

既存化学物質の人健康影響に関する情報(第二種監視化学物質審議関係)

(平成20年12月19日開催)

CAS No.	官報公示 整理番号	物質名称	単回	28日間	Reprotox	簡易生殖	Ames	染色体	小核	評価文書	頁
140-66-9	3-503	<i>p-tert</i> -オクチルフェノール		○			○	○			1

p-tert-オクチルフェノールのラットを用いた28日間反復投与毒性試験

28-Day Repeated Dose Toxicity Test of p-tert-Octylphenol in Rats

要約

p-tert-オクチルフェノールをSD系ラット (Crj:CD) の雌雄に15、70および300mg/kgの用量で28日間反復投与し、その毒性学的意義について検討した。対照群および高用量群については14日間の回復期間を設けた。

なお、本試験は化審法ガイドライン (1986年) に従って実施した。また化審法GLP (1984年) を満足している。

300mg/kg群において、雌雄ともに流涎、飲水量の増加、血清ナトリウムの増加、尿量の増加および尿比重の低下、尿中電解質の変化、腎臓の重量増加および灰白色斑が認められた。病理組織学的検査で腎臓の尿細管上皮に再生性変化が認められた。その他、雄で体重増加抑制および血清アルブミンの減少、雌で血中総コレステロールの減少、A/G比の低下、尿素窒素の増加、トリグリセライドの増加および肝重量の軽度の増加が認められた。

70 mg/kg群でも流涎が雌雄で、A/G比の低下が雌で認められた。

これら被験物質投与に起因する変化は投与休止により消失あるいは回復傾向を示した。

以上の結果より、本試験条件下におけるp-tert-オクチルフェノールの無影響量は雌雄とも15 mg/kgと考えられる。

緒言

p-tert-オクチルフェノールは、エチルセルロースの安定剤、酸化防止剤、界面活性剤および油性フェノール樹脂の製造などに利用されている。毒性に関する情報として、ヒトおよび実験動物で皮膚の白斑症を起こすといわれる。また、試験管内での実験でもチロシナーゼのクレゾラーゼ活性阻害、メラニン合成阻害を示すといわれる。ラットでの経口投与によるLD₅₀値は2160 mg/kgとの報告がある。

今回、ラットを用いてp-tert-オクチルフェノールの経口投与による28日間反復投与毒性試験を実施し、生体への毒性学的影響について検討したので報告する。

方法

1. 被験物質

日本化学工業協会より提供されたp-tert-オクチルフェノール (大日本インキ化学工業株式会社, Lot No. C162, 純度: 98.24%) を使用した。被験物質は白色の固体である。なお、本ラットについては投与開始前および投与終

了後に被験物質供給者が分析し、安定であることを確認した。

2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社より1991年10月16日に入手したSD系 (Crj:CD) ラット (SPF) を使用した。

動物入荷後5日間馴化し、健康状態が良好なことを確認した後、5週齢で投与を開始した。

投与開始前に動物を体重別層化無作為抽出法により群分けした後、イヤバッチを用いて群および個体を識別した。投与開始時の体重範囲は、雄が128~148g、雌が118~146gであった。

3. 動物飼育

1) 飼育管理

馴化・検査期間を含めた全飼育期間中、温度20~25℃、湿度40~70%R.H.、換気約12回/時、照明12時間 (7:00~19:00) に自動調節された飼育室を使用した。

実験動物用床敷 (ベータチップ: 日本チャールス・リバー株式会社) を敷いたポリカーボネート製ケージ (265W×426D×200Hmm) に1ケージ当り2匹 (同性) で収容し、スチール製架台上で飼育した。ステンレス製の固型飼料用給餌器およびポリカーボネート製の給水瓶 (700 ml) を用いた。

ケージ (含床敷)、給餌器および給水瓶は、週1回の頻度でオートクレーブ滅菌したものと交換した。

2) 飼料

実験動物用固型飼料 (MF: オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。飼料は週1回の頻度で交換した。残留農薬等汚染物質の分析値が当社のSOPで定めた濃度以下であることが保証された飼料を使用した。

3) 飲水

5μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由摂取させた。飲水は週1回の頻度で交換した。なお、水道法に準拠した水質検査を定期的に行い、厚生省令56の別表に定める基準の範囲内であることを確認した。

28日間反復投与毒性試験

4. 投与

1) 投与用量および設定理由

被験物質を100、300、500および1000 mg/kgの用量でSD系ラットに7日間反復経口投与した結果、500 mg/kg以上で体重増加抑制および死亡が認められた。また、300 mg/kgでは流涎が認められた。この結果を基に、高用量を300 mg/kgとし、以下中用量を70 mg/kg、低用量を15 mg/kgとした。この他に溶媒（オリーブ油）のみを投与する対照群を設けた。

2) 投与期間

28日間、毎日1回、午前中に投与した。

3) 投与方法

胃ゾンデを装着した注射筒を用いて強制経口投与した。投与量は5 ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

5. 投与液の調製

乳鉢を用いて被験物質とオリーブ油（日本薬局方）を混和し40℃以下で加湯溶解させ、所定の濃度に調製した。投与液の調製は10日以内に1度実施し、投与直前まで冷暗所で保存した。

投与液の安定性については本研究所において分析し、冷暗所保存下で調製後14日間は安定であることを確認した。

6. 回復期間

投与終了後、対照群および高用量群に14日間の回復期間を設けた。

7. 群構成

群名	用量 (mg/kg)	動物数 (匹)			
		28日後解剖 ^{a)}		回復後解剖 ^{b)}	
		雄	雌	雄	雌
対照群	0	6	6	6	6
低用量群	15	6	6		
中用量群	70	6	6		
高用量群	300	6	6	6	6

a) 最終投与日の翌日に解剖した。

b) 14日間の回復期間終了後に解剖した。

8. 観察および検査方法

1) 一般状態観察

全例について生死および外観・行動等について毎日観察した。更に、毎週1回、触診を含む詳しい観察を行った。

2) 体重

全例について投与開始日（投与0日）およびその後毎週1回測定した。測定には電子上皿天秤（EB-5000：株式会社島津製作所）を使用した。

3) 摂餌量

全ケージについて投与開始日およびその後毎週1回風袋込み重量を測定し、各期間毎の1匹あたりの1日の平均摂餌量を算出した。測定には前記天秤を使用した。

4) 飲水量

投与初期の観察から高用量群で飲水量の増加傾向がみられたため、全ケージについて投与開始後1週以降、毎週1回風袋込み重量を測定し、各期間毎の1匹あたりの1日の平均飲水量を算出した。測定には前記天秤を使用した。

5) 血液学的検査

各計画殺時の生存動物について、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液：ダイナポット株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し、以下の項目について検査した。凝固阻止剤として、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間測定用には3.13%クエン酸ナトリウム水溶液を、それ以外の項目の測定にはEDTA-2Kを用いた。なお、採血に際し絶食は行わなかった。

a) 赤血球数	レーザー光散乱法
b) 白血球数	同上
c) 血小板数	同上
d) ヘモグロビン濃度	シアンメトヘモグロビン法
e) ヘマトクリット値	マイクロヘマトクリット法
f) 白血球百分率	ライト染色塗抹標本について測定
g) 網状赤血球数	ニューメチレンブルー染色後ライト染色した塗抹標本について測定
h) プロトロンビン時間 (PT)	Quick一段法
i) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	活性化セファロプラスチン法
j) 平均赤血球容積 (MCV)	a)、e)より算出
k) 平均赤血球血色素量 (MCH)	a)、d)より算出
l) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	d)、e)より算出

a)~d)は自動血液分析装置（ELT-8/ds：オルソインスツルメンツ社）、e)はヘマトクリット用遠心機（MC-201：株式会社日立製作所）、f)、g)は血液細胞自動分析装置（MICROX HEG-70A：立石電機株式会社）、h)、i)は血液凝固計（KC-10：アメルング社）により測定した。

6) 血液生化学的検査

血液学的検査に用いた残りの血液を室温で約30分間放置した後、3,000r.p.m.で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて以下の項目を自動分析装置（日立736-10形：株式会社日立製作所）により測定した。

a) 総蛋白	Biuret法
b) アルブミン	BCG法
c) A/G比	a)およびb)より算出
d) グルコース	酵素-UV法 (GK-G6PDH法)
e) トリグリセライド	酵素法 (LPL-GK-G3PO-POD法)
f) 総コレステロール	酵素法 (CES-CO-POD法)
g) 尿素窒素	酵素-UV法 (Urease-GLDH法)
h) クレアチニン	Jaffe法
i) カルシウム	O-CPC法
j) 無機リン	UV法
k) GOT (AST)	UV-Rate法 (SSCC改良法)
l) GPT (ALT)	UV-Rate法 (SSCC改良法)
m) γ -GTP	γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (SSCC改良法)
n) ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (SSCC改良法)

- o) ナトリウム イオン選択電極法
p) カリウム イオン選択電極法
q) クロライド イオン選択電極法

7) 尿検査

投与期間終了前に生存動物の新鮮尿を採取し、以下のa)～g)の項目について検査した。飲水量の変化から尿量の増加が推察されたため、尿沈渣および16時間尿のi)～m)の項目について検査した。ただし尿沈渣については雄は各群6例ずつ、雌は対照群と高用量群6例ずつ検査した。また回復期間終了前にも、投与期間終了前の検査で異常がみられなかった尿沈渣を除き同様の検査を実施した。

- | | |
|-------------|---|
| a) pH | } 試験紙法 (N-マルチスティックス
SG: マイルス・三共株式会社) |
| b) 潜血 | |
| c) 蛋白 | |
| d) 糖 | |
| e) ケトン体 | |
| f) ビリルビン | |
| g) ウロビリノーゲン | |
| h) 尿沈渣 | 鏡検法 (Sternheimer-Malbin染色) |
| i) 尿量 | メスシリンダーにて測定 |
| j) ナトリウム | 炎光光度法 |
| k) カリウム | 炎光光度法 |
| l) クロライド | 電量滴定法 |
| m) 比重 | 屈折法 |

a)～g)は尿分析器 (クリニテック10: 株式会社マイルス・三共)、j)、k)は全自動炎光光度計 (FLAME30-C/AD-3型: 日本分光メディカル)、l)はクロライドメーター (Model 925: コーニングメディカル株式会社)、m)は尿比重計 (ユリコン-S: 株式会社アタゴ) により測定した。

8) 病理学的検査

(1) 病理解剖学的検査

各計画殺時の生存動物について採血後に腹大動脈を切断して放血し、致死さ剖検を行った。

(2) 器官重量

各計画殺時の全生存動物について以下の器官の重量を測定した。測定には電子上皿天秤 (ED-H60: 株式会社島津製作所) を用いた。更に、解剖日の体重を基に対体重比についても算出した。

脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣または卵巣

(3) 病理組織学的検査

全動物について以下の器官を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液にて固定後保存した。ただし、眼球およびハーダー腺はDavidsonの溶液にて固定した。

脳、下垂体、眼球 (付属腺を含む)、肺、胃、甲状腺 (上皮小体を含む)、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣または卵巣、骨髄 (大腿骨)

採取した器官のうち、28日後解剖動物の対照および高用量群の心臓、肝臓、腎臓、副腎および脾臓を対象に、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し鏡検した。この結果、腎臓で被験物質の影響が認められたため、低、中用量群および回復後解剖動物についても検査した。また剖検時に肉眼的変化の認められた器官についても同様に処理して鏡検した。

9. 統計学的解析

計量的データについては、Bartlett法による等分散の検定を行い、分散が一樣の場合は一元配置分散分析を、一樣でない場合はKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合で各群の例数が一定の場合はDunnettの方法、不定ならばScheffeの方法により平均値あるいは順位多重比較検定を行った。尿の定性検査および尿沈渣については、Armitageの χ^2 検定を用いた。

結果

1. 死亡動物

雌雄とも死亡は認められなかった。

2. 一般状態

雌雄とも、流涎が70 mg/kg群の少数例、300 mg/kg群の全例に認められた。一部には投与直前から流涎するものもあり、300 mg/kg群の雄2例には回復期間でも観察された。また、投与開始後1週に300 mg/kg群の雄1例に自発運動量の減少がみられた。

3. 体重 (Fig.1)

300 mg/kg群の雄で体重増加抑制が認められた。回復期間では回復傾向がみられた。

4. 摂餌量

300 mg/kg群の雄で回復後1週に高値がみられたが、その他は各被験物質投与群とも対照群と同様な推移を示した。

5. 飲水量 (Fig.2,3)

300 mg/kg群の雌雄とも増加が認められた。しかし回復期間には回復する傾向を示した。

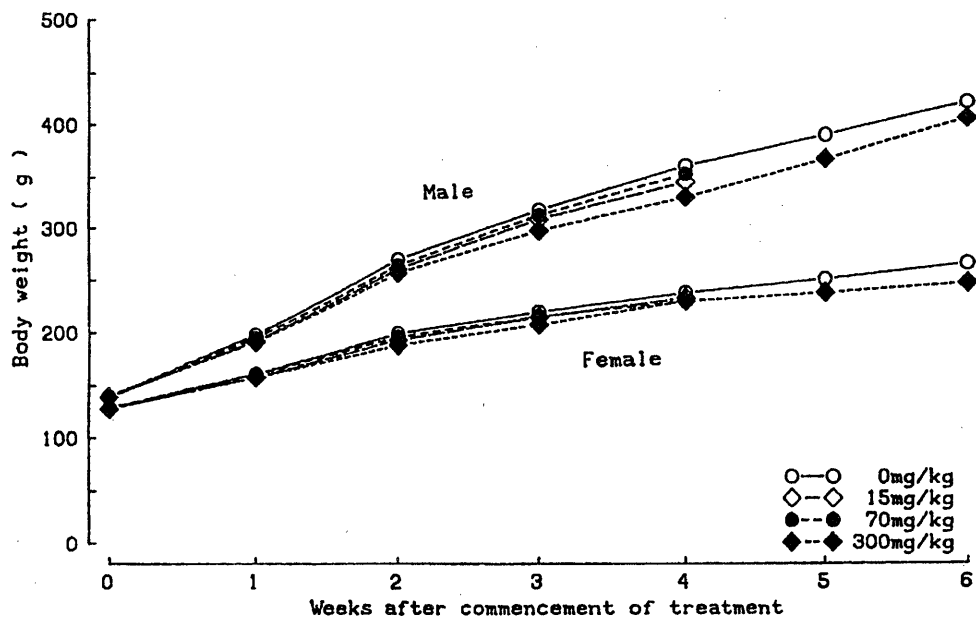


Fig.1 Body weight change of rats treated with *p-tert-Octylphenol*

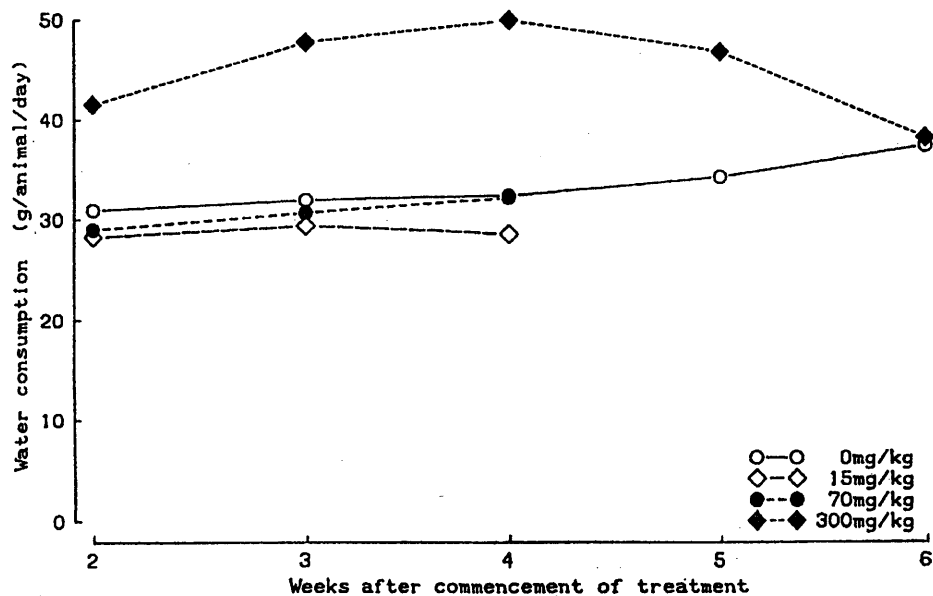


Fig.2 Water consumption change of male rats treated with *p-tert-Octylphenol*

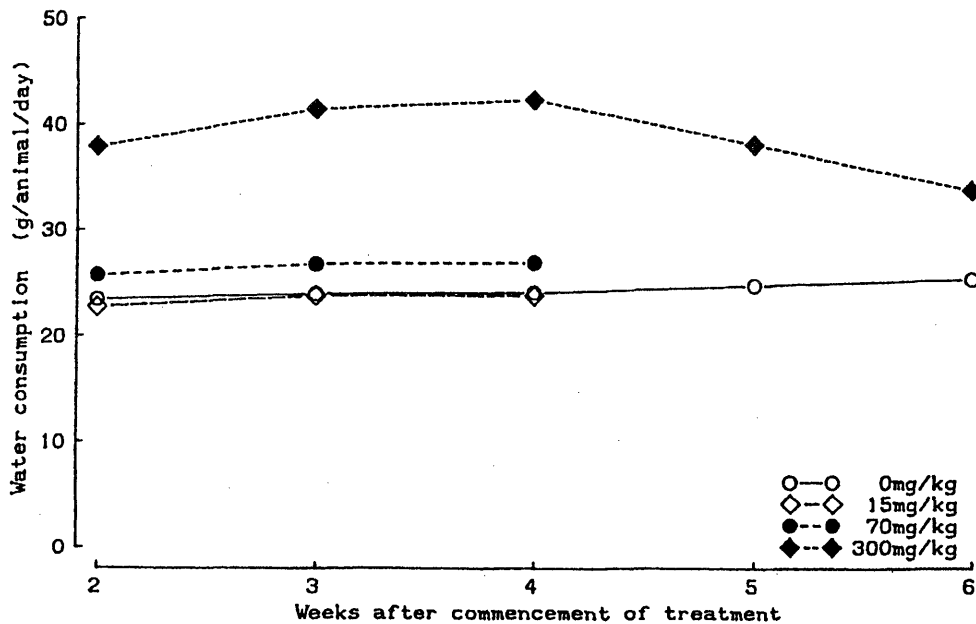


Fig. 3 Water consumption change of female rats treated with p-tert-Octylphenol

6. 血液学的検査 (Table 1)

赤血球指数、ヘマトクリット値および白血球百分率で有意な変化がみられたが、用量依存性がないか、あるいは生理的変動範囲内の変化であったことから、被験物質投与とは関連のない偶発的変化と判断した。

7. 血液生化学的検査 (Table 2)

投与終了時の検査では、300 mg/kg群において血中ナトリウムの増加が雌雄に、総コレステロールの減少、トリグリセライドおよび尿素窒素の増加が雌に、アルブミンの減少が雄に認められた。またA/G比の低下が70および300 mg/kg群の雌に認められた。

その他、総蛋白およびアルブミンの増加が15 mg/kg群の雌に、GPTの低下が70 mg/kg群の雌にみられたが、これらはいずれも用量依存性のない変化であるため、偶発的変化と判断した。

回復期間終了時の検査では、300 mg/kg群の雄に血中カリウムの減少がみられたが、生理的変動範囲内の変化であるため被験物質投与とは関連のない偶発的変化と判断した。

8. 尿検査 (Table 3)

投与終了前の検査では、300 mg/kg群において尿量の増加および尿比重の低下が雌雄ともに認められた。また、尿中ナトリウムおよびクロライドの減少が雌雄で、カリウムの減少が雄で認められた。

ケトン体の減少が300 mg/kg群の雌雄に、尿蛋白の減少が雌に、また、尿沈渣でリン酸アンモニウムマグネシウムの減少が15および300 mg/kg群の雄に、赤血球数の減少が300 mg/kg群の雄でみられたが、これらは尿量増加により希釈されたために得られた二次的変化と考えられる。その他、カリウムおよびクロライドの減少が15 mg/kg群の雄に、またpHの低下が70 mg/kg群の雌にみられたが、用量依存性がなく偶発的なものと考えられる。

回復期間終了前での検査では異常は認められなかった。

9. 器官重量 (Table 4)

投与終了時の検査では、300 mg/kg群の雌雄の腎臓および雌の肝臓重量に増加の傾向がみられ、対体重比では有意差が認められた。

その他、300 mg/kg群の雄で脳および精巣の対体重比に増加がみられたが、実重量ではほとんど差がないことから、体重差が反映した見掛け上の変化と考えられる。

回復期間終了時の検査では、300 mg/kg群の雌に腎臓および副腎の対体重比で増加が認められたが、実重量では差がなかった。

10. 病理解剖学的検査 (Table 5)

投与終了時解剖動物では両側腎臓の表面、断面における灰白色斑が300 mg/kg群の雄の1例および雌の2例に認められた。回復期間終了時解剖動物でも300 mg/kg群の雄の1例に同様な変化が認められた。

28日間反復投与毒性試験

Table 1. Hematology of rats treated with *p*-tert-octylphenol for 28 days and after a 14-day recovery period

Sex	Dose level	28Days				Recovery		
		0mg/kg	15mg/kg	70mg/kg	300mg/kg	0mg/kg	300mg/kg	
Male	No. of animals	6	6	6	6	6	6	
	RBC ($10^6/mm^3$)	781±47.5	806±31.7	830±19.2	829±41.8	880±38.7	867±39.8	
	Hematocrit (%)	42.2±0.93	41.5±1.14	41.7±0.82	41.3±1.78	44.1±0.38	42.8±1.13*	
	Hemoglobin (g/dl)	14.3±0.82	14.8±0.62	14.8±0.13	14.9±0.83	15.6±0.51	15.5±0.59	
	Reticulocyte ($\%_{100}$)	36±11.2	35±9.8	39±10.1	33±11.1	29±5.8	39±11.9	
	MCV (μm^3)	54.1±3.13	51.5±1.16	50.2±1.85*	49.8±2.18**	50.2±2.53	49.3±1.34	
	MCH (pg)	18.4±0.95	18.4±0.41	17.9±0.46	18.0±0.72	17.7±0.50	17.9±0.53	
	MCHC (%)	34.0±1.56	35.6±0.63*	35.5±0.74	36.1±1.29**	35.3±1.20	36.3±0.52	
	Platelet ($\times 10^3/mm^3$)	118.0±17.78	129.6±17.11	126.3±19.06	129.1±13.04	133.5±9.71	132.1±8.50	
	PT (sec)	13.1±0.55	13.1±0.62	13.2±0.52	12.7±0.77	13.7±0.17	13.5±0.42	
	APTT (sec)	17.3±1.25	17.1±1.09	16.3±0.70	17.1±0.75	17.7±1.39	16.6±0.86	
	WBC ($\times 10^3/mm^3$)	112±27.4	133±27.6	108±12.6	103±4.1	102±14.2	95±30.9	
	Differential leukocyte counts (%)							
	Lymphocytes	93±3.4	96±1.9	94±3.4	90±3.1	90±4.5	92±3.4	
	Neutrophils							
	segmented	3±1.0	2±1.8	4±3.0	5±2.4	5±1.5	6±3.8	
	band	0±0.4	0±0.0	0±0.0	0±0.4	0±0.4	0±0.0	
	Eosinophils	0±0.4	0±0.5	0±0.5	1±0.8	1±1.4	0±0.4*	
	Basophils	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	
	Monocytes	4±2.0	2±1.2*	3±1.0	4±1.2	4±2.5	2±1.5	
Female	No. of animals	6	6	6	6	6	6	
	RBC ($\times 10^6/mm^3$)	844±27.9	835±21.8	842±13.0	810±51.9	836±10.5	823±51.5	
	Hematocrit (%)	42.1±1.36	42.1±0.58	42.8±1.25	40.4±1.07*	42.2±1.13	40.8±1.60	
	Hemoglobin (g/dl)	15.1±0.43	15.5±0.47	15.2±0.51	14.4±0.79	15.3±0.41	14.6±0.72	
	Reticulocyte ($\%_{100}$)	31±5.7	30±5.6	31±3.6	24±4.7	31±5.0	31±8.3	
	MCV (μm^3)	49.9±1.99	50.4±0.95	50.9±0.92	50.0±1.86	50.4±1.19	49.5±1.40	
	MCH (pg)	17.9±0.48	18.6±0.53*	18.1±0.50	17.8±0.27	18.2±0.45	17.8±0.44	
	MCHC (%)	35.8±1.86	36.8±0.84	35.6±1.18	35.7±1.04	36.2±0.77	35.8±0.49	
	Platelet ($\times 10^3/mm^3$)	114.7±15.10	121.6±9.72	125.0±7.08	117.8±14.50	120.9±10.30	133.2±8.84	
	PT (sec)	14.3±0.12	14.3±0.24	14.1±0.38	14.6±0.36	13.4±0.67	13.3±0.86	
	APTT (sec)	16.1±1.21	15.9±0.74	15.8±1.15	14.6±0.97	15.7±1.58	16.3±1.17	
	WBC ($\times 10^3/mm^3$)	87±25.5	96±29.5	105±25.9	91±28.1	83±23.3	69±11.8	
	Differential leukocyte counts (%)							
	Lymphocytes	95±1.9	95±3.4	97±1.2	93±6.8	94±3.3	96±2.2	
	Neutrophils							
	segmented	3±1.9	3±2.9	2±0.4	4±4.9	4±3.2	2±1.6	
	band	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.4	0±0.0	0±0.4	
	Eosinophils	0±0.0	0±0.5	0±0.4	1±0.8	1±0.5	1±1.2	
	Basophils	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	
	Monocytes	3±1.8	3±1.2	1±1.2	3±2.4	2±1.5	2±0.8	

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; * :P<0.05, ** :P<0.01.

その他、片側腎臓の腎盂腔の拡張が投与終了時解剖動物の300 mg/kg群の雌に1例、脾臓のろ胞の集合による直径5mm大の結節形成が回復期間終了時解剖動物の対照群の雄に1例認められたが、その発現状況から偶発病変と判断した。

11. 病理組織学的検査 (Table 6)

腎臓において被験物質投与に起因する変化が300mg/kg群で認められた。即ち、尿細管の再生像が投与終了時解剖動物の雄の全例および雌の5例で認められた。病変は皮質に限局し、腫大および好塩基性変化した再生上皮より成る近位尿細管が散在性に認められた。再生尿細管には有糸分裂像も散見された。このうちの雌の1例では病変は皮質から髓質に向かって帯状に拡がり、尿細管の拡張、その腔内への上皮の脱落と好中球の浸潤、間質における組

織球、リンパ球および好中球などの浸潤を伴っていた。回復期間終了時解剖動物では間質の軽度の線維化を伴う散在性の軽度の再生性変化が雌雄の各1例に認められた。

その他、腎臓の尿細管上皮内の硝子滴の出現が投与終了時および回復期間終了時解剖動物の雄の各群で高頻度に認められたが、群間で程度の差はなかった。各群の少数例に肝臓の微小肉芽腫、腎臓の皮髓境界部間質における石灰沈着、限局性炎症性変化、硝子円柱およびのう胞が散見された。また肉眼所見に対応する変化として脾臓のリンパ球の結節性過形成および片側性の腎盂腔の拡張が認められた。これらは用量相関性を欠く変化であり、ラットを用いた毒性試験ではしばしば自然発生病変として認められることから、被験物質投与とは無関係と考えられる。

Table 2. Clinical chemistry of rats treated with p-tert-octylphenol for 28 days and after a 14-day recovery period

Sex	Dose level	28Days				Recovery	
		0mg/kg	15mg/kg	70mg/kg	300mg/kg	0mg/kg	300mg/kg
Male	No. of animals	6	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	93±15.4	107±13.5	88±4.0	104±19.1	92±12.6	91±26.2
	GPT (IU/l)	32±3.5	32±3.9	33±3.4	38±5.9	31±2.9	29±4.6
	γ-GTP (IU/l)	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.4	1±0.5
	ALP (IU/l)	532±144.1	567±162.3	553±109.4	476±88.7	521±39.5	440±92.8
	Urea nitrogen (mg/dl)	16.8±1.31	16.2±1.60	16.2±2.22	16.0±2.51	17.5±2.34	19.0±1.61
	Creatinine (mg/dl)	0.5±0.06	0.5±0.04	0.5±0.00	0.5±0.04	0.5±0.08	0.5±0.05
	Glucose (mg/dl)	186±12.5	176±8.2	178±16.1	174±9.7	171±13.1	169±5.3
	Total chol. (mg/dl)	66±10.8	58±3.3	70±9.5	63±8.7	60±7.1	64±10.7
	Triglyceride (mg/dl)	102±71.1	72±47.2	110±97.7	44±10.2	128±73.1	127±30.5
	Total protein (g/dl)	5.93±0.336	5.87±0.217	6.05±0.200	5.74±0.246	6.43±0.287	6.33±0.189
	Albumin (g/dl)	3.76±0.107	3.77±0.126	3.76±0.059	3.58±0.120*	3.82±0.077	3.83±0.116
	A/G ratio	1.75±0.169	1.80±0.109	1.65±0.135	1.66±0.100	1.47±0.100	1.54±0.069
	Ca (mg/dl)	9.7±0.21	9.8±0.25	9.7±0.18	9.6±0.26	9.9±0.15	9.8±0.31
	Inorganic phos. (mg/dl)	9.2±0.38	9.3±0.51	9.3±0.41	9.3±0.51	8.7±0.30	8.9±0.43
	Na (meq/l)	142±0.5	143±0.8	143±0.5	144±1.0*	143±0.6	144±0.8
	K (meq/l)	4.3±0.12	4.4±0.25	4.4±0.23	4.4±0.21	4.7±0.13	4.5±0.09*
Cl (meq/l)	102±1.2	102±0.6	103±1.2	102±0.4	103±1.9	103±0.5	
Female	No. of animals	6	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	83±7.3	90±10.4	79±13.4	89±18.0	91±6.4	83±10.2
	GPT (IU/l)	29±4.0	24±4.3	22±1.2*	29±5.5	38±6.0	30±8.1
	γ-GTP (IU/l)	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.5	0±0.0
	ALP (IU/l)	362±119.0	311±67.8	260±41.0	455±90.8	251±78.5	299±83.0
	Urea nitrogen (mg/dl)	14.0±1.21	13.9±1.26	12.9±1.91	21.3±3.81*	20.3±4.22	20.7±2.56
	Creatinine (mg/dl)	0.5±0.05	0.5±0.05	0.5±0.05	0.6±0.08	0.5±0.08	0.5±0.05
	Glucose (g/dl)	181±20.7	170±20.4	175±5.5	163±5.8	185±34.9	179±19.9
	Total chol. (mg/dl)	59±5.7	57±8.9	59±9.1	45±8.4*	65±12.1	70±13.8
	Triglyceride (mg/dl)	26±3.7	28±7.5	31±6.6	67±31.8**	60±41.8	39±14.8
	Total protein (g/dl)	5.89±0.155	6.43±0.283**	6.17±0.162	5.96±0.353	6.79±0.422	6.71±0.302
	Albumin (g/dl)	3.86±0.139	4.14±0.197*	3.91±0.090	3.66±0.243	4.12±0.239	4.08±0.149
	A/G ratio	1.90±0.087	1.83±0.165	1.73±0.074*	1.58±0.051**	1.55±0.093	1.56±0.098
	Ca (mg/dl)	9.3±0.26	9.6±0.11	9.4±0.29	9.6±0.34	9.9±0.21	10.0±0.29
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.3±0.46	8.2±0.46	7.7±0.60	8.7±0.62	8.5±0.58	8.4±0.98
	Na (meq/l)	141±1.0	142±0.5	141±1.0	144±1.4**	142±0.8	142±1.5
	K (meq/l)	4.3±0.36	4.3±0.24	4.3±0.21	4.2±0.21	4.8±0.50	4.9±0.60
Cl (meq/l)	104±0.9	103±1.5	103±1.6	105±1.9	103±1.0	104±0.8	

Values are expressed as Mean±S.D.
Significantly different from control group; * :P<0.05, **:P<0.01.

Table 3. Urinalysis of rats treated with p-tert-octylphenol for 28 days and after a 14-day recovery period

Sex	Dose level	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	15mg/kg	70mg/kg	300mg/kg	0mg/kg	300mg/kg
Male	No. of animals examined	12	5	6	12	6	6
	Specific gravity	1.064±0.0230	1.070±0.0064	1.081±0.0127	1.029±0.0115**	1.055±0.0112	1.060±0.0177
	Volume (ml/day)	9.8±4.01	6.5±1.08	7.4±1.42	19.5±8.70*	12.9±3.22	13.2±4.39
	Na (meq)	1.43±0.223	1.08±0.226	1.38±0.174	0.61±0.228**	1.41±0.239	1.40±0.360
	K (meq)	2.83±0.425	2.25±0.275*	2.83±0.243	2.10±0.334**	3.50±0.542	3.76±0.430
	Cl (meq)	1.37±0.219	1.05±0.204*	1.47±0.130	0.51±0.138**	1.33±0.193	1.47±0.146
Female	No. of animals examined	12	6	6	12	6	6
	Specific gravity	1.072±0.0155	1.070±0.0177	1.069±0.0216	1.022±0.0111**	1.054±0.0127	1.052±0.0280
	Volume (ml/day)	5.7±2.07	5.9±2.47	5.4±3.08	20.5±15.05**	10.9±3.47	13.0±8.39
	Na (meq)	0.81±0.329	0.75±0.163	0.83±0.362	0.27±0.113**	1.13±0.200	1.14±0.201
	K (meq)	1.77±0.517	1.76±0.275	1.51±0.649	1.18±0.521	2.62±0.496	2.50±0.361
	Cl (meq)	0.75±0.239	0.78±0.078	0.73±0.260	0.03±0.173**	1.03±0.184	1.06±0.171

Values are expressed as Mean±S.D.
Significantly different from control group; * :P<0.05, **:P<0.01.

Table 4. Absolute and relative organ weights of rats treated with *p*-tert-octylphenol for 28 days and after a 14-day recovery period

Sex	Dose level	28 Days				Recovery		
		0mg/kg	15mg/kg	70mg/kg	300mg/kg	0mg/kg	300mg/kg	
Male	No. of animals examined	6	6	6	6	6	6	
	Body weight (g)	363±24.3	345±7.8	354±25.8	325±13.1**	422±26.9	405±36.3	
	Absolute organ weight							
	Brain (g)	1.98±0.041	1.97±0.080	2.01±0.074	2.01±0.124	2.06±0.048	2.05±0.073	
	Liver (g)	14.89±1.940	13.70±0.799	15.31±2.204	14.52±1.354	16.34±2.407	15.56±2.093	
	Kidneys (g)	2.67±0.138	2.55±0.209	2.71±0.148	2.78±0.276	3.03±0.266	2.99±0.406	
	Adrenals (mg)	51.5±2.44	51.5±5.12	45.2±3.86	48.7±6.10	56.1±6.63	60.5±9.83	
	Testes (g)	2.97±0.251	2.89±0.087	2.91±0.162	3.02±0.172	3.25±0.291	3.23±0.157	
	Relative organ weight							
	Brain (g%)	0.55±0.027	0.57±0.017	0.57±0.029	0.62±0.026**	0.49±0.030	0.51±0.035	
	Liver (g%)	4.10±0.306	3.97±0.263	4.31±0.362	4.46±0.273	3.86±0.348	3.83±0.238	
	Kidneys (g%)	0.73±0.023	0.74±0.059	0.77±0.039	0.86±0.076**	0.72±0.035	0.74±0.065	
	Adrenals (mg%)	14.2±0.87	15.0±1.70	12.9±1.18	15.0±1.94	13.3±0.94	15.0±2.06	
Testes (g%)	0.82±0.033	0.84±0.029	0.83±0.100	0.93±0.060**	0.77±0.071	0.80±0.069		
Female	No. of animals examined	6	6	6	6	6	6	
	Body weight (g)	239±23.3	234±15.6	230±15.2	231±21.5	266±24.3	246±30.3	
	Absolute organ weight							
	Brain (g)	1.89±0.105	1.93±0.056	1.92±0.031	1.89±0.106	1.92±0.063	1.91±0.062	
	Liver (g)	8.57±1.023	8.35±0.600	8.52±0.730	9.44±0.822	9.20±0.747	8.90±1.609	
	Kidneys(g)	1.87±0.260	1.73±0.056	1.73±0.124	2.08±0.164	1.81±0.050	1.85±0.218	
	Adrenals (mg)	65.0±7.74	64.7±6.56	64.7±12.30	56.5±3.33	66.3±3.10	69.2±6.12	
	Ovaries (mg)	88.0±9.07	86.7±8.94	92.4±13.27	90.7±13.64	98.1±13.01	94.3±11.97	
	Relative organ weight							
	Brain (g%)	0.79±0.041	0.83±0.059	0.84±0.068	0.82±0.055	0.73±0.066	0.78±0.102	
	Liver (g%)	3.59±0.181	3.58±0.139	3.70±0.147	4.10±0.268**	3.47±0.131	3.59±0.287	
	Kidneys (g%)	0.78±0.051	0.74±0.032	0.75±0.049	0.90±0.045**	0.69±0.048	0.76±0.029*	
	Adrenals (mg%)	27.3±1.52	27.6±1.44	28.5±7.12	24.6±1.59	25.1±2.04	28.3±2.42*	
Ovaries (mg%)	37.0±3.68	37.1±3.02	40.6±8.59	39.3±3.25	37.1±5.05	38.4±2.73		

Values are expressed as Mean±S.D.
Significantly different from control group; * :P<0.05, ** :P<0.01.

考察

p-tert-オクチルフェノールを15、70および300 mg/kgの用量で雌雄のSD系ラットに28日間反復経口投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察した。また、14日間の回復期間を設け、現れた変化の回復性を検討した。

300 mg/kg群において流涎、飲水量の増加、体重増加抑制が認められた。また、血液生化学的検査、尿検査および器官重量においても被験物質投与に起因すると考えられる変化が認められた。さらに病理学的検査においては腎臓に尿管上皮の障害が認められた。70 mg/kg群においても流涎など毒性徴候が観察された。

腎臓の尿管でみられた形態変化は変性や脱落に対する再生性増殖を示唆する上皮の腫大や好塩基性変化であり、被験物質は尿管上皮に対して障害性を有するものと考えられる。雌の1例にみられた間質の炎症性細胞浸潤は尿管に対する障害性がより強く、基底膜を越えて間質にまで波及したことを表している。また、回復期間終了後の2例にみられた尿管周囲の線維化も同様に障害が間質に及んだことを意味するが、一定の炎症性過程を経た修復の像と理解される。回復期間終了後の多くの例ではこのような所見は観察されなかったことから、被験物質の影響が尿管上皮だけにとどまった場合には2週間の回復期間を設けることによって完全に回復することが示された。

300 mg/kg群の雌雄で尿量の増加とともに尿中電解質の減少が認められた。通常、尿量の増加に伴い尿中電解質は増加あるいは変化しないことが多い。そこで本試験とは別に雌ラットに300 mg/kgの用量で28日間投与し尿の変化を調べたところ（以下補足試験）、被験物質投与後6時間までに多量の尿と電解質が排泄されていることが判明した。本試験で得られた尿は投与後7時間以降のものであったことから、投与後の電解質排泄に対して代償的に再吸収が亢進し、その結果尿中電解質が減少したと考えられる。

一方、腎臓の近位尿管で障害が認められたため、補足試験にて尿中酵素（N-Acetyl-β-D-glucosaminidase）を測定したが、明らかな尿量増加を認めたにもかかわらず、尿中酵素の変化は明確でなかった。このことから、尿量の増加は尿管障害に直接起因するものではなく、被験物質の利尿作用によるものである可能性が示唆される。

300 mg/kg群の雌で肝臓重量に軽度の増加がみられたが、病理組織学的変化はなかった。雌で認められた血中総コレステロールおよびトリグリセライド等の脂質の変化は本所見と関連したものである可能性が考えられる。しかしながら、いずれもわずかな変化であり、毒性学的重要性は少ないものと考えられる。

被験物質に起因する変化は、回復期間終了後には消失あ

Table 5. Total incidence of macroscopic findings of rats treated with p-tert-octylphenol for 28 days and after a 14-day recovery period

Organ	Fate	Sex	28 Days								Recovery			
			Male				Female				Male		Female	
	Dose level(mg/kg)		0	15	70	300	0	15	70	300	0	300	0	300
Findings	No. of animals		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Kidneys														
	Grayish patch		0	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0
	Pyelectasis		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Spleen														
	Nodule composed of lymph follicles		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

No abnormalities were observed in the other organs.

Table 6. Total incidence of microscopic findings of rats treated with p-tert-octylphenol for 28 days and after a 14-day recovery period

Organ	Fate	Sex	28 Days								Recovery			
			Male				Female				Male		Female	
	Dose level(mg/kg)		0	15	70	300	0	15	70	300	0	300	0	300
Findings	No. of animals		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Kidneys														
	Regeneration of the renal tubule	(slight)	0	0	0	6	0	0	0	4	0	1	0	1
		(moderate)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Calcification		0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	Cyst		1	0	0	0	1	1	2	0	1	1	0	1
	Focal inflammatory change		0	1	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0
	Hyaline cast		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hyaline droplets in the tubular epithelium		6	6	6	5	0	0	0	0	5	4	0	0
	Pyelectasis		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Spleen														
	Nodular lymphoid hyperplasia		0	*	*	0	0	*	*	0	*	*	1/1 ¹⁾	*
Liver														
	Microgranuloma		3	*	*	0	0	*	*	1	*	*	*	*
Heart														
			ND	*	*	ND	ND	*	*	ND	*	*	*	*
Adrenals														
			ND	*	*	ND	ND	*	*	ND	*	*	*	*

* ; Not examined.

1) ; Number of animals with lesion / number of animals examined.

ND ; No abnormalities were observed.

るいは回復傾向がみられることから、投与休止により回復性を示す変化と考えられる。

以上の結果から、本試験条件下におけるp-tert-オクチルフェノールの無影響量は雌雄とも15 mg/kgと考えられる。

連絡先：試験責任者 松浦郁夫

(株) 三菱化成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 : Matsuura, Ikuo

Mitsubishi-Kasei Institute of Toxicological and Environmental Sciences, Japan

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

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

p-tert-オクチルフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of p-tert-Octylphenol on Bacteria

要約

p-tert-オクチルフェノールの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は50~5000 µg/プレートの用量で試験を行ったが、すべての検定菌において抗菌性が認められた。抗菌性は*S. typhimurium* 4検定菌の直接試験において強く認められた。そのため、*S. typhimurium*の4検定菌について、TA100とTA98では20~200 µg/プレート、TA1535およびTA1537では10~100 µg/プレートの用量で直接試験のみについて再試験を実施したが、いずれの検定菌において

も抗菌性は強く認められた。

本試験は、*S. typhimurium*の4検定菌では直接試験を1.56~50 µg/プレート、代謝活性化試験を6.25~200 µg/プレートの用量で、WP2については直接試験および代謝活性化試験のいずれも125~2000 µg/プレートの用量で実施した。

その結果、2回の本試験ともに、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、p-tert-オクチルフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

緒言

OECD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、日本が独自に選定した既存化学物質のつである、p-tert-オクチルフェノールについて、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ(ネズミチフス菌)におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異²⁾を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素(S9混液)によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号)およびOECD化学品試験法ガイドライン: 471、472に準拠し、化学物質GLP(昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号)に基づいて実施した。

方法

〔検定菌〕

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

Salmonella typhimurium TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537の4菌株は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。

Escherichia coli WP2 *uvrA*株は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。

試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス(Difco)を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、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〕

p-tert-オクチルフェノール(CAS No. 3780-50-5、p-tert-Octylphenol)は、分子量206.33、融点79~82℃、沸点175℃の白色結晶状固体である。純度97%以上のもの(ロット番号:C162、大日本インキ化学工業株式会社製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。p-tert-オクチルフェノールは、ジメチルスルホキシド(ロット番号:DSL 5887、和光純薬工業(株))を用いて50あるいは20 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてp-tert-オクチルフェノールのDMSO溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度(20 mg/ml)および最低濃度以下の濃度(12.5 µg/ml)について、室温遮光条件下で、実施した。その結果、調製後3時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値(0時間)に対して、101および102%であった。これらの値は当研究所の標準操作手順書の基準(初回の測定平均値の90%以上)を満たしていた。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、20 mg/ml溶液については、92.6~97.6%、15.6 µg/ml溶液については、103~104%の回収率が得られ

復帰変異試験

た。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の85%以上）を満たしていた。

以上の結果から、p-tert-オクチルフェノールはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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。

- AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬 (株))
- SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業 (株))
- 9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業 (株))
- 2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業 (株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業 (株)) に、SAは蒸留水に溶解して試験に用いた。

〔培地およびS9混液の組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

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
ビオチン	0.5 mM

* WP2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、日清製粉株式会社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	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30mlを流して固めてある。

3) S9混液 (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
0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml

** : 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。

〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2ml、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (代謝活性化試験においてはS9混液0.5 ml)、検定菌液0.1 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表中に示した。培養は37°Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

〔判定基準〕

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が、陰性対照のそれに比べて倍以上に増加し、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〕

50~5000 μg/プレートの範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接試験および代謝活性化試験において、抗菌性が強く認められた。抗菌性は、*S. typhimurium*の検定菌でWP2より強く認められ、また直接試験において著しかった。そのため、*S. typhimurium*の4検定菌について、TA100とTA98では20~200 μg/プレート、TA1535とTA1537は10~100 μg/プレートの用量で直接試験のみについて追加試験を実施した。抗菌性はいずれの検定菌においても高用量の2~3用量群で認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量を*S. typhimurium*の4検定菌の直接試験では50 μg/プレート、代謝活性化試験では、200 μg/プレート、WP2については、直接試験、代謝活性化試験ともに2000 μg/プレートとし、*S. typhimurium*の4検定菌においては6用量、WP2については5用量を公比2で設けた。

〔本試験〕

本試験の結果をTables 1~4に示した。p-tert-オクチルフェノールについて、上記の用量範囲で試験を実施した。その結果、すべての検定菌において、直接試験および代謝活性化試験のいずれにおいても、高用量の1~2用量群において抗菌性が認められたものの、用量依存性のあ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、p-tert-オクチルフェノールは、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。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel, eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

連絡先：試験責任者 澁谷徹
 (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 : Shibuya, Tohru
 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

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I-1) with p-octylphenol**

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean \pm S.D.)														
			Base-pair substitution type						Frameshift type								
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537						
Solvent control	-	-	123 (124 \pm 7.5)	132 (117 \pm 7.5)	117 (13 \pm 14)	13 (15 \pm 2.1)	14 (15 \pm 2.1)	17 (15 \pm 2.1)	19 (22 \pm 3.0)	22 (22 \pm 3.0)	25 (16 \pm 9)	8 (9 \pm 1.0)	9 (8 \pm 1.2)	10 (9 \pm 1.7)			
	1.56	-	153 (141 \pm 14.3)	144 (125 \pm 14.3)	125 (15 \pm 13)	15 (14 \pm 1.2)	13 (14 \pm 1.2)	13 (14 \pm 1.2)	22 (22 \pm 5.5)	27 (16 \pm 5.5)	16 (9 \pm 7)	9 (8 \pm 1.2)	7 (8 \pm 1.2)	9 (9 \pm 1.7)			
	3.13	-	128 (133 \pm 6.1)	132 (140 \pm 6.1)	140 (19 \pm 16)	19 (15 \pm 4.6)	10 (16 \pm 4.6)	16 (15 \pm 4.6)	30 (23 \pm 7.6)	15 (25 \pm 7.6)	25 (14 \pm 11)	14 (13 \pm 11.7)	14 (13 \pm 11.7)	11 (13 \pm 11.7)			
	6.25	-	146 (143 \pm 11.4)	130 (152 \pm 11.4)	152 (14 \pm 11)	14 (15 \pm 4.6)	20 (11 \pm 4.6)	11 (15 \pm 4.6)	20 (25 \pm 4.6)	26 (29 \pm 4.6)	29 (15 \pm 12)	15 (12 \pm 3.0)	12 (12 \pm 3.0)	9 (9 \pm 3.0)			
	12.5	-	133 (124 \pm 10.8)	112 (127 \pm 10.8)	127 (18 \pm 14)	18 (15 \pm 2.3)	14 (14 \pm 2.3)	14 (15 \pm 2.3)	27 (22 \pm 4.7)	20 (18 \pm 4.7)	18 (11 \pm 8)	11 (10 \pm 1.7)	8 (10 \pm 1.7)	11 (10 \pm 1.7)			
	25	-	138 (125 \pm 17.4)	131 (105 \pm 17.4)	105 (15* \pm 9*)	15* (11 \pm 3.2)	9* (10* \pm 3.2)	10* (10* \pm 3.2)	16 (22 \pm 5.3)	24 (26 \pm 5.3)	26 (10* \pm 8*)	10* (8 \pm 4*)	4* (8 \pm 3.5)	10* (8 \pm 3.5)			
	50	-	109* (117 \pm 9.2)	115* (127* \pm 9.2)	127* (9* \pm 10)	9* (10 \pm 1.2)	9* (10 \pm 1.2)	11* (10 \pm 1.2)	16* (23 \pm 5.9)	25* (27* \pm 5.9)	27* (9* \pm 6)	9* (6 \pm 3.5)	2* (6 \pm 3.5)	6* (6 \pm 3.5)			
Solvent control	+	+	187 (157 \pm 26.3)	142 (141 \pm 26.3)	141 (15 \pm 10)	15 (13 \pm 2.6)	10 (14 \pm 2.6)	14 (13 \pm 2.6)	39 (39 \pm 2.5)	42 (37 \pm 2.5)	37 (11 \pm 13)	11 (14 \pm 4.2)	13 (14 \pm 4.2)	19 (19 \pm 4.2)			
	6.25	+	148 (149 \pm 4.6)	154 (145 \pm 4.6)	145 (15 \pm 19)	15 (16 \pm 2.6)	19 (16 \pm 2.6)	14 (16 \pm 2.6)	50 (48 \pm 2.5)	48 (45 \pm 2.5)	45 (8 \pm 10)	8 (12 \pm 4.7)	10 (12 \pm 4.7)	17 (17 \pm 4.7)			
	12.5	+	178 (164 \pm 12.7)	162 (153 \pm 12.7)	153 (14 \pm 19)	14 (18 \pm 3.6)	19 (21 \pm 3.6)	21 (18 \pm 3.6)	38 (48 \pm 11.1)	60 (47 \pm 11.1)	47 (13 \pm 6)	13 (9 \pm 3.6)	6 (6 \pm 3.6)	8 (8 \pm 3.6)			
	25	+	143 (142 \pm 3.1)	145 (139 \pm 3.1)	139 (11 \pm 16)	11 (17 \pm 7.1)	16 (25 \pm 7.1)	25 (17 \pm 7.1)	33 (36 \pm 3.0)	36 (39 \pm 3.0)	39 (12 \pm 13)	12 (11 \pm 2.6)	13 (11 \pm 2.6)	8 (8 \pm 2.6)			
	50	+	155 (156 \pm 7.1)	164 (150 \pm 7.1)	150 (14 \pm 15)	14 (15 \pm 0.6)	15 (15 \pm 0.6)	15 (15 \pm 0.6)	39 (38 \pm 2.1)	36 (40 \pm 2.1)	40 (14 \pm 7)	14 (10 \pm 3.5)	7 (10 \pm 3.5)	10 (10 \pm 3.5)			
	100	+	146 (144 \pm 12.6)	131 (156 \pm 12.6)	156 (11 \pm 9)	11 (16 \pm 9.9)	9 (27 \pm 9.9)	27 (16 \pm 9.9)	38 (37 \pm 5.1)	31 (41 \pm 5.1)	41 (7 \pm 5)	7 (7 \pm 2.5)	5 (7 \pm 2.5)	10 (10 \pm 2.5)			
	200	+	94* (94 \pm 3.5)	91* (98* \pm 3.5)	98* (16* \pm 12*)	16* (12 \pm 4.0)	12* (8* \pm 4.0)	8* (12 \pm 4.0)	24* (27 \pm 3.5)	31* (27* \pm 3.5)	27* (4* \pm 8*)	4* (5 \pm 2.3)	8* (5 \pm 2.3)	4* (5 \pm 2.3)			
Positive control	Chemical		AP2 0.01			SA 0.5			AP2 0.01			AP2 0.1			9AA 80		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		AP2 0.01			SA 0.5			AP2 0.01			AP2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		649 (626 \pm 20.2)	618 (611 \pm 20.2)	611 (214 \pm 225)	214 (228 \pm 15.2)	225 (244 \pm 15.2)	244 (228 \pm 15.2)	572 (560 \pm 54.0)	607 (501 \pm 54.0)	501 (3360 \pm 3605)	3360 (3533 \pm 150.9)	3605 (3533 \pm 150.9)	3635 (3533 \pm 150.9)	3635 (3533 \pm 150.9)		
Positive control	Chemical		2AA 1		2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2						
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		2AA 1		2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2						
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		725 (750 \pm 26.1)	748 (777 \pm 26.1)	777 (216 \pm 207)	216 (212 \pm 213)	207 (213 \pm 4.6)	213 (212 \pm 4.6)	286 (294 \pm 24.6)	275 (322 \pm 24.6)	322 (171 \pm 170)	171 (164 \pm 152)	170 (164 \pm 152)	152 (10.7)			

AP2:2-(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.
 **:Purity was above 97%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (I-2) with p-octylphenol**

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean \pm S.D.)				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Solvent control	-	-			11 (11 \pm 5.0)	17 (6.0)	
Test substance	125	-			13 (12 \pm 2.1)	14 (2.1)	
	250	-			7 (7 \pm 1.5)	9 (1.5)	
	500	-			8 (8 \pm 0.6)	7 (0.6)	
	1000	-			2 (3 \pm 3.1)	6 (3.1)	
	2000	-			8* (10 \pm 1.5)	11* (1.5)	10* (1.5)
	Solvent control	+	+			15 (17 \pm 6.2)	24 (6.2)
Test substance	125	+			14 (16 \pm 2.1)	15 (2.1)	18 (2.1)
	250	+			16 (15 \pm 1.5)	15 (1.5)	13 (1.5)
	500	+			12 (10 \pm 2.1)	9 (2.1)	8 (2.1)
	1000	+			7 (4 \pm 2.6)	3 (2.6)	2 (2.6)
	2000	+			7 (8 \pm 1.2)	7 (1.2)	9 (1.2)
	Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate				190 (195 \pm 7.2)	191 (7.2)	203 (7.2)
Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate				288 (273 \pm 22.9)	285 (22.9)	247 (22.9)

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.
 **:Purity was above 97%

Table 3 Results of bacterial reverse mutation assay (II-1) with p-octylphenol**

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean \pm S.D.)														
			Base-pair substitution type						Frameshift type								
			TA100		TA1535		WP2avrA		TA98		TA1537						
Solvent control	-	-	168 (150 \pm)	141 (150 \pm)	142 (15.3)	18 (16 \pm)	17 (16 \pm)	14 (2.1)	20 (21 \pm)	22 (1.0)	21 (1.0)	9 (8 \pm)	8 (8 \pm)	7 (1.0)			
Test substance	1.56	-	162 (155 \pm)	172 (155 \pm)	130 (21.9)	23 (21 \pm)	24 (21 \pm)	15 (4.9)	25 (29 \pm)	32 (29 \pm)	31 (3.8)	6 (9 \pm)	9 (9 \pm)	12 (3.0)			
	3.13	-	156 (152 \pm)	141 (152 \pm)	160 (10.0)	19 (16 \pm)	12 (16 \pm)	18 (3.8)	15 (21 \pm)	23 (21 \pm)	25 (5.3)	5 (12 \pm)	14 (12 \pm)	16 (5.9)			
	6.25	-	151 (143 \pm)	138 (143 \pm)	141 (6.8)	13 (14 \pm)	12 (14 \pm)	18 (3.2)	21 (26 \pm)	32 (26 \pm)	26 (5.5)	16 (13 \pm)	13 (13 \pm)	11 (2.5)			
	12.5	-	149 (148 \pm)	150 (148 \pm)	145 (2.6)	17 (11 \pm)	8 (11 \pm)	9 (4.9)	36 (28 \pm)	23 (28 \pm)	26 (6.8)	7 (8 \pm)	7 (8 \pm)	9 (1.2)			
	25	-	139 (143 \pm)	142 (143 \pm)	147 (4.0)	19 (19 \pm)	23 (19 \pm)	15 (4.0)	17 (24 \pm)	23 (24 \pm)	31 (7.0)	6* (7 \pm)	10* (7 \pm)	5* (2.6)			
	50	-	123* (114 \pm)	115* (114 \pm)	105* (9.0)	15* (18 \pm)	17* (18 \pm)	23* (4.2)	23* (25 \pm)	31* (25 \pm)	22* (4.9)	2* (5 \pm)	5* (5 \pm)	8* (3.0)			
Solvent control	+	+	169 (160 \pm)	141 (160 \pm)	170 (16.5)	12 (16 \pm)	16 (16 \pm)	21 (4.5)	56 (50 \pm)	46 (50 \pm)	48 (5.3)	11 (12 \pm)	15 (12 \pm)	10 (2.6)			
Test substance	6.25	+	149 (150 \pm)	153 (150 \pm)	147 (3.1)	13 (20 \pm)	26 (20 \pm)	21 (6.6)	41 (41 \pm)	43 (41 \pm)	38 (2.5)	11 (13 \pm)	11 (13 \pm)	18 (4.0)			
	12.5	+	197 (173 \pm)	161 (173 \pm)	160 (21.1)	14 (16 \pm)	20 (16 \pm)	13 (3.8)	45 (49 \pm)	57 (49 \pm)	44 (7.2)	11 (13 \pm)	15 (13 \pm)	14 (2.1)			
	25	+	167 (158 \pm)	132 (158 \pm)	174 (22.5)	17 (16 \pm)	17 (16 \pm)	15 (1.2)	38 (47 \pm)	52 (47 \pm)	50 (7.6)	11 (12 \pm)	10 (12 \pm)	15 (2.6)			
	50	+	156 (159 \pm)	167 (159 \pm)	155 (6.7)	24 (21 \pm)	24 (21 \pm)	14 (5.8)	58 (48 \pm)	41 (48 \pm)	44 (9.1)	12 (14 \pm)	13 (14 \pm)	17 (2.6)			
	100	+	151 (156 \pm)	151 (156 \pm)	167 (9.2)	12 (14 \pm)	16 (14 \pm)	13 (2.1)	38 (38 \pm)	46 (38 \pm)	31 (7.5)	17* (14 \pm)	14* (14 \pm)	11* (3.0)			
	200	+	120* (116 \pm)	113* (116 \pm)	114* (3.8)	7* (13 \pm)	19* (13 \pm)	19* (6.0)	34* (32 \pm)	32* (32 \pm)	31* (1.5)	7* (7 \pm)	11* (7 \pm)	3* (4.0)			
Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		709 (700 \pm)	678 (700 \pm)	714 (19.5)	178 (175 \pm)	185 (175 \pm)	163 (11.2)	753 (759 \pm)	747 (759 \pm)	776 (15.3)	4447 (4064 \pm)	4216 (4064 \pm)	3528 (478.1)			
Positive control	Chemical Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		919 (922 \pm)	904 (922 \pm)	942 (19.1)	241 (228 \pm)	213 (228 \pm)	229 (14.0)	334 (304 \pm)	289 (304 \pm)	288 (26.3)	196 (203 \pm)	208 (203 \pm)	204 (6.1)			

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.
 **:Purity was above 97%

Table 4 Results of bacterial reverse mutation assay (II-2) with p-octylphenol**

Group	Dose (μ g/plate)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean \pm S.D.)						
			Base-pair substitution type			Frameshift type			
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		
Solvent control	-	-			15 (15 \pm 4.0)	19 (19 \pm 4.0)	11 (11 \pm 4.0)		
Test substance	125	-			21 (14 \pm 6.2)	9 (9 \pm 6.2)	12 (12 \pm 6.2)		
	250	-			7 (10 \pm 2.6)	12 (12 \pm 2.6)	11 (11 \pm 2.6)		
	500	-			6 (7 \pm 1.2)	6 (6 \pm 1.2)	8 (8 \pm 1.2)		
	1000	-			6 (4 \pm 2.0)	2 (2 \pm 2.0)	4 (4 \pm 2.0)		
	2000	-			10* (12 \pm 3.2)	11* (11 \pm 3.2)	16* (16 \pm 3.2)		
Solvent control		+			16 (17 \pm 0.6)	17 (17 \pm 0.6)	17 (17 \pm 0.6)		
Test substance	125	+			21 (18 \pm 2.9)	16 (16 \pm 2.9)	16 (16 \pm 2.9)		
	250	+			17 (13 \pm 4.0)	9 (9 \pm 4.0)	13 (13 \pm 4.0)		
	500	+			7 (7 \pm 1.0)	8 (8 \pm 1.0)	6 (6 \pm 1.0)		
	1000	+			7 (6 \pm 1.5)	4 (4 \pm 1.5)	6 (6 \pm 1.5)		
	2000	+			2* (3 \pm 1.0)	3* (3 \pm 1.0)	4* (4 \pm 1.0)		
Positive control	Chemical Dose (μ g/plate)		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate				174 (162 \pm 10.8)	157 (157 \pm 10.8)	154 (154 \pm 10.8)		
Positive control	Chemical Dose (μ g/plate)		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate				761 (711 \pm 51.6)	658 (658 \pm 51.6)	715 (715 \pm 51.6)		

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.
 **:Purity was above 97%

p-tert-オク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 *p*-tert-Octylphenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

p-tert-オクチルフェノールの染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

1) 細胞増殖抑制試験

直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は16 µg/ml 代謝活性化法では40 µg/mlであった。

従って、染色体異常試験において、直接法では16 µg/ml 代謝活性化法では40 µg/mlの処理濃度を高濃度とし、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て用いた。

2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、高濃度では分裂抑制のため染色体観察ができなかったが、中濃度および低濃度では、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。また、代謝活性化法においても、S9 mix存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかった。なお、S9 mix非存在下の5 µg/ml以上の群では分裂抑制が顕著であった。

3) 結論

p-tert-オクチルフェノールは、今回実施した試験条件下で、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。

緒言

OECD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、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである *p*-tert-オクチルフェノールの、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) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

上記の試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECDガイドライン: 473に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものである。

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) 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; J.R.Scientific; ロット番号C019407, Bocknek; ロット番号SF70521) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (径6cm, Corning) に播き、37°CのCO₂インキュベーター (5% CO₂) 内で培養した。

4. 被験物質

p-tert-オクチルフェノール (CAS No. 3780-50-5, C162, 大日本インキ化学工業 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は白色結晶状で、DMSO (ジメチルスルホキシド) に535.2 mg/mlまで可溶、水に1.7% (w/w) まで溶ける。分子式C₁₄H₂₂OH、分子量206.4、融点84°Cの物質で、純度は97%以上である (大日本インキ化学工業 (株) 資料)。本実験では被験物質がDMSOに可溶であることから、溶媒としてDMSOを用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施したエームス試験 (試験計画番号: M-91-187) におけるDMSO中での安定性試験では0.0125~20.0 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体をDMSO (Sigma Chemical Co., ロット番号: 129F0413) に溶解して原液を調製し、ついで原液をDMSO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、全ての試験において培養液の0.5% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた最高濃度群と最低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

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細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）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、回帰直線式より算出した直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は16 µg/ml、代謝活性化法では40 µg/mlであった（Fig.1）。

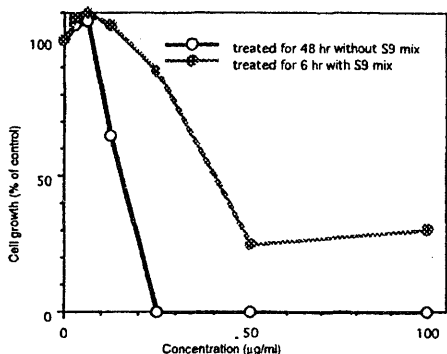


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with p-tert-octylphenol in CHL cells

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最高処理濃度を、直接法（24および48時間連続処理）では16 µg/ml、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）では40 µg/mlとし、それぞれ最高処理濃度の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。

上記濃度にしたがって試験を実施したところ、S9 mix非存在下の処理群では、低濃度群（10 µg/ml）においても、分裂抑制のため染色体の分析が不可能であった。そこで、S9 mix非存在下の低濃度群の濃度（5.0 µg/ml）を高濃度として、以下の濃度群を設定して追加試験を実施した。

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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。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¹¹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（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. 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、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら²¹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

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

p-tert-オクチルフェノールを加えて24時間および48時間処理した低濃度および中濃度の各群において、いずれも染色体の構造異常と倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。一方、高濃度群については、分裂抑制のため、観察可能な分裂中期細胞がみられなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

p-tert-オクチルフェノールを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した各濃度群においては、いずれも分裂抑制のため、観察可能な分裂中期細胞がみられなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度において倍数性細胞が有意（p=0.0192）に増加したが、染色体の構造異常については全ての処理群で有意な増加は認められなかった。分裂抑制のため観察不能であったS9 mix非存在下の群については、さらに低い濃度を設定して追加試験を実施した（Table 3）。その結果、5.0 µg/mlの濃度では、分裂抑制のため、ほとんど分裂中期細胞が得られなかったが、1.3 µg/mlおよび2.5 µg/mlの濃度では、構造異常および倍数性細胞ともに有意な増加はみられなかった。従って、代謝活性化法における最終判定は、全ての処理群で陰性となった。

上記の試験において、直接法（24時間および48時間）における8 µg/mlの処理濃度では染色体分析は可能であったが、代謝活性化法におけるS9 mix非存在下の5 µg/mlの処理濃度では分裂細胞が得られなかった。その理由としては、S9 mix存在下ではp-tert-オクチルフェノールによる細胞毒性が著しく低減されることから、直接法の処理培養液中に含まれている10%の血清が代謝的に作用していることや、5~8 µg/mlの濃度付近が分裂抑制のかかる限界であることなどが考えられる。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9 mix存在下でのCPA処理群では染色体体交換（cte）や染色体体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

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 田中憲穂
 (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 : Tanaka, Noriho
 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

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with p-tert-octylphenol ** by direct method

Group	Concentration (µg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾		
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
														TA (%)		TA (%)		
Control			200	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.38		
Solvent ¹⁾	0	24	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	0 (0.0)	0.75			
PO	4	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	
PO	8	24	200	7	0	0	0	0	0	0	7	0	7 (3.5)	0 (0.0)	0.13	-	-	
PO	16	24	0													Tox	Tox	
MC	0.05	24	200	30	40	40	0	1	0	10	121	0	69* (34.5)	57* (28.5)	0.38	+	-	
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.75			
PO	4	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	-	-	
PO	8	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25	-	-	
PO	16	48	0													Tox	Tox	
MC	0.05	48	200	18	24	33	2	2	0	10	89	1	52* (26.0)	39* (19.5)	0.13	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was more than 97%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with p-tert-octylphenol ** by metabolic activation method

Group	Concentration (µg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
															TA (%)		TA (%)	
Control				200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50		
PO	10	-	6-(18)	0													Tox	Tox
PO	20	-	6-(18)	0													Tox	Tox
PO	40	-	6-(18)	0													Tox	Tox
CPA	5	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13		
PO	10	+	6-(18)	200	5	0	0	0	0	0	5	0	5 (2.5)	0 (0.0)	0.00	-	-	
PO	20	+	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	1.00*	-	-	
PO	40	+	6-(18)	200	5	8	1	0	0	0	14	0	8 (4.0)	4 (2.0)	0.25	-	-	
CPA	5	+	6-(18)	200	23	11	28	0	0	0	62	0	48* (24.0)	33* (16.5)	0.63	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was more than 97%.

染色体異常試験

Table 3 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with p-tert-octylphenol ** by metabolic activation method

Group	Concentration (µg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations										No. of cells with aberrations			Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾		
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total	Others ³⁾	TAG	(%)	TA	(%)		SA	NA	
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25		
Solvent ¹⁾	0	—	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25		
PO	1.3	—	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0	(0.0)	0.00	—	—	
PO	2.5	—	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0	(0.0)	0.25	—	—	
PO	5.0	—	6-(18)	4	0	2	1	0	0	0	0	3	0	2	(50.0)	2	(50.0)	0.00 ⁶⁾	Tox	Tox	
MC	0.1	—	6-(18)	200	12	21	40	0	1	0	0	74	0	52*	(26.0)	46*	(23.0)	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.), f : fragment (deletion), 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. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Four cells were analyzed.

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was more than 97%.