# 最 終 報 告 書

2,4－ジ－*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：98-100）

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 …… 4

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 …… 7

1）用量設定 …… 7

2）実験方法 …… 7

(1) プレインキュベーション法（直接法） …… 7

(2) プレインキュベーション法（代謝活性化法） …… 8

11. 無菌試験 …… 8

12. 試験の有効性 …… 8

13. 結果の判定 …… 9

結果 …… 9

結論および参考事項 …… 10

参考文献 …… 10

表：

表 1-1　S9 mix 非存在下における 2,4－ジ－*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〕 …… 12
表 1-2　S9 mix 存在下における 2,4－ジ－*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〕 …… 13
表 2-1　S9 mix 非存在下における 2,4－ジ－*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〕 …… 14
表 2-2　S9 mix 存在下における 2,4－ジ－*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〕 …… 15

図：

図 1-1　2,4－ジ－*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 1-2　2,4－ジ－*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 1-3　2,4－ジ－*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 …… 18
図 1-4　2,4－ジ－*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 …… 19
図 1-5　2,4－ジ－*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 …… 20
図 2-1　2,4－ジ－*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 …… 21
図 2-2　2,4－ジ－*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 …… 22
図 2-3　2,4－ジ－*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 …… 23
図 2-4　2,4－ジ－*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 …… 24
図 2-5　2,4－ジ－*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 …… 25

# 要　約

2,4－ジ－*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* WP2*uvrA* 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，直接法においては，TA100，TA1535 および TA1537 で 0.781～25μg/プレート，TA98 で 1.56～50μg/プレート，WP2*uvrA* で 3.13～100μg/プレートの範囲（公比２），また，代謝活性化法においては，TA1535 および TA1537 で 7.81～250 μg/プレート，TA100 および TA98 で 15.6～500μg/プレート，WP2*uvrA* で 3.91～125μg/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，TA98 では 25μg/プレート以上，TA100，TA1535 および TA1537 では 12.5μg/プレート以上，WP2*uvrA* では 50μg/プレート以上で認められた。また，代謝活性化法の場合は，WP2*uvrA* で 62.5μg/プレート以上，TA1535 および TA1537 で 125μg/プレート以上，TA100 および TA98 では 250μg/プレート以上で認められた。

以上の成績から，本実験条件下では，2,4－ジ－*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，2,4－ジ－*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[1, 2)]

1．被験物質

名称(略号)：　2,4－ジ－*tert*－ブチルフェノール（2,4TBP）

別名　Phenol, 2,4-di-*tert*-butyl; 2,4-Di-*tert*-butylhydroxybenzene; 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol; 2,4-Bis(*tert*-butyl)phenol; Antioxidant no.33

ＣＡＳ番号：　96-76-4

ロット番号：

純　　度：　99.67 %（平成10年11月９日分析）

不純物　*p*-*tert*-Butylphenol　：0.07 %

2,6-Di-*tert*-butylphenol　：0.04 %

2,4,6-Tri-*tert*-butylphenol：0.03 %

その他の Alkylphenol 類　：0.19 %

入手先(製造元)：

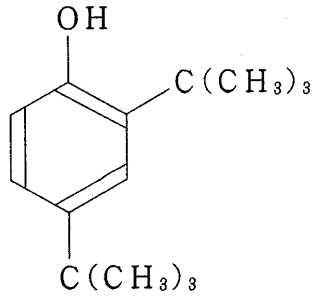
入　手　日：　平成10年11月11日

入　手　量：　250 g

物　性　等：

化 学 名　2,4-Di-*tert*-butylphenol

構 造 式



分子式　$C_{14}H_{22}O$

分子量　206.32

性状(常温)　淡黄褐色固体

融　点　56℃

沸　点　263℃

蒸気圧　3 Pa (25℃)

溶解性　水：0.1 %；ジメチルスルホキシド（DMSO），アセトン，アルコール：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99.7%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（窒素充塡）

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*　WP2*uvrA*

（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℃以下で保存した。この保存菌株の 25 μL 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℃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 $1\times10^9$ 以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数（$\times10^9$/mL）

| 指標菌株 | TA100 | TA1535 | WP2*uvrA* | TA98 | TA1537 |
|---|---|---|---|---|---|
| 用量設定試験（１回目） | 1.70 | 1.81 | 1.52 | 1.48 | 1.28 |
| 用量設定試験（２回目） | 1.54 | 1.67 | 1.34 | 1.41 | 1.21 |
| 本試験（１回目） | 1.46 | 1.67 | 1.30 | 1.41 | 1.21 |
| 本試験（２回目） | 1.62 | 1.76 | 1.25 | 1.33 | 1.28 |

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（用量設定試験：ロット番号 FSM-399・1999年３月19日製造・1999年４月２日購入，本試験：ロット番号 FSM-405・1999年５月21日製造・1999年５月25日購入）。凍結 S9 mix は－80℃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

a） 種・系統： Sprague-Dawley系ラット（日本エスエルシー株式会社）

b） 性・週齢： 雄・7週齢

c） 体　　重： 198～231g(FSM-399)， 184 ～243g(FSM-405)

B．誘導法

a） 誘導物質： phenobarbital （PB），5,6-benzoflavone（BF）

b） 投与経路： 腹腔内投与

c） 投与法（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×g）し，その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

| | |
|---|---|
| $MgCl_2$ | 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<br>（μg/プレート） | 代謝活性化法<br>（μg/プレート） |
|---|---|---|
| TA100 | AF-2 (0.01) | 2-AA (1) |
| TA1535 | SA (0.5) | 2-AA (2) |
| WP2*uvrA* | 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，直接法の場合は，TA98，TA100，TA1535 および TA1537 では 1.56，3.13，6.25，12.5，25 および 50μg/プレートの 6 用量，WP2*uvrA* では 50，100，200，500，1000，2000 および 5000

μg/プレートの7用量を，また，代謝活性化法の場合は，いずれの指標菌株とも 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 および 5000μg/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，直接法の場合は，TA98 では 50μg/プレート，TA100 および TA1537 で 25μg/プレート以上，TA1535 では 12.5μg/プレート以上，WP2*uvrA* では 100μg/プレート以上で菌の生育阻害が認められた。但し，TA1535 における 12.5 μg/プレートの生育阻害は軽度であった。代謝活性化法の場合は，TA98 では 500 μg/プレート以上，TA100, TA1535 および TA1537 では 200μg/プレート以上，WP2*uvrA* では 100μg/プレート以上で認められた。但し，TA100 における 200 μg/プレートの生育阻害は軽度であった。

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，直接法の場合，TA100, TA1535 および TA1537 では 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 および 25μg/プレート（公比2），TA98 では 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 および50μg/プレート（公比2），WP2*uvrA* では 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 および 100μg/プレート（公比2）のそれぞれ計6用量とした。代謝活性化法の場合は，WP2*uvrA* では 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5 および 125μg/プレート（公比2），TA1535 および TA1537 では 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125 および 250μg/プレート（公比2），TA100 および TA98 では 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 および 500μg/プレート（公比2）のそれぞれ計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℃で20分間振盪培養後，45℃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 AN080BO・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℃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℃で20分間振盪培養後，45℃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℃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℃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 1-1，1-2，1-3，1-4，1-5，2-1，2-2，2-3，2-4，2-5），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，TA98 では 25μg/プレート以上，TA100，TA1535 および TA1537 では 12.5μg/プレート以上，WP2*uvrA* では 50 μg/プレート以上で認められた。また，代謝活性化法の場合は，WP2*uvrA* で 62.5μg/プレート以上，TA1535 および TA1537 で 125μg/プレート以上，TA100 および TA98 で 250μg/プレート以上で認められた。

なお，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

2,4－ジ－*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，その類縁化合物について，2,6－ジ－*tert*－ブチルフェノールは，*Salmonella typhimurium* および *Escherichia 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[3]，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[4]，4－*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[3, 5]，ラット肝細胞を用いた染色体異常試験[3]および酵母を用いた遺伝子突然変異試験[3]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[6]と報告されている。また，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[7]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[8]が報告され，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で陰性[9]，*S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰突然変異試験で陰性[10]および CHL 細胞を用いた染色体異常試験で陽性[11]と報告されている。

そこで，今回 2,4－ジ－*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，2,4－ジ－*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**, 57

4） 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.

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.295-299.

6） 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.

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.2” 化学物質点検推進委員会, 東京, 1995, pp.343-346.

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.2” 化学物質点検推進委員会, 東京, 1995, pp.347-351.

9） 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.

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.7” 化学物質点検推進委員会, 東京, 1999, pp.227-231.

11） 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.

表 1-1　S9 mix 非存在下における 2,4－ジ－*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〔μg/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 | WP2*uvrA* | TA98 | TA1537 |
| 陰性対照〔ジメチルスルホキシド〕 | 116<br>117<br>113<br>(115±2) | 11<br>8<br>8<br>( 9±2) | 21<br>20<br>16<br>(19±3) | 15<br>21<br>30<br>(22±8) | 6<br>6<br>7<br>( 6±1) |
| 0.781 | 84<br>121<br>101<br>(102±19) | 12<br>7<br>7<br>( 9±3) | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 9<br>7<br>9<br>( 8±1) |
| 1.56 | 103<br>116<br>124<br>(114±11) | 10<br>8<br>8<br>( 9±1) | --<br>--<br>--<br>-- | 22<br>30<br>23<br>(25±4) | 12<br>7<br>7<br>( 9±3) |
| 3.13 | 118<br>137<br>104<br>(120±17) | 13<br>14<br>6<br>(11±4) | 17<br>17<br>15<br>(16±1) | 27<br>21<br>18<br>(22±5) | 7<br>13<br>5<br>( 8±4) |
| 6.25 | 105<br>109<br>125<br>(113±11) | 11<br>10<br>12<br>(11±1) | 18<br>15<br>24<br>(19±5) | 21<br>29<br>25<br>(25±4) | 8<br>5<br>11<br>( 8±3) |
| 12.5 | 101*<br>73*<br>82*<br>( 85±14) | 6*<br>5*<br>7*<br>( 6±1) | 17<br>13<br>14<br>(15±2) | 13<br>21<br>15<br>(16±4) | 2*<br>5*<br>6*<br>( 4±2) |
| 25 | 102*<br>74*<br>92*<br>( 89±14) | 7*<br>6*<br>4*<br>( 6±2) | 10<br>18<br>24<br>(17±7) | 20*<br>19*<br>18*<br>(19±1) | 3*<br>2*<br>2*<br>( 2±1) |
| 50 | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 19*<br>15*<br>11*<br>(15±4) | 11*<br>19*<br>13*<br>(14±4) | --<br>--<br>--<br>-- |
| 100 | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 18*<br>18*<br>18*<br>(18±0) | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- |
| 陽性対照 | AF-2 | SA | AF-2 | AF-2 | 9-AA |
| μg/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 | 808<br>829<br>820<br>(819±11) | 385<br>396<br>380<br>(387±8) | 829<br>948<br>869<br>(882±61) | 323<br>321<br>318<br>(321±3) | 567<br>480<br>401<br>(483±83) |

( )：平均値±標準偏差　*：菌の生育阻害が認められた。　--：試験せず
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 2,4－ジ－*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〔μg/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 | WP2*uvrA* | TA98 | TA1537 |
| 陰性対照〔ジメチルスルホキシド〕 | 100<br>119<br>96<br>(105±12) | 9<br>7<br>10<br>( 9±2) | 21<br>30<br>28<br>(26±5) | 27<br>30<br>29<br>(29±2) | 15<br>15<br>8<br>(13±4) |
| 3.91 | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 25<br>28<br>20<br>(24±4) | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- |
| 7.81 | --<br>--<br>--<br>-- | 17<br>10<br>9<br>(12±4) | 23<br>27<br>23<br>(24±2) | --<br>--<br>--<br>-- | 9<br>13<br>11<br>(11±2) |
| 15.6 | 105<br>100<br>111<br>(105±6) | 11<br>6<br>7<br>( 8±3) | 22<br>16<br>27<br>(22±6) | 20<br>25<br>23<br>(23±3) | 12<br>12<br>13<br>(12±1) |
| 31.3 | 100<br>107<br>101<br>(103±4) | 11<br>10<br>10<br>(10±1) | 23<br>16<br>32<br>(24±8) | 33<br>25<br>21<br>(26±6) | 8<br>11<br>13<br>(11±3) |
| 62.5 | 101<br>116<br>89<br>(102±14) | 8<br>7<br>10<br>( 8±2) | 21*<br>16*<br>15*<br>(17±3) | 18<br>25<br>20<br>(21±4) | 10<br>9<br>13<br>(11±2) |
| 125 | 93<br>83<br>97<br>( 91±7) | 5*<br>6*<br>7*<br>( 6±1) | 19*<br>23*<br>22*<br>(21±2) | 12<br>27<br>17<br>(19±8) | 15*<br>13*<br>12*<br>(13±2) |
| 250 | 102*<br>88*<br>93*<br>( 94±7) | 5*<br>6*<br>6*<br>( 6±1) | --<br>--<br>--<br>-- | 32*<br>25*<br>20*<br>(26±6) | 3*<br>5*<br>3*<br>( 4±1) |
| 500 | 65*<br>63*<br>63*<br>( 64±1) | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 19*<br>17*<br>18*<br>(18±1) | --<br>--<br>--<br>-- |
| 陽性対照 | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA |
| μg/プレート | 1 | 2 | 10 | 1 | 2 |
| 復帰変異コロニー数／プレート | 719<br>693<br>746<br>(719±27) | 180<br>201<br>187<br>(189±11) | 812<br>712<br>973<br>(832±132) | 513<br>425<br>520<br>(486±53) | 145<br>158<br>123<br>(142±18) |

( )：平均値±標準偏差　*　：菌の生育阻害が認められた。　--　：試験せず
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 2,4－ジ－*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〔μg/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 | WP2*uvrA* | TA98 | TA1537 |
| 陰性対照〔ジメチルスルホキシド〕 | 104<br>117<br>135<br>(119±16) | 10<br>7<br>7<br>( 8±2) | 25<br>25<br>18<br>(23±4) | 28<br>28<br>19<br>(25±5) | 9<br>12<br>8<br>(10±2) |
| 0.781 | 125<br>97<br>114<br>(112±14) | 12<br>8<br>8<br>( 9±2) | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 13<br>15<br>7<br>(12±4) |
| 1.56 | 112<br>120<br>90<br>(107±16) | 11<br>6<br>8<br>( 8±3) | --<br>--<br>--<br>-- | 23<br>27<br>31<br>(27±4) | 7<br>11<br>9<br>( 9±2) |
| 3.13 | 101<br>93<br>95<br>( 96±4) | 10<br>6<br>6<br>( 7±2) | 16<br>19<br>20<br>(18±2) | 21<br>18<br>28<br>(22±5) | 13<br>8<br>9<br>(10±3) |
| 6.25 | 95<br>105<br>101<br>(100±5) | 14<br>10<br>10<br>(11±2) | 18<br>11<br>20<br>(16±5) | 28<br>31<br>27<br>(29±2) | 11<br>8<br>9<br>( 9±2) |
| 12.5 | 96*<br>70*<br>83*<br>( 83±13) | 8*<br>10*<br>12*<br>(10±2) | 20<br>20<br>20<br>(20±0) | 25<br>25<br>30<br>(27±3) | 4*<br>10*<br>10*<br>( 8±3) |
| 25 | 52*<br>46*<br>52*<br>( 50±3) | 9*<br>5*<br>4*<br>( 6±3) | 18<br>15<br>17<br>(17±2) | 16*<br>24*<br>18*<br>(19±4) | 6*<br>6*<br>5*<br>( 6±1) |
| 50 | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 21*<br>17*<br>22*<br>(20±3) | 18*<br>11*<br>18*<br>(16±4) | --<br>--<br>--<br>-- |
| 100 | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 12*<br>18*<br>17*<br>(16±3) | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- |
| 陽性対照 | AF-2 | SA | AF-2 | AF-2 | 9-AA |
| μg/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 | 867<br>829<br>735<br>(810±68) | 393<br>482<br>414<br>(430±47) | 770<br>782<br>798<br>(783±14) | 473<br>439<br>491<br>(468±26) | 419<br>488<br>399<br>(435±47) |

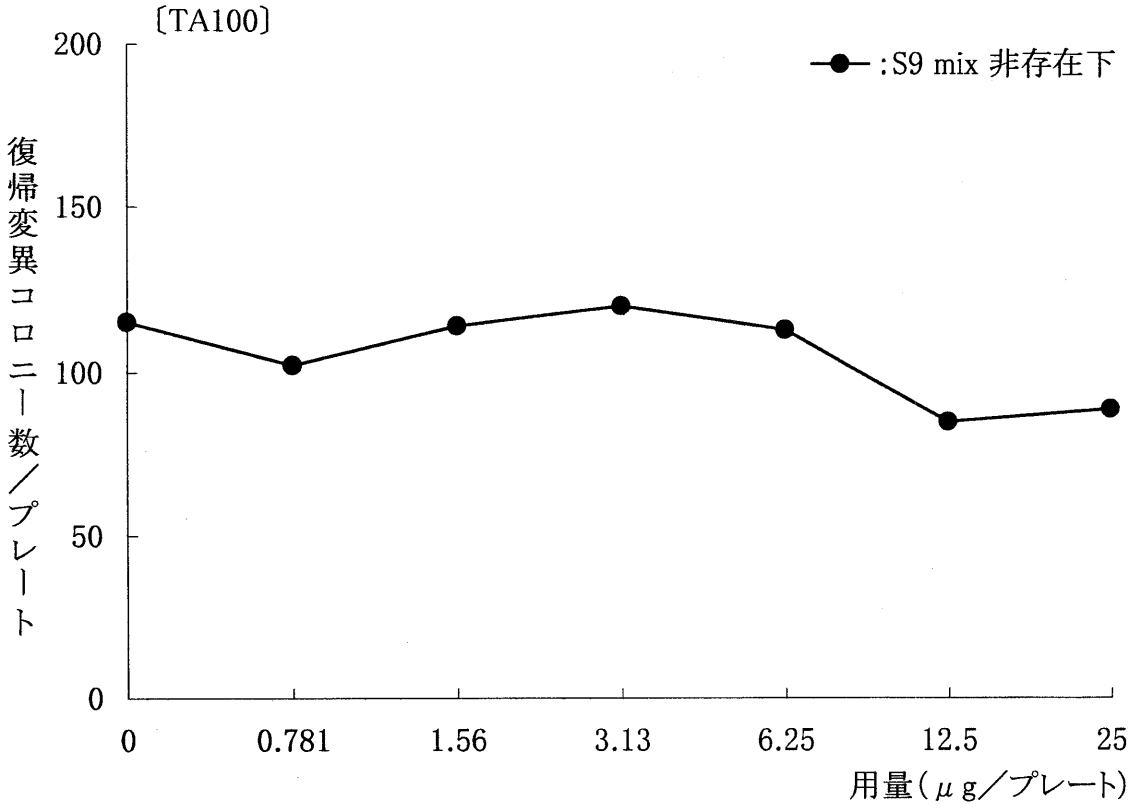
( )：平均値±標準偏差　*：菌の生育阻害が認められた。　--：試験せず
AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SA：アジ化ナトリウム
9-AA：9-アミノアクリジン

表 2-2　S9 mix 存在下における 2,4－ジ－*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〔μg/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 | WP2*uvrA* | TA98 | TA1537 |
| 陰性対照〔ジメチルスルホキシド〕 | 102<br>109<br>96<br>(102±7) | 13<br>8<br>10<br>(10±3) | 26<br>25<br>25<br>(25±1) | 32<br>42<br>31<br>(35±6) | 15<br>11<br>10<br>(12±3) |
| 3.91 | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 17<br>18<br>24<br>(20±4) | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- |
| 7.81 | --<br>--<br>--<br>-- | 8<br>10<br>8<br>( 9±1) | 24<br>22<br>19<br>(22±3) | --<br>--<br>--<br>-- | 15<br>15<br>8<br>(13±4) |
| 15.6 | 113<br>95<br>99<br>(102±9) | 7<br>9<br>10<br>( 9±2) | 26<br>24<br>25<br>(25±1) | 41<br>42<br>35<br>(39±4) | 13<br>7<br>8<br>( 9±3) |
| 31.3 | 100<br>97<br>92<br>( 96±4) | 10<br>13<br>5<br>( 9±4) | 19<br>19<br>28<br>(22±5) | 35<br>27<br>33<br>(32±4) | 8<br>14<br>18<br>(13±5) |
| 62.5 | 95<br>124<br>98<br>(106±16) | 7<br>5<br>4<br>( 5±2) | 24*<br>25*<br>21*<br>(23±2) | 34<br>28<br>21<br>(28±7) | 12<br>10<br>14<br>(12±2) |
| 125 | 92<br>107<br>110<br>(103±10) | 5*<br>7*<br>4*<br>( 5±2) | 19*<br>17*<br>14*<br>(17±3) | 22<br>28<br>27<br>(26±3) | 10*<br>10*<br>14*<br>(11±2) |
| 250 | 100*<br>89*<br>111*<br>(100±11) | 2*<br>6*<br>6*<br>( 5±2) | --<br>--<br>--<br>-- | 23*<br>17*<br>19*<br>(20±3) | 6*<br>3*<br>11*<br>( 7±4) |
| 500 | 95*<br>105*<br>99*<br>(100±5) | --<br>--<br>--<br>-- | --<br>--<br>--<br>-- | 17*<br>15*<br>8*<br>(13±5) | --<br>--<br>--<br>-- |
| 陽性対照 | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA |
| μg/プレート | 1 | 2 | 10 | 1 | 2 |
| 復帰変異コロニー数／プレート | 804<br>811<br>815<br>(810±6) | 230<br>186<br>234<br>(217±27) | 756<br>751<br>770<br>(759±10) | 469<br>448<br>481<br>(466±17) | 162<br>165<br>121<br>(149±25) |

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

図 1－1　2,4-ジー*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



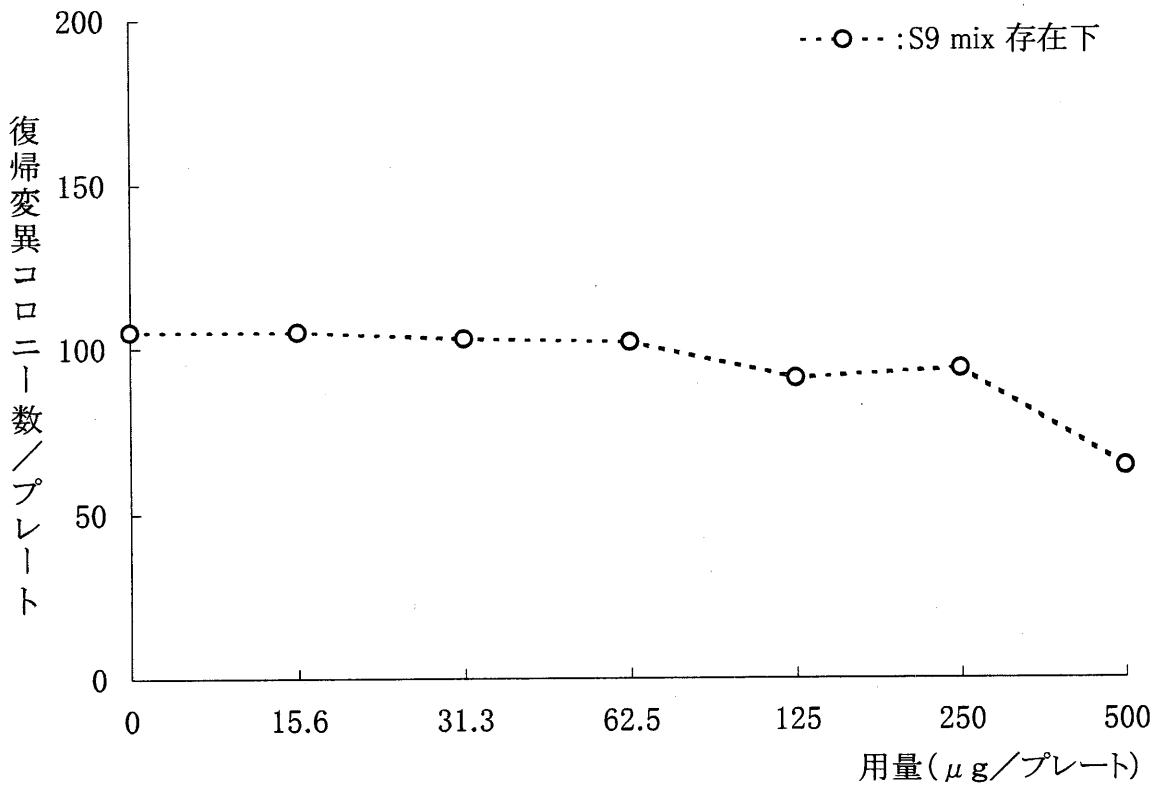
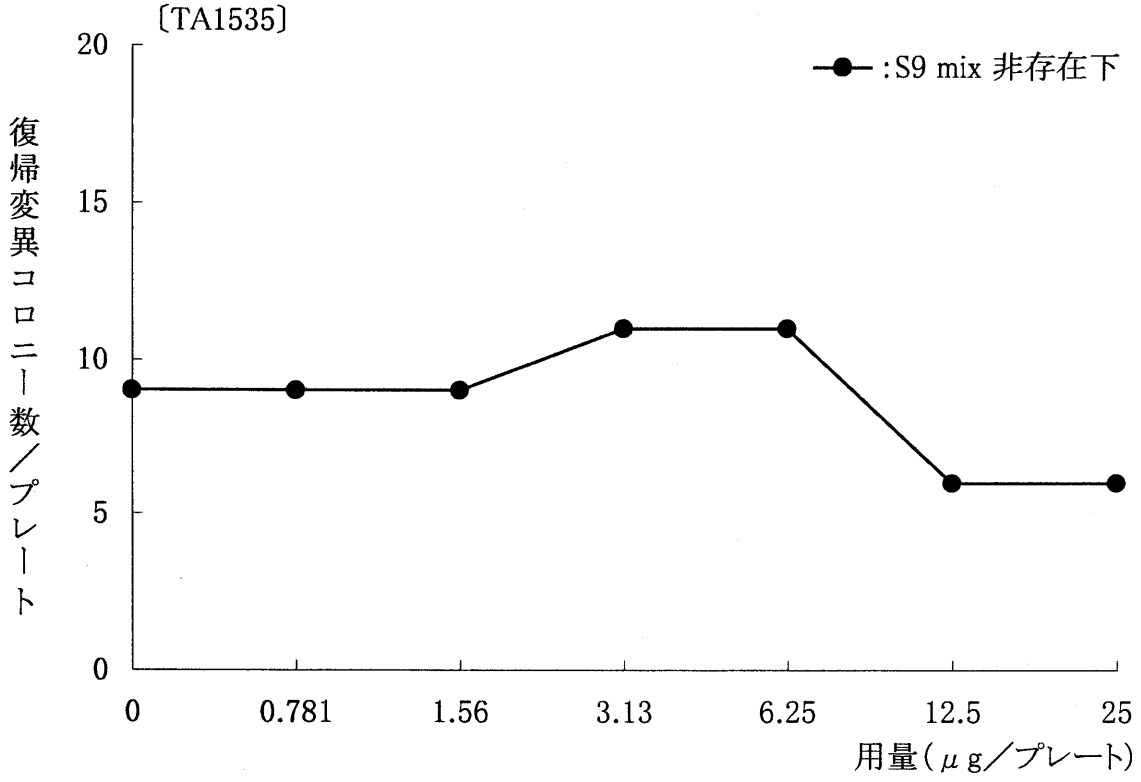



図 1－2　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



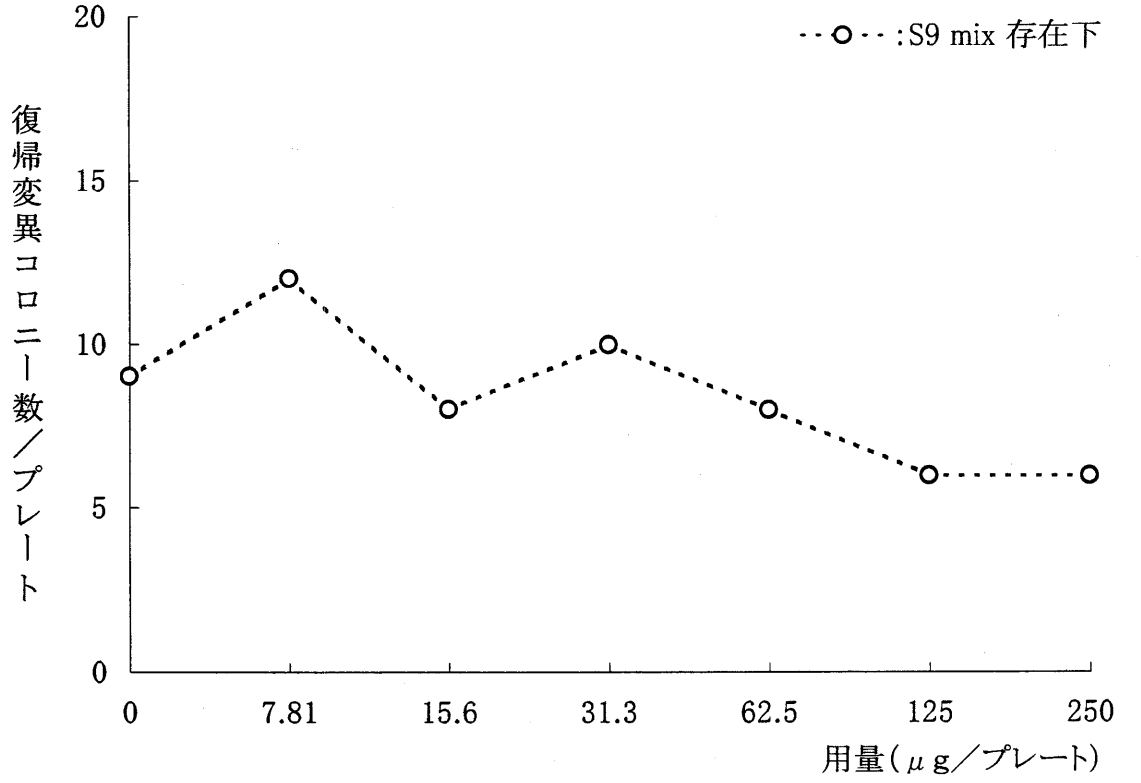
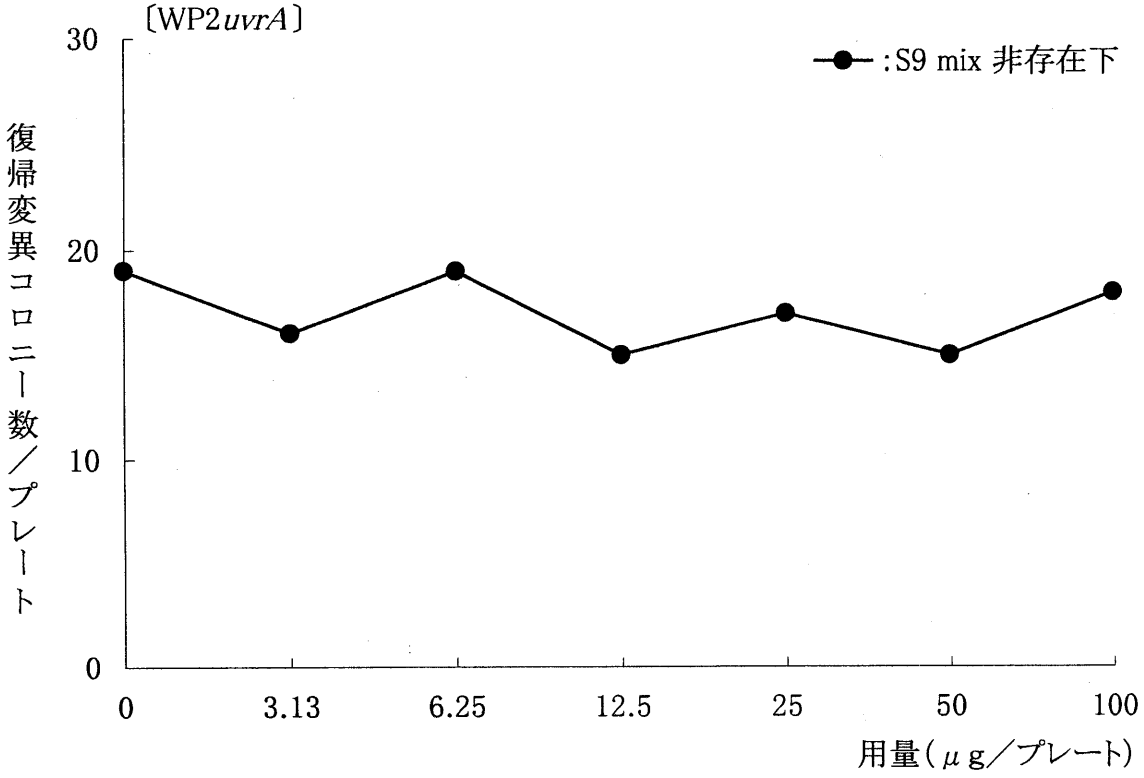



図 1－3　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



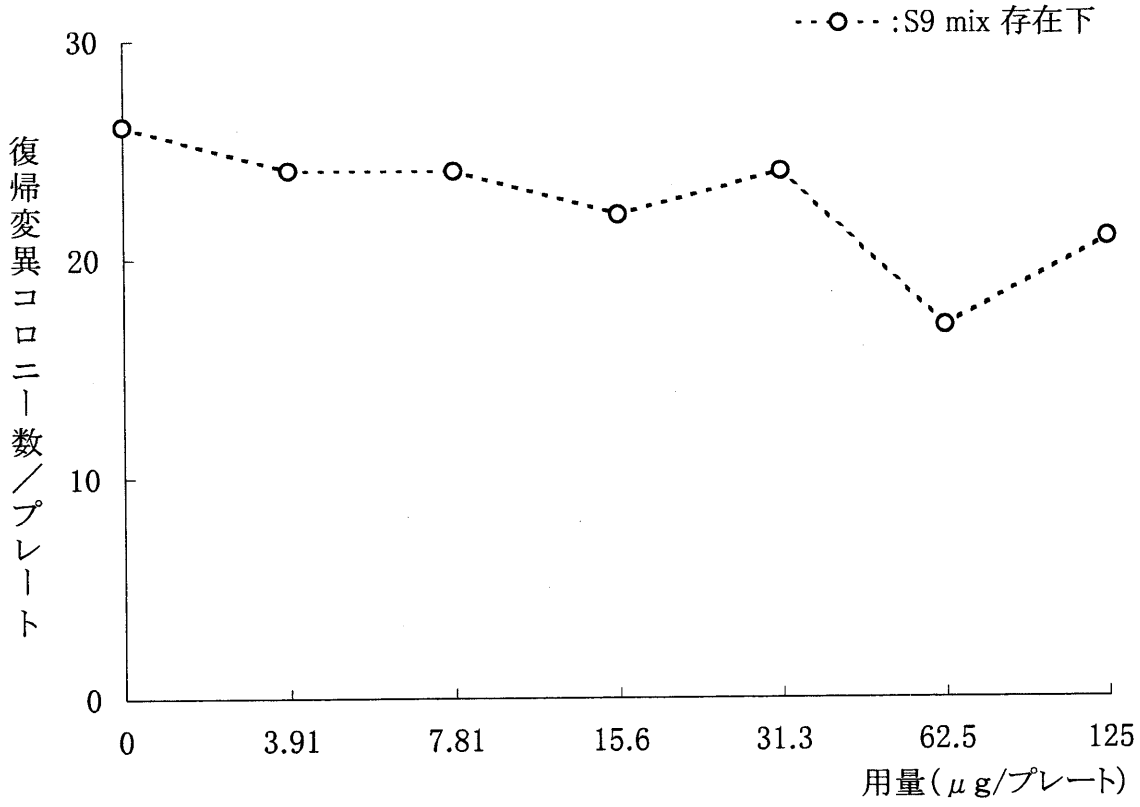
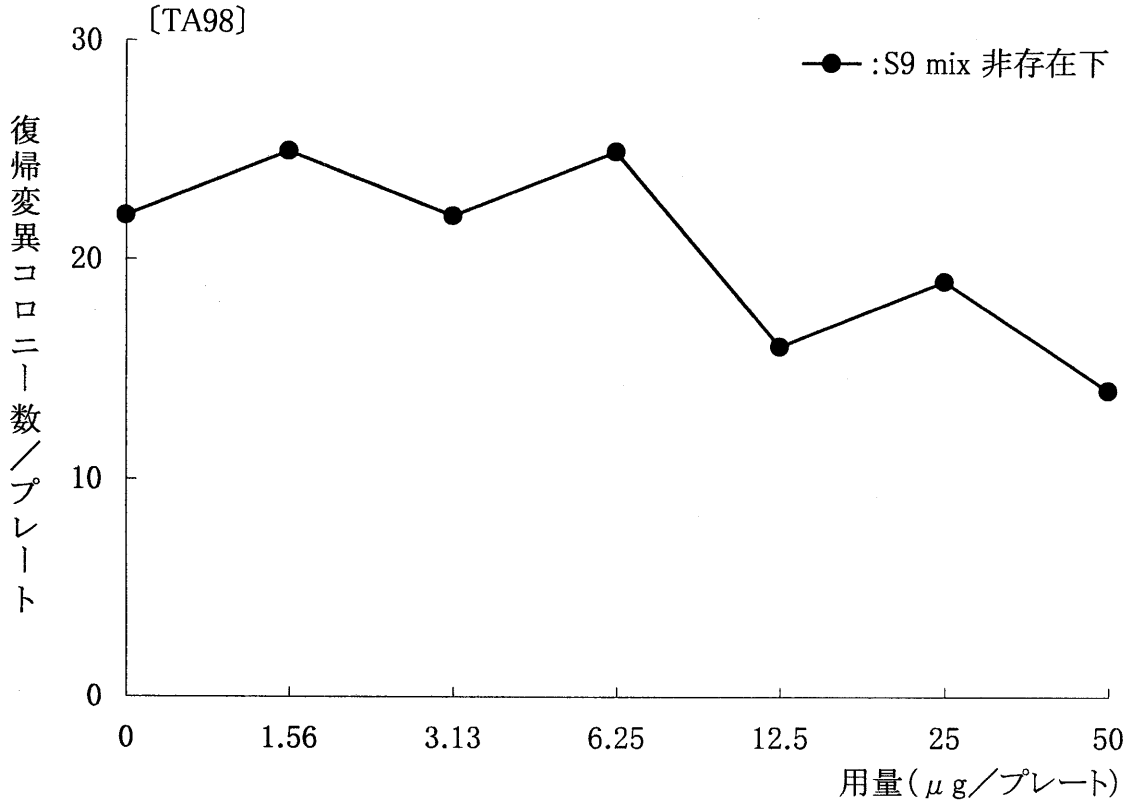



図 1－4　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



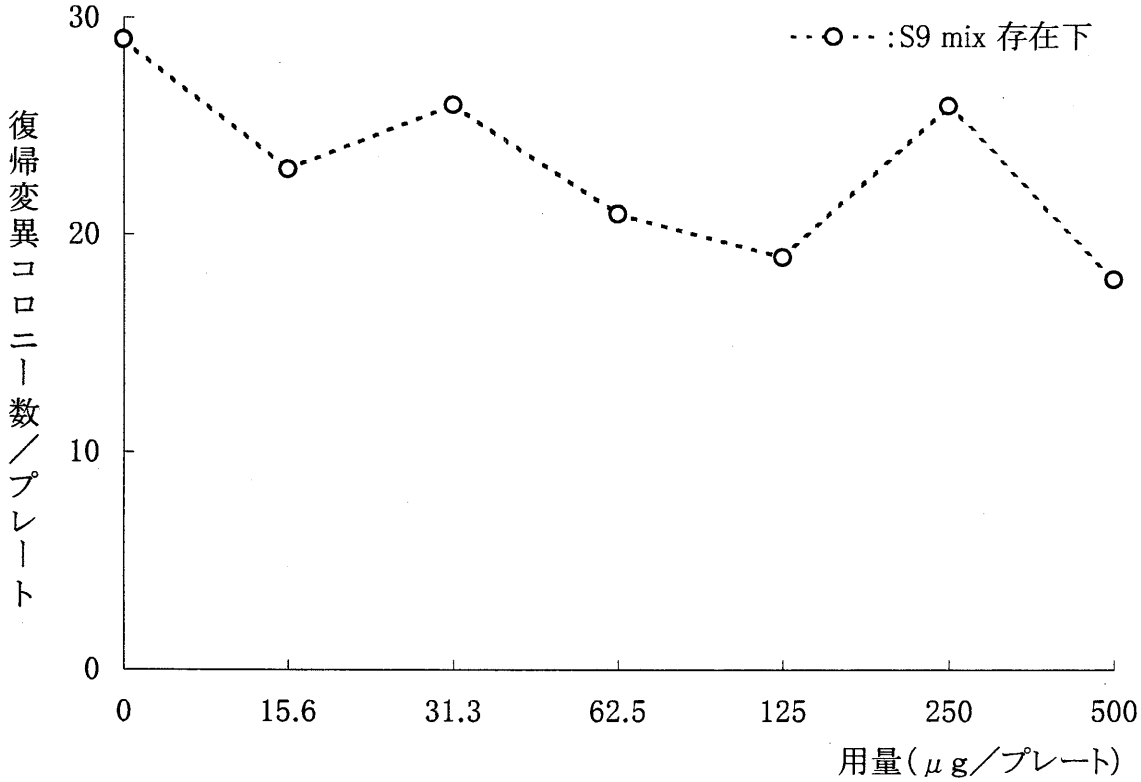
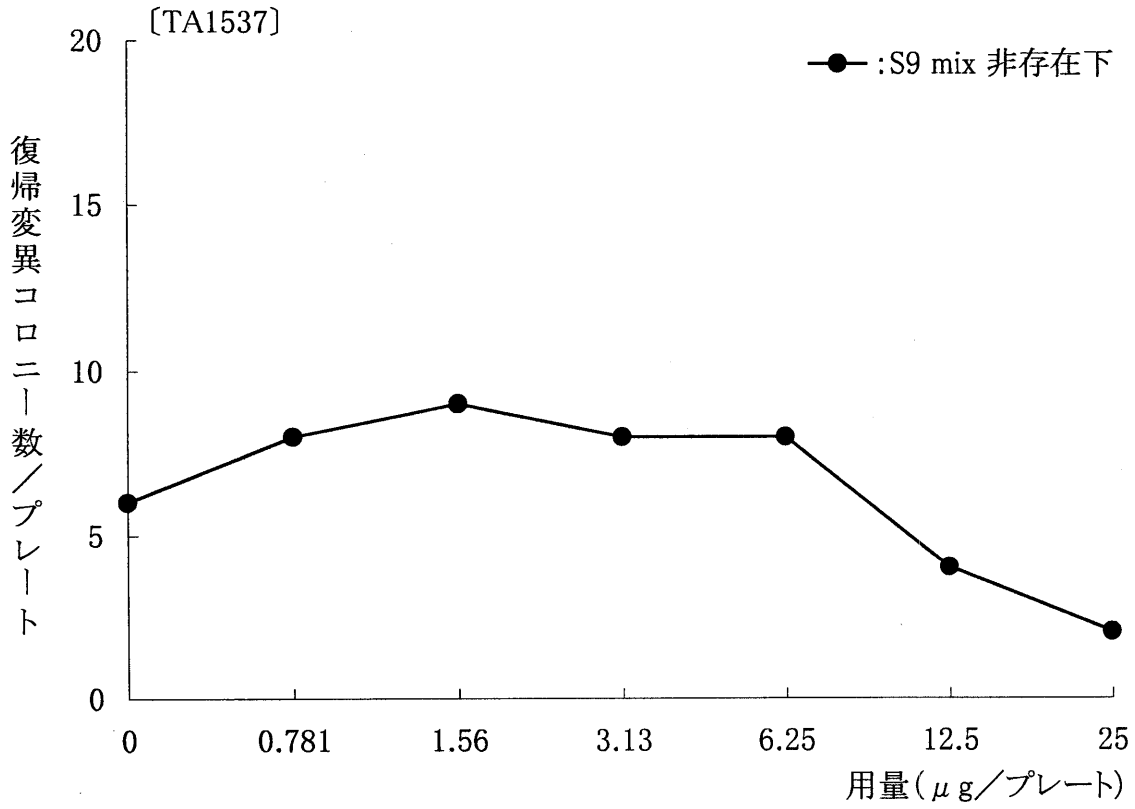



図 1－5　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



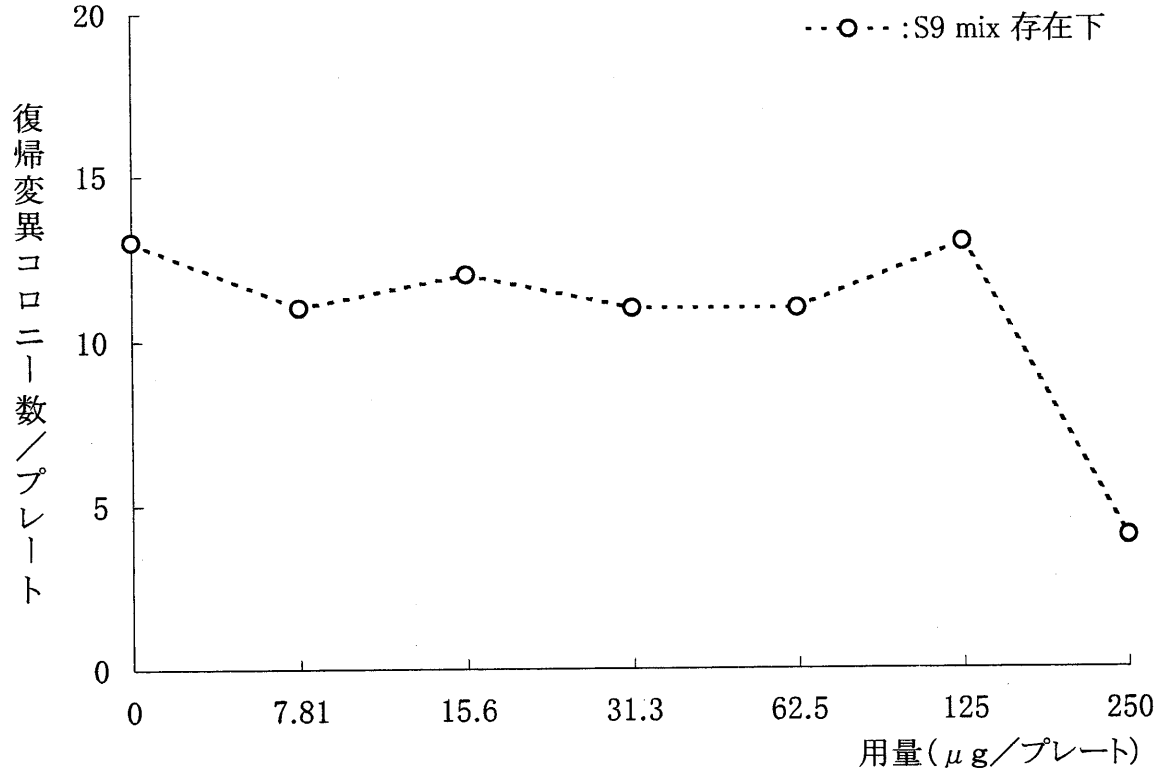
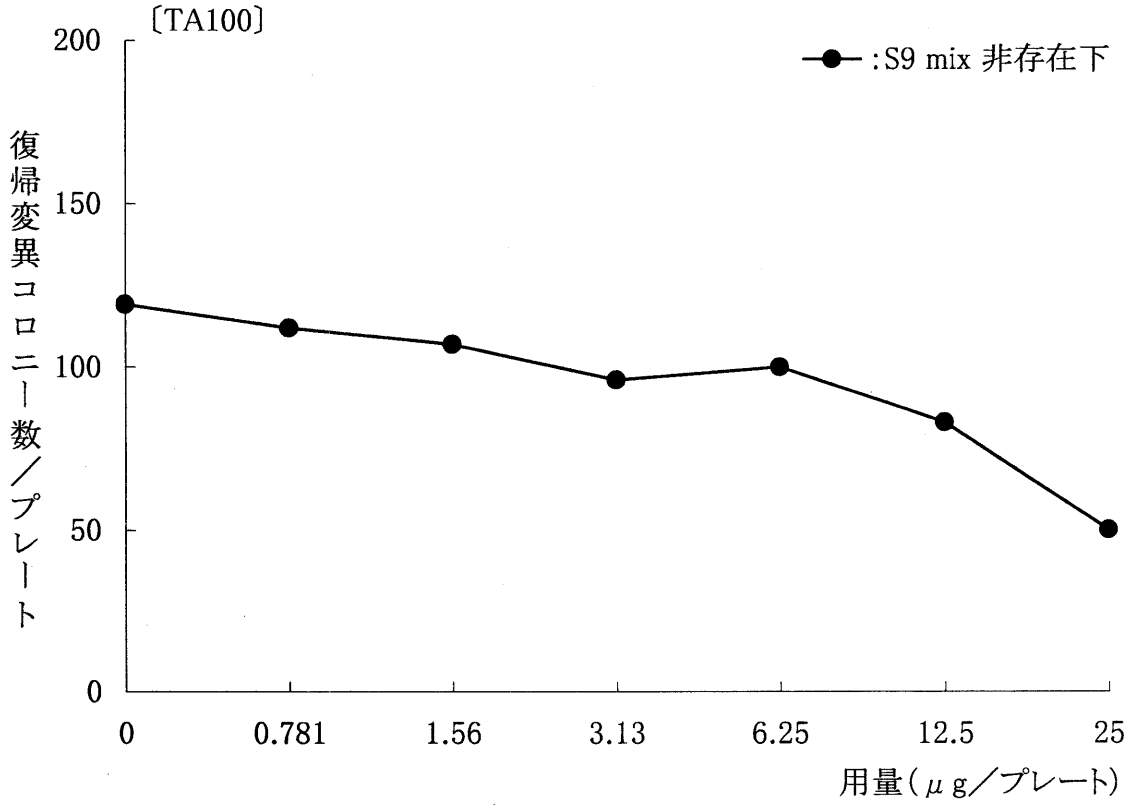



図 2－1　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験2回目



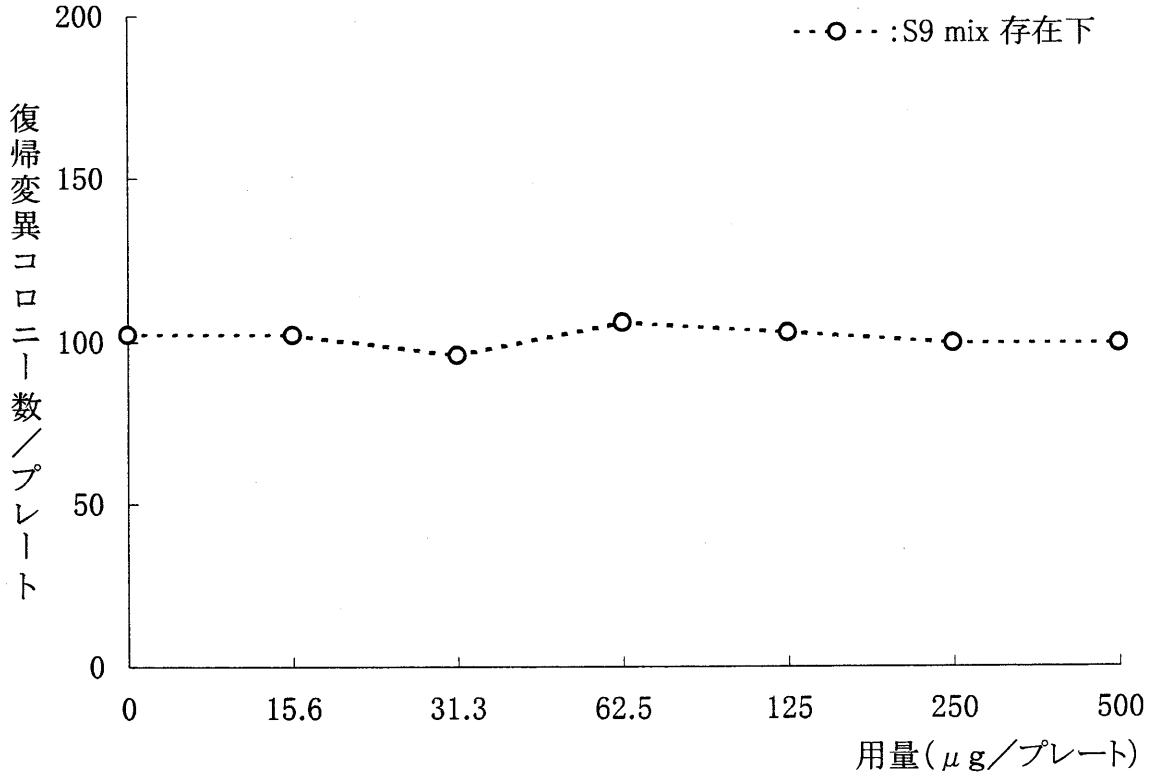
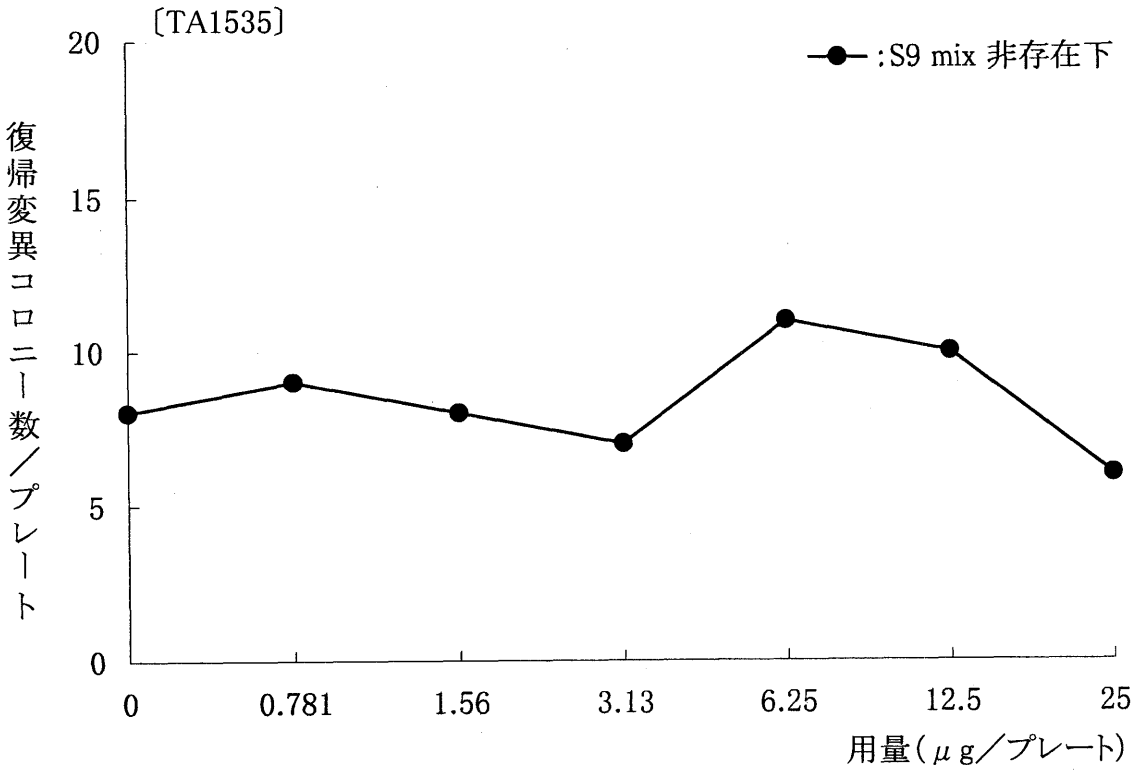



図 2－2　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験2回目



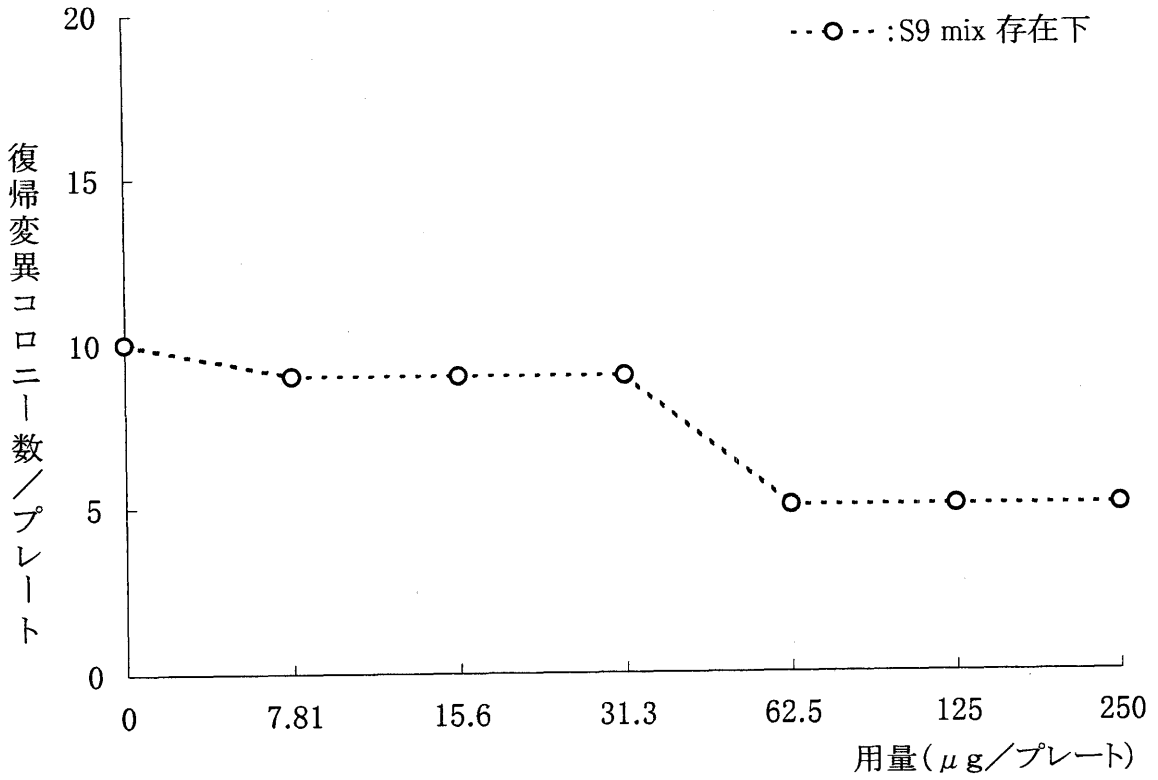
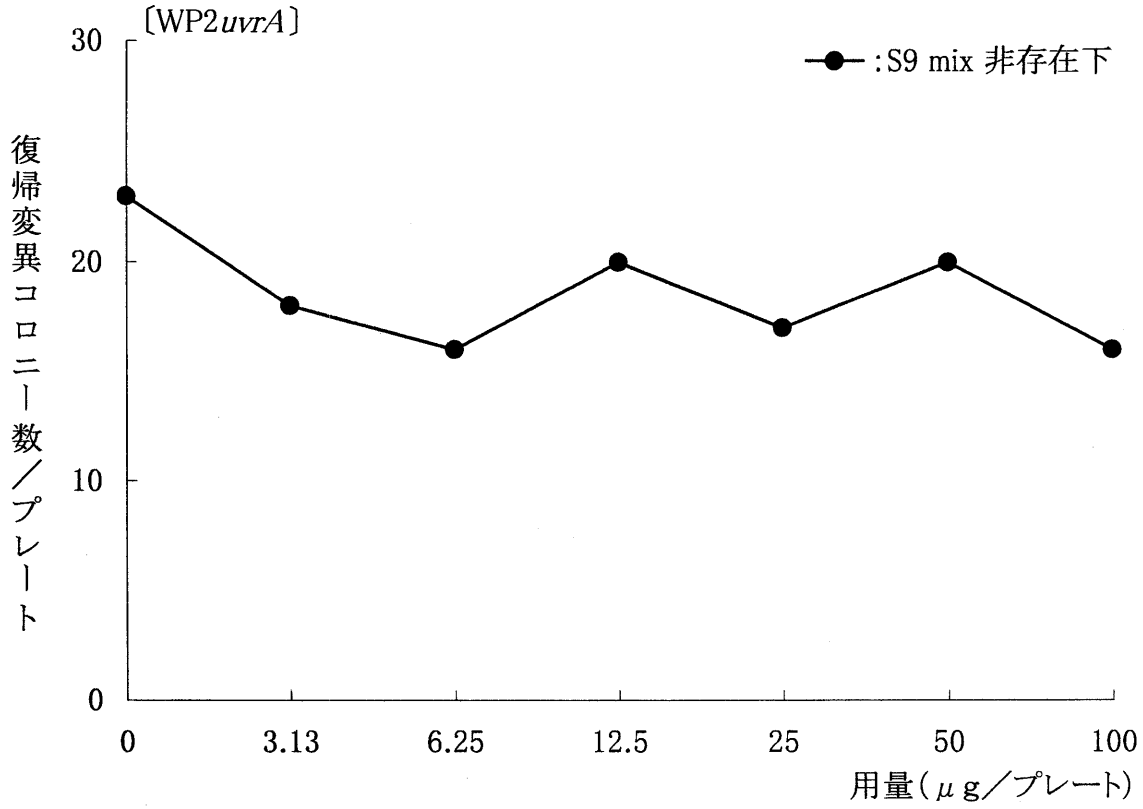



図 2－3　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験2回目



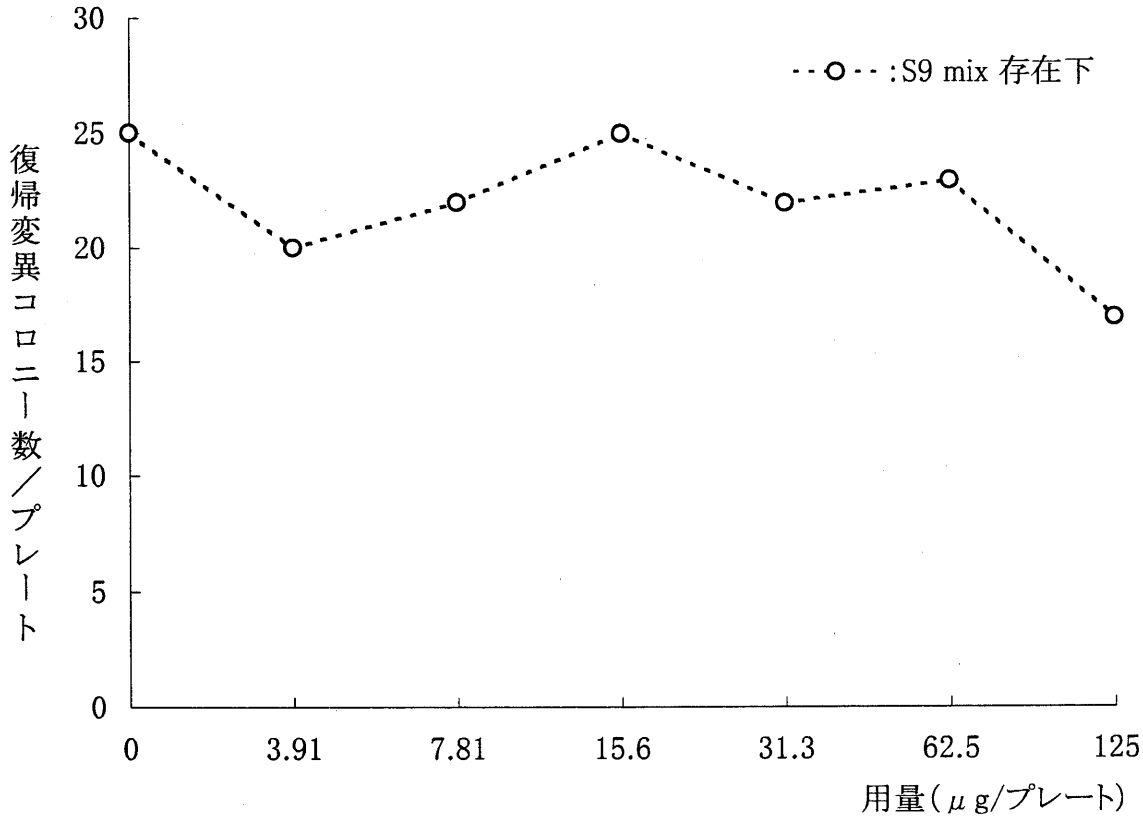
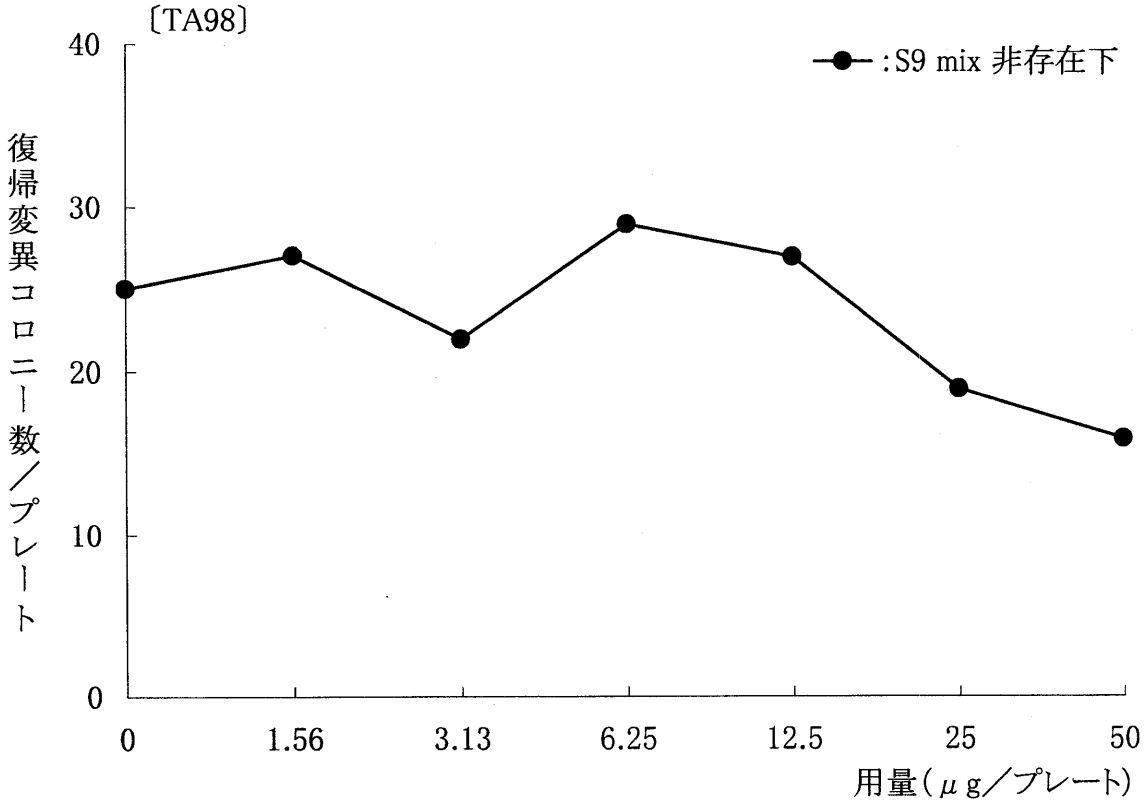



図 2－4　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験2回目



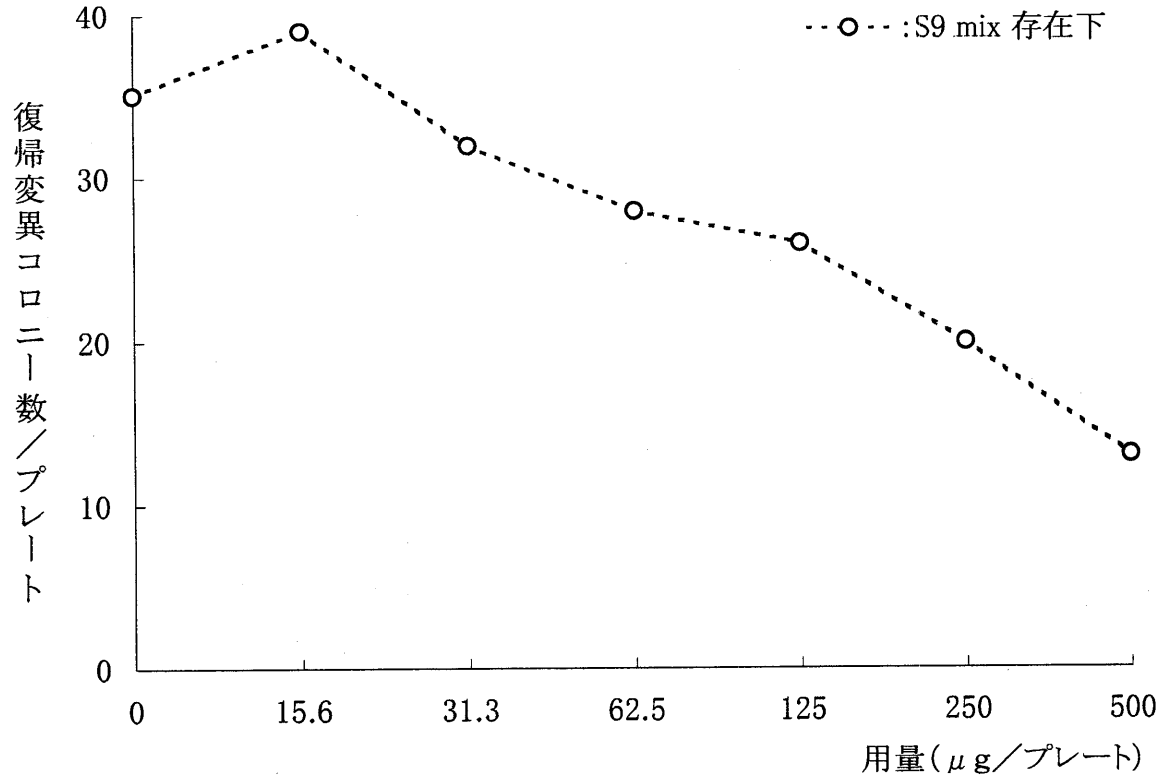
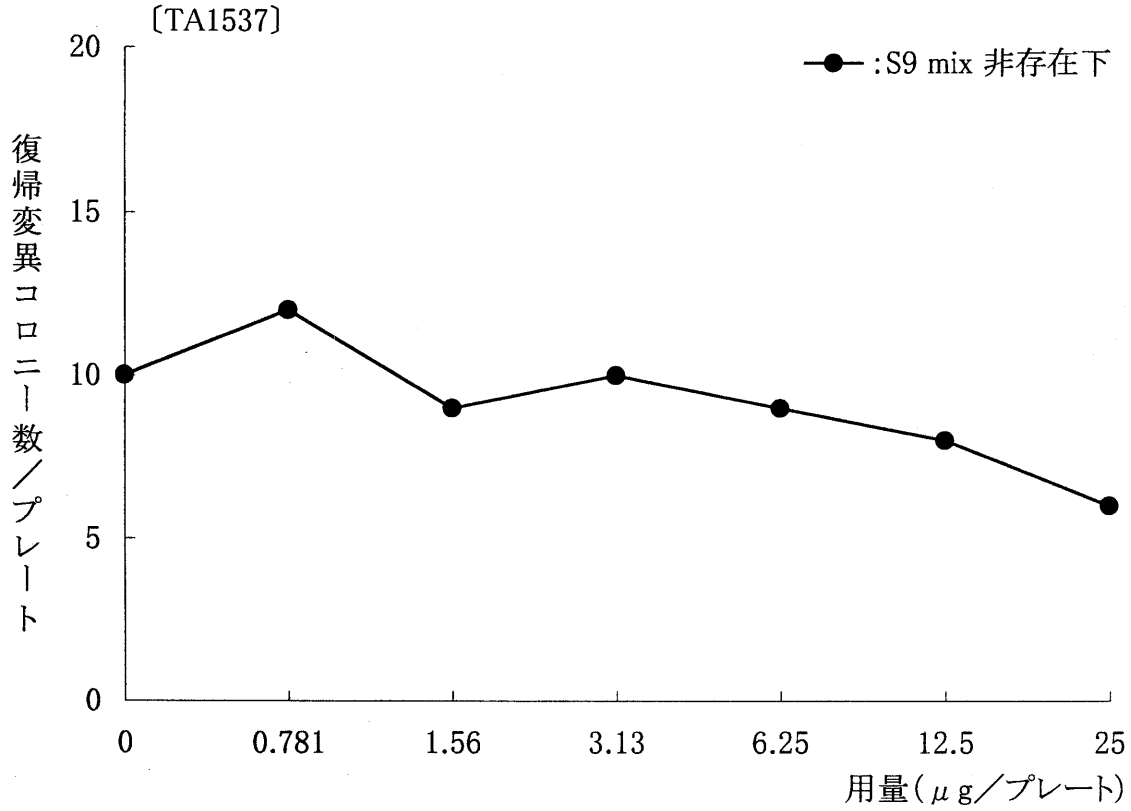
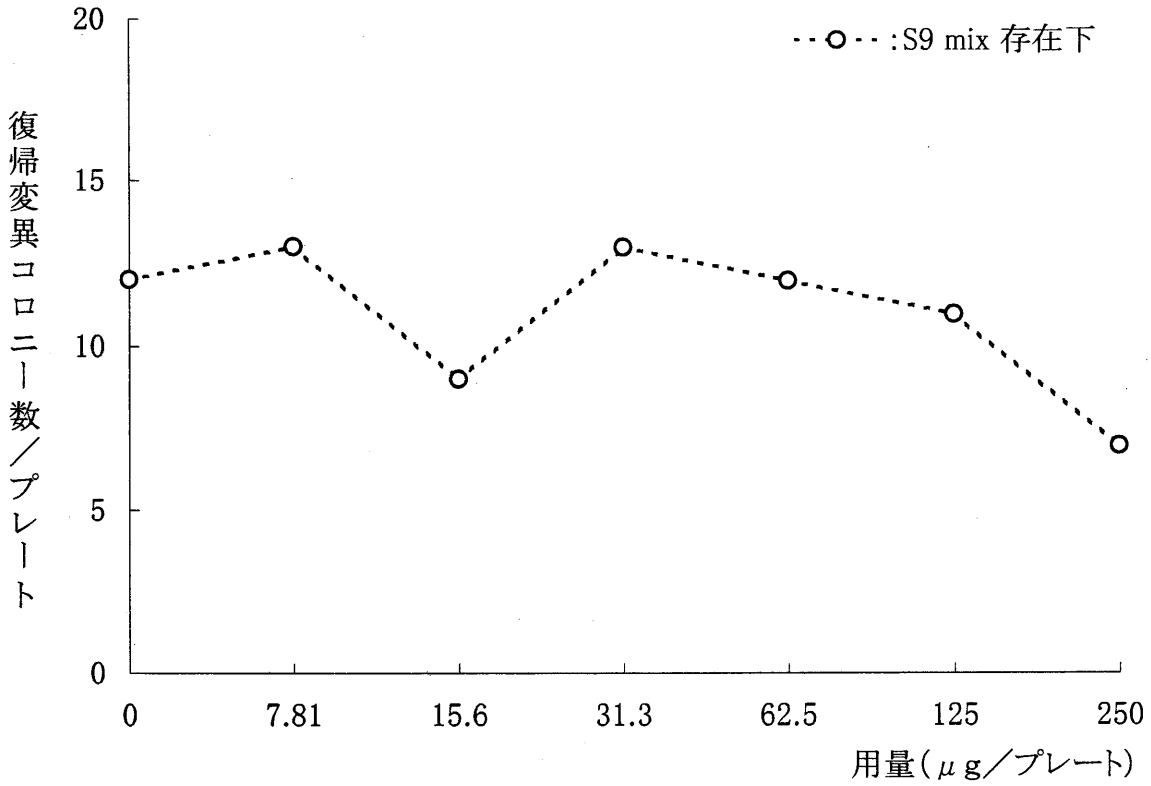




図 2－5　2,4-ジー*tert*－ブチルフェノールの復帰突然変異試験結果－本試験2回目