



para-tert-ブチルフェノールの
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
結 論	8
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

p-tert-ブ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ート法により用量設定試験および本試験を行った。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、S9 mix 無添加では 500 μg /プレート 以上 (WP2 *uvrA* は 1500 μg /プレート 以上)、S9 mix 添加では 500 μg /プレート 以上 (TA98, WP2 *uvrA* は 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 無添加試験を 15.6~500 μg /プレート (WP2 *uvrA* は 31.3~1000 μg /プレート)、S9 mix 添加試験を 15.6~500 μg /プレート (TA98, WP2 *uvrA* は 31.3~1000 μg /プレート) の範囲で用量を設定し、試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれにおいても溶媒対照値の2倍以上となる用量依存性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、*p-tert*-ブチルフェノールは、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、*p-tert*-ブ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突然変異⁽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突然変異⁽²⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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、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毒性試験ガイドライン：471、472」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】

〔検定菌〕

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

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、
から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に
から分与
を受けた。

検定菌は -80°C 以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について行った。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、 37°C で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-ブチルフェノール (PTBP、CAS No. 98-54-4) は、分子量 150.22 の白色フレークである。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 99.9% (不純物: 2,6-*ditert*-ブチルフェノール 16 ppm、2,4-*ditert*-ブチルフェノール 103 ppm、*o-tert*-ブチルフェノール 2 ppm、フェノール 18 ppm) であり、(株)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

PTBP は、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: KCL2807、和光純薬工業(株)) に 10 mg/ml、20 mg/ml または 50 mg/ml になるように溶解した後、同溶媒で公比約 3 ないし 2 で希釈し、速やかに試験に用いた。

PTBP の DMSO 溶液中での安定性試験および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、低濃度 (156 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液は当該試験の本試験 I で調製したものについて、また高濃度 (16.0 mg/ml) 溶液は当研究所で実施した染色体異常試

験 (G-94-016) で調製したものについて、室温遮光条件下で、調製後 4 時間までの安定性を調べた。その結果、調製 4 時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値 (0 時間) の平均値に対して、97.6 および 101% であった。これらの値は当研究所で規定している基準内 (4 時間後における平均含量が初期値の 90% 以上) であった (Appendix 2、3)。

また、本試験 I で調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内 (溶媒中での平均含量が添加量の 90~110%) であった (Appendix 4)。

[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。

AF2	: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬(株) ロット番号 46, 純度 99.9%)
SA	: アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株) ロット番号 TWR3330, 純度 90% 以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co. ロット番号 96F05641, 純度 98% 以上)
2AA	: 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株) ロット番号 DSF2950, 純度 90% 以上)

AF2, 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを -20°C で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

[培地および S9 mix 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%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオニン	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 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)製の最少寒天培地（ロット番号：DJ030HJ、1994年8月11日製造）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	0.2 g	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バクテリア（Difco）	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g		

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix (1 ml 中下記の成分を含む)

^{**} S9	0.1 ml	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 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(株)、ロット番号 RAA-309、1994年5月13日製造および RAA-317、同年10月27日製造)を用いた。PB および BF の投与量は 1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したもので、ラットの解剖および S9 の調製は 5 日目であった。

[試験方法]

プレート法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、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使用溶媒、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各 Table 中に示した。培養は 37°C で 48 時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。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、溶媒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。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。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、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、溶媒対照のそれに比べて2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。ただし、本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。PTBPについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験では WP2 *uvrA* において 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他は 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では TA98 と WP2 *uvrA* において 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他は 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量を、S9 mix 無添加試験では 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (WP2 *uvrA* は 1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とし、S9 mix 添加試験では 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA98, WP2 *uvrA* は 1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。PTBPの用量を、S9 mix 無添加試験では 15.6~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (WP2 *uvrA* は 31.3~1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$)、S9 mix 添加試験では 15.6~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA98 と WP2 *uvrA* は 31.3~1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) の範囲で公比を 2 として設定し試験を実施した。本試験 I の TA1537 において、S9 mix 無添加試験の 125 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量でのみ変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍以上となったが、用量依存性は認められなかった。その他については、2 回の試験のいずれも、S9 mix 無添加試験および添加試験において、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。

PTBPについて実施したすべての試験において、陽性対照群ではいずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

以上の結果に基づき、*p-tert*-ブチルフェノールは、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。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態、および試験計画書からの逸脱はなかった。

【文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp.161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of p-tert-butylphenol ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	137	90	97	11	16	13	24	29	20	16	26	28	9	8	10	
		(108 \pm 25.4)			(13 \pm 2.5)			(24 \pm 4.5)			(23 \pm 6.4)			(9 \pm 1.0)			
	50	104			12			30			21			16			
	150	80			11			24			29			5			
	500	0 *			0 *			20			10 *			3 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
S9mix (+)	0	128	134	117	14	13	9	30	30	23	31	41	28	12	15	13	
		(126 \pm 8.6)			(12 \pm 2.6)			(28 \pm 4.0)			(33 \pm 6.8)			(13 \pm 1.5)			
	50	128			8			18			37			18			
	150	127			11			24			26			19			
	500	88 *			7 *			18			36			14 *			
	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	643	622	606	244	294	335	163	143	130	891	862	816	1240	970	1230	
	(624 \pm 18.6)			(291 \pm 45.6)			(145 \pm 16.6)			(856 \pm 37.8)			(1147 \pm 153.1)				
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate	1467	1261	941	253	311	356	1664	1692	1470	475	451	463	152	150	139	
	(1223 \pm 265.1)			(307 \pm 51.6)			(1609 \pm 120.9)			(463 \pm 12.0)			(147 \pm 7.0)				

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 99.9% and 2,6-ditert-butylphenol (16 ppm), 2,4-ditert-butylphenol (103 ppm), o-tert-butylphenol (2 ppm), phenol (18ppm), were contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of p-tert-butylphenol ** 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			WP2uvrA			TA98			TA1537							
S9mix (-)	0	115	127	83	11	9	13	24	20	18	21	18	22	8	7	7	(108± 22.7)	(11± 2.0)	(21± 3.1)	(20± 2.1)	(7± 0.6)
	15.6	116	97	102	13	14	11	ND			20	21	17	5	9	9	(105± 9.8)	(13± 1.5)		(19± 2.1)	(8± 2.3)
	31.3	101	105	104	10	6	7	35	27	27	26	26	30	10	9	7	(103± 2.1)	(8± 2.1)	(30± 4.6)	(27± 2.3)	(9± 1.5)
	62.5	104	120	112	17	12	16	26	23	23	19	14	19	11	9	11	(112± 8.0)	(15± 2.6)	(24± 1.7)	(17± 2.9)	(10± 1.2)
	125	108	115	101	10	6	11	34	33	25	22	23	20	15	23	12	(108± 7.0)	(9± 2.6)	(31± 4.9)	(22± 1.5)	(17± 5.7)
	250	96	97	114	15	17	12	29	26	21	12	20	29	17	12	10	(102± 10.1)	(15± 2.5)	(25± 4.0)	(20± 8.5)	(13± 3.6)
	500	97 *	83 *	84 *	2 *	6 *	5 *	24	13	18	18 *	10 *	9 *	5 *	5 *	7 *	(88± 7.8)	(4± 2.1)	(18± 5.5)	(12± 4.9)	(6± 1.2)
	1000							0 *	0 *	0 *											
S9mix (+)	0	123	144	155	7	12	10	22	38	23	37	41	32	12	14	15	(141± 16.3)	(10± 2.5)	(28± 9.0)	(37± 4.5)	(14± 1.5)
	15.6	136	138	135	13	15	10	ND			ND			15	21	14	(136± 1.5)	(13± 2.5)			(17± 3.8)
	31.3	133	122	144	16	18	12	31	40	24	35	32	28	25	19	14	(133± 11.0)	(15± 3.1)	(32± 8.0)	(32± 3.5)	(19± 5.5)
	62.5	128	133	129	16	11	10	34	27	25	37	33	26	24	23	14	(130± 2.6)	(12± 3.2)	(29± 4.7)	(32± 5.6)	(20± 5.5)
	125	139	133	120	12	13	15	28	28	25	31	42	34	19	14	12	(131± 9.7)	(13± 1.5)	(27± 1.7)	(36± 5.7)	(15± 3.6)
	250	126	130	151	8	14	9	39	31	28	35	32	33	17	15	14	(136± 13.4)	(10± 3.2)	(33± 5.7)	(33± 1.5)	(15± 1.5)
	500	105 *	112 *	118 *	6 *	2 *	18 *	25	24	24	26	27	40	10 *	11 *	14 *	(112± 6.5)	(9± 8.3)	(24± 0.6)	(31± 7.8)	(12± 2.1)
	1000							8 *	15 *	12 *	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							
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	2008	1637	1544	212	229	230	1407	1386	1261	573	498	438	262	217	221	(1730± 245.5)	(224± 10.1)	(1351± 78.9)	(503± 67.6)	(233± 24.9)

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 99.9% and 2,6-ditert-butylphenol (16 ppm), 2,4-ditert-butylphenol (103 ppm), o-tert-butylphenol (2 ppm), phenol (18ppm), were contained as impurity.

ND: Not done

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of p-tert-butylphenol ** 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			WP2uvrA			TA98			TA1537							
S9mix (-)	0	102	98	89	16	13	12	23	22	21	27	19	27	5	11	10	(96± 6.7)	(14± 2.1)	(22± 1.0)	(24± 4.6)	(9± 3.2)
	15.6	99	80	102	12	10	9	ND	ND	ND	23	18	20	9	9	6	(94± 11.9)	(10± 1.5)	(20± 2.5)	(8± 1.7)	
	31.3	110	88	98	15	13	22	30	25	39	37	16	27	11	11	4	(99± 11.0)	(17± 4.7)	(31± 7.1)	(27± 10.5)	(9± 4.0)
	62.5	93	96	102	13	15	14	22	30	23	19	18	28	12	8	9	(97± 4.6)	(14± 1.0)	(25± 4.4)	(22± 5.5)	(10± 2.1)
	125	101	108	89	14	15	25	24	21	17	23	26	31	7	11	5	(99± 9.6)	(18± 6.1)	(21± 3.5)	(27± 4.0)	(8± 3.1)
	250	98	104	84	15	16	8	21	17	21	22	20	15	10	11	4	(95± 10.3)	(13± 4.4)	(20± 2.3)	(19± 3.6)	(8± 3.8)
	500	77 *	69 *	87 *	5 *	9 *	7 *	12 *	12 *	17 *	10 *	17 *	20 *	4 *	5 *	0 *	(78± 9.0)	(7± 2.0)	(14± 2.9)	(16± 5.1)	(3± 2.6)
	1000							0 *	18 *	0 *									(6± 10.4)		
S9mix (+)	0	100	112	109	14	10	8	30	25	29	40	31	37	5	18	12	(107± 6.2)	(11± 3.1)	(28± 2.6)	(36± 4.6)	(12± 6.5)
	15.6	99	99	93	10	16	11	ND	ND	ND	ND	ND	13	20	11	(97± 3.5)	(12± 3.2)			(15± 4.7)	
	31.3	117	87	101	16	13	16	42	27	20	34	32	36	15	19	18	(102± 15.0)	(15± 1.7)	(30± 11.2)	(34± 2.0)	(17± 2.1)
	62.5	131	102	133	11	19	15	31	36	45	31	40	37	14	10	12	(122± 17.3)	(15± 4.0)	(37± 7.1)	(36± 4.6)	(12± 2.0)
	125	103	115	90	21	11	11	27	26	33	48	34	34	16	20	16	(103± 12.5)	(14± 5.8)	(29± 3.8)	(39± 8.1)	(17± 2.3)
	250	120	110	84	15	12	16	37	37	34	42	42	35	10	12	6	(105± 18.6)	(14± 2.1)	(36± 1.7)	(40± 4.0)	(9± 3.1)
	500	79 *	79 *	79 *	9 *	5 *	9 *	27	33	34	34	34	39	14 *	18 *	15 *	(79± 0.0)	(8± 2.3)	(31± 3.8)	(36± 2.9)	(16± 2.1)
	1000							19 *	18 *	22 *	18 *	21 *	11 *						(20± 2.1)	(17± 5.1)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
	Number of colonies / plate	535	591	587	267	284	275	152	146	140	761	734	764	1132	929	1397	(571± 31.2)	(275± 8.5)	(146± 6.0)	(753± 16.5)	(1153± 234.7)
	Number of colonies / plate	1464	1444	1498	291	304	309	1422	1450	1427	342	363	371	263	294	277	(1469± 27.3)	(301± 9.3)	(1433± 14.9)	(359± 15.0)	(278± 15.5)

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 99.9% and 2,6-ditert-butylphenol (16 ppm), 2,4-ditert-butylphenol (103 ppm), o-tert-butylphenol (2 ppm), phenol (18ppm), were contained as impurity.

ND: Not done