

2. 表題

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討する。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

ガイドライン

- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

5. 試験番号

9048 (115-199)

6. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

7. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

【本試験 (確認試験)】

被験物質液調製日 : 平成17年9月6日
被験物質処理日 : 平成17年9月6日
コロニー計数日 : 平成17年9月8日
実験終了日 : 平成17年9月8日
試験終了日 : 平成18年9月11日

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (日本名 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール)

12.2. ロット番号

K630V

12.3. 純度

99.8%

残り 0.2%不明

12.4. 提供元

丸善油化商事株式会社

12.5. 特性分析年月日

2005年3月16日

12.6. 保存条件

気密, 室温 (1~30°C)

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-3 : 実測値 23.8~25.3°C, 2005年5月11日~2005年5月26日; 6号館2階被験物質調製室内スーパードライ ch. 40 (C-3) : 実測値 17.8~26.6°C, 2005年5月26日~2005年11月29日)

12.8. 化学名

2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール

2,6-Ditert-butyl-4-ethylphenol

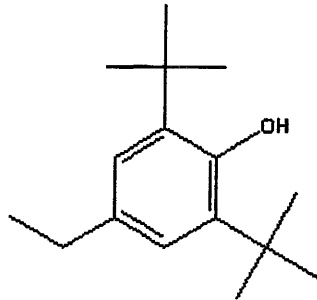
12.9. 別名

Phenol, 2,6-di-tert-butyl-4-ethyl-

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol

12.10. CAS No.
4130-42-1

12.11. 化学構造



12.12. 分子式
C₁₆H₂₆O

12.13. 分子量
234.38

12.14. 物質の状態
形状：結晶性粉状
色：淡黄白色

12.15. 融点/沸点
融点：45.7°C/沸点：268.6°C

12.16. 引火点
132°C (クリーブランド開放式)

12.17. 溶解性
水に不溶
アルコール、トルエン、ヘプタン、クロロホルム、ガソリン、ベンゼンに可溶
DMSOに易溶 (>240 mg/mL：当施設の試験による)

12.18. 安定性
通常の取り扱い条件においては安定

12.19. 分配係数 (Octanol/Water)
Log Pow > 3.27

12.20. 取り扱い上の注意

適切な保護具（マスク・手袋等）を着用し，吸い込んだり，目，皮膚および衣類に触れたりしないようにする。

12.21. 急性毒性

経口投与における LD₅₀ は，雄ラットでは 4800 mg/kg，雌マウスでは 7450 mg/kg である。

12.22. 残余被験物質の処理

実験終了後，約 1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し，残りは安定性分析のため，被験物質等管理責任者を介して被験物質提供元に返却した。分析の結果（2005 年 12 月 20 日付報告），被験物質が試験期間中安定であったことが確認された。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において遺伝毒性ガイドラインでは試験菌株が指定されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は1983年9月9日にカリフォルニア大学(エイムス教授)から、また、大腸菌については1983年3月16日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。

2004年9月6日~同年9月9日および2005年8月30日~同年9月1日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO, GC用, 純度99.9%, Lot No. K30049278 および K31758278, Merck)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-U71V, 三洋電機バイオメディカ; 設定値:-80°C, 基準値:-60°C以下)に保存した。

13.2. 培地の調製

13.2.1. 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN培地(2005年6月23日製造, Lot No. ANI510FU, オリエンタル酵母工業)を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地Eを含む溶液30 mLを無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した。

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天(BA-30A, Lot No. 41201, 伊那食品工業)	12.0	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天 (Bacto-agar, Lot No. 3069265, BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した。ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275, 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 008D2026 【確認試験以外】、211D2047 【確認試験】、関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた。

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した。フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し、培養開始までの間、設定温度 4°C に静置した。その後、37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATPフォトメーター (ルミテスター-K-100, キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が 1.0×10^9 /mL 以上であることを確認した。生菌数を次の表に示した。

試験	生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	4.69	3.77	3.39	3.31	1.70
用量設定試験 (追加試験)	3.60	3.67	3.90	3.15	1.62
本試験	3.64	3.68	3.68	3.21	1.43
本試験 (確認試験)	3.01	2.41	2.98	2.09	1.23

13.4. S9 mix

製造後 6 カ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-523 【確認試験以外】、FSM-526 【確認試験】、キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法等を次の表に示した。

	確認試験以外	確認試験
ロット番号	RAA-523	RAA-526
製造年月日	2005年6月17日(誘導物質投与開始後5日目)	2005年7月29日(誘導物質投与開始後5日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系	
性/週齢	雄/7週齢	雄/7週齢
体重	207~243 g	215~259 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量および投与回数	PB: 30 mg/kg 1回(1日目) 60 mg/kg 3回(2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回(3日目)	
投与方法	腹腔内投与	
蛋白含量	26.05 mg/mL	25.58 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に不溶で DMSO に易溶 (>240 mg/mL) であり, DMSO と混合後, 4 時間以内では発熱, 発色, 発煙等の変化がなかった. したがって, 溶媒にはモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K31758278, Merck) を使用し, 調製後は 4 時間以内に使用した.

用量設定試験では, 使用直前に被験物質 400 mg を目盛付き試験管に精密に量り, 約 4 mL の DMSO (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 8 mL に定容し, 調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した. 4.5 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を加えることにより, 20.0 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶

液を調製した。

用量設定試験（追加試験）では、使用直前に被験物質 200 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 2 mL の DMSO（使用溶媒）を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 4 mL に定容し、調製原液（50.0 mg/mL 溶液）を準備した。3 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 2 mL を加えることにより 20.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205, 0.0819, 0.0328 および 0.0131 mg/mL 溶液を調製した。

本試験および本試験（確認試験）では、使用直前に被験物質 400 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 4 mL の DMSO（使用溶媒）を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 8 mL に定容し、調製原液（50.0 mg/mL 溶液）を準備した。4 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 4 mL を加えることにより 25.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195 および 0.0977 mg/mL 溶液を調製した。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液（保証期限：2006年9月1日、オリエンタル酵母工業）を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー（設定値：-80°C，基準値：-60°C以下）に保存した。陽性対照物質名および用量等を以下に示した。

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃ アジ化ナトリウム

9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA 2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	化合物名	陽性対照調製日	用量 (µg/プレート)	陽性対照溶液濃度 (µg/mL)	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2005.2.3	0.1	1.0	050203AF10
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2005.2.2	0.5	5.0	050202N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2005.2.3	80	800	050203A9
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2005.2.2	1.0	10	050202A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2005.2.2	0.5	5.0	050202A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	2005.2.2	10	100	050202A2100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液 (調製原液) ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 25 µL あるいは S9 mix 500 µL にトッパアガーを 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験 (予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートを最高用量とし、以下 2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19 µg/プレートの計 8 用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて試験菌株, S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した.

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に, 使用溶媒, 被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L を添加した. 次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合, 0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ L, 代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合, S9 mix を 500 μ L 分注した. さらに前培養した試験菌株懸濁液 100 μ L を加えた後, ウォーターバスシェーカー (MM-10, タイテック) を用いて 37°C の条件で 20 分間振盪 (120 回/分, プレインキュベーション) した. 振盪終了後, トップアガー 2 mL を添加し, 内容物を混合した. その後, 混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた. 恒温器 (SSV-R11DA, 池田理化) を用い, 各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した.

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した.

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため, プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 40$) を用いて観察した. 次いで, 復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した. 計測に際しては, コロニーアナライザー (CA-11, システムサイエンス) を用い, 面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した. ただし, 析出物の影響により, -S9 処理および+S9 処理の 5000 μ g/プレートの用量ではコロニーアナライザーの使用が不適當であったため, 目視でコロニーを計数した.

13.8. 用量設定試験 (追加試験)

用量設定試験の結果において, 代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA98 株および TA1537 株についてのみ生育阻害が低用量までみられ, 他の菌株と乖離した結果が得られたことから, 追加試験を実施した.

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果において, 代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA98 株および TA1537 株についてのみ生育阻害が低用量までみられたが, その他の菌株では 5000 μ g/プレートの用量においても生育阻害が認められなかった. したがって, 用量設定試験 (追加試験) における被験物質の用量として, 5000 μ g/プレートを最高用量に次表の 10 段階を設定した.