

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 4,4-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) on Bacteria

要約

既存化学物質安全性調査事業の一環として、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)について、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50~5000 μg /プレートの用量で行ったところ、S9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても*Salmonella*の4検定菌において強い抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*では抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験ではS9 mix無添加試験をTA100, TA1535およびTA1537は0.781~50 μg /プレート、TA98は3.13~200 μg /プレート、WP2 *uvrA*は313~5000 μg /プレートの範囲で、S9 mix添加試験を*S. typhimurium*の4菌株は12.5~800 μg /プレート、WP2 *uvrA*は313~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定して実施した

その結果、S9 mix無添加試験では、TA100およびTA1537は、12.5 μg /プレート、TA1535は25 μg /プレート、TA98は100 μg /プレートで抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*では認められなかった。またS9 mix添加試験ではTA100, TA1535, およびTA1537は400 μg /プレート、TA98は800 μg /プレートで抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*では認められなかった。復帰変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いた検定菌について、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)は、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

[検定菌]

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

*S. typhimurium*の4菌株¹⁾は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames博士から分

与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株²⁾は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid)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。

[被験物質]

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)(CAS No. 96-69-5)は、分子量358.54の白色結晶性粉末である。試験には、住友化学工業(株)製〔ロット番号:40701, 純度98%以上(不純物:不明)]のものを、(株)日本化学工業協会から供与され、使用時まで室温保管し、用いた。

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)は、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに50 mg/mlになるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)のDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、本試験IIで調製した低濃度(7.81 $\mu\text{g}/\text{ml}$)溶液および高濃度(50.0 mg/ml)溶液について、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、100および98.6%であった。

また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、高濃度は94.7%、低濃度は98.3%であった。

[陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬(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, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

[培地およびS9 mixの組成]

1) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混

合した。

| | |
|--------------------|--------|
| (A) バクトアガー (Difco) | 0.6% |
| 塩化ナトリウム | 0.5% |
| (B)* L-ヒスチジン | 0.5 mM |
| D-ビオチン | 0.5 mM |

*: WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地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 |
| バクトアガー (Difco) | 15 g |

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml中下記の成分を含む

| | |
|-----------------------|----------|
| 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を用いた。

[試験方法]

プレート法により、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 およびトッパアガー2 mlを混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにDMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

用いた平板は用量設定試験においては、溶媒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行った。

[判定基準]

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix 無添加あるいは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変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

結果および考察

[用量設定試験]

4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)について50~5000 μg/プレートの範囲で公比を約3として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験では、TA100、TA1535およびTA1537はすべての用量で、TA98は150 μg/プレート以上の用量で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*では抗菌性は認められなかった。また、S9 mix 添加試験では*S. typhimurium*の4菌株はすべて500 μg/プレート以上の用量で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*では抗菌性は認められなかった。

[本試験]

結果をそれぞれTable 1, 2に示した。4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)の用量を、S9 mix 無添加試験ではTA100、TA1535およびTA1537は0.781~50 μg/プレート、TA98は3.13~200 μg/プレート、WP2 *uvrA*は313~5000 μg/プレートの範囲で、S9 mix 添加試験では*S. typhimurium*の4菌株は12.5~800 μg/プレート、WP2 *uvrA*は313~5000 μg/プレートの範囲で公比を2として試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた5種類の検定菌のS9 mix 無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の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。

以上の結果に基づき、4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)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。

Table 1-1. Mutagenicity of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)** in reverse mutation test (I) on bacteria

| 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 | | TA98 | TA1537 | |
| S9mix (-) | 0 | 109 134 119 (121 \pm 12.6) | 20 22 11 (18 \pm 5.9) | | 21 21 30 (24 \pm 5.2) | 11 6 13 (10 \pm 3.6) | |
| | 0.781 | 104 107 119 (110 \pm 7.9) | 16 12 17 (15 \pm 2.6) | | ND | 7 12 12 (10 \pm 2.9) | |
| | 1.56 | 99 115 109 (108 \pm 8.1) | 16 11 14 (14 \pm 2.5) | | ND | 8 8 5 (7 \pm 1.7) | |
| | 3.13 | 88 111 99 (99 \pm 11.5) | 14 10 9 (11 \pm 2.6) | | 22 25 23 (23 \pm 1.5) | 7 15 12 (11 \pm 4.0) | |
| | 6.25 | 95 85 101 (94 \pm 8.1) | 9 12 14 (12 \pm 2.5) | | 18 14 25 (19 \pm 5.6) | 10 7 6 (8 \pm 2.1) | |
| | 12.5 | 95 97 94 (95 \pm 1.5) | 9 9 8 (9 \pm 0.6) | | 22 22 19 (21 \pm 1.7) | 5* 5* 5* (5 \pm 0.0) | |
| | 25 | 88* 84* 89* (87 \pm 2.6) | 11* 5* 13* (10 \pm 4.2) | | 11 25 19 (18 \pm 7.0) | 7* 8* 2* (6 \pm 3.2) | |
| | 50 # | 69* 66* 53* (63 \pm 8.5) | 7* 14* 5* (9 \pm 4.7) | | 13 11 14 (13 \pm 1.5) | 3* 1* 5* (3 \pm 2.0) | |
| | 100 # | | | | 5* 5* 9* (6 \pm 2.3) | | |
| 200 # | | | | 0* 2* 8* (3 \pm 4.2) | | | |
| S9mix (+) | 0 | 156 139 134 (143 \pm 11.5) | 13 14 24 (17 \pm 6.1) | | 32 32 31 (32 \pm 0.6) | 12 15 12 (13 \pm 1.7) | |
| | 12.5 | 146 145 161 (151 \pm 9.0) | 19 12 18 (16 \pm 3.8) | | 40 39 40 (40 \pm 0.6) | 9 15 13 (12 \pm 3.1) | |
| | 25 | 133 141 140 (138 \pm 4.4) | 18 17 19 (18 \pm 1.0) | | 30 41 37 (36 \pm 5.6) | 14 13 6 (11 \pm 4.4) | |
| | 50 | 137 156 128 (140 \pm 14.3) | 12 8 22 (14 \pm 7.2) | | 38 32 36 (35 \pm 3.1) | 17 6 14 (12 \pm 5.7) | |
| | 100 | 134 125 120 (126 \pm 7.1) | 11 16 15 (14 \pm 2.6) | | 42 32 33 (36 \pm 5.5) | 23 14 19 (19 \pm 4.5) | |
| | 200 | 98 99 94 (97 \pm 2.6) | 9 20 9 (13 \pm 6.4) | | 25 17 17 (20 \pm 4.6) | 13 19 13 (15 \pm 3.5) | |
| | 400 # | 60 83 74 (72 \pm 11.6) | 10* 10* 9* (10 \pm 0.6) | | 2 5 2 (3 \pm 1.7) | 11 9 6 (9 \pm 2.5) | |
| | 800 # | 46* 43* 36* (42 \pm 5.1) | 5* 9* 8* (7 \pm 2.1) | | 2* 2* 3* (2 \pm 0.6) | 1* 1* 2* (1 \pm 0.6) | |
| Positive control | Chemical | AF2 | SA | | AF2 | 9AA | |
| | Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | 0.5 | | 0.1 | 80 | |
| S9 mix (-) | Number of colonies/plate | 868 803 830 (834 \pm 32.7) | 170 165 175 (170 \pm 5.0) | | 894 873 913 (893 \pm 20.0) | 1310 1187 1149 (1215 \pm 84.2) | |
| Positive control | Chemical | 2AA | 2AA | | 2AA | 2AA | |
| | Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 1 | 2 | | 0.5 | 2 | |
| S9 mix (+) | Number of colonies/plate | 1352 1209 1238 (1266 \pm 75.6) | 270 316 300 (295 \pm 23.4) | | 420 373 374 (389 \pm 26.9) | 243 212 142 (199 \pm 51.7) | |

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

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

**:Purity was above 98% and impurity was unknown.

ND:Not done

Table 1-2. Mutagenicity of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)** in reverse mutation test (I) on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (µg/plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.) | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--|--|-------------------------------|--|--|--|
| | | Base-pair substitution type | | | | | |
| | | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | |
| S9mix (-) | 0 | | | 20 37 22 (26± 9.3) | | | |
| | 313 # | | | 14 13 12 (13± 1.0) | | | |
| | 625 # | | | 16 29 18 (21± 7.0) | | | |
| | 1250 # | | | 16 22 29 (22± 6.5) | | | |
| | 2500 # | | | 25 24 19 (23± 3.2) | | | |
| | 5000 # | | | 22 22 23 (22± 0.6) | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| S9mix (+) | 0 | | | 29 22 24 (25± 3.6) | | | |
| | 313 # | | | 29 21 18 (23± 5.7) | | | |
| | 625 # | | | 20 16 16 (17± 2.3) | | | |
| | 1250 # | | | 24 15 18 (19± 4.6) | | | |
| | 2500 # | | | 12 11 11 (11± 0.6) | | | |
| | 5000 # | | | 11 11 9 (10± 1.2) | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control | Chemical | | | AF2 | | | |
| | Dose (µg/plate) | | | 0.01 | | | |
| S9 mix (-) | Number of colonies/plate | | | 146 162 170 (159±12.2) | | | |
| Positive control | Chemical | | | 2AA | | | |
| | Dose (µg/plate) | | | 10 | | | |
| S9 mix (+) | Number of colonies/plate | | | 1214 1213 1269 (1232±32.0) | | | |

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2AA:2-Aminoanthracene

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

**Purity was above 98% and impurity was unknown.

Table 2-1. Mutagenicity of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)** in reverse mutation test (I) on bacteria

| 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 | | | TA98 | | TA1537 | | | |
| S9mix (-) | 0 | 120 | 130 | 141 | 11 | 12 | 18 | 29 | 18 | 26 | 7 | 12 | 5 |
| | | (130 \pm 10.5) | | | (14 \pm 3.8) | | | (24 \pm 5.7) | | (8 \pm 3.6) | | | |
| | 0.781 | 124 | 135 | 149 | 12 | 10 | 14 | ND | | | 8 | 12 | 7 |
| | | (136 \pm 12.5) | | | (12 \pm 2.0) | | | | | | (9 \pm 2.6) | | |
| | 1.56 | 151 | 112 | 105 | 20 | 14 | 12 | ND | | | 6 | 9 | 11 |
| | | (123 \pm 24.8) | | | (15 \pm 4.2) | | | | | | (9 \pm 2.5) | | |
| | 3.13 | 129 | 104 | 132 | 8 | 17 | 19 | 23 | 25 | 29 | 12 | 7 | 5 |
| | | (122 \pm 15.4) | | | (15 \pm 5.9) | | | (26 \pm 3.1) | | (8 \pm 3.6) | | | |
| | 6.25 | 114 | 91 | 112 | 15 | 10 | 13 | 12 | 24 | 24 | 5 | 5 | 6 |
| | | (106 \pm 12.7) | | | (13 \pm 2.5) | | | (20 \pm 6.9) | | (5 \pm 0.6) | | | |
| 12.5 | 107* | 106* | 84* | 15 | 15 | 6 | 25 | 19 | 21 | 10* | 8* | 12* | |
| | (99 \pm 13.0) | | | (12 \pm 5.2) | | | (22 \pm 3.1) | | (10 \pm 2.0) | | | | |
| 25 | 64* | 84* | 106* | 6* | 11* | 14* | 17 | 23 | 20 | 5* | 6* | 6* | |
| | (85 \pm 21.0) | | | (10 \pm 4.0) | | | (20 \pm 3.0) | | (6 \pm 0.6) | | | | |
| 50 # | 53* | 63* | 48* | 9* | 6* | 9* | 8 | 14 | 17 | 0* | 0* | 2* | |
| | (55 \pm 7.6) | | | (8 \pm 1.7) | | | (13 \pm 4.6) | | (1 \pm 1.2) | | | | |
| 100 # | | | | | | | 9* | 5* | 6* | | | | |
| | | | | | | | (7 \pm 2.1) | | | | | | |
| 200 # | | | | | | | 10* | 4* | 6* | | | | |
| | | | | | | | (7 \pm 3.1) | | | | | | |
| S9mix (+) | 0 | 129 | 137 | 129 | 15 | 16 | 20 | 30 | 36 | 36 | 14 | 13 | 14 |
| | | (132 \pm 4.6) | | | (17 \pm 2.6) | | | (34 \pm 3.5) | | (14 \pm 0.6) | | | |
| | 12.5 | 172 | 182 | 166 | 20 | 20 | 30 | 33 | 46 | 35 | 8 | 13 | 9 |
| | | (173 \pm 8.1) | | | (23 \pm 5.8) | | | (38 \pm 7.0) | | (10 \pm 2.6) | | | |
| | 25 | 160 | 162 | 174 | 33 | 26 | 23 | 45 | 38 | 39 | 12 | 22 | 8 |
| | | (165 \pm 7.6) | | | (27 \pm 5.1) | | | (41 \pm 3.8) | | (14 \pm 7.2) | | | |
| | 50 | 166 | 168 | 146 | 24 | 15 | 20 | 42 | 41 | 39 | 11 | 10 | 9 |
| | | (160 \pm 12.2) | | | (20 \pm 4.5) | | | (41 \pm 1.5) | | (10 \pm 1.0) | | | |
| 100 | 120 | 146 | 118 | 17 | 26 | 12 | 29 | 30 | 38 | 14 | 15 | 18 | |
| | (128 \pm 15.6) | | | (18 \pm 7.1) | | | (32 \pm 4.9) | | (16 \pm 2.1) | | | | |
| 200 # | 117 | 114 | 122 | 11 | 16 | 11 | 19 | 14 | 17 | 8 | 12 | 4 | |
| | (118 \pm 4.0) | | | (13 \pm 2.9) | | | (17 \pm 2.5) | | (8 \pm 4.0) | | | | |
| 400 # | 82* | 95* | 80* | 15 | 9 | 10 | 9 | 5 | 7 | 2* | 9* | 14* | |
| | (86 \pm 8.1) | | | (11 \pm 3.2) | | | (7 \pm 2.0) | | (8 \pm 6.0) | | | | |
| 800 # | 45* | 47* | 46* | 9* | 8* | 5* | 3* | 3* | 4* | 0* | 0* | 0* | |
| | (46 \pm 1.0) | | | (7 \pm 2.1) | | | (3 \pm 0.6) | | (0 \pm 0.0) | | | | |
| Positive control | Chemical | AF2 | | | SA | | | AF2 | | 9AA | | | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | | | 0.5 | | | 0.1 | | 80 | | | |
| S9 mix (-) | Number of colonies/plate | 794 | 787 | 840 | 172 | 181 | 159 | 932 | 901 | 970 | 942 | 913 | 905 |
| | | (807 \pm 28.8) | | | (171 \pm 11.1) | | | (934 \pm 34.6) | | (920 \pm 19.5) | | | |
| Positive control | Chemical | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | 2AA | | | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 1 | | | 2 | | | 0.5 | | 2 | | | |
| S9 mix (+) | Number of colonies/plate | 1418 | 1526 | 1543 | 299 | 297 | 298 | 321 | 299 | 319 | 256 | 270 | 235 |
| | | (1496 \pm 67.8) | | | (298 \pm 1.0) | | | (313 \pm 12.2) | | (254 \pm 17.6) | | | |

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

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. #:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

**:Purity was above 98% and impurity was unknown.

ND:Not done.

Table 2-2. Mutagenicity of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)** in reverse mutation test (I) on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (µg/plate) | Number of revertants (number of colonies/plate, Mean ± S.D.) | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--|--|-------------------------------|--|--|--|
| | | Base-pair substitution type | | | | | |
| | | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | |
| S9mix (-) | 0 | | | 27 24 18 (23± 4.6) | | | |
| | 313 # | | | 16 25 17 (19± 4.9) | | | |
| | 625 # | | | 18 22 22 (21± 2.3) | | | |
| | 1250 # | | | 23 24 17 (21± 3.8) | | | |
| | 2500 # | | | 15 22 14 (17± 4.4) | | | |
| | 5000 # | | | 8 5 10 (8± 2.5) | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| S9mix (+) | 0 | | | 32 26 39 (32± 6.5) | | | |
| | 313 # | | | 27 33 19 (26± 7.0) | | | |
| | 625 # | | | 26 17 17 (20± 5.2) | | | |
| | 1250 # | | | 22 21 20 (21± 1.0) | | | |
| | 2500 # | | | 13 13 12 (13± 0.6) | | | |
| | 5000 # | | | 12 12 15 (13± 1.7) | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control | Chemical | | | AF2 | | | |
| | Dose (µg/plate) | | | 0.01 | | | |
| S9 mix (-) | Number of colonies/plate | | | 217 195 204 (205± 11.1) | | | |
| Positive control | Chemical | | | 2AA | | | |
| | Dose (µg/plate) | | | 10 | | | |
| S9 mix (+) | Number of colonies/plate | | | 1569 1540 1512 (1540±28.5) | | | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA: 2-Aminoanthracene

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

** : Purity was above 98% and impurity was unknown.

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.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子,
清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか,
中尾美津男, 飯田さやか
㈱食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Kumiko Kawakami, Yuri Shimizu,
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi,
Mitsuo Nakao, Sayaka Jida
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)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
4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.002 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理の(6時間)S9 mix存在下および非存在下においてはそれぞれ50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.02 mg/mlおよび0.0009 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)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。

CHL/IU細胞を24時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48時間連続処理したいずれの濃度群でも、染色体の構造異常は認められなかった。また、高濃度群(0.002 mg/ml)細胞毒性では、十分な細胞数が分析できなかったが、その他の濃度群においては倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や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、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)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12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、牛胎児血清(FCS: Biocell)を10%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

2×10⁴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℃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時間および48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 存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)(略号: TBBC, CAS No.:96-69-5, ロット番号: 40701, 住友化学工業(株)製造, (株)日本化学工業協会提供)は、白色結晶性粉末で、水に対しては不溶、アセトンおよびメタノールには可溶であり、融点160~165℃、分子式C₂₂H₃₀O₂S、分子量358.54、純度98%(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)では、7.81 μg/ml~50.0 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(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1%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/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%の増殖抑制濃度を明らかに超える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.002 mg/mlであった(Fig. 1)。一方、短時間処理のS9 mix 存在下および非存在下では、それぞれ0.02 mg/ml(Fig. 2)および0.0009 mg/mlであった(Fig. 1)。

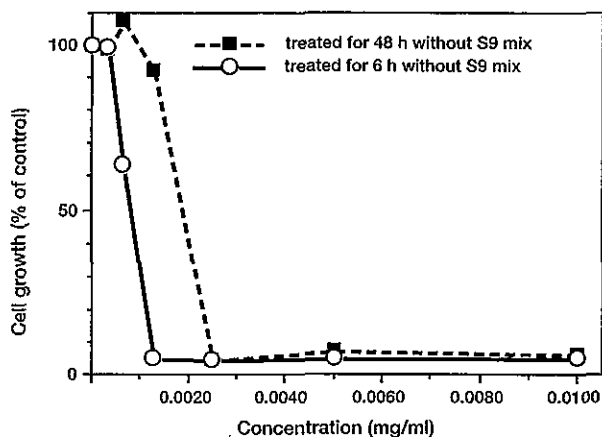


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) without S9 mix

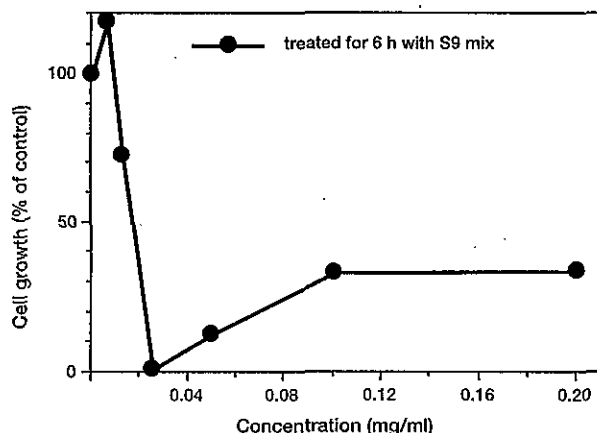


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) with S9 mix

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では0.002 mg/ml、短時間処理S9 mix存在下および非存在下では、それぞれ0.02 mg/mlおよび0.0009 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。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、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。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、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(MMS)分科会²⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyloid)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. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林²⁾の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、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⁴⁾($p < 0.05$)を行った。原則として以上2回の検定でもに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

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。4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を加えて24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は認められなかった。また、48時間連続処理したいずれの処理群においても染色体の構造異常は誘発されなかった。倍数性細胞の誘発作用に関して、高濃度群(0.002 mg/ml)では、細胞毒性のため倍数性細胞の誘発に関しては十分な細胞数が分析できなかったが、その他の処理群では倍数性細胞は誘発されなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を加えてS9 mix存在下および非存在下で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。

従って、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)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。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4,4'-thiobis (6-*tert*-butyl-*m*-cresol) (TBBC)* without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | Others ³⁾ | No. of cells with aberrations | | Polyploid ⁴⁾ (%) | Trend test ⁵⁾ | |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|-------------------------------|-----------|-----------------------------|--------------------------|----|
| | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | | TAG (%) | TA (%) | | SA | NA |
| Control | | | 200 | 0 | 1 | 0 | 6 | 0 | 0 | 7 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 0.13 | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.00 | | |
| TBBC | 0.00050 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.13 | | |
| TBBC | 0.0010 | 24 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.38 | NT | NT |
| TBBC | 0.0020 | 24 | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.00 | | |
| MC | 0.00005 | 24 | 200 | 0 | 16 | 58 | 0 | 0 | 0 | 74 | 1 | 62 (31.0) | 62 (31.0) | 0.13 | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.50 | | |
| TBBC | 0.00050 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.13 | | |
| TBBC | 0.0010 | 48 | 200 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 5 | 0 | 3 (1.5) | 2 (1.0) | 0.13 | NT | NT |
| TBBC | 0.0020 | 48 | 140 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 4 | 0 | 2 (1.4) | 2 (1.4) | 0.42 ^{6)T} | | |
| MC | 0.00005 | 48 | 200 | 3 | 31 | 67 | 3 | 6 | 20 | 130 | 5 | 70 (35.0) | 68 (34.0) | 0.13 | | |

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at p<0.05 when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. 6) Two hundred and thirty-eight cells were analysed. *: Purity was more than 98%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4,4'-thiobis (6-*tert*-butyl-*m*-cresol) (TBBC)* with and without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | S9 mix | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | Others ³⁾ | No. of cells with aberrations | | Polyploid ⁴⁾ (%) | Trend test ⁵⁾ | |
|-----------------------|-----------------------|--------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|-------------------------------|-----------|-----------------------------|--------------------------|----|
| | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | | TAG (%) | TA (%) | | SA | NA |
| Control | | | | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.13 | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.13 | | |
| TBBC | 0.00023 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.25 | | |
| TBBC | 0.00045 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.25 | NT | NT |
| TBBC | 0.00090 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.38 | | |
| CPA | 0.005 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.00 | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.00 | | |
| TBBC | 0.0050 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.25 | | |
| TBBC | 0.010 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.13 | NT | NT |
| TBBC | 0.020 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.00 | | |
| CPA | 0.005 | + | 6-(18) | 200 | 1 | 26 | 112 | 0 | 1 | 40 | 180 | 0 | 90 (45.0) | 89 (44.5) | 0.00 | | |

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at p<0.05 when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. *: Purity was more than 98%.

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.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, “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.
- 4) 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.

連絡先

試験責任者: 田中憲徳
試験担当者: 山影康次, 若栗 忍, 中川ゆづき,
日下部博一, 橋本恵子, 長尾哲二,
太田 亮
(財)食品薬品安全センター秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

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

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM
Technical Report Series
No. 435



TOXICOLOGY AND CARCINOGENESIS
STUDIES OF 4,4'-THIOBIS(6-*t*-BUTYL-*m*-CRESOL)
(CAS NO. 96-69-5)
IN F344/N RATS AND B6C3F₁ MICE
(FEED STUDIES)

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
Public Health Service
National Institutes of Health

FOREWORD

The National Toxicology Program (NTP) is made up of four charter agencies of the U.S. Department of Health and Human Services (DHHS): the National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health; the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), National Institutes of Health; the National Center for Toxicological Research (NCTR), Food and Drug Administration; and the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Centers for Disease Control. In July 1981, the Carcinogenesis Bioassay Testing Program, NCI, was transferred to the NIEHS. The NTP coordinates the relevant programs, staff, and resources from these Public Health Service agencies relating to basic and applied research and to biological assay development and validation.

The NTP develops, evaluates, and disseminates scientific information about potentially toxic and hazardous chemicals. This knowledge is used for protecting the health of the American people and for the primary prevention of disease.

The studies described in this Technical Report were performed under the direction of the NIEHS and were conducted in compliance with NTP laboratory health and safety requirements and must meet or exceed all applicable federal, state, and local health and safety regulations. Animal care and use were in accordance with the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Animals. The prechronic and chronic studies were conducted in compliance with Food and Drug Administration (FDA) Good Laboratory Practice Regulations, and all aspects of the chronic studies were subjected to retrospective quality assurance audits before being presented for public review.

These studies are designed and conducted to characterize and evaluate the toxicologic potential, including carcinogenic activity, of selected chemicals in laboratory animals (usually two species, rats and mice). Chemicals selected for NTP toxicology and carcinogenesis studies are chosen primarily on the bases of human exposure, level of production, and chemical structure. Selection *per se* is not an indicator of a chemical's carcinogenic potential.

These NTP Technical Reports are available for sale from the National Technical Information Service, U.S. Department of Commerce, 5285 Port Royal Road, Springfield, VA 22161 (703-487-4650). Single copies of this Technical Report are available without charge while supplies last from NTP Central Data Management, NIEHS, P.O. Box 12233, MD A0-01, Research Triangle Park, NC 27709 (919-541-1371).