

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 (25 \pm 3.0)	25 (8 \pm 9)	8 (9 \pm 1.0)	9 (10 \pm 1.0)				
Test substance	1.56	-	153 (141 \pm 14.3)	144 (125 \pm 14.3)	125 (15 \pm 13)	15 (14 \pm 1.2)	15 (14 \pm 1.2)	13 (15 \pm 1.2)	22 (22 \pm 5.5)	27 (16 \pm 5.5)	16 (9 \pm 7)	9 (8 \pm 1.2)	7 (9 \pm 1.2)				
	3.13	-	128 (133 \pm 6.1)	132 (140 \pm 6.1)	140 (19 \pm 16)	19 (15 \pm 4.6)	10 (15 \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)	11 (14 \pm 11.7)				
	6.25	-	146 (143 \pm 11.4)	130 (152 \pm 11.4)	152 (14 \pm 20)	14 (15 \pm 4.6)	20 (15 \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 (15 \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 (11 \pm 1.7)			
	25	-	138 (125 \pm 17.4)	131 (105 \pm 17.4)	105 (15* \pm 9*)	15* (11 \pm 3.2)	9* (11 \pm 3.2)	10* (11 \pm 3.2)	16 (22 \pm 5.3)	24 (26 \pm 5.3)	26 (10* \pm 8*)	10* (8 \pm 3.5)	4* (8 \pm 3.5)	10* (10* \pm 3.5)			
	50	-	109* (117 \pm 9.2)	115* (127* \pm 9.2)	127* (9* \pm 9*)	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 2*)	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 (13 \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 (19 \pm 4.2)				
Test substance	6.25	+	148 (149 \pm 4.6)	154 (153 \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 (10 \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 (18 \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 (17 \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 (16 \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* (12 \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		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 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)	3635 (3533 \pm 150.9)	
Positive control	Chemical		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 4.6)	207 (213 \pm 4.6)	213 (213 \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)	152 (10.7)	152 (10.7)	

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.
 **: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)	17 (6.0)	
Test substance	125	-			13 (12 \pm 10)	14 (2.1)	
	250	-			7 (7 \pm 6)	9 (1.5)	
	500	-			8 (8 \pm 8)	7 (0.6)	
	1000	-			2 (3 \pm 0)	6 (3.1)	
	2000	-			8* (10 \pm 11*)	10* (1.5)	
	Solvent control	-	+			15 (17 \pm 12)	24 (6.2)
Test substance	125	+			14 (16 \pm 15)	18 (2.1)	
	250	+			16 (15 \pm 15)	13 (1.5)	
	500	+			12 (10 \pm 9)	8 (2.1)	
	1000	+			7 (4 \pm 3)	2 (2.6)	
	2000	+			7 (8 \pm 7)	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 191)	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 285)	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 (155 \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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	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	-	-			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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01		AF2 0.1		9AA 80
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate				174 (162 \pm 10.8)	157 (157 \pm 10.8)	154 (154 \pm 10.8)		
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				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C₁₄H₂₂O₂, 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。