

# 最終報告書

2-tert-ブチルフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号: 98-099)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

## 目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 指標菌株	3
3. 指標菌株の検査	3
4. 指標菌株の保存と前培養	3
5. S9 mix	4
6. 被験物質の供試液の調製	5
7. 陰性対照および陽性対照	5
8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製	6
9. 用量設定試験（予備試験）	6
10. 本試験	6
1) 用量設定	6
2) 実験方法	6
(1) プレインキュベーション法（直接法）	6
(2) プレインキュベーション法（代謝活性化法）	7
11. 無菌試験	7
12. 試験の有効性	8
13. 結果の判定	8
結果	8
結論および参考事項	9
参考文献	10

表：

表 1-1	S9 mix 非存在下における 2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目-直接法〕	11
表 1-2	S9 mix 存在下における 2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目-代謝活性化法〕	12
表 2-1	S9 mix 非存在下における 2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目-直接法〕	13
表 2-2	S9 mix 存在下における 2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目-代謝活性化法〕	14

図：

図 1-1	2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	15
図 1-2	2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	16
図 1-3	2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	17
図 2-1	2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	18
図 2-2	2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	19
図 2-3	2-tert-ブチルフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	20

## 要 約

2-tert-ブチルフェノールの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験（予備試験）の結果から菌の生育阻害が認められる用量を最高用量とし、直接法および代謝活性化法ともに、6.25~200  $\mu$ g/プレートの範囲（公比2）で設定した。

試験は2回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、*S. typhimurium* では 100  $\mu$ g/プレート以上で、また、WP2uvrA では 200  $\mu$ g/プレートで認められ、代謝活性化法の場合は、TA100 および TA1535 では 100  $\mu$ g/プレート以上で、また、TA98, TA1537 および WP2uvrA では 200  $\mu$ g/プレートで認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、2-tert-ブチルフェノール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。

## 試験目的

この試験は、2-*tert*-ブチルフェノールの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1, 2)</sup>

### 1. 被験物質

名称(略号): 2-*tert*-ブチルフェノール (2TBP)

別名 *o-tert*-Butylphenol

CAS番号: 88-18-6

ロット番号:

純度: 99.97% (平成10年10月2日分析) [不純物 Phenol: 0.03 %]

入手先(製造元):

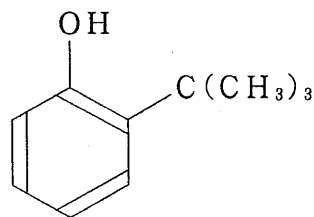
入手日: 平成10年11月11日

入手量: 250 g

物性等:

化学名 2-*tert*-Butylphenol

構造式



分子式  $C_{10}H_{14}O$

分子量 150.22

性状(常温) 無色透明液体

融点  $-7^{\circ}C$

沸点  $224^{\circ}C$

蒸気圧 13 Pa ( $25^{\circ}C$ )

溶解性 水：難溶；アセトン，アルコール，ジメチルスルホキシド（DMSO）  
：易溶

安定性：安定〔実験終了後，残余被験物質を にお  
いて分析（平成11年6月28日）した結果，純度は99.9%で，実験期間中被  
験物質は安定であったことを確認した。〕

保管条件：冷暗所（4℃），密栓（窒素充填）

## 2. 指標菌株

指標菌株は，国立公衆衛生院より入手（平成6年12月19日）した以下の5種類を用いた。

（塩基対置換型）

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535

*Escherichia coli* WP2uvrA

（フレームシフト型）

*Salmonella typhimurium* TA98, TA1537

## 3. 指標菌株の検査

次に示す指標菌株の遺伝的特性およびその他の諸性質に関する項目について検査し，本来の特性を有することを確認した。

- 1) *S. typhimurium* におけるヒスチジンおよびビオチン要求性  
*E. coli* におけるトリプトファン要求性
- 2) 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- 3) *S. typhimurium* におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- 4) *S. typhimurium* TA100 および TA98 におけるアンピシリン耐性 (pKM101)
- 5) 自然突然変異体数
- 6) 陽性対照物質に対する反応性

## 4. 指標菌株の保存と前培養

菌液 0.8 mL にジメチルスルホキシド（DMSO，和光純薬工業株式会社，ロット番号

TPK7807, 99.9%) を 0.07 mL の割合で加えて -80°C 以下で保存した。この保存菌株の 25  $\mu$ L をニュートリエントブロス (Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories, ロット番号 44077JK) 液体培地 15 mL に接種し, 37°C で 12 時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液については, 分光光度計で吸光度 ( $OD_{660nm}$ ) を測定し, 懸濁と生菌数の換算式より 1 mL あたり  $1 \times 10^9$  以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)					
指標菌株	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
用量設定試験	1.70	1.81	1.34	1.48	1.28
本試験 (1回目)	1.54	1.67	1.52	1.41	1.21
本試験 (2回目)	1.50	1.67	1.52	1.41	1.24

## 5. S9 mix

代謝活性化法に用いた S9 mix は, ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結された市販品をキッコーマン株式会社から購入し, 使用した (ロット番号 FSM-399・1999年3月19日製造・1999年4月2日購入)。凍結 S9 mix は -80°C 以下で保存し, 使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL 当たりの組成は, 次のとおりである。

### S9 製造法

#### A. 使用動物

- 種・系統: Sprague-Dawley系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- 性・週齢: 雄・7週齢
- 体重: 198~231g

#### B. 誘導法

- 誘導物質: phenobarbital (PB), 5,6-benzoflavone (BF)
- 投与経路: 腹腔内投与
- 投与方法 (投与開始日起算):
  - 1日目-PB 30 mg/kg, 2, 3, 4日目-PB 60 mg/kg
  - 3日目-BF 80 mg/kg

#### C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離 ( $9,000 \times g$ ) し, その上清を採取

### S9 mix 1 mL 当たりの組成

MgCl <sub>2</sub>	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADH	4	μmol
NADPH	4	μmol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol
S9	0.1	mL

### 6. 被験物質の供試液の調製

被験物質は水に難溶で、DMSO に易溶であるため、溶媒には DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 ACH7185, 99.9%) を用いた。被験物質の供試液の調製は、実験の直前に行った。溶媒を用いて最高用量の供試液 (原液) を調製し、ついで、この原液を溶媒で順次希釈して所定の用量の被験物質供試液を調製した。

### 7. 陰性対照および陽性対照

陰性対照 (溶媒対照) には、被験物質の溶媒である DMSO を用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原性物質を用いた。

指標菌株	直接法 (μg/プレート)	代謝活性化法 (μg/プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2uvrA	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社, 98%, ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社, >90%, ロット番号 KCM 2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 90%, ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company, 98%, ロット番号 07721MZ)



AF-2 および 2-AA は DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 ACH7185, 99.9%) に, SA および 9-AA は蒸留水 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号 K7B87) に溶解した。

#### 8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6%寒天粉末 (Difco laboratories, ロット番号 42101JG) および 0.5%塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, ロット番号 6314, 7001) の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に, *S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン (Sigma Chemical Company, ロット番号 126H0568) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 DLJ5479) 水溶液, *E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 KCK3898) 水溶液を 1/10 容加え, アミノ酸添加軟寒天培地とした。

#### 9. 用量設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために, 全指標菌株について, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 および 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量を用いて, 本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果, 代謝活性化の有無にかかわらず, いずれの菌株においても 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で生育阻害が認められ, また, TA100, TA1535 および TA1537 では直接法における 100  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  でも軽度な生育阻害が認められた。

#### 10. 本試験

##### 1) 用量設定

用量設定試験の結果から, 被験物質の用量は, 直接法および代謝活性化法ともに最高用量を 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とし, 以下公比 2 で 100, 50, 25, 12.5 および 6.25  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の計 6 用量とした。

##### 2) 実験方法

###### (1) プレインキュベーション法 (直接法)

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 0.1 mL, 被験物質の供試液 0.1 mL および

0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (和光純薬工業株式会社, リン酸水素二ナトリウム・十二水塩: ロット番号 CAH3075, リン酸二水素ナトリウム・二水塩: ロット番号 CAJ2723) を分注し, 37°Cで20分間振盪培養後, 45°Cに保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (テスメディアAN培地, オリエンタル酵母工業株式会社, ロット番号 AN080B0・1999年2月4日製造・1999年3月19日購入) は, Vogel-Bonner E培地 (0.2%クエン酸・一水塩, 1%リン酸二カリウム, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム, 0.02%硫酸マグネシウム・七水塩) に 1.5%寒天粉末および2%グルコースを加え, 30 mL ずつ分注したものである。37°Cで48時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては, 上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり, 溶媒 (DMSO) および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量3枚のプレートで行った。

## (2) プレインキュベーション法 (代謝活性化法)

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 0.1 mL, 被験物質の供試液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を分注し, 37°Cで20分間振盪培養後, 45°Cに保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37°Cで48時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては, 上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり, 溶媒 (DMSO) および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量3枚のプレートで行った。

## 11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において, 用いた溶媒, S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について, それぞれ 0.1 mL に 0.6%軟寒天 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地に重層後, 37°Cで48時間培養し, 菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は, それぞれ3枚ずつ使用した。

## 12. 試験の有効性

以下の3基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効と判定した。

- 1) 試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- 2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す（自然復帰変異体数）。
- 3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

## 13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の3基準を満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量依存性）。
- 3) 2回にわたる本試験の結果から、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定した。

## 結 果

試験を2回実施した結果（表 1-1, 1-2, 2-1, 2-2 および図 1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3）、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を越えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、*S. typhimurium* では 100  $\mu$ g/プレート以上で、また、WP2uvrA では 200  $\mu$ g/プレートで認められ、代謝活性化法の場合は、TA100 および TA1535 では 100  $\mu$ g/プレート以上で、また、TA98, TA1537 および WP2uvrA では 200  $\mu$ g/プレートで認められた。

陰性対照群では、背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ、

陽性対照群においては、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix などには、雑菌の混入は認められなかった。その他、実験中、被験物質の析出等、特記すべき変化は認められなかった。

## 結論および参考事項

2-tert-ブチルフェノールの変異原性に関する報告は見当たらないが、その異性体である 4-tert-ブチルフェノールについては、*Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験<sup>3, 4)</sup>、ラット肝細胞を用いた染色体異常試験<sup>3)</sup> および酵母を用いた遺伝子突然変異試験<sup>3)</sup> でいずれも陰性、CHL 細胞を用いた染色体異常試験では陽性<sup>5)</sup> と報告されている。

その他の類縁化合物について、2-sec-ブチルフェノールは、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験<sup>6)</sup> 並びに *S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰突然変異試験<sup>7)</sup> で陰性、CHL 細胞を用いた染色体異常試験では陽性<sup>8)</sup>、4-sec-ブチルフェノールは、*S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>9)</sup> および CHL 細胞を用いた染色体異常試験で構造異常誘発に関し疑陽性の結果<sup>10)</sup> が報告されている。また、2,6-ジ-tert-ブチルフェノールは、*S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰突然変異試験、ラット肝細胞を用いた染色体異常試験および酵母を用いた遺伝子突然変異試験でいずれも陰性<sup>3)</sup> と報告されている。さらに、2,4,6-トリ-tert-ブチルフェノールは、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>11)</sup> と報告されている。

そこで、今回 2-tert-ブチルフェノールの遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については、2回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下では、2-tert-ブチルフェノールの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

## 参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215.
- 2) Green, M.H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol.3, eds. by Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp.161-187.
- 3) Dean, B.J., Brooks, T.M., Hodson-Walker, G. and Hutson, D.H. (1985). Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. *Mutation Research*, **153**
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol.4" 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, pp.295-299.
- 5) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol.4" 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, pp.301-304.
- 6) Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, W., Tainer, B. and Zeiger, E. (1986). *Salmonella* mutagenicity tests : II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environmental Mutagenesis*, **8**(Supplement 7), 1-119.
- 7) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol.7" 化学物質点検推進委員会, 東京, 1999, pp.227-231.
- 8) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol.7" 化学物質点検推進委員会, 東京, 1999, pp.232-236.
- 9) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol.2" 化学物質点検推進委員会, 東京, 1995, pp.343-346.
- 10) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol.2" 化学物質点検推進委員会, 東京, 1995, pp.347-351.
- 11) 石館 基 監修, "微生物を用いる変異原性試験データ集" エル・アイ・シー, 東京, 1991, pp.560-561.

表 1-1 S9 mix 非存在下における 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目-直接法〕

用 量 〔 $\mu\text{g}$ /プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔ジメチルスルホキシド〕	97	8	21	15	10
	103	15	13	18	6
	125	9	12	18	6
	(108 $\pm$ 15)	(11 $\pm$ 4)	(15 $\pm$ 5)	(17 $\pm$ 2)	(7 $\pm$ 2)
6.25	116	14	16	20	9
	100	15	10	17	7
	115	9	18	16	6
	(110 $\pm$ 9)	(13 $\pm$ 3)	(15 $\pm$ 4)	(18 $\pm$ 2)	(7 $\pm$ 2)
12.5	116	11	14	14	15
	114	14	12	28	6
	107	5	14	18	13
	(112 $\pm$ 5)	(10 $\pm$ 5)	(13 $\pm$ 1)	(20 $\pm$ 7)	(11 $\pm$ 5)
25	104	9	17	18	10
	139	9	9	29	9
	120	10	13	19	10
	(121 $\pm$ 18)	(9 $\pm$ 1)	(13 $\pm$ 4)	(22 $\pm$ 6)	(10 $\pm$ 1)
50	126	11	17	22	12
	110	11	8	25	9
	98	15	13	27	14
	(111 $\pm$ 14)	(12 $\pm$ 2)	(13 $\pm$ 5)	(25 $\pm$ 3)	(12 $\pm$ 3)
100	96*	7*	15	12*	3*
	90*	4*	16	16*	3*
	72*	9*	9	17*	2*
	(86 $\pm$ 12)	(7 $\pm$ 3)	(13 $\pm$ 4)	(15 $\pm$ 3)	(3 $\pm$ 1)
200	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	1*	0*	0*	0*
	0*	0*	0*	0*	0*
	(0 $\pm$ 0)	(0 $\pm$ 1)	(0 $\pm$ 0)	(0 $\pm$ 0)	(0 $\pm$ 0)
陽 性 対 照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu\text{g}$ /プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復 帰 変 異 コロニー数 /プレート	1018	426	703	369	506
	994	454	721	402	410
	925	434	789	347	499
	(979 $\pm$ 48)	(438 $\pm$ 14)	(738 $\pm$ 45)	(373 $\pm$ 28)	(472 $\pm$ 54)

( ) : 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下における 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目-代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu\text{g}$ /プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔ジメチルスルホキシド〕	98	10	24	25	14
	109	9	20	38	13
	96	7	23	29	15
	(101 $\pm$ 7)	( 9 $\pm$ 2)	(22 $\pm$ 2)	(31 $\pm$ 7)	(14 $\pm$ 1)
6.25	142	14	16	23	10
	139	8	17	27	12
	124	8	10	33	13
	(135 $\pm$ 10)	(10 $\pm$ 3)	(14 $\pm$ 4)	(28 $\pm$ 5)	(12 $\pm$ 2)
12.5	127	8	20	25	10
	128	10	20	32	11
	139	10	12	41	12
	(131 $\pm$ 7)	( 9 $\pm$ 1)	(17 $\pm$ 5)	(33 $\pm$ 8)	(11 $\pm$ 1)
25	152	8	4	38	7
	139	11	22	36	14
	133	11	14	30	10
	(141 $\pm$ 10)	(10 $\pm$ 2)	(13 $\pm$ 9)	(35 $\pm$ 4)	(10 $\pm$ 4)
50	130	5	17	32	6
	138	12	18	46	7
	127	4	18	35	16
	(132 $\pm$ 6)	( 7 $\pm$ 4)	(18 $\pm$ 1)	(38 $\pm$ 7)	(10 $\pm$ 6)
100	104*	8*	28	31	5
	112*	4*	18	26	5
	127*	4*	16	34	8
	(114 $\pm$ 12)	( 5 $\pm$ 2)	(21 $\pm$ 6)	(30 $\pm$ 4)	( 6 $\pm$ 2)
200	8*	4*	14*	22*	0*
	0*	0*	10*	6*	0*
	74*	0*	10*	28*	0*
	( 27 $\pm$ 41)	( 1 $\pm$ 2)	(11 $\pm$ 2)	(19 $\pm$ 11)	( 0 $\pm$ 0)
陽 性 対 照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}$ /プレート	1	2	10	1	2
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	536	179	708	319	87
	554	125	697	375	83
	498	245	796	327	100
	(529 $\pm$ 29)	(150 $\pm$ 27)	(734 $\pm$ 54)	(340 $\pm$ 30)	( 90 $\pm$ 9)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差  
 \* : 菌の生育阻害が認められた。  
 2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下における 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目-直接法〕

用 量 〔 $\mu\text{g}$ /プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔ジメチルスルホキシド〕	106	16	16	22	7
	118	13	14	28	8
	121	12	17	27	8
	(115 $\pm$ 8)	(14 $\pm$ 2)	(16 $\pm$ 2)	(26 $\pm$ 3)	( 8 $\pm$ 1)
6.25	113	15	12	30	7
	118	15	12	28	7
	117	10	14	29	9
	(116 $\pm$ 3)	(13 $\pm$ 3)	(13 $\pm$ 1)	(29 $\pm$ 1)	( 8 $\pm$ 1)
12.5	131	22	21	17	9
	127	10	16	20	7
	145	11	12	28	14
	(134 $\pm$ 9)	(14 $\pm$ 7)	(16 $\pm$ 5)	(22 $\pm$ 6)	(10 $\pm$ 4)
25	109	18	7	22	7
	138	15	14	30	6
	125	17	14	39	10
	(124 $\pm$ 15)	(17 $\pm$ 2)	(12 $\pm$ 4)	(30 $\pm$ 9)	( 8 $\pm$ 2)
50	105	10	12	24	13
	98	7	13	26	12
	101	6	11	22	12
	(101 $\pm$ 4)	( 8 $\pm$ 2)	(12 $\pm$ 1)	(24 $\pm$ 2)	(12 $\pm$ 1)
100	105*	14*	10	15*	5*
	80*	6*	16	16*	4*
	80*	11*	13	15*	4*
	( 88 $\pm$ 14)	(10 $\pm$ 4)	(13 $\pm$ 3)	(15 $\pm$ 1)	( 4 $\pm$ 1)
200	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	0*	11*	0*	0*
	( 0 $\pm$ 0)	( 0 $\pm$ 0)	( 4 $\pm$ 6)	( 0 $\pm$ 0)	( 0 $\pm$ 0)
陽 性 対 照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu\text{g}$ /プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	985	409	912	405	688
	894	521	868	372	550
	906	442	818	383	508
	(928 $\pm$ 49)	(457 $\pm$ 58)	(866 $\pm$ 47)	(387 $\pm$ 17)	(582 $\pm$ 94)

( ) : 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン



表 2-2 S9 mix 存在下における 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-代謝活性化法]

用 量 〔 $\mu\text{g}$ /プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔ジメチルスルホキシド〕	114	11	21	27	9
	113	8	16	29	12
	110	9	19	35	17
	(112 $\pm$ 2))	( 9 $\pm$ 2)	(19 $\pm$ 3)	(30 $\pm$ 4)	(13 $\pm$ 4)
6. 25	157	10	26	52	16
	147	10	22	37	8
	131	9	14	30	12
	(145 $\pm$ 13)	(10 $\pm$ 1)	(21 $\pm$ 6)	(40 $\pm$ 11)	(12 $\pm$ 4)
12. 5	129	11	22	33	9
	131	9	24	35	10
	140	9	28	32	14
	(133 $\pm$ 6)	(10 $\pm$ 1)	(25 $\pm$ 3)	(33 $\pm$ 2)	(11 $\pm$ 3)
25	143	17	14	42	6
	138	8	20	28	10
	131	12	16	27	13
	(137 $\pm$ 6)	(12 $\pm$ 5)	(17 $\pm$ 3)	(32 $\pm$ 8)	(10 $\pm$ 4)
50	152	7	21	36	13
	134	8	15	25	6
	119	13	21	34	13
	(135 $\pm$ 17)	( 9 $\pm$ 3)	(19 $\pm$ 3)	(32 $\pm$ 6)	(11 $\pm$ 4)
100	100*	5*	20	28	7
	87*	3*	20	34	16
	109*	5*	21	34	8
	( 99 $\pm$ 11)	( 4 $\pm$ 1)	(20 $\pm$ 1)	(32 $\pm$ 3)	(10 $\pm$ 5)
200	48*	0*	4*	13*	0*
	1*	0*	9*	16*	0*
	111*	0*	10*	6*	6*
	( 53 $\pm$ 55)	( 0 $\pm$ 0)	( 8 $\pm$ 3)	(12 $\pm$ 5)	( 2 $\pm$ 3)
陽 性 対 照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}$ /プレート	1	2	10	1	2
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	670	162	831	318	72
	589	164	783	330	73
	644	162	811	367	80
	(634 $\pm$ 41)	(163 $\pm$ 1)	(808 $\pm$ 24)	(338 $\pm$ 26)	( 75 $\pm$ 4)

( ) : 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

2-AA : 2-アミノアントラセン

図 1-1 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

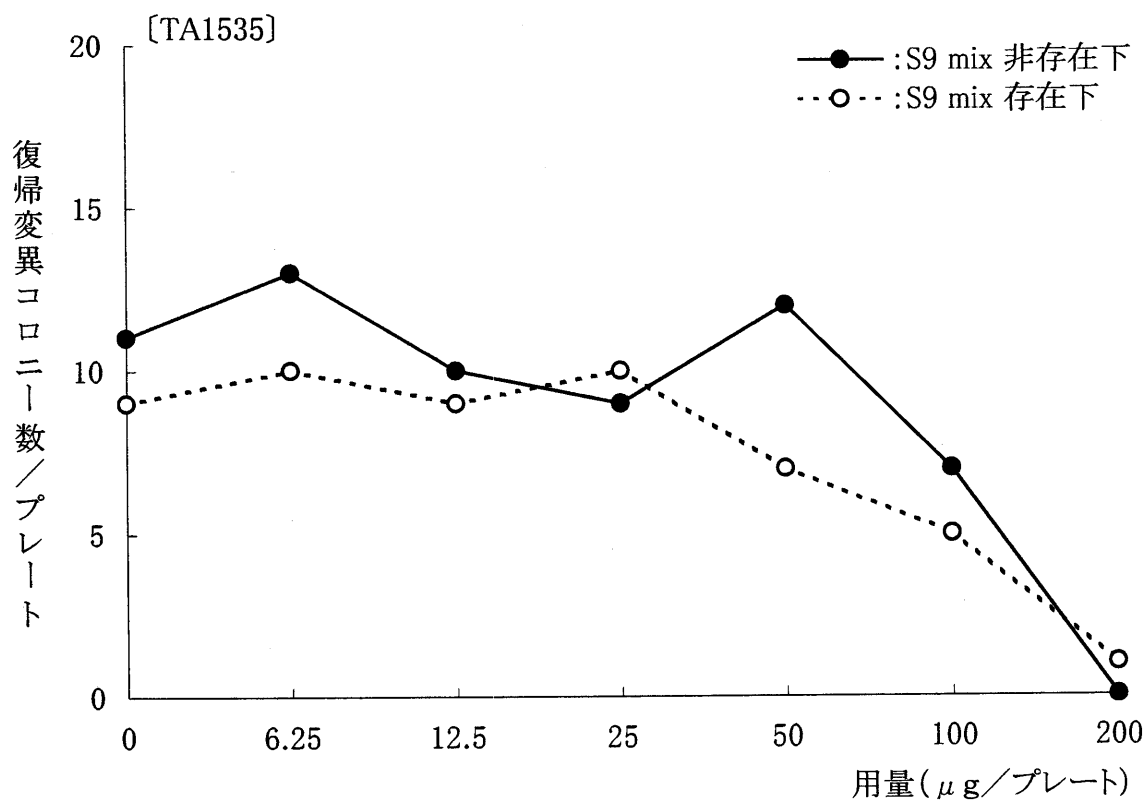
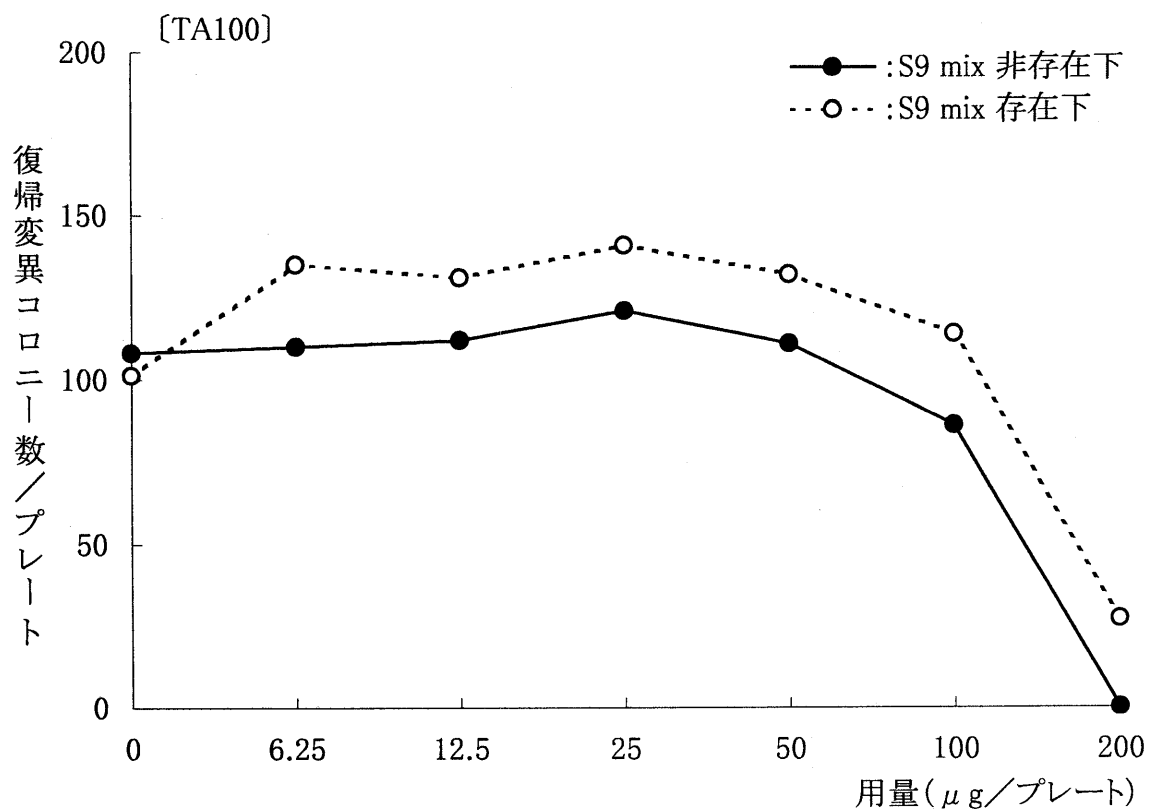


図 1-2 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

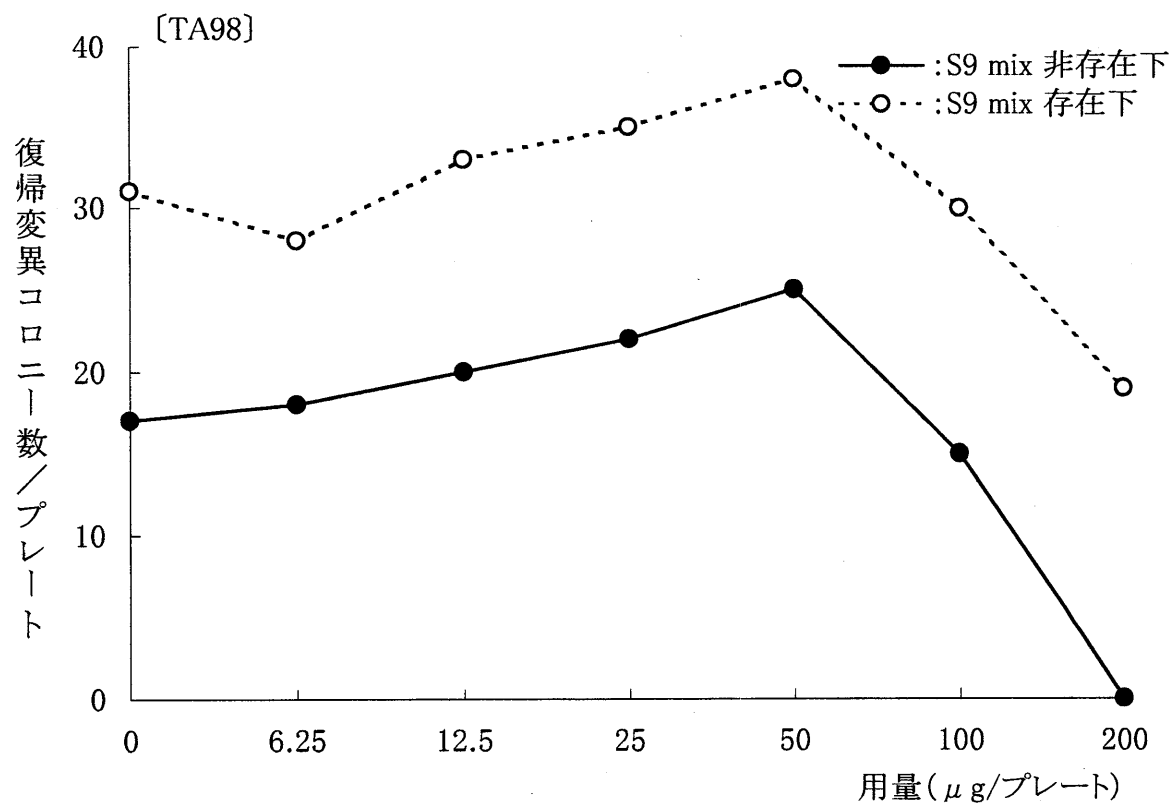
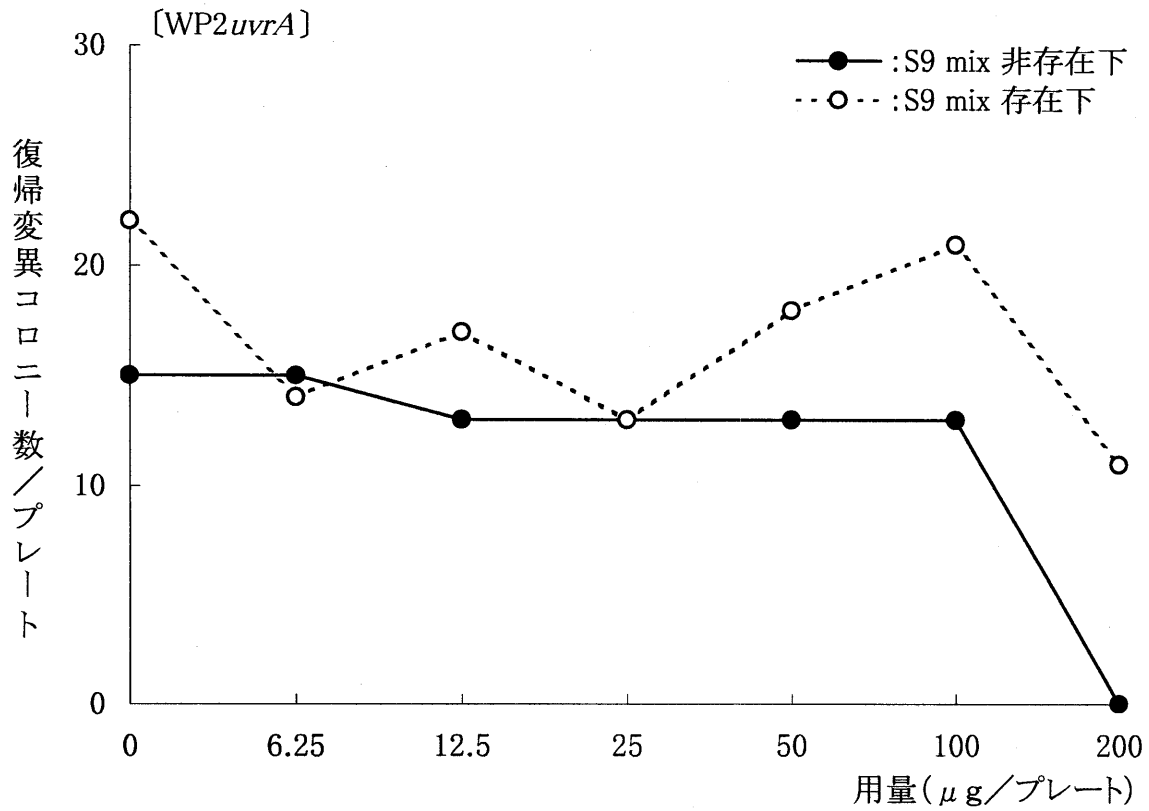


図 1-3 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

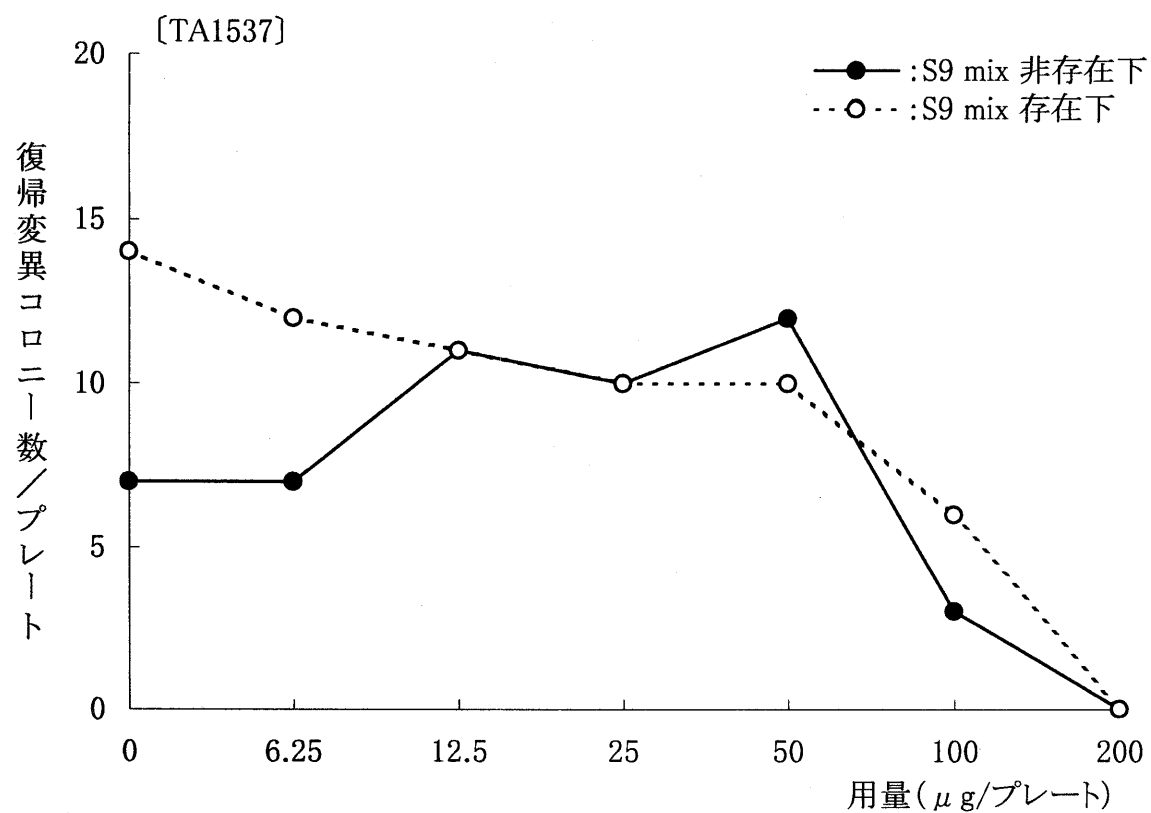


図 2-1 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

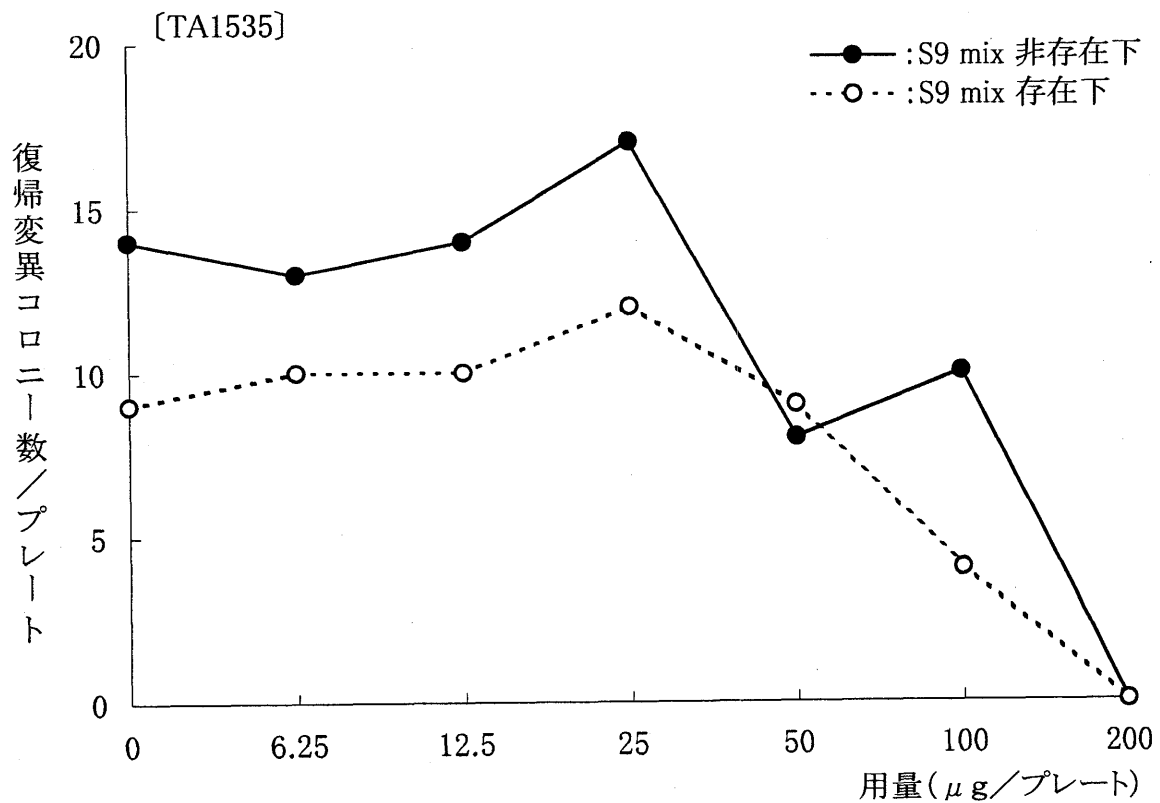
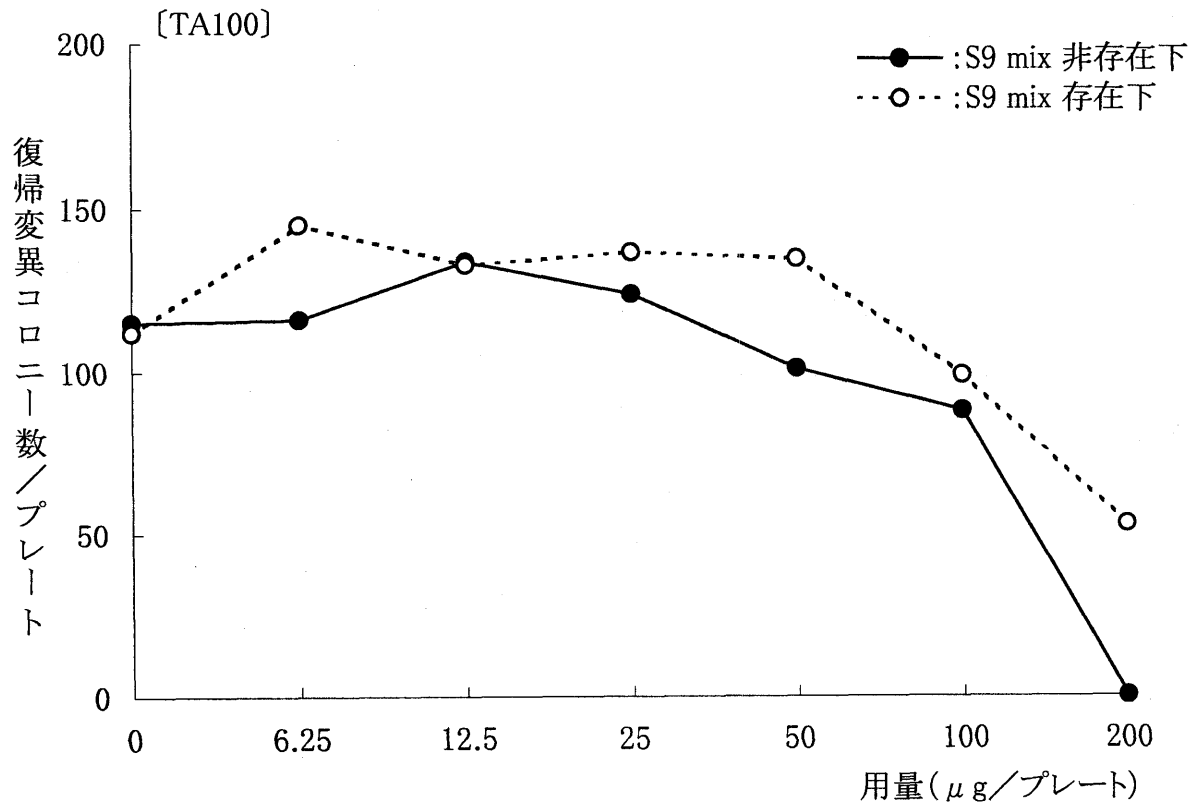


図 2-2 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

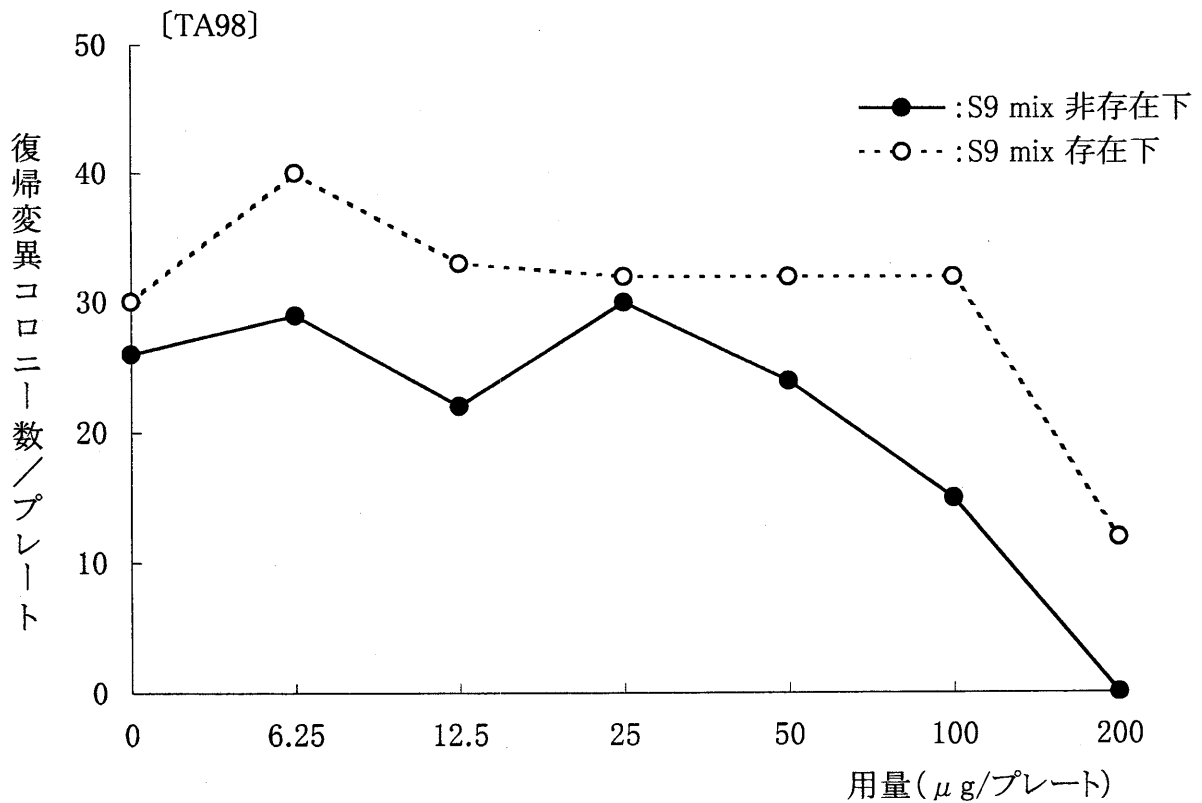
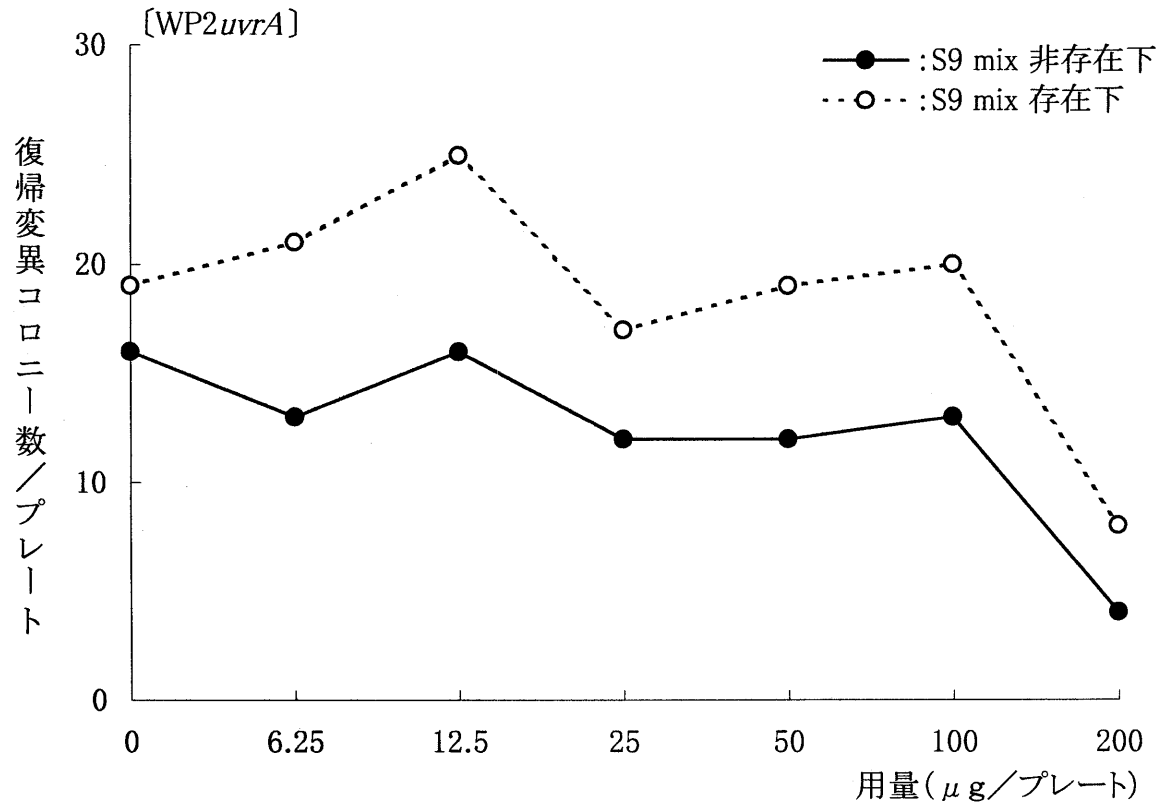


図 2-3 2-tert-ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

