

Reverse Mutation Test of 2-Hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、2-ヒドロキシ-4-(オクナルオキシ)ベンゾフェノンについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験の結果、いずれの菌株にも抗菌性が認められなかったことから、本試験では S9 mix 非共存下および共存下のいずれも、5000~313 μg /プレート の公比2で5濃度を設定した。

本試験を2回実施した結果、被験物質の各濃度において誘発された復帰突然変異コロニー数は、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上を示さなかった。従って、2-ヒドロキシ-4-(オクナルオキシ)ベンゾフェノンの変異原性は、陰性と結論した。

方法

〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B. N. Ames 教授より 1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および東京大学医科学研究所 松島教授より 1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用いた。各使用菌株は超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その20 μl をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, ロット番号: 067 54134, Unipath社) 25 g を 1 l の精製水に溶解して作成した液体完全培地 10 ml に接種し、37℃で8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

〔被験物質〕

2-ヒドロキシ-4-(オクナルオキシ)ベンゾフェノン (CAS No.: 1843-05-6, ロット番号: 40650, 純度: 99%以上; 住友化学工業(株)製造, 日本化学工業協会提供) は分子量 326.44, 融点 45~50℃ の淡黄(白)色粉末であり、水、熱、光等に安定である。また、*n*-ヘキサンおよびベンゼンに可溶で、水には不溶である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

2-ヒドロキシ-4-(オクナルオキシ)ベンゾフェノンはジメチルスルホキシド (DMSO, ロット番号: 603E2089,

純度: 99.7%, 関東化学(株)) を用いて最高濃度 (50 mg/ml) の溶液を調製した後、同溶媒で公比2で希釈したものを用いた。なお、本試験の1回目に調製した最高および最低濃度の溶液について濃度分析を実施し、いずれも所定濃度の 100 \pm 5% 以内であることを確認した。

〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (純度: 98.0%, 和光純薬工業(株))

NaN₃ : アジ化ナトリウム (純度: 96.5%, 和光純薬工業(株))

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (純度: 99.0%, Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン (純度: 99%, Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン (純度: 95.0%, 和光純薬工業(株))

NaN₃ は注射用水 (株) 大塚製薬工場) に、その他は DMSO に溶解したものを使用した。

〔培地および S9 mix の組成〕

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて D-ビオチン、L-ヒスチジンおよび L-トリプトファン の 0.5 mM 混合水溶液を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水 100 ml に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar; Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し、約 45℃ に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (日清製粉(株)) を購入し、使用した。なお、培地 1 l あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム七水塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	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
ブドウ糖	20 g
寒天 (OXOID Agar No.1)	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

S9 mix 1 mlあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

*: 購入したS9(キッコーマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

〔試験方法〕

試験はブレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mlを分注し、S9 mix 0.5 mlと菌懸濁液0.1 mlを加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪し、ブレインキュベーションを行った。S9 mixを共存させない場合には、S9 mixの代わりに0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mlを加えた。ブレインキュベーション後、トップアガー2 mlを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養し、復帰変異コロニー数を数えた。同時に実体顕微鏡を用いてバックグラウンドの菌の生育を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた。予備試験は各濃度あたり1枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり3枚のプレートを用い、2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

〔試験結果の判定基準〕

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

結果および考察

〔予備試験〕

5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 μ g/プレート
の濃度で実施したところ、S9 mix非共存下および共存

下のいずれについても、すべての菌株で抗菌性が認められなかった。従って、S9 mix非共存下および共存下のいずれについても本試験では5000, 2500, 1250, 625, 313 μ g/プレートの5濃度を設定した。

〔本試験〕

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施したところ、2回の本試験とも各テスト菌株の復帰変異コロニー数は、S9 mix非共存下および共存下のいずれにおいても、陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、抗菌性はS9 mixの有無によらずいずれの菌株も5000 μ g/プレートまで認められなかった。S9 mix非共存下および共存下の625 μ g/プレート以上の濃度で、沈殿物が認められた。

以上の結果から、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの変異原性は陰性と結論した。

参考文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, pp. 173-215 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, 38, pp. 3-32 (1976).

連絡先

試験責任者: 西富 保

試験担当者: 水野文夫, 榎本佳明, 石毛裕子,
藤代洋子, 村田久美, 鈴木美江

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Tamotsu Nishitomi (Study director)

Fumio Mizuno, Yoshiaki Enomoto,

Yuko Ishige, Yoko Fujishiro,

Kumi Murata, Yoshie Suzuki

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-02 Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test(I) of 2-hydroxy-4-(octyloxy) benzophenone on bacteria

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	85 81 (83) 82 (± 2)	9 11 (11) 12 (± 2)	32 17 (27) 32 (± 9)	16 20 (18) 17 (± 2)	4 7 (5) 4 (± 2)
	313	90 80 (80) 70 (± 10)	9 9 (9) 8 (± 1)	19 23 (23) 27 (± 4)	19 22 (17) 10 (± 6)	2 4 (5) 8 (± 3)
	625 C	67 88 (74) 67 (± 12)	8 8 (8) 7 (± 1)	28 31 (29) 29 (± 2)	17 17 (18) 19 (± 1)	10 7 (7) 5 (± 3)
	1250 C	87 82 (83) 79 (± 4)	9 12 (10) 10 (± 2)	18 31 (24) 23 (± 7)	24 17 (20) 18 (± 4)	4 5 (4) 4 (± 1)
	2500 C	82 81 (81) 80 (± 1)	10 12 (11) 10 (± 1)	34 24 (24) 14 (± 10)	19 18 (19) 20 (± 1)	5 4 (4) 3 (± 1)
	5000 C	91 72 (83) 87 (± 10)	5 4 (5) 5 (± 1)	22 32 (24) 19 (± 7)	14 14 (13) 12 (± 1)	4 2 (3) 4 (± 1)
S9 mix (+)	0	73 89 (86) 95 (± 11)	6 3 (6) 8 (± 3)	24 19 (23) 27 (± 4)	29 29 (29) 30 (± 1)	7 14 (10) 10 (± 4)
	313	85 87 (88) 92 (± 4)	6 9 (9) 11 (± 3)	26 29 (25) 20 (± 5)	23 30 (31) 39 (± 8)	7 9 (11) 18 (± 6)
	625 C	83 66 (68) 54 (± 15)	8 13 (10) 8 (± 3)	30 18 (22) 19 (± 7)	27 30 (29) 29 (± 2)	7 8 (8) 8 (± 1)
	1250 C	100 122 (99) 75 (± 24)	8 11 (10) 12 (± 2)	36 25 (29) 27 (± 6)	27 22 (27) 31 (± 5)	6 8 (8) 11 (± 3)
	2500 C	90 82 (84) 80 (± 5)	4 7 (7) 9 (± 3)	28 31 (29) 29 (± 2)	26 26 (27) 29 (± 2)	8 12 (10) 11 (± 2)
	5000 C	103 88 (86) 68 (± 18)	12 10 (11) 10 (± 1)	35 32 (30) 24 (± 6)	43 24 (32) 30 (± 10)	12 13 (13) 14 (± 1)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN_3	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of revertants	385 412 (410) 433 (± 24)	283 331 (314) 327 (± 27)	301 308 (335) 397 (± 54)	406 486 (454) 470 (± 42)	876 836 (851) 842 (± 22)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	559 625 (572) 532 (± 48)	356 284 (303) 269 (± 47)	897 897 (888) 869 (± 16)	312 355 (316) 280 (± 38)	159 152 (163) 177 (± 13)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN_3 : sodium azide

ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates.

(Mean)
(\pm S.D.)

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone on bacteria

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	80 91 (83) 79 (± 7)	6 6 (7) 8 (± 1)	18 24 (21) 21 (± 3)	12 18 (14) 13 (± 3)	9 9 (7) 4 (± 3)
	313	88 83 (81) 71 (± 9)	11 5 (9) 12 (± 4)	32 27 (29) 28 (± 3)	13 15 (14) 14 (± 1)	7 5 (5) 2 (± 3)
	625 C	76 81 (78) 76 (± 3)	4 7 (8) 12 (± 4)	26 20 (19) 12 (± 7)	10 15 (15) 20 (± 5)	3 6 (5) 6 (± 2)
	1250 C	94 97 (99) 107 (± 7)	9 11 (9) 6 (± 3)	24 25 (24) 22 (± 2)	19 18 (20) 22 (± 2)	8 7 (7) 6 (± 1)
	2500 C	98 93 (93) 87 (± 6)	10 11 (9) 6 (± 3)	33 35 (34) 34 (± 1)	21 21 (21) 20 (± 1)	6 7 (8) 10 (± 2)
	5000 C	87 80 (84) 84 (± 4)	12 5 (8) 7 (± 4)	26 23 (26) 29 (± 3)	21 20 (18) 13 (± 4)	7 7 (5) 2 (± 3)
S9 mix (+)	0	97 80 (90) 92 (± 9)	13 7 (10) 10 (± 3)	22 31 (25) 22 (± 5)	34 27 (30) 30 (± 4)	15 14 (12) 8 (± 4)
	313	88 94 (92) 95 (± 4)	7 11 (8) 5 (± 3)	30 30 (27) 22 (± 5)	29 28 (30) 32 (± 2)	14 14 (14) 13 (± 1)
	625 C	83 84 (78) 66 (± 10)	5 6 (6) 6 (± 1)	31 37 (32) 27 (± 5)	27 26 (29) 33 (± 4)	10 11 (13) 19 (± 5)
	1250 C	123 85 (103) 101 (± 19)	13 6 (10) 11 (± 4)	43 31 (35) 31 (± 7)	35 32 (32) 30 (± 3)	13 13 (12) 9 (± 2)
	2500 C	98 89 (99) 110 (± 11)	12 5 (9) 9 (± 4)	36 25 (30) 28 (± 6)	37 28 (31) 29 (± 5)	5 11 (9) 11 (± 3)
	5000 C	98 107 (100) 96 (± 6)	9 9 (9) 8 (± 1)	32 30 (29) 25 (± 4)	30 21 (31) 41 (± 10)	12 9 (10) 9 (± 2)
Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	472 434 (443) 424 (± 25)	280 315 (308) 329 (± 25)	592 674 (651) 688 (± 52)	410 420 (428) 453 (± 23)	714 779 (751) 760 (± 33)
Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	560 715 (606) 542 (± 95)	304 337 (318) 312 (± 17)	696 722 (692) 658 (± 32)	217 234 (224) 221 (± 9)	111 131 (131) 150 (± 20)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide

ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates.

(Mean)
(\pm S.D.)

In Vitro Chromosomal Aberration Test of
2-Hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン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, 以下CHLと略す)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行ったところ、連続処理法の24時間処理および短時間処理法のいずれの処理濃度群(0.156~5.00 mg/ml)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。連続処理法の48時間処理では0.156~1.25 mg/mlの細胞増殖率はいずれも50%程度であり顕著な差が認められなかった。従って染色体異常試験において、連続処理法および短時間処理法では5.00 mg/mlを高濃度とし、それぞれその1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度に設定した。48時間処理では、さらに最低の細胞生存率を示した0.625 mg/ml(高濃度の1/8の濃度)を加えた4濃度を設定した。

CHL細胞を被験物質で24時間および48時間連続処理した結果、すべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下においても、すべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1994年8月, 入手時: 継代14代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代5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: GIBCO LABORATORIES, ロット番号: 43N1140)を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴個のCHL細胞を、培養液5mlを入れたディッシュ(径6cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37℃のCO₂インキュベーター(5%CO₂)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mixの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

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン(CAS No.: 1843-05-6, ロット番号: 40650, 純度: 99%以上, 住友化学工業(株)製造, 日本化学工業協会提供)は、分子量326.44, 融点45~50℃の淡黄(白)色粉末であり、水、熱、光に安定である。また、*n*-ヘキサンおよびベンゼンに可溶で、水には不溶である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はアセトン(和光純薬工業(株), ロット番号: KCF1401)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1.0(v/v)%になるように加えた。染色体異常試験に用いた最高および最低濃度の被験物質調製液について濃度分析を実施し、いずれも所定濃度の100±5%以内であることを確認した。

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細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の生存細胞を数え、陰性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、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、連続処理法の48時間処理では0.404 mg/mlであったが、この値の前後の濃度の細胞生存率は50%前後で差が認められなかった。一方、連続処理法の24時間処理と短時間処理法ではいずれの処理濃度群(0.156~5.00 mg/ml)においても50%を超える増殖抑制は認められなかった(Fig. 1)。

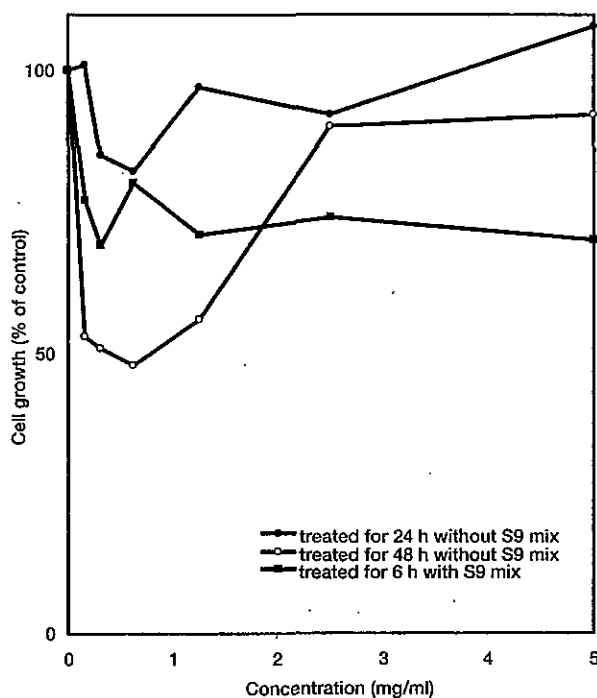


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone

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法および短時間処理法では5.00 mg/mlを高濃度とし、それぞれその1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。48時間処理では、さらに最低の細胞生存率を示した0.625 mg/ml(高濃度の1/8の濃度)を加えた4濃度を設定した。

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 $\mu\text{g/ml}$ 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。スライド標本は各シャーレにつき2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のシャーレから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)¹⁾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、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、

石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンを加えて24時間および48時間処理した各濃度群で、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群で、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

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，1988.
- 2) 石館 基 監修，“改訂染色体異常試験データ集”，エル・アイ・シー社，1987.

連絡先

試験責任者：西富 保

試験担当者：水野文夫，太田絵律奈，中川宗洋，
岩井由美子，鈴木美江

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Tamotsu Nishitomi (Study director)
Fumio Mizuno, Erina Ohta, Munehiro
Nakagawa, Yumiko Iwai, Yoshie Suzuki
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-02 Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
HOBP	1.25	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	2.50	24	200	0	1	0	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
	5.00	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	MC	0.00003	24	200	2	35	17	1	0	0	55	48 (24.0)	49 (24.5)	0.0	+
Solvent	0	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.5	-	-
HOBP	0.625	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	1.25	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	2.50	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	5.00	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.5	-	-
MC	0.00003	48	200	2	34	23	7	1	0	67	57 (28.5)	59 (29.5)	0.0	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), -g : total no. cells with aberrations except gap, +g : total no. of cells with aberrations, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, HOBP : 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone, MC : mitomycin C

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
HOBP	1.25	-	6-(18)	200	0	0	0	2	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
	2.50	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	5.00	-	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
BP	0.020	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
HOBP	1.25	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	2.50	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	5.00	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
BP	0.020	+	6-(18)	200	2	25	140	3	0	0	170	142 (71.0)	144 (72.0)	0.0	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), -g : total no. cells with aberrations except gap, +g : total no. of cells with aberrations, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, HOBP : 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone, BP : benzo[a]pyrene

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

ノニルフェノールのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Nonylphenol in Rats

要約

既存化学物質の毒性評価の一環として、ノニルフェノールの0(オリーブ油)、4、15、60および250 mg/kgをSDラットに28日間強制経口投与し、その毒性を検討した。0、60および250 mg/kgについては、別に14日間の回復群を設けた。

流涎および体重増加抑制が250 mg/kg群の雌雄にみられた。

尿検査では、尿量の増加と比重の低下が250 mg/kg群の雌雄に、摂水量の増加、沈渣中への扁平上皮細胞の増加と小円形上皮細胞の出現が250 mg/kg群の雌に、血液学検査では、ヘモグロビンとヘマトクリット値の減少が250 mg/kg群の雌に、血液生化学検査では、尿素窒素および無機リンの増加と塩素の減少が250 mg/kg群の雄に、総蛋白およびトリグリセライドの増加が250 mg/kg群の雌にみられた。

病理学検査では、肝臓、腎臓、膀胱および盲腸に変化がみられた。肝臓では、重量増加が60 mg/kg群の雄と250 mg/kg群の雌雄にみられ、組織学的には小葉中心帯肝細胞の肥大が250 mg/kg群の雌雄にみられた。腎臓では、250 mg/kg群で重量増加が雄に、肉眼的に白色点散在、腫大および腎盂拡張が雌にみられ、組織学的には、皮髄境界部において近位尿管の好塩基性化が雌雄に、同部近位尿管の単細胞性壊死、間質の細胞浸潤および円柱が雌に、集合管の好塩基性化と拡張が雌雄に、腎盂粘膜の単純性過形成と腎盂拡張が雌にみられた。膀胱では、移行上皮の単純性過形成が250 mg/kg群の雌雄にみられた。盲腸では、肉眼的な拡張が250 mg/kg群の雌雄にみられたが、組織学的変化は認められなかった。

回復群においては、腎臓および膀胱を除く変化は消失した。腎臓および膀胱の変化は投与終了時と比べ軽減していたことから、いずれの変化も可逆性のものと考えられた。

以上の結果から、本試験条件下におけるノニルフェノールの無影響量は雄で15 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと考えられた。

方法

1. 被験物質および被験液の調製

被験物質ノニルフェノールは、分子量220.36、融点2℃、沸点295℃、比重0.95、刺激臭のある無色～黄色

の粘稠な液体で水に溶けにくい。本試験にはロット番号F1132(三井東圧(株)製)、純度99.0%のものを用いた。なお、投与終了後の残余被験物質について分析を行った結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

投与容量が2.5 ml/kg体重となるよう、オリーブ油(日本薬局方)に溶解して最高用量群の投与液(10%(w/v))を調製した。高、中および低用量群の投与液は、10%液をオリーブ油で段階的に希釈してそれぞれ2.4、0.6および0.16%(w/v)液とした。0.05～10%(w/v)液は、室温で1日間および冷蔵(約4℃)・暗所(褐色ガラス瓶)・窒素置換で8日間まで安定であったことから、被験液は最大1週間分を一括して調製し、1日分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、窒素置換した上で、冷蔵庫(約4℃)に保存した。また、投与開始前および投与終了週の2回、投与に使用する各濃度液について当施設で濃度を測定した結果、いずれも適正であった。

2. 使用動物および飼育条件

5週齢のCrj:CD(SD)系SPF雌雄ラットを日本チャールス・リバー(株)から購入し、当所で約1週間検疫・馴化飼育した後、体重増加が順調で一般状態に異常を認めなかった雌雄各48匹を選び、6週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で199～234 g(平均値:217.0 g)、雌で146～175 g(平均値:161.9 g)であった。

動物は、群分け当日の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重がほぼ均等となるよう、コンピュータを用いて各群に割り付けた。

動物は、温度23±3℃、相対湿度50±20%、換気回数1時間当たり11～13回、照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(放射線滅菌CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))および飲料水(水道水)を自由に摂取させ飼育した。

3. 投与量および投与方法

2週間投与による予備試験(投与量:0、5、60、250および1000 mg/kg)の結果、1000 mg/kg群で全例が死亡し、250 mg/kg群では尿素窒素および総コレステロールの増加、盲腸の拡張などがみられた。60 mg/kg以下の投与群では肝臓あるいは副腎重量の増加がみられた。これらの成績から、本試験では250、60、15および4 mg/kgの4用量を設定し、これに对照群を加えて計5群を使用した。さらに、对照群、60および250 mg/kg群では14日間の回復群を設けた。動物数はいずれの群も雌雄各6匹とした。

被験者の投与量は2.5 ml/kg体重とし、金属製目ノ
ンデを用いて1日1回28日間強制経口投与した。対照群
には溶媒(オリーブ油)を同様に投与した。

4. 検査項目

1) 一般状態の観察

投与期間中は毎日2回以上、回復期間中は毎日1回観
察した。

2) 体重

投与期間および回復期間を通じ、週2回の頻度で体重
を測定した。

3) 摂餌量測定

投与期間および回復期間を通じ、週2回の頻度で摂餌
量を測定した。

4) 血液学検査

投与期間および回復期間終了の翌日の剖検時に検査を
行った。前日から一夜(約16時間)絶食させた動物をエ
ーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から抗凝固剤(EDTA-
2K)を加えた採血ビンに血液を採取し、赤血球数(電気
抵抗変化検出法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグ
ロビン法)、ヘマトクリット値(平均赤血球容積および
赤血球数から算出)、平均赤血球容積(電気抵抗変化検
出法)、平均赤血球血色素量(ヘモグロビン量および赤
血球数から算出)、平均赤血球血色素濃度(ヘモグロビ
ン量およびヘマトクリット値から算出)、血小板数(電
気抵抗変化検出法)、白血球数(電気抵抗変化検出法)
(以上コールター全自動8項目血球アナライザー
T890、(株)日科機)、網赤血球率(Brecher法)および白血
球百分率(May-Giemsa鏡検法)を測定した。また、3.8%
クエン酸ナトリウムを加えた容器に採取した血液を遠心
分離(3000 rpm, 10分間)し、得られた血漿を用いてプ
ロトロンピン時間および活性化部分トロンボプラスチン
時間(以上クロット法、血液凝固自動測定装置、ACL-
100, Instrumentation Laboratory)を測定した。

5) 血液生化学検査

血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採血
し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血清
を用いてAIP(Bessey-Lowry法)、総コレステロール
(CEH-COD-POD法)、トリグリセライド(GK-GPO-POD
法)、リン脂質(PLD-ChOD-POD法)、総ビリルビン(ア
ゾビリルビン法)、血糖(Hexokinase-G6PD法)、尿素窒
素(Urease-GLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、ナトリ
ウム、カリウムおよび塩素(イオン選択電極法)、カル
シウム(OCPC法)、無機リン(モリブデン酸法)、総蛋白
質(Biuret法)、アルブミン(BCG法)およびA/G比(総蛋
白質およびアルブミンから算出)を測定した。また、ヘ
パリンを加えた容器に採血し、遠心分離(3000 rpm, 10
分間)により得られた血漿を用いてGOT, GPT,
LDH(UV-rate法)、 γ -GTP(γ -グルタミル-3-カルボキシ-

4-アミノ-2-オキソ-5-リン酸)およびCHC(DIND法)により
れも自動分析装置 Monarch, Instrumentation
Laboratory)を測定した。

6) 尿検査

投与終了時剖検動物は投与第4週(検査当日の投与後)
に、回復群の動物は回復第2週に検査を行った。検査動
物を代謝ケージに個別に収容し、絶食・自由摂水下で4
時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20
時間尿を採取した。採取した最初の4時間尿を用いて
pH、蛋白質、ケトン体、ブドウ糖、潜血、ビリルビン、
ウロビリノーゲン(以上URIFLET7A試験紙、(株)京都第
一科学)、色調(肉眼観察)および沈渣(鏡検)を検査した。
また、その後に得られた20時間尿を用いて比重(屈折法、
アタゴ屈折計、(株)アタゴ)を測定し、4時間尿量および
20時間尿量から1日の尿量を算出した。さらに、代謝ケ
ージに収容した状態で、前日からの1日の摂水量を給水
瓶を用いて測定した。

7) 剖検および器官重量

上記血液学検査および血液生化学検査のための採血後
に放血致死させ、外表異常の有無を観察した後、頭部、
胸部および腹部を含む全身の器官・組織について肉眼的
に異常の有無を観察した。続いて、以下に示す器官を摘
出後、器官重量(絶対重量)を測定した。また、絶食後
の体重および絶対重量から体重100 g当たりの相対重量
を算出した。

脳、胸腺、心臓、肺(気管支を含む)、肝臓、脾臓、
腎臓、副腎、精巣、卵巣

8) 病理組織学検査

全動物について以下に示す全器官・組織を採取し、リ
ン酸緩衝10%ホルマリン液(但し、眼球およびハーダー
腺は3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液)で固
定した。さらに*印を施した器官・組織についてパラフ
インに包埋した。投与終了時剖検動物では、このうち対
照群と最高用量群は包埋した全ての器官・組織につい
て、また、高、中および低用量群は被験物質投与によ
ると考えられる変化のみられた肝臓、腎臓および膀胱につ
いてそれぞれ切片とし、ヘマトキシリン・エオジン
(H.E.)染色を施して鏡検した。回復群では、被験物質投
与による変化が疑われた上記の肝臓、腎臓および膀胱の
うち腎臓と膀胱は全動物について、肝臓については対照
群と最高用量群の動物を検査した。また、肉眼的異常部
位については用量に関係なく鏡検した。

脳*、脊髄*、坐骨神経*、胸大動脈、心臓*、気管*、
肺(気管支を含む)*、舌、食道、胃*、十二指腸*、空腸*、
回腸*、盲腸*、結腸*、直腸*、唾液腺(顎下腺・舌下
腺)、肝臓*、脾臓*、下垂体*、甲状腺(上皮小体を含
む)*、副腎*、胸腺*、脾臓*、腸間膜リンパ節*、頸部
リンパ節*、腎臓*、膀胱*、精巣*、精巣上体*、精囊、
前立腺*、卵巣*、子宮*、陰*、乳腺、皮膚、眼球*、ハ
ーダー腺、骨及び骨髄(胸骨・大腿骨)*、大腿筋、肉眼

的異常部位*

5. 統計解析

各検査項目のうち、数値化した成績についてまず Bartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合には一元配置法による分散分析を行い、群間に有意差が認められたならば、Dunnett法(各群の例数が等しいとき)または Scheffé法(各群の例数が異なるとき)を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が均一でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であれば Dunnett型(各群の例数が等しいとき)または Scheffé型(各群の例数が異なるとき)を用いて対照群と各投与群との平均順位の差の検定を行った。検定はいずれも両側で、有意水準は5および1%とした。

試験結果

1. 一般状態

雄では、流涎が投与13日から投与期間終了まで250 mg/kg群の1~4例で投与直後または投与2時間後にみられた。

雌では、流涎が投与14日から21日まで250 mg/kg群の1~2例で投与直後にみられた。回復期間中にはいずれの動物にも異常はみられなかった。

2. 体重(Fig.1)

1) 投与期間

雄では、250 mg/kg群の体重は投与15日頃から対照群をやや下回って推移し、投与期間中の体重増加量は有意に低かった。雌では、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

2) 回復期間

雄では、250 mg/kg群の体重は回復10日まで対照群を有意に下回って推移したが、回復期間中の体重増加量は対照群とほぼ同等であった。雌では、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。なお、60 mg/kg群の回復期間中の体重増加量は有意な低値を示したが、用量に関連した変化ではなかった。

3. 摂餌量

1) 投与期間

雌雄ともに、各投与群の摂餌量は対照群と同様に推移した。なお、60 mg/kg群の雌で投与1日(投与開始前日から投与開始直前までの値)に有意な低値を示したが、投与前であり偶発的な変動であった。

2) 回復期間

雄では、60 mg/kg群の摂餌量は回復期間を通じて対照群を有意に上回ったが、用量に関連した変化ではなかった。雌では、各投与群の摂餌量は対照群と同様に推移した。

4. 血液学検査(Table 1)

1) 投与終了時

雄では、被験物質投与による変化はみられなかった。雌では、250 mg/kg群でヘモグロビン量およびヘマトクリット値の有意な減少がみられた。

2) 回復終了時

雄では、桿状核好中球比率の有意な増加が60 mg/kg群にみられたが、用量に関連した変化ではなかった。雌では、各投与群ともに対照群との間に有意差はみられなかった。

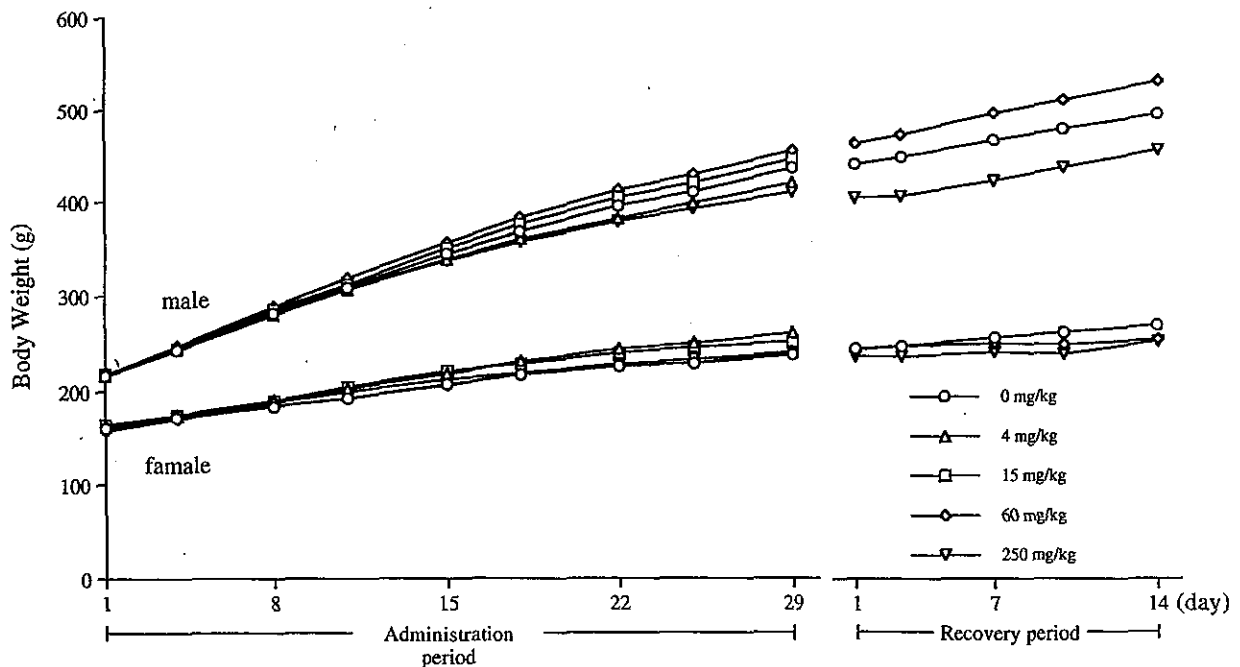


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with nonylphenol in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test