

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

菌株	用量 (µg/プレート)									
TA100	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA1535	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
WP2uvrA	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA98	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA1537	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.9. 本試験

13.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験（追加試験）の結果、代謝活性化系非存在下（-S9 処理）の TA100 株、TA98 株および TA1537 株について生育阻害がみられたが、その他については 5000 µg/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。また、いずれの被験物質処理群においても変異原性は認められなかった。したがって、本試験では生育阻害が認められると考えられる用量あるいは 5000 µg/プレートを最高用量とし、次表に示す 6~7 用量（公比 2）を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)							
TA100	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	
TA1535	—	156	313	625	1250	2500	5000	
WP2uvrA	—	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	

《代謝活性化系存在下 : +S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)					
TA100	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。ただし、析出物の影響により、-S9 処理および+S9 処理の 2500 µg/プレート以上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。

13.10. 本試験 (確認試験)

用量設定試験では、塩化ナトリウム濃度が規定値 (0.5 w/v%) と異なったトッブアガー (0.4 w/v%含有) を使用した上、さらに寒天の秤量値も生データ上で保証できない (風袋引きをした証拠がない) ことが判明したので、当該用量設定試験の結果を最終評価 (再現性確認) に採用することは出来ないと判断した。したがって、本試験との再現性をみる確認試験を実施した。

13.10.1. 用量

本試験の結果、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA100 株, TA98 株および TA1537 株について生育阻害がみられたが、その他については 5000 µg/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。また、変異原性は認められなかった。したがって、本試験 (確認試験) では、次表に示す 6~7 用量 (公比 2) を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	—	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA1535	—	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 ^{uvrA}	—	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	—	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000	
WP2 ^{uvrA}	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000	

13.10.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.10.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.10.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.10.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.11. 試験成立条件

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、背景データから求めた基準値内であること。陽性対照のコロニー数は同時陰性対照値の2倍を超えること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

13.12. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA98 株および TA1537 株についてのみ低用量まで認められ、生育阻害を示さない用量が 4 用量に満たなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.1.1. 被験物質の析出等

処理開始時に、-S9 処理では 128 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色の塊状、粉末状ならびに膜状の析出物が認められた。+S9 処理では 320 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色および透明油滴状の析出物および白濁が認められた。

コロニー数計測時には、-S9 処理および+S9 処理の両処理の 2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で透明油滴状、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた。

14.2. 用量設定試験 (追加試験)

結果を Figure 6~10 および Table 3 に示した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合、いずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は TA100 株, TA98 株および TA1537 株の 320 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量についてのみ認められた。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.2.1. 被験物質の析出等

処理開始時に、128 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色の粉末状ならびに膜状の析出物、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色塊状の析出物が認められた。プレインキュベーション終了後、800~2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で処理開始時に認められた白色粉末状が消失していた。

コロニー数計測時には、2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた。

14.3. 本試験

結果を Figure 11~15 および Table 4, 5 に示した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験

菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA100 株および TA98 株の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1537 株の 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量についてのみ認められた。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.3.1. 被験物質の析出等

処理開始時に、-S9 処理では 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色の粉末状ならびに膜状の析出物が認められた。+S9 処理では 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色および透明油滴状の析出物および白濁が認められた。プレインキュベーション終了後、-S9 処理では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色塊状の析出物が認められた。

コロニー数計測時においては、両処理の 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた。

14.4. 本試験 (確認試験)

結果を Figure 16~20 および Table 6, 7 に示した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA100 株および TA98 株の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1537 株の 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量についてのみ認められた。

一方、陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.4.1. 被験物質の析出等

処理開始時に、-S9 処理では 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色粉末状ならびに透明油滴状の析出物が認められた。+S9 処理では 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状の析出物が認められた。プレインキュベーション終了後、-S9 処理では 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状の、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色塊状の析出物が認められ、+S9 処理では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色の塊状および粉末状の析出物が認められた。

コロニー数計測時においては、両処理の 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色粉末状、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色塊状が認められた。

以上、用量設定試験 (追加試験)、本試験および本試験 (確認試験) により、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両処理法において再現性が確認された。

15. 考察および結論

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは生育阻害作用を示す用量まで検討した結果、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

用量設定試験（追加試験）、本試験および本試験（確認試験）によりこれら両処理法での試験結果の再現性が確認された。

これまでに 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はない。

類縁体である *p-tert*-ブチルフェノールについては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性¹⁾、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性²⁾と報告されている。また、4-エチルフェノールについては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性³⁾、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁴⁾と報告されている。

なお、陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ
当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 参考文献

- 1) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 295-299, 1996.
- 2) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 301-304, 1996.
- 3) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 8(1), 567-571, 2001.
- 4) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 8(1), 572-575, 2001.

17. 参考とした資料

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Nat Acad Sci 1973; 70: 782-6.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens. a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci USA. 1973; 70 (8): 2281-5.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31: 347-64.
- Yahagi T. [Screening methods using microbes for the environmental carcinogens (author's transl)]. [Article in Japanese]. Protein, Nucleic Acid and Enzyme 1975; 20: 16-27.
- Ministry of Labor, Industrial Safety and Health Department. [Test Guidelines and GLP for Mutagenicity Test using Microorganisms in the Safety and Health Law]. Tokyo; Japan Industrial Safety and Health Association; 1991.
- Ishidate M Jr editor. [The data book for mutagenicity assay using microorganisms]. [Article in Japanese]. Life-science Information Center Press; 1991.

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	129 [130	124 ±	136 6]	14 [15	14 ±	18 2]	28 [23	21 ±	19 5]	24 [22	21 ±	21 2]	8 [9	12 ±	8 2]
	8.19	116 [117	120 ±	116 2]	14 [13	10 ±	14 2]	20 [22	25 ±	20 3]	15 [15	18 ±	13 3]	5 [6	7 ±	6 1]
	20.5	137 [127	123 ±	121 9]	7 [9	7 ±	13 3]	22 [24	28 ±	23 3]	16 [16	17 ±	14 2]	6 [7	5 ±	10 3]
	51.2	111 [115	115 ±	119 4]	16 [11	9 ±	9 4]	25 [21	20 ±	19 3]	15 [16	17 ±	16 1]	9 [8	6 ±	9 2]
	128	118 [126	130 ±	131 7]	15 [14	15 ±	12 2]	24 [24	26 ±	23 2]	18* [18	15* ±	20* 3]	6* [7	6* ±	8* 1]
	320	107 [107	106 ±	107 1]	11 [13	13 ±	15 2]	31 [29	23 ±	32 5]	21* [22	24* ±	20* 2]	12* [11	10* ±	10* 1]
	800	126 [118	129 ±	99 17]	15 [14	16 ±	12 2]	30 [27	22 ±	28 4]	20* [22	21* ±	24* 2]	7* [7	8* ±	5* 2]
	2000 +	109 [111	120 ±	104 8]	13 [11	10 ±	11 2]	20 [22	24 ±	22 2]	17* [20	22* ±	20* 3]	7* [7	8* ±	5* 2]
5000 +	101 [101	100 ±	103 2]	10 [8	7 ±	8 2]	23 [24	22 ±	26 2]	17* [15	16* ±	13* 2]	5* [3	2* ±	3* 2]	
Positive control		911 [897	894 ±	886 b) 13]	604 [582	557 ±	584 c) 24]	162 [156	158 ±	147 b) 8]	673 [665	674 ±	647 d) 15]	248 [259	247 ±	281 e) 19]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	129	136	132	14	11	13	24	28	29	31	27	28	24	26	23
		[132	\pm	4]	[13	\pm	2]	[27	\pm	3]	[29	\pm	2]	[24	\pm	2]
	8.19	131	129	145	14	19	16	28	23	22	28	24	26	18	18	14
		[135	\pm	9]	[16	\pm	3]	[24	\pm	3]	[26	\pm	2]	[17	\pm	2]
	20.5	131	139	141	16	14	14	27	31	26	33	38	34	16	16	15
		[137	\pm	5]	[15	\pm	1]	[28	\pm	3]	[35	\pm	3]	[16	\pm	1]
	51.2	120	127	128	13	12	10	24	25	21	21	30	28	13	16	19
		[125	\pm	4]	[12	\pm	2]	[23	\pm	2]	[26	\pm	5]	[16	\pm	3]
	128	112	105	106	9	7	8	23	28	21	28	32	26	14	15	16
	[108	\pm	4]	[8	\pm	1]	[24	\pm	4]	[29	\pm	3]	[15	\pm	1]	
320	106	108	105	10	8	8	24	23	23	29	24	26	17	14	17	
	[106	\pm	2]	[9	\pm	1]	[23	\pm	1]	[26	\pm	3]	[16	\pm	2]	
800	86	95	86	11	15	14	24	24	25	28	28	27	12	14	16	
	[89	\pm	5]	[13	\pm	2]	[24	\pm	1]	[28	\pm	1]	[14	\pm	2]	
2000 +	89	99	85	11	13	10	21	26	23	27	29	23	16	11	11	
	[91	\pm	7]	[11	\pm	2]	[23	\pm	3]	[26	\pm	3]	[13	\pm	3]	
5000 +	76	86	87	9	14	14	23	24	20	19	21	18	5	4	6	
	[83	\pm	6]	[12	\pm	3]	[22	\pm	2]	[19	\pm	2]	[5	\pm	1]	
Positive control		1013	1048	1101 b)	321	341	335 c)	498	510	494 d)	387	367	378 e)	180	179	196 c)
		[1054	\pm	44]	[332	\pm	10]	[501	\pm	8]	[377	\pm	10]	[185	\pm	10]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study)
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	122 [126	125 \pm	132 5]	16 [16	17 \pm	14 2]	27 [28	34 \pm	24 5]	19 [21	22 \pm	22 2]	9 [11	14 \pm	11 3]
	1.31	126 [129	130 \pm	132 3]	15 [14	12 \pm	15 2]	22 [25	25 \pm	27 3]	19 [17	14 \pm	19 3]	9 [11	11 \pm	13 2]
	3.28	121 [122	130 \pm	115 8]	15 [15	12 \pm	18 3]	21 [21	20 \pm	21 1]	18 [19	24 \pm	16 4]	9 [9	7 \pm	10 2]
	8.19	114 [107	104 \pm	102 6]	13 [13	14 \pm	12 1]	26 [26	26 \pm	27 1]	15 [18	19 \pm	20 3]	11 [10	11 \pm	8 2]
	20.5	113 [116	113 \pm	123 6]	17 [16	18 \pm	14 2]	27 [26	24 \pm	28 2]	12 [14	12 \pm	19 4]	12 [10	9 \pm	8 2]
	51.2	100 [104	106 \pm	105 3]	15 [15	14 \pm	15 1]	23 [26	28 \pm	26 3]	14 [15	17 \pm	13 2]	10 [9	10 \pm	6 2]
	128	106 [107	113 \pm	103 5]	12 [12	16 \pm	8 4]	18 [20	21 \pm	20 2]	17 [18	20 \pm	18 2]	12 [11	11 \pm	9 2]
	320	99* [97	95* \pm	96* 2]	10 [12	13 \pm	12 2]	15 [18	20 \pm	20 3]	16* [18	17* \pm	21* 3]	8* [9	12* \pm	8* 2]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.