

## 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in Bacteria

#### 要約

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾ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, TA1537<sup>uvrA</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrAの5菌株を用い、S9 mix無添加条件および添加条件のいずれも、用量設定試験で生育阻害が認められなかったことから、本試験はS9 mix無添加条件および添加条件ともに313~5000 µg/plateの範囲で実施した。*

その結果、用いた5種の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは、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

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは、淡黄色粉末固体である。用いた被験物質は、ロット番号S4-034-1、純度100% (LC面積百分率)、製造シプロ化成(株)(福井)であり、シプロ化成(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。本ロットについては、試験期間中安定であることが確認された。

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:SEG4422, 和光純薬工業(株))に懸濁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。調製時に、発熱、発泡、変色等の変化はみられなかった。

##### 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。

AF2 : 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))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(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℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

##### 3. 検定菌

試験には、*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℃で凍結保存したものを、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*)、アンピシリン耐性因子pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照群と陽性対照群の復帰変異コロニー数について調べ、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No. 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℃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(株))	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。

## 復帰変異試験

- (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-ピオチン 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 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol

\*:7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製したS9(キッコーマン株)を用いた。

### 5. 試験方法

ブレインキューベーション法<sup>9)</sup>により, S9 mix無添加条件および添加条件で試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液0.1 mL, 0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mL(S9 mix添加条件においてはS9 mix 0.5 mL), 検定菌液0.1 mLを混合し, 37°Cで20分間ブレインキューベーションしたのち, 約45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えて混和し, 合成培地平板上に流して固めた。また, 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。同時に実施した他試験については, 陰生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, 発生した復帰変異コロニー数をコロニーアナライザ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, 肉眼により確認した。また, 生育阻害の有無については, 肉眼あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては, 陰性および陽性対照群では3枚ずつ, 各用量については1枚ずつとした。また, 本試験においては, 両対照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, 本試験は同一用量について2回実施し, 結果の再現性の確認をした。

### 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無添加条件あるいはS9 mix添加条件において, 被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が, 陰性対照値の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  $\mu$ g/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無添加条件および添加条件のいずれにおいても生育阻害は認められなかった。また, 被験物質に由来する沈殿は, S9 mix無添加条件ではすべての用量で, S9 mix添加条件では150  $\mu$ g/plate以上の用量で認められた。

したがって, S9 mix無添加条件および添加条件とも最高用量を5000  $\mu$ g/plateとして公比2で5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, 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, 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは, 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, 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは, 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も陰性の結果が得られている<sup>4)</sup>。また, 関連物質であるブチレーチドヒドロキシトルエン<sup>5)</sup>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, p-tert-ブチルフェノール<sup>6,7)</sup>, 2-tert-ブチルフェノール<sup>8,9)</sup>および2,4-ジ-tert-ブチルフェノール<sup>10,11)</sup>については, 復帰変異試験で陰性の, 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. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp. 273-285.
- 4) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, 10, 242(2003).
- 5) 祖父尼俊雄監修 "染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1999, p. 92.
- 6) 森谷徹, 化学物質毒性試験報告, 4, 295(1996).
- 7) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, 4, 301(1996).
- 8) 野田篤, 化学物質毒性試験報告, 8, 219(2001).
- 9) 野田篤, 化学物質毒性試験報告, 8, 224(2001).
- 10) 野田篤, 化学物質毒性試験報告, 8, 387(2001).
- 11) 野田篤, 化学物質毒性試験報告, 8, 392(2001).

絡先

試験責任者：原 巧  
試験担当者：須井 哉, 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: Takumi Hara (Study Director)  
Hajime Sui, 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 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in 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 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	131	123	127	8	12	9	19	23	23	21	26	23	15	12	15
		( 127 $\pm$ 4)			( 10 $\pm$ 2)			( 22 $\pm$ 2)			( 23 $\pm$ 3)			( 14 $\pm$ 2)		
	313 †	107	105	134	4	12	8	19	19	37	26	15	28	13	6	8
		( 115 $\pm$ 16)			( 8 $\pm$ 4)			( 25 $\pm$ 10)			( 23 $\pm$ 7)			( 9 $\pm$ 4)		
	625 †	134	116	104	8	9	10	18	15	13	13	14	20	7	10	6
		( 118 $\pm$ 15)			( 9 $\pm$ 1)			( 15 $\pm$ 3)			( 16 $\pm$ 4)			( 8 $\pm$ 2)		
S9 mix (+)	1250 †	123	109	128	5	8	7	16	34	18	20	26	25	8	12	8
		( 120 $\pm$ 10)			( 7 $\pm$ 2)			( 23 $\pm$ 10)			( 24 $\pm$ 3)			( 9 $\pm$ 2)		
	2500 †	114	141	137	6	8	11	24	17	17	19	15	14	7	11	15
		( 131 $\pm$ 15)			( 8 $\pm$ 3)			( 19 $\pm$ 4)			( 16 $\pm$ 3)			( 11 $\pm$ 4)		
	5000 †	128	118	136	11	14	9	13	23	29	23	21	17	8	7	8
		( 127 $\pm$ 9)			( 11 $\pm$ 3)			( 22 $\pm$ 8)			( 20 $\pm$ 3)			( 8 $\pm$ 1)		
S9 mix (+)	0	122	112	117	12	7	12	37	38	28	17	24	33	15	13	9
		( 117 $\pm$ 5)			( 10 $\pm$ 3)			( 34 $\pm$ 6)			( 25 $\pm$ 8)			( 12 $\pm$ 3)		
	313 †	101	87	111	8	9	7	20	27	27	28	15	24	8	19	13
		( 100 $\pm$ 12)			( 8 $\pm$ 1)			( 25 $\pm$ 4)			( 22 $\pm$ 7)			( 13 $\pm$ 6)		
	625 †	102	119	148	11	6	10	27	26	30	19	29	22	8	8	9
		( 123 $\pm$ 23)			( 9 $\pm$ 3)			( 28 $\pm$ 2)			( 23 $\pm$ 5)			( 8 $\pm$ 1)		
Positive control S9 mix (-)	1250 †	117	96	107	10	5	5	22	25	30	22	24	26	6	12	10
		( 107 $\pm$ 11)			( 7 $\pm$ 3)			( 26 $\pm$ 4)			( 24 $\pm$ 2)			( 9 $\pm$ 3)		
	2500 †	148	132	131	7	16	11	20	22	23	35	24	26	17	10	10
		( 137 $\pm$ 10)			( 11 $\pm$ 5)			( 22 $\pm$ 2)			( 28 $\pm$ 6)			( 12 $\pm$ 4)		
	5000 †	139	126	135	11	8	6	29	21	28	26	24	22	12	5	8
		( 133 $\pm$ 7)			( 8 $\pm$ 3)			( 26 $\pm$ 4)			( 24 $\pm$ 2)			( 8 $\pm$ 4)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 <sup>a)</sup>			SA <sup>b)</sup>			AF2			AF2			9AA <sup>c)</sup>		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	477	501	402	525	546	536	196	209	183	404	417	366	482	343	324
	( 460 $\pm$ 52)			( 536 $\pm$ 11)			( 196 $\pm$ 13)			( 396 $\pm$ 27)			( 383 $\pm$ 86)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA <sup>d)</sup>			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	770	783	754	391	377	332	938	785	908	487	473	534	258	289	280
	( 769 $\pm$ 15)			( 367 $\pm$ 31)			( 877 $\pm$ 81)			( 498 $\pm$ 32)			( 276 $\pm$ 16)			

The purity of the test substance was 100 %.

This substance contained 0.01 % water as impurity.

a) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, b) Sodium azide, c) 9-Aminoacridine, d) 2-Aminoanthracene

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール

Table 2 Mutagenicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in 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 <i>uvrA</i>			TA98		TA1537			
S9 mix (-)	0	111	125	112	6	11	11	22	29	26	20	21	16	11	11	9
		(116 $\pm$ 8)			(9 $\pm$ 3)			(26 $\pm$ 4)			(19 $\pm$ 3)		(10 $\pm$ 1)			
	313 †	133	113	145	12	8	9	27	28	29	22	15	13	9	5	6
		(130 $\pm$ 16)			(10 $\pm$ 2)			(28 $\pm$ 1)			(17 $\pm$ 5)		(7 $\pm$ 2)			
	625 †	135	127	119	15	16	10	24	24	18	19	19	16	15	10	3
		(127 $\pm$ 8)			(14 $\pm$ 3)			(22 $\pm$ 3)			(18 $\pm$ 2)		(9 $\pm$ 6)			
	1250 †	146	149	132	11	12	9	19	23	22	13	21	10	19	6	8
		(142 $\pm$ 9)			(11 $\pm$ 2)			(21 $\pm$ 2)			(15 $\pm$ 6)		(11 $\pm$ 7)			
	2500 †	137	126	136	5	8	16	28	20	30	15	15	13	5	5	6
		(133 $\pm$ 6)			(10 $\pm$ 6)			(26 $\pm$ 5)			(14 $\pm$ 1)		(5 $\pm$ 1)			
	5000 †	125	142	146	5	12	10	30	27	17	12	16	14	8	8	7
		(138 $\pm$ 11)			(9 $\pm$ 4)			(25 $\pm$ 7)			(14 $\pm$ 2)		(8 $\pm$ 1)			
S9 mix (+)	0	129	136	116	10	6	13	29	24	29	26	22	21	15	6	17
		(127 $\pm$ 10)			(10 $\pm$ 4)			(27 $\pm$ 3)			(23 $\pm$ 3)		(13 $\pm$ 6)			
	313 †	101	125	122	9	14	13	12	27	28	14	18	20	10	6	7
		(116 $\pm$ 13)			(12 $\pm$ 3)			(22 $\pm$ 9)			(17 $\pm$ 3)		(8 $\pm$ 2)			
	625 †	118	126	123	13	9	9	35	20	20	20	23	20	10	5	6
		(122 $\pm$ 4)			(10 $\pm$ 2)			(25 $\pm$ 9)			(21 $\pm$ 2)		(7 $\pm$ 3)			
	1250 †	128	150	113	12	11	12	32	29	23	18	21	12	6	14	9
		(130 $\pm$ 19)			(12 $\pm$ 1)			(28 $\pm$ 5)			(17 $\pm$ 5)		(10 $\pm$ 4)			
	2500 †	126	126	133	14	8	9	29	19	26	13	21	18	12	9	12
		(128 $\pm$ 4)			(10 $\pm$ 3)			(25 $\pm$ 5)			(17 $\pm$ 4)		(11 $\pm$ 2)			
	5000 †	141	135	93	15	17	8	35	37	29	19	17	26	6	9	8
		(123 $\pm$ 26)			(13 $\pm$ 5)			(34 $\pm$ 4)			(21 $\pm$ 5)		(8 $\pm$ 2)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 <sup>a)</sup>			SA <sup>b)</sup>			AF2			AF2		9AA <sup>c)</sup>			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1		80			
	Number of colonies/plate	663	671	621	619	482	540	266	277	259	499	498	429	345	445	294
	(652 $\pm$ 27)			(547 $\pm$ 69)			(267 $\pm$ 9)			(475 $\pm$ 40)		(361 $\pm$ 77)				
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA <sup>d)</sup>			2AA			2AA			2AA		2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5		2			
	Number of colonies/plate	856	765	842	359	368	275	781	848	841	372	451	434	245	339	329
	(821 $\pm$ 49)			(334 $\pm$ 51)			(823 $\pm$ 37)			(419 $\pm$ 42)		(304 $\pm$ 52)				

The purity of the test substance was 100%.

This substance contained 0.01% water as impurity.

a) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, b) Sodium azide, c) 9-Aminoacridine, d) 2-Aminocanthracene

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

## 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの 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-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl) benzotriazole in Cultured Chinese Hamster Cells

#### 要約

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾ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。

S9 mix非存在下および存在下の短時間処理(6時間処理後18時間の回復時間)において、3.2 mg/mL(10 mmol/L)の濃度においても細胞増殖抑制は認められなかった。連続処理(24時間処理)でも3.2 mg/mLにおいて50%を超える増殖抑制作用は認められなかった。従って、すべての処理群で3.2 mg/mLを最高濃度とし、公比2で4~5濃度設定した。

染色体分析の結果、S9 mix非存在下および存在下における短時間処理ではいずれの群(0.80~3.2 mg/mL)においても染色体の構造異常の誘発作用および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理で陰性の結果が得られたため、連続処理を行った。その結果、いずれの群(0.80~3.2 mg/mL)においても染色体の構造異常ならびに倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下で2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

#### 方法

##### 1. 細胞

CHL/IU細胞はチャイニーズ・ハムスター、肺由来で、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。解凍後は継代10代以内で試験に用いた。仔牛血清(CS, Cansera International Inc.)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬(株))培養液を用い、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

##### 2. S9 mix

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンに投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。S9 mixは処理培地に10 vol%添加し、各成分の最終濃度はS9 5 vol%, グルコース6リン酸(Sigma Chemical Co.)0.83 mmol/L, β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(オリエンタル酵母工業(株))0.67 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 0.83 mmol/L,

KCl 5.5 mmol/L, HEPES緩衝液(pH7.2)0.67 mmol/Lとした。

##### 3. 被験物質

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール(ロット番号:S4-034-1, シプロ化成(株)(福井))は、純度100%(水分0.01%を含む)の淡黄色粉末固体であり、常温で安定で、室温で保管した。本物質は水、アセトンおよびDMSOに不溶(50 mg/mL未満)であった。被験物質原体は、試験後の分析によって試験期間中、室温で安定であったことが確認された。

##### 4. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。媒体は0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC Na, ロット番号:WTH1105, 和光純薬工業(株))水溶液を用いて原液を調製した。原液を媒体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10 vol%になるように加えた。

##### 5. 培養条件

2 × 10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm)に播き、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3日間培養した。その後、連続処理では、新鮮培地と交換後、被験物質を加え、24時間処理した。また、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、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

##### 6. 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。培養終了後、細胞を10 vol%ホルマリン水溶液で固定し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で染色した。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<sup>™</sup>, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の媒体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、S9 mix非存在下および存在下における短時間処理において最高処理濃度の3.2 mg/mL(10 mmol/L)においても細胞増殖抑制は認められなかった(Fig. 1)。連続処理においては弱い増殖抑制作用が認められたが、最高処理濃度の3.2 mg/mLの濃度においても50%を超える増殖抑制作用は認められなかった(Fig.

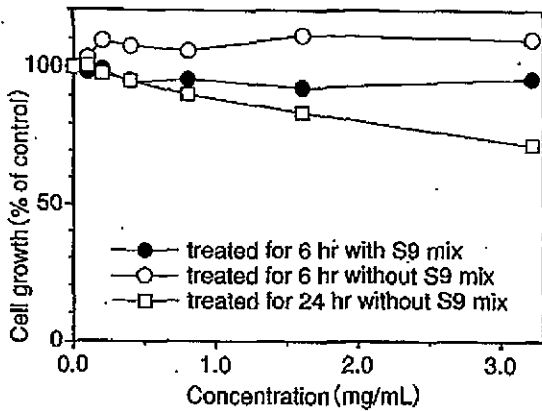


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl) benzotriazole. Precipitation was observed at all doses during the treatment.

1).

#### 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、すべての処理群において3.2 mg/mL (10 mmol/L) を最高処理濃度とした。短時間処理では、公比2で4濃度群 (0.40~3.2 mg/mL)、連続処理では、公比2で5濃度群 (0.20~3.2 mg/mL) を設定した。

また、陽性対照物質として用いたマイトマイシンC (MC, 協和醗酵工業(株)) およびシクロホスファミド (CP, Sigma Chemical Co.) は、日局注射用水(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、溶媒対照群と処理群では1濃度あたり4枚のディッシュを用いた。このうちの2枚は染色体標本作製し、残りの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。無処理対照群および陽性対照群については細胞増殖率測定は行わなかった。

#### 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  $\mu$ g/mL になるように培養液に加えた。染色体標本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。作製した標本は3 vol% ギムザ溶液で染色した。

#### 9. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数を細胞毒性の指標として、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 1~3)、すべての処理系列において観察可能な最高濃度は3.2 mg/mL (10 mmol/L) であったこと

から、この濃度を高濃度群として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)<sup>11)</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. 判定

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<sup>12)</sup> 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<sup>13)</sup> ( $p < 0.01$ ) 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

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールを加えてS9 mix非存在下および存在下で短時間処理した場合には、いずれの処理群 (0.80, 1.6, 3.2 mg/mL) においても染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められなかった (Table 1, 2)。

短時間処理で陰性の結果が得られたため、24時間処理を行ったところ、いずれの群 (0.80, 1.6, 3.2 mg/mL) においても染色体の構造異常ならびに倍数性細胞の誘発作用は認められなかった (Table 3)。

陽性対照物質として用いたMCは、S9 mix非存在下で短時間処理および24時間連続処理した場合において染色体の構造異常を誘発し (Table 1, 3)、CPはS9 mix存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発した (Table 2)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

なお、2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは、細菌を用いる復帰変異試験において陰性の結果が得られている<sup>4)</sup>。また関連物質である2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール (butylated hydroxytoluene)<sup>14)</sup> については復帰変異試験および染色体異常試験で陰性、*p*-tert-ブチルフェノール<sup>6,7)</sup>、2-tert-ブチルフェノール<sup>8,9)</sup> および2,4-ジ-tert-ブチルフェノール<sup>10,11)</sup> 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報告されている。これらのことから、tert-ブチルフェノールの染色体異常誘発活性が、他の置換基が結合することにより失われることが示唆された。

以上の結果より、2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

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) 原巧ら, 化学物質毒性試験報告, 10, 237(2003).
- 5) 祖父尼俊雄 監修, "染色体異常試験データ集改定1998年版," エル・アイ・シー, 東京, 1999, p. 92.
- 6) 澁谷徹ら, 化学物質毒性試験報告, 4, 295(1996).
- 7) 田中憲穂ら, 化学物質毒性試験報告, 4, 301(1996).
- 8) 野田篤ら, 化学物質毒性試験報告, 8, 219(2001).
- 9) 野田篤ら, 化学物質毒性試験報告, 8, 224(2001).
- 10) 野田篤ら, 化学物質毒性試験報告, 8, 387(2001).
- 11) 野田篤ら, 化学物質毒性試験報告, 8, 392(2001).

連絡先

試験責任者: 山影康次  
試験担当者: 高橋俊孝, 渡辺美香, 中川ゆづき,  
橋本恵子, 三枝克彦, 加藤初美  
財団法人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)  
Toshitaka Takahashi, Mika Watanabe,  
Yuzuki Nakagawa, Keiko Hashimoto,  
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



2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HBBT)\*\* for 6 hr without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent cell growth <sup>a</sup> (%)	Mitotic index <sup>a</sup> (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Total number of cells with aberrations	No. of polyploid cells <sup>a</sup> (%)	Trend test <sup>b</sup>	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>a</sup>	total				Others <sup>c</sup>
Non-treatment				—	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.00)
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.00)
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.00)
Negative <sup>d</sup>	0	—	6-(18)	100.0	—	100	1	0	2	0	0	0	3	0	3(3.0)	2(2.0)	0(0.00)
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.00)
						200	1	0	2	0	0	0	3	0	3(1.5)	2(1.0)	0(0.00)
HBBT	0.40†	—	6-(18)	107.0	—	not observed											
HBBT	0.80†	—	6-(18)	111.5	—	100	0	0	1	1	0	0	2	0	2(2.0)	2(2.0)	0(0.00)
						100	2	0	0	1	0	0	3	0	3(3.0)	1(1.0)	1(0.25)
						200	2	0	1	2	0	0	5	0	5(2.5)	3(1.5)	1(0.13)
HBBT	1.6†	—	6-(18)	118.5	—	100	0	0	0	1	0	0	1	0	1(1.0)	1(1.0)	0(0.00)
						100	0	1	1	0	0	0	2	0	2(2.0)	2(2.0)	1(0.25)
						200	0	1	1	1	0	0	3	0	3(1.5)	3(1.5)	1(0.13)
HBBT	3.2†	—	6-(18)	119.0	84, 80	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2(2.0)	1(1.0)	1(0.25)
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1(1.0)	0(0.0)	1(0.25)
						200	2	1	0	0	0	0	3	0	3(1.5)	1(0.5)	2(0.25)
MC	0.1 (μg/mL)	—	6-(18)	—	—	100	4	34	61	0	1	10	110	0	61(61.0)	59(59.0)	0(0.00)
						100	12	42	66	0	1	0	121	0	68(68.0)	63(63.0)	0(0.00)
						200	16	76	127	0	2	10	231	0	129(64.5)	122*(61.0)	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 number of cells with aberrations including gaps, TA: total number of cells with aberrations excluding gaps, MC: mitomycin C.

1) 0.5% Sodium carboxymethylcellulose was used as vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ .

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

\*\*: Purity was 100%, and water (0.01%) was contained as impurity.

†: Precipitation was observed during the treatment.

染色体異常試験

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HBBT)\*\* for 6 hr with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent cell growth <sup>a</sup> (%)	Mitotic index <sup>a</sup> (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>d</sup>	Total number of cells with aberrations		No. of polyploid cells <sup>e</sup> (%)	Trend test <sup>g</sup>	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>b</sup>	total		TAG(%)	TA(%)		TA	POL
Negative <sup>c</sup>	0	+	6-(18)	100.0	—	100	0	2	4	0	0	0	6	0	2(2.0)	2(2.0)	1(0.25)		
						100	2	0	0	0	0	0	2	0	2(2.0)	0(0.0)	0(0.00)		
						200	2	2	4	0	0	0	8	0	4(2.0)	2(1.0)	1(0.13)		
HBBT	0.40†	+	6-(18)	98.5	—		not observed												
HBBT	0.80†	+	6-(18)	95.0	—	100	0	1	0	1	0	0	2	0	2(2.0)	2(2.0)	1(0.25)		
						100	0	0	0	0	1	0	1	0	1(1.0)	1(1.0)	0(0.00)		
						200	0	1	0	1	1	0	3	0	3(1.5)	3(1.5)	1(0.13)		
HBBT	1.6†	+	6-(18)	95.5	—	100	0	0	1	3	0	0	4	0	2(2.0)	2(2.0)	0(0.00)		
						100	4	1	0	5	0	0	10	1	6(6.0)	2(2.0)	0(0.00)		
						200	4	1	1	8	0	0	14	1	8(4.0)	4(2.0)	0(0.00)		
HBBT	3.2†	+	6-(18)	97.0	6.2, 5.6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	1(0.25)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.00)		
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	1(0.13)		
CP	5 (µg/mL)	+	6-(18)	—	—	100	3	10	23	0	0	0	36	0	30(30.0)	28(28.0)	0(0.00)		
						100	2	19	24	0	0	0	45	0	36(36.0)	34(34.0)	0(0.00)		
						200	5	29	47	0	0	0	81	0	66(33.0)	62*(31.0)	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 number of cells with aberrations including gaps, TA: total number of cells with aberrations excluding gaps, CP: cyclophosphamide.

1) 0.5 % Sodium carboxymethylcellulose was used as vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ .

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

\*\* : Purity was 100 %, and water (0.01 %) was contained as impurity.

† : Precipitation was observed during the treatment.

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HBBT)\*\* for 24 hr without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	Concurrent cell growth <sup>a</sup> (%)	Mitotic index <sup>a</sup> (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>d</sup>	Total number of cells with aberrations		No. of polyploid cells <sup>e</sup> (%)	Trend test <sup>f</sup>	
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>g</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL
Non-treatment			—	—	100	1	0	0	0	0	10	11	0	2(2.0)	1(1.0)	2(0.50)		
					100	2	1	0	0	0	0	3	0	3(3.0)	1(1.0)	1(0.25)		
					200	3	1	0	0	0	10	14	0	5(2.5)	2(1.0)	3(0.38)		
Negative <sup>h</sup>	0	24	100.0	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.00)		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.00)		
					200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.00)		
HBBT	0.20†	24	99.0	—									not observed					
HBBT	0.40†	24	96.0	—									not observed					
HBBT	0.80†	24	92.5	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	1(0.25)		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	1(0.25)			
					200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	2(0.25)			
HBBT	1.6†	24	91.5	—	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1(1.0)	0(0.0)	0(0.00)		
					100	0	3	0	0	0	0	3	0	3(3.0)	3(3.0)	3(0.75)		
					200	1	3	0	0	0	0	4	0	4(2.0)	3(1.5)	3(0.38)		
HBBT	3.2†	24	82.5	6.8, 6.4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	2(0.50)		
					100	0	1	0	0	0	0	1	0	1(1.0)	1(1.0)	1(0.25)		
					200	0	1	0	0	0	0	1	0	1(0.5)	1(0.5)	3(0.38)		
MC	0.05 (μg/mL)	24	—	—	100	3	19	52	0	0	0	74	1	51(51.0)	48(48.0)	1(0.25)		
					100	3	26	47	1	0	0	77	0	56(56.0)	54(54.0)	0(0.00)		
					200	6	45	99	1	0	0	151	1	107(53.5)	102*(51.0)	1(0.13)		

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 number of cells with aberrations including gaps, TA:total number of cells with aberrations excluding gaps, MC:mitomycin C.

1) 0.5 % Sodium carboxymethylcellulose was used as vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ .

\*\*Significantly different from the negative control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test.

†Purity was 100 %, and water (0.01 %) was contained as impurity.

‡Precipitation was observed during the treatment.