

験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞については異常細胞数に含めないで判定した。

異常細胞の出現頻度を、Fisher の直接確率計算法（有意水準片側 2.5%）を用いて検定した。また、用量依存性については、Cochran Armitage の傾向検定（有意水準片側 2.5%）を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した.

50%細胞増殖抑制濃度は, 短時間処理法-S9 処理で 71.0 $\mu\text{g/mL}$, 短時間処理法+S9 処理では 34.3 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法 24 時間処理では 52.0 $\mu\text{g/mL}$ であった.

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時, 全ての処理の 147 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において透明油滴状の析出物が認められ, さらに 586 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では白色油滴状の析出物も認められた. 被験物質処理終了時, 全ての処理の 147 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において透明油滴状の析出物が認められた.

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, 4, Table 3 および Appendix 1 に示した.

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し, 陰性対照群 (1.0%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は, 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し, 陰性対照群 (0.0%) と同等であった. また, 用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 75.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 49.0%であった.

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では, 染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 38.0% ($p \leq 0.025$) であった.

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 3, 4, Table 4 および Appendix 2 に示した.

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 5.5%, 45.0 $\mu\text{g/mL}$ で 8.5% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 8.0% ($p \leq 0.025$) を示し, 陰性対照群 (1.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた. 倍数性細胞の出現頻度は, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 5.5% ($p \leq 0.025$), 45.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 5.0% ($p \leq 0.025$) を示し, 陰性対照群 (0.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた. しかしながら, これらの出現頻度が 10%未満と低いことから, 明確な陽性反応と判断できなかった. また, 用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 55.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 37.9%であつ

た。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 38.5% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 7, 8, Table 6 および Appendix 4 に示した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は、35.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0% を示し、陰性対照群 (1.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0% を示し、陰性対照群 (0.0%) と同等であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 27.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、75.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において白色膜状の析出物が認められた。

15.3. 染色体異常試験 (確認試験)

15.3.1. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 5, 6, Table 5 および Appendix 3 に示した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は 15.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 45.0 $\mu\text{g/mL}$ で 6.0% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5% ($p \leq 0.025$) を示し、陰性対照群 (0.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた。倍数性細胞の出現頻度は、15.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 7.0% ($p \leq 0.025$), 45.0 $\mu\text{g/mL}$ で 8.0% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 7.0% ($p \leq 0.025$) を示し、陰性対照群 (0.0%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた。しかしながら、染色体異常試験と再現性が得られたものの、狭い用量範囲での出現頻度の上昇であること、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。また、用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 55.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 22.9% であった。

一方、陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 47.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.3.2. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、析出あるいは培養液の色変化等の特筆すべき変化が認められなかった。

16. 考察および結論

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の変異原性, すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため, 培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した.

細胞増殖抑制試験結果を基に, 短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では細胞毒性が顕著に認められる用量まで検討した.

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.

確認試験の結果, 染色体異常試験との再現性が得られたものの, 狭い用量範囲での出現頻度の上昇であること, および出現頻度が 10%未満と低いことを考慮すると明確な陽性反応である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¹⁾ことから, 連続処理法の標本についても追加観察したが, 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.

なお, 陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 5) から求めた基準値内であり, 試験成立条件を満たしたことから, 当該試験は適切な条件でなされたと判断された.

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²⁾, CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性 (構造異常および倍数性細胞の出現頻度の上昇)¹⁾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 (構造異常の出現頻度の上昇)⁴⁾と報告されている. このことから, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenolの当該試験におけるCHL/IU細胞への作用は, これら類縁物質の反応性に類似しているが, 弱いものであると考えられた.

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 のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は疑陽性と判定した.

17. 参考文献

- 1) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 301-304, 1996.
- 2) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 295-299, 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. 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課 監修 “労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく 既存化学物質 変異原性試験データ集”, 日本化学物質安全・情報センター, 1996

18. 参考とした資料

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. *Chemical Mutagens*. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat Res* 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 269-275.

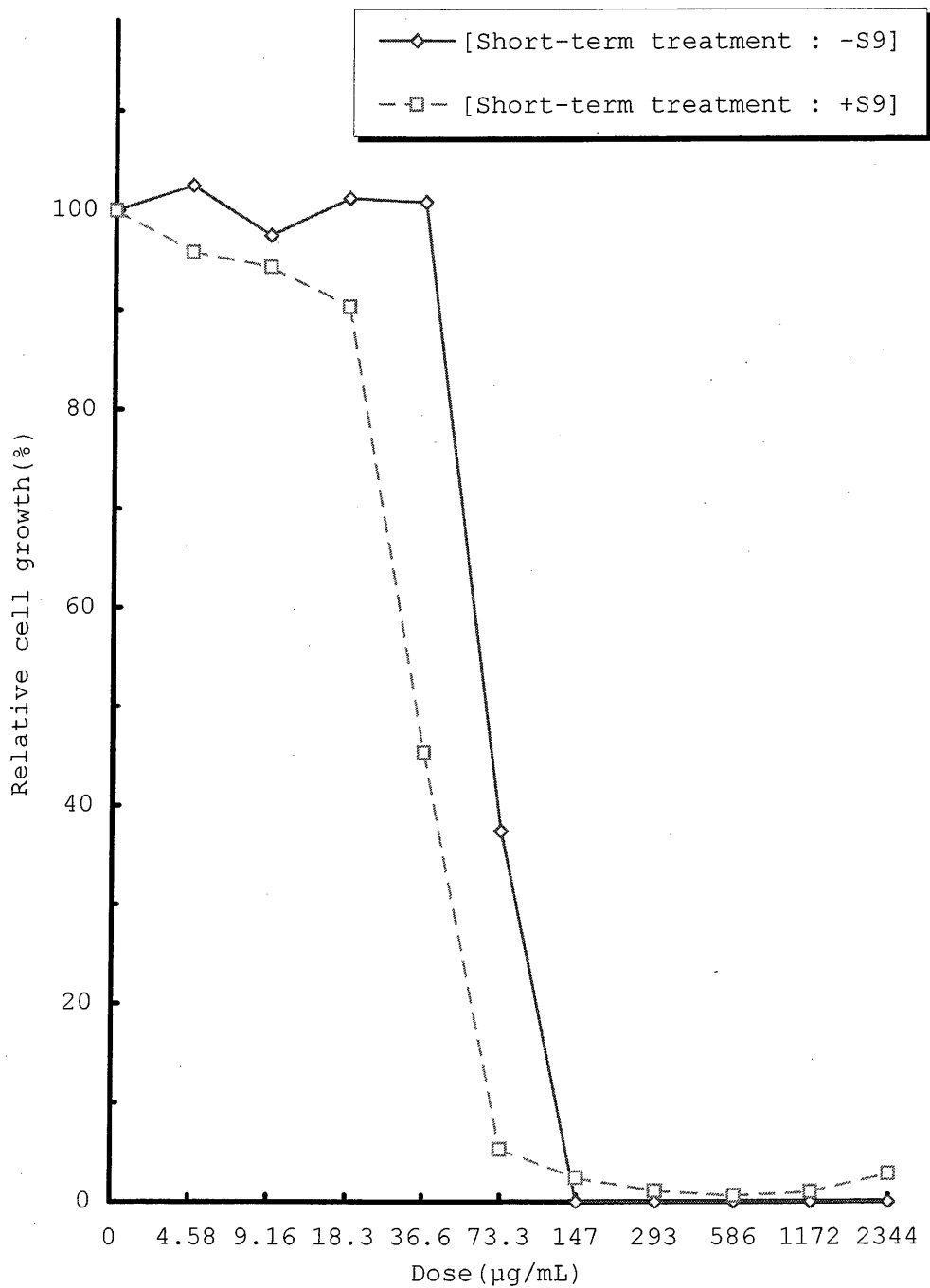


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment]

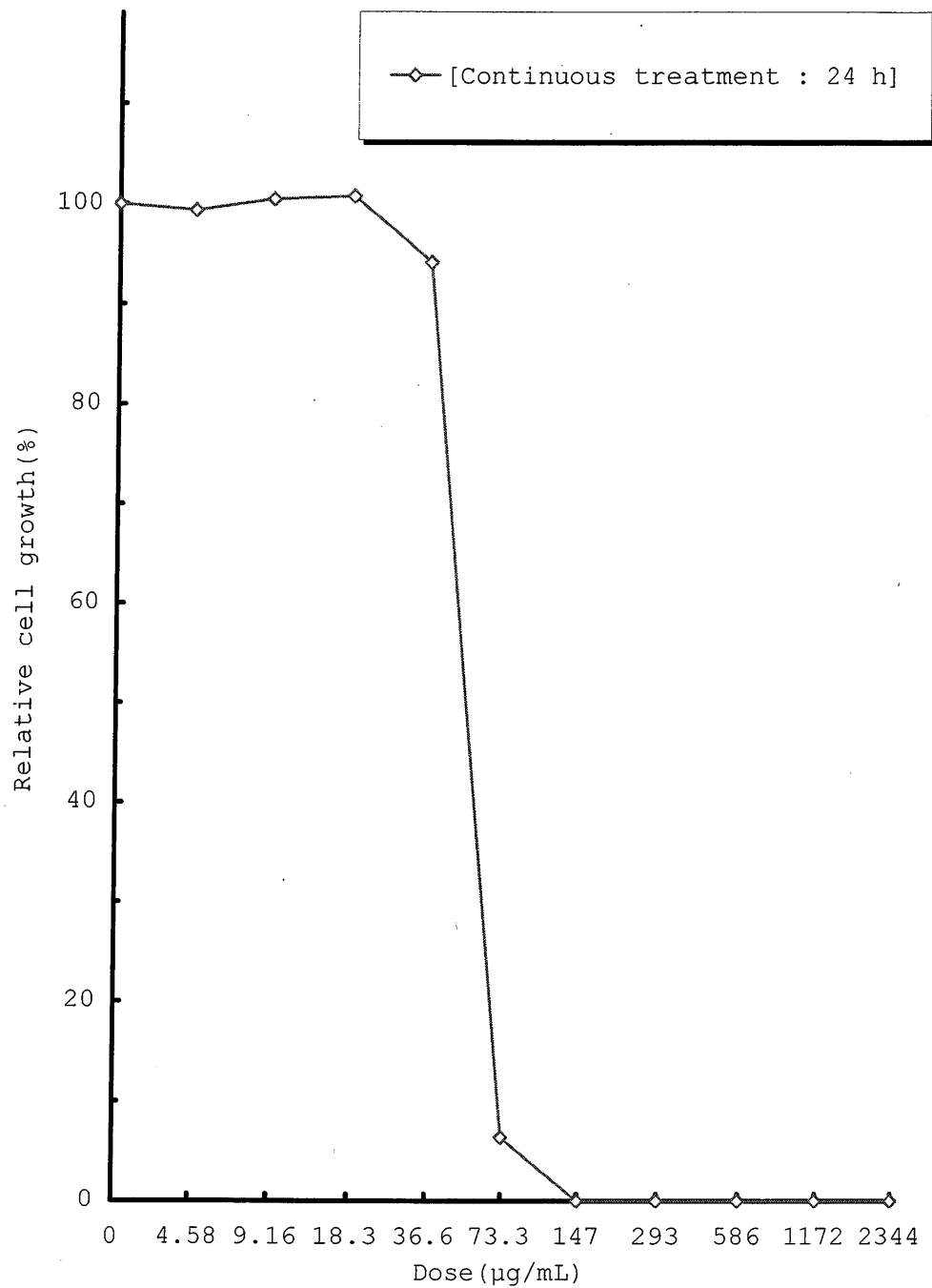


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	4.58	101.3 103.8	[102.6]	4.58	98.7 92.9	[95.8]	
	9.16	97.7 97.2	[97.5]	9.16	96.3 92.3	[94.3]	
	18.3	101.2 101.1	[101.2]	18.3	93.0 87.7	[90.4]	
	36.6	105.4 96.2	[100.8]	36.6	41.2 49.3	[45.3]	
	73.3	38.6 36.1	[37.4]	73.3	5.3 5.2	[5.3]	
	147 d)	0.0 0.0	[0.0]	147 d)	1.3 3.4	[2.4]	
	293 d)	0.0 0.0	[0.0]	293 d)	0.7 1.4	[1.1]	
	586 d)	0.0 0.0	[0.0]	586 d)	0.8 0.3	[0.6]	
	1172 d)	0.0 0.0	[0.0]	1172 d)	0.0 2.0	[1.0]	
2344 d)	0.0 0.0	[0.0]	2344 d)	2.0 3.6	[2.8]		

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Short-term treatment : -S9] ——— 71.0 (µg/mL)

[Short-term treatment : +S9] ——— 34.3 (µg/mL)

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

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

Table 2. Results of growth inhibition test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	4.58	98.5 100.3	[99.4]
	9.16	98.9 102.1	[100.5]
	18.3	100.6 100.9	[100.8]
	36.6	103.8 84.5	[94.2]
	73.3	5.4 7.3	[6.4]
	147 d)	0.0 0.0	[0.0]
	293 d)	0.0 0.0	[0.0]
	586 d)	0.0 0.0	[0.0]
	1172 d)	0.0 0.0	[0.0]
2344 d)	0.0 0.0	[0.0]	

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] ——— 52.0 (µg/mL)

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	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)	6	100.0	200	1	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	35.0	6	130.6	200	0	1	2	1	0	0	4 (2.0)	200	1 (0.5)
	55.0	6	120.0	200	0	1	2	0	0	0	3 (1.5)	200	1 (0.5)
	75.0 d)	6	49.0	200	1	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	85.0 d)	6	20.1	NA									
MMC b)	0.1	6	78.6	200	12	34	54	0	0	0	76 (38.0) *	200	2 (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

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

NA: Not analyzed

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.

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	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)	6	100.0	200	2	2	1	0	0	0	3 (1.5)	#	200	1 (0.5) #
	25.0	6	88.1	200	2	3	1	0	0	0	4 (2.0)		200	3 (1.5)
	35.0	6	89.0	200	2	5	7	0	0	0	11 (5.5)		200	11 (5.5) *
	45.0	6	50.2	200	4	10	10	1	0	0	17 (8.5)	*	200	10 (5.0) *
	55.0	6	37.9	200	3	6	14	0	0	0	16 (8.0)	*	200	10 (5.0) *
CP b)	12.5	6	118.9	200	5	27	64	0	0	0	77 (38.5)	*	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): $p \leq 0.025$

:Significant difference from control (Chochran-Armitage trend test): $p \leq 0.025$

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

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	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)	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5) #	200	0 (0.0) #
	15.0	6	81.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	25.0	6	71.9	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	2 (1.0)
	35.0	6	65.0	200	1	0	2	0	0	0	2 (1.0)	200	14 (7.0) *
	45.0	6	36.4	200	3	5	11	0	0	0	12 (6.0) *	200	16 (8.0) *
	55.0	6	22.9	200	0	3	8	0	0	0	9 (4.5) *	200	14 (7.0) *
	65.0	6	6.1	Toxic									
CP b)	12.5	6	119.1	200	4	18	86	0	1	0	94 (47.0) *	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): $p \leq 0.025$

:Significant difference from control (Chochran-Armitage trend test): $p \leq 0.025$

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

b): Positive control (Cyclophosphamide)