

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 4-(1-Methyl-1-phenylethyl)phenol on Bacteria

要約

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)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、用量設定試験で強い抗菌性が認められたことから、本試験は用量範囲をS9 mix無添加試験においてはすべての検定菌で6.25~200 $\mu\text{g}/\text{plate}$, S9 mix添加試験においては*Salmonella*の4菌株では6.25~200 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2 *uvrA*では12.5~400 $\mu\text{g}/\text{plate}$ として実施した。

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4-(1-メチル-1-フェニルエチル)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-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールは、フレーク状の固体である。用いた被験物質は、ロット番号101002, 純度99.88%, 製造 サンテクノケミカル(株)(東京)であり、サンテクノケミカル(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。

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:ACL5008, 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℃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℃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、ニュートリエントブロス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)	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) <i>Salmonella typhimurium</i> 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 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ 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℃で20分間ブレインキューベーションしたのち、約45℃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。各検定菌ごとに用いたの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℃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澱の有無は、肉眼により確認した。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 μ 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、S9 mix無添加試験においてはすべての検定菌で150 μ g/plate以上で、S9 mix添加試験においては*Salmonella*の4菌株では150 μ g/plate以上で、WP2 *uvrA*では500 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。また、被験物質に由来する沈澱は、S9 mix無添加試験においては1500 μ g/plate以上で、S9 mix添加試験においては5000 μ g/plateで認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験においてはすべての検定菌で200 μ g/plate、S9 mix添加試験においては*Salmonella*の4菌株では200 μ g/plate、WP2 *uvrA*では400 μ g/plateとした。

上記の最高用量に基づいて、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-(1-メチル-1-フェニルエチル)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-(1-メチル-1-フェニルエチル)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陰性であった⁴⁾。また、関連物質であるビスフェノールAについては、復帰変異試験で陰性の結果が⁵⁾、また、ジフェニル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^{6,7)}。

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) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 738(2001).
- 5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課, "労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集," 日本化学物質安全・情報センター, 東京, 1996, pp. 223-224.
- 6) 石館基, "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, 1996, pp. 203-204.
- 7) 石館基, "<改定>染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1987, pp. 152.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹

試験担当者：川上久美子，原 巧，須井 哉，
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 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)

Kumiko Kawakami, Takumi Hara,

Hajime Sui, 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

Table 1 Mutagenicity of 4-(1-methyl-1-phenylethyl) phenol 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 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	165	164	161 (163 $\pm$ 2.1)	13	10	12 (12 $\pm$ 1.5)	21	23	14 (19 $\pm$ 4.7)	31	26	23 (27 $\pm$ 4.0)	8	16	13 (12 $\pm$ 4.0)
	6.25	159	154	150 (154 $\pm$ 4.5)	11	14	10 (12 $\pm$ 2.1)	30	17	25 (24 $\pm$ 6.6)	26	20	19 (22 $\pm$ 3.8)	7	3	12 (7 $\pm$ 4.5)
	12.5	170	143	140 (151 $\pm$ 16.5)	9	11	12 (11 $\pm$ 1.5)	25	21	13 (20 $\pm$ 6.1)	24	29	15 (23 $\pm$ 7.1)	11	14	9 (11 $\pm$ 2.5)
	25.0	139	139	149 (142 $\pm$ 5.8)	7	9	11 (9 $\pm$ 2.0)	16	26	25 (22 $\pm$ 5.5)	19	25	17 (20 $\pm$ 4.2)	22	12	8 (14 $\pm$ 7.2)
	50.0	132	130	135 (132 $\pm$ 2.5)	15	7	9 (10 $\pm$ 4.2)	16	23	18 (19 $\pm$ 3.6)	18	20	11 (16 $\pm$ 4.7)	7	12	5 (8 $\pm$ 3.6)
	100	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)
	200	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	151	163	147 (154 $\pm$ 8.3)	11	12	7 (10 $\pm$ 2.6)	14	28	29 (24 $\pm$ 8.4)	38	31	30 (33 $\pm$ 4.4)	16	13	18 (16 $\pm$ 2.5)
	6.25	210	227	166 (201 $\pm$ 31.5)	13	11	16 (13 $\pm$ 2.5)	NT			41	34	33 (36 $\pm$ 4.4)	11	12	14 (12 $\pm$ 1.5)
	12.5	185	171	183 (180 $\pm$ 7.6)	10	12	14 (12 $\pm$ 2.0)	28	24	27 (26 $\pm$ 2.1)	38	30	28 (32 $\pm$ 5.3)	6	13	11 (10 $\pm$ 3.6)
	25.0	180	214	196 (197 $\pm$ 17.0)	13	9	6 (9 $\pm$ 3.5)	36	37	26 (33 $\pm$ 6.1)	39	33	30 (34 $\pm$ 4.6)	15	21	17 (18 $\pm$ 3.1)
	50.0	162	184	168 (171 $\pm$ 11.4)	17	11	12 (13 $\pm$ 3.2)	31	34	32 (32 $\pm$ 1.5)	31	30	23 (28 $\pm$ 4.4)	13	18	10 (14 $\pm$ 4.0)
	100	193	160	164 (172 $\pm$ 18.0)	10	9	14 (11 $\pm$ 2.6)	35	23	35 (31 $\pm$ 6.9)	21	26	27 (25 $\pm$ 3.2)	17	12	12 (14 $\pm$ 2.9)
	200	79*	106*	119* (101 $\pm$ 20.4)	8*	8*	8* (8 $\pm$ 0.0)	18*	16*	19* (18 $\pm$ 1.5)	14*	23*	20* (19 $\pm$ 4.6)	0*	0*	0* (0 $\pm$ 0.0)
	400	NT			NT			12*	14*	11* (12 $\pm$ 1.5)	NT			NT		
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	732	765	729 (742 $\pm$ 20.0)	707	702	698 (702 $\pm$ 4.5)	246	258	221 (242 $\pm$ 18.9)	631	667	647 (648 $\pm$ 18.0)	623	571	653 (616 $\pm$ 41.5)
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	1161	1261	1190 (1204 $\pm$ 51.4)	422	395	422 (413 $\pm$ 15.6)	811	846	978 (878 $\pm$ 88.1)	562	499	492 (518 $\pm$ 38.6)	291	297	354 (314 $\pm$ 34.8)

The purity of the test substance was 99.88 %.

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

*: Growth inhibition was observed.

NT: Not tested

Table 2 Mutagenicity of 4-(1-methyl-1-phenylethyl)phenol 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 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	128	146	106	15	14	14	23	21	21	21	27	21	6	5	11
		(127 $\pm$ 20.0)			(14 $\pm$ 0.6)			(22 $\pm$ 1.2)			(23 $\pm$ 3.5)			(7 $\pm$ 3.2)		
	6.25	139	152	126	10	5	14	24	25	32	28	25	26	5	7	9
		(139 $\pm$ 13.0)			(10 $\pm$ 4.5)			(27 $\pm$ 4.4)			(26 $\pm$ 1.5)			(7 $\pm$ 2.0)		
	12.5	144	138	129	4	7	7	18	17	21	25	24	18	9	5	9
		(137 $\pm$ 7.5)			(6 $\pm$ 1.7)			(19 $\pm$ 2.1)			(22 $\pm$ 3.8)			(8 $\pm$ 2.3)		
	25.0	151	132	121	7	11	7	19	26	22	21	30	16	12	8	8
		(135 $\pm$ 15.2)			(8 $\pm$ 2.3)			(22 $\pm$ 3.5)			(22 $\pm$ 7.1)			(9 $\pm$ 2.3)		
	50.0	129	139	149	14	9	7	29	21	20	22	17	16	5	5	7
		(139 $\pm$ 10.0)			(10 $\pm$ 3.6)			(23 $\pm$ 4.9)			(18 $\pm$ 3.2)			(6 $\pm$ 1.2)		
	100	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)		
	200	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)		
S9 mix (+)	0	146	129	106	9	13	12	30	32	30	20	31	26	12	21	12
		(127 $\pm$ 20.1)			(11 $\pm$ 2.1)			(31 $\pm$ 1.2)			(26 $\pm$ 5.5)			(15 $\pm$ 5.2)		
	6.25	165	138	161	14	16	7	NT			21	22	18	12	20	7
		(155 $\pm$ 14.6)			(12 $\pm$ 4.7)						(20 $\pm$ 2.1)			(13 $\pm$ 6.6)		
	12.5	165	170	186	16	5	14	32	34	20	32	29	32	12	18	11
		(174 $\pm$ 11.0)			(12 $\pm$ 5.9)			(29 $\pm$ 7.6)			(31 $\pm$ 1.7)			(14 $\pm$ 3.8)		
	25.0	142	163	165	8	11	12	29	29	36	38	37	27	10	13	12
		(157 $\pm$ 12.7)			(10 $\pm$ 2.1)			(31 $\pm$ 4.0)			(34 $\pm$ 6.1)			(12 $\pm$ 1.5)		
	50.0	152	153	150	10	13	11	35	23	27	38	31	33	12	11	15
		(152 $\pm$ 1.5)			(11 $\pm$ 1.5)			(28 $\pm$ 6.1)			(34 $\pm$ 3.6)			(13 $\pm$ 2.1)		
	100	138	139	156	10	8	7	33	43	35	33	29	23	6	15	9
		(144 $\pm$ 10.1)			(8 $\pm$ 1.5)			(37 $\pm$ 5.3)			(28 $\pm$ 5.0)			(10 $\pm$ 4.6)		
	200	101*	132*	86*	5*	5*	5*	19*	26*	22*	12*	17*	24*	0*	0*	0*
		(106 $\pm$ 23.5)			(5 $\pm$ 0.0)			(22 $\pm$ 3.5)			(18 $\pm$ 6.0)			(0 $\pm$ 0.0)		
	400	NT			NT			12*	8*	12*	NT			NT		
								(11 $\pm$ 2.3)								
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	620	651	677	661	773	708	212	226	210	650	617	653	511	613	709
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	1027	964	919	359	334	349	1099	1005	956	368	464	488	256	252	202
		(970 $\pm$ 54.2)			(347 $\pm$ 12.6)			(1020 $\pm$ 72.7)			(440 $\pm$ 63.5)			(237 $\pm$ 30.1)		

The purity of the test substance was 99.88 %.

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

*: Growth inhibition was observed.

NT: Not tested

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)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-(1-Methyl-1-phenylethyl)phenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)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0.021 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では、それぞれ0.0083 mg/mLおよび0.031 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、それぞれ公比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0.020 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では0.0080 mg/mLおよび0.030 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時間連続処理および、S9 mix非存在下で短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存在下の短時間処理では、染色体の構造異常について、傾向性検定($p < 0.01$)において有意差が認められたが、フィッシャーの直接確率法においては、いずれの濃度群でも溶媒対照群との間で有意差($p < 0.01$)が認められなかったことから、陰性と判定した。また、倍数性細胞についても誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールは、上記の試験条件下で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, 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(日水製薬(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を入れたデイスコ(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を購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノール(ロット番号:101002, サンテクノケミカル(株)(東京))は、固体、フレーク状で、水に対しては100 mmol/L未満、DMSOでは2 mol/L以上、アセトン50 mg/mL以上で溶解し、融点73 °C, 沸点189-191 °C, 純度99.88 % (不純物は不明)の物質で、室温で保存した。

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:TPG6738および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、24時間連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は、0.021 mg/mLであった。また、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下で短時間処理した場合は、0.0083

mg/mLおよび0.031 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(24時間連続処理:0.0025, 0.0050, 0.010, 0.020, 0.040 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理:0.0010, 0.0020, 0.0040, 0.0080, 0.016 mg/mL, S9 mix存在下での短時間処理:0.0038, 0.0075, 0.015, 0.030, 0.060 mg/mL). 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(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 μ 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0.020 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0.0080 mg/mLおよび0.030 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(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。

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。

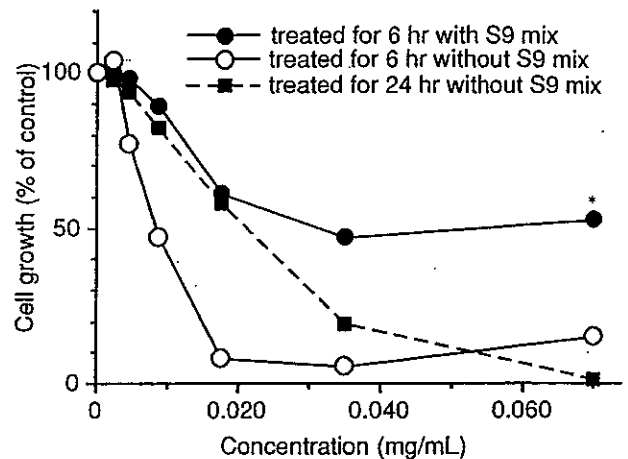


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-(1-methyl-1-phenylethyl)phenol

*: There were few visible cells. The increased percentage represents adhesion of unknown materials onto 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²¹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²¹($p < 0.01$)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-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールを加えて24時間連続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誘発作用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-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールを加えてS9 mix非存在下で短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。また、S9 mix存在下で短時間処理した場合、染色体の構造異常は、傾向性検定($p < 0.01$)において有意差が認められたが、フィッシャーの直接確率法においてはいずれの濃度群でも溶媒対照群との間で有意差($p < 0.01$)が認められず、最高濃度(0.030 mg/mL)における出現頻度は4.0%と低かったことから、陰性と判定した。また、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。

従って、4-(1-メチル-1-フェニルエチル)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しないと結論した。

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールの関連物質としては、様々なビスフェノール類があげられる。本物質の分子構造は、ビスフェノールAから水酸基を一つ除いた構造であり、酷似している。ビスフェノールAについては、復帰変異試験で陰性の結果が報告されている⁴¹が、分裂装置である紡錘糸の形成を阻害し、異数性細胞

(染色体の数的異常)を誘発することが、CREST染色法(キネトコア抗体を用いる動原体の蛍光抗体染色法)を用いた小核の分析結果から示唆されている⁵⁾。ただし、ビスフェノール類のうち異数性細胞を誘発する分子種は、CRESTポジティブな小核のみを誘発し⁵⁾、染色体の構造異常を誘発しないことも示唆される。なお、基本骨格と考えられるビスフェニルについてはS9 mix存在下で染色体の構造異常を誘発するが、倍数細胞を誘発しない⁶⁾ことから、ビスフェノール類の細胞に対する作用機作とは根本的に異なると考えられる。加えて、ビスフェノール類のうち、4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジプロモフェノール)については、本物質と同様に異数性細胞誘発の指標となる倍数性細胞を誘発しなかった⁷⁾ことや、ビス(p-ヒドロキシフェニル)メタンも異数性細胞を誘発しない⁵⁾ことが報告されており、ビスフェノール類が誘発する異数性細胞は、側鎖の種類やある特定の結合位置に側鎖が存在することによって発現するのではなく、それら全体の分子構造によって決定される可能性が考えられる。

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) 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) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, “労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集,” 日本化学物質安全・情報センター編集・発行, 東京, 1996, p. 223.
- 5) E. Pfeiffer et al.; *Mutat. Res.*, **390**, 21 (1997).
- 6) 石館基監修, “改訂増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.152.
- 7) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 133(2001).

連絡先

試験責任者: 日下部博一

試験担当者: 田中憲穂, 山影康次, 佐々木澄志,
高橋俊孝, 若栗 忍, 渡辺美香,
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: Hirokazu Kusakabe (Study director)

Noriho Tanaka, Kohji Yamakage,

Kiyoshi Sasaki, Toshitaka Takahashi,

Shinobu Wakuri, Mika Watanabe,

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-(1-methyl-1-phenylethyl)phenol (PIPP)^a without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^d	No. of cells with aberrations		POL ^e (%)	Trend test ^f		Concurrent cytotoxicity ^g (%)	Mitotic index ^h (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent ^b 0		24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			100.0	—
PIPP 0.0050		24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			95.5	—
PIPP 0.010		24	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-	89.0	—
PIPP 0.020		24	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13			67.0	10.0, 9.6
PIPP 0.040 ^c		24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			9.0	—
MC 0.05 µg/mL		24	200	5	53	116	1	2	0	177	0	108*(54.0)	105*(52.5)	0.13			—	—

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), 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 99.88 %. 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 confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) 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-(1-methyl-1-phenylethyl)phenol (PIPP)^a with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^d	No. of cells with aberrations		POL ^e (%)	Trend test ^f		Concurrent cytotoxicity ^g (%)	Mitotic index ^h (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			—	—
Solvent ^b 0		-	6-(18)	200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13			100.0	—
PIPP 0.0020		-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			106.5	—
PIPP 0.0040		-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-	106.5	—
PIPP 0.0080		-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			94.0	17.2, 24.0
PIPP 0.016 ^c		-	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			0.0	—
MC 0.1 µg/mL		-	6-(18)	200	6	60	157	1	1	40	265	0	115*(57.5)	114*(57.0)	0.00			—	—
Solvent ^b 0		+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			100.0	—
PIPP 0.0075		+	6-(18)	200	0	3	0	1	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00			113.0	—
PIPP 0.015		+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	+	-	97.0	—
PIPP 0.030		+	6-(18)	200	0	5	14	0	0	0	19	0	8 (4.0)	8 (4.0)	0.38			69.5	10.2, 12.2
PIPP 0.060 ^c		+	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			10.5	—
CPA 5 µg/mL		+	6-(18)	200	6	47	79	2	1	0	135	2	82*(41.0)	79*(39.5)	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.

a) Purity was 99.88 %. 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 confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity.

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

メチレンジフェノールのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of Methylenediphenol in Rats

要約

既存化学物質の安全性点検調査事業の一環として、メチレンジフェノールについて雌雄のSD系ラットに単回経口投与した時の毒性を検討した。投与用量は0および2000 mg/kgの2用量を設定した。

投与の結果、2000 mg/kg群の雌1例が第10日に死亡した。この個体は死亡まで不整呼吸およびラッセル音が認められ、剖検の結果、鼻腔閉鎖による、口での呼吸により嚥下された空気と思われるガスにより消化管が膨満していた。

その他の個体については、一般状態、体重および剖検所見に異常はみられなかった。

メチレンジフェノールを雌雄のラットに0および2000 mg/kgの用量で1回経口投与した結果、1例の死亡の他、異常は認められなかった。本被験物質の半数致死量(LD₅₀値)は雌雄とも2000 mg/kgより大と結論した。

方法

1. 被験物質

メチレンジフェノール(三井化学㈱、愛知、ロット番号S980013、純度99.0%)は、融点100℃、沸点360~370℃(760 mmHg)、蒸気圧3 mmHg(200℃)、比重1.18(25℃)、常温で微赤色の10φストランド状固体で、塗料、フィルム、成形用樹脂、ポリエステル、アルキド樹脂の原料¹⁾、特殊エポキシ、ポリカーボネート、エポキシ樹脂、ポリエステル樹脂の原料²⁾として用いられている。

被験物質原体は冷蔵暗所に保存し、試験に供した。被験物質は試験期間中安定であったことを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー㈱から入手した雌雄のSD系ラット(Crj:CD(SD)IGS, SPF)を、6日間検疫・馴化後、試験に供した。投与前日に体重層別化無作為抽出法により、1群につき雌雄各5匹に振り分けた。投与日の週齢は5週齢、体重範囲は雄が126~135 g、雌が106~113 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間を通して、温度22±2℃、相対湿度55±15%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00-19:00)に自動調節した飼育室を使用した。

動物は、実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー㈱)を敷いたポリカーボネート製ケージに1

ケージあたり同性5匹収容し、飼育した。動物には、実験動物用固型飼料(MF:オリエンタル酵母工業㈱)と、5μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を、それぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与経路は経口、投与回数は1回とした。投与前日から約17時間絶食させたラットにゾンデを用いて強制経口投与した。投与後約3時間は飼料を与えなかった。

予備検討(100, 500, 1000および2000 mg/kg)の結果、2000 mg/kgの雄で一般状態の変化が認められたのみで、死亡は認められなかった。これらの結果から、本試験における投与用量は、雌雄ともに2000 mg/kgの1用量とし、この他に溶媒(0.1% Tween 80添加0.5% CMC-Na水溶液)のみを投与する対照群を設けた。投与液量は10 mL/kgとし、投与直前の体重に基づいて算出した。被験物質は溶媒(0.1% Tween 80[東京化成工業㈱]添加0.5% CMC-Na[関東化学㈱]水溶液)に懸濁調製した。投与前に投与液中の被験物質の均一性および0.4 mg/mLと200 mg/mLの8日間の安定性について確認した。また、2000 mg/kg群の投与液(濃度:200 mg/mL)を分析し、被験物質の濃度が設定通りであることを確認した。

4. 観察および検査項目

1) 一般状態

投与日(第1日)は15、30分、1、3および6時間の5回、以後は1日1回、14日間にわたって生死および一般状態を観察した。

2) 体重

体重は投与直前、第4、8および15日に測定した。死亡動物については発見時に測定した。

3) 病理学検査

2000 mg/kg群の雌1例が投与後の観察期間中(第10日)に死亡した。剖検で胃および腸管内のガス貯留による膨満のほか、鼻腔内に帯黄色粘液様物の貯留が認められたため、本例の鼻腔について病理組織学的検査を行った。

生存例については観察終了後にチオペンタール・ナトリウム麻酔下で放血し、安楽死させた後、剖検した。

4) LD₅₀値の算出

LD₅₀値の算出は実施しなかった。