

4-(1-メチルプロピル)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

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 -----	3
材料および方法 -----	4
1. 使用した細胞 -----	4
2. 培養液の調製 -----	4
3. 培養条件 -----	4
4. 被験物質および陽性対照物質 -----	4
5. 被験物質の調製 -----	5
6. 試験条件 -----	6
7. 細胞増殖抑制試験 -----	6
7.1 処理条件 -----	6
7.2 標本作製法 -----	7
7.3 増殖抑制の指標とその結果 -----	7
8. 本試験の群構成 -----	7
8.1 直接法 -----	8
8.2 代謝活性化法 -----	8
8.3 追加試験 (in vitro 小核試験) -----	9
9. 染色体標本作製法 -----	9
10. 染色体分析 -----	10
11. 小核標本作製法と観察 -----	10
12. 記録と判定 -----	11
結果および考察 -----	12
結 論 -----	12
特記事項 -----	13
文 献 -----	13

Tables 1~6, Figures 1~2

【要 約】

4-(1-メチルプロピル)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、以下CHL/IU と略す)を用いて検討した。

1. 細胞増殖抑制試験

直接法48時間処理における約50%の増殖抑制を示す濃度は0.049 mg/mlであった。また、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ0.067 mg/mlおよび0.040 mg/mlであった。

以上の結果をもとに、染色体異常試験において、直接法では0.049 mg/ml、代謝活性化法のS9mix存在下では0.067 mg/mlの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、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設定した。また、代謝活性化法のS9mix非存在下では、約50%の増殖抑制濃度が直接法におけるその濃度に近い値であることから、0.049 mg/mlの濃度を高濃度とした。

2. 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間処理したすべての処理群において、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。しかしながら、48時間処理した最高処理濃度の0.049 mg/mlでは、観察した細胞の5.5%に染色体異常が認められた。

一方、代謝活性化法においては、S9mix存在下および非存在下の最高処理濃度では、分裂抑制のため染色体分析ができなかった。代謝活性化法のS9mix非存在下におけるその他の処理群では、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が、S9mix存在下では、中濃度(0.034 mg/ml)の処理群で観察した細胞の7%に染色体異常が認められた。これらの結果より、直接法の48時間処理群と代謝活性化法のS9mix存在下群について、染色体異常誘発を精度よく反映できる*in vitro*小核試験による追加試験を実施したところ、再現性は認められなかった。

3. 結論

4-(1-メチルプロピル)フェノールは、直接法により、24時間処理(0.012~0.049 mg/ml)したすべての処理群において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つ

た。48時間処理した最高処理濃度 (0.049 mg/ml) では、観察した細胞の5.5%に染色体異常が認められたが、追加試験では再現性が得られなかった。

一方、代謝活性化法における S9mix 非存在下 (0.012~0.025 mg/ml) 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、S9mix 存在下では、中濃度 (0.034 mg/ml) の処理群で、観察した細胞の7%に染色体異常が認められたが、追加試験では再現性が得られなかった。

従って、4-(1-メチルプロピル)フェノールは、上記の試験条件下で、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、4-(1-メチルプロピル)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。

【材料および方法】

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。

この CHL 細胞株は、一般的に化学物質に対して検出感度が高いため常用されている。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS : JRH BIOSCIENCES、ロット番号 : 1C2073) を 10% 添加したイーグル MEM 培養液を用いた。MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末 (日水製薬(株)) 9.4 g を 1 l の蒸留水に溶解し、121 °C で 15 分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン (滅菌済み、日水製薬(株)) 300 mg と 10% NaHCO₃ 溶液 12.5 ml を加えて調製した。2倍濃度の MEM 培養液は、上記の培地 9.4 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、以下 MEM 培養液と同様に調製した。

3. 培養条件

2×10⁴個の CHL 細胞を、培養液 5 ml を入れたディッシュ (径 6 cm、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. 被験物質および陽性対照物質

[被験物質]

(名 称) 4-(1-メチルプロピル)フェノール

(略 号) MPP

(CAS No.) 99-71-8

(ロ ッ ト 番 号)

(分 子 式) C₁₀H₁₄O

(分 子 量) 150.21

(純 度) 66%

(不純物：メタセカンダリーブチルフェノールを33%含む)

(性 状) 淡黄色固体で、水およびメタノールに対する溶解度は 0.1

g/100 ml および 681 g/100 ml、ジメチルスルフォキシド (DMSO) には 134.6% *w/v(で可溶、アセトンに易溶、融点53℃、沸点242℃、蒸気圧135.4~136.5℃/mmHg)の物質である。

(提 供 者)

(保 存 条 件) 室温遮光保存

(安 定 性) 熱、光、酸素等に対して安定

(溶媒中での安定性) 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-92-224) における溶媒中での安定性試験では、0.06~15 mg/ml の濃度範囲で3時間は安定であった。

[陽性対照物質]

1) 直接法の試験に用いる物質

(化 学 名) マイトマイシン C

(略 号) MC

(ロ ッ ト 番 号) 814 ABB

(製 造 者) 協和醗酵工業(株)

(保 存 条 件) 冷暗所保存

2) 代謝活性化法の試験に用いる物質

(化 学 名) シクロホスファミド

(略 号) CPA

(ロ ッ ト 番 号) 67F-0155

(製 造 者) Sigma Chemical Co.

(保 存 条 件) 冷暗所保存

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO (Sigma Chemical Co.、ロット番号：30H0608) を用いた。原体を溶媒に溶解して原液 (増殖抑制試験では 20 および 300 mg/ml、染色体異常試験では 9.8 および 13.4 mg/ml、小核試験では 9.8 mg/ml) を調製し、ついで原液を溶媒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。染色体異常試験および小核試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、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（Appendix 1、2）。なお、濃度については、純度換算は行わなかった。

6. 試験条件

直接法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、ディッシュに培養液5 mlと各濃度の被験物質調製液25 μ lを加え、24時間および48時間処理した。

代謝活性化法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、MEM培養液、2倍濃度のMEM培養液、およびS9 mixをそれぞれ4:1:1の割合で混合した溶液3 mlをディッシュに加えた。また、S9 mix非存在下の処理群においては、MEM培養液3 mlをディッシュに加え、さらに15 μ lの被験物質調製液を加えて6時間処理した。処理終了後、新鮮な培養液に交換し、さらに18時間培養した。S9 mixの調製は下記の組成で行った。

追加試験として実施した *in vitro* 小核試験についても上記と同様の試験条件で実施した。

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM MgCl ₂	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1

合計 10 ml

* S9 : Sprague-Dawley 系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与して調製したキッコマン(株)のS9（ロット番号：RAA-281, 1992年8月製造およびロット番号：RAA-292, 1993年5月製造）を購入し、使用時まで-80℃の超低温槽内に保存した。

7. 細胞増殖抑制試験

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。

7.1 処理条件

直接法では48時間処理群について、また、代謝活性化法ではS9mix存在下および非存在

下の処理群について細胞増殖抑制試験を実施した。処理濃度は、直接法および代謝活性化法の S9 mix 非存在下では0.04 ~0.10 mg/ml、代謝活性化法の S9 mix 存在下では0.05 ~ 1.50 mg/ml の範囲の濃度を用いた。ディッシュは1濃度について2枚用いた。

7.2 標本作製法

培養終了後、培養液を捨てたのち、10%ホルマリン溶液を加え、細胞がディッシュに付着した状態で固定した。固定後、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。

7.3 増殖抑制の指標とその結果

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 (Monocellater、オリンパス光学工業(株)) 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、MPP の約50% の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、直接法では 0.049 mg/ml であった。また、代謝活性化法の S9mix 存在下および非存在下における約50% の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ 0.067 mg/ml および 0.040 mg/ml であった。(Table 1、2、3 および Fig.1、2)。

8. 本試験の群構成

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高濃度群を、直接法では 0.049 mg/ml、代謝活性化法の S9mix 存在下では 0.067 mg/ml とし、それぞれ高濃度群の 1/2 の濃度を中濃度、1/4 の濃度を低濃度とした。なお、代謝活性化法の S9mix 非存在下においては、約50% の増殖抑制を示す濃度が、直接法におけるその濃度に近い値であったことから、直接法と同様に 0.049 mg/ml の濃度を高濃度とし、その 1/2 の濃度を中濃度、1/4 の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いた MC および CPA は、注射用水 (大塚製薬工場(株)、ロット番号: K1G70 およびロット番号: K2L74) に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8.1 直接法

直接法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め下記の11群を設け、各群2枚のディッシュを用いた。

群	濃度 (mg/ml)	処理時間 (hours)
1) 無処理対照	—	—
2) 溶媒対照	0	24
3) MPP	0.012	24
4) MPP	0.025	24
5) MPP	0.049	24
6) 陽性対照 (MC)	0.00005	24
7) 溶媒対照	0	48
8) MPP	0.012	48
9) MPP	0.025	48
10) MPP	0.049	48
11) 陽性対照 (MC)	0.00005	48

8.2 代謝活性化法

代謝活性化法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群として S9mix を加えない群を含め、下記の11群を設け、各群2枚のディッシュを用いた。

群	濃度 (mg/ml)	S9mixの有無	処理時間 (hours)
1) 無処理対照	—	—	—
2) 溶媒対照	0	—	6-(18)
3) MPP	0.012	—	6-(18)
4) MPP	0.025	—	6-(18)
5) MPP	0.049	—	6-(18)
6) 陽性対照 (CPA)	0.005	—	6-(18)
7) 溶媒対照	0	+	6-(18)
8) MPP	0.017	+	6-(18)
9) MPP	0.034	+	6-(18)
10) MPP	0.067	+	6-(18)
11) 陽性対照 (CPA)	0.005	+	6-(18)

8.3 追加試験 (*in vitro* 小核試験)

追加試験では、下記の4段階の被験物質処理濃度群に溶媒対照と陽性対照群を加え、それぞれ直接法48時間処理と代謝活性化法 S9 mix 存在下の12群を設けた。各群2枚のディッシュを用いた。

群	濃度 (mg/ml)	S9mixの有無	処理時間 (hours)
1) 溶媒対照	0	—	48
2) MPP	0.015	—	48
3) MPP	0.022	—	48
4) MPP	0.033	—	48
5) MPP	0.049	—	48
6) 陽性対照 (MC)	0.00005	—	48
7) 溶媒対照	0	+	6-(18)
8) MPP	0.015	+	6-(18)
9) MPP	0.022	+	6-(18)
10) MPP	0.033	+	6-(18)
11) MPP	0.049	+	6-(18)
12) 陽性対照 (CPA)	0.005	+	6-(18)

9. 染色体標本作製法

- 1) 培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ になるように培養液に加え、培養終了後、各群の細胞をリン酸緩衝液 (Ca^{++} 、 Mg^{++} を含まない) で洗い、0.25% トリプシン溶液を用いてはがし、10 ml の遠沈管に集めた。
- 2) 1,000~1,200 rpm で5分間遠沈し、上清を捨てたのち、沈殿した細胞に3 ml の0.075 M KCl 水溶液を加えることにより約30分間低張処理を行った。
- 3) 低張処理後、低張液の上層にカルノア液 (氷酢酸:メタノール = 1:3 v/v) 約6 ml を加え、下方から静かにピペッティングしながら混和して固定し、その後 1,000~1,200 rpm で5分間遠沈した。
- 4) 遠沈後上清を除き、再び新鮮なカルノア液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ、1,000~1,200 rpm で5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。
- 5) 遠沈して得た白色の細胞塊に、0.2~0.5 ml のカルノア液を加え、十分に懸濁させた。

- 6) 細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドガラス上に滴下し、そのまま風乾した。
- 7) スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。
- 8) スライドガラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。
- 9) 乾燥したスライドは、ギムザ原液 (Merck) 4.5 ml を M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.8) 150 ml に希釈した染色液で約8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。
- 10) 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。

10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、複数の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験 (MMS) 分科会¹⁾ による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、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。

11. 小核標本作製法と観察

- 1) ディッシュより細胞を剥離し、遠心して得られた細胞に3 ml の 0.15 M KCl 水溶液を加えてピペッティングし、約20分間低張処理した。
- 2) メタノール：氷酢酸 (5:1) の固定液を低張液の上から加え、細胞を固定した。
- 3) 遠心して固定液を捨て、再び固定液を10 ml を加えてピペッティング後、遠心した。
- 4) 場合によっては、3と同じ操作をもう1度行った。
- 5) 固定液を捨て、新たに少量の固定液を加えて細胞を浮遊させた。
- 6) パスツールピペットでピペッティング後、少量の細胞懸濁液をとり、スライド上に1滴滴下した。
- 7) 風乾した後、染色した。染色は、市販のギムザ液 5 ml を pH 6.8 の M/15 リン酸緩衝

液145 ml で希釈した染色液で約10分間染色した。

- 8) 観察は、60倍以上の対物レンズ（接眼10倍）をつけた顕微鏡を用いて行った。
- 9) 細胞質を含み細胞質周辺の明瞭な間期細胞1000個について観察し、小核をもった細胞を算定した。
- 10) 小核の判定基準は以下のように行った²⁾。
 - ・小核の直径が主核の1/3以下であること。
 - ・光の屈折がなく、焦点をわずかにずらしても明瞭に小核と判定できること。
 - ・小核の色調は主核と同じか、それより明るく見え明らかに核由来と判定できること。
 - ・主核に接し突起状に小核様のものがある場合は小核と見なさない。
 - ・異常な多核や異型核が多く見られる場合や細胞融解がある場合は、その旨を記録しておく。

12. 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は、石館ら³⁾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%以上を陽性としたが、疑陽性の結果が得られた場合、*in vitro*小核試験を実施し再現性を確認して最終判定をおこなうこととした。

再現性確認の為に実施した *in vitro* 小核試験に関しては、KASTENBAUM & BOWMANの方法⁴⁾ (1970) に従って有意差検定 ($p < 0.05$) を行い、小核誘発の判定を行った。

【結果および考察】

直接法による染色体分析の結果を Table 4 に示した。

MPPを加えて24時間処理したいずれの群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。また、48時間処理した中濃度群および低濃度群でも、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。しかしながら、最高処理濃度群 (0.049mg/ml) では、観察した細胞の5.5%に染色体異常が認められた。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 5 に示した。

MPPを加えて S9mix 存在下および非存在下で6時間処理した最高処理濃度群では、分裂抑制のため染色体分析ができなかった。その他の処理群では、S9mix 非存在下において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。しかし、S9mix 存在下では、中濃度 (0.034 mg/ml) の処理群で、観察した細胞の7%に染色体異常が認められた。

以上の結果より、疑陽性の結果が得られた直接法48時間処理と代謝活性化法 S9 mix 存在下群については、再現性を確認するため *in vitro* 小核試験を追加試験として実施した (Table 6)。その結果、いずれの処理群においても小核の誘発は見られず、染色体異常誘発性に関して再現性が得られなかった。従って、今回実施した試験条件下ではMPPの染色体異常誘発性はないものと判断した。

陽性対照として用いた直接法での MC 処理群、および S9mix 存在下での CPA 処理群では染色分体交換 (cte) や染色分体切断 (ctb) などの構造異常をもつ細胞および小核が高頻度に誘発された。

【結 論】

4-(1-メチルプロピル)フェノールは、直接法により、24時間処理したすべての処理群において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。しかしながら、48時間処理した最高処理濃度 (0.049 mg/ml) では、観察した細胞の5.5%に染色体異常が認められた。

一方、代謝活性化法における S9mix 存在下および非存在下の最高処理濃度では、分裂抑制のため染色体分析ができなかったが、S9mix 非存在下におけるその他の処理群では、染

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、S9mix 存在下では、中濃度 (0.034 mg/ml) の処理群で、観察した細胞の7%に染色体異常が認められた。

このように、染色体試験で疑陽性の結果が得られたことから、更に、染色体異常を精度良く反映する *in vitro* 小核試験を実施して再現性を調べたところ、その誘発性は認められなかった。

従って、MPPは、上記の試験条件下で、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。

【特記事項】

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) 日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法、247-251、朝倉書店、1991
- 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、1987
- 4) Kastenbaum M. A. and K. O. Bowman, *Mutation Res.* 9 : 527-549, 1970

Table 1 Inhibition of cell growth treated with 4-(1-methylpropyl)phenol (MPP) for 48 hours by direct method in CHL cells

Concentration of MPP (mg/ml)	Cell growth (% of control)		Average
0.00	100,	100	100.0
0.04	84,	70	77.0
0.05	45,	58	51.5
0.06	24,	45	34.5
0.07	6,	10	8.0
0.08	2,	0	1.0
0.10	2,	5	3.5

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 2 Inhibition of cell growth treated with 4-(1-methylpropyl)phenol (MPP) for 6 hours with S9 mix by metabolic activation method in CHL cells

Concentration of MPP (mg/ml)	Cell growth (% of control)	
		Average
0.00	100, 100	100.0
0.05	82, 78	80.0
0.09	11, 12	11.5
0.19	11, 12	11.5
0.38	45, 45	45.0
0.75	85, 80	82.5
1.50	118, 113	115.5

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 3 Inhibition of cell growth treated with 4-(1-methylpropyl)phenol (MPP) for 6 hours without S9 mix by metabolic activation method in CHL cells

Concentration of MPP (mg/ml)	Cell growth (% of control)		Average
0.00	100,	100	100.0
0.04	52,	41	46.5
0.05	0,	4	2.0
0.06	0,	0	0.0
0.07	0,	0	0.0
0.08	0,	0	0.0
0.10	0,	0	0.0

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 4 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 4-(1-methylpropyl)phenol (MPP)** by direct method

Group	Concent- ration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of analysed cells	No. of structural aberrations										No. of cells with aberrations		Polyploid		Judgement		
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul	total	Others	TAG (%)	TA (%)	(%)	(%)	SA	NA		
Control ¹⁾			200	1	0	0	2	0	0	0	0	3	0	2	(1.0)	1	(0.5)	0.50		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	2	0	1	0	3	0	1	1	(0.5)	1	(0.5)	0.75		
MPP	0.012	24	200	0	0	0	1	0	0	0	1	2	2	1	(0.5)	1	(0.5)	0.38		
MPP	0.025	24	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	(0.5)	1	(0.5)	0.25		
MPP	0.049	24	200	0	1	1	0	0	1	0	3	0	0	3	(1.5)	3	(1.5)	0.00		
MC	0.00005	24	200	7	44	82	5	2	3	0	143	7	89*	(44.5)	87*	(43.5)	0.13		+	
Solvent ¹⁾	0	48	200	2	1	0	0	1	0	0	4	0	4	4	(2.0)	2	(1.0)	0.25		
MPP	0.012	48	200	1	0	0	1	0	0	0	2	0	2	2	(1.0)	1	(0.5)	0.00		
MPP	0.025	48	200	1	0	2	3	0	0	0	6	0	4	4	(2.0)	3	(1.5)	0.13		
MPP	0.049	48	200	2	1	4	1	0	5	0	13	2	11	11	(5.5)	10*	(5.0)	0.98 ⁶⁾		±
MC	0.00005	48	200	8	21	74	13	5	8	0	129	23	74*	74*	(37.0)	71*	(35.5)	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, MC : mitomycin C. 1) Dimethyl sulfoxide 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) Six hundred and thirty-one cells were analyzed. * : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was 66%, and meta secondary butyl phenol (33%) was contained as impurity.

Table 5 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 4-(1-methylpropyl)phenol (MPP)** by metabolic activation method

Group	Concent- ration (mg/ml)	S 9 mix (hr)	Time of exposure cells	No. of structural aberrations										Others ³⁾		No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾		Judgement ⁵⁾			
				analysed	gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total	TAG (%)	TA (%)	TA (%)	TA (%)	SA	NA					
Control ¹⁾	0	—	6-(18)	200	0	0	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	1	0	2	0	3	1	0	3	3	3	3	3	3	0.25	—	—
MPP	0.012	—	6-(18)	200	3	0	2	0	0	1	0	6	0	0	5	3	3	3	3	3	0.25	—	—
MPP	0.025	—	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	10	11	1	0	2	2	2	2	2	2	0.50	—	—
MPP	0.049	—	6-(18)	0																		Tox	Tox
CPA	0.005	—	6-(18)	200	2	1	0	0	2	3	0	8	0	0	4	2	2	2	2	2	0.25	—	—
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	2	6	7	11	0	0	0	26	1	0	8	6	6	6	6	6	0.38	—	—
MPP	0.017	+	6-(18)	200	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	2	2	2	2	2	2	0.25	—	—
MPP	0.034	+	6-(18)	200	3	5	13	0	1	0	0	22	1	0	14	13	13	13	13	13	1.00	±	±
MPP	0.067	+	6-(18)	0																		Tox	Tox
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	73	198	6	0	7	50	339	2	0	133*	132*	132*	132*	132*	132*	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, CPA : cyclophosphamide, Tox : toxicity. 1) Dimethyl sulfoxide 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 66%, and meta secondary butyl phenol (33%) was contained as impurity.

Table 6 Results of in vitro micronucleus test of Chinese hamster cells (CHL) treated with 4-(1-methylpropyl)phenol (MPP)**

Group	Concent- ration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with MN	% Judgement ²⁾
Solvent ¹⁾	0	-	48	1000	3	0.3
MPP	0.015	-	48	1000	3	0.3
MPP	0.022	-	48	1000	7	0.7
MPP	0.033	-	48	1000	3	0.3
MPP	0.049	-	48	1000	1	0.1
MC	0.00005	-	48	1000	271	27.1 *
<hr/>						
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	1000	10	1.0
MPP	0.015	+	6-(18)	1000	5	0.5
MPP	0.022	+	6-(18)	1000	5	0.5
MPP	0.033	+	6-(18)	1000	3	0.3
MPP	0.049	+	6-(18)	1000	9	0.9
CPA	0.005	+	6-(18)	1000	192	19.2 * +

Abbreviations : MN : micronuclei, MC : mitomycin C, CPA : cyclophosphamide.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

2) Judgement was done by statistical method of Kastenbaum and Bowman (1970).

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$.

** : Purity was 66%, and meta secondary butyl phenol (33%) was contained as impurity.

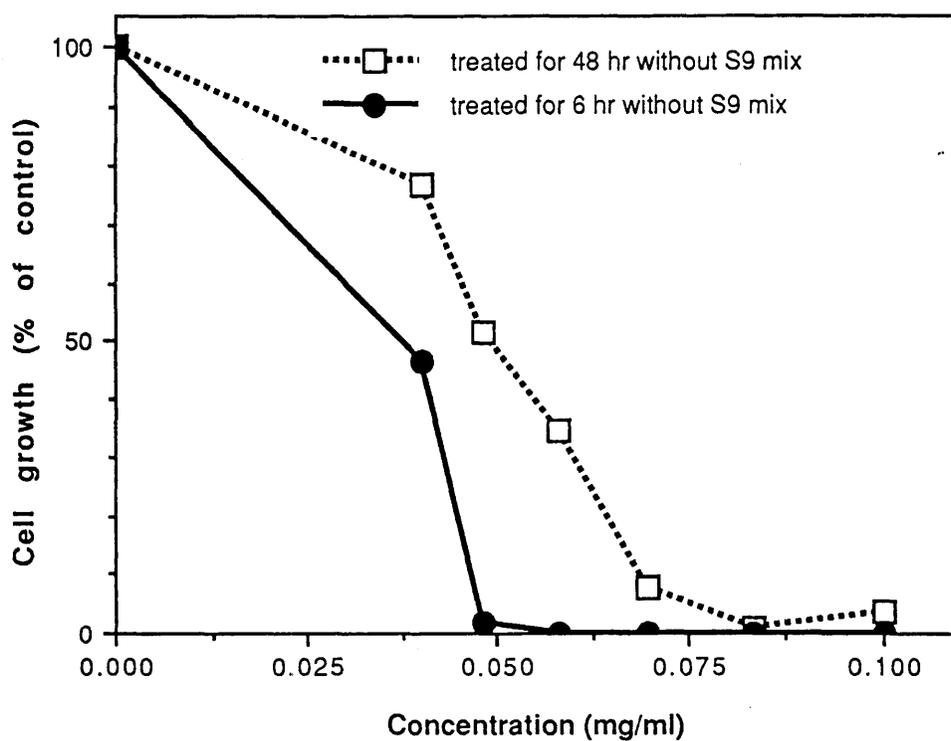


Fig.1 Inhibition of cell growth treated with 4-(1-methylpropyl)phenol in CHL cells

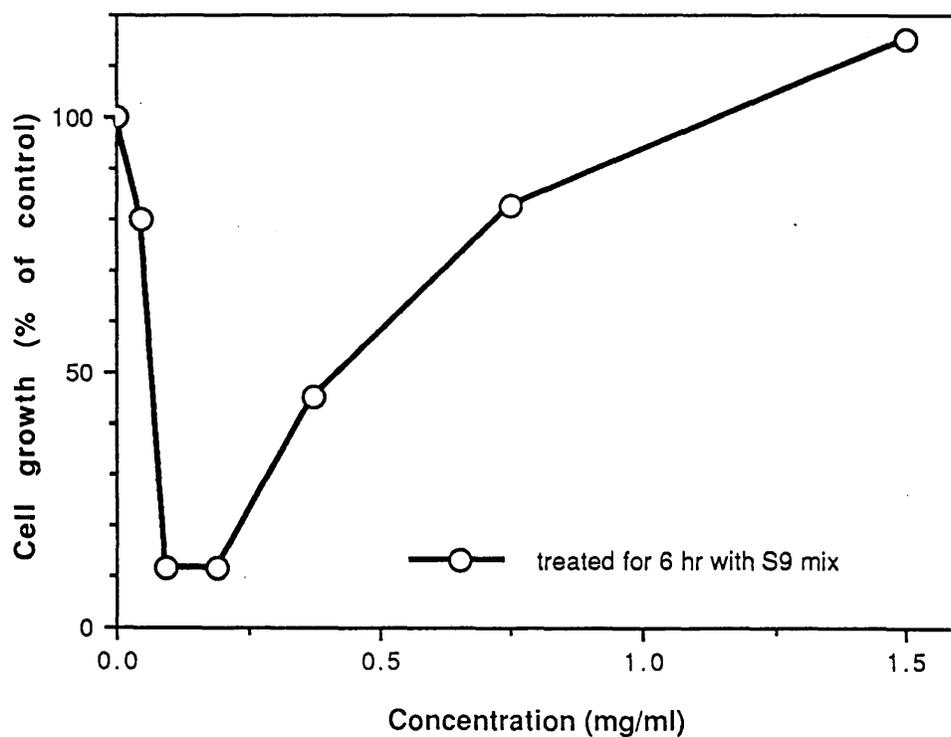


Fig.2 Inhibition of cell growth treated with 4-(1-methylpropyl)phenol in CHL cells