

# ノニルフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Nonylphenol on Bacteria

### 要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ノニルフェノールの変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法 (-S9 mix) ならびに代謝活性化法 (+S9 mix) の各菌株についてそれぞれ、0.195-200  $\mu\text{g}$ /プレートの6用量を設定し試験した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められず、再現性も確認された。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、ノニルフェノールは微生物に対し遺伝子突然変異を誘起しないものと判断した。

### 材料および方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537<sup>1)</sup> ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2uvrA<sup>2)</sup> の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学の B. N. Ames 教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年11月25日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド (DMSO: MERCK 社) を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 ml ずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

#### 2. 培地の調製

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

日清製粉(株)製のテスメディア AN 培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonner の最少培地 E を含む水溶液 (0.02% 硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2% クエン酸・1水塩, 1% リン酸カルシウム・無水塩, 0.192%

リン酸一アンモニウム, 0.066% 水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度]) に2%のグルコース (和光純薬工業(株)) と1.5%の寒天 (OXOID 社: No.1) を加え、30 ml をシャーレに分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar (DIFCO 社) 0.6% を含む0.5% 塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン (関東化学(株)) -0.5 mM D-ビオチン (関東化学(株)) 水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン (関東化学(株)) 水溶液を同じく1容量加え用いた。

#### 3. 前培養条件

内容量 200 ml の円筒容器 (ストレージボトル: Corning Costar 社) に2.5% ニュートリエントブロス (OXOID 社) 溶液を25 ml 分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{l}$  接種した。ウォーターバスシェーカー (MM-10: タイテック(株)) を用い、37℃で8時間振盪 (往復振盪: 120回/分) 培養し、試験に使用した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製 S9 mix を試験に使用した。S9 mix 中の S9 は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与した Sprague-Dawley 系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mix の組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1ml 中の量
S9	0.1 ml
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
リン酸緩衝 Na-液 (pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$

#### 5. 被験物質

被験物質のノニルフェノール (ロット番号: F1132, CAS No.: 25154-52-3) は分子式 C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O, 分子量 220.36, 純度 99.0% 以上の無色~黄色の粘調液体である。三井東圧化学(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

8.00, 40.0, 200, 1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法でネズミチフス菌の8.00  $\mu\text{g}$ /プレート以上およびWP2uvrAの40.0  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。また、代謝活性化法ではTA100, TA1535およびTA1537の40.0  $\mu\text{g}$ /プレート以上, WP2uvrAおよびTA98の200  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量において同作用が観察された。従って、本試験においては直接法のネズミチフス菌で12.5  $\mu\text{g}$ /プレートおよびWP2uvrAで50.0  $\mu\text{g}$ /プレートを、代謝活性化法ではTA100, TA1535およびTA1537で50.0  $\mu\text{g}$ /プレート, WP2uvrAおよびTA98で200  $\mu\text{g}$ /プレートを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2: 和光純薬工業(株))
- アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ : 和光純薬工業(株))
- 9-アミノアクリジン(ACR:ALDRICH社)
- 2-アミノアントラセン(2-AA: 和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法<sup>1)</sup>に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{l}$ 、次いで直接法の場合、0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{l}$ 、代謝活性化法の場合、S9 mixを500  $\mu\text{l}$ および試験菌液100  $\mu\text{l}$ を加え、37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、トップアガーを2 ml添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡( $\times 60$ )を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11: システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

試験結果をTable 1-4に示した。直接法(-S9 mix)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)のいずれとも高用量群において、ノニルフェノール処理による生育阻害作用が観察された。また、復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、S9 mix添加時試験管内で反応液が僅かに白濁したが、コロニー計数時には特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下においてノニルフェノールの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3(1976).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓  
 試験担当者: 北沢倫世, 板倉真由実  
 (財)食品農医薬品安全性評価センター  
 〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2  
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)  
 Michiyo Kitazawa, Mayumi Itakura  
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
 Pesticides (An-pyo Center)  
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,  
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan  
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol(1st trial) [direct method:-S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	85	95	97	13	17	19	17	17	23	24	31	33	10	10	6
		[ 92 $\pm$ 6]			[ 16 $\pm$ 3]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 29 $\pm$ 5]			[ 9 $\pm$ 2 ]		
Test sub.	0.195	111	84	91	17	14	11	-	-	-	26	27	28	13	8	8
		[ 95 $\pm$ 14]			[ 14 $\pm$ 3]						[ 27 $\pm$ 1]			[ 10 $\pm$ 3]		
	0.391	92	102	89	13	23	17	-	-	-	28	22	26	7	9	7
		[ 94 $\pm$ 7]			[ 18 $\pm$ 5]						[ 25 $\pm$ 3]			[ 8 $\pm$ 1]		
	0.781	95	109	101	10	17	12	-	-	-	31	16	27	9	8	5
		[102 $\pm$ 7]			[ 13 $\pm$ 4]						[ 25 $\pm$ 8]			[ 7 $\pm$ 2]		
	1.56	86	95	84	21	14	16	24	15	17	27	16	28	8	6	6
		[ 88 $\pm$ 6]			[ 17 $\pm$ 4]			[ 19 $\pm$ 5]			[ 24 $\pm$ 7]			[ 7 $\pm$ 1]		
	3.13	92	92	107	13	11	9	18	23	17	30*	13*	32*	11*	10*	12*
		[ 97 $\pm$ 9]			[ 11 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 25 $\pm$ 10]			[ 11 $\pm$ 1]		
	6.25	84*	84*	82*	10*	10*	11*	17	22	17	19*	15*	24*	7*	6*	4*
		[ 83 $\pm$ 1]			[ 10 $\pm$ 1]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 19 $\pm$ 5]			[ 6 $\pm$ 2]		
	12.5	83*	61*	75*	13*	9*	10*	16	27	16	17*	16*	25*	2*	1*	4*
		[ 73 $\pm$ 11]			[ 11 $\pm$ 2]			[ 20 $\pm$ 6]			[ 19 $\pm$ 5]			[ $\pm$ 2]		
	25.0	-	-	-	-	-	-	20*	14*	16*	-	-	-	-	-	-
								[ 17 $\pm$ 3]								
	50.0	-	-	-	-	-	-	14*	22*	14*	-	-	-	-	-	-
								[ 17 $\pm$ 5]								
Positive control		466	378	397 <sup>a)</sup>	517	517	487 <sup>b)</sup>	112	117	116 <sup>a)</sup>	575	543	551 <sup>c)</sup>	465	551	438 <sup>d)</sup>
		[414 $\pm$ 46]			[507 $\pm$ 17]			[115 $\pm$ 3]			[556 $\pm$ 17]			[485 $\pm$ 59]		

# : Solvent control \* : The background lawn was thin - : Not tested

a) : AF-2;2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) :  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) : AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

Table 2. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (1st trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	87	94	97	9	15	12	32	36	24	37	34	36	15	15	19
		[ 93 $\pm$ 5]			[ 12 $\pm$ 3]			[ 31 $\pm$ 6]			[ 36 $\pm$ 2]			[ 16 $\pm$ 2]		
Test sub.	1.56	105	94	92	11	21	14	-	-	-	-	-	-	19	13	12
		[ 97 $\pm$ 7]			[ 15 $\pm$ 5]									[ 15 $\pm$ 4]		
	3.13	112	116	114	15	18	23	-	-	-	-	-	-	17	18	22
		[114 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 4]			[ 19 $\pm$ 3]								
	6.25	126	95	91	13	16	9	25	21	31	38	36	32	17	12	9
		[104 $\pm$ 19]			[ 13 $\pm$ 4]			[ 26 $\pm$ 5]			[ 35 $\pm$ 3]			[ 13 $\pm$ 4]		
	12.5	124	105	100	16	13	16	17	20	33	35	34	36	17	18	7
		[110 $\pm$ 13]			[ 15 $\pm$ 2]			[ 23 $\pm$ 9]			[ 35 $\pm$ 1]			[ 14 $\pm$ 6]		
	25.0	100	114	94	16	8	12	25	17	30	54	50	57	9	12	17
		[103 $\pm$ 10]			[ 12 $\pm$ 4]			[ 24 $\pm$ 7]			[ 54 $\pm$ 4]			[ 13 $\pm$ 4]		
	50.0	87*	97*	95*	8*	10*	16*	21	28	29	46	42	38	9*	17*	14*
		[ 93 $\pm$ 5]			[ 11 $\pm$ 4]			[ 26 $\pm$ 4]			[ 42 $\pm$ 4]			[ 13 $\pm$ 4]		
	100	-	-	-	-	-	-	30*	24*	31*	34*	32*	31*	-	-	-
								[ 28 $\pm$ 4]			[ 32 $\pm$ 2]					
	200	-	-	-	-	-	-	16*	15*	18*	25*	25*	29*	-	-	-
								[ 16 $\pm$ 2]			[ 26 $\pm$ 2]					
Positive control		866	793	819 <sup>a)</sup>	483	592	538 <sup>b)</sup>	811	845	824 <sup>c)</sup>	374	306	338 <sup>d)</sup>	186	149	170 <sup>b)</sup>
		[826 $\pm$ 37]			[538 $\pm$ 55]			[827 $\pm$ 17]			[339 $\pm$ 34]			[168 $\pm$ 19]		

# : Solvent control \* : The background lawn was thin - : Not tested

a) : 2-AA;2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) : 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) : 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) : 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (2nd trial) [direct method:-S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	106	93	98	11	10	12	27	19	24	18	26	24	10	7	9
		[99 $\pm$ 7]			[11 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 4]			[23 $\pm$ 4]		[9 $\pm$ 2]			
Test sub.	0.195	100	108	103	14	14	13	-	-	-	24	29	31	10	12	8
		[104 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 1]						[28 $\pm$ 4]		[10 $\pm$ 2]			
	0.391	105	105	109	16	15	13	-	-	-	25	29	32	10	12	9
		[106 $\pm$ 2]			[15 $\pm$ 2]						[29 $\pm$ 4]		[10 $\pm$ 2]			
	0.781	103	106	102	15	11	15	-	-	-	27	28	32	9	7	7
		[104 $\pm$ 2]			[14 $\pm$ 2]						[29 $\pm$ 3]		[8 $\pm$ 1]			
	1.56	94	107	99	16	14	16	15	14	16	30	23	25	10	5	6
		[100 $\pm$ 7]			[15 $\pm$ 1]			[15 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 4]		[7 $\pm$ 3]			
3.13	101*	104*	101*	13	13	14	23	19	21	24	25	33	7*	9*	13*	
	[102 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 1]			[21 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 5]		[10 $\pm$ 3]				
6.25	79*	83*	85*	11*	14*	14*	20	24	19	20*	14*	20*	6*	5*	4*	
	[82 $\pm$ 3]			[13 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 3]			[18 $\pm$ 3]		[5 $\pm$ 1]				
12.5	82*	76*	85*	5*	8*	10*	19	21	23	16*	16*	22*	3*	6*	3*	
	[81 $\pm$ 5]			[8 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 3]		[4 $\pm$ 2]				
25.0	-	-	-	-	-	-	16*	18*	15*	-	-	-	-	-	-	
							[16 $\pm$ 2]									
50.0	-	-	-	-	-	-	12*	13*	13*	-	-	-	-	-	-	
							[13 $\pm$ 1]									
Positive control		432	403	397 <sup>a)</sup>	460	557	453 <sup>b)</sup>	127	134	100 <sup>a)</sup>	526	527	473 <sup>c)</sup>	613	591	463 <sup>d)</sup>
		[411 $\pm$ 19]			[490 $\pm$ 58]			[120 $\pm$ 18]			[509 $\pm$ 31]		[556 $\pm$ 81]			

#: Solvent control    \*: The background lawn was thin    -: Not tested  
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d): ACR; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (2nd trial) [activation method:+S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]															
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
DMSO#	0	97	91	102	16	18	15	29	32	22	40	39	29	17	16	16	
		[97 $\pm$ 6]			[16 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 5]			[36 $\pm$ 6]		[16 $\pm$ 1]				
Test sub.	1.56	102	99	105	16	14	16	-	-	-	-	-	-	17	14	17	
		[102 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 1]									[16 $\pm$ 2]			
	3.13	97	100	110	14	15	14	-	-	-	-	-	-	14	19	14	
		[102 $\pm$ 7]			[14 $\pm$ 1]										[16 $\pm$ 3]		
	6.25	99	106	100	14	17	14	32	25	34	40	31	41	17	14	17	
		[102 $\pm$ 4]			[15 $\pm$ 2]			[30 $\pm$ 5]			[37 $\pm$ 6]		[16 $\pm$ 2]				
	12.5	114	102	96	15	17	16	21	33	29	37	33	31	13	16	15	
		[104 $\pm$ 9]			[16 $\pm$ 1]			[28 $\pm$ 6]			[34 $\pm$ 3]		[15 $\pm$ 2]				
25.0	105*	101*	107*	15	14	7	36	30	33	40	44	34	13	13	12		
	[104 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 4]			[33 $\pm$ 3]			[39 $\pm$ 5]		[13 $\pm$ 1]					
50.0	102*	101*	94*	8*	11*	11*	31	31	32	30	29	35	14*	8*	9*		
	[99 $\pm$ 4]			[10 $\pm$ 2]			[31 $\pm$ 1]			[31 $\pm$ 3]		[10 $\pm$ 3]					
100	-	-	-	-	-	-	24*	21*	23*	28*	22*	37*	-	-	-		
							[23 $\pm$ 2]			[29 $\pm$ 8]							
200	-	-	-	-	-	-	24*	23*	21*	33*	22*	24*	-	-	-		
							[23 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 6]							
Positive control		646	660	634 <sup>a)</sup>	360	414	432 <sup>b)</sup>	611	786	719 <sup>c)</sup>	316	276	335 <sup>d)</sup>	140	127	127 <sup>b)</sup>	
		[647 $\pm$ 13]			[402 $\pm$ 37]			[705 $\pm$ 88]			[309 $\pm$ 30]		[131 $\pm$ 8]				

#: Solvent control    \*: The background lawn was thin    -: Not tested  
a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d): 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of Nonylphenol  
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ノニルフェノールの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。細胞増殖抑制試験結果を基に、細胞毒性が観察される濃度を最高用量として設定した。すなわち、連続24時間処理法で6.25, 12.5, 25.0および50.0  $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理法で3.13, 6.25, 12.5および25.0  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法(6時間処理の+S9 mixおよび-S9 mix)で7.50, 15.0, 30.0および60.0  $\mu\text{g/ml}$ の4用量(公比2)について染色体標本作製した後、顕微鏡観察を実施した。細胞の増殖が強く抑制される用量まで検討した結果、連続処理法ならびに短時間処理法のいずれとも染色体異常、すなわち構造異常あるいは倍数性細胞の誘発は認められなかった。一方、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC(MMC)および短時間処理+S9 mixの陽性対照物質シクロホスファミド(CP)は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、ノニルフェノールには染色体異常を誘起する可能性がないものと判断した。

材料および方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数32の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000 mlの精製水で溶解した後、2.2 gの炭酸水素ナトリウム(関東化学株)を加えた。1N塩酸を用いてpHを7.2に調整した後、メンブランフィルター(0.2  $\mu\text{m}$ :Gelman Sciences社)を用いて加圧濾過除菌した。非働化(56 $^{\circ}\text{C}$ , 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。

3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機株)を用い、CO<sub>2</sub>濃度5%、37 $^{\circ}\text{C}$ の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン株製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った<sup>1)</sup>。

5. 被験物質

被験物質のノニルフェノール(ロット番号:F1132, CAS No.:25154-52-3)は分子式C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O、分子量220.36、純度99.0%以上の無色~黄色の粘調液体である。三井東圧化学株から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質溶液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix存在下(+S9 mix)あるいは非存在下(-S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業株)で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学株)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール, 1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち細胞生存率を算出した。

その結果、いずれの処理法においても顕著な細胞増殖抑制が観察された(Fig. 1)。プロビット法あるいは対数確立紙を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は連続24時間処理で23.2  $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理で25.9  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間+S9 mix処理で31.8  $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9 mix処理で29.3  $\mu\text{g/ml}$ であった。

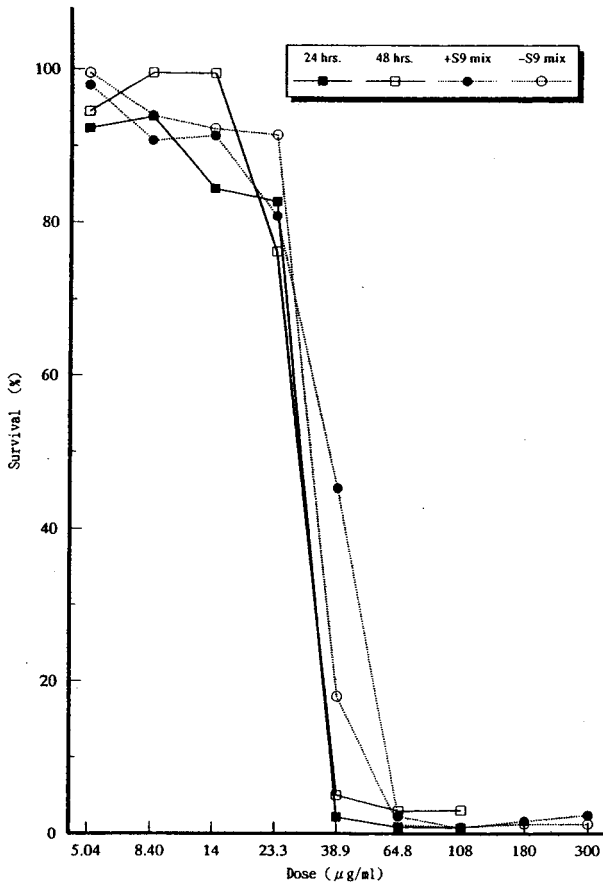


Fig. 1 Dose-survival curves of nonylphenol

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果を基に、染色体異常試験では連続24時間処理で50.0 µg/ml, 同48時間処理で25.0 µg/ml, 短時間処理法で60.0 µg/mlを最高用量とし、以下公比2で減じた計4用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理法の場合、マイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業株)を、24時間処理で0.05 µg/ml, 48時間処理で0.025 µg/mlの用量で、短時間処理法の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬株)を、12.5 µg/mlの用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 µg/mlとなるようコルセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個, すなわち用量当たり200個

の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。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<sup>2)</sup>による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合(+gap)と、含まない場合(-gap)とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら<sup>3)</sup>の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が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。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。ノニルフェノール処理群の場合、24時間ならびに48時間処理のいずれにおいても最高用量で強い細胞毒性作用が観察された。しかしながら、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、+S9 mixならびに-S9 mixの最高用量で細胞毒性作用が認められたものの、いずれの用量においても染色体構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。また、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下においてノニルフェノールの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat Res.*, **66**, 277(1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 31-35.
- 3) 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, 東京, 1987, pp. 19-24.

Table 1. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [long-term treatment]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
Test Sub.	6.25	24	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	0.0	-
	12.5	24	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
	25.0	24	200	1	1	0	1	2	0	2.5	2.0	0.5	-
	50.0	24	Toxic										
	MMC**	0.05	24	200	19	49	0	95	1	0	65.5	61.5	0.5
DMSO*	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
Test Sub.	3.13	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.0	-
	6.25	48	200	0	0	1	5	0	0	2.5	2.5	0.0	-
	12.5	48	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	25.0	48	Toxic										
	MMC**	0.025	48	200	14	47	0	91	6	0	60.0	59.0	1.0

\*: Solvent control    \*\*: Positive control (mitomycin C)

ctb: chromatid break    csb: chromosome break    cte: chromatid exchange    cse: chromosome exchange    oth: others

Table 2. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [short-term treatment]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	+	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-
Test Sub.	7.50	+	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
	15.0	+	6	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	30.0	+	6	200	0	0	0	2	1	0	1.5	1.5	3.0	-
	60.0	+	6	200	2	1	0	6	0	0	4.0	3.5	0.0	-
	CP**	12.5	+	6	200	7	17	0	66	1	0	39.5	38.0	0.0
DMSO*	0	-	6	200	4	0	1	1	1	0	3.5	1.5	1.0	-
Test Sub.	7.50	-	6	200	1	0	0	2	1	0	2.0	1.5	1.0	-
	15.0	-	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	30.0	-	6	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	0.5	-
	60.0	-	6	Toxic										
	CP**	12.5	-	6	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0

\*: Solvent control    \*\*: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: chromatid break    csb: chromosome break    cte: chromatid exchange    cse: chromosome exchange    oth: others

連絡先

試験責任者：中嶋 圓  
試験担当者：北沢倫世，菊池正憲，勝俣 勇  
(財)食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2  
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)  
Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi  
Isami Katsumata  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,  
Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393