

最終報告書

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の 細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター 秦野

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729

TEL 0463-82-4751

試験委託者 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
(東京都千代田区霞が関 1-2-2)

試験番号 M-11-042

被験物質 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)

試験項目 細菌を用いる復帰突然変異試験

試験開始日 2011 年 11 月 2 日

実験開始日 2011 年 11 月 28 日

実験終了日 2011 年 12 月 15 日

試験終了日 試験責任者の捺印日

試験資料保管場所 秦野研究所資料保存室

保管期間 試験終了後 10 年間
その後の保管については試験委託者と協議する。

運営管理者 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長 

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発第 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発第 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施したものである。

2012 年 3 月 9 日

試験責任者 

試験従事者

試験責任者

試験担当者

検体調製

試験操作

被験物質管理



目次

要約	5
試験目的	5
試験ガイドラインと GLP	6
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 陽性対照物質	6
3. 検定菌	7
4. 試験材料	7
5. 被験物質調製液の調製	9
6. 試験操作	9
7. 結果の表示	11
8. 判定	12
予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと	12
試験成績と考察	12
1. 用量設定試験	12
2. 本試験	12
参考文献	13
表	15
図	18
資料	22

(最終ページ:24 ページ)

信頼性保証書

要約

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)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、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 8 用量を設定して用量設定試験を行ったところ、S9 mix 非存在下の TA100 および TA98 では 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で、TA1535 および WP2 *uvrA* では 150 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で、TA1537 では 15.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 1500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で、WP2 *uvrA* および TA98 では 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で、TA1537 では 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で生育阻害が認められた。

用量設定試験の結果に基づき、S9 mix 非存在下の TA100 および TA98 では 19.5、39.1、78.1、156、313 および 625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 6 用量を、TA1535 および WP2 *uvrA* では 4.88、9.77、19.5、39.1、78.1 および 156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 6 用量を、TA1537 では 0.610、1.22、2.44、4.88、9.77 および 19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 6 用量を、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 39.1、78.1、156、313、625、1250 および 2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 7 用量を、WP2 *uvrA* および TA98 では 156、313、625、1250、2500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 6 用量を、TA1537 では 19.5、39.1、78.1、156、313 および 625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 6 用量をそれぞれ設定して、2 回の本試験(本試験 I および本試験 II)を行った。その結果、2 回の本試験ともに、S9 mix 非存在下の TA100 では 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で、TA1535 では 78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で、WP2 *uvrA* では 156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で、TA98 では 625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で、TA1537 では 9.77 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で、WP2 *uvrA* および TA98 では 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で、TA1537 では 625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で生育阻害が認められた。また、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

試験目的

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の遺伝子突然変異誘発性(変異原性)の有無を検討し、安全性評価の資料とするために、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発第 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発第 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl) [化学名(別名): 2,4-Di-*tert*-amylphenol、2,4-Bis(1,1-dimethylpropyl)phenol、2,4-Di-*tert*-pentylphenol、略称: 2,4-DTAP、CAS 番号: 120-95-6、分子式: $C_{16}H_{26}O$ 、分子量: 234.38、ロット番号: XPX4F、純度: 99.7%(GC)、資料 1]は、白色～ほとんど白色の結晶(20℃で固体)である。被験物質の物理化学的性状等を資料 2に示す。被験物質は [REDACTED] から入手し、使用時まで冷蔵(実測値: 3~6℃)、暗所で保管した。

被験物質原体の安定性については、製品安全データシート中に、適切な条件下においては安定であることが記載されている。また、実験開始前と実験終了後に、秦野研究所において被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことが確認された(試験番号: G-11-031)。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	AF-2	STQ3987 (2010年8月6日)	和光純薬工業	99.7%
アジ化ナトリウム	SA	HLP7075 (2010年8月3日)	和光純薬工業	100.2%
9-アミノアクリジン	9AA	4785KA (2010年8月24日)	MP Biomedicals	98.6%
ベンゾ[a]ピレン	B[a]P	L16T027 (2010年8月6日)	Alfa Aesar	97.6%
2-アミノアントラセン	2AA	EPM0250 (2010年8月3日)	和光純薬工業	96.3%

AF-2、9AA、B[a]P および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号: STE3833、和光純薬工業)に、SA は日局注射用水(製造番号: KOJ81、大塚製薬工場)に溶解して所定の濃度に調製したのち、冷凍保存(設定温度: -20℃)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して用いた。各陽性対照物質調製液の調

製濃度および添加量を以下に示す。

菌 株	S9 mix 非存在下				S9 mix 存在下			
	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	添加量 ($\mu\text{L}/\text{plate}$)	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	添加量 ($\mu\text{L}/\text{plate}$)	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
<i>Salmonella typhimurium</i>								
TA100	AF-2	0.1	100	0.01	B[a]P	50	100	5
TA1535	SA	5	100	0.5	2AA	100	20	2
TA98	AF-2	1	100	0.1	B[a]P	50	100	5
TA1537	9AA	800	100	80	B[a]P	50	100	5
<i>Escherichia coli</i>								
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	100	0.01	2AA	100	100	10

各検定菌に用いた陽性対照物質は、秦野研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とした。

3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターの [REDACTED] より分与された。*S. typhimurium* の4菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異²⁾、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異³⁾を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は冷凍保存(設定温度:-80℃)したもの(凍結保存菌)を、調製後6か月以内に用時解凍して試験に用いた。凍結保存菌は、液体培地にて37℃で静止期の初期まで培養した菌液0.8 mLに対し、滅菌DMSOを0.07 mLの割合で加えて混合したものをプラスチックチューブに分注し、急速凍結して調製したものであり、調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が適正であることが確認されている。

4. 試験材料

1) 最少グルコース寒天平板培地

最少グルコース寒天平板培地(ロット番号:DZAC9G01、2011年9月16日製造、極東製薬工業)を購入して用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は以下のとおりで、径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

硫酸マグネシウム・七水和物	0.2	g
クエン酸・一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
グルコース	20	g
大洋寒天(ロット番号:BM-M5-249、清水食品)	15	g

2) トップアガー

①の水溶液をオートクレーブ滅菌後、フィルター滅菌した②または③を容量比 10:1 の割合で混合して用いた。

①	バクトアガー (Difco)	0.6 w/v%
	塩化ナトリウム	0.5 w/v%
②	<i>S. typhimurium</i> 用	
	L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
	D-ビオチン	0.5 mmol/L
③	<i>E. coli</i> 用	
	L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成分	S9 mix 1 mL 中の量	濃度
S9* ¹	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 mL	100 μmol/mL
補酵素溶液* ²	0.38 mL	——
塩化カルウム	——	33 μmol/mL
グルコース-6-リン酸	——	5 μmol/mL
NADH	——	4 μmol/mL
NADPH	——	4 μmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 μmol/mL

NADH: Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt

NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt

*¹: S9(ロット番号: RAA-636、2011年9月2日製造、キッコーマン)は、フェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)を腹腔内投与(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)した7週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラット(体重: 207~250 g)の肝臓から調製したものを購入後、冷凍保存(設定温度: -80℃)して、製造後6か月以内に用時解凍して試験に用いた。

*²: 補酵素溶液は、上記の成分を混合してフィルター滅菌したのち、冷凍保存(設定温度: -80℃)し、調製後6か月以内に用時解凍して試験に用いた。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度 (50.0 mg/mL) で水に不溶であったが、DMSO には溶解したことから、媒体には DMSO を用いた。

試験に際しては、被験物質を 40℃以下で加温し、溶解させてから秤量した。秤量した被験物質を、DMSO (ロット番号: ALM9502、和光純薬工業、分光分析用、純度 99.9%以上) に溶解して最高濃度 (50.0 mg/mL) の被験物質調製液を調製し[調製量: (用量設定試験) 3.0 mL 以上、(本試験 I および II) 5.0 mL 以上]、以下同媒体で段階希釈した。被験物質調製液は用時調製し、媒体添加後 27 分以内 (室温: 25~26℃、用量設定試験)、58 分以内 (室温: 25~26℃、本試験 I) および 50 分以内 (室温: 23~25℃、本試験 II) に使用した。調製濃度を以下に示す。

用量設定試験: 0.0150、0.0500、0.150、0.500、1.50、5.00、15.0、50.0 mg/mL

本試験 I および II: 0.00610、0.0122、0.0244、0.0488、0.0977、0.195、0.391、0.781、
1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 mg/mL

媒体中での被験物質の安定性については、秦野研究所において室温、遮光下で保管した 0.01 mg/mL および 250 mg/mL の濃度の試験液について、調製後 24 時間の安定性が確認 (試験番号: G-11-031) されている。なお、本試験 I および本試験 II における 0.00610 mg/mL の濃度については、媒体中の安定性が確認された範囲内ではないが、安定性が確認された範囲内の濃度 (0.0122 mg/mL) の被験物質調製液を用時に段階希釈して試験に使用したことから、試験結果に影響しないと判断した。

含量分析については、「医薬品・化学物質 GLP 解説 (2002)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。

6. 試験操作

1) 試験菌液の作製

ニュートリエントブロス No. 2 (ロット番号: 612715、Oxoid) を 12 mL 入れた L 字型試験管 (容積: 29 mL) に、解凍した凍結保存菌 24 μ L (TA100、TA1535、TA98、TA1537 および WP2 *uvrA*) をすみやかに接種し、4℃で保冷後、37℃で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには DOUBLE SHAKER NR-3 (TAITEC) を用い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。検定菌の増殖の確認のため、レシオビーム分光光度計 (日立 U-1900 形) (HITACHI) により、試験菌液の吸光度を 660 nm で測定した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。660 nm の吸光度の測定値および生菌数を以下に示す。

試験の種類		検定菌				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	OD ₆₆₀	1.866	1.864	1.871	1.885	1.869
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.13	2.82	4.02	2.62	2.33
本試験 I	OD ₆₆₀	1.870	1.876	1.857	1.910	1.855
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	1.66	2.71	4.04	2.80	1.52
本試験 II	OD ₆₆₀	1.882	1.845	1.866	1.915	1.873
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	1.77	2.95	3.95	2.79	1.97

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2010 年度の背景データ(秦野研究所)の平均値の 90% 以上であった。また、各試験菌液の生菌数は 1×10^9 cells/mL 以上であった。

2) 試験法

Ames らの標準法²⁾を参考にして、プレインキュベーション法¹⁾により、1 回の用量設定試験と 2 回の本試験を実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下および哺乳動物(ラット)のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用媒体 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37°C で 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11、システムサイエンス、面積補正有り) または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。平板は各用量につき用量設定試験では 1 枚、本試験では 2 枚を使用し、陰性および陽性対照では、各試験とも 2 枚を使用した。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

3) 試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、すべての検定菌で最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 8 用量を設定した。

本試験 I および II においては、以下の用量を設定した。

(S9 mix 非存在下)

TA100 および TA98: 19.5、39.1、78.1、156、313、625 µg/plate

TA1535 および WP2 *uvrA* : 4.88、9.77、19.5、39.1、78.1、156 µg/plate

TA1537: 0.610、1.22、2.44、4.88、9.77、19.5 µg/plate

(S9 mix 存在下)

TA100 および TA1535: 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 µg/plate

WP2 *uvrA* および TA98: 156、313、625、1250、2500、5000 µg/plate

TA1537: 19.5、39.1、78.1、156、313、625 µg/plate

4) 無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL と 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、あるいは S9 mix 0.5 mL のみを入れ、37°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトッパアガー (*S. typhimurium* 用) を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。37°C で 48 時間培養後、雑菌の混入の有無を調べた。なお、S9 mix の無菌試験については、同日に実施した他の試験と共通に用いた。

5) 識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 非存在下は黒、S9 mix 存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 *uvrA* は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々 0 および P と記入して識別した。試験の識別は、試験番号のかわりに菌の識別番号の左に用量設定試験では 2、本試験 I および本試験 II では 1 と記入した。生菌数測定における平板の識別は、菌の識別番号の左に VC と記入した。無菌試験における平板の識別は、被験物質については用量設定試験では 2、本試験 I および本試験 II では 1 のみを記入し、S9 mix については S9 と記入した。

6) 背景データによる管理

陰性対照値および陽性対照値が、秦野研究所における背景データの変動範囲内 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) から外れた場合には、該当する検定菌について再度、同一用量を用いて試験を実施し、再試験のデータを採用することとした。なお、2010 年度に実施した各試験の陰性対照値および陽性対照値を背景データとした (資料 3)。

7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値 (小数点以下第一位を四捨五入) を示し、用量-反応曲線の図を添付した。また、被験物質に由来する沈殿および生育阻害が認められた場合は、その旨表示することとした。

8. 判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix非存在下あるいはS9 mix存在下において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、当該試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定することとした。なお、結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

試験成績と考察

1. 用量設定試験

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)について、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および5000 µg/plateの8用量を設定して用量設定試験を行った(表1)。その結果、S9 mix非存在下のTA100およびTA98では500 µg/plate以上の用量で、TA1535およびWP2 *uvrA*では150 µg/plate以上の用量で、TA1537では15.0 µg/plate以上の用量で、S9 mix存在下のTA100およびTA1535では1500 µg/plate以上の用量で、WP2 *uvrA*およびTA98では5000 µg/plateの用量で、TA1537では500 µg/plate以上の用量で生育阻害が認められた。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix非存在下では500 µg/plate以上の用量で、S9 mix存在下では1500 µg/plate以上の用量で認められた。

以上の結果から、2回の本試験(本試験Iおよび本試験II)における最高用量を、S9 mix非存在下のTA100およびTA98では625 µg/plate、TA1535およびWP2 *uvrA*では156 µg/plate、TA1537では19.5 µg/plate、S9 mix存在下のTA100およびTA1535では2500 µg/plate、WP2 *uvrA*およびTA98では5000 µg/plate、TA1537では625 µg/plateとした。

2. 本試験

S9 mix非存在下のTA100およびTA98では19.5、39.1、78.1、156、313および625 µg/plateの6用量を、TA1535およびWP2 *uvrA*では4.88、9.77、19.5、39.1、78.1および156 µg/plateの6用量を、TA1537では0.610、1.22、2.44、4.88、9.77および19.5 µg/plateの6用量を、S9 mix存在下のTA100およびTA1535では39.1、78.1、156、313、625、1250および2500 µg/plateの7用量を、WP2 *uvrA*およびTA98では156、313、625、1250、2500および5000 µg/plateの6用量を、TA1537では19.5、39.1、78.1、156、313および625 µg/plateの6用量をそれぞれ設定して、本試験Iおよび本試験IIを行った(本試験I:表2、図1および図2、本試験II:表3、図3および図4)。その結果、2回の本試験ともに、S9

mix 非存在下の TA100 では 313 µg/plate 以上の用量で、TA1535 では 78.1 µg/plate 以上の用量で、WP2 *uvrA* では 156 µg/plate の用量で、TA98 では 625 µg/plate の用量で、TA1537 では 9.77 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 2500 µg/plate の用量で、WP2 *uvrA* および TA98 では 5000 µg/plate の用量で、TA1537 では 625 µg/plate の用量で生育阻害が認められた。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下では 625 µg/plate の用量で、S9 mix 存在下では 2500 µg/plate 以上の用量において認められた。また、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

すべての試験において、用いた最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内(平均値±3×標準偏差)であったことから、当該試験系の妥当性が確認された。

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)については、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号:G-11-031)で、S9 mix 存在下の短時間処理で陽性の結果が得られている。

また、関連物質である 2,4-di-*tert*-butylphenol については復帰突然変異試験で陰性、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性(S9 mix 存在下で構造異常)の結果が報告されている⁴⁾。2,4,6-Tri-*tert*-butylphenol については復帰突然変異試験で陰性の結果が報告されている⁵⁾。

以上の結果から、phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

参考文献

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norporth, K. H., Garner, R. C. eds, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D. M., Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187
- 4) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修、化学物質毒性試験報告 Vol. 8

- (1)、化学物質点検推進連絡協議会、東京(2003)p363-395
- 5) 石館基 監修、微生物を用いる変異原性データ集、Life-Science Information Center、東京(1991)、
p.560 - 561

表 1 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の細菌を用いる復帰突然変異試験(用量設定試験)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間:2011年11月28日より2011年12月1日										
		復帰突然変異数 コロニー数/plate(平均)										
		塩基対置換型					フレームシフト型					
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	89	83	7	6	39	37	14	15	11	5	
		(86)		(7)		(38)		(15)		(8)		
	1.50	75		11		37		15		7		
	5.00	116		9		34		14		8		
	15.0	87		11		30		24		4 *		
	50.0	112		8		28		18		4 *		
	150	100		11 *		21 *		15		4 *		
	500 †	58 *		4 *		15 *		12 *		1 *		
	1500 †	39 *		1 *		7 *		5 *		0 *		
5000 †	26 *		0 *		10 *		8 *		0 *			
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	97	84	7	10	34	41	25	32	9	17	
		(91)		(9)		(38)		(29)		(13)		
	1.50	88		11		34		28		14		
	5.00	116		12		48		31		8		
	15.0	114		7		48		33		16		
	50.0	109		10		42		19		13		
	150	109		12		32		26		11		
	500	70		3		22		14		1 *		
	1500 †	36 *		1 *		20		18		0 *		
5000 †	15 *		3 *		20 *		10 *		0 *			
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA					
		用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
		コロニー数/plate	434	339	484	490	92	86	405	358	384	242
			(387)		(487)		(89)		(382)		(313)	
	S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P					
	用量(µg/plate)	5	2	10	5	5						
	コロニー数/plate	1146	1063	376	388	653	539	378	368	169	196	
		(1105)		(382)		(596)		(373)		(183)		

陰性対照, ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

*, 生育阻害が認められた。

表 2 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 I)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間: 2011年12月5日より2011年12月8日										
		復 帰 変 異 数 コロニー数/plate(平均)										
		塩 基 対 置 換 型					フ レ ー ム シ フ ト 型					
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	99	109	13	11	23	29	20	14	9	7	
		(104)		(12)		(26)		(17)		(8)		
	0.610	NT		NT		NT		NT		9	6	
										(8)		
	1.22	NT		NT		NT		NT		12	4	
										(8)		
	2.44	NT		NT		NT		NT		8	5	
										(7)		
	4.88	NT		10	15	22	25	NT		3	6	
				(13)		(24)				(5)		
	9.77	NT		9	10	26	26	NT		7 *	6 *	
				(10)		(26)				(7)		
19.5	88	106	7	6	30	22	22	23	4 *	4 *		
	(97)		(7)		(26)		(23)		(4)			
39.1	94	89	10	15	21	26	15	19	NT			
	(92)		(13)		(24)		(17)					
78.1	103	90	11 *	7 *	11	19	17	26	NT			
	(97)		(9)		(15)		(22)					
156	73	86	10 *	6 *	15 *	17 *	13	17	NT			
	(80)		(8)		(16)		(15)					
313	77 *	72 *	NT		NT		15	13	NT			
	(75)						(14)					
625 †	71 *	60 *	NT		NT		17 *	16 *	NT			
	(66)						(17)					
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	89	81	8	8	29	32	34	22	14	16	
		(85)		(8)		(31)		(28)		(15)		
	19.5	NT		NT		NT		NT		12	14	
										(13)		
	39.1	110	105	13	11	NT		NT		18	17	
		(108)		(12)						(18)		
	78.1	120	108	10	13	NT		NT		12	17	
		(114)		(12)						(15)		
	156	93	100	14	10	29	36	21	27	13	9	
		(97)		(12)		(33)		(24)		(11)		
313	82	102	8	13	18	25	25	19	2	7		
	(92)		(11)		(22)		(22)		(5)			
625	70	74	7	5	23	22	17	11	1 *	3 *		
	(72)		(6)		(23)		(14)		(2)			
1250	51	48	8	3	19	19	20	15	NT			
	(50)		(6)		(19)		(18)					
2500 †	37 *	36 *	1 *	1 *	16	16	14	10	NT			
	(37)		(1)		(16)		(12)					
5000 †	NT		NT		20 *	15 *	11 *	11 *	NT			
					(18)		(11)					
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA					
		用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
		コロニー数/plate	280	366	522	568	90	81	408	450	252	292
			(323)		(545)		(86)		(429)		(272)	
		S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P				
		用量(µg/plate)	5	2	10	5	5					
	コロニー数/plate	1190	989	379	384	503	533	380	338	166	113	
		(1090)		(382)		(518)		(359)		(140)		

陰性対照, ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

*, 生育阻害が認められた。

NT, 実施せず。

表 3 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 II)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間:2011年12月12日より2011年12月15日									
		復帰突然変異数 コロニー数/plate(平均)									
		塩基対置換型					フレームシフト型				
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	100	103	16	13	37	36	16	16	10	9
	0.610	NT		NT		NT		NT		7	9
	1.22	NT		NT		NT		NT		4	5
	2.44	NT		NT		NT		NT		11	7
	4.88	NT		8	14	39	40	NT		6	5
	9.77	NT		15	5	38	33	NT		2 *	4 *
	19.5	121	101	13	10	36	25	15	20	4 *	4 *
	39.1	104	110	15	5	29	31	18	25	NT	
	78.1	122	113	6 *	9 *	23	24	12	14	NT	
	156	120	95	8 *	6 *	24 *	25 *	13	17	NT	
	313	74 *	75 *	NT		NT		14	12	NT	
625 †	56 *	48 *	NT		NT		7 *	16 *	NT		
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	99	104	15	11	40	36	34	23	17	16
	19.5	NT		NT		NT		NT		11	10
	39.1	126	123	16	12	NT		NT		16	18
	78.1	109	117	12	17	NT		NT		9	12
	156	108	110	18	12	37	38	21	26	4	9
	313	116	113	7	8	39	39	18	27	3	4
	625	73	70	3	3	27	29	21	15	2 *	1 *
	1250	69	49	1	3	21	23	21	18	NT	
	2500 †	21 *	33 *	3 *	1 *	34	22	21	17	NT	
	5000 †	NT		NT		31 *	26 *	13 *	13 *	NT	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA				
	用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
	コロニー数/plate	388	382	560	539	101	116	481	465	305	290
		(385)	(550)	(109)	(473)	(298)					
S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P					
用量(µg/plate)	5	2	10	5	5						
コロニー数/plate	1180	1032	388	390	485	511	391	351	147	148	
	(1106)	(389)	(498)	(371)	(148)						

陰性対照, ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

*, 生育阻害が認められた。

NT, 実施せず。

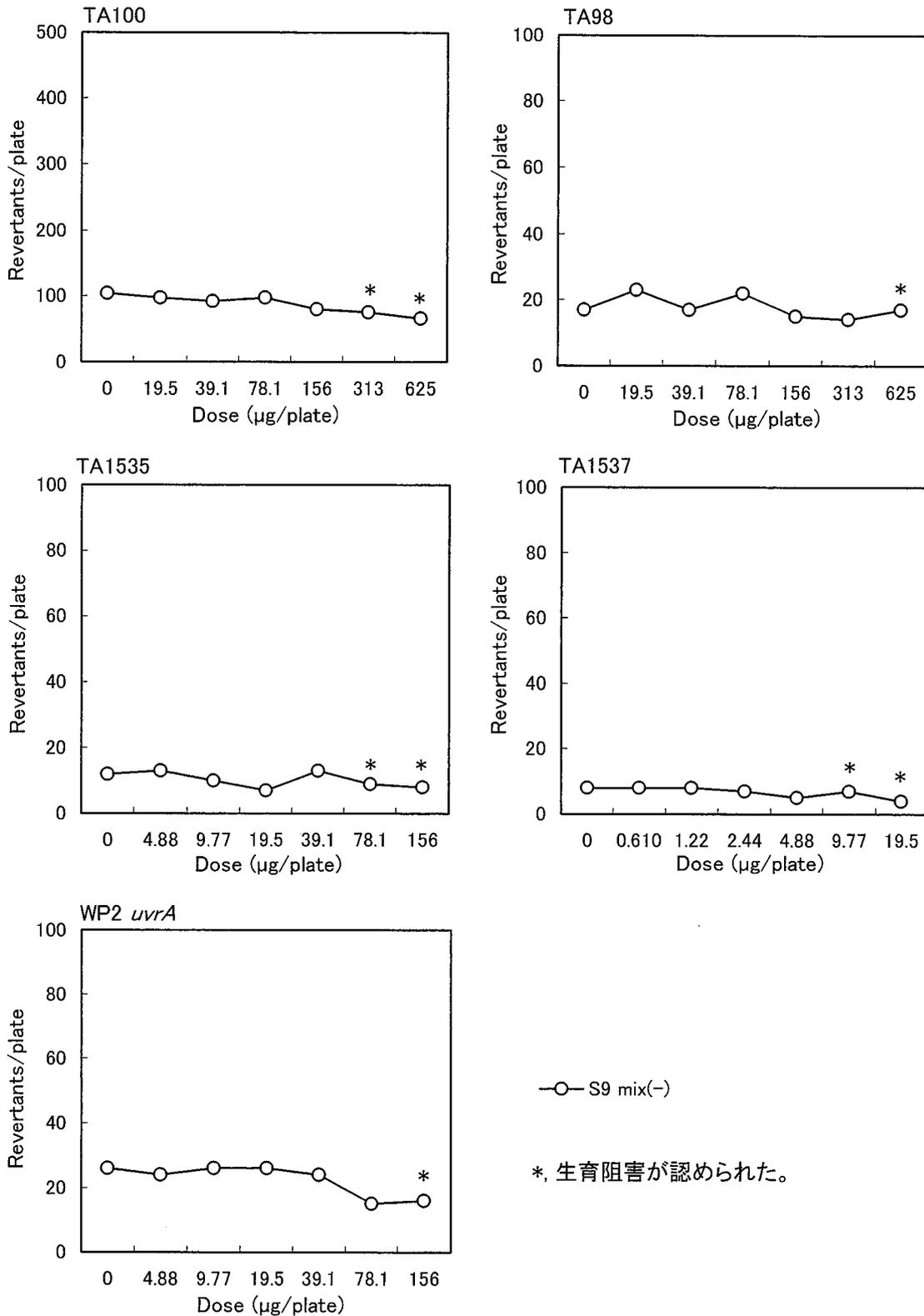


図 1 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の細菌を用いる復帰突然変異試験
(本試験 I、S9 mix 非存在下)

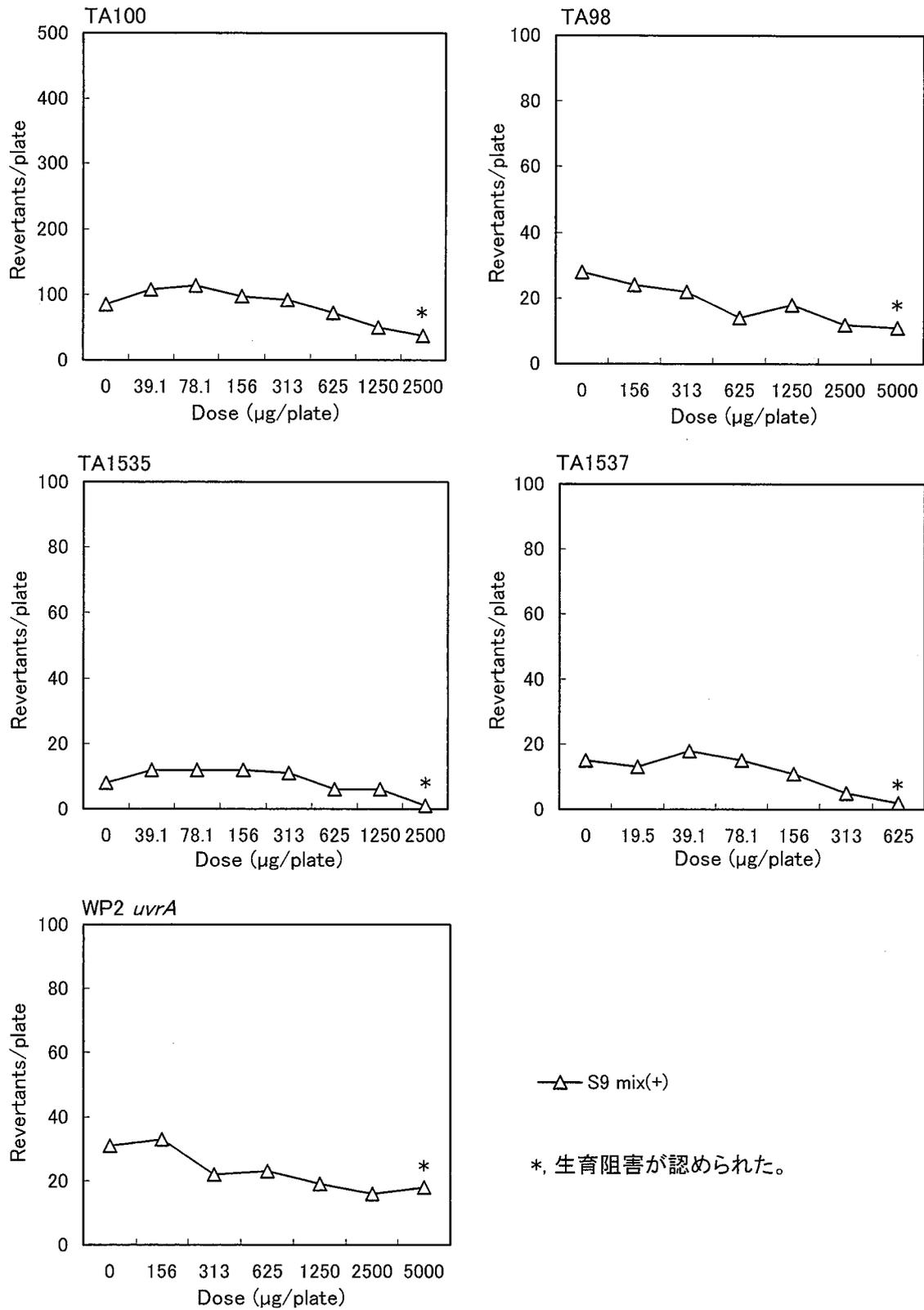


図 2 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の細菌を用いる復帰突然変異試験
(本試験 I, S9 mix 存在下)

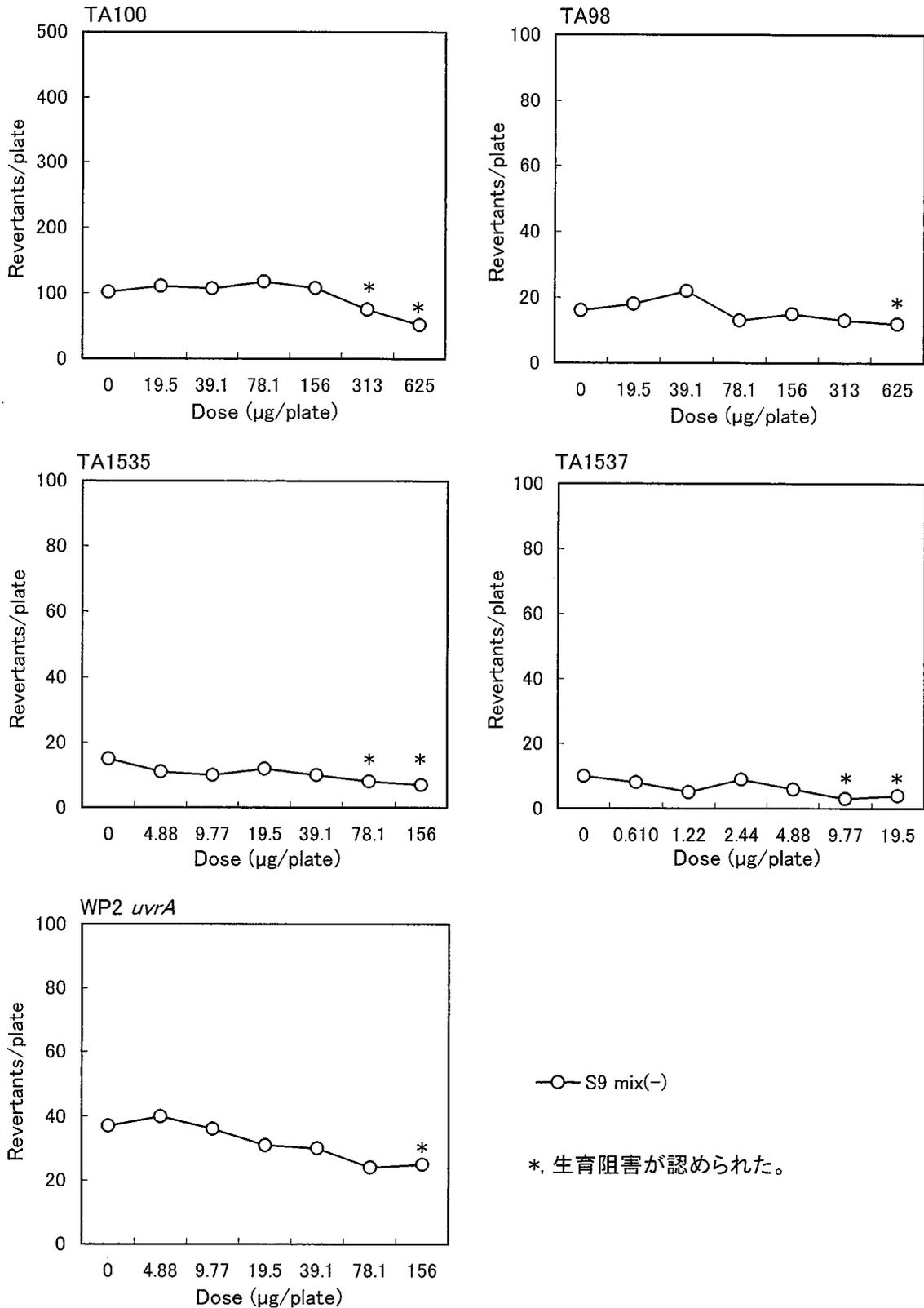


図 3 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の細菌を用いる復帰突然変異試験
(本試験 II、S9 mix 非存在下)

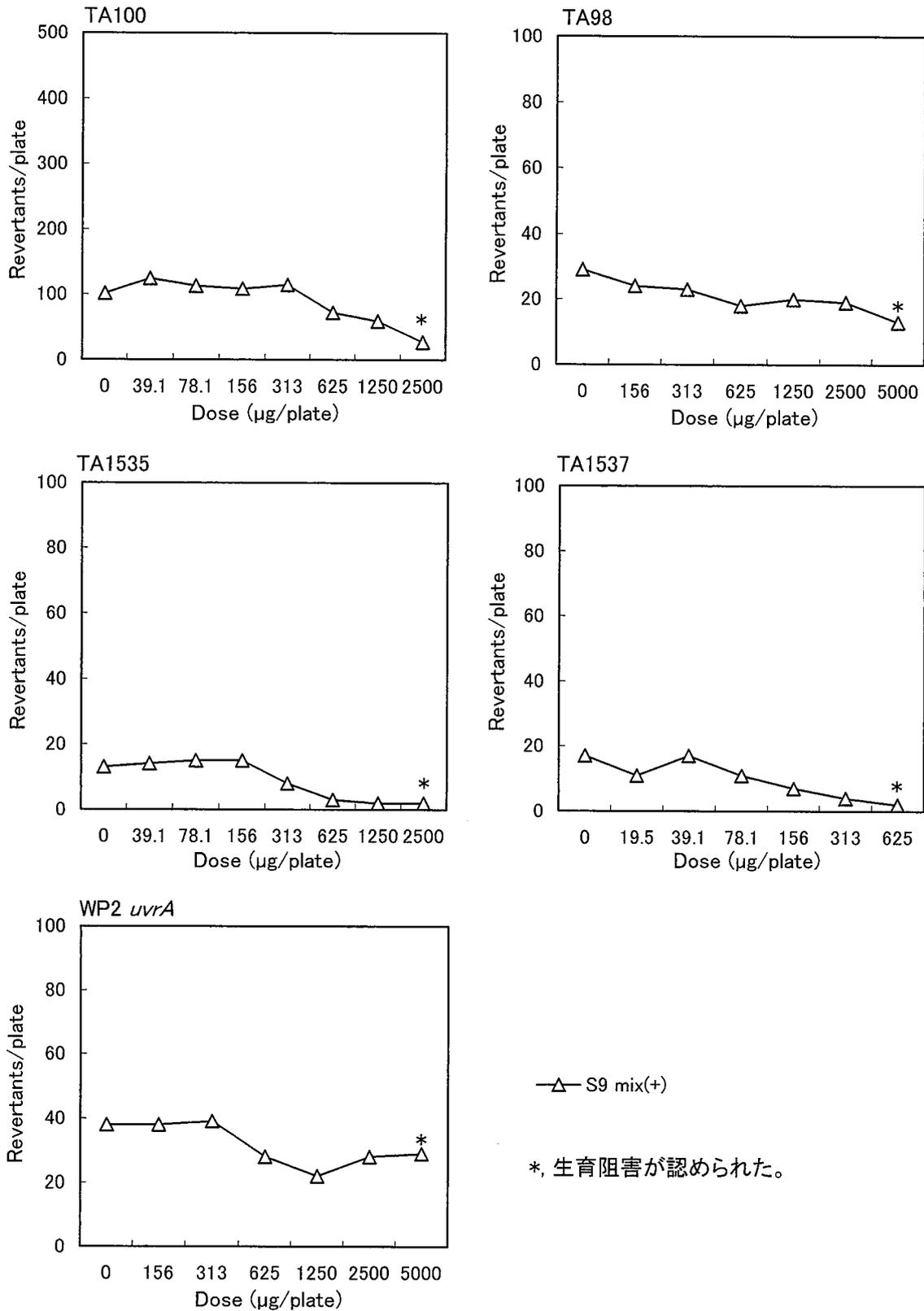


図 4 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の細菌を用いる復帰突然変異試験
(本試験 II、S9 mix 存在下)

資料 1



試験成績書

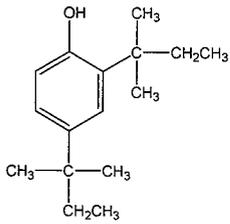
2011年09月27日

東京化成工業株式会社 品質保証部
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10
TEL: 03(5640)8860 FAX: 03

製品名: 2,4-Di-tert-amylphenol					
製品コード: D3294	等級: EP	製品ロット: XPX4F	判定: 合格		
項目	結果	規格値			
純度(GC)	99.7 %	98.0 %以上			

資料 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	2,4-ジ-tert-アミルフェノール		
別 名	Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylpropyl)、2,4-Di-tert-amylphenol、 2,4-Bis (1,1-dimethylpropyl) phenol、2,4-Di-tert-pentylphenol		
C A S 番 号	120-95-6		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
分 子 量	234.38		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	99.7% (GC)		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	XPX4F		
不 純 物 の 名 称 及び含有率	_____		
蒸 気 圧	_____		
対 水 溶 解 度	_____		
1-オクタノール/水分配係数	_____		
融 点	26°C (凝固点)		
沸 点	143°C/0.5 kPa		
常温における性状	白色〜ほとんど白色の結晶 (20°Cで固体)		
安 定 性	適切な条件下においては安定 (製品安全データシートより)。		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度 *	溶 媒 中 の 安 定 性 *
	水	25.0 mg/mL で不溶	50.0 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	D M S O	250 mg/mL で溶解	234 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。調製後 24 時間の安定性 (0.01 mg/mL および 250 mg/mL、室温、遮光保管) を確認した (試験番号: G-11-031)。
	アセトン	250 mg/mL で溶解	100 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。

〔備考〕物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

*: (財)食品薬品安全センター秦野研究所において確認した。

資料 3

試験に用いた検定菌の復帰変異コロニー数の
背景データ(プレインキュベーション法)

(2010年4月~2011年3月)

	陰性対照値		陽性対照値	
	(- S9 mix)	(+ S9 mix)	(- S9 mix)	(+ S9 mix)
TA100	105 ± 11* (n=122)	105 ± 13 (n=132)	359 ± 32 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=111)	938 ± 81 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=60)
TA1535	12 ± 3 (n=106)	12 ± 3 (n=109)	508 ± 50 (SA, 0.5 µg/plate) (n=97)	398 ± 36 (2AA, 2 µg/plate) (n=100)
WP2 <i>uvrA</i>	27 ± 4 (n=101)	30 ± 5 (n=108)	102 ± 14 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=94)	675 ± 73 (2AA, 10 µg/plate) (n=98)
TA98	22 ± 4 (n=128)	33 ± 6 (n=136)	433 ± 57 (AF-2, 0.1 µg/plate) (n=118)	297 ± 34 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=67)
TA1537	9 ± 2 (n=108)	16 ± 3 (n=119)	377 ± 76 (9AA, 80 µg/plate) (n=98)	145 ± 20 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=55)

*: 平均値の平均 ± 標準偏差
n: 試験数

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
SA : Sodium azide
9AA : 9-Aminoacridine
B[a]P : Benzo[a]pyrene
2AA : 2-Aminoanthracene

信頼性保証書

表題 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 M-11-042

この試験に関する信頼性保証部門による査察および監査状況等は下記のとおりであった。

査察・監査項目	査察・監査年月日	運営管理者および試験責任者への報告年月日
試験計画書	2011年11月2日	2011年11月2日
試験計画書変更書		
M-11-042-No.1	2011年11月17日	2011年11月17日
M-11-042-No.2	2011年12月5日	2011年12月5日
被験物質調製液の調製および検定菌処理	2011年12月6日	2011年12月6日
コロニー数の計測	2011年12月8日	2011年12月8日
報告書草案・生データ	2012年2月10,14日	2012年2月15日
最終報告書	2012年3月9日	2012年3月9日

試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成23年3月31日、薬食発0331第8号、平成23・03・29製局第6号、環企発第110331010号)を遵守して実施され、また、この報告書は試験に使用された方法および手順を正確に記載し、記載された結果は試験の生データを正確に反映していることを保証する。

2012年3月9日

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

信頼性保証部門責任者

