

Table 1 Urinalysis in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2,3,6-trimethylphenol in rats

		On day 23 of administration period				On day 9 of recovery period	
Dose (mg/kg)		0	100	300	1000	0	1000
Male							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
Volume(mL) ^{a)}		15.7±2.9	18.2±3.9	24.3±3.3	32.8±9.4**	21.5±3.5	29.5±12.3
Specific gravity ^{a)}		1.048±0.008	1.047±0.008	1.036±0.004*	1.026±0.008**	1.058±0.007	1.046±0.012
Color	yellow	0	1	1	3	0	0
pH	≤6.0	0	0	0	0	0	0
Protein ^{b)}	±	0	1	2	2	1	2
	+	5	3	2	2	4	3
	++	0	1	1	1	0	0
Ketone ^{c)}	±	3	0	0	1	3	1
Bilirubin ^{d)}	+	0	0	0	1	0	0
Occult blood ^{d)}	±	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen ^{e)}	±	5	5	5	4	5	4
	+	0	0	0	1	0	1
Sediment							
Crystal ^{d)}	±	4	5	4	5	5	5
	+	1	0	1	0	0	0
Epithelial cell ^{d)}	±	0	0	1	0	0	0
Female							
Number of animals		5	5	5	5	5	4
Volume(mL) ^{a)}		14.6±5.0	14.1±6.4	25.1±7.1	20.9±12.8	19.5±4.4	12.3±6.2
Specific gravity ^{a)}		1.034±0.017	1.039±0.017	1.015±0.009	1.03±0.023	1.04±0.013	1.054±0.017
Color	yellow	1	1	0	5	0	0
pH	≤6.0	1	0	0	3	0	0
Protein ^{b)}	±	0	0	0	0	0	2
	+	1	0	0	1	0	0
	++	0	0	0	2	0	0
Ketone ^{c)}	±	1	0	0	2	2	2
Bilirubin ^{d)}	+	0	1	0	3	0	0
Occult blood ^{d)}	±	0	1	0	0	0	0
Urobilinogen ^{e)}	±	5	4	5	2	5	4
	+	0	1	0	3	0	0
Sediment							
Crystal ^{d)}	±	5	5	3	4	4	4
	+	0	0	0	1	0	0
Epithelial cell ^{d)}	±	0	0	0	2	0	0

a) Mean±S.D. b) ±:trace, +:30 mg/kg, ++:100 mg/dL c) ±:trace, +:slight d) ±:0.1 EU/dL, +:1.0 EU/dL e) ±:a few, +:abundant

*:significantly different from 0 mg/kg, p<0.05

**:significantly different from 0 mg/kg, p<0.01

Table 2 Hematological examination in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2,3,6-trimethylphenol in rats

	Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
		0	100	300	1000	0	1000
Male							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10000/\text{mm}^3$)		662 $\pm$ 23	663 $\pm$ 22	662 $\pm$ 17	659 $\pm$ 47	707 $\pm$ 15	718 $\pm$ 27
Hemoglobin (g/dL)		14.2 $\pm$ 0.4	14.1 $\pm$ 0.7	14.1 $\pm$ 0.3	13.6 $\pm$ 0.6	14.4 $\pm$ 0.2	14.2 $\pm$ 0.4
Hematocrit (%)		42.7 $\pm$ 1.6	42.8 $\pm$ 1.8	42 $\pm$ 1.1	41.5 $\pm$ 1.9	44.1 $\pm$ 0.8	43.6 $\pm$ 1.6
MCV (μm^3)		64.6 $\pm$ 1.8	64.5 $\pm$ 0.8	63.4 $\pm$ 1.4	63.1 $\pm$ 3.7	62.5 $\pm$ 1	60.7 $\pm$ 0.9 *
MCH (pg)		21.4 $\pm$ 0.6	21.2 $\pm$ 0.5	21.3 $\pm$ 0.4	20.7 $\pm$ 1.6	20.4 $\pm$ 0.2	19.8 $\pm$ 0.3 *
MCHC (%)		33.2 $\pm$ 0.4	32.9 $\pm$ 0.7	33.5 $\pm$ 0.4	32.8 $\pm$ 0.6	32.7 $\pm$ 0.3	32.7 $\pm$ 0.4
Reticulocyte (%)		7.1 $\pm$ 1.2	6.6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	8.7 $\pm$ 2.2	3.3 $\pm$ 1.1	5.2 $\pm$ 1.8
Platelet ($\times 10000/\text{mm}^3$)		99.9 $\pm$ 10.5	103.5 $\pm$ 9.3	105.1 $\pm$ 11.7	111.9 $\pm$ 14.2	101.4 $\pm$ 3.8	101.2 $\pm$ 9.2
PT (sec)		22.9 $\pm$ 2.9	26.3 $\pm$ 6.4	37.2 $\pm$ 11.9	30.4 $\pm$ 8.8	26.4 $\pm$ 2.1	27.1 $\pm$ 4.2
APTT (sec)		24.7 $\pm$ 1.7	25.2 $\pm$ 2.2	28.1 $\pm$ 2.5	27.4 $\pm$ 3.3	25.9 $\pm$ 1	25.2 $\pm$ 2.2
WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)		122 $\pm$ 35	107 $\pm$ 22	131 $\pm$ 19	115 $\pm$ 23	101 $\pm$ 21	104 $\pm$ 29
Differential leukocyte counts (%)							
Band neutrophil		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil		6 $\pm$ 3	7 $\pm$ 5	7 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3	7 $\pm$ 3	9 $\pm$ 3
Eosinophil		0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1
Basophil		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte		1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1
Lymphocyte		93 $\pm$ 3	91 $\pm$ 6	92 $\pm$ 2	90 $\pm$ 5	91 $\pm$ 4	88 $\pm$ 4
Female							
Number of animals		5	5	5	4	5	4
RBC ($\times 10000/\text{mm}^3$)		691 $\pm$ 36	694 $\pm$ 15	672 $\pm$ 28	615 $\pm$ 45 **	732 $\pm$ 22	699 $\pm$ 58
Hemoglobin (g/dL)		14.1 $\pm$ 0.9	14.4 $\pm$ 0.4	14 $\pm$ 0.4	12.7 $\pm$ 0.2 **	14.6 $\pm$ 0.4	14 $\pm$ 1
Hematocrit (%)		42.7 $\pm$ 2.6	43 $\pm$ 0.7	41.8 $\pm$ 1.2	38 $\pm$ 0.4 *	44.1 $\pm$ 1.2	42.4 $\pm$ 3.1
MCV (μm^3)		61.8 $\pm$ 1.1	62 $\pm$ 1	62.3 $\pm$ 1.2	62.1 $\pm$ 4.7	60.2 $\pm$ 1.5	60.7 $\pm$ 1.6
MCH (pg)		20.4 $\pm$ 0.5	20.7 $\pm$ 0.6	20.8 $\pm$ 0.3	20.8 $\pm$ 1.3	20 $\pm$ 0.6	20 $\pm$ 0.5
MCHC (%)		33 $\pm$ 0.3	33.5 $\pm$ 0.4	33.4 $\pm$ 0.2	33.4 $\pm$ 0.5	33.2 $\pm$ 0.4	32.9 $\pm$ 0.4
Reticulocyte (%)		3.7 $\pm$ 1.1	3.2 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.4	10.7 $\pm$ 4.1	3.1 $\pm$ 0.8	4.1 $\pm$ 1
Platelet ($\times 10000/\text{mm}^3$)		94.9 $\pm$ 7.1	100.6 $\pm$ 4	105.1 $\pm$ 11.8	101.9 $\pm$ 6.4	98.1 $\pm$ 6.1	95.8 $\pm$ 2.4
PT (sec)		17.5 $\pm$ 1.6	15.4 $\pm$ 0.4	16.7 $\pm$ 1	17.1 $\pm$ 1.9	17.1 $\pm$ 0.9	16.8 $\pm$ 0.9
APTT (sec)		22.8 $\pm$ 1.8	21.1 $\pm$ 1.9	24.4 $\pm$ 2.5	21.6 $\pm$ 1	21.8 $\pm$ 1.5	21.7 $\pm$ 0.3
WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)		38 $\pm$ 13	47 $\pm$ 17	45 $\pm$ 11	65 $\pm$ 20	41 $\pm$ 6	42 $\pm$ 8
Differential leukocyte counts (%)							
Band neutrophil		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil		13 $\pm$ 4	8 $\pm$ 6	12 $\pm$ 5	7 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	13 $\pm$ 4
Eosinophil		0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
Basophil		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte		2 $\pm$ 2	3 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Lymphocyte		85 $\pm$ 7	87 $\pm$ 11	86 $\pm$ 6	91 $\pm$ 3	90 $\pm$ 4	84 $\pm$ 5

Parameter, mean $\pm$ S.D., *: significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$, **: significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 3 Blood chemical examination in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2,3,6-trimethylphenol in rats

		End of administration period				End of recovery period	
Dose (mg/kg)		0	100	300	1000	0	1000
Male							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)		5.2±0.1	5.1±0.4	5.1±0.1	5±0.3	5.3±0.2	5.3±0.2
Albumin (g/dL)		3±0.1	2.9±0.1	3±0.1	2.8±0.1 **	2.8±0.1	2.8±0.2
A/G		1.37±0.02	1.41±0.19	1.39±0.15	1.29±0.08	1.11±0.13	1.17±0.09
Glucose (mg/dL)		145±16	140±19	143±29	151±25	148±12	141±17
Total cholesterol (mg/dL)		52±5	45±7	45±6	49±10	48±6	36±5 *
Triglyceride (mg/dL)		78±16	79±28	77±25	76±33	51±14	59±15
BUN (mg/dL)		11±1	14±2 *	9±2	11±1	13±2	16±2
Creatinine (mg/dL)		0.6±0	0.7±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1
Inorg. Phos. (mg/dL)		8±0.3	8.3±0.2	8.9±0.5 *	9.2±1 *	7.5±0.6	8±0.5
Ca (mg/dL)		9.3±0.4	9.2±0.3	9.4±0.2	9.4±0.6	9±0.3	9.7±0.4 *
Na (mEq/L)		145.7±0.7	144.6±1	145±0.9	145.1±0.5	144.5±0.9	143.8±0.3
K (mEq/L)		3.97±0.22	4.18±0.19	4.1±0.18	4.08±0.14	4.34±0.2	4.31±0.35
Cl (mEq/L)		106.3±1	105.6±1.7	106.5±1	106.1±1.2	106.4±1	106.2±1.1
ALP (U/L)		373±86	373±69	334±82	417±113	275±42	306±73
LDH (U/L)		227±178	171±77	156±98	182±55	181±72	194±143
GPT (U/L)		28±8	30±2	30±3	32±5	27±5	34±14
GOT (U/L)		60±19	63±6	56±8	55±9	65±11	63±13
γ-GTP (U/L)		0±0	0±0	0±0	0±0	0±1	0±0
Female							
Number of animals		5	5	5	4	5	4
Total protein (g/dL)		5.1±0.1	5.2±0.3	5.4±0.1	5.2±0.3	5.5±0.2	5.5±0.3
Albumin (g/dL)		3.1±0.1	3.2±0.2	3.2±0.1	3.1±0.2	3.1±0.1	3.2±0.2
A/G		1.6±0.22	1.62±0.13	1.52±0.1	1.52±0.13	1.36±0.12	1.37±0.1
Glucose (mg/dL)		95±13	105±12	108±13	106±9	134±25	117±17
Total cholesterol (mg/dL)		45±11	53±8	56±9	64±9	61±8	59±5
Triglyceride (mg/dL)		34±13	40±13	54±20	41±9	53±19	40±15
BUN (mg/dL)		19±3	19±2	19±2	18±4	22±5	20±2
Creatinine (mg/dL)		0.6±0.1	0.7±0.2	0.7±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1
Inorg. Phos. (mg/dL)		7.9±1.6	8±1.5	6.2±0.4	7.6±1.2	7.4±0.8	8.9±1.8
Ca (mg/dL)		9±0.5	9.2±0.4	9.1±0.2	9.1±0.5	9.3±0.2	9.5±0.5
Na (mEq/L)		145.7±1.9	145.1±0.8	146.2±0.7	145.7±1.2	143.9±0.5	144±1.1
K (mEq/L)		4.64±2.33	4.22±1.19	3.63±0.35	4.07±0.83	4.57±0.3	4.47±0.54
Cl (mEq/L)		109.3±3.8	108.8±2.9	109.4±0.3	108.6±1.6	107.9±1.2	107.9±1.1
ALP (U/L)		237±25	236±52	203±58	246±63	182±42	150±35
LDH (U/L)		146±72	155±44	150±70	106±42	178±50	146±56
GPT (U/L)		22±2	26±12	24±4	43±27	22±3	23±4
GOT (U/L)		70±9	64±14	62±10	61±12	63±7	62±11
γ-GTP (U/L)		0±1	0±0	0±0	1±1	0±0	0±0

Parameter, mean±S.D., *:significantly different from 0 mg/kg, p<0.05, **:significantly different from 0 mg/kg, p<0.01

Table 4 Organ weights in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2,3,6-trimethylphenol in rats

		End of administration period				End of recovery period	
Dose (mg/kg)		0	100	300	1000	0	1000
Male							
Number of animals		5	5	5	5	5	5
Body weight (g)		347.7±15.7	360.6±17.1	343.3±14.3	305.4±5 **	409.7±18.3	415.3±41.6
Absolute organ weights (mg)							
Brain		1903.3±44.3	1948.9±51.9	1941.5±49	1946.9±114.3	1977.8±68.3	2052.5±91.7
Thymus		614.4±80.2	753.4±106.8	683.1±74.9	562.5±103.7	516.3±136.7	584.4±102.5
Heart		1199.8±75.3	1190.2±48.6	1172.6±79.7	1101.6±52.2	1395.4±83.2	1295.2±113.2
Liver		13184±512	12989.3±1347.5	12477.1±743.8	12686.6±812	13964.7±454.8	13720±2360.5
Kidneys		2815.3±281.8	2862.2±208.3	2808.2±322.8	2583.8±154.5	3169.4±271.5	2964.5±456.8
Spleen		750.8±41.8	722±132.2	774.5±93.6	762.9±120.3	842.6±43.6	841.3±103.8
Adrenal glands		51.7±5.7	49.4±2.7	43.8±4.3 *	43.4±3.7 *	59.2±13.4	53.5±8.4
Testes		2864±66.7	2878.9±118.1	2838.7±273.4	2863.9±239.2	3311.3±274.1	3112.3±224.5
Epididymides		596.5±50.8	595.1±37.9	607.1±98	580.5±23.6	871.9±56.1	746.7±70.1 *
Relative organ weights (mg/g)							
Brain		5.48±0.153	5.413±0.252	5.66±0.178	6.373±0.347 **	4.83±0.15	4.971±0.41
Thymus		1.766±0.2	2.09±0.277	1.988±0.172	1.844±0.362	1.25±0.281	1.405±0.171
Heart		3.451±0.143	3.305±0.174	3.414±0.116	3.608±0.195	3.412±0.268	3.123±0.114
Liver		37.939±0.881	35.955±2.437	36.403±2.798	41.538±2.609	34.103±0.824	32.968±3.941
Kidneys		8.115±0.923	7.934±0.353	8.198±1.088	8.466±0.614	7.736±0.573	7.131±0.736
Spleen		2.164±0.181	2.001±0.348	2.254±0.244	2.495±0.365	2.062±0.186	2.038±0.293
Adrenal glands		0.149±0.017	0.138±0.012	0.128±0.015	0.142±0.012	0.145±0.031	0.131±0.033
Testes		8.255±0.491	7.994±0.423	8.275±0.782	9.382±0.858 *	8.075±0.42	7.579±1.182
Epididymides		1.715±0.098	1.654±0.152	1.764±0.235	1.902±0.105	2.131±0.151	1.815±0.263 *
Female							
Number of animals		5	5	5	4	5	4
Body weight (g)		212±23.4	227.8±12	213.7±11.8	202±24.8	255.6±14.6	229.1±14.5 *
Absolute organ weights (mg)							
Brain		1761.8±43.4	1727.1±68.9	1790.5±66.3	1860.9±50.3	1851.9±43.5	1842.1±76.2
Thymus		474.9±150.8	403.7±70.3	451.3±93.8	347.8±51.5	372.3±106.2	345.2±72.3
Heart		771.2±94.6	777±89.8	779.3±60.5	761.8±54.4	834±40.1	808.6±59
Liver		6749.1±1111.2	7084.1±502.3	7218.3±724.6	7532.5±1431.7	7697.5±561.9	7107±209
Kidneys		1674.4±123.6	1663.9±107.6	1765.8±148.6	1791.8±232.2	1988±73	1757.6±79 **
Spleen		482.6±97	476.1±41.4	485.1±23.7	640.1±98.6 *	491.9±59.3	504.7±33.5
Adrenal glands		61.6±4.5	57.9±7.3	53±6.3	51.8±7	65.5±11.7	60.9±4.7
Ovaries		84.3±7.9	95.1±11.6	85.7±11.8	73.5±22.2	90.7±14.7	85.8±4.9
Relative organ weights (mg/g)							
Brain		8.413±1.167	7.598±0.483	8.403±0.615	9.305±0.984	7.265±0.487	8.051±0.183 *
Thymus		2.225±0.553	1.766±0.245	2.114±0.443	1.724±0.183	1.461±0.43	1.497±0.222
Heart		3.647±0.315	3.407±0.305	3.646±0.181	3.792±0.229	3.266±0.133	3.53±0.131 *
Liver		31.704±2.441	31.093±1.278	33.757±2.335	37.083±2.813 *	30.122±1.596	31.092±1.47
Kidneys		7.951±0.716	7.31±0.418	8.267±0.552	8.873±0.313	7.789±0.336	7.69±0.473
Spleen		2.27±0.312	2.093±0.188	2.275±0.156	3.161±0.139 **	1.921±0.146	2.204±0.076 *
Adrenal glands		0.294±0.044	0.256±0.04	0.248±0.03	0.258±0.035	0.256±0.045	0.268±0.036
Ovaries		0.402±0.057	0.418±0.05	0.404±0.073	0.361±0.079	0.357±0.065	0.377±0.046

Parameter, mean±S.D., *: significantly different from 0 mg/kg, p<0.05, **: significantly different from 0 mg/kg, p<0.01

Table 5 Histopathological examination in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2,3,6-trimethylphenol in rats

Sex	Dose (mg/kg)	Male						Female					
		End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period	
		0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0	1000
Number of animals examined													
5 5 5 5 5 5 5 5 5 4 5 4													
(Liver)													
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular, ground glass appearance													
± 0 0 0 3 0 0 0 0 0 1 0 0													
1+ 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0													
Pos. 0 0 0 4# 0 0 0 0 0 1 0 0													
Fatty change, periportal													
± 5 3 4 2 5 2 3 5 3 4 5 4													
1+ 0 2 0 0 0 2 2 0 2 0 0													
Pos. 5 5 4 2 5 4 5 5 5 4 5 4													
(Spleen)													
Hematopoiesis, extramedullary													
± 0 0 0 0 1 0 5 5 4 0 3 3													
1+ 3 5 4 3 4 5 0 0 1 4 2 1													
2+ 2 0 1 2 0 0 0 0 0 0 0													
Pos. 5 5 5 5 5 5 5 5 5 4 5 4													
Deposit, hemosiderin													
± 5 5 5 0 1 0 2 0 1 0 0 0													
1+ 0 0 0 5 4 0 3 5 4 0 4 0													
2+ 0 0 0 0 0 5 0 0 0 4 1 4													
Pos. 5 5 5 5 5 5 5 5 5 4 5 4													
Dilatation, sinus													
± 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0													
1+ 0 0 0 4 0 0 0 0 0 4 0 0													
Pos. 0 0 0 5## 0 1 0 0 0 4### 0 0													
(Stomach)													
Squamous hyperplasia, diffuse, forestomach													
± 0 0 0 5 0 0 0 0 0 2 0 1													
1+ 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2 0 1													
Pos. 0 0 0 5## 0 0 0 0 0 4### 0 0													
Erosion, glandular stomach													
± 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0													
Pos. 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0													

±: very slight, 1+: Slight, 2+: Moderate, Pos.: Total of positive grade

** : significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)# : significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)## : significantly different from control $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)

2,3,6-トリメチルフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2,3,6-Trimethylphenol on Bacteria

要約

2,3,6-トリメチルフェノールについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下および共存下の各菌株について 1250 ~ 39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6濃度を設定した。

本試験を2回実施した結果、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix 非共存下および共存下のTA100, TA1535は625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、WP2 *uvrA*, TA98, TA1537は1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で抗菌性が認められた。従って2,3,6-トリメチルフェノールは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と結論した。

方法

[使用菌株]

カリフォルニア大学B. N. Ames教授より1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および東京大学医科学研究所 松島教授より1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用いた。各菌株は超低温槽で-80℃以下に凍結保存したものを使用した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その20 μL をニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath社)25 gを1 Lの精製水に溶解して作製した液体完全培地10 mLに接種し、37℃で8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は、濁度計を用いて菌濃度を測定し、各菌株共に生菌数が $1 \times 10^8/\text{mL}$ 以上であることを確認した。

[被験物質]

2,3,6-トリメチルフェノール(ロット番号:971209, 本州化学工業(株), 和歌山)は、純度99.67%(不純物として、2,4,6-トリメチルフェノール0.08%, 2,5-ギシレノール0.05%を含有)の淡黄色固体である。被験物質は使用時まで室温、暗所に保存した。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

2,3,6-トリメチルフェノールはジメチルスルホキシド

(DMSO, 関東化学(株))を用いて最高濃度(50 mg/mL)の溶液を調製した後、同溶媒で所定濃度に段階希釈したものをを用いた。

[陽性対照物質]

陽性対照物質として下記のものをを用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

NaN₃ : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN₃は注射用水(大塚製薬工場)に、その他はDMSOに溶解したものを使用した。

[培地およびS9 mixの組成]

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて0.5 mM D-ビオチン、L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または0.5 mM L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水100 mLに対して、粉末寒天(Bacto-Agar, Difco社)0.6 g、塩化ナトリウム0.5 gの割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を1/10量加えて混和し、約45℃に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディアAM-N培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。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・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 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

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで氷中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

*: 購入したS9(キッコマン(株))を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いて併用投与して作製した肝ホモジネートの9000×g遠心上清分画である。

[試験方法]

試験はブレインキューベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37℃で20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。ブレインキューベーション後、トップアガー 2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37℃で48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

[試験結果の判定基準]

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

結果および考察

[予備試験]

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/plateの濃度で実施した結果、S9 mix非共存下および共存下の1250 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。従って、本試験では1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 μ g/plateの6濃度を設定した。

[本試験]

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともに、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix非共存下お

よび共存下のTA100, TA1535は625 μ g/plate以上、WP2 uvrA, TA98, TA1537は1250 μ g/plateで抗菌性が認められた。

以上の結果から、2,3,6-トリメチルフェノールは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と結論した。

なお、類似化合物である2,6-ジブチル-*p*-クレゾールおよび2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノールは、いずれも細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている³⁾。

参考文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).
- 3) 石館基監修, “微生物を用いる変異原性試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1991.

連絡先

試験責任者: 宮川 誠

試験担当者: 榎本佳明, 清水優子, 大久保智子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Makoto Miyagawa (Study director)

Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu,

Tomoko Okubo

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,

Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test of 2,3,6-trimethylphenol on bacteria (I)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate)					
		Base-pair change type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	162 150 (163) 177 (± 14)	15 8 (12) 12 (± 4)	27 39 (30) 23 (± 8)	24 27 (26) 26 (± 2)	4 4 (5) 6 (± 1)	
	39.1	149 175 (158) 150 (± 15)	7 16 (10) 8 (± 5)	33 25 (27) 22 (± 6)	23 30 (25) 22 (± 4)	4 4 (4) 3 (± 1)	
	78.1	153 142 (145) 141 (± 7)	14 11 (11) 9 (± 3)	25 21 (27) 34 (± 7)	20 20 (20) 20 (± 0)	8 7 (6) 3 (± 3)	
	156	135 142 (137) 135 (± 4)	13 9 (11) 10 (± 2)	23 35 (27) 23 (± 7)	17 18 (18) 18 (± 1)	7 6 (6) 4 (± 2)	
	313	128 149 (145) 159 (± 16)	9 13 (11) 12 (± 2)	34 37 (32) 24 (± 7)	35 23 (27) 22 (± 7)	7 6 (8) 11 (± 3)	
	625	94* 94* (102) 119* (± 14)	10* 9* (8) 6* (± 2)	24 24 (25) 27 (± 2)	23 21 (21) 19 (± 2)	9 8 (8) 7 (± 1)	
	1250	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	185 168 (181) 190 (± 12)	10 13 (13) 16 (± 3)	27 32 (29) 27 (± 3)	24 23 (30) 43 (± 11)	11 9 (9) 8 (± 2)	
	39.1	207 182 (193) 190 (± 13)	9 10 (12) 18 (± 5)	36 24 (31) 33 (± 6)	37 41 (38) 35 (± 3)	6 6 (6) 7 (± 1)	
	78.1	213 198 (199) 187 (± 13)	18 11 (17) 21 (± 5)	32 47 (38) 35 (± 8)	36 33 (38) 46 (± 7)	11 8 (8) 5 (± 3)	
	156	186 193 (191) 194 (± 4)	10 15 (13) 13 (± 3)	41 33 (38) 40 (± 4)	40 33 (40) 46 (± 7)	13 12 (14) 16 (± 2)	
	313	182 199 (190) 189 (± 9)	11 12 (12) 12 (± 1)	34 43 (35) 27 (± 8)	37 40 (40) 42 (± 3)	18 10 (13) 10 (± 5)	
	625	145* 137* (149) 165* (± 14)	12* 10* (13) 17* (± 4)	39 36 (37) 37 (± 2)	35 29 (29) 23 (± 6)	18 8 (14) 15 (± 5)	
	1250	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 (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA	
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80	
	Number of revertants	597 566 (574) 559 (± 20)	452 482 (476) 493 (± 21)	409 461 (427) 410 (± 30)	356 329 (346) 352 (± 15)	318 339 (314) 284 (± 28)	
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
	Number of revertants	1221 1131 (1200) 1247 (± 61)	344 339 (336) 326 (± 9)	1239 1339 (1324) 1393 (± 78)	393 485 (432) 419 (± 47)	131 180 (170) 200 (± 36)	

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
 ($\pm$ S.D.)

*: Microbial toxicity was observed.

Table 2 Results of reverse mutation test of 2,3,6-trimethylphenol on bacteria (II)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate)					
		Base-pair change type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	162 175 (164) 156 (± 10)	17 12 (13) 9 (± 4)	23 17 (25) 36 (± 10)	26 24 (26) 27 (± 2)	10 17 (13) 13 (± 4)	
	39.1	163 159 (157) 149 (± 7)	13 15 (14) 13 (± 1)	30 25 (28) 30 (± 3)	20 15 (16) 13 (± 4)	15 9 (13) 16 (± 4)	
	78.1	165 167 (168) 173 (± 4)	12 13 (14) 16 (± 2)	29 27 (28) 29 (± 1)	16 24 (21) 23 (± 4)	11 21 (17) 19 (± 5)	
	156	180 166 (162) 141 (± 20)	12 14 (16) 23 (± 6)	28 28 (29) 32 (± 2)	12 14 (16) 22 (± 5)	9 14 (13) 16 (± 4)	
	313	147 167 (158) 160 (± 10)	16 9 (13) 15 (± 4)	19 20 (26) 38 (± 11)	28 30 (25) 18 (± 6)	14 19 (17) 18 (± 3)	
	625	136* 107* (117) 107* (± 17)	5* 3* (6) 11* (± 4)	23 17 (23) 29 (± 6)	16 15 (16) 17 (± 1)	10 9 (11) 13 (± 2)	
	1250	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	172 187 (168) 144 (± 22)	15 17 (15) 13 (± 2)	37 24 (31) 31 (± 7)	36 33 (33) 30 (± 3)	16 15 (16) 18 (± 2)	
	39.1	183 193 (194) 205 (± 11)	26 12 (16) 10 (± 9)	29 41 (35) 34 (± 6)	36 42 (37) 33 (± 5)	18 15 (18) 22 (± 4)	
	78.1	212 218 (218) 223 (± 6)	13 9 (13) 17 (± 4)	38 35 (37) 37 (± 2)	25 27 (25) 24 (± 2)	11 10 (13) 18 (± 4)	
	156	214 190 (199) 192 (± 13)	10 17 (13) 11 (± 4)	44 34 (35) 27 (± 9)	40 36 (35) 30 (± 5)	20 21 (23) 27 (± 4)	
	313	218 197 (210) 214 (± 11)	16 16 (16) 17 (± 1)	41 23 (31) 28 (± 9)	28 44 (33) 27 (± 10)	18 19 (19) 19 (± 1)	
	625	166* 170* (161) 148* (± 12)	11* 8* (12) 16* (± 4)	22 36 (27) 22 (± 8)	21 23 (23) 25 (± 2)	8 13 (12) 16 (± 4)	
	1250	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 (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA	
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80	
	Number of revertants	526 443 (470) 440 (± 49)	572 561 (561) 551 (± 11)	846 765 (775) 715 (± 66)	397 406 (410) 427 (± 15)	402 330 (354) 330 (± 42)	
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
	Number of revertants	1160 1119 (1124) 1092 (± 34)	333 310 (321) 320 (± 12)	1343 1373 (1372) 1401 (± 29)	354 378 (365) 363 (± 12)	176 196 (181) 170 (± 14)	

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide
 ENNG: N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
 ($\pm$ S.D.)

*: Microbial toxicity was observed.

2,3,6-トリメ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 2,3,6-Trimethylphenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2,3,6-トリメ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、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法の24、48時間処理および短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下において200 $\mu\text{g/mL}$ を最高濃度として、公比2で4用量を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、構造異常細胞の出現頻度は、24時間処理100 $\mu\text{g/mL}$ で5.0%、48時間処理の25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ において2.0、11.5、38.0、18.1%であった。これらの再現性及び用量依存性を確認するために、24時間、48時間処理ともに、200 $\mu\text{g/mL}$ を最高濃度として、公比2で5用量で確認試験を実施した。その結果、48時間処理の50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ において9.5、13.5、8.5%であった。

短時間処理法S9 mix存在下の200 $\mu\text{g/mL}$ およびS9 mix非存在下の200 $\mu\text{g/mL}$ において、染色体の構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ11.5、11.0%であった。

数的異常細胞の出現頻度は、全ての処理条件で5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では2,3,6-トリメチルフェノールは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1996年11月、入手時:継代14代、凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(GIBCO BRL, ロット番号:39K0464)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、

24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mixの存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

2,3,6-トリメチルフェノール(ロット番号:971209, 本州化学工業(株), 和歌山)は、純度:99.67%(不純物として、2,4,6-トリメチルフェノール0.08%, 2,5-キシレノール0.05%含有)の淡黄色固体である。被験物質は使用時まで室温、暗所に保存した。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質提供者が分析し、確認した。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はアセトン(国産化学(株), ロット番号:A605G1)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、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、すべての試験において培養液の1.0 vol%になるように加えた。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(オリンパス光学工業(株))を用いて測定し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、2,3,6-トリメチルフェノールの約50%の増殖抑制を示す濃度を、プロビット法により算出したところ、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ124、71 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、短時間処理法のS9 mix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108、119 $\mu\text{g/mL}$ であった。(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

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最高濃度を200 $\mu\text{g/mL}$ とし、公比2で4用量を設定した。また、連続処理法24および48時間処理の確認試験では、最高濃度を200 $\mu\text{g/mL}$ とし、公比2で5用量を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:139AFK)を0.03 $\mu\text{g/mL}$ 、

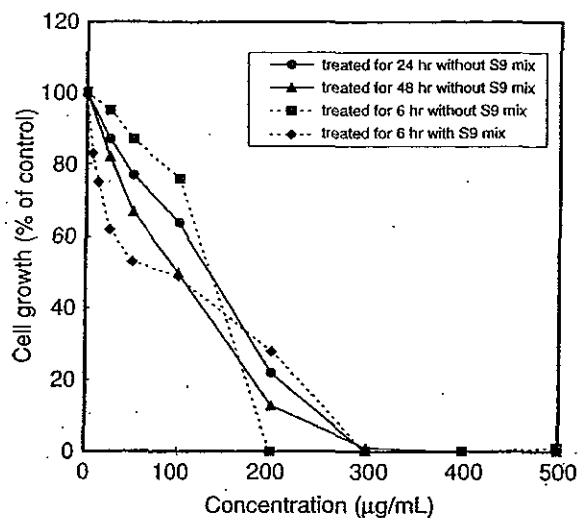


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,3,6-trimethylphenol

短時間処理法は、ベンゾ [a] ピレン (東京化成工業㈱, ロット番号:AX01) を 20 μg/mL に設定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 μg/mL になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき2枚作製した。作製した標本を、3 % ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを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。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 (MMS)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。

構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾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。

結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果を Table 1, 2 に示した。CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、構造異常細胞の出現頻度は、24時間処理100

μg/mL で5.0 %, 48時間処理の25, 50, 100, 200 μg/mL において2.0, 11.5, 38.0, 18.1 % であった。このため、再現性及び用量依存性を確認するために、24時間、48時間処理ともに、200 μg/mL を最高濃度として、公比2で5用量で確認試験を実施した。その結果、48時間処理の50, 100, 200 μg/mL において9.5, 13.5, 8.5 % であった。

短時間処理法による染色体分析の結果を Table 2 に示した。短時間処理法 S9 mix 存在下の 200 μg/mL および S9 mix 非存在下の 200 μg/mL において、染色体の構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ11.5, 11.0 % であった。

また、数的異常細胞の出現頻度は全ての処理条件で5 % 未満であった。

以上の結果から、2,3,6-トリメチル安息香酸は本試験条件下において、染色体異常誘発性を有すると結論した。

なお、同物質あるいは類似化合物における染色体異常誘発性に関する情報は得られなかった。

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, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 2) 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, p. 19.

連絡先

試験責任者: 太田絵律奈

試験担当者: 中川宗洋, 石毛裕子, 穴澤由美子,
玉川 恵, 成見香瑞範

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Erina Ohta (Study director)

Munehiro Nakagawa, Yuko Ishige,

Yumiko Anazawa, Megumi Tamagawa,

Kazunori Narumi

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874