

6) 器官重量(Table 3)

雌雄ともに对照群に比べ 1000 mg/kg 群で肝臓の絶対および相対重量、脳、腎臓および副腎の相対重量が統計学的に有意な高値を示した。さらに雄では 1000 mg/kg 群で胸腺の絶対重量が有意な低値を、精巣の相対重量が有意な高値を示した。

7) 剖検所見

1000 mg/kg 群の1例に認められた全児死亡動物(動物番号 2306)には異常所見は認められなかった。

雄では、 1000 mg/kg 群で胸腺の萎縮が4例、肝臓の肥大が3例観察された。その他、 1000 mg/kg 群で腎臓の白色斑点および副腎の肥大が各2例に観察され、胸腺の赤色斑点、肝臓の白色斑点、皮下の塊、腹腔の塊、精巣上体の結節および被毛の菲薄化が 300 mg/kg 群を除く各群に単発性に観察された。

雌では、胸腺の赤色斑点、肺の褐色斑点、肝臓の肥大、瘢痕および白色斑点、卵巣の囊胞、子宮の内腔拡張、副腎の肥大および被毛の菲薄化が対照群を含む各群に1ないし少數例に観察された。

交尾しなかった動物は対照群で雌雄各1例であった。雄では異常所見は認められず、雌では脾臓の表面粗および結節、肺の褐色斑点および子宮の内腔拡張が観察された。

8) 病理組織学検査(Table 4, 5)

1000 mg/kg 群の全児死亡動物では、脾臓の色素沈着、肺の細胞浸潤、肝臓の脂肪化および子宮の小肉芽腫が観察された。

雄では、 1000 mg/kg 群で胸腺の萎縮が3例、肝細胞肥大が12例、腎臓の硝子円柱が8例、尿細管拡張が7例、腎乳頭壊死が5例、リンパ球浸潤が6例に発生し、対照群と比べて統計学的に有意な発生率の増加が認められた。また、肝臓の脂肪化が対照群で6例の発生に対し、 1000 mg/kg 群では認められず有意な減少を示した。さらに腎尿細管の好塩基化が対照群、100, 300および 1000 mg/kg 群でそれぞれ8(全例軽度), 9(全例軽度), 9(軽度8, 中等度1)および12例(軽度8, 中等度4)観察され、発生率に有意差は認められなかつたが 1000 mg/kg 群で程度の増強が認められた。一方、 100 mg/kg 群で腎臓の好酸性小体の発生率に有意な高値が認められたが、用量に関連した発現の増加および程度の増強は認められなかつた。脾臓の色素沈着、胸腺の出血、肝臓の小肉芽腫および副腎束状帶の空胞変性が対照群を含め比較的多く観察されたが発生率に有意な変化は認められなかつた。なお、 1000 mg/kg の雄の1例に認められた皮下の塊は、組織学的には臍瘍であった。その他、観察された所見は単発性あるいは少數例の発生であった。

雌で認められた所見はいずれも単発性の変化かあるいは群間の発生率に差がない変化であった。

交尾しなかった動物では、雌雄に共通して脾臓の色素沈着および腎臓のリンパ球浸潤が認められ、その他雄では肝臓のリンパ球浸潤、腎臓の尿細管の好塩基化および

副腎の血管拡張ならびに束状帶の空胞変性、雌では脾臓の包膜炎、肺炎、肝臓の小肉芽腫、腎臓の腎孟炎、子宮の内腔拡張および細胞浸潤が観察された。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能(Table 6)

交尾は対照群を除くすべての被験物質投与群で全例成立した。対照群では1組が交尾不成立であり、交尾率は91.7%であった。受胎はすべての群の交尾成立雌で成立了。

性周期観察では、いずれの群もほぼ4~5日の性周期を示し平均性周期に群間差は認められなかつた。

2) 分娩および哺育(Table 7)

1000 mg/kg 群で対照群に比べ妊娠期間が統計学的に有意な低値を示したが、個体別の妊娠期間はすべて22日であり、正常の範囲内であった。また、同群で対照群に比べ哺育4日の生児数が雌雄ともに有意な低値を示し、哺育4日の生存率も雌雄ともに有意な低値を示した。その他、分娩状態には異常が観察されず、対照群を含む各群の黄体数、着床痕数、出産生児数および死産児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、分娩率および出生率に群間差は認められなかつた。

3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外表検査では、 100 mg/kg 群で鎖肛および無尾が同一個体の1例に、 300 mg/kg 群で鎖肛および痕跡尾が同一個体の1例にそれぞれ観察された。

哺育期間中の体重では、哺育0および4日に対照群に比べ 1000 mg/kg 群で雌雄とも統計学的に有意な低値を示した。死亡児の剖検では、右鎖骨下動脈起始異常が100および 1000 mg/kg 群で1および3例観察された。その他、腎孟拡張が 100 mg/kg 群の1例、大脳低形成および食道位置異常が 300 mg/kg 群の同一個体の1例、小眼球が 1000 mg/kg 群の1例にそれぞれ観察された。哺育4日の剖検で、雄では胸腺頸部残留が対照群、 100 および 300 mg/kg 群でそれぞれ3, 2および1例観察された。また、肝臓の白色斑点が対照群および 1000 mg/kg 群で各1例に観察された。その他、肝臓の赤色斑点、黒色斑点および淡色が300あるいは 1000 mg/kg 群で1から2例に観察された。雌では胸腺頸部残留が対照群、 100 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ2, 1および1例に観察された。また、肝臓の白色斑点が 100 および 1000 mg/kg 群で1および4例に観察され、対照群に比べて 1000 mg/kg 群で有意な発生率の高値を示した。その他、肝臓の赤色斑点、黒色斑点および緑色、鎖肛、眼球の赤色、尾の欠損、痕跡尾および痴皮が被験物質投与群で単発性に散見された。

考察

1. 反復投与毒性

死亡例は、投与期間を通じ雌雄いずれの群にも認めら

れなかった。

一般状態の観察では、流涎が投与期間を通じ雌雄ともに300 mg/kg以上の被験物質投与群で認められた。この症状は用量に対応して発現頻度が増強し、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

体重は、雌雄とともに1000 mg/kg群で増加抑制が認められ、摂餌量についても雌雄ともに同群で投与開始直後低値を示し、被験物質投与の影響が示唆された。

雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。

雄において、1000 mg/kg群で肝臓重量が高値を示し、剖検でも肝臓の肥大が観察された。また、病理組織学検査においても肝細胞肥大の発生率は増加を示したのに対し、肝臓の脂肪化は発生率の減少が観察され、肝臓に対する被験物質投与の影響が認められた。また、同群で腎臓重量が高値を示し、病理組織学検査で腎乳頭壊死、尿細管拡張、リンパ球浸潤、尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた。腎乳頭壊死は鎮痛剤および非ステロイド系抗炎症剤の投与により実験的に誘発されることが知られており^{6,7)}、本試験においても尿細管の好塩基化や硝子円柱の程度の強いものに腎乳頭壊死および尿細管拡張が観察されていることから、被験物質による尿細管の障害とともに尿濃縮による腎乳頭への障害が考えられた。また、血液生化学検査においても300および1000 mg/kg群でクレアチニンが、また、1000 mg/kg群でBUNの高値が認められ、腎障害が示唆された。その他、血液生化学検査で1000 mg/kg群に認められた総タンパク、アルブミン、A/G、ALP、塩素およびカリウムの変化も肝臓あるいは腎臓に対する被験物質の影響を反映するものと考えられた。同群で認められた総ビリルビンの減少は毒性学的意義が乏しいものと考えられるため被験物質投与の影響とは判断しなかった。1000 mg/kg群で観察された胸腺の萎縮は、組織学的には皮質および髓質領域の萎縮であり、器官重量にも低値が認められていることから被験物質投与の影響と考えられた。

雌においても1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し、剖検で肝臓の肥大が観察され、肝臓および腎臓に及ぼす被験物質投与の影響が示唆された。しかし、病理組織学検査では影響を示唆する変化は認められず、雄に比べ雌に対する被験物質投与の影響は軽度なものと考えられた。

その他、雌雄の1000 mg/kg群で脳、副腎および精巣重量の高値が認められたが、病理組織学検査では相当する所見は認められず、相対重量のみの変化であることから同群の低体重に起因する二次的な変化と考えられた。

以上のことから、2,4,6-トリブロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察された。また、雌雄とも1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた。さらに、雄の血液生化学検査で300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において、被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影

響が示唆される変化が認められた。したがって、雌雄とも無影響量は100 mg/kg/dayと判断された。

2. 生殖発生毒性

性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。交尾しなかった動物の病理学検査では生殖器系に特異的な変化は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し、妊娠期間にも被験物質投与の明らかな影響は認められなかった。1000 mg/kg群で雌雄の新生児の哺育0および4日の体重が低値を示し、哺育4日の生児数および生存率が低値を示したことから、被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された。なお、1000 mg/kg群で全児死亡動物が1例観察されたが、病理学検査の結果からは母動物には被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。しかし、前述のごとく新生児の哺育4日の生存率が明らかな低値を示していることから、新生児に対する本被験物質の影響に起因したものと考えられた。その他、出産率、出生率に被験物質投与の影響は認められず、新生児の外表にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、死亡児の剖検で1000 mg/kg群に認められた右鎖骨下動脈起始異常[Crj:CD(SD)胎児の背景値⁸⁾ [12施設分:施設間の変動(施設内変動)] :0.03~0.63%(0~4.55%)]は3例中2例が同腹児の発現であり、被験物質投与との関連は明らかではなかった。哺育4日の剖検では雌の1000 mg/kg群で肝臓の白色斑点の発生率が増加を示したが、母動物2例から各2例の発現であり、雄ではこの所見は対照群でも認められ、発生率の増加も認められないことから被験物質投与の影響とは考えなかった。

以上のことから、2,4,6-トリブロモフェノールの雌雄の生殖に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

児動物の発生・発育に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、哺育4日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は300 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) S. Gad and C. S. Weil, "Statistics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, New Jersey, 1986, pp. 43-45.
- 2) 佐野正樹, 岡山佳弘, 医薬安全性研究会会報, 32, 21(1990).
- 3) M, Yoshida, *J. Japanese Soc. Comp. Statist.*, 1, 111(1988).
- 4) 佐久間昭, "薬効評価-計画と解析-I," 東京大学出版会, 東京, 1977, pp. 109-117.
- 5) 石居進, "生物統計学入門," 培風館, 東京, 1975, pp. 78-107.
- 6) 高橋道人監訳, "毒性病理学の基礎," ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp. 59-152.

- 7) C. Gopinath, D. E. Prentice and D. J. Lewis, "Atlas of Experimental Toxicological Pathology," MTP Press Limited, Lancaster, 1987, pp. 77-90.
- 8) T. Nakatsuka et al., *Cong. Anom.*, **37**, 47-138(1997).

連絡先

試験責任者：田中亮太
試験担当者：山田るみ，大庭耕輔，伊賀達也，
三上真一
(財)食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Ryota Tanaka (Study director)
Rumi Yamada, Kousuke Oba,
Tatsuya Iga, Shinichi Mikami
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shioshinden, Arahama, Fukude-cho, Iwata-
gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 1 Hematology and coagulation of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT(%)	44.1 ± 1.6	44.6 ± 1.1	44.1 ± 1.9	43.6 ± 1.9
HGB(g/dL)	15.3 ± 0.4	15.5 ± 0.4	15.3 ± 0.6	15.1 ± 0.7
RBC($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.23 ± 0.34	8.35 ± 0.19	8.23 ± 0.30	8.16 ± 0.48
MVC(μm^2)	53.7 ± 1.5	53.4 ± 1.2	53.7 ± 1.6	53.5 ± 1.6
MCH(pg)	18.6 ± 0.6	18.6 ± 0.5	18.6 ± 0.6	18.5 ± 0.7
MCHC(%)	34.6 ± 0.6	34.8 ± 0.6	34.7 ± 0.3	34.5 ± 0.5
PLT($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1090 ± 115	1100 ± 111	1024 ± 116	1093 ± 124
WBC($\times 10^3/\text{mm}^3$)	9.3 ± 3.0	9.7 ± 3.8	9.5 ± 3.2	8.6 ± 2.2
Differential leukocyte counts(%)				
NEUT	15 ± 4	16 ± 6	16 ± 5	18 ± 6
LYMPH	80 ± 4	80 ± 7	80 ± 5	78 ± 7
MONO	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
PT(sec.)	14.2 ± 0.7	14.6 ± 0.5	15.0 ± 1.1	15.6 ± 1.2**
APTT(sec.)	24.8 ± 1.9	24.5 ± 2.0	25.3 ± 2.0	26.7 ± 2.6
Fibrinogen(mg/dL)	222 ± 16	208 ± 13	214 ± 19	240 ± 35

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil BASO:Basophil

LUC:Large unstained cells

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; **:P<0.01

Table 2 Blood chemistry chemical examination of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
T. protein(g/dL)	5.87 ± 0.22	5.84 ± 0.14	5.95 ± 0.26	6.45 ± 0.51**
Albumin(g/dL)	3.36 ± 0.13	3.33 ± 0.09	3.39 ± 0.19	3.88 ± 0.29**
A/G	1.34 ± 0.06	1.33 ± 0.09	1.33 ± 0.10	1.51 ± 0.08**
Glucose(mg/dL)	152 ± 25	157 ± 21	157 ± 18	149 ± 14
Triglyceride(mg/dL)	49.4 ± 17.9	47.7 ± 14.6	55.6 ± 28.8	62.0 ± 33.7
T. cholesterol(mg/dL)	61 ± 14	60 ± 14	54 ± 15	57 ± 14
BUN(mg/dL)	13.3 ± 1.4	13.6 ± 2.1	13.2 ± 2.3	20.9 ± 11.4
Creatinine(mg/dL)	0.27 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.33 ± 0.07*	0.47 ± 0.26**
T. bilirubin(mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01**
GOT(U/L)	77 ± 10	77 ± 13	72 ± 7	71 ± 8
GPT(U/L)	32 ± 5	34 ± 7	29 ± 4	38 ± 7
ALP(U/L)	354 ± 74	440 ± 162	342 ± 102	514 ± 155*
γ-GTP(U/L)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Sodium(mmol/L)	141.3 ± 1.2	141.5 ± 0.8	141.5 ± 0.7	141.9 ± 1.3
Potassium(mmol/L)	4.46 ± 0.29	4.40 ± 0.25	4.38 ± 0.30	4.03 ± 0.25**
Chloride(mmol/L)	106.6 ± 1.2	107.6 ± 1.1	107.8 ± 1.5	119.0 ± 3.6**
Calcium(mg/dL)	9.58 ± 0.51	9.38 ± 0.23	9.47 ± 0.27	9.88 ± 0.34
I. phosphorus(mg/dL)	6.31 ± 0.64	5.91 ± 0.52	5.68 ± 0.58	7.28 ± 1.24

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Male				
No. of animals examined	12	12	12	12
Body weight(g)	492 ± 34	478 ± 31	478 ± 36	422 ± 25
Absolute organ weight				
Brain(g)	2.25 ± 0.08	2.22 ± 0.08	2.25 ± 0.08	2.20 ± 0.06
Thymus(mg)	299 ± 81	269 ± 52	269 ± 66	201 ± 57**
Liver(g)	13.99 ± 1.72	13.18 ± 1.31	14.20 ± 1.99	16.23 ± 2.32*
Spleen(g)	0.73 ± 0.14	0.69 ± 0.09	0.73 ± 0.09	0.63 ± 0.10
Kidneys(g)	3.34 ± 0.36	3.15 ± 0.17	3.23 ± 0.31	3.47 ± 0.37
Adrenals(mg)	60 ± 7	56 ± 6	64 ± 7	64 ± 6
Testes(g)	3.55 ± 0.32	3.50 ± 0.25	3.47 ± 0.32	3.35 ± 0.25
Epididymides(mg)	1319 ± 75	1220 ± 124	1341 ± 109	1235 ± 111
Relative organ weight				
Brain(g%)	0.460 ± 0.042	0.465 ± 0.033	0.473 ± 0.041	0.522 ± 0.032**
Thymus(mg%)	60.382 ± 14.897	56.587 ± 12.134	56.483 ± 13.955	47.291 ± 12.204
Liver(g%)	2.834 ± 0.218	2.751 ± 0.152	2.964 ± 0.285	3.837 ± 0.447**
Spleen(g%)	0.149 ± 0.023	0.144 ± 0.016	0.152 ± 0.016	0.149 ± 0.020
Kidneys(g%)	0.678 ± 0.054	0.661 ± 0.053	0.679 ± 0.083	0.824 ± 0.101**
Adrenals(mg%)	12.257 ± 1.299	11.807 ± 1.277	13.494 ± 1.966	15.304 ± 1.697**
Testes(g%)	0.721 ± 0.062	0.733 ± 0.067	0.729 ± 0.080	0.794 ± 0.046*
Epididymides(mg%)	268.582 ± 16.867	256.085 ± 31.810	281.498 ± 26.289	292.996 ± 27.221
Female				
No. of animals examined	11	12	12	11
Body weight(g)	332 ± 16	317 ± 27	333 ± 22	307 ± 15
Absolute organ weight				
Brain(g)	2.03 ± 0.06	2.07 ± 0.10	2.00 ± 0.10	2.04 ± 0.05
Thymus(mg)	157 ± 46	134 ± 48	168 ± 75	137 ± 32
Liver(g)	13.70 ± 0.80	13.48 ± 2.07	14.39 ± 1.76	15.74 ± 1.28**
Spleen(g)	0.60 ± 0.09	0.64 ± 0.10	0.61 ± 0.13	0.57 ± 0.09
Kidneys(g)	2.15 ± 0.20	2.18 ± 0.11	2.22 ± 0.19	2.36 ± 0.25
Adrenals(mg)	77 ± 7	82 ± 11	87 ± 15	84 ± 8
Ovaries(mg)	108 ± 30	111 ± 15	98 ± 11	94 ± 12
Relative organ weight				
Brain(g%)	0.613 ± 0.034	0.657 ± 0.067	0.602 ± 0.038	0.665 ± 0.025*
Thymus(mg%)	47.175 ± 13.289	41.733 ± 13.767	49.633 ± 20.449	44.365 ± 9.118
Liver(g%)	4.138 ± 0.287	4.230 ± 0.396	4.312 ± 0.393	5.117 ± 0.265**
Spleen(g%)	0.181 ± 0.029	0.201 ± 0.026	0.183 ± 0.031	0.185 ± 0.029
Kidneys(g%)	0.649 ± 0.072	0.694 ± 0.078	0.666 ± 0.047	0.772 ± 0.094**
Adrenals(mg%)	23.171 ± 1.572	25.991 ± 3.418	25.988 ± 4.091	27.315 ± 3.415**
Ovaries(mg%)	32.738 ± 9.135	35.252 ± 6.883	29.454 ± 3.137	30.501 ± 4.301

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 4 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necrosed	11	12	20	12	11	12	12	11
Organ Findings								
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
heart								
cellular infiltration, lymphocyte	2	-	-	1	0	-	-	0
fibrosis	1	-	-	0	0	-	-	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
spleen								
deposit, pigment	11	-	-	12	11	-	-	11
hematopoiesis, extramedullary	0	-	-	0	3	-	-	3
thymus								
hemorrhage	2	4	4	4	0	-	-	1
atrophy	0	0	0	3	0	-	-	0
deposit, pigment	0	0	0	0	0	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM								
lung								
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	1(1)
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	1(1)
DIGESTIVE SYSTEM								
liver								
cytological alteration	0	1	0	0	0	0	0	0
deposit, pigment	1	0	0	0	0	0	0	0
fatty change	6	5	3	0**	2	1	0	0
hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	12**	0	0	0	0
necrosis, focal	0	0	0	1	0	3	0	2
accumulation of macrophage	0	0	0	1	0	0	0	2
cellular infiltration, lymphocyte	1	2	3	2	0	0	0	0
microgranuloma	5	4	4	3	0	0	1	0
hematopoiesis, extramedullary	0	0	0	0	3	2	2	3
peritoneum								
fat granuloma	-	-	-	1(1)	-	-	-	-
URINARY SYSTEM								
kidney								
basophilic tubules	8	9	9	12	2	-	-	3
case, hyaline	1	1	0	8**	1	-	-	0
dilatation, tubules	0	0	0	7**	0	-	-	0
eosinophilic body	5	11*	9	7	0	-	-	0
mineralization	1	0	0	1	3	-	-	1
papillary necrosis	0	0	0	5	0	-	-	0
cellular infiltration, lymphocyte	1	1	0	6*	0	-	-	0
inflammatory infiltration	0	1	0	0	0	-	-	0
lipoma	0	1	0	0	0	-	-	0

=:benign #:malignant

():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable.

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 4 (continued)

	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necrosed	11	12	20	12	11	12	12	11
Organ Findings								
REPRODUCTIVE SYSTEM								
testis								
atrophy, seminiferous tubule	0	-	-	1	-	-	-	-
cellular infiltration	1	-	-	0	-	-	-	-
epididymis								
cellular infiltration, lymphocyte	1	-	-	1	-	-	-	-
ovary								
deosit, pigment	-	-	-	-	1	-	-	1
mineralization	-	-	-	-	0	-	-	1
ENDCRINE SYSTEM								
adrenal gland								
angiectasis	1	-	-	1	1	-	-	0
accumulation of foamy cells	0	-	-	0	0	-	-	1
degeneration, vacuolar	4	-	-	3	0	-	-	0
NERVOUS SYSTEM								
brain								
dilatation, ventricle	0	-	-	0	1	-	-	0
INTEGUMENTARY SYSTEM								
skin								
hair follicle atrophy	-	-	-	-	1 (1)	-	-	1 (1)
subcutaneous tissue								
abscessy	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-

=:benign #:malignant

():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable.

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 5 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2, 4, 6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necropsied	11	12	12	12	11	12	12	11
Organ Findingsd	T 1 2 3 T 1 2 3 T 1 2 3 T 1 2 3 T 1 2 3 T 1 2 3							
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
heart								
cellular infiltration, lymphocyte	- 2 0 0 - - - - -	- - - - -	1 0 0	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
fibrosis	- 1 0 0 - - - - -	- - - - -	0 0 0	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
spleen								
deposit, pigment	- 1 1 0 0 - - - - -	- - - - -	1 1 0	- 1 1 0 0 - - - - -	- - - - -	1 1 0 0	- - - - -	1 1 0 0
hematopoiesis, extramedullary	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	0 0 0	- 3 0 0 - - - - -	- - - - -	3 0 0	- - - - -	3 0 0
thymus								
hemorrhage	- 2 0 0 - 4 0 0 - 4 0 0 - 4 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 1 0	- - - - -	0 1 0
atrophy	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 3 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
deposit, pigment	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	1 0 0	- - - - -	1 0 0
RESPIRATORY SYSTEM								
lung							(1)	
hemorrhage	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- 1 0 0	- - - - - - - - -
cellular infiltration	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- 1 0 0	- - - - - - - - -
DEGESTIVE SYSTEM								
liver								
cytological alteration	- 0 0 0 - 1 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - 1 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
deposit, pigment	- 1 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
fatty change	- 5 1 0 - 5 0 0 - 3 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- 2 0 0 - 0 1 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
hypertrophy, hepatocyte	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 1 2 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
necrosis, focal	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 1 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - 2 0 0 - 0 0 0 - 2 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
accumulation of macrophage	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 1 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 2 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
cellular infiltration, lymphocyte	- 1 0 0 - 2 0 0 - 3 0 0 - 2 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
microgranuloma	- 5 0 0 - 4 0 0 - 4 0 0 - 3 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - 0 0 0 - 1 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
hematopoiesis, extramedullary	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- 3 0 0 - 2 0 0 - 2 0 0 - 3 0 0	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
peritoneum					(1)			
fat granuloma	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	1 0 0	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -
URINARY SYSTEM								
kidney								
basophilic tubules	- 8 0 0 - 9 0 0 - 8 1 0 - 8 4 0**	- - - - -	- 2 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	3 0 0	- - - - -	3 0 0
cast, hyaline	- 0 1 0 - 1 0 0 - 0 0 0 - 7 1 0**	- - - - -	- 1 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
dilatation, tubules	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 6 1 0**	- - - - -	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
eosinophilic body	- 4 1 0 - 11 0 0*- 6 3 0 - 6 1 0	- - - - -	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
mineralization	- 1 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 1 0 0	- - - - -	- 3 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	1 0 0	- - - - -	1 0 0
parillary necrosis	- 0 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0 - 3 2 0**	- - - - -	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
cellular infiltration, lymphocyte	- 1 0 0 - 1 0 0 - 0 0 0 - 6 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
inflammatory infiltration	- 0 0 0 - 1 0 0 - 0 0 0 - 0 0 0	- - - - -	- 0 0 0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 0 0	- - - - -	0 0 0
= lipoma	0 - - - 1 - - 0 - - 0 - -	- - - - -	0 - - - - -	- - - - -	- - - - -	0 - - - - -	- - - - -	0 - - - - -

1:slight 2:moderate 3:marked

=:benign #:malignant

() :No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 5 (continued)

	Male animals								Female animals																					
	0	100	300	1000	0	100	300	1000	0	100	300	1000	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3		
Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000	0	100	300	1000	0	100	300	1000																		
No. of animals necropsied	11	12	12	12	11	12	12	11																						
Organ Findingsd	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3		
REPRODUCTIVE SYSTEM																														
testis																														
atrophy, seminiferous tubule	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
cellular infiltration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
epididymis																														
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ovary																														
deposit, pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
mineralization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ENDOCRINE SYSTEM																														
adrenal gland																														
angiectasis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
accumulation of foamy cells	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
degeneration, vacuolar	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	2	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
NERVOUS SYSTEM																														
brain																														
dilatation, ventricle	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
INTEGUMENTRY SYSTEM																														
skin																			(1)											
hair follicle atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
subcutaneous tissue																		(1)												
abscess	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

1:slight 2:moderate 3:marked

=:benign #:malignant

():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable

Table 6 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	11	12	12	12
No. of pregnant females	11	12	12	12
Copulation index (%) ^{a)}	91.7	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Estrus cycle (days, Mean ± S.D.)	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.5	4.2 ± 0.3

a) : (No. of animals with successful copulation/no. of animals mated) × 100

b) : (No. of pregnant animals/no. of animals with successful copulation) × 100

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 7 Findings of delivery in dams treated orally with 2,4,6-tribromophenol and observations on their pups (F_1) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams observed	11	12	12	12
No. of dams delivered live pups	11	12	12	12
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.7	22.0 ± 0.0*
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	209 (19.0 ± 3.9)	231 (19.3 ± 3.7)	209 (17.4 ± 1.8)	200 (16.7 ± 2.0)
No. of total implants (Mean±S.D.)	175 (15.9 ± 2.0)	204 (17.0 ± 2.3)	195 (16.3 ± 1.9)	189 (15.8 ± 1.4)
No. of total pups born (Mean±S.D.)	161 (14.6 ± 2.0)	188 (15.7 ± 1.9)	175 (14.8 ± 3.2)	174 (14.5 ± 1.9)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	161 (14.6 ± 2.0)	187 (15.6 ± 1.9)	175 (14.5 ± 2.6)	174 (14.5 ± 1.9)
Male	87 (7.9 ± 1.4) ^b	97 (8.1 ± 2.3) ^b	89 (7.4 ± 2.5)	79 (6.6 ± 2.1) ^b
Female	74 (6.7 ± 1.9) ^b	90 (7.5 ± 1.8) ^b	85 (7.1 ± 1.0) ^{f,g}	95 (7.9 ± 1.2) ^b
Sex ratio (male/female, Mean±S.D.)	1.29 ± 0.54	1.17 ± 0.50	1.07 ± 0.42	0.88 ± 0.42
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	83 (7.3 ± 1.2)	87 (7.3 ± 2.8)	86 (7.2 ± 2.3)	42 (3.5 ± 2.4)**
Female	72 (6.5 ± 1.9)	84 (7.0 ± 2.2)	80 (6.7 ± 1.2)	49 (4.1 ± 2.9)*
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	0 (0.0 ± 0.0)	1 (0.1 ± 0.3)	1 (0.1 ± 0.3)	0 (0.0 ± 0.0)
stillbirth	0 (0.0 ± 0.0)	0 (0.0 ± 0.0)	1 (0.1 ± 0.3)	0 (0.0 ± 0.0)
cannibalism	0 (0.0 ± 0.0)	1 (0.1 ± 0.0)	1 (0.0 ± 0.0)	0 (0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) ^a	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (%), Mean±S.D.) ^b	83.5 ± 11.7	90.1 ± 13.2	93.3 ± 6.9	94.9 ± 5.9
Delivery index (%), Mean±S.D.) ^c	92.1 ± 5.8	92.5 ± 6.6	89.3 ± 9.4	91.9 ± 7.0
Live birth index (%), Mean±S.D.) ^d	100.0 ± 0.0	99.5 ± 1.8	99.5 ± 1.7	100.0 ± 0.0
Viability index on day 4 (%), Mean±S.D.) ^e				
Male	96.2 ± 8.6	88.6 ± 23.7	97.4 ± 6.3	53.3 ± 34.2**
Female	97.6 ± 5.4	92.7 ± 15.5	94.0 ± 9.6	50.4 ± 35.1**

a) : (No. of females with live pups/no. of pregnant females) × 100

b) : (No. of implants/no. of corpora lutea) × 100

c) : (No. of pups born/no. of implants) × 100

d) : (N. of live pups born/no. of pups born) × 100

e) : (No. of live pups on day 4 after birth/no. of live pups born) × 100

f) : Includes live pups died before observations

g) : Includes a pup reatained on day 1 after birth

Values in parentheses are expressed number of animals examined

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

4-エチルフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 4-Ethylphenol on Bacteria

要約

4-エチルフェノールについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で1500 µg/plate以上の用量で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験ともに62.5～2000 µg/plateの範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の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。

以上の結果から4-エチルフェノールは、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。

方法

1. 被験物質

4-エチルフェノールは、白色結晶である。用いた被験物質は、ロット番号81029A、純度98.328%(キャビラリーギガロット、製造 丸善石油化学(株)(東京)であり、丸善石油化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

4-エチルフェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号：ACQ2095、和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

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。

各検定菌ごと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Table中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

(AF2、和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム(SA、和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン(9AA、Sigma Chem. Co.)

2-アミノアントラセン(2AA、和光純薬工業(株))

AF2, 9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解したものを -20 °C で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

3. 検定菌

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia 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日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は -80 °C で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、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*)およびアンピシリン耐性因子 pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロス2(Oxoid Ltd.)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37 °C で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。分光光度計により 660 nm の吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

4. 培地およびS9 mixの組成

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	0.2 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)	15 g

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。

2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(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) *Salmonella typhimurium* 用

L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L

(C) *Escherichia coli* 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ある。

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
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol

*: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。

5. 試験方法

プレインキュベーション法³⁾により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液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、約45 °Cに保温したトップアガーブルブを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、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37 °Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は、肉眼により観察した。また、抗菌性の有無については、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群では3枚ずつ、各用量について1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群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。

用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

6. 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S9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、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、当該被験物質は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

50.0～5000 μg/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても1500

μg/plate以上の用量で抗菌性が認められた。被験物質に由来する沈殿はすべての用量で認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験および添加試験とも2000 μg/plateとした。

最高用量を2000 μg/plateとして公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも陰性対照値の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。

以上の結果に基づき、4-エチルフェノールは、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。

なお4-エチルフェノールは、当研究所で本試験と並行して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染色体の構造異常が誘発され、陽性であった⁴⁾。また、関連物質である4-(1-メチルプロピル)フェノールについては、復帰変異試験および染色体異常試験で陰性の結果が^{5, 6)}、また、3-エチルフェノール^{7, 8)}およびp-tert-ブチルフェノール^{9, 10)}については、復帰変異試験で陰性、染色体異常試験で陽性の結果が得られている。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpeth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp.273-285.
- 4) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 572(2001).
- 5) 濵谷徹, 化学物質毒性試験報告, **2**, 343(1995).
- 6) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **2**, 347(1995).
- 7) 濵谷徹, 化学物質毒性試験報告, **8**, 759(2001).
- 8) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 764(2001).
- 9) 濵谷徹, 化学物質毒性試験報告, **4**, 295(1996).
- 10) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **4**, 301(1996).

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：川上久美子，原 巧，山本明子，
三枝克彦，加藤初美
(財)食品薬品安全センター秦野研究所
〒257-8523 秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Kumiko Kawakami, Takumi Hara,
Akiko Yamamoto, Katsuhiko Saegusa,
Hatsumi Kato
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,
Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

復帰変異試験

Table 1 Mutagenicity of 4-ethylphenol on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)										
		Base - pair substitution type						Frameshift type				
		TA100			TA1535			WP2 uvrA			TA98	
S9 mix (-)	0	137 138 138 (138 \pm 0.6)	6 11 12 (10 \pm 3.2)	32 22 19 (24 \pm 6.8)	20 28 23 (24 \pm 4.0)	15 15 12 (14 \pm 1.7)						
	62.5	140 140 130 (137 \pm 5.8)	10 8 15 (11 \pm 3.6)	23 29 25 (23 \pm 3.1)	19 26 24 (23 \pm 3.6)	9 10 14 (11 \pm 2.6)						
	125	144 136 152 (144 \pm 8.0)	9 14 9 (11 \pm 2.9)	16 22 20 (19 \pm 3.1)	25 20 19 (21 \pm 3.2)	14 2 2 (6 \pm 6.9)						
	250	145 105 131 (127 \pm 20.3)	7 9 13 (10 \pm 3.1)	19 18 28 (22 \pm 5.5)	14 22 20 (19 \pm 4.2)	5 15 10 (10 \pm 5.0)						
	500	141 129 140 (137 \pm 6.7)	9 10 8 (9 \pm 1.0)	15 20 20 (18 \pm 2.9)	18 25 18 (20 \pm 4.0)	14 14 11 (13 \pm 1.7)						
	1000	47* 49* 54* (50 \pm 3.6)	5* 2* 2* (3 \pm 1.7)	17 21 23 (20 \pm 3.1)	7* 16* 3* (9 \pm 6.7)	4* 2* 0* (2 \pm 2.0)						
	2000	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0 (0 \pm 0.0)	0* 0* 0 (0 \pm 0.0)	0* 0* 0 (0 \pm 0.0)	0* 0* 0 (0 \pm 0.0)						
S9 mix (+)	0	176 146 154 (159 \pm 15.5)	8 10 10 (9 \pm 1.2)	25 28 27 (27 \pm 1.5)	38 29 26 (31 \pm 6.2)	9 14 19 (14 \pm 5.0)						
	62.5	174 182 172 (176 \pm 5.3)	10 12 12 (11 \pm 1.2)	34 31 24 (30 \pm 5.1)	36 23 23 (27 \pm 7.5)	15 17 14 (15 \pm 1.5)						
	125	157 175 179 (170 \pm 11.7)	8 11 13 (11 \pm 2.5)	29 27 19 (25 \pm 5.3)	34 32 33 (33 \pm 1.0)	15 16 12 (14 \pm 2.1)						
	250	181 163 188 (177 \pm 12.9)	12 16 15 (14 \pm 2.1)	23 28 21 (24 \pm 3.6)	27 29 34 (30 \pm 3.6)	10 14 11 (12 \pm 2.1)						
	500	165 158 160 (161 \pm 3.6)	15 10 11 (12 \pm 2.6)	20 20 20 (20 \pm 0.0)	28 35 35 (33 \pm 4.0)	21 12 18 (17 \pm 4.6)						
	1000	136 132 119 (129 \pm 8.9)	3 9 7 (6 \pm 3.1)	18 20 16 (18 \pm 2.0)	22 20 23 (22 \pm 1.5)	5 12 9 (9 \pm 3.5)						
	2000	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)						
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA						
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80						
	Number of colonies/plate	598 557 565 (573 \pm 21.7)	714 702 739 (718 \pm 18.9)	183 260 252 (232 \pm 42.3)	639 628 654 (640 \pm 13.1)	380 585 453 (473 \pm 103.9)						
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA						
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2						
	Number of colonies/plate	980 1121 1117 (1073 \pm 80.3)	459 402 408 (423 \pm 31.3)	777 891 969 (879 \pm 96.6)	490 535 485 (503 \pm 27.5)	348 395 364 (369 \pm 23.9)						

The purity of the test substance was 98.328 %.

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-ethylphenol on bacteria(II)

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)							
		Base - pair substitution type				Frameshift type			
		TA100		TA1535		WP2 uvrA		TA98	
S9 mix (-)	0	134 163 129 (142 \pm 18.4)	13 13 11 (12 \pm 1.2)	26 22 31 (26 \pm 4.5)	24 26 19 (23 \pm 3.6)	7 12 7 (9 \pm 2.9)			
	62.5	156 124 142 (141 \pm 16.0)	10 8 11 (10 \pm 1.5)	28 12 21 (20 \pm 8.0)	29 18 27 (25 \pm 5.9)	11 17 7 (12 \pm 5.0)			
	125	157 145 159 (154 \pm 7.6)	16 12 15 (14 \pm 2.1)	13 12 14 (13 \pm 1.0)	24 27 16 (22 \pm 5.7)	16 11 9 (12 \pm 3.6)			
	250	175 159 113 (149 \pm 32.2)	10 17 4 (10 \pm 6.5)	22 20 16 (19 \pm 3.1)	24 17 18 (20 \pm 3.8)	10 9 8 (9 \pm 1.0)			
	500	151 150 150 (150 \pm 0.6)	13 8 14 (12 \pm 3.2)	13 12 13 (13 \pm 0.6)	24 28 17 (23 \pm 5.6)	11 9 10 (10 \pm 1.0)			
	1000	59* 92* 75* (75 \pm 16.5)	2* 5* 2* (3 \pm 1.7)	17 18 15 (17 \pm 1.5)	5* 6* 12* (8 \pm 3.8)	3* 2* 3* (3 \pm 0.6)			
	2000	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
S9 mix (+)	0	148 144 132 (141 \pm 8.3)	8 12 12 (11 \pm 2.3)	28 19 20 (22 \pm 4.9)	31 34 34 (33 \pm 1.7)	10 18 16 (15 \pm 4.2)			
	62.5	162 168 152 (161 \pm 8.1)	11 10 14 (12 \pm 2.1)	29 31 27 (29 \pm 2.0)	42 35 29 (35 \pm 6.5)	18 17 17 (17 \pm 0.6)			
	125	193 185 186 (188 \pm 4.4)	16 21 11 (16 \pm 5.0)	25 25 29 (26 \pm 2.3)	25 27 45 (32 \pm 11.0)	14 6 11 (10 \pm 4.0)			
	250	176 157 160 (164 \pm 10.2)	13 10 15 (13 \pm 2.5)	18 26 21 (22 \pm 4.0)	24 26 28 (26 \pm 2.0)	20 19 17 (19 \pm 1.5)			
	500	150 172 152 (158 \pm 12.2)	8 16 12 (12 \pm 4.0)	17 32 28 (26 \pm 7.8)	41 40 37 (39 \pm 2.1)	15 14 15 (15 \pm 0.6)			
	1000	130 124 119 (124 \pm 5.5)	1 5 10 (5 \pm 4.5)	32 29 23 (28 \pm 4.6)	33 20 30 (28 \pm 6.8)	5 17 13 (12 \pm 6.1)			
	2000	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
Positive control S9 mix(-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA			
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80			
	Number of colonies/plate	637 601 526 (588 \pm 56.6)	792 701 662 (718 \pm 66.7)	260 236 212 (236 \pm 24.0)	622 586 637 (615 \pm 26.2)	507 568 625 (567 \pm 59.0)			
Positive control S9 mix(+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA			
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2			
	Number of colonies/plate	939 994 968 (967 \pm 27.5)	324 358 433 (372 \pm 55.8)	825 803 912 (847 \pm 57.6)	478 427 428 (444 \pm 29.2)	386 322 395 (368 \pm 39.8)			

The purity of the test substance was 98.328 %.

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

*:Growth inhibition was observed.

4-エ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 4-Ethylphenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-エチルフェノールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.15 mg/mL, S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理ではそれぞれ0.41 mg/mLおよび0.15 mg/mLであった。従って、各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理では0.075 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では0.20 mg/mLおよび0.075 mg/mLであったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した群では、中濃度群(0.038 mg/mL)および高濃度群(0.075 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度はそれぞれ6.5%および21.0%(gapを除く)であった。S9 mix非存在下の短時間処理では、いずれの処理群においても、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。S9 mix存在下での短時間処理では、高濃度群(0.075 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度は11.0%(gapを除く)であった。倍数性細胞の誘発作用については、傾向性検定で有意差($p<0.01$)が認められたが、その誘発頻度が低いことから、陰性と判定した。

以上の結果より、本試験条件下で4-エチルフェノールは、染色体異常を誘発する(陽性)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、現在21代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU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、仔牛血清(CS, Cansera International)を10

vol%添加したイーグルMEM(日本製薬株)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU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CO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で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. S9

S9(キッコーマン株)は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したもの購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

4-エチルフェノール(ロット番号:81029A, 丸善石油化学会株、東京)は、白色結晶で、水に対しては100 mmol/L未満、DMSOでは2 mol/L以上、アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、融点44.8 °C、沸点219 °C、蒸気圧2.7kPa(115 °C)で、純度98.328%(不純物は不明)の物質で、室温で保存した。被験物質原体は、常温で安定であった。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はDMSO(ロット番号:ACL5008, 和光純薬工業株)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 vol%になるように加えた。

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/IU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、連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.15 mg/mL、S9 mix非存在下および存在下における

短時間処理では、それぞれ0.41 mg/mLおよび0.15 mg/mLであった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(連続処理およびS9 mix存在下での短時間処理:0.019, 0.038, 0.075, 0.15, 0.30 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理:0.050, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/mL)。陽性対照物質として用いたマイトイシンC(MC, 協和醸酵工業株)およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方注射用水(株大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本を作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

9. 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2), 連続処理では0.075 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下での短時間処理では0.20 mg/mLおよび0.075 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)¹¹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(polyplloid)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。

11. 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。

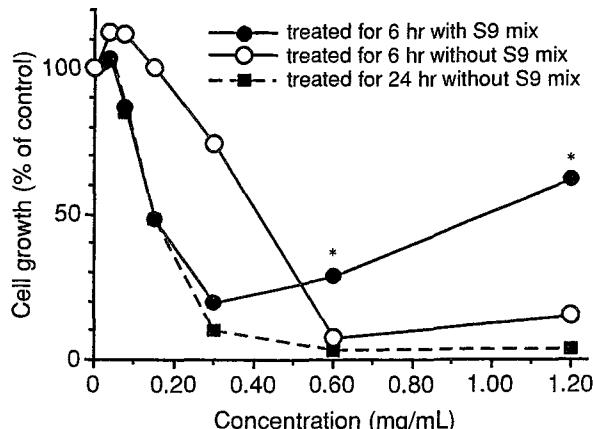


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-ethylphenol

*: Dead cells remained adhering onto the culture dishes.

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²⁾により、有意差検定を実施した($p<0.01$)。また、用量依存性に関してコクラン・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p<0.01$)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。4-エチルフェノールを加えて24時間連続処理した群では、中濃度群(0.038 mg/mL)および高濃度群(0.075 mg/mL)において染色体異常が誘発され、その頻度はそれぞれ6.5%および21.0%(gapを除く)であった。一方、倍数性細胞の誘発作用については、高濃度群(0.075 mg/mL)では毒性のために800細胞の観察できず、それぞれの観察細胞数は722細胞であったが、すべての処理群において、有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。4-エチルフェノールを加え、S9 mix非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、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。S9 mix存在下で6時間処理した場合は、高濃度群(0.075 mg/mL)で有意な染色体異常の増加が認められ、その頻度は11.0%(gapを除く)であった。また、中および高濃度群(0.038 mg/mLおよび0.075 mg/mL)において、倍数性細胞の出現頻度に有意差が認められ、傾向性検定($p<0.01$)でも有意差が認められたが、その誘発頻度が1.50~1.63%と低いことから、陰性と判定した。

従って、4-エチルフェノールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

フェノール類のうち、側鎖に炭化水素を有している化合物の一つである4-(1-メチルプロピル)フェノールにつ

いては、染色体異常を誘発しないことが報告されている⁴⁾。一方、*p*-tert-ブチルフェノールは、染色体の構造異常を誘発することに加え、倍数性細胞の高頻度誘発(最高出現頻度:93.18%)が特徴的である⁵⁾。また、本試験と平行して実施した、3-エチルフェノールの染色体異常試験結果についても陽性の結果が得られている⁶⁾が、本物質の結果とは異なり、代謝活性化の処理系列においてのみ構造異常の誘発が認められている。これらのことから、側鎖に炭化水素を有するフェノール類は、炭化水素の結合位置および種類が染色体異常の発現と関わっており、発現する異常のタイプ(構造異常および倍数性細胞)または細胞に対する作用様式を決定している可能性が示唆された。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編，“化学物質による染色体異常アトラス，”朝倉書店、東京、1988, pp. 16-37.
- 2) 吉村功編，“毒性・薬効データの統計解析、事例研究によるアプローチ，”サイエンティスト社、東京、1987, pp. 76-78.
- 3) 吉村功、大橋靖夫編，“毒性試験講座14、毒性試験データの統計解析，”地人書館、東京、1992, pp. 218-223.
- 4) 田中憲穂、化学物質毒性試験報告、2, 347(1995).
- 5) 田中憲穂、化学物質毒性試験報告、4, 301(1996).
- 6) 日下部博一、化学物質毒性試験報告、8, 764(2001).

連絡先

試験責任者：山影康次
試験担当者：日下部博一、佐々木澄志、高橋俊孝、
若栗 忍、橋本恵子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors:Kohji Yamakage (Study director)
Hirokazu Kusakabe, Kiyoshi Sasaki,
Toshitaka Takahashi, Shinobu Wakuri,
Keiko Hashimoto
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4-ethylphenol (4EP)^a without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							No. of cells with aberrations		POL ^c (%)	Trend test ^f	Concurrent cytotoxicity ^g (%)	Mitotic index ^h (%)			
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ^e	total	Others ^d	TAG(%)	TA(%)						
Solvent ^b 0	—	24	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	—	100.0	—		
4EP 0.019	0.019	24	200	4	1	5	3	1	0	14	0	11 (5.5)	8 (4.0)	0.00	—	102.0	—		
4EP 0.038	0.038	24	200	3	6	7	0	1	0	17	3	16*(8.0)	13*(6.5)	0.13	+	89.0	—		
4EP 0.075	0.075	24	200	4	24	18	0	4	0	50	1	45*(22.5)	42*(21.0)	0.00 ⁱ	—	68.5	1.4, 1.2		
4EP 0.15 ^j	0.15 ^j	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	33.0	0.4, 0.0		
4EP 0.30 ^k	0.30 ^k	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.5	—		
MC 0.05 μg/mL	0.05 μg/mL	24	200	2	49	119	2	3	10	185	0	105*(52.5)	104*(52.0)	0.00	—	—	—	—	—

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C.

a) Purity was 98.328 %. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$. g) Cell confluence, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Seven hundred and twenty-two cells were analysed. j) Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity. k) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity.

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

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-ethylphenol (4EP)^a with and without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							No. of cells with aberrations		POL ^c (%)	Trend test ^f	Concurrent cytotoxicity ^g (%)	Mitotic index ^h (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ^e	total	Others ^d	TAG(%)	TA(%)				
Non-treatment	—	—	—	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	—	—	—
Solvent ^b 0	—	—	6-(18)	200	0	2	0	0	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	—	100.0	—
4EP 0.050	0.050	—	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	—	85.0	—
4EP 0.10	0.10	—	6-(18)	200	1	2	2	0	0	0	5	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38	—	88.5	—
4EP 0.20	0.20	—	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	—	76.0	12.8, 9.8
4EP 0.40 ^j	0.40 ^j	—	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.0	—	
4EP 0.80 ^j	0.80 ^j	—	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	19.0	—	
MC 0.1 μg/mL	0.1 μg/mL	—	6-(18)	200	1	53	131	7	1	0	193	3	101*(50.5)	100*(50.0)	0.00	—	—	—
Solvent ^b 0	+	+	6-(18)	200	0	1	0	2	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	—	100.0	—
4EP 0.019	0.019	+	6-(18)	200	2	2	1	1	0	0	6	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.00	—	95.0	—
4EP 0.038	0.038	+	6-(18)	200	2	2	7	5	0	0	16	1	10 (5.0)	8 (4.0)	1.50*	+	83.5	—
4EP 0.075	0.075	+	6-(18)	200	1	13	35	2	0	10	61	0	22*(11.0)	22*(11.0)	1.63*	—	56.0	4.6, 6.8
4EP 0.15 ^j	0.15 ^j	+	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.0	2.0, 0.4	
4EP 0.30 ^j	0.30 ^j	+	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	21.0	Tox, Tox	
CPA 5 μg/mL	5 μg/mL	+	6-(18)	200	11	45	193	3	1	0	253	1	124*(62.0)	121*(60.5)	0.00	—	—	—

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C, CPA: cyclophosphamide, Tox: cytotoxic.

a) Purity was 98.328 %. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$. g) Cell confluence, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity. j) Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

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