

3-メチル-4-ニトロフェノールの細菌を用いる 復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 3-Methyl-4-nitrophenol on Bacteria

要約

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、3-メチル-4-ニトロ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。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* を用い、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、1.5~5000 µg/プレート の用量で、本試験は用量設定試験で抗菌性が認められたことから、直接法および代謝活性化法のいずれも 78.12~2500 µg/プレート の用量で試験を実施した。

その結果、それぞれ2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌とも、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、3-メチル-4-ニトロフェノールは、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。

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、カリフォルニア大学の B.N. Ames 博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。

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字型試験管に種菌を接種し、37℃、10~12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〕

3-メチル-4-ニトロフェノール (CAS No 2581-34-2) は、分子量153.15、比重 (128℃) 1.208 の淡黄褐色の結晶である。純度 99.9% のもの (ロット番号: 90320S, 住友化学工業(株)製造) を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで密栓して冷所に保管した。

3-メチル-4-ニトロフェノールは、ジメチルスルホキシド (DMSO, ロット番号: TWP5445, 和光純薬工業(株)) を用いて 50 mg/ml なるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度および比重換算は行わなかった。試験の開始に先立って、秦野研究所において3-メチル-4-ニトロフェノールの DMSO 溶液中での安定

性試験を行った。すなわち、本試験および染色体異常試験における最高濃度 (30 mg/ml) および最低濃度 (781.2 µg/ml) の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値 (0時間) の平均に対して、いずれも 99.8% であった。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、25.00 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、102~103%、また、781.2 µg/ml 溶液は、106~108% であった。

以上の結果から、3-メチル-4-ニトロフェノールは DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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。

AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬(株))
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))
9-AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem.Co.)
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 混液の組成〕

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%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
ピチオン	0.5 mM

* : WP2 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
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸水素アンモニウムナトリウム	3.5 g
・4水和物	

グルコース	20 g
バクトアガー (Difco)	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 混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
NADH	4 μ mol
塩化マグネシウム	8 μ mol
NADPH	4 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
0.2M リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μ mol

** : 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)) を用いた。

〔試験方法〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッパガー2ml, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml, (代謝活性化試験においては S9 混液 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 DMSO, 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Tableに示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。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、寒天表面上の菌膜の状態から判断した。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性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。

結果および考察

〔用量設定試験〕

3-メチル-4-ニトロフェノールについて、1.5~5000 μ g/プレートの範囲で公比約3とし試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、1500 μ g/プレート以上で抗菌性が認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量の決定は、直接法、代謝活性化法とも抗菌性の認められる用量範囲の 2500 μ g/プレートとし、以下6用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Table 1, 2 に示した。3-メチル-4-ニトロフェノールについて上記の用量範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある陰性対照の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。

以上の結果に基づき、3-メチル-4-ニトロフェノールは、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) D.M. Maron, and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983).
- (2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nicholson and C. Ramel eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, 161-187.

連絡先

試験責任者：高鳥浩介
試験担当者：鈴木文子, 亀地礼子, 川上久美子,
松本容彦, 北嶋美似子,
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Kosuke Takatori (Study director)
Fumiko Suzuki, Reiko Kameji,
Kumiko Kawakami,
Yasuhiko Matsuki, Miiko Kitashima
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 3-methyl-4-nitrophenol ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μ g / 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	102	99	102	13	13	12	18	22	20	19	32	22	5	10	13
		(101 $\pm$ 1.7)			(13 $\pm$ 0.6)			(20 $\pm$ 2.0)			(24 $\pm$ 6.8)			(9 $\pm$ 4.0)		
	78.12	130	92	105	13	17	16	10	14	20	30	29	22	9	7	12
		(109 $\pm$ 19.3)			(15 $\pm$ 2.1)			(15 $\pm$ 5.0)			(27 $\pm$ 4.4)			(9 $\pm$ 2.5)		
	156.2	116	110	87	19	18	19	11	12	17	21	30	20	5	11	10
		(104 $\pm$ 15.3)			(19 $\pm$ 0.6)			(13 $\pm$ 3.2)			(24 $\pm$ 5.5)			(9 $\pm$ 3.2)		
	312.5	103	122	99	10	14	13	7	14	16	26	17	26	9	12	2
		(108 $\pm$ 12.3)			(12 $\pm$ 2.1)			(12 $\pm$ 4.7)			(23 $\pm$ 5.2)			(8 $\pm$ 5.1)		
S9Mix (+)	625	95	82	85	13	13	12	7	6	7	21	25	27	12	6	7
		(87 $\pm$ 6.8)			(13 $\pm$ 0.6)			(7 $\pm$ 0.6)			(24 $\pm$ 3.1)			(8 $\pm$ 3.2)		
	1250	64 *	75 *	70 *	7 *	10 *	17 *	0 *	2 *	2 *	28 *	17 *	18 *	0 *	4 *	7 *
		(70 $\pm$ 5.5)			(11 $\pm$ 5.1)			(1 $\pm$ 1.2)			(21 $\pm$ 6.1)			(4 $\pm$ 3.5)		
	2500	18 *	20 *	21 *	11 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	4 *	14 *	9 *	0 *	0 *	0 *
		(20 $\pm$ 1.5)			(4 $\pm$ 6.4)			(0 $\pm$ 0.0)			(9 $\pm$ 5.0)			(0 $\pm$ 0.0)		
S9Mix (+)	0	113	111	107	11	9	14	20	28	27	36	41	39	12	16	12
		(110 $\pm$ 3.1)			(11 $\pm$ 2.5)			(25 $\pm$ 4.4)			(39 $\pm$ 2.5)			(13 $\pm$ 2.3)		
	78.12	121	126	108	14	17	16	27	22	32	30	31	20	15	9	16
		(118 $\pm$ 9.3)			(16 $\pm$ 1.5)			(27 $\pm$ 5.0)			(27 $\pm$ 6.1)			(13 $\pm$ 3.8)		
	156.2	117	107	103	12	12	16	18	28	22	29	22	29	13	11	9
		(109 $\pm$ 7.2)			(13 $\pm$ 2.3)			(23 $\pm$ 5.0)			(27 $\pm$ 4.0)			(11 $\pm$ 2.0)		
	312.5	95	100	103	8	15	22	10	7	16	31	28	23	11	14	11
		(99 $\pm$ 4.0)			(15 $\pm$ 7.0)			(11 $\pm$ 4.6)			(27 $\pm$ 4.0)			(12 $\pm$ 1.7)		
Positive control S9 Mix (-)	625	101	115	97	14	19	10	10	4	9	24	24	30	9	4	10
		(104 $\pm$ 9.5)			(14 $\pm$ 4.5)			(8 $\pm$ 3.2)			(26 $\pm$ 3.5)			(8 $\pm$ 3.2)		
	1250	86 *	58 *	75 *	13 *	9 *	10 *	4 *	3 *	4 *	16 *	24 *	22 *	7 *	2 *	3 *
		(73 $\pm$ 14.1)			(11 $\pm$ 2.1)			(4 $\pm$ 0.6)			(21 $\pm$ 4.2)			(4 $\pm$ 2.6)		
	2500	15 *	23 *	22 *	0 *	2 *	2 *	0 *	0 *	0 *	5 *	8 *	6 *	0 *	1 *	1 *
		(20 $\pm$ 4.4)			(1 $\pm$ 1.2)			(0 $\pm$ 0.0)			(6 $\pm$ 1.5)			(1 $\pm$ 0.6)		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μ g / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	556	533	565	281	266	290	244	235	237	664	665	687	2796	3125	2913
		(551 $\pm$ 16.5)			(279 $\pm$ 12.1)			(239 $\pm$ 4.7)			(672 $\pm$ 13.0)			(2945 $\pm$ 166.8)		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g / plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	687	771	609	252	228	271	545	505	523	348	331	339	241	202	253
		(689 $\pm$ 81.0)			(250 $\pm$ 21.5)			(524 $\pm$ 20.0)			(339 $\pm$ 8.5)			(232 $\pm$ 26.7)		

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%.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 3-methyl-4-nitrophenol ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μ g /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	0	181	185	145	13	17	13	20	19	16	21	19	27	8	14	11
		(170 $\pm$ 22.0)			(14 $\pm$ 2.3)			(18 $\pm$ 2.1)			(22 $\pm$ 4.2)			(11 $\pm$ 3.0)		
	78.12	90	92	93	22	17	18	17	15	11	26	29	20	13	9	9
		(92 $\pm$ 1.5)			(19 $\pm$ 2.6)			(14 $\pm$ 3.1)			(25 $\pm$ 4.6)			(10 $\pm$ 2.3)		
	156.2	123	108	94	8	17	8	14	11	16	21	27	19	8	8	9
		(108 $\pm$ 14.5)			(11 $\pm$ 5.2)			(14 $\pm$ 2.5)			(22 $\pm$ 4.2)			(8 $\pm$ 0.6)		
	312.5	124	125	85	10	11	19	19	9	12	30	17	24	7	15	7
		(111 $\pm$ 22.8)			(13 $\pm$ 4.9)			(13 $\pm$ 5.1)			(24 $\pm$ 6.5)			(10 $\pm$ 4.6)		
S9 Mix (+)	625	101	99	103	13	15	11	4	8	7	22	11	17	6	4	5
		(101 $\pm$ 2.0)			(13 $\pm$ 2.0)			(6 $\pm$ 2.1)			(17 $\pm$ 5.5)			(5 $\pm$ 1.0)		
	1250	86 *	72 *	74 *	7 *	8 *	5 *	2 *	0 *	1 *	16 *	15 *	14 *	4 *	4 *	13 *
		(77 $\pm$ 7.6)			(7 $\pm$ 1.5)			(1 $\pm$ 1.0)			(15 $\pm$ 1.0)			(7 $\pm$ 5.2)		
	2500	5 *	6 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	0 *	0 *	0 *
		(4 $\pm$ 3.2)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(1 $\pm$ 1.2)			(0 $\pm$ 0.0)		
S9 Mix (+)	0	161	149	125	20	16	17	23	21	21	35	34	30	11	12	10
		(145 $\pm$ 18.3)			(18 $\pm$ 2.1)			(22 $\pm$ 1.2)			(33 $\pm$ 2.6)			(11 $\pm$ 1.0)		
	78.12	120	100	113	15	13	13	24	24	13	26	23	37	9	7	11
		(111 $\pm$ 10.1)			(14 $\pm$ 1.2)			(20 $\pm$ 6.4)			(29 $\pm$ 7.4)			(9 $\pm$ 2.0)		
	156.2	110	97	117	10	17	12	20	22	17	35	36	36	13	14	22
		(108 $\pm$ 10.1)			(13 $\pm$ 3.6)			(20 $\pm$ 2.5)			(36 $\pm$ 0.6)			(16 $\pm$ 4.9)		
	312.5	114	112	107	15	23	10	23	19	24	38	24	28	13	13	11
		(111 $\pm$ 3.6)			(16 $\pm$ 6.6)			(22 $\pm$ 2.6)			(30 $\pm$ 7.2)			(12 $\pm$ 1.2)		
S9 Mix (+)	625	107	103	117	12	8	17	4	10	9	32	31	23	12	12	15
		(109 $\pm$ 7.2)			(12 $\pm$ 4.5)			(8 $\pm$ 3.2)			(29 $\pm$ 4.9)			(13 $\pm$ 1.7)		
	1250	76 *	74 *	86 *	2 *	3 *	5 *	0 *	1 *	0 *	31 *	13 *	21 *	5 *	6 *	5 *
		(79 $\pm$ 6.4)			(3 $\pm$ 1.5)			(0 $\pm$ 0.6)			(22 $\pm$ 9.0)			(5 $\pm$ 0.6)		
	2500	0 *	1 *	2 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	1 *	0 *	0 *	0 *	0 *
		(1 $\pm$ 1.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(1 $\pm$ 1.0)			(0 $\pm$ 0.0)		
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μ g /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	545	529	539	239	271	259	141	132	127	633	610	577	2723	2907	2685
		(538 $\pm$ 8.1)			(256 $\pm$ 16.2)			(133 $\pm$ 7.1)			(607 $\pm$ 28.1)			(2772 $\pm$ 118.7)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	743	666	722	257	266	222	679	753	743	321	343	346	246	227	231
		(710 $\pm$ 39.8)			(248 $\pm$ 23.2)			(725 $\pm$ 40.1)			(337 $\pm$ 13.7)			(235 $\pm$ 10.0)		

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%.

3-メチル-4-ニトロフェノールの 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 3-Methyl-4-nitrophenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

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、3-メチル-4-ニトロ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/IU, 以下CHLと略す)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行ったところ、直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は0.023 mg/mlであった。一方、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0.12 mg/mlおよび0.15 mg/mlであった。従って、染色体異常試験において、直接法では0.023 mg/ml、代謝活性化法では0.15 mg/mlの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、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。一方、代謝活性化法におけるS9mix非存在下の高濃度群では、観察した細胞の9%に染色体の構造異常が認められた。また、S9mix存在下におけるすべての処理群で、観察した細胞の10%以上(gapを含む)に染色体の構造異常が認められ、陽性の結果が得られた。

以上の結果より、3-メチル-4-ニトロフェノールは、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

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。

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。

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℃のCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

直接法では、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、代謝活性化法では、細胞播種3日目にS9mix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

3-メチル-4-ニトロフェノール(別名: 4-ニトロ-m-クレゾール, CAS No.: 2581-34-2, ロット番号: 90320S, 住友化学工業(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は淡黄褐色結晶で、水に0.15 g/100 g (25℃)まで溶解、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアセトンに溶けやすく、分子式C₇H₇NO₃, 分子量153.15, 純度99.9%, 融点127~129℃, 沸点207℃で、170℃以上の高温にさらすと爆発の可能性がある物質である。原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)での安定性試験では、0.7812~30 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

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: 129F0413 および30H0608)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0.5% (v/v)になるように加えた。染色体異常試験の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の調製液の濃度は、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。

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、3-メチル-4-ニトロフェノールの約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0.023 mg/mlであった。一方、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0.12 mg/mlおよび0.15 mg/mlであった(Fig. 1)。

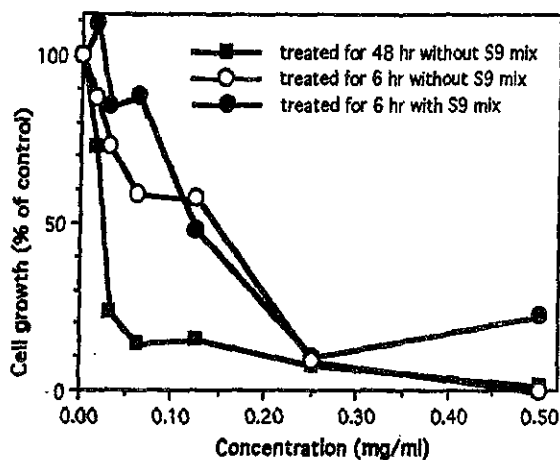


Fig. 1 Growth inhibition of CHL cells treated with with 3-methyl-4-nitrophenol

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高濃度群を、直接法では0.023 mg/ml、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下では0.15 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。

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 μ g/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で約10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。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。

10. 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

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。3-メチル-4-ニトロフェノールを加えて24時間および48時間処理した各濃度群で、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。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。3-メチル-4-ニトロフェノールを加えてS9mix非存在下で6時間処理した高濃度群(0.15 mg/ml)で、観察した細胞の9%(gapを含む)に染色体の構造異常がみられた。また、S9mix存在下で6時間処理したすべての濃度群で、観察した細胞の10%以上(gapを含む)に染色体の構造異常がみられ、陽性の結果が得られた。

3-メチル-4-ニトロフェノールを培養液に加えると、培養液の色が黄色に変化することから、本試験の代謝活性化法と同一条件で、処理直後と処理終了時のpHを測定した。その結果、pHは6.87~7.96の範囲内の値を示し、明らかなpHの低下は認められなかった。従って、本実験で誘発された染色体異常に関しては、3-メチル-4-ニトロフェノール添加による培地の酸性化によるよりはむしろ、3-メチル-4-ニトロフェノールそれ自身によるDNA傷害作用に起因するものと考えられる。

一方、本試験と並行して実施された5種類の検定菌を用いる復帰突然変異試験では、直接法、代謝活性化法のいずれの試験においても変異原活性は認められなかった。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 3-methyl-4-nitrophenol** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
Solvent ¹⁾ 0		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50		
MNP 0.006		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
MNP 0.012		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	—	—
MNP 0.023		24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38	—	—
MC 0.00005		24	200	7	25	69	1	0	1	0	103	0	56 * (28.0)	53 * (26.5)	0.25	+	—
Solvent ¹⁾ 0		48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
MNP 0.006		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	—	—
MNP 0.01		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	—	—
MNP 0.023		48	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.13	—	—
MC 0.00005		48	200	7	12	56	0	4	0	0	79	0	53 * (26.5)	51 * (25.5)	0.25	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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 analysed 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 99.9%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 3-methyl-4-nitrophenol ** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
Solvent ¹⁾ 0		—	6 - (18)	200	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.38		
MNP 0.04		—	6 - (18)	200	2	0	9	0	0	0	0	11	0	8 (4.0)	7 * (3.5)	0.88	—	—
MNP 0.08		—	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
MNP 0.15		—	6 - (18)	200	5	14	15	0	0	0	0	34	0	18 * (9.0)	15 * (7.5)	0.25	±	—
CPA 0.0005		—	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
Solvent ¹⁾ 0		+	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00		
MNP 0.04		+	6 - (18)	200	10	11	29	0	0	0	20	70	0	31 * (15.5)	26 * (13.0)	0.88 *	+	—
MNP 0.08		+	6 - (18)	200	6	7	33	0	0	0	0	46	0	21 * (10.5)	18 * (9.0)	0.50	+	—
MNP 0.15		+	6 - (18)	200	6	9	15	0	0	0	0	30	0	23 * (11.5)	19 * (9.5)	0.00	+	—
CPA 0.0005		+	6 - (18)	200	25	65	152	1	1	0	80	324	0	125 * (62.5)	121 * (60.5)	0.38	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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.

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 analysed 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 99.9%.

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) 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.

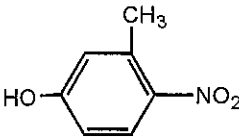
連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 日下部博一,
橋本恵子, 渋谷 徹, 原 巧,
加藤基恵, 石原尚子
(財)食品薬品安全センター秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors : Noriho Tanaka (Study director)
Kohji Yamakage,
Hirokazu Kusakabe,
Keiko Hashimoto, Toru Shibuya,
Takumi Hara, Motoe Kato,
Naoko Ishihara
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE

CAS No.	2581-34-2
Chemical Name	Phenol, 3-methyl-4-nitro-
Structural Formula	
CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS Potential risk to man is identified due to genotoxicity and thus presumed carcinogenicity, but measures currently in place reduce risks such that the chemical is of low priority for further work.	
SHORT SUMMARY WHICH SUPPORTS THE REASONS FOR THE CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS 3-Methyl-4-nitrophenol is a stable solid, and the production volume was 3,300 tonnes/year for 1990 - 1993 in Japan. The substance is used as an intermediate for the synthesis of pesticides. Based on an international information gathering activity on exposure, 3-methyl-4-nitrophenol has been produced in two OECD Member countries, i.e. Japan and Denmark. In Japan, the chemical is manufactured and processed in a closed system, i.e. the product itself and all reagents and solvents for its synthesis are handled in perfectly closed tubes and vessels. The synthesis is operated within the same plant. At the work place, protective clothing, gloves and goggles are used. No consumer uses are known. Monitoring data in the general environment in Japan (surface water and sediments) are available, but the substance was not detected in 1984. Regarding the Japanese global situation, the predicted worst case concentration in surface water is 1.7×10^{-4} mg/l and the predicted indirect exposure to humans through the environment was calculated to be 1.4×10^{-3} mg/man/day (i.e. 2.3×10^{-5} mg/kg/day). In Denmark, the chemical is produced, but detailed exposure information is not available, except that there is no consumer use. For the environment, various NOEC and LC₅₀ values were gained from test results; LC₅₀ = 9.8 mg/l (acute fish); EC₅₀ = 9.1 mg/l (acute daphnia); EC₅₀ = 8.6 mg/l (acute algae); NOEC = 0.78 mg/l (long-term daphnia reproduction). Therefore, the chemical is considered to be moderately toxic to fish, daphnids and algae. The lowest chronic toxicity result, 21 d-NOEC (reproduction) of <i>Daphnia magna</i> (0.78 mg/l), was adopted for the calculation of the PNEC, applying an assessment factor of 100. Thus the PNEC of the chemical is 0.0078 mg/l. Since the PEC is lower than the PNEC, the environmental risk is presumably low. The chemical showed genotoxic effects in a chromosomal aberration test <i>in vitro</i> and in an <i>in vivo</i> micronucleus test. In a 6 months repeated dose toxicity test, the chemical showed a transient excretion of glucose to urine in the 1500 ppm group, but no other abnormalities were noted. In an OECD preliminary reproductive/developmental toxicity test, the chemical showed no effect on reproductive ability, organ weight, histopathological appearance of reproductive organs, delivery and maternal behaviour of dams, viability, clinical signs, body weight change and autopsy findings for offspring. Also, as repeated dose effect to male rats, decreased locomotor activity, prone position, bradypnea and thrombus in the kidney, heart and lung were observed in the high-dose group (300 mg/kg/day). The NOEL for 6 months repeated dose toxicity was 500 ppm (30.7 mg/kg/day) in both sexes. The NOEL for reproductive toxicity was 300 mg/kg/day and the NOEL for repeat dose toxicity to male rats in the preliminary reproductive test was 100 mg/kg/day. 3-Methyl-4-nitrophenol showed genotoxicity in an <i>in vitro</i> chromosomal aberration test. However, this chemical is used as raw material for the synthesis of pesticides in closed systems, and the results from gathering international exposure information showed that the production volume is low, and exposure to the general population from the general environment is currently low. In Japan, the chemical is manufactured and processed in a closed system, i.e. the product itself and all reagents and solvents for its synthesis are handled in perfectly closed tubes and vessels. The synthesis is operated within the same plant. At the work place, protective clothing, gloves and goggles are used. The	

daily intake of the chemical via the environment was estimated to be 1.4×10^{-3} mg/man/day (i.e. 2.3×10^{-5} mg/kg/day) from the result of worst-case calculation using the MNSEM 145I exposure model. The concentrations in surface water and sediments were not detectable in a Japanese environmental monitoring program. No consumer uses have been identified. Although no data on work place monitoring have been reported, voluntary exposure reducing procedures are in place in Japan. Occupational exposure seems to be low.

Therefore, 3-methyl-4-nitrophenol is considered as low priority for further work.

NATURE OF FURTHER WORK RECOMMENDED

In an OECD preliminary reproductive/developmental toxicity test in rats at doses of 0, 30, and 300 mg/kg/day, the chemical showed decreased locomotor activity, prone position, bradypnea and thrombus in the kidney, heart and lung were observed in the high-dose group (300 mg/kg/day) as repeated dose effect to male rats. NOEL for repeated dose toxicity to male rats in the preliminary reproductive toxicity test was 100 mg/kg/day.

3.1.3 Mutagenicity

In vitro Studies

Bacterial test

A reverse gene mutation assay was conducted in line with Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Japan) and OECD Test Guidelines 471 and 472, using the pre-incubation method. This study was well controlled and regarded as a key study.

3-Methyl-4-nitrophenol showed negative results in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA* at concentrations up to 1.5 mg/plate with or without a metabolic activation system (MHW, 1993).

Non-bacterial test

A chromosomal aberration test in line with Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Japan) and OECD Test Guideline 473 was conducted using cultured Chinese Hamster lung (CHL/IU) cells. This study was well controlled and regarded as a key study. Although 3-methyl-4-nitrophenol showed negative results without metabolic activation, positive results were obtained with metabolic activation (MHW, 1993).

In vivo Studies

In a micronucleus test in mice, a positive result was reported. However, detailed data are not available.

3.1.4 Toxicity for Reproduction

3-Methyl-4-nitrophenol was studied for oral toxicity in rats according to the OECD Preliminary reproductive toxicity test at doses of 0, 30, 100 and 300 mg/kg/day. Although this study was designed to investigate reproductive capability in parental generation as well as development in F₁ offspring, parameters to evaluate developmental toxicity were limited to body weights at day 0 and day 4 after birth, and autopsy findings at day 4.

Effects of the repeated administration on both sexes:

No effects of 3-methyl-4-nitrophenol treatment were revealed in body weight changes, food consumption or autopsy. One male of the 300 mg/kg group died, and decrease in spontaneous activity, prone position and bradypnea were noted in the dead animal and two surviving females of the 300 mg/kg group. On the basis of these findings, NOEL of this chemical was considered to be 100 mg/kg/day for repeated administration toxicity of both sexes in this study.

In effects on reproduction of both sexes and development of the next generation, no effects of this chemical were detected in reproductive ability, organ weights or histopathological examination of the reproductive organs of both sexes, delivery or maternal behavior of dams, viability, general appearance, body weight changes or autopsy of pups. On the basis of these findings, the NOEL of this chemical was considered to be 300 mg/kg/day for reproductive/developmental toxicity of both parent animals and offspring in this study.