

Table 6. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment : 24 h]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	24	100.0	200	2	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	35.0	24	102.5	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	200	1 (0.5)
	55.0	24	104.7	200	0	3	0	0	0	0	3 (1.5)	200	3 (1.5)
	75.0 d)	24	35.6	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
MMC b)	0.05	24	138.5	200	12	18	46	0	0	0	54 (27.0) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

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

Appendix 1. Chromosome aberration test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
 [Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9049 (115-200)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0	
		6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
	35.0	6	129.3	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0	
		6	131.8	100	0	0	1	1	0	0	0.0	2.0	100	1.0	
	55.0	6	110.3	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	1.0	
		6	129.7	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
	75.0 d)	6	46.4	100	1	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
		6	51.5	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0	
	85.0 d)	6	28.1	NA											
		6	12.1	NA											
	MMC b)	0.1	6	71.4	100	6	16	27	0	0	0	3.0	38.0	100	1.0
			6	85.8	100	6	18	27	0	0	0	2.0	38.0	100	1.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
 b): Positive control (Mitomycin C)
 d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.
 NA: Not analyzed

Appendix 2. Chromosome aberration test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
 [Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9049 (115-200)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	100	1	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	1.0	
		6	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0	
	25.0	6	71.9	100	0	2	0	0	0	0	0.0	2.0	100	1.0	
		6	104.2	100	2	1	1	0	0	0	2.0	2.0	100	2.0	
	35.0	6	85.7	100	0	3	4	0	0	0	0.0	6.0	100	7.0	
		6	92.3	100	2	2	3	0	0	0	2.0	5.0	100	4.0	
	45.0	6	50.7	100	3	5	3	0	0	0	2.0	7.0	100	6.0	
		6	49.6	100	1	5	7	1	0	0	1.0	10.0	100	4.0	
	55.0	6	44.7	100	2	4	7	0	0	0	2.0	8.0	100	8.0	
		6	31.1	100	1	2	7	0	0	0	1.0	8.0	100	2.0	
	CP b)	12.5	6	137.3	100	2	7	29	0	0	0	1.0	34.0	100	0.0
			6	100.4	100	3	20	35	0	0	0	1.0	43.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Appendix 3. Chromosome aberration test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9049 (115-200)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
		6	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0
	15.0	6	83.5	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	1.0
		6	78.4	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
	25.0	6	67.1	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
		6	76.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
	35.0	6	63.1	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	8.0
		6	66.9	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	6.0
	45.0	6	37.9	100	1	3	5	0	0	0	0.0	6.0	100	5.0
		6	34.9	100	2	2	6	0	0	0	1.0	6.0	100	11.0
	55.0	6	17.1	100	0	2	5	0	0	0	0.0	6.0	100	9.0
		6	28.6	100	0	1	3	0	0	0	0.0	3.0	100	5.0
	65.0	6	5.0	Toxic										
		6	7.2	Toxic										
CP b)	12.5	6	125.4	100	2	9	36	0	1	0	1.0	41.0	100	0.0
		6	112.8	100	2	9	50	0	0	0	1.0	53.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
b): Positive control (Cyclophosphamide)

Appendix 4. Chromosome aberration test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment : 24 h]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	24	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
		24	100.0	100	1	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	0.0	
	35.0	24	95.6	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0	
		24	109.4	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0	
	55.0	24	109.2	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
		24	100.2	100	0	2	0	0	0	0	0.0	2.0	100	3.0	
	75.0 d)	24	29.6	100	2	0	0	0	0	0	2.0	0.0	100	0.0	
		24	41.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	MMC b)	0.05	24	139.4	100	5	9	20	0	0	0	3.0	24.0	100	0.0
			24	137.6	100	7	9	26	0	0	0	4.0	30.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

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

B-5805

3. 試験実施概要

3.1 試験計画書

試験番号 : B-5805
試験表題 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールのラットを用いた
2週間回復性観察を含む28日間反復経口投与毒性試験

3.2 試験目的

被験物質をラットに28日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、その後2週間の回復期間を設けて障害の可逆性を調べることを目的とした。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

3.3 試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター

- 1) 動物試験及び病理標本作製
株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284
- 2) 病理標本観察
株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所
〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松 1308-125

4. 要約

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)] を用いて、2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの反復投与による毒性並びにその回復性を検討した。投与量は 0 (0.5w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、15、60 及び 250 mg/kg/day とし、28 日間反復強制経口投与した。1 群の動物数は対照群及び 250 mg/kg 投与群で雌雄各 12 匹、15 及び 60mg/kg 投与群で雌雄各 6 匹とした。このうち、対照群及び 250 mg/kg 投与群の雌雄各 6 例については、28 日間投与後 2 週間休薬させた。

1) 一般状態、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定、体重並びに摂餌量

投与及び回復期間を通じ、いずれの検査項目にも、被験物質投与の影響は認められなかった。

2) 尿検査（摂水量含む）

褐色尿が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。この変化は休薬により消失し、回復性が認められた。

3) 血液学検査

血小板数及びフィブリノーゲン量の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が 250mg/kg 投与群の雌雄に、プロトロンビン時間の延長が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。これらの変化は休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性が認められた。

4) 血液化学検査

総コレステロール及び総たん白質の高値が 250mg/kg 投与群の雌雄に、カルシウムの高値が 250mg/kg 投与群の雄に、リン脂質の高値及び塩素の低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。これらの変化は休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性が認められた。

5) 病理学検査

病理組織学検査における肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 60mg/kg 以上の投与群の雌雄に、甲状腺の濾胞上皮細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄と 250mg/kg 投与群の雌雄に認められ、肝臓の変化は重量増加を伴った。これらの変化は、休薬により消失し、回復性が認められた。

以上の結果から、本試験条件下における 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの無影響量は雌雄とも 15mg/kg/日と推定された。なお、認められた変化は、休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性を示した。

5. 緒言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールをラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の回復性を調べた。その成績を報告する。なお、準拠する基準及びガイドラインなどは以下の通りである。

1) 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、平成 17 年 4 月 1 日 最終改正)

2) 毒性試験ガイドライン

- 「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、平成 17 年 4 月 1 日 最終改正)
- 「OECD Guideline for Testing of Chemicals 407」
(OECD 理事会：1995 年 7 月 27 日)

3) 動物の福祉

- 「動物の愛護及び管理に関する法律」
(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 17 年 6 月 22 日最終改正)
- 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」
(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)
- 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」
(日本学術会議 平成 18 年 6 月 1 日)

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールは丸善石油化学株式会社より供給された。当試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績を添付資料1に示した。

名称	:	2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol
CAS 番号	:	4130-42-1
示性式	:	$C_{2}H_{5}C_{6}H_{2}(C_{4}H_{9})_{2}OH$
ロット番号	:	HAU01
純度	:	99.0%(GC)
入手量	:	500g
性状	:	微黄色結晶性粉末
融点	:	45°C
沸点	:	272°C
分子量	:	234.38
安定性	:	動物試験終了後に丸善石油化学株式会社に返却し、安定であることが確認された。
保存方法	:	気密容器に入れ、冷暗所に保存（冷蔵庫内、実測値：4~8°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用する。 取扱い場所及び周囲の火気を厳禁し、高温物及び強酸化剤との接触を避ける。
返却	:	被験物質 5g を保存試料として保存した。残量はすべて供給者に返却した ^{注)} 。

注) : 試験計画書では被験物質の残量は廃棄することになっていたが、実際には廃棄せず、すべての被験物質（分析用に小分けした被験物質を含む）の残量を供給者に返却した。

6.1.2 媒体

名称	:	メチルセルロース（商品名；メトローズ SM-400）
ロット番号	:	411523
メーカー	:	信越化学工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

6.2 投与液の調製

6.2.1 媒体の調製

- 調製方法 : メチルセルロース (メトローズ SM-400) を注射用水 (株式会社大塚製薬工場、ロット番号 ; 6A93) に溶解し、0.5w/v%メチルセルロース水溶液とした。
- 保存方法 : ガラス容器に入れ、冷所 (冷蔵庫内、実測値 ; 3~7°C) に保存した。なお、使用期限は調製後 10 日とした。

6.2.2 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、0.5w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁して規定量にメスアップした。被験液は週 1 回以上の頻度で調製し、調製後 8 日以内に使用した。

6.2.3 投与液の保存方法

投与液は 1 日の必要分ずつ褐色ガラス遮光瓶に分注し、使用時まで冷蔵庫内に保存した (実測温度 : 3~7°C)。

6.2.4 媒体中での安定性

0.5 及び 100 mg/mL 懸濁液は、褐色ガラス遮光瓶に入れ冷蔵庫内 8 日間保存後、室温 24 時間保存した時安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている (試験番号 : A-1907、添付資料 2)。

6.2.5 調製物の濃度・均一性確認

投与第 1 週と第 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で HPLC 法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は 98.8~102.4% (許容範囲 : 表示値 \pm 10%)、均一性は 0.7~2.4% (許容値 : CV10%以内) であり、いずれも許容範囲内であった (添付資料 3 及び 4)。分析法の概略を次に示す。

1 濃度当たりの採取本数 (採取量)

: 3 本 (上、中及び下層から採取)、1 本につき 10 mL

測定対象物質 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール

測定対象標準物質

名称 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール

ロット番号 : HAU01

保存方法 : 気密容器に入れ、冷暗所 (冷蔵庫内、実測値 : 3~7°C) に保存

使用機器	:	HPLC システム (Waters Corporation)
HPLC	:	2690 セパレーションモジュール
検出器	:	2487 デュアルλ UV/VIS 検出器
データ処理装置	:	ミレニアム ³² クロマトグラフィーマネジャー

HPLC 条件

カラム	:	L-column ODS (5 μm、4.6 mm I.D.×150 mm、財団法人 化学物質評価 研究機構)
カラム温度	:	40°C (カラム恒温槽設定温度)
移動相	:	アセトニトリル/精製水 (9:1、v/v)
流速	:	1 mL/min
検出	:	UV (測定波長 280 nm)
試料注入量	:	20 μL
試料温度	:	10°C (オートサンプラー設定温度)

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用される系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 52 匹^{注)} を 5 週齢で入手し、当所で 9 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態の観察 (1 回) を行い、体重増加が順調で一般状態等に異常のみられない健康と思われる動物雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 200~223 g、雌で 136~158 g であった。

動物は、検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てる) により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外した。

^{注)} : 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 50 匹であったが、実際には雌雄各 52 匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度 22~25°C、相対湿度 45~61%、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (201 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D