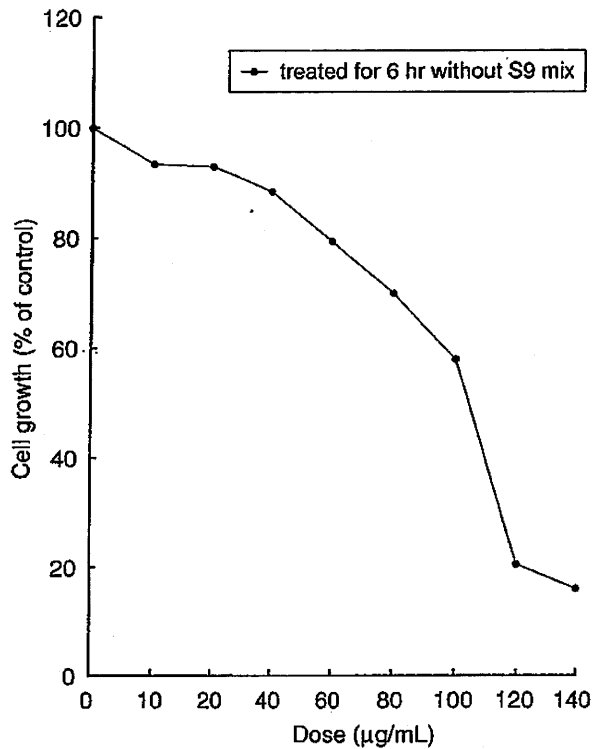


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-tert-butylphenol

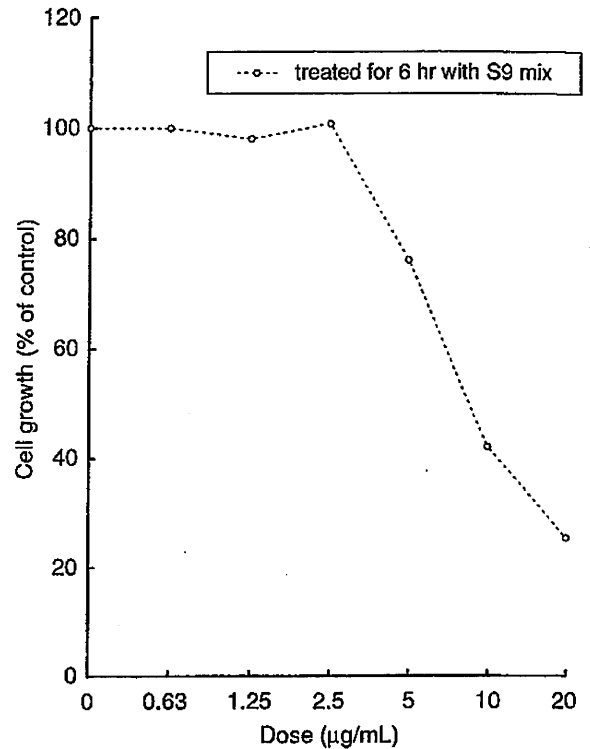


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-tert-butylphenol

量域にあるものと判断された。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果から、染色体異常試験における被験物質の用量は、50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ3用量以上のデータが得られることを考慮して、S9 mix非存在下では40, 60, 80, 100, 110および120 µg/mL, S9 mix存在下では1.25, 2.5, 5, 7.5, 10および20 µg/mLのそれぞれ6用量を設定した。対照として、溶媒対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として、短時間処理法S9 mix存在下では3,4-benzo[a]pyrene(B[a]P, Sigma Chemical Co.)を10 µg/mL, S9 mix非存在下では1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine(MNNG, Aldrich Chemical Co.)を2.5 µg/mLの用量で用いた。陽性対照物質の溶媒には、いずれもDMSO(和光純薬工業㈱)を使用した。

9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド(Gibco Laboratories)を最終濃度として0.2 µg/mLとなるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後、1.4 vol%ギムザ液で約15分間染色した。

10. 染色体の観察

各ディッシュあたり100個、すなわち、1用量当たり2

ディッシュ、200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)による分類法¹⁾に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型の切断、交換などの構造異常と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

11. 記録と判定

観察した細胞数、構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し、記録した。

染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について、多試料 χ^2 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は、フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各用量群との間の有意差検定(有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた)を行った。

その結果、溶媒対照群と比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2用量以上で有意に増加し、かつ用量依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

結果および考察

短時間処理法による結果をTable 1に示す。S9 mix非存在下では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下においては、用量依存的な染色体の構造異常を有する細胞の増

加が認められ、7.5および10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加(出現頻度5.5および11.0%)は溶媒対照群と比較して統計学的に有意なものであった。また、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で倍数性細胞の有意な増加(出現頻度5.0%)も認められた。S9 mix非存在下の110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上およびS9 mix存在下の20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては、被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像が認められなかった。

以上の成績から、2-tert-ブチルフェノールは、その代謝物に染色体構造異常を誘発する作用があると考えられた。したがって、本実験条件下では、2-tert-ブチルフェノールのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。陽性結果が得られたため、 D_{20} 値²⁾(分裂中期像の20%に異常を誘発させる被験物質の推定用量)を算出したところ、本被験物質の D_{20} 値は、構造異常に関して0.022 mg/mL、数値異常に関しては、0.043 mg/mLであった。本試験結果は、CHL/IU細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とする石館らの判定基準³⁾からみても、陽性と判断されるものであった。

2-tert-ブチルフェノールの類縁化合物については、4-tert-ブチルフェノールでは、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験において連続処理法24時間および48時間処理で倍数性細胞の誘発作用が、また、短時間処理法S9 mix存在下では構造異常および倍数性細胞の誘発作用が報告され⁴⁾、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール⁵⁾および6-tert-ブチル-m-クレゾール⁶⁾では同様の試験において、短時間処理法S9 mix存在下で構造異常細胞の誘発作用が報告されている。また、2-sec-ブチルフェノールでもCHL/IU細胞を用いた染色体異常試験において連続処理法48時間処理および短時間処理法S9 mix存在下で構造異常細胞の誘発作用が認められ⁷⁾、さらに、4-sec-ブチルフェノールでは同様の試験において、連続処理法48時間処理および短時間処理法S9 mix存在下での構造異常細胞の誘発に対し、疑陽性の判定が示されている⁸⁾。一方、2,6-tert-ブチルフェノールおよび4-tert-ブチルフェノールでは、ラット肝細胞を用いた染色体異常試験において陰性⁹⁾、また、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)¹⁰⁾および4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)¹¹⁾ではCHL/IU細胞を用いた染色体異常試験において陰性と報告されている。

このように、類縁化合物にも染色体異常誘発性を示す物質が多いことから、2-tert-ブチルフェノールの染色体異常誘発性はこれらに共通した化学構造との関連性が考えられる。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988, pp.16-37.
- 2) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説 改訂版," 化学工業日報社, 東京, 1992, pp.51-52.

- 3) 石館基監修, "改定増補 染色体異常試験 データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.19.
- 4) 田中憲穂, 山影康次, 中川ゆずき, 日下部博一, 橋本恵子, 水谷正寛, 古畑紀久子, 化学物質毒性試験報告, 4, 301(1996).
- 5) 野田篤, 昆尚美, 化学物質毒性試験報告, 8, 392(2001).
- 6) 野田篤, 昆尚美, 化学物質毒性試験報告, 7, 200(1999).
- 7) 野田篤, 昆尚美, 化学物質毒性試験報告, 7, 232(1999).
- 8) 田中憲穂, 山影康次, 佐々木澄志, 若栗忍, 日下部博一, 橋本恵子, 化学物質毒性試験報告, 2, 347(1995).
- 9) B. J. Dean, T. M. Brooks, G. Hodson-Walker, D. H. Hutson, *Mutat. Res.*, 153, 57(1985).
- 10) 田中憲穂, 山影康次, 若栗忍, 日下部博一, 橋本恵子, 長尾哲二, 太田亮, 化学物質毒性試験報告, 4, 427(1996).
- 11) 田中憲穂, 山影康次, 若栗忍, 中川ゆずき, 日下部博一, 橋本恵子, 長尾哲二, 太田亮, 化学物質毒性試験報告, 4, 247(1996).

連絡先

試験責任者: 野田 篤
 試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美
 (財)畜産生物科学安全研究所
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)
 Naomi Kon
 Research Institute for Animal Science in
 Biochemistry and Toxicology
 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa,
 229-1132 Japan
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-tert-butylphenol with and without S9 mix

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with structural aberrations						gap (%)	No. of cells with numerical aberrations			Cell Growth rate(%)	
					ctb	cte	csb	cse	oth	total(%) ²		Polyploid	Polyploid ³	total(%) ²		
Solvent ¹	0	-	6-(18)	200	2	1	0	0	0	3(1.5)	0(0)	0	0	0(0)	100.0	
2TBP	40	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0(0)	1(0.5)	0	0	0(0)	105.5	
	60	-	6-(18)	200	0	1	0	1	0	2(1.0)	0(0)	0	0	0(0)	97.0	
	80	-	6-(18)	200	0	2	0	2	0	4(2.0)	0(0)	1	0	1(0.5)	95.0	
	100	-	6-(18)	200	3	6	0	0	0	8(4.0)	0(0)	0	0	0(0)	50.5	
	110	-	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13.5
	120	-	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.0
MNNG	2.5	-	6-(18)	200	64	188	3	1	0	190(95.0)**	3(1.5)	0	0	0(0)	—	
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	1(0.5)	0(0)	1	0	1(0.5)	100.0	
2TBP	1.25	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	2(1.0)	0(0)	1	0	1(0.5)	90.0	
	2.5	+	6-(18)	200	1	2	0	2	0	4(2.0)	1(0.5)	0	0	0(0)	81.5	
	5	+	6-(18)	200	1	2	0	0	0	2(1.0)	0(0)	0	0	0(0)	70.0	
	7.5	+	6-(18)	200	2	10	0	0	0	11(5.5)*	1(0.5)	7	0	7(3.5)	43.0	
	10	+	6-(18)	200	8	18	0	0	0	22(11.0)**	0(0)	7	3	10(5.0)*	26.5	
	20	+	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16.5
	BP	10	+	6-(18)	200	13	68	1	0	0	75(37.5)**	0(0)	0	0	0(0)	—

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, 2TBP: 2-tert-butylphenol, MNNG: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, BP: 3,4-benzo[a]pyrene

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

2) Multi-sample χ^2 test was done at $p < 0.05$ and then Fisher's exact test was done at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

3) endoreduplication

*: Significantly different from solvent group data at $p < 0.05$ by Fisher's exact test.

**: Significantly different from solvent group data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test.