食薬セ研第１０－１６４６号

２０００年１２月　１日

４－エチルフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局　委託

財団法人食品薬品安全センター
秦　野　研　究　所

【目　　次】

	頁
要　　約	1
緒　　言	2
材料および方法	3
結果および考察	7
文　　献	9
Tables　　1～3	

【要　　約】

4-エチルフェノールの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0～5000 μg/プレート の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験でともに 1500 μg/プレート 以上の用量で抗菌性が認められた。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験について 62.5～2000 μg/プレート の範囲で6用量を設定して実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかったことから、4-エチルフェノールは、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。

【緒　　言】

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、4-エチルフェノールについて、細菌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[1]により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異[2]、ならびに大腸菌（*Escherichia coli*）におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異[3]を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 S9 mix 添加試験とからなっている。

この試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成9年10月31日、環保安第 287号、衛生第 127号、平成09・10・31基局第2号）および「OECD 毒性試験ガイドライン：471」に準拠し、「化学物質 GLP基準」（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。

【材料および方法】

1．被験物質

4-エチルフェノール（CAS No. 123-07-9）は、分子式 $C_8H_{10}O$、分子量 122.16 の白色結晶である。構造式等は Appendix 1に示した。用いた被験物質は、ロット番号　　純度 98.328%（キャピラリーGC）であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

本被験物質は、ジメチルスルホキシド（DMSO、ロット番号：ACQ2095、和光純薬工業㈱）に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。

50 mg/mL 溶液の調製時に、発熱、発泡、変色等の変化は認められなかったことから、被験物質は溶媒中で安定であることが確認された。

2．陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれ Table 中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド	(AF2、和光純薬工業㈱　ロット番号 WTQ0059、　純度98%以上)
アジ化ナトリウム	(SA、和光純薬工業㈱　ロット番号 DLL3931、　純度98%以上)
9-アミノアクリジン	(9AA、Sigma Chem. Co. ロット番号 106F06681、純度97%以上)
2-アミノアントラセン	(2AA、和光純薬工業㈱　ロット番号 DLH6052、　純度90%以上)

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製したものを－20℃で凍結保存し、解凍後速やかに試験に用いた。

3．検定菌

試験には、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの　　から分与された。

検定菌は－80℃で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異（*rfa*）およびアンピシリン耐性因子 pKM 101（プラスミド）の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2（Oxoid Ltd.）を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。分光光度計により 660 nm の吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。試験に用いた検定菌液の、段階希釈法により求めた生菌数を Appendix 2に示した。

4．試験材料

1）合成培地

培地は、極東製薬工業㈱製の最少グルコース寒天培地（ロット番号：HY3902、1998年9月17日製造）を用いた。なお、培地1Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天（清水食品）	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

2）トップアガー

下記の水溶液（A）および（B）または（C）を容量比 10:1 の割合で混合した。

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

(C) *Escherichia coli* 用

L-トリプトファン	0.5 mM

3） S9 mix

S9 mix 1 mL あたりの組成は下記のとおりである。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）	100 μmol

* ：7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9（キッコーマン㈱、ロット番号：RAA-389、1998年8月21日製造）を購入し、-80℃で凍結保存し、用時に解凍して用いた。

5．試験操作

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、リン酸緩衝液 0.5 mL（S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 mL）、検定菌液 0.1 mL を混合し、37℃で20分間プレインキュベーションしたのち、トップアガー 2 mL を加えて混和し、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使用溶媒（陰性対照）または陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37℃で48時間行い、発生した変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は、肉眼により観察した。また、抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断し

た。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認を行った。

6．判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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】

1．用量設定試験

「新規化学物質等に係る試験の方法について」および「OECD 毒性試験ガイドライン：471」の記載に準拠し、50.0～5000 μg/プレート の範囲で公比を約3として、試験を実施した（Table 1）。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても 1500 μg/プレート 以上の用量で抗菌性が認められた。被験物質に由来する沈殿はすべての用量で認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 2000 μg/プレート とした。

2．本試験

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、62.5～2000 μg/プレート の範囲で公比を2として6用量を設定して2回の本試験を実施した（Table 2、3）。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

すべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、陰性対照値とともに計測された変異コロニー数は背景データ（Appendix 3）の変動範囲内（平均値±3×標準偏差）であったことから、本試験系の有効性が確認された。

4-エチルフェノールは、当研究所で本試験と並行して実施した、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では染色体の構造異常が誘発され、陽性であった[4]。また、関連物質である 4-(1-メチルプロピル) フェノールについては、復帰突然変異試験および染色体異常試験で陰性の結果が[5]、また、3-エチルフェノール[6,7]および *p-tert*-ブチルフェノール[8]については、復帰突然変異試験で陰性、染色体異常試験で陽性の結果が得られている。

以上の結果に基づき、4-エチルフェノールは、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）Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds, Springer, Berlin (1980) pp. 273-285

2）Maron, D.M., Ames, B.N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113 : 173-215 (1983)

3）Green, M.H.L. : Mutagen testing using Trp^+ reversion in *Escherichia coli*. in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187

4）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修，"化学物質毒性試験報告，" Vol.8, 化学物質点検推進連絡協議会，東京，2000（投稿準備中）

5）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修，"化学物質毒性試験報告，" Vol.2, 化学物質点検推進連絡協議会，東京，1995, pp. 329-351.

6）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修，"化学物質毒性試験報告，" Vol.8, 化学物質点検推進連絡協議会，東京，2000（投稿準備中）

7）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修，"化学物質毒性試験報告，" Vol.8, 化学物質点検推進連絡協議会，東京，2000（投稿準備中）

8）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修，"化学物質毒性試験報告，" Vol.4, 化学物質点検推進連絡協議会，東京，1996, pp. 277-304.

Table 1. Cytotoxicity of 4-Ethylphenol on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)				
		Base - pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	154 134 139 (142 ± 10.4)	8 13 12 (11 ± 2.6)	18 20 28 (22 ± 5.3)	29 25 33 (29 ± 4.0)	13 15 15 (14 ± 1.2)
	50.0	170	8	22	23	11
	150	160	6	22	14	11
	500	161	11	16	20	17
	1500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	0	149 159 132 (147 ± 13.7)	14 12 15 (14 ± 1.5)	24 31 33 (29 ± 4.7)	42 34 36 (37 ± 4.2)	18 17 18 (18 ± 0.6)
	50.0	171	12	20	51	12
	150	195	20	26	33	12
	500	182	15	21	25	15
	1500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies / plate	599 623 632 (618 ± 17.1)	645 647 602 (631 ± 25.4)	226 267 247 (247 ± 20.5)	666 676 658 (667 ± 9.0)	556 615 462 (544 ± 77.2)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	830 869 860 (853 ± 20.4)	520 378 434 (444 ± 71.5)	781 749 793 (774 ± 22.7)	398 402 404 (401 ± 3.1)	336 379 352 (356 ± 21.7)

The purity of the test substance was 98.328%.

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.

Table 2. Mutagenicity of 4-Ethylphenol on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	137	138	138	6	11	12	32	22	19	20	28	23	15	15	12
		(138 ± 0.6)			(10 ± 3.2)			(24 ± 6.8)			(24 ± 4.0)			(14 ± 1.7)		
	62.5	140	140	130	10	8	15	23	29	25	19	26	24	9	10	14
		(137 ± 5.8)			(11 ± 3.6)			(26 ± 3.1)			(23 ± 3.6)			(11 ± 2.6)		
	125	144	136	152	9	14	9	16	22	20	25	20	19	14	2	2
		(144 ± 8.0)			(11 ± 2.9)			(19 ± 3.1)			(21 ± 3.2)			(6 ± 6.9)		
	250	145	105	131	7	9	13	19	18	28	14	22	20	5	15	10
		(127 ± 20.3)			(10 ± 3.1)			(22 ± 5.5)			(19 ± 4.2)			(10 ± 5.0)		
	500	141	129	140	9	10	8	15	20	20	18	25	18	14	14	11
		(137 ± 6.7)			(9 ± 1.0)			(18 ± 2.9)			(20 ± 4.0)			(13 ± 1.7)		
	1000	47 *	49 *	54 *	5 *	2 *	2 *	17	21	23	7 *	16 *	3 *	4 *	2 *	0 *
		(50 ± 3.6)			(3 ± 1.7)			(20 ± 3.1)			(9 ± 6.7)			(2 ± 2.0)		
	2000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
		(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)		
S9 mix (+)	0	176	146	154	8	10	10	25	28	27	38	29	26	9	14	19
		(159 ± 15.5)			(9 ± 1.2)			(27 ± 1.5)			(31 ± 6.2)			(14 ± 5.0)		
	62.5	174	182	172	10	12	12	34	31	24	36	23	23	15	17	14
		(176 ± 5.3)			(11 ± 1.2)			(30 ± 5.1)			(27 ± 7.5)			(15 ± 1.5)		
	125	157	175	179	8	11	13	29	27	19	34	32	33	15	16	12
		(170 ± 11.7)			(11 ± 2.5)			(25 ± 5.3)			(33 ± 1.0)			(14 ± 2.1)		
	250	181	163	188	12	16	15	23	28	21	27	29	34	10	14	11
		(177 ± 12.9)			(14 ± 2.1)			(24 ± 3.6)			(30 ± 3.6)			(12 ± 2.1)		
	500	165	158	160	15	10	11	20	20	20	28	35	35	21	12	18
		(161 ± 3.6)			(12 ± 2.6)			(20 ± 0.0)			(33 ± 4.0)			(17 ± 4.6)		
	1000	136	132	119	3	9	7	18	20	16	22	20	23	5	12	9
		(129 ± 8.9)			(6 ± 3.1)			(18 ± 2.0)			(22 ± 1.5)			(9 ± 3.5)		
	2000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
		(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	598	557	565	714	702	739	183	260	252	639	628	654	380	585	453
		(573 ± 21.7)			(718 ± 18.9)			(232 ± 42.3)			(640 ± 13.1)			(473 ± 103.9)		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	980	1121	1117	459	402	408	777	891	969	490	535	485	348	395	364
		(1073 ± 80.3)			(423 ± 31.3)			(879 ± 96.6)			(503 ± 27.5)			(369 ± 23.9)		

The purity of the test substance was 98.328%.

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.

Table 3. Mutagenicity of 4-ethylphenol on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	134	163	129	13	13	11	26	22	31	24	26	19	7	12	7
		(142 ± 18.4)			(12 ± 1.2)			(26 ± 4.5)			(23 ± 3.6)			(9 ± 2.9)		
	62.5	156	124	142	10	8	11	28	12	21	29	18	27	11	17	7
		(141 ± 16.0)			(10 ± 1.5)			(20 ± 8.0)			(25 ± 5.9)			(12 ± 5.0)		
	125	157	145	159	16	12	15	13	12	14	24	27	16	16	11	9
		(154 ± 7.6)			(14 ± 2.1)			(13 ± 1.0)			(22 ± 5.7)			(12 ± 3.6)		
	250	175	159	113	10	17	4	22	20	16	24	17	18	10	9	8
		(149 ± 32.2)			(10 ± 6.5)			(19 ± 3.1)			(20 ± 3.8)			(9 ± 1.0)		
	500	151	150	150	13	8	14	13	12	13	24	28	17	11	9	10
		(150 ± 0.6)			(12 ± 3.2)			(13 ± 0.6)			(23 ± 5.6)			(10 ± 1.0)		
	1000	59 *	92 *	75 *	2 *	5 *	2 *	17	18	15	5 *	6 *	12 *	3 *	2 *	3 *
		(75 ± 16.5)			(3 ± 1.7)			(17 ± 1.5)			(8 ± 3.8)			(3 ± 0.6)		
	2000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
		(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)		
S9 mix (+)	0	148	144	132	8	12	12	28	19	20	31	34	34	10	18	16
		(141 ± 8.3)			(11 ± 2.3)			(22 ± 4.9)			(33 ± 1.7)			(15 ± 4.2)		
	62.5	162	168	152	11	10	14	29	31	27	42	35	29	18	17	17
		(161 ± 8.1)			(12 ± 2.1)			(29 ± 2.0)			(35 ± 6.5)			(17 ± 0.6)		
	125	193	185	186	16	21	11	25	25	29	25	27	45	14	6	11
		(188 ± 4.4)			(16 ± 5.0)			(26 ± 2.3)			(32 ± 11.0)			(10 ± 4.0)		
	250	176	157	160	13	10	15	18	26	21	24	26	28	20	19	17
		(164 ± 10.2)			(13 ± 2.5)			(22 ± 4.0)			(26 ± 2.0)			(19 ± 1.5)		
	500	150	172	152	8	16	12	17	32	28	41	40	37	15	14	15
		(158 ± 12.2)			(12 ± 4.0)			(26 ± 7.8)			(39 ± 2.1)			(15 ± 0.6)		
	1000	130	124	119	1	5	10	32	29	23	33	20	30	5	17	13
		(124 ± 5.5)			(5 ± 4.5)			(28 ± 4.6)			(28 ± 6.8)			(12 ± 6.1)		
	2000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
		(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	637	601	526	792	701	662	260	236	212	622	586	637	507	568	625
		(588 ± 56.6)			(718 ± 66.7)			(236 ± 24.0)			(615 ± 26.2)			(567 ± 59.0)		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	939	994	968	324	358	433	825	803	912	478	427	428	386	322	395
		(967 ± 27.5)			(372 ± 55.8)			(847 ± 57.6)			(444 ± 29.2)			(368 ± 39.8)		

The purity of the test substance was 98.328%.

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.