

# 最終報告書

4-(1-Methylethenyl)-phenol のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : 5459 ( 115-149 )

平成 14 年 3 月 4 日

試験委託者  
厚生労働省 医薬局

財団法人  
食品農医薬品安全性評価センター

## 目 次

1. 要約 .....	3
12. 被験物質 .....	7
13. 試験材料および方法 .....	9
14. 試験結果 .....	16
15. 考察および結論 .....	18
16. 参考文献 .....	19

Figures		F-1~3
Figure 1	Dose-survival curves of 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment]	F-1
Figure 2	Incidence of structural aberrations induced by 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment : -S9]	F-2
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment : +S9]	F-3

Tables		T-1~3
Table 1	Results of growth inhibition test on 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment : +S9]	T-3

## 1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、4-(1-Methylethenyl)-phenol は染色体異常を誘起するものと判断した。

4-(1-Methylethenyl)-phenol 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、試験用量を設定した。

染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理で 64.8, 108 および 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、4-(1-Methylethenyl)-phenol 処理群の場合、短時間処理法の-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても用量相関性を伴い、統計学的に有意な染色体異常の誘発が認められたことから陽性反応と判断した。

また、短時間処理法-S9 処理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 ( $p \leq 0.05$ ) な増加を示した。

## 12. 被験物質

## 12.1. 被験物質名

4-(1-Methylethenyl)-phenol

## 12.2. ロット番号

## 12.3. 純度/含量

99 wt%以上

## 12.4. 不純物の名称および純度

知見なし

## 12.5. 提供元

## 12.6. 保存条件

直射日光を避け、火気・熱源から遠ざけて保管した。  
室温では2量化するのので、冷凍保存した。

## 12.7. 保管場所

安評センター被験物質保存庫 (C-2)

## 12.8. 一般名

ミレックス PM, *p*-イソプロペニルフェノール

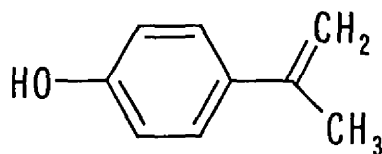
## 12.9. 化学名

Phenol, 4-(1-methylethenyl)-

## 12.10. CAS No.

4286-23-1

## 12.11. 化学構造



## 12.12. 分子式

 $C_9H_{10}O$

- 12.13. 分子量  
134.18
- 12.14. 物質の状態  
白～淡黄色粉体
- 12.15. 沸点  
知見なし
- 12.16. 融点  
80～83°C
- 12.17. 溶解性  
水に難溶，アセトンおよびメタノールに可溶．DMSOに易溶．
- 12.18. 蒸気圧  
3333 Pa (142°C)
- 12.19. 取り扱い上の注意  
火気厳禁  
吸入，皮膚への接触を防ぎ，目に入らぬよう適切な保護具を着用した．
- 12.20. 残余被験物質の処理  
被験物質の一部を保管した後，残りは被験物質提供元に返却した．

### 13. 試験材料および方法

#### 13.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を選択した。

CHL/IU 細胞は昭和 59 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、一部についてはジメチルスルホキシド (DMSO : GC 用 ; Merck KGaA ; 純度 99.7%以上 ; Lot No. K23082678 651) 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継代数 34 の細胞を、染色体異常試験では同 37 の細胞を用いた。

#### 13.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : 旭テクノグラス株式会社 ; Lot No. 99560007) に、メンブランフィルター (孔径 0.45  $\mu\text{m}$  : Featuring Corning and Costar Products) を用いて濾過除菌した非働化 (56°C, 30 分) 済み仔牛血清 (GIBCO Life Technologies, Inc. ; Lot No. 1075354) 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 (4°C) に保存した。

#### 13.3. 培養条件

CO<sub>2</sub> インキュベーター (三洋電機メディカシステム株式会社) を用い、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C の条件で細胞を培養した。

#### 13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社 ; Lot No. CAM-444) を試験に使用した。

## 13.4.1. S9 の調製方法

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以下に示した.

ロット番号	RAA-444
調製日	平成 13 年 4 月 27 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	205~241 g
臓器	肝臓
誘導物質投与量 および投与回数	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF) 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	25.65 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	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol

## 13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であり, かつ同溶液中で安定であることから, 被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Merck KGaA ; Lot No. K26414578 013) に溶解させ調製原液とした. この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に順次希釈した後, 速やかに処理を行った.



### 13.6. 対照群

#### 13.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒で試験した。

#### 13.6.2. 陽性対照（短時間処理法-S9 処理）

注射用水（株式会社大塚製薬工場；Lot No. K1C75）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 339AJH）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K0B93）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。試験用量は、0.1 µg/mL とした。

#### 13.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K1C75）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 9007）を生理食塩液（Lot No. K0B93）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。試験用量は 12.5 µg/mL とした。

### 13.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

#### 13.7.1. 試験用量

予備的な試験（10.9, 36.2, 121, 403 および 1342 µg/mL 【10 mM 相当】の 5 用量：公比 10/3）の結果、-S9 処理（処理後 6 時間時点での観察）の 121 µg/mL 以上および 短時間処理法+S9 処理の 121 µg/mL 以上の用量において中等度以上の細胞増殖抑制が認められた。  
本結果を参考に、細胞増殖抑制試験の用量として下記に示した 10 用量（公比 10/7）を設定した。

試験系	用量数	試験用量 (µg/mL)
短時間処理法-S9 処理	10	54.2 ~ 1342
短時間処理法+S9 処理	10	54.2 ~ 1342

#### 13.7.2. 使用ウェル数および識別

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

試験系および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

## 13.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト株式会社）の各ウェルに培養液を用いて  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 400  $\mu$ L を除いた後、溶媒あるいは被験物質液 6  $\mu$ L を加えた。6 時間被験物質に暴露させた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Sigma-Aldrich Japan K. K. ; Lot No. 100K2311）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500  $\mu$ L を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に細胞生存率（陰性対照に対する比）を求めた。

## 13.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 500  $\mu$ L を除き、S9 mix を 100  $\mu$ L 添加した後、溶媒あるいは被験物質液を 6  $\mu$ L 加えた。

以下の操作は 13.7.3. に記載の方法に準じた。

## 13.7.5. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

## 13.7.6. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウェルから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を 1 回洗浄した。10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. DWR8722）を加えて約 10 分間細胞を固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 107D2074）水溶液で 10 分間染色した。各ウェルを水洗した後、乾燥させた。各ウェルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 3.0 mL 加え、5 分間放置した後、分光光度計（105-50 型：株式会社日立製作所）を用いて 580 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求め、さらにプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には 77.4~158  $\mu$ g/mL の 3 点（-S9 処理）および 54.2~322  $\mu$ g/mL の 6 点（+S9 処理）を用いた。

なお、細胞生存率の平均値は各ウェルの四捨五入する以前の値から求めた。

## 13.8. 染色体異常試験 (本試験)

## 13.8.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に、各試験系それぞれ6用量 (公比 5/3 : 下表参照) を本試験の用量に設定した。

試験系	試験用量 (μg/mL)					
短時間処理法-S9 処理	38.9	<u>64.8</u>	<u>108</u>	<u>180</u>	300	500
短時間処理法+S9 処理	38.9	<u>64.8</u>	<u>108</u>	<u>180</u>	300	500

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

## 13.8.2. 使用プレート数および識別

1用量当たり2枚のプレートを用いた。

試験系および連番を明記することにより各プレートを識別した。

## 13.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ : 住友ベークライト株式会社) に  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL ( $4 \times 10^4$  細胞) を播種し、3日間培養した。培養終了後、溶媒、被験物質処理群では培養液 2.0 mL を除いた後、溶媒、被験物質液 30 μL を加えた。ただし、陽性対照処理群では培養液 2.3 mL を除いた後、陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。6時間各物質に暴露させた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Sigma-Aldrich Japan K. K. ; Lot No. 100K2311) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに18時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

## 13.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3日間培養した。培養終了後、溶媒、被験物質処理群では培養液 2.5 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後、溶媒、被験物質液 30 μL を加えた。ただし、陽性対照処理群では培養液 2.8 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後、陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。

以下の操作は 13.8.3. に記載の方法に準じた。

## 13.8.5. 析出等の観察

13.7.5. に準じた。

### 13.8.6. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に最終濃度で0.2 µg/mLとなるようコルセミド溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc. ; Lot No. 1094585) を添加し, 細胞分裂を中期で停止させた. 次いで, 培養液を遠心管に全量移した後, 0.25% トリプシン溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc. ; Lot No. 1099108) を用いてプレートから細胞を剥離し, 遠心管内の培養液に加えた. 細胞懸濁液を1000 r/min で5分間遠心分離して培養液を除いた後, 37°C に保温しておいた75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を5 mL 加え, 37°C 中で16分間低張処理を行った. 遠心分離により低張液を除いた後, 4°C に冷却した固定液 (メタノール3容: 酢酸1容) で細胞を固定した. 固定液を3回交換した後, 新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし, 脱脂洗浄済みのスライドガラス上に1~2滴ずつ滴下した. スライド標本を十分乾燥させ, 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8: Merck KGaA ; Lot No. TP392174 927) を用いて希釈した1.2%ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. 040408362) で12分間染色した. スライドを軽く水洗した後, 乾燥させた.

1プレート当たり2~3枚の染色体標本作製した.

### 13.8.7. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照, 各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて, ATP フォトメーター (ルミテスター C-100LU: キッコーマン株式会社) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した.

なお, 細胞生存率の平均値は各プレートの四捨五入する以前の値から求めた.

### 13.8.8. 染色体の観察

染色体異常の観察可能な上位3用量について顕微鏡観察を実施した.

全ての標本をコード化した後, マスキング法で観察した.

各プレート当たり100個, すなわち1用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下 (×600) で観察し, 染色体の形態的变化としてギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した. ただし, 染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し, 染色体切断様の像が認められる場合, その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満, かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した. また, 数的異常として1用量当たり200個の分裂中期像を観察し, 倍数体等の出現数についても計数した.

**13.9. 結果の解析**

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った。異常細胞の出現頻度を、Fisher の直接確率計算法（有意水準 0.05）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 0.05）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、試験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。

**13.10.  $D_{20}$  値ならびに TR 値の算出法**

$D_{20}$  値は分裂中期像の 20% にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり、最小二乗法により算出した。TR 値は一定濃度（mg/mL）当たりの交換型異常（cte）出現数を示す比較値であり、染色分体交換の出現頻度（%）を被験物質濃度（mg/mL 換算）で割ることにより算出した。

## 14. 試験結果

### 14.1. 細胞増殖抑制試験

#### 14.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した。

50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法-S9 処理で 97.8  $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理で 107  $\mu\text{g/mL}$  であった。

#### 14.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理の 939  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量において白色粉末状の析出物が観察されたが、pH の変動はいずれの処理においても観察されなかった。

被験物質処理終了時、短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理の 1342  $\mu\text{g/mL}$  の用量において白色粉末状の析出物が観察されたが、pH の変動はいずれの処理においても観察されなかった。

### 14.2. 染色体異常試験

#### 14.2.1. 短時間処理法-S9 処理

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

4-(1-Methylethenyl)-phenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は 64.8  $\mu\text{g/mL}$  で 5.0% ( $p \leq 0.05$ ), 108  $\mu\text{g/mL}$  で 13.5% ( $p \leq 0.05$ ), 180  $\mu\text{g/mL}$  で 30.5% ( $p \leq 0.05$ ) を示し、試験用量に依存した有意な増加 ( $p \leq 0.05$ ) が認められた。倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照と同等であった。

また、試験用量に依存した細胞生存率の減少が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 180  $\mu\text{g/mL}$  での細胞生存率は 28.6% であった。高用量群の 300 および 500  $\mu\text{g/mL}$  での生存率はそれぞれ 0.0 および 0.0% 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 28.0% ( $p \leq 0.05$ ) であった。

#### 14.2.2. 短時間処理法+S9 処理

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

4-(1-Methylethenyl)-phenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は 64.8  $\mu\text{g/mL}$  で 0.0%, 108  $\mu\text{g/mL}$  で 3.5% ( $p \leq 0.05$ ), 180  $\mu\text{g/mL}$  で 17.5% ( $p \leq 0.05$ ) を示し、試験用量に依存した有意な増加 ( $p \leq 0.05$ ) が認められた。倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照と同等であった。また、試験用量に依存した細胞生存率の減少が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 180  $\mu\text{g/mL}$  での細胞生存率は 27.3% であった。高用量群の 300 お

よび 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  での生存率はそれぞれ 0.1 および 0.2%であった。

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 76.0% ( $p \leq 0.05$ ) であった。

#### 14.2.3. $D_{20}$ 値ならびに TR 値算出結果

本染色体異常試験結果から算出した  $D_{20}$  値 ( $\text{mg}/\text{mL}$ ) ならびに TR 値 ( $\text{mg}$  当たり) は次の通りであった。

試験	試験系	異常の種類	$D_{20}$ 値	TR 値
本試験	短時間処理法-S9 処理	構造異常	0.124	156
	短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.239	91.7

#### 14.2.4. 被験物質の析出等

被験物質処理開始および終了時、pH の変動、析出等の特筆すべき変化は、いずれの試験用量においても観察されなかった。

## 15. 考察および結論

4-(1-Methylethenyl)-phenol 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 処理ならびに同+S9 処理とも細胞の増殖が著しく抑制される濃度まで検討した。

その結果、4-(1-Methylethenyl)-phenol 処理では短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理では、試験用量に依存した有意な染色体構造異常の誘発が認められた。変異原性の強さに関する相対的比較値である  $D_{20}$  値の最小値は 0.124 (mg/mL) および TR 値の最大値は 156 (mg 当たり) とそれぞれ算出され、既知変異原性物質に比較して 4-(1-Methylethenyl)-phenol の変異原性は中等度であることを示していた。

本被験物質 4-(1-Methylethenyl)-phenol の変異原性に関する報告はなかった。類縁体である 2, 4, 6-trichlorophenol は V79 培養細胞を用いた *hprt* 突然変異試験で陽性との報告があった<sup>1)</sup>。しかしながら、類縁体である 4-alkylphenols の変異原性に関する報告はなかった。

なお、短時間処理法の陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データ (Appendix 3) の範囲内であり、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、本試験条件下において 4-(1-Methylethenyl)-phenol のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。



16. 参考文献

- 1) Jansson K., Jansson V. : Mutat. Res., 280 (3):175-179, 1992.

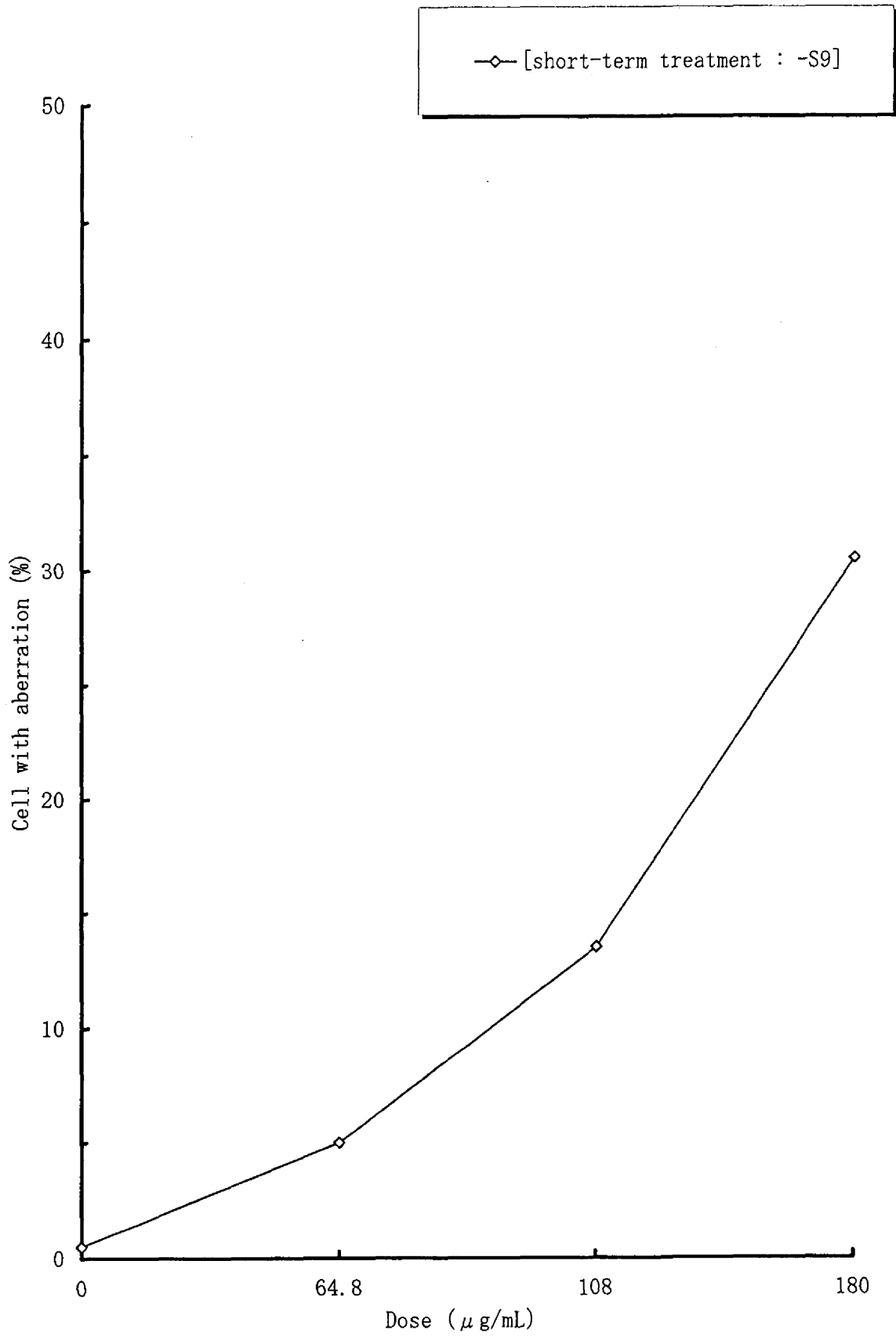


Figure 1. Incidence of structural aberrations induced by 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment:-S9]

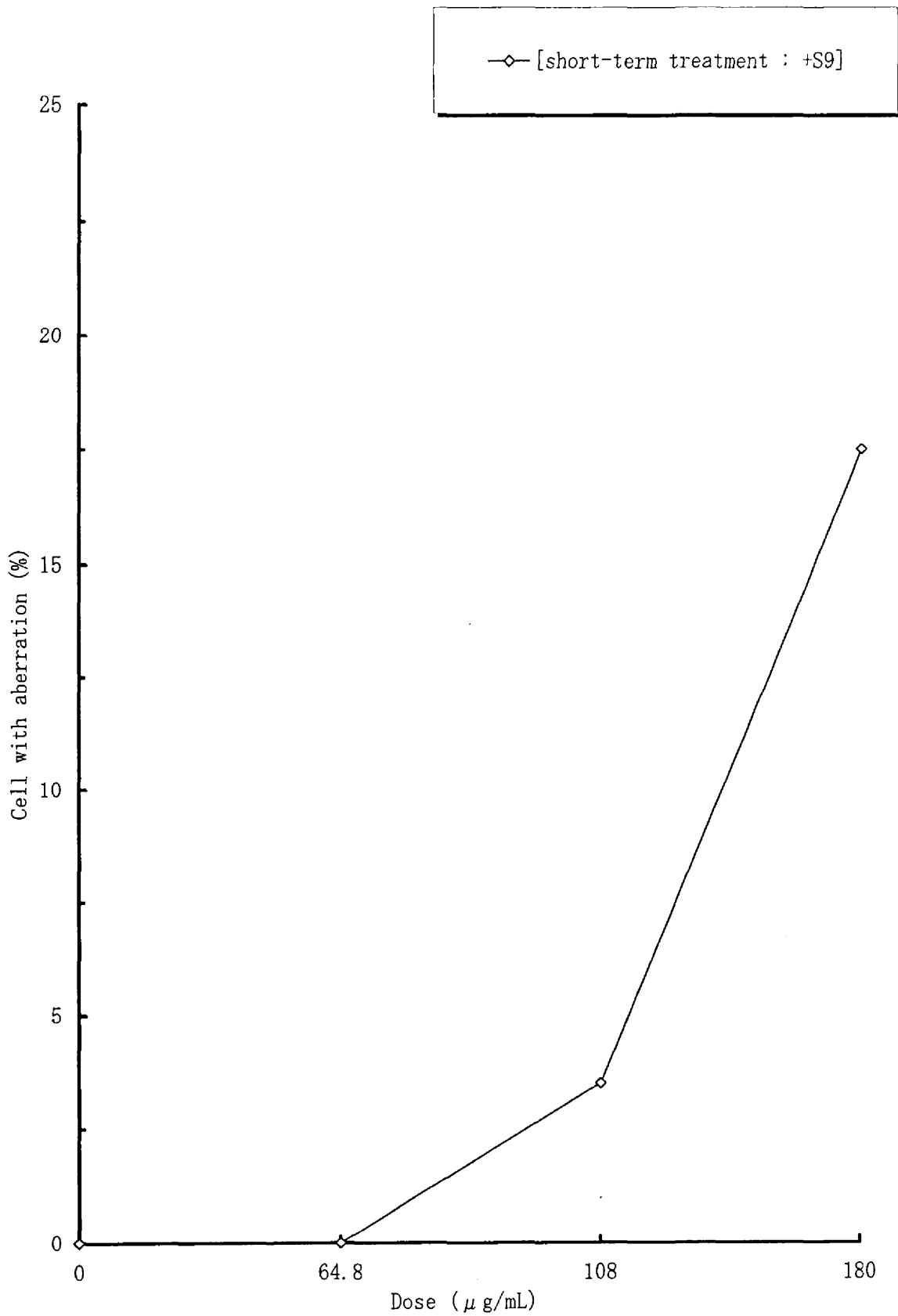


Figure 2. Incidence of structural aberrations induced by 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment:+S9]

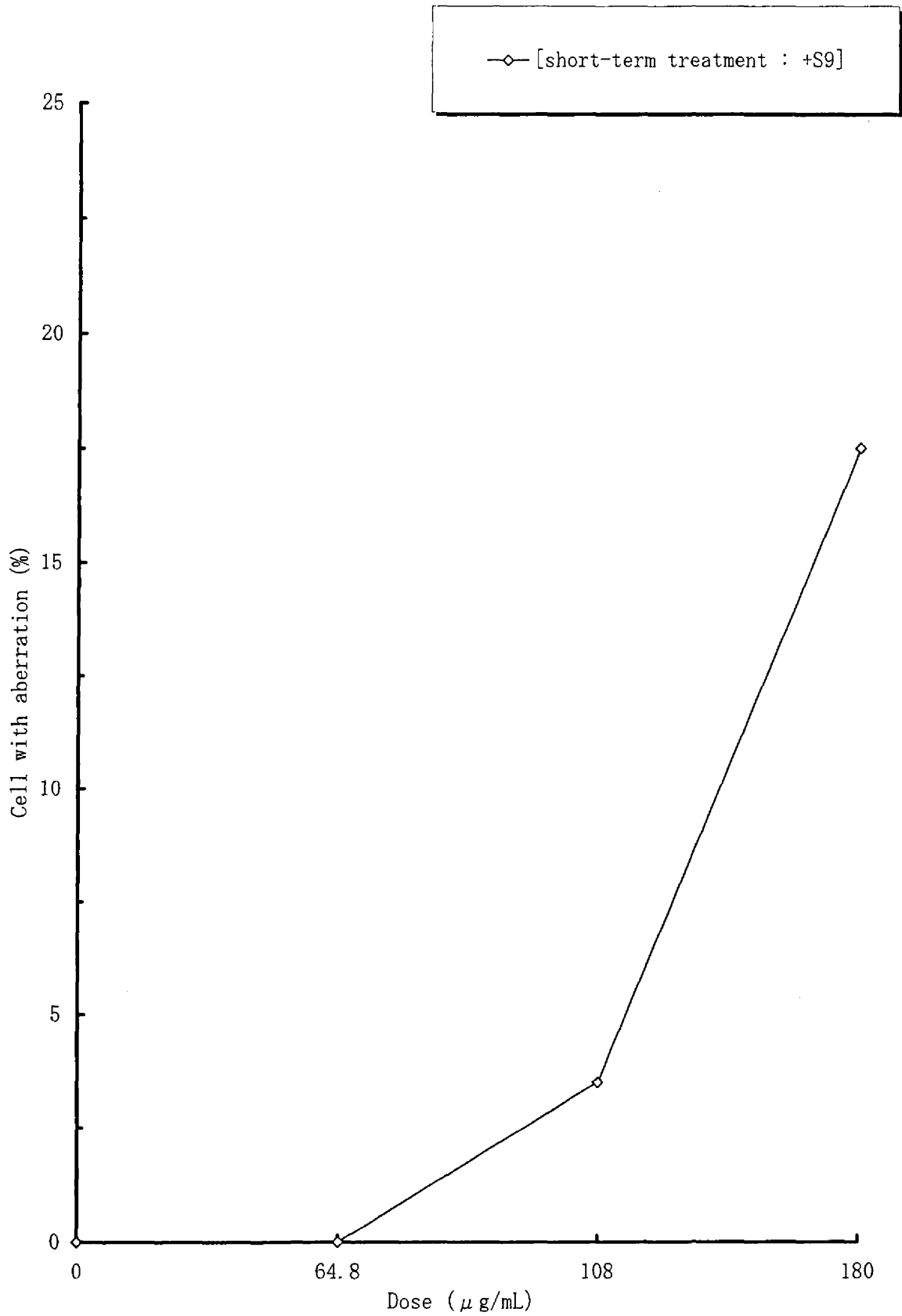


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment:+S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on 4-(1-Methylethenyl)-phenol [short-term treatment]

Exp. No. 5459 (115-149)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Survival (%)	[ Mean ]	Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Survival (%)	[ Mean ]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
Test substance	54.2	58.9 58.2	[ 58.6 ]	Test substance	54.2	83.7 70.1	[ 76.9 ]
		77.4				68.8 54.3	
	111	43.9 48.1	[ 46.0 ]		111	46.7 48.5	[ 47.6 ]
	158	25.3 20.7	[ 23.0 ]		158	36.6 44.6	[ 40.6 ]
	226	11.8 12.4	[ 12.1 ]		226	26.8 19.3	[ 23.1 ]
	322	7.0 5.9	[ 6.4 ]		322	7.7 12.9	[ 10.3 ]
	460	6.9 15.7	[ 11.3 ]		460	9.0 6.2	[ 7.6 ]
	658	2.6 3.2	[ 2.9 ]		658	10.2 6.5	[ 8.3 ]
	939	3.1 1.2	[ 2.1 ]		939	5.6 5.9	[ 5.8 ]
	1342 d)	2.6 1.2	[ 1.9 ]		1342 d)	4.4 10.2	[ 7.3 ]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— 97.8 ( $\mu$ g/mL)[short-term treatment : +S9] ——— 107 ( $\mu$ g/mL)

a): Negative control

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

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 4-(1-Methylethyl)-phenol  
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 5459 (115-149)

Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Time of exposure (h)	Cell survival (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed	Number of polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	#	200	0 ( 0.0)	
Test substance	64.8	6	50.8	200	3	7	7	0	0	0	10 ( 5.0)	*	200	2 ( 1.0)	
	108	6	45.2	200	3	13	22	0	0	0	27 ( 13.5)	*	200	2 ( 1.0)	
	180	6	28.6	200	6	21	56	0	0	0	61 ( 30.5)	*	200	2 ( 1.0)	positive
	300	6	0.0	Toxic											
	500	6	0.0	Toxic											
MMC b)	0.1	6	59.5	200	10	29	36	0	0	0	56 ( 28.0)	*	200	1 ( 0.5)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

#:p&lt;0.05 Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

\*:p&lt;0.05 Significant difference by trend test (Fisher's exact test)

a):Negative control

b):Positive control (Mitomycin C)

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 4-(1-Metylene)-phenol  
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 5459 (115-149)

Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Time of exposure (h)	Cell survival (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed	Number of polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	#	200	1 ( 0.5)	
Test substance	64.8	6	71.0	200	1	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)		200	2 ( 1.0)	
	108	6	43.3	200	1	4	4	0	0	0	7 ( 3.5)	*	200	5 ( 2.5)	
	180	6	27.3	200	4	8	33	0	0	0	35 ( 17.5)	*	200	3 ( 1.5)	positive
	300	6	0.1	Toxic											
	500	6	0.2	Toxic											
CP c)	12.5	6	64.8	200	14	59	146	0	0	0	152 ( 76.0)	*	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

#:  $p \leq 0.05$  Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

\*:  $p \leq 0.05$  Significant difference by trend test (Fisher's exact test)

a): Negative control

c): Positive control (Cyclophosphamide)