

最 終 報 告 書

2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの
細菌を用いる復帰突然変異試験
(試験番号 : 08-121-1)

目 次

要 約	1 頁
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	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	7
13. 結果の判定	8
結 果	9
結 論	9
文 献	9

表：

表 1-1 S9 mix 非存在下における 2,2', 6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'- メチレンジフェノールの用量設定試験結果 [直接法]	1
表 1-2 S9 mix 存在下における 2,2', 6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'- メチレンジフェノールの用量設定試験結果 [代謝活性化法]	2

表 2-1	S9 mix 非存在下における 2,2', 6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'-メチレン ジ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].....	3
表 2-2	S9 mix 存在下における 2,2', 6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'-メチレン ジ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]..	4
表 3-1	S9 mix 非存在下における 2,2', 6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'-メチレン ジ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].....	5
表 3-2	S9 mix 存在下における 2,2', 6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'-メチレン ジ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]..	6
図：		
図 1	2,2', 6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの復帰突然 変異試験結果－本試験 1 回目.....	7
図 2	2,2', 6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの復帰突然 変異試験結果－本試験 2 回目.....	10
添付資料	復帰変異コロニー数：背景データ	13

要 約

2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジ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、いずれの菌株とも生育阻害が認められなかったため、直接法および代謝活性化法ともに 156～5000 μ g/プレート（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も、いずれの菌株とも認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジ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。

目 的

この試験は、2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジ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

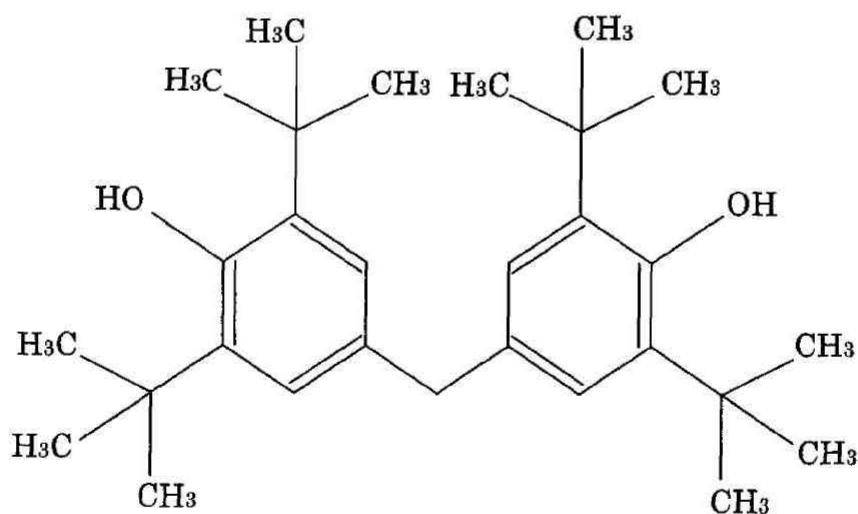
名 称 : 2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール
(英名 : 2,2', 6,6'-tetra-*tert*-butyl-4,4'-methylenediphenol)
別名 : 4,4'-メチレンビス(2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)、
Bis(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)methane、
Phenol, 4, 4'-methylenebis(2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-

CAS 番号 : 118-82-1

ロット番号 :

純 度 : 99.6% (GC 法、分析 : 東京化成工業株式会社)

構 造 式 :



分 子 式 : $C_{29}H_{44}O_2$

分 子 量 : 424.67

入 手 先 :

入手日・量 : 平成 20 年 12 月 9 日・20 g

物理化学的性状：

常温における性状 白色～うすい黄色の結晶性粉末

分子量 424.67

沸点 289℃

融点 155℃

溶解性 水：10 mg 以下/L (20℃)

オクタノール/水分配係数 6.24

安定性：安定〔実験終了後、(財) 畜産生物科学安全研究所において保管した残余被験物質を分析 (2010 年 5 月 18 日：東京化成工業株式会社、GC 法) した結果、純度は 99.6% 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 (2～6℃) で密栓

2. 指標菌株

指標菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部より入手 (平成 20 年 9 月 12 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 TSQ4946、100%) 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 μL をニュートリエントブロス (Bacto nutrient broth dehydrated、Difco Laboratories、ロット番号 6338974) 液体培地 15mL に接種し、 37°C で 10 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 ($\text{OD}_{660\text{nm}}$) を測定し、濁度と生菌数の換算式により 1 mL あたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数 ($\times 10^9/\text{mL}$)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
用量設定試験	1.99	2.40	1.88	1.95	1.39
本試験(1回目)	1.74	2.00	1.70	1.79	1.21
本試験(2回目)	1.95	2.35	1.88	2.03	1.46

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-603・2009 年 10 月 2 日製造・2009 年 11 月 6 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 あたりの組成は、以下のとおりである。

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: 193~226 g

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) 投与方法 (投与開始日起算)

1 日目: PB 30 mg/kg、2 日目: PB 60 mg/kg

3 日目: PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、4 日目: PB 60 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($9000 \times g$)し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

MgCl ₂	8	μ mol
KCl	33	μ mol
G-6-P	5	μ mol
NADH	4	μ mol
NADPH	4	μ mol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100	μ mol
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あり、予備的検討の結果、ジメチルスルホキシド (DMSO) に不溶、アセトンに 200 mg/mL まで可溶であったことから、溶媒にはアセトン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 DPJ7275、100%) 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作製した。

7. 陰性対照および陽性対照

陰性対照 (溶媒対照) には、被験物質用の溶媒であるアセトンを用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2 および 2-AA は DMSO (和光純薬工業株式会社、ロット番号 TSQ4946、100%) 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 K8A90、局方) に溶解した。

指標菌株	直接法 (μ g/プレート)	代謝活性化法 (μ g/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 EWL3616)

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)

8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6 w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories、ロット番号 8107256) および 0.5 w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、ロット番号 8251) 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 AASXB) 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 EWP0420) 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、20～5000 μ g/プレート の範囲で用量を設定し、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 (表 1-1、1-2)、直接法および代謝活性化法のいずれ場合も、全ての菌株で菌の生育阻害は認められなかった。なお、200 μ g/プレート以上で、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる析出が認められた。

10. 本試験

本試験は、同一菌株、同一用量で 2 回行った。

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のいずれの場合も、5000 μ g/プレートを最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156 μ g/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)

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.05 mL、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 WAF3531、リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723) および前培養した懸濁菌液 0.1 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。最少グルコース寒天平板培地（プレート）（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 ANI600IY・2009 年 9 月 1 日製造・2009 年 11 月 10 日購入）は、Vogel-Bonner E 培地（0.2 w/v%クエン酸・一水塩、1 w/v%リン酸二カリウム・無水塩、0.192 w/v%リン酸一アンモニウム、0.066 w/v%水酸化ナトリウム、0.02 w/v%硫酸マグネシウム・七水塩）に寒天粉末 1.5 w/v%およびグルコース 2 w/v%を含み、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 0.05 mL にかわり、溶媒（アセトン）0.05 mL 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) プレインキューベーション法（代謝活性化法）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.05 mL、S9 mix 0.5 mL および前培養した懸濁菌液 0.1 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 0.05 mL にかわり、溶媒（アセトン）0.05 mL 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（アセトン）、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 w/v%軟寒天培地 2 mL を加え、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 ANI600IY）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、試験は有効であると判定した。

(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、当研究所における陽性対照値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2-1、2-2、3-1、3-2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倍を超えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法および代謝活性化法のいずれの場合にも認められなかった。なお、156 μ g/プレート以上の全ての用量で、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる析出が認められた。

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た。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ(添付資料)の範囲内またはその近くの陽性値を示すものであった。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。

結 論

2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールについて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、全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2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの変異原性について、*Salmonella typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102 および *Escherichia coli* WP2/pKM101 を用いた復帰突然変異試験⁹⁾で陰性との報告がある。

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., Nicols, W. and Ramel, C., Elsevier,

Amsterdam, New York, Oxford, pp. 161-187.

- 3) 蜂谷紀之, 滝澤行雄. プラスチック添加剤の変異原性試験. 変異原性試験, 3(3):147-154, 1994.

表 1-1 S9 mix 非存在下における2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの
用量設定試験結果〔直接法〕

用 量 〔 μ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔アセトン〕	135	8	17	31	17
20	101	12	24	34	26
50	135	5	13	28	23
100	131	9	22	28	24
200 #	139	5	18	32	29
500 #	136	4	12	27	34
1000 #	114	3	12	28	17
2000 #	129	3	14	34	18
5000 #	117	10	19	25	22
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ 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	428	374	521	294	555

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる析出が認められた。

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2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの
用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用 量 〔 μ 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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
陰性対照〔アセトン〕	108	8	22	32	11
20	143	8	17	29	9
50	135	9	27	21	13
100	103	14	28	28	13
200 #	128	7	18	35	6
500 #	119	10	12	28	7
1000 #	103	9	28	34	7
2000 #	83	7	17	15	7
5000 #	86	5	10	20	3
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 /プレート	399	131	407	253	83

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる析出が認められた。

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2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの
復帰突然変異試験結果〔本試験1回目－直接法〕

用 量 〔 μ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	87	6	23	27	9
[アセトン]	100	7	24	25	10
	107	3	20	34	10
	(98 $\pm$ 10)	(5 $\pm$ 2)	(22 $\pm$ 2)	(29 $\pm$ 5)	(10 $\pm$ 1)
156 #	95	2	24	31	4
	98	11	13	35	9
	97	5	19	35	5
	(97 $\pm$ 2)	(6 $\pm$ 5)	(19 $\pm$ 6)	(34 $\pm$ 2)	(6 $\pm$ 3)
313 #	111	5	22	27	9
	86	4	18	20	8
	110	8	14	23	5
	(102 $\pm$ 14)	(6 $\pm$ 2)	(18 $\pm$ 4)	(23 $\pm$ 4)	(7 $\pm$ 2)
625 #	101	4	17	13	6
	88	3	13	21	9
	88	6	16	20	6
	(92 $\pm$ 8)	(4 $\pm$ 2)	(15 $\pm$ 2)	(18 $\pm$ 4)	(7 $\pm$ 2)
1250 #	74	4	13	21	6
	89	3	14	19	10
	78	6	18	22	4
	(80 $\pm$ 8)	(4 $\pm$ 2)	(15 $\pm$ 3)	(21 $\pm$ 2)	(7 $\pm$ 3)
2500 #	76	9	12	19	8
	75	6	22	16	5
	93	5	16	15	10
	(81 $\pm$ 10)	(7 $\pm$ 2)	(17 $\pm$ 5)	(17 $\pm$ 2)	(8 $\pm$ 3)
5000 #	86	4	17	24	11
	91	5	15	23	9
	94	3	10	19	7
	(90 $\pm$ 4)	(4 $\pm$ 1)	(14 $\pm$ 4)	(22 $\pm$ 3)	(9 $\pm$ 2)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	626	247	675	382	440
コロニー数	746	286	712	483	309
/プレート	761	299	705	487	512
	(711 $\pm$ 74)	(277 $\pm$ 27)	(697 $\pm$ 20)	(451 $\pm$ 60)	(420 $\pm$ 103)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる析出が認められた。

() : 平均値 $\pm$ 標準偏差

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2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの
 復帰突然変異試験結果〔本試験1回目－代謝活性化法〕

用 量 〔 μ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	88	11	27	27	5
〔アセトン〕	84	8	22	41	9
	93	9	21	26	11
	(88 $\pm$ 5)	(9 $\pm$ 2)	(23 $\pm$ 3)	(31 $\pm$ 8)	(8 $\pm$ 3)
156 #	142	3	16	43	9
	109	7	23	29	10
	114	12	24	44	9
	(122 $\pm$ 18)	(7 $\pm$ 5)	(21 $\pm$ 4)	(39 $\pm$ 8)	(9 $\pm$ 1)
313 #	107	10	28	38	8
	108	6	19	33	9
	84	4	29	28	12
	(100 $\pm$ 14)	(7 $\pm$ 3)	(25 $\pm$ 6)	(33 $\pm$ 5)	(10 $\pm$ 2)
625 #	114	11	21	26	12
	105	2	29	30	6
	124	6	18	24	10
	(114 $\pm$ 10)	(6 $\pm$ 5)	(23 $\pm$ 6)	(27 $\pm$ 3)	(9 $\pm$ 3)
1250 #	87	16	20	29	12
	90	10	17	36	9
	83	11	21	27	6
	(87 $\pm$ 4)	(12 $\pm$ 3)	(19 $\pm$ 2)	(31 $\pm$ 5)	(9 $\pm$ 3)
2500 #	84	13	24	20	11
	116	7	26	21	5
	96	7	25	19	9
	(99 $\pm$ 16)	(9 $\pm$ 3)	(25 $\pm$ 1)	(20 $\pm$ 1)	(8 $\pm$ 3)
5000 #	82	8	27	17	4
	103	4	18	28	3
	104	14	20	22	6
	(96 $\pm$ 12)	(9 $\pm$ 5)	(22 $\pm$ 5)	(22 $\pm$ 6)	(4 $\pm$ 2)
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	446	221	444	258	118
コロニー数	439	204	465	234	107
/プレート	344	231	410	238	83
	(410 $\pm$ 57)	(219 $\pm$ 14)	(440 $\pm$ 28)	(243 $\pm$ 13)	(103 $\pm$ 18)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる析出が認められた。

() : 平均値 $\pm$ 標準偏差

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 3-1

S9 mix 非存在下における2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの
復帰突然変異試験結果〔本試験2回目－直接法〕

用 量 〔 μ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	104	11	14	30	12
〔アセトン〕	102	12	22	32	16
	101	5	18	23	11
	(102 $\pm$ 2)	(9 $\pm$ 4)	(18 $\pm$ 4)	(28 $\pm$ 5)	(13 $\pm$ 3)
156 #	109	7	20	31	10
	120	12	16	25	22
	125	7	20	28	10
	(118 $\pm$ 8)	(9 $\pm$ 3)	(19 $\pm$ 2)	(28 $\pm$ 3)	(14 $\pm$ 7)
313 #	115	6	16	27	17
	119	6	17	25	14
	111	6	23	46	15
	(115 $\pm$ 4)	(6 $\pm$ 0)	(19 $\pm$ 4)	(33 $\pm$ 12)	(15 $\pm$ 2)
625 #	115	4	20	21	25
	111	8	17	46	15
	101	11	11	40	13
	(109 $\pm$ 7)	(8 $\pm$ 4)	(16 $\pm$ 5)	(36 $\pm$ 13)	(18 $\pm$ 6)
1250 #	116	8	11	33	12
	110	6	16	30	16
	103	11	17	30	12
	(110 $\pm$ 7)	(8 $\pm$ 3)	(15 $\pm$ 3)	(31 $\pm$ 2)	(13 $\pm$ 2)
2500 #	107	12	16	30	15
	98	10	14	32	14
	98	13	20	31	17
	(101 $\pm$ 5)	(12 $\pm$ 2)	(17 $\pm$ 3)	(31 $\pm$ 1)	(15 $\pm$ 2)
5000 #	77	7	15	26	16
	97	9	21	40	23
	120	7	18	30	19
	(98 $\pm$ 22)	(8 $\pm$ 1)	(18 $\pm$ 3)	(32 $\pm$ 7)	(19 $\pm$ 4)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	773	247	737	530	816
コロニー数	785	253	721	513	582
/プレート	713	204	798	465	648
	(757 $\pm$ 39)	(235 $\pm$ 27)	(752 $\pm$ 41)	(503 $\pm$ 34)	(682 $\pm$ 121)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる析出が認められた。

() : 平均値 $\pm$ 標準偏差

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 3-2

S9 mix 存在下における2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの
 復帰突然変異試験結果〔本試験2回目－代謝活性化法〕

用 量 〔 μ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	124	10	15	40	10
〔アセトン〕	110	13	16	38	9
	120	6	24	44	12
	(118 $\pm$ 7)	(10 $\pm$ 4)	(18 $\pm$ 5)	(41 $\pm$ 3)	(10 $\pm$ 2)
156 #	148	7	14	36	4
	119	6	16	35	5
	113	9	22	33	14
	(127 $\pm$ 19)	(7 $\pm$ 2)	(17 $\pm$ 4)	(35 $\pm$ 2)	(8 $\pm$ 6)
313 #	107	12	24	32	7
	126	16	24	30	5
	100	16	19	35	18
	(111 $\pm$ 13)	(15 $\pm$ 2)	(22 $\pm$ 3)	(32 $\pm$ 3)	(10 $\pm$ 7)
625 #	117	13	17	35	14
	121	15	25	37	6
	85	13	21	39	13
	(108 $\pm$ 20)	(14 $\pm$ 1)	(21 $\pm$ 4)	(37 $\pm$ 2)	(11 $\pm$ 4)
1250 #	96	16	22	38	10
	128	10	20	39	15
	121	13	19	36	10
	(115 $\pm$ 17)	(13 $\pm$ 3)	(20 $\pm$ 2)	(38 $\pm$ 2)	(12 $\pm$ 3)
2500 #	117	15	13	24	9
	122	8	17	27	11
	115	8	14	27	10
	(118 $\pm$ 4)	(10 $\pm$ 4)	(15 $\pm$ 2)	(26 $\pm$ 2)	(10 $\pm$ 1)
5000 #	119	6	18	18	11
	127	9	19	24	8
	158	5	18	38	11
	(135 $\pm$ 21)	(7 $\pm$ 2)	(18 $\pm$ 1)	(27 $\pm$ 10)	(10 $\pm$ 2)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	510	256	395	246	97
コロニー数	544	243	441	263	90
/プレート	369	248	435	282	95
	(474 $\pm$ 93)	(249 $\pm$ 7)	(424 $\pm$ 25)	(264 $\pm$ 18)	(94 $\pm$ 4)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる析出が認められた。

() : 平均値 $\pm$ 標準偏差

2-AA : 2-アミノアントラセン

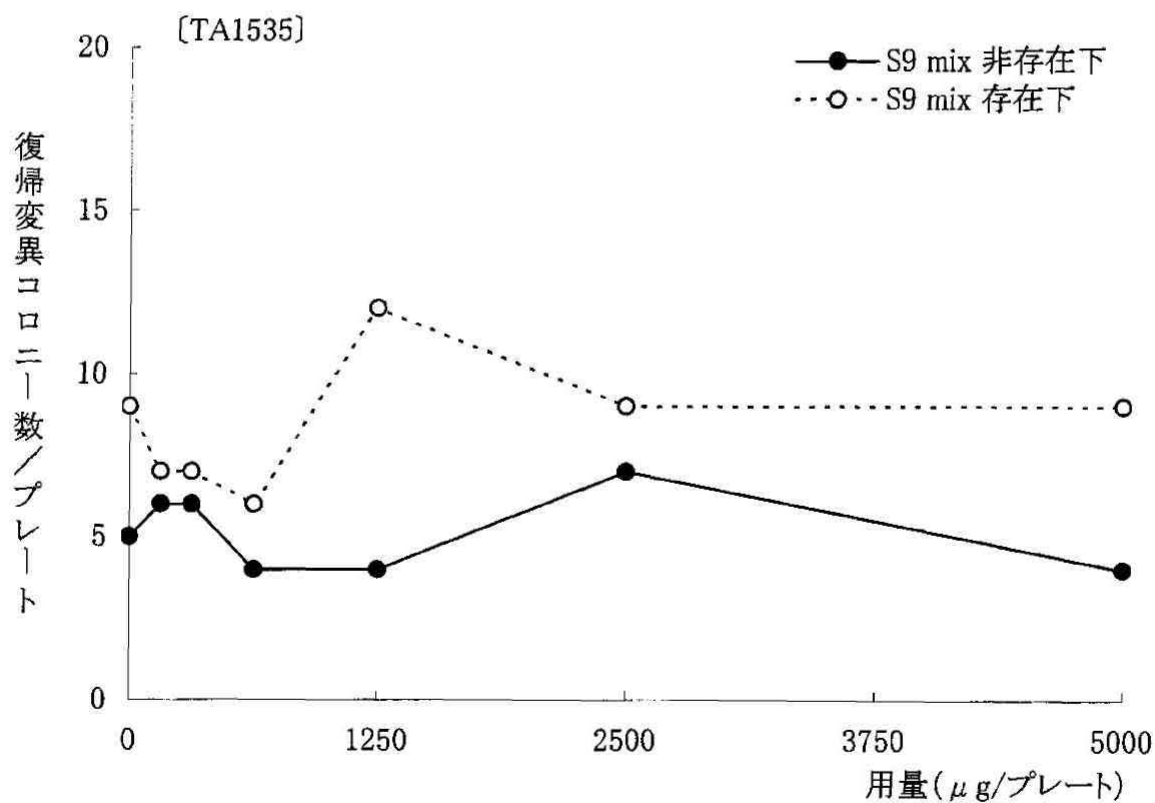
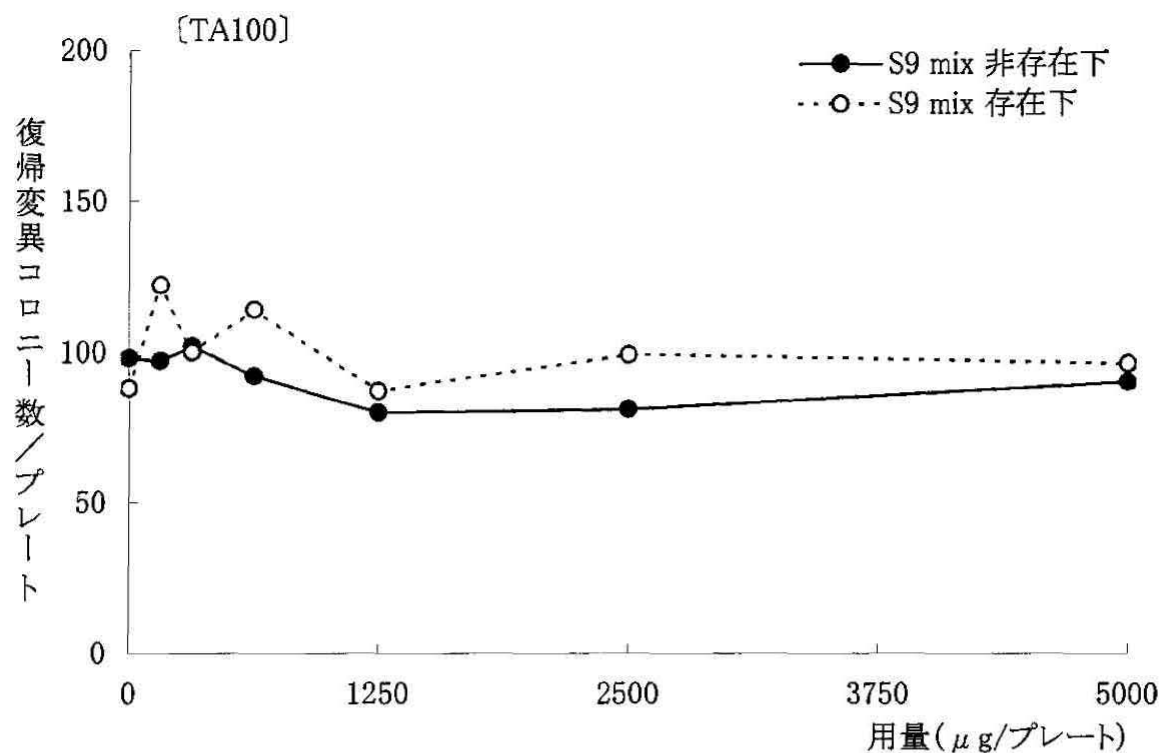


図 1-1 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

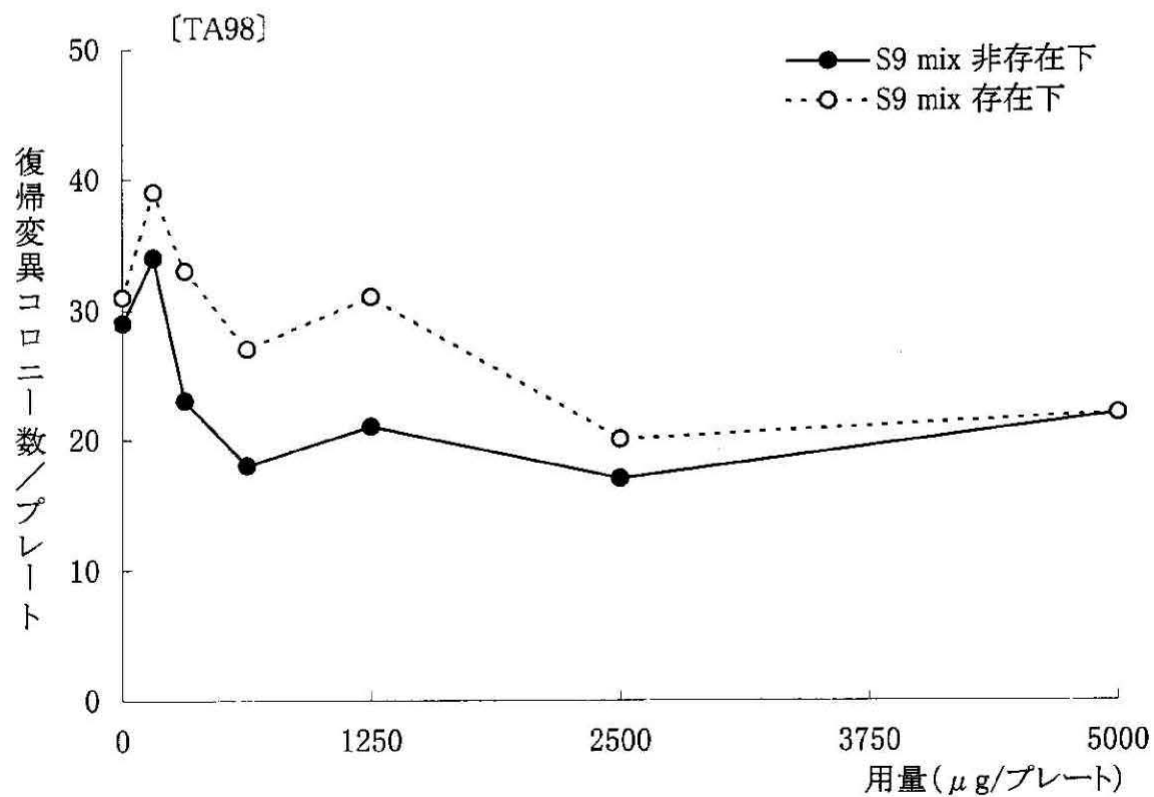
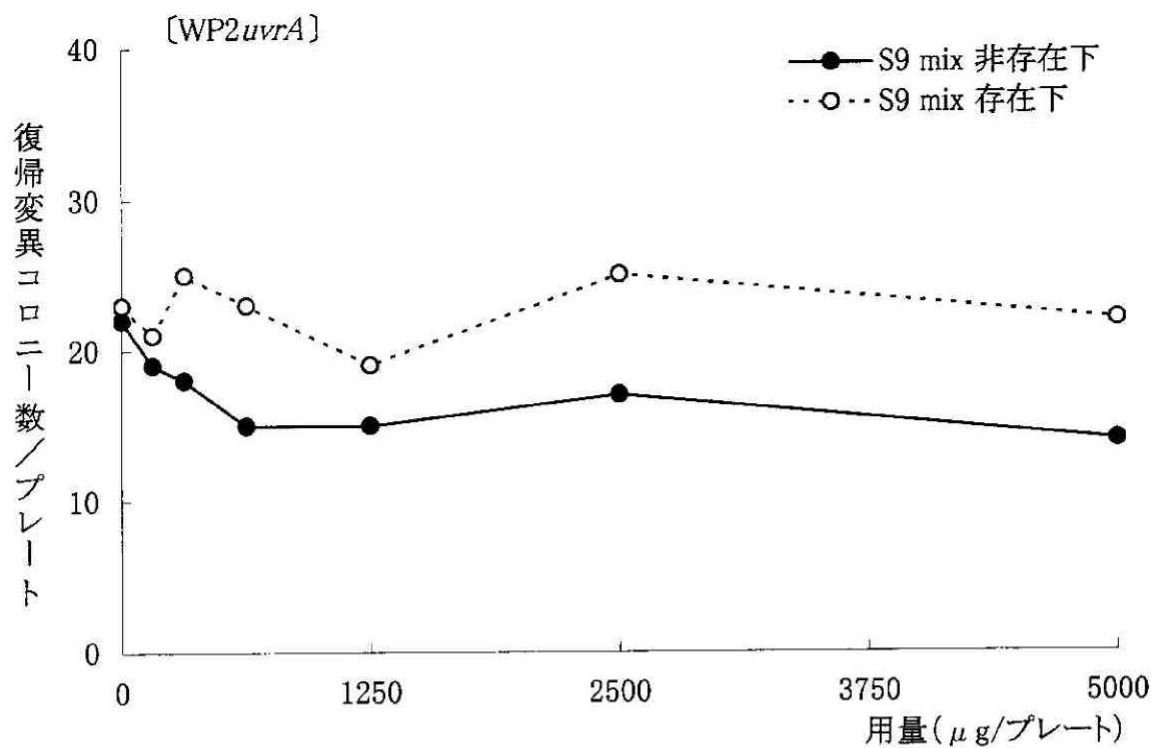


図 1-2 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

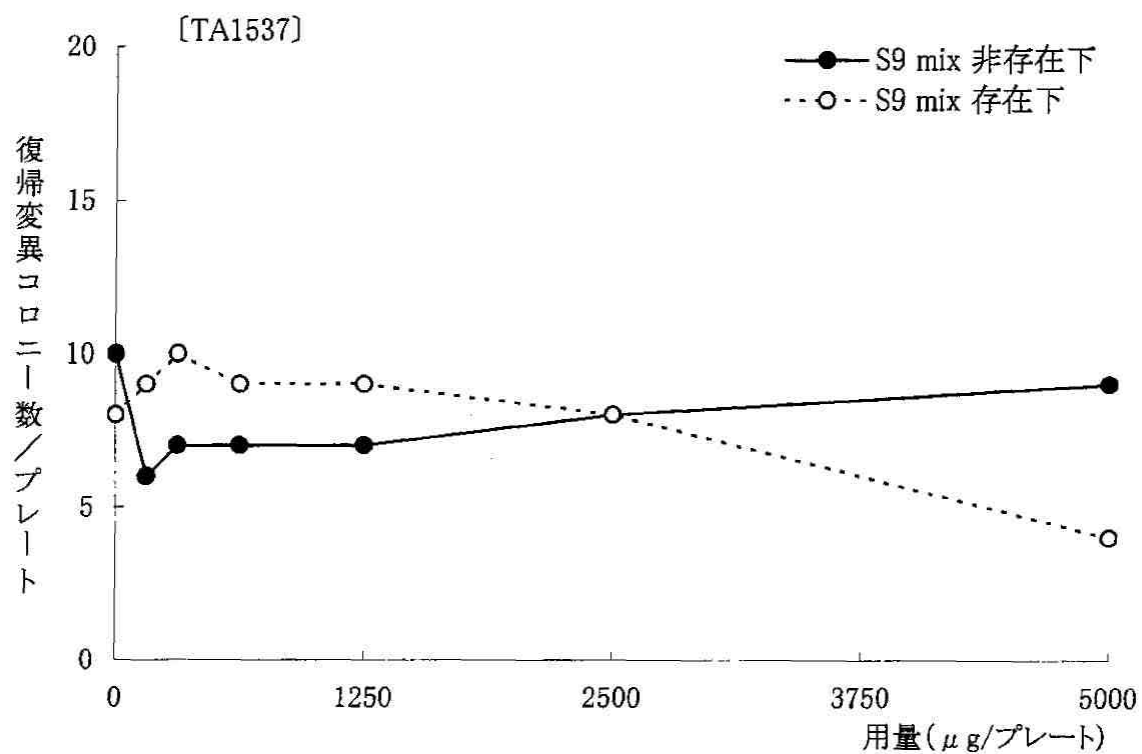


図 1-3 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

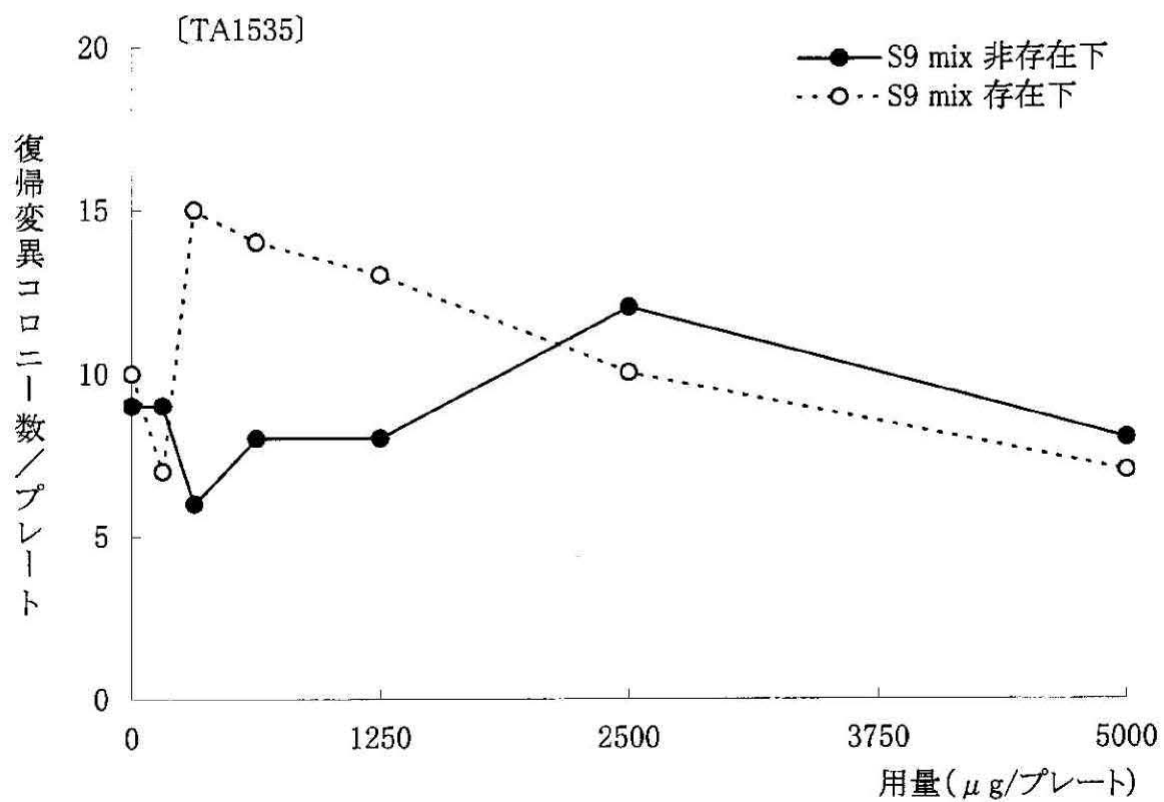
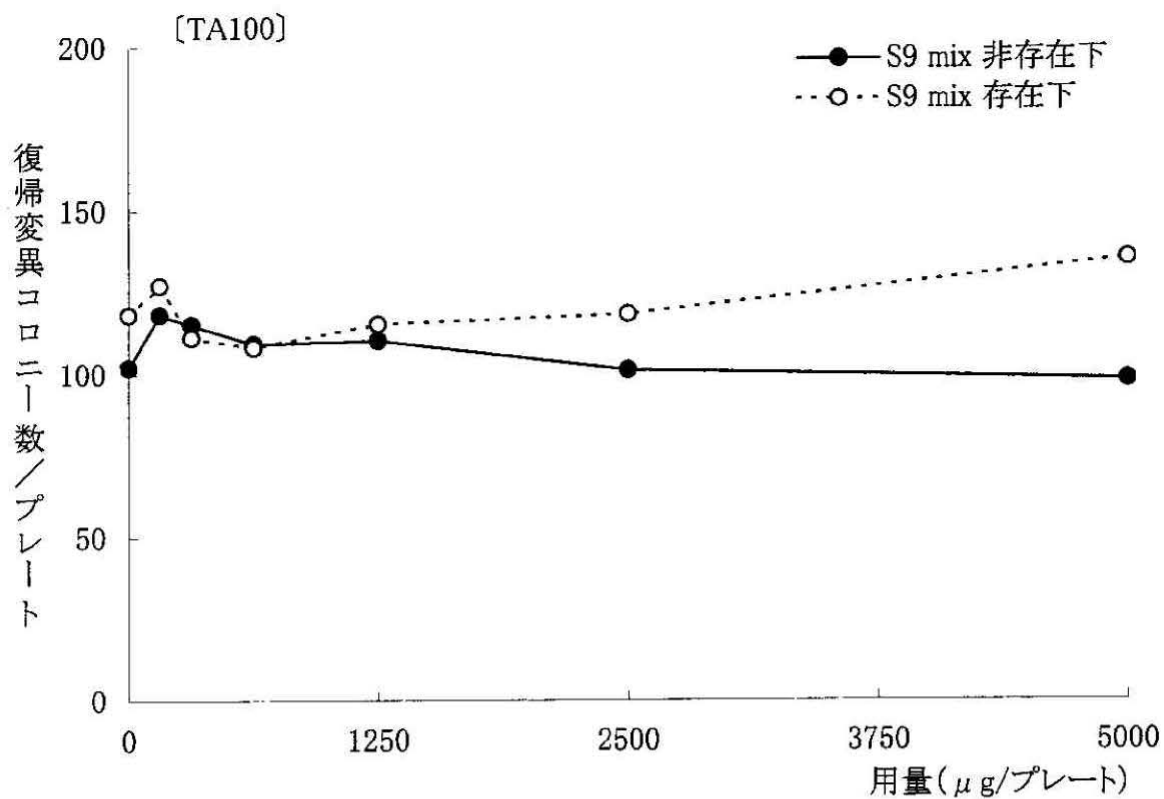


図 2-1 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

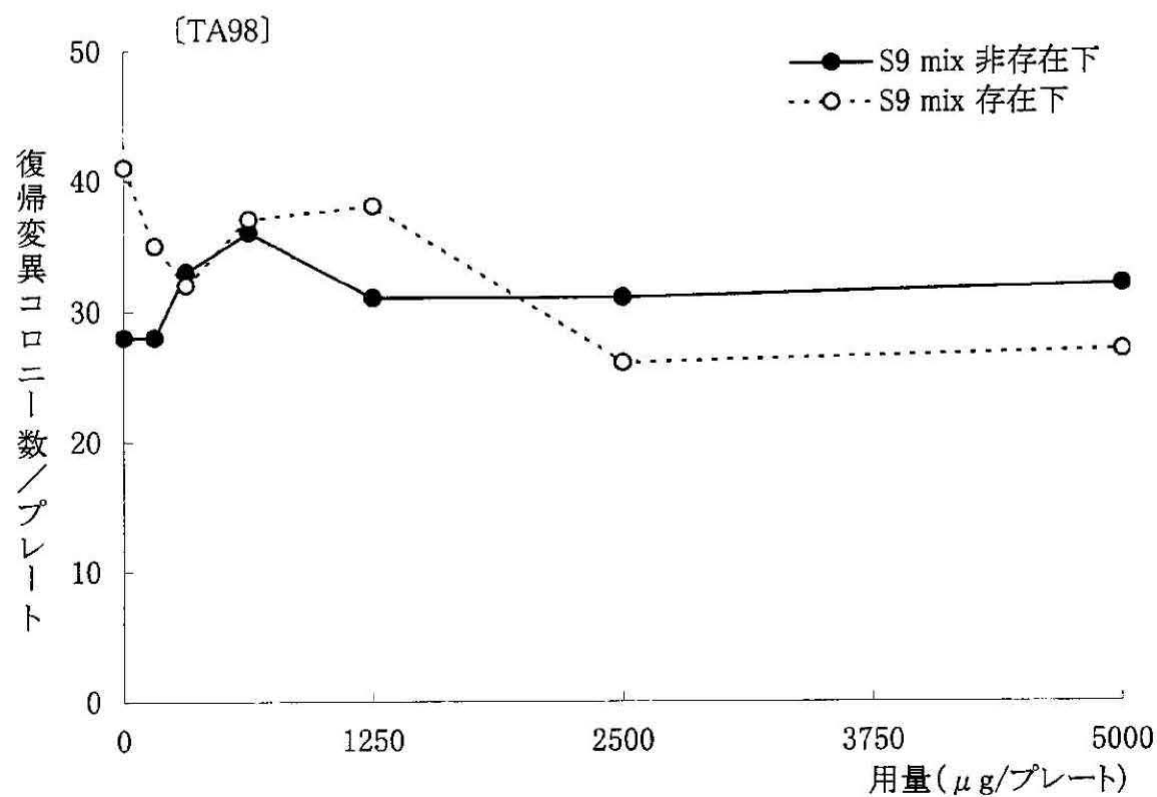
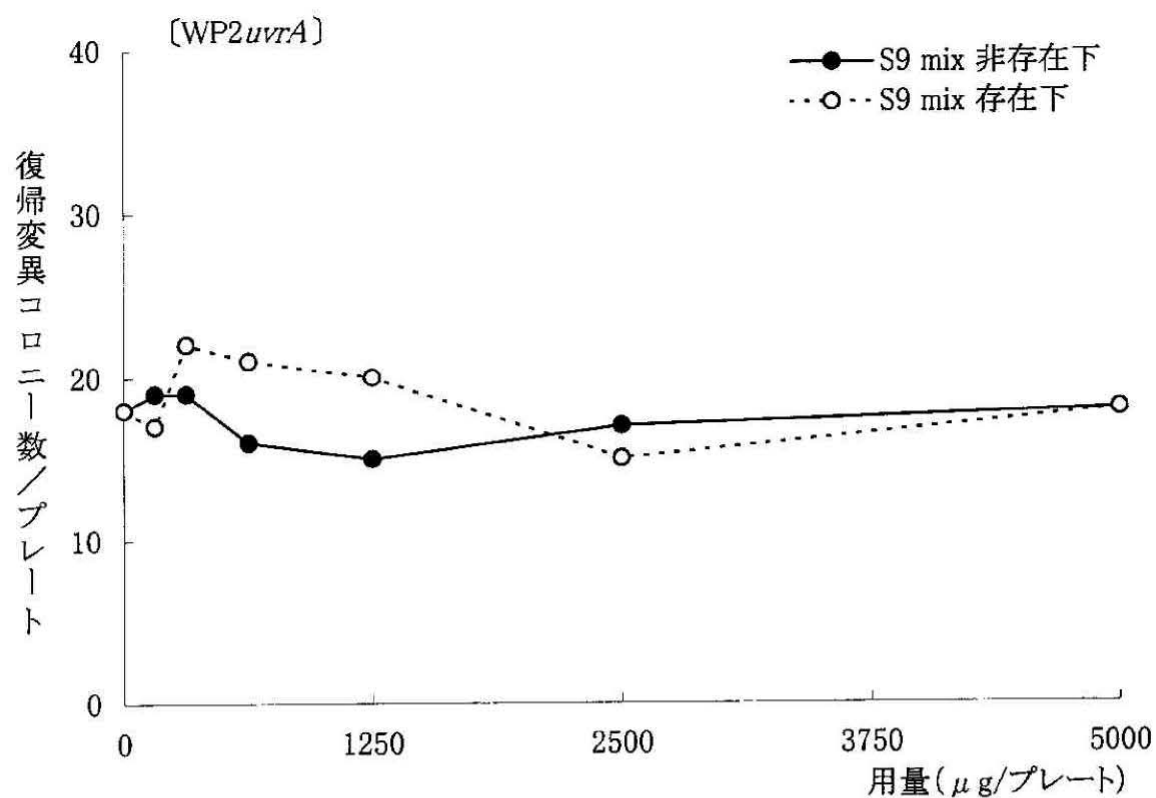


図 2-2 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

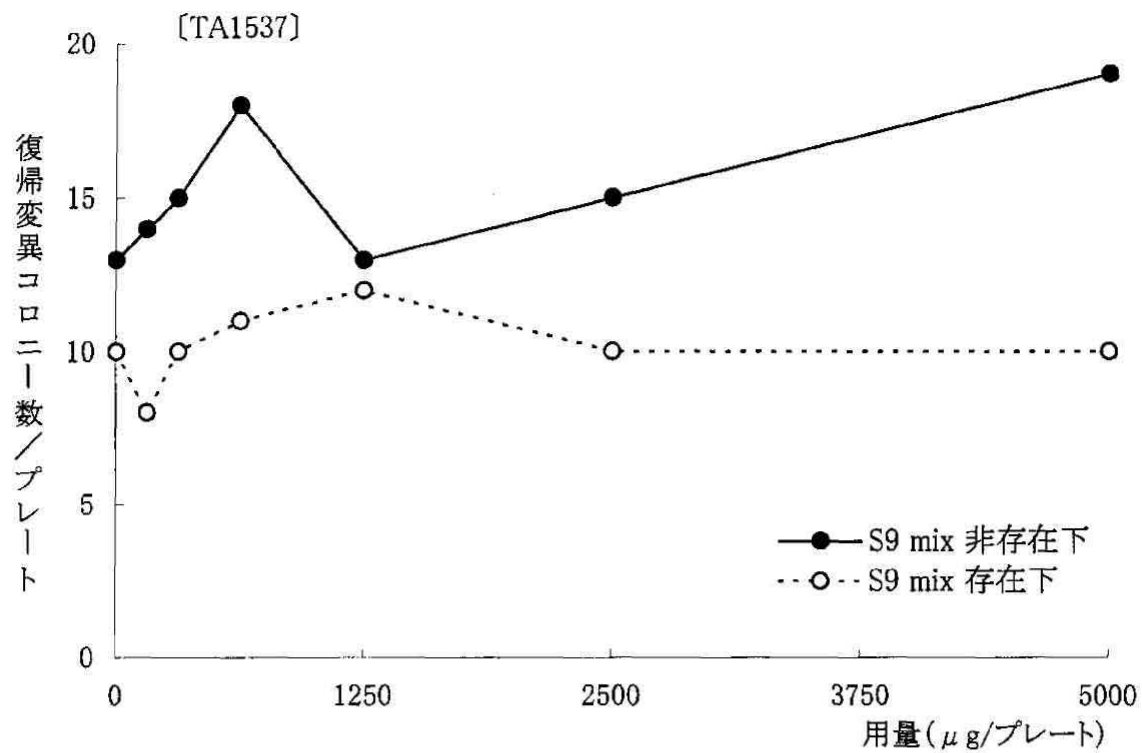


図 2-3 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

添付資料

復帰変異コロニー数:背景データ

自然復帰変異値(復帰変異コロニー数/プレート)						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
直接法	n	316	289	311	320	298
	平均	120	11	17	24	8
	標準偏差	18	4	4	7	3
	最大値(+2S.D.)	156	19	25	38	14
	最大値(-2S.D.)	84	3	9	10	2
代謝活性化法	n	326	294	306	302	294
	平均	117	10	21	34	13
	標準偏差	17	3	5	7	4
	最大値(+2S.D.)	151	16	31	48	21
	最大値(-2S.D.)	83	4	11	20	5
陽性対照値(復帰変異コロニー数/プレート)						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陽性対照物質		AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
用量(μ g/プレート)		0.01	0.5	0.04	0.1	80
直接法	n	236	234	238	238	234
	平均	766	362	792	396	563
	標準偏差	180	75	175	70	223
	最大値(+2S.D.)	1126	512	1142	536	1009
	最大値(-2S.D.)	406	212	442	256	117
陽性対照物質		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
用量(μ g/プレート)		1	2	10	1	2
代謝活性化法	n	248	234	240	229	233
	平均	496	159	844	312	101
	標準偏差	125	47	223	87	37
	最大値(+2S.D.)	746	253	1290	486	175
	最大値(-2S.D.)	246	65	398	138	27

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

2-AA : 2-アミノアントラセン