

Table 3. Continued

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	800	99*	91*	102*	13	10	9	25	26	24	15*	14*	17*	9*	9*	12*
		[97	\pm	6]	[11	\pm	2]	[25	\pm	1]	[15	\pm	2]	[10	\pm	2]
	2000 +	102*	95*	103*	11	13	12	24	23	21	19*	14*	18*	8*	9*	6*
	[100	\pm	4]	[12	\pm	1]	[23	\pm	2]	[17	\pm	3]	[8	\pm	2]	
	5000 +	97*	98*	91*	9	12	10	18	25	20	10*	9*	13*	5*	5*	4*
	[95	\pm	4]	[10	\pm	2]	[21	\pm	4]	[11	\pm	2]	[5	\pm	1]	
Positive control		830	726	767 b)	516	592	553 c)	150	164	142 b)	679	700	649 d)	167	239	224 e)
		[774	\pm	52]	[554	\pm	38]	[152	\pm	11]	[676	\pm	26]	[210	\pm	38]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

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

Table 4. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[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)	125	130	118	12	19	15	21	32	23	25	19	21	10	9	9
		[124	\pm	6]	[15	\pm	4]	[25	\pm	6]	[22	\pm	3]	[9	\pm	1]
	9.77	108	112	114							23	24	20	8	12	8
		[111	\pm	3]							[22	\pm	2]	[9	\pm	2]
	19.5	103	119	96							26	22	13	9	10	7
		[106	\pm	12]							[20	\pm	7]	[9	\pm	2]
	39.1	110	110	85							21	27	22	12	8	9
		[102	\pm	14]							[23	\pm	3]	[10	\pm	2]
78.1	111	102	97							25	22	30	9	8	8	
	[103	\pm	7]							[26	\pm	4]	[8	\pm	1]	
156	92	105	102	8	13	13	22	19	27	14	15	24	7*	7*	6*	
	[100	\pm	7]	[11	\pm	3]	[23	\pm	4]	[18	\pm	6]	[7	\pm	1]	
313	83	103	104	14	13	7	23	28	21	17	15	20	9*	5*	7*	
	[97	\pm	12]	[11	\pm	4]	[24	\pm	4]	[17	\pm	3]	[7	\pm	2]	
625	88*	103*	111*	8	15	8	28	25	22	23*	26*	22*	5*	7*	8*	
	[101	\pm	12]	[10	\pm	4]	[25	\pm	3]	[24	\pm	2]	[7	\pm	2]	

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

* : Growth inhibition was observed.

Table 4. Continued

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	1250 +	16	14	15	25	34	22									
		[15	\pm	1]	[27	\pm	6]									
	2500 +	8	11	9	21	12	23									
		[9	\pm	2]	[19	\pm	6]									
	5000 +	12	11	12	22	17	19									
		[12	\pm	1]	[19	\pm	3]									
Positive control		493	510	494 b)	565	570	592 c)	151	137	135 b)	713	673	658 d)	272	272	219 e)
		[499	\pm	10]	[576	\pm	14]	[141	\pm	9]	[681	\pm	28]	[254	\pm	31]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

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

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test 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)	117	127	114	16	10	9	28	23	26	21	25	35	24	22	19
		[119	\pm	7]	[12	\pm	4]	[26	\pm	3]	[27	\pm	7]	[22	\pm	3]
	156	98	101	104	9	13	10	23	23	20	25	28	32	25	23	19
		[101	\pm	3]	[11	\pm	2]	[22	\pm	2]	[28	\pm	4]	[22	\pm	3]
	313	100	103	106	17	16	8	30	24	16	29	25	23	17	26	18
		[103	\pm	3]	[14	\pm	5]	[23	\pm	7]	[26	\pm	3]	[20	\pm	5]
	625	99	97	104	16	8	12	17	33	14	32	28	22	19	24	20
	[100	\pm	4]	[12	\pm	4]	[21	\pm	10]	[27	\pm	5]	[21	\pm	3]	
1250 +	87	94	80	16	12	16	18	17	24	27	35	26	13	11	17	
	[87	\pm	7]	[15	\pm	2]	[20	\pm	4]	[29	\pm	5]	[14	\pm	3]	
2500 +	90	88	83	12	10	6	21	18	15	23	19	23	9	8	6	
	[87	\pm	4]	[9	\pm	3]	[18	\pm	3]	[22	\pm	2]	[8	\pm	2]	
5000 +	86	73	85	7	6	10	18	16	20	23	21	20	9	8	6	
	[81	\pm	7]	[8	\pm	2]	[18	\pm	2]	[21	\pm	2]	[8	\pm	2]	
Positive control		939	842	954 b)	371	318	359 c)	482	559	561 d)	406	415	362 e)	120	150	142 c)
		[912	\pm	61]	[349	\pm	28]	[534	\pm	45]	[394	\pm	28]	[137	\pm	16]

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 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [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)	121	119	110	16	12	12	19	19	17	29	22	34	14	15	14
		[117	\pm	6]	[13	\pm	2]	[18	\pm	1]	[28	\pm	6]	[14	\pm	1]
	9.77													15	13	14
														[14	\pm	1]
	19.5	124	102	118							22	30	29	8	16	17
		[115	\pm	11]							[27	\pm	4]	[14	\pm	5]
	39.1	122	102	116							22	26	22	16	11	16
	[113	\pm	10]							[23	\pm	2]	[14	\pm	3]	
78.1	120	114	108							26	27	22	16	10	16	
	[114	\pm	6]							[25	\pm	3]	[14	\pm	3]	
156	119	112	121	9	12	11	28	21	24	23	19	27	17	12	13	
	[117	\pm	5]	[11	\pm	2]	[24	\pm	4]	[23	\pm	4]	[14	\pm	3]	
313	100	107	106	8	11	12	24	19	21	27	26	21	14*	17*	8*	
	[104	\pm	4]	[10	\pm	2]	[21	\pm	3]	[25	\pm	3]	[13	\pm	5]	
625	116*	112*	113*	12	8	15	24	25	22	21*	22*	31*	11*	11*	14*	
	[114	\pm	2]	[12	\pm	4]	[24	\pm	2]	[25	\pm	6]	[12	\pm	2]	

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

* : Growth inhibition was observed.

Table 6. Continued

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	1250 +	14	9	11	22	15	16									
		[11	\pm	3]	[18	\pm	4]									
	2500 +	15	12	11	22	21	17									
		[13	\pm	2]	[20	\pm	3]									
	5000 +	6	9	9	20	20	17									
		[8	\pm	2]	[19	\pm	2]									
Positive control		677	699	722 b)	564	622	556 c)	155	156	141 b)	725	699	768 d)	173	221	167 e)
		[699	\pm	23]	[581	\pm	36]	[151	\pm	8]	[731	\pm	35]	[187	\pm	30]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

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

Table 7. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [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)	117	123	119	17	10	8	22	28	19	26	40	28	34	27	24
		[120	\pm	3]	[12	\pm	5]	[23	\pm	5]	[31	\pm	8]	[28	\pm	5]
	156	96	101	106	7	8	12	20	23	23	36	27	27	32	29	34
		[101	\pm	5]	[9	\pm	3]	[22	\pm	2]	[30	\pm	5]	[32	\pm	3]
	313	84	84	74	10	12	7	16	16	24	28	24	36	23	23	21
		[81	\pm	6]	[10	\pm	3]	[19	\pm	5]	[29	\pm	6]	[22	\pm	1]
	625	108	89	96	12	17	13	20	17	21	31	35	40	23	16	19
	[98	\pm	10]	[14	\pm	3]	[19	\pm	2]	[35	\pm	5]	[19	\pm	4]	
1250 +	95	98	98	14	7	10	22	20	28	28	33	23	24	17	20	
	[97	\pm	2]	[10	\pm	4]	[23	\pm	4]	[28	\pm	5]	[20	\pm	4]	
2500 +	87	85	96	10	9	15	25	21	22	34	32	27	15	19	13	
	[89	\pm	6]	[11	\pm	3]	[23	\pm	2]	[31	\pm	4]	[16	\pm	3]	
5000 +	87	78	85	7	9	9	19	18	20	29	28	24	12	16	13	
	[83	\pm	5]	[8	\pm	1]	[19	\pm	1]	[27	\pm	3]	[14	\pm	2]	
Positive control		1027	1142	1047 b)	338	381	348 c)	558	499	524 d)	478	409	461 e)	162	169	200 c)
		[1072	\pm	61]	[356	\pm	23]	[527	\pm	30]	[449	\pm	36]	[177	\pm	20]

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.

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol は染色体異常を誘起する可能性があるもの（疑陽性）と判断した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株（CHL/IU）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に染色体異常試験の用量を設定した。短時間処理法-S9 処理では 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理では 25.0, 35.0, 45.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ の 3~4 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理では、明確な染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。しかしながら、+S9 処理では、染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の有意な増加が認められたが、その出現頻度が 10%未満と低いことから、明確な陽性反応と判断できないため確認試験を実施した。確認試験では、15.0, 25.0, 35.0, 45.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、再現性が得られたものの、狭い用量範囲での出現率の上昇であること、および出現頻度が 10%未満と低いことを考慮し、陽性反応と判断できなかった。さらに、類似化合物では連続処理法で明らかに倍数性細胞の誘発が認められていることから、連続処理法 24 時間処理群においても 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理による染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。

2. 表題

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する。

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 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration 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

9049 (115-200)

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

実験終了日： 平成17年12月28日
試験終了日： 平成18年9月11日

13. 被験物質

13.1. 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)

13.2. ロット番号

K630V

13.3. 純度

99.8%

残り 0.2%不明

13.4. 提供元

丸善油化商事株式会社

13.5. 特性分析年月日

2005年3月16日

13.6. 保存条件

気密, 室温 (1~30°C)

13.7. 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)

13.8. 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

13.9. 別名

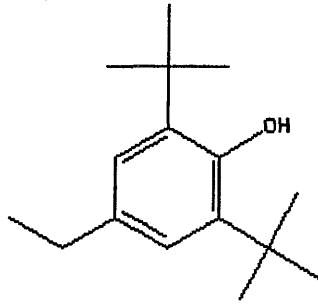
Phenol, 2,6-di-tert-butyl-4-ethyl-

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

13.10. CAS No.

4130-42-1

13.11. 化学構造



13.12. 分子式

$C_{16}H_{26}O$

13.13. 分子量

234.38

13.14. 物質の状態

形状：結晶性粉状

色：淡黄白色

13.15. 融点/沸点

融点：45.7°C/沸点：268.6°C

13.16. 引火点

132°C (クリーブランド開放式)

13.17. 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)

13.18. 安定性

通常取り扱い条件においては安定

13.19. 分配係数 (Octanol/Water)

Log Pow > 3.27

13.20. 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.

13.21. 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。

13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、約1g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。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において遺伝毒性ガイドラインで指定されていることから、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU細胞)を使用した。CHL/IU細胞は1984年11月15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、ジメチルスルホキシド(DMSO, GC用, 純度99.9%, Lot No. K26414578, Merck)を容量比で10%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては、凍結した細胞を融解した後、3~5日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験では継代数8の細胞(Lot No. CLC-001)を、染色体異常試験では継代数14の細胞(Lot No. CLC-001)を、染色体異常試験(追加試験)では継代数21の細胞(Lot No. CLC-001)、染色体異常試験(確認試験)では継代数3の細胞(Lot No. CLC-004)を用いた。

凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査(陰性)、倍加時間の測定(Lot No. CLC-001 : 17.9時間, Lot No. CLC-004 : 15.2時間)、染色体数(モード数25本の細胞が, Lot No. CLC-001 : 82%, CLC-004 : 84%)の測定ならびに陰性対照および陽性対照における構造異常出現頻度の確認を実施し、異常のない細胞を試験に使用した。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(IWAKI : Lot No. 919084【細胞増殖抑制試験】, 519045【細胞増殖抑制試験以外】、旭テクノグラス)に非働化(56°C, 30分)済みの仔牛血清(Lot No. 511116【細胞増殖抑制試験】, 5423845D【細胞増殖抑制試験以外】、Invitrogen)を最終濃度で10%になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所(15°C以下)に保存した。

14.3. 培養条件

CO₂インキュベーター(三洋電機バイオメディカ)を用い、CO₂濃度5%、37°Cの条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-520 【確認試験以外】, CAM-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.

14.4.1. 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を次に示す.

	確認試験以外	確認試験
ロット番号	RAA-520	RAA-526
製造年月日	2005 年 4 月 28 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	
体重	193~237 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	24.86 mg/mL	25.58 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示す.

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1mL
KCl	33 μmol/0.1mL
G-6-P	5 μmol/0.1mL
NADP	4 μmol/0.1mL
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol/0.2mL
蒸留水	0.1 mL