

最終報告書

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の
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

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
(東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2)

試験番号 G-11-031

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

試験項目 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

試験開始日 2011 年 10 月 31 日

実験開始日 2011 年 11 月 7 日

実験終了日 2012 年 1 月 30 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 

本試験は、「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 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 11031009 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 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 03 月 15 日

試験責任者



試験従事者

試験責任者

試験担当者

溶媒中の安定性試験用検体調製

原体および溶媒中の被験物質

安定性測定

培養

検体調製および細胞処理

細胞増殖率測定用サンプル作製

細胞増殖率測定

染色体標本作製

染色体分析

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. 細胞と培養条件	6
4. S9 反応液	7
5. 被験物質調製液の調製	7
6. 細胞増殖抑制試験	8
7. 染色体異常試験	8
8. 染色体分析	9
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	10
試験成績および考察	10
参考文献	11
Figure	12
Tables	13
Appendices	16

(最終ページ:21 ページ)

信頼性保証書

要約

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の CHL/IU 細胞(チャイニーズ・ハムスター、雌肺由来)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を調べた。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では0.10 mg/mL および0.030 mg/mL、24時間連続処理では0.060 mg/mLを最高処理濃度とし、以下の濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.0031、0.0063、0.013、0.025、0.050、0.10 mg/mL (公比 2)

S9 mix 存在下の短時間処理:0.00094、0.0019、0.0038、0.0075、0.015、0.030 mg/mL (公比 2)

24 時間連続処理:0.0019、0.0038、0.0075、0.015、0.030、0.060 mg/mL (公比 2)

なお、肉眼観察の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した0.10 mg/mLの濃度群でのみ、処理開始時に培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに分析可能な最高濃度を決定し、その濃度を含む以下の3濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.0063、0.013、0.025 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.0038、0.0075、0.015 mg/mL

24 時間連続処理:0.0075、0.015、0.030 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下の短時間処理および24時間連続処理についてはいずれの被験物質処理群においても構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。なお、24 時間連続処理の高濃度群(0.030 mg/mL)については、細胞毒性のため倍数性細胞について、規定の細胞数を分析できなかった。

S9 mix 存在下の短時間処理については、高濃度群(0.015 mg/mL)において、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加(出現率:12.0%および4.8%)が認められ、用量依存性も認められた。なお、同濃度群では核内倍加も認められた。

なお、類縁物質である2,4-di-*tert*-butylphenolにおいてもphenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)と同様にS9 mix 存在下の短時間処理で染色体の構造異常が誘発される結果が得られている。

以上の結果より、phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)は本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

試験目的

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の染色体異常誘発作用を調べるため、そのCHL/IU細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

本試験は、「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 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、環保企発第 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について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 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、環保企発第 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)、Appendix 1 参照]は、白色～ほとんど白色の結晶(20°C で固体)である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 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: 4~6°C)、暗所で保管した。

被験物質原体の安定性については、製品安全性データシート中に、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、当該試験において、冷蔵保管した被験物質を用いて実験開始前(測定日: 2011 年 11 月 7 日)および実験終了後(測定日: 2012 年 1 月 30 日)にフーリエ変換赤外分光光度計を用いて赤外吸収スペクトルを測定し、両者の測定結果に変化の無いことを確認した(Appendix 3)。

2. 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC、ロット番号: 535AHF、協和醗酵キリン)を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド(CP、ロット番号: 097K1311、Sigma Chemical)を用いた。

試験には、これらの陽性対照物質を日局注射用水(ロット番号: K0F76、大塚製薬工場)に溶かし、凍結保存(-30°C)した原液(MMC: 20 µg/mL、CP: 1 mg/mL、調製日: MMC および CP 共に 2011 年 6 月 20 日)を用時解凍して、調製後 6 ヶ月以内に試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国においては染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手(1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4)し、継代後、液体窒素(気相)中に凍結保存(現在の継代数 23)した。その細胞(倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代 6 代(細胞増殖抑制試験)、3 代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:522123、Biological Industries)を 10 vol%添加したイーグル MEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、CO₂インキュベーター(5%CO₂、37℃の加湿条件下)内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末(日水製薬)4.7 g に精製水を 500 mL 加えて溶解し、高圧蒸気滅菌(121℃、15 分)したものに、L-グルタミン(日水製薬)を約 0.15 g、10 w/v%NaHCO₃水溶液を約 10 mL 無菌的に添加して調製した。

4. S9 反応液

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と 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽(-80℃)に保管し、調製後 6 ヶ月以内に使用した。グルコース-6-リン酸(G-6-P、Sigma)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業)および KCl を精製水に溶かし、混合液として超低温槽(-80℃)に保管し、使用時(調製後 6 ヶ月以内に使用)はこれに S9、MgCl₂ および HEPES(pH 7.2)を加え、S9 mix とした。試験には 10%CS/MEM:S9 mix を 25:5 の割合で混和した S9 反応液を用いた(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP⁺、0.83 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

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で水に溶解しないが、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したことから、溶媒として DMSO(ロット番号:ALE9134 および KWK3063、和光純薬、分光分析用)を用いた。

被験物質を約 40℃ 以下で加温して溶解したものを秤量したのち、溶媒(DMSO)を加えて原液[細胞増殖抑制試験:234 mg/mL、染色体異常試験:10.0 mg/mL]を用時調製した。その原液を溶媒で段階希釈して下記の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 1 vol%添加して処理を行った。

[細胞増殖抑制試験]

0.914、1.83、3.66、7.31、14.6、29.3、58.5、117、234 mg/mL(公比 2)

[染色体異常試験]

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.313、0.625、1.25、2.50、5.00、10.0 mg/mL(公比 2)

S9 mix 存在下の短時間処理:0.0938、0.188、0.375、0.750、1.50、3.00 mg/mL(公比 2)

24 時間連続処理:0.188、0.375、0.750、1.50、3.00、6.00 mg/mL(公比 2)

なお、被験物質調製液(原液)調製時に目視により、発熱、発泡、変色等の変化の無いことを確認した。

被験物質の溶媒中で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 0.0100 mg/mL 溶液および 250 mg/mL 溶液について被験物質調製液の調製 24 時間の安定性を確認した(分析方法は Appendix 4 参照)。0.0100 mg/mL 溶液については調製直後および調製 24 時間後の平均含量が 105.6%および 106.3%、各測定値のばらつきが 99.5~100.5%、平均残存率は 100.8%であった。また、250

mg/mL 溶液については調製直後および調製 24 時間後の平均含量が 101.4%および 101.6%、各測定値のばらつきは 99.6%~100.5%、平均残存率は 100.2%であった。これらの測定値は、いずれも試験計画書に記載した許容基準の範囲内(調製直後および保管後の平均含量が、それぞれ調製濃度の 90.0~110.0%、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0~110.0%以内、調製直後の平均測定値に対する保管後の残存率の平均値が 90.0%以上)であった(Appendix 5)。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、試験法ガイドラインに従い 2.3 mg/mL (10 mmol/L) を最高処理濃度とする 9 濃度群 (0.0091~2.3 mg/mL、公比 2) を設定して細胞増殖抑制試験を実施した。

CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシン溶液を用いてはがした後、 4×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (2×10^4 個) をプラスチックディッシュ(直径 6 cm) に播種した。培養開始 3 日目に以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM および S9 反応液と交換 (3 mL/ディッシュ) した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 1 vol% 添加 (30 μ L/ディッシュ) し 6 時間処理した。処理後、MEM(血清不含) で洗浄し、10%CS/MEM (5 mL/ディッシュ) でさらに 18 時間培養した。連続処理する場合は各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM と交換 (5 mL/ディッシュ) した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 1 vol% 添加 (50 μ L/ディッシュ) し 24 時間処理した。各群 2 枚のディッシュを用いた。また、処理開始時および終了時における培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了後、培養液を捨て、10 vol%ホルマリン水溶液で細胞を固定したのち、0.1%クリスタルバイオレット液で染色し、陰性対照群に対する被験物質処理群の細胞密度を単層培養細胞密度計 (Monocellater™、オリンパス販売) で測定し、増殖抑制の指標とした。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験とほぼ同じ試験条件で染色体異常試験を行った。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理については、0.10 mg/mL および 0.030 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で 6 濃度群を設定した。また 24 時間連続処理については、0.060 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で計 6 濃度群を設定した。さらに溶媒(陰性)対照群および陽性対照群も設けた。1 濃度あたり 4 枚のディッシュ(ただし陽性対照群は 2 枚)を用い、そのうち 2 枚は染色体標本を作製し、残りの 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

陽性対照群については、培養液を 10% CS/MEM または S9 反応液と交換した後、MMC (20 μ g/mL) を、S9 mix 非存在下の短時間処理では 15 μ L/ディッシュ(最終濃度: 0.1 μ g/mL)、連続処理では 12.5 μ L/ディッシュ(最終濃度: 0.05 μ g/mL) 添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では CP (1 mg/mL) を 30 μ L/

ディッシュ(最終濃度:10 µg/mL)添加した。なお、MMC および CP はこれらの濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、陰性対照群および被験物質処理群については、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

染色体標本作製のディッシュについては、培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 µg/mL になるように添加した。培養終了後、培養液を捨て 0.02 w/v% EDTA 含有 PBS(Ca²⁺および Mg²⁺ 不含)をディッシュあたり 5 mL 加えてピペティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。細胞懸濁液を遠沈(1400 rpm、5 分)し、上清を捨てた後、3 mL の低張液(0.075 mol/L KCl 水溶液)を加え、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液(メタノール:氷酢酸=3:1(v/v))を 6 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作をさらに 1 回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス(あらかじめフロスト部分に試験番号、コード番号およびスライド番号を記入)上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 4~6 枚のスライド標本作製した。

作製したスライド標本を 70 vol%メタノールに軽く浸漬したのち 3 vol%ギムザ液(pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製)で 8 分染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立って、1 ディッシュから得られた 1 枚の標本を用いて濃度の高い方から分裂指数の分析(500 細胞/標本)を行い、0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、分析可能な最高濃度とそれより低い 2 濃度を観察対象とした。また、標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数が少ない場合は、その数を考慮して観察対象群を決定した。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1 群あたり 200 個(100 細胞/ディッシュ、25 細胞/観察者)の分裂中期細胞(染色体数:23~27 本)について構造異常の種類と数を、1 群あたり 800 個(400 細胞/ディッシュ、100 細胞/観察者)の分裂中期細胞について倍数性細胞(染色体数が 38 本以上)の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く構造異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会¹⁾による分類法に基づいて行った。ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

染色体の構造異常(ギャップを除く)を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法($p < 0.01$ 、片側)により有意差検定を実施した。また、有意差が認められた処理条件については、統計解析ソフトウェア SAS®を用いてコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定($p < 0.01$ 、片側)を行った。同様に細胞毒性により分析細胞数が規定数に満たなかった被験物質処理群についても統計解析ソフトウェア SAS®を用いて有意差検定を行った。これ

らの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

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

本試験期間中に、「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。

試験成績および考察

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果、50%の細胞増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 0.049 mg/mL および 0.015 mg/mL、24 時間連続処理では 0.029 mg/mL と推定された。肉眼観察の結果、処理開始時ではすべての処理条件で 0.15 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時では、すべての処理条件で 0.59 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められた (Figure 1)。

以上の結果より、すべての処理条件で 50%細胞増殖抑制濃度の約 2 倍の濃度 (S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理:0.10 mg/mL および 0.030 mg/mL、24 時間連続処理:0.060 mg/mL) を最高処理濃度として下記の濃度群を設定し、染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.0031、0.0063、0.013、0.025、0.050、0.10 mg/mL (公比 2)

S9 mix 存在下の短時間処理:0.00094、0.0019、0.0038、0.0075、0.015、0.030 mg/mL (公比 2)

24 時間連続処理:0.0019、0.0038、0.0075、0.015、0.030、0.060 mg/mL (公比 2)

なお、肉眼観察の結果、処理開始時に S9 mix 非存在下の短時間処理の 0.10 mg/mL においてのみ培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析の結果、分析可能な最高濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 0.025 mg/mL および 0.015 mg/mL、24 時間連続処理では 0.030 mg/mL となった。したがって各処理条件で、その濃度を含む下記の 3 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.0063、0.013、0.025 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.0038、0.0075、0.015 mg/mL

24 時間連続処理:0.0075、0.015、0.030 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理については構造異常を有する細胞および倍数性細胞について統計学的に有意な増加は認められなかった (Table 1、Table 3)。なお、24 時間連続処理の 0.030 mg/mL 濃度群では細胞毒性のため、倍数性細胞について規定の 800 細胞を分析できなかった。

S9 mix 存在下の短時間処理については、高濃度群 (0.015 mg/mL) で構造異常を有する細胞および倍

数性細胞の統計学的に有意な増加(出現率:12.0%および 4.8%)が認められ、用量依存性も認められた (Table 2)。

陽性の結果が得られた S9 mix 存在下の短時間処理について D_{20} 値を求めたところ、構造異常では 0.029 mg/mL、倍数性細胞では 0.068 mg/mL となった。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および連続処理において染色体の構造異常を誘発し (Table 1、Table 3)、CP は S9 mix 存在下の短時間処理において染色体の構造異常を誘発した (Table 2)。これらの結果より、本実験系の成立が確認された。

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl) は、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験 (試験番号:M-11-042) では陰性の結果が得られている。なお、類縁物質である 2,4-di-*tert*-butylphenol においても phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl) と同様に S9 mix 存在下の短時間処理で染色体の構造異常が誘発される結果²⁾が得られている。また、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³⁾が報告されている。

以上の結果より、phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl) は、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

参考文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」, 朝倉書店, 東京(1988)
- 2) 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
- 3) 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

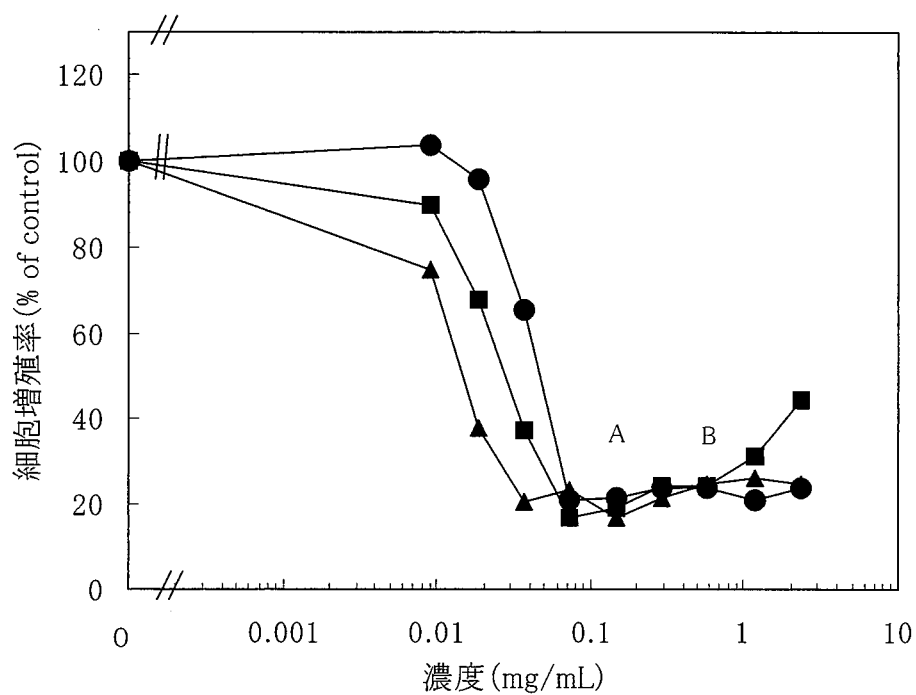


Figure1 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)で CHL/IU 細胞を処理した場合の増殖抑制作用

- : S9 mix 非存在下の短時間処理
- ▲: S9 mix 存在下の短時間処理
- : 24 時間連続処理

肉眼観察の結果、すべての処理条件で処理開始時に 0.15 mg/mL (A) 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時では 0.59 mg/mL (B) 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められた。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylpropyl) (2,4-DTAP) for 6 hours without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	—	6 - (18)	100	NA	100	1	1	0	2	0	0	4	1	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						100	1	2	0	1	1	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)		
						200	2	3	0	3	1	0	9	1	8 (4.0)	6 (3.0)	0 (0.0)		
2,4-DTAP	0.0031	—	6 - (18)	104	NA	not observed													
2,4-DTAP	0.0063	—	6 - (18)	96	NA	100	2	0	1	0	1	0	4	0	4 (4.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						200	2	0	2	0	1	0	5	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0 (0.0)		
2,4-DTAP	0.013	—	6 - (18)	94	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						100	0	2	0	0	0	0	2	2	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						200	1	3	0	0	0	0	4	2	4 (2.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	NA	NA
2,4-DTAP	0.025	—	6 - (18)	74	5.0, 4.8	100	1	2	0	0	0	0	3	1	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						100	1	1	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						200	2	3	0	1	0	0	6	1	6 (3.0)	4 (2.0)	0 (0.0)		
2,4-DTAP	0.050		6 - (18)	13	NA	not made chromosome specimen													
2,4-DTAP	0.10 ^{pb}	—	6 - (18)	13	NA	not made chromosome specimen													
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	NA	NA	100	3	36	38	0	0	10	87	7	49 (49.0)	47 (47.0)	0 (0.0)		
						100	2	34	48	1	0	0	85	0	53 (53.0)	52 (52.0)	1 (0.3)		
						200	5	70	86	1	0	10	172	7	102 (51.0)	99* (49.5)	1 (0.1)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring);

mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid;

MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10

aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Two hundred cells were

analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

pb, Precipitation was observed at the beginning of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylpropyl) (2,4-DTAP) for 6 hours with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	+	6 - (18)	100	NA	100	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	2 (0.5)		
						100	1	2	1	0	0	0	4	1	4 (4.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
						200	2	4	1	0	0	0	7	1	7 (3.5)	5 (2.5)	2 (0.3)		
2,4-DTAP	0.00094	+	6 - (18)	110	NA	not observed													
2,4-DTAP	0.0019	+	6 - (18)	108	NA	not observed													
2,4-DTAP	0.0038	+	6 - (18)	99	NA	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
						200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (0.4)		
2,4-DTAP	0.0075	+	6 - (18)	89	NA	100	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						100	2	1	0	3	0	0	6	0	4 (4.0)	2 (2.0)	1 (0.3)		
						200	2	2	0	3	1	0	8	0	6 (3.0)	4 (2.0)	1 (0.1)	+	+
2,4-DTAP	0.015	+	6 - (18)	50	1.8, 2.4	100	0	2	23	0	0	0	25	1	12 (12.0)	12 (12.0)	23 (5.8)	#	
						100	3	7	20	1	1	0	32	0	14 (14.0)	12 (12.0)	15 (3.8)	#	
						200	3	9	43	1	1	0	57	1	26 (13.0)	24 *(12.0)	38 *(4.8)		
2,4-DTAP	0.030	+	6 - (18)	21	Tox, Tox	not observed because of severe cytotoxicity													
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	4	12	20	1	1	0	38	4	29 (29.0)	27 (27.0)	0 (0.0)		
						100	7	7	18	0	0	0	32	0	26 (26.0)	20 (20.0)	0 (0.0)		
						200	11	19	38	1	1	0	70	4	55 (27.5)	47 *(23.5)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring);

mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid;

CP, cyclophosphamide; Tox, cytotoxic; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Two hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

#, Endoreduplicated cells were observed.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylpropyl) (2,4-DTAP) for 24 hours without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	24	100	NA	100	0	1	0	1	0	0	2	1	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
					100	0	1	1	0	1	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
					200	0	2	1	1	1	0	5	1	5 (2.5)	5 (2.5)	0 (0.0)		
2,4-DTAP	0.0019	24	97	NA	not observed													
2,4-DTAP	0.0038	24	99	NA	not observed													
2,4-DTAP	0.0075	24	96	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
					100	0	4	0	0	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	0 (0.0)		
					200	0	4	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0 (0.0)		
2,4-DTAP	0.015	24	76	NA	100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
					100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
					200	1	2	1	0	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	NA	NA
2,4-DTAP	0.030	24	32	1.0, 0.6	100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
					100	0	1	1	8	0	0	10	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
					200	0	3	1	8	0	0	12	0	5 (2.5)	5 (2.5)	1 (0.1) ⁸⁾		
2,4-DTAP	0.060	24	16	NA	not made chromosome specimen													
MMC	0.05 μg/mL	24	NA	NA	100	6	31	40	1	0	0	78	0	52 (52.0)	50 (50.0)	1 (0.3)		
					100	4	38	37	0	1	0	80	2	47 (47.0)	44 (44.0)	0 (0.0)		
					200	10	69	77	1	1	0	158	2	99 (49.5)	94 * (47.0)	1 (0.1)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring);

mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid;

MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Two hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side). 8) Seven hundred and forty eight cells were analyzed.

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

Appendix 1



試験成績書

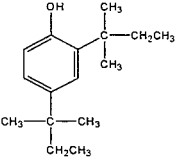
2011年09月27日

東京化成工業株式会社 品質保証
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目1
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		

Appendix 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質の名称(IUPACの命名法による)	2,4-ジ- <i>tert</i> -アミルフェノール		
別名	Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylpropyl)、2,4-Di- <i>tert</i> -amylphenol 2,4-Bis (1,1-dimethylpropyl) phenol、2,4-Di- <i>tert</i> -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℃(凝固点)		
沸点	143℃/0.5 kPa		
常温における性状	白色～ほとんど白色の結晶(20℃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(試験番号:M-11-042)。
	DMSO	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。また、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。
	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(試験番号:M-11-042)。

[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。

Appendix 3

被験物質原体の安定性測定方法

① 使用機器

フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR-8300) 島津製作所

② 測定条件

測定方法 液膜法

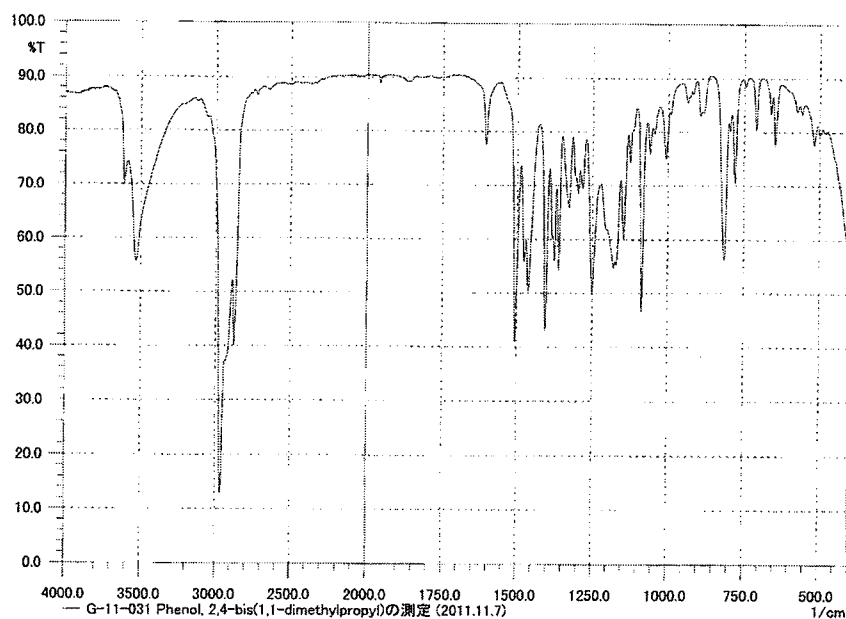
波数範囲 4000~400cm⁻¹

③ 測定方法

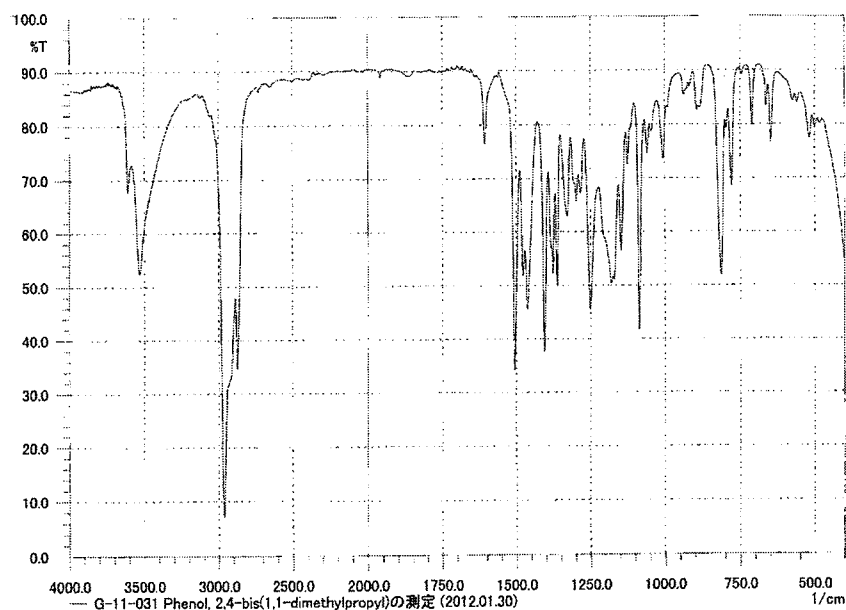
約 40℃ 以下で加温して溶解した被験物質 1 滴を 2 枚の窓板(臭化カリウム)の間に挟み、測定した。対照は測定雰囲気バックグラウンド吸収とした。

Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)の赤外吸収スペクトル測定結果

実験開始前



実験終了後



Appendix 4

投与検体中の被験物質濃度測定法

① 試薬

蒸留水 (HPLC 用)	和光純薬工業 (ロット番号: DCH5318)
アセトニトリル (HPLC 用)	和光純薬工業 (ロット番号: DCH7371 および DCG7377)

② 試薬の調製

移動相 蒸留水 200 mL とアセトニトリル 300 mL を混合した。

③ 使用機器

電子天秤 (R200D)	ザルトリウス
高速液体クロマトグラフ	島津製作所

主要構成: LC-10AT VP (ポンプ)、SIL-10AD VP (オートインジェクタ)、CTO-10AC VP (カラムオーブン)、SPD-10A VP (検出器)、SCL-10A VP (システムコントローラ)、DGU-14A (デガッサ)、C-R7A plus (データ処理装置)

④ 標準溶液の調製

約 40°C で加温して溶かした被験物質約 50 mg を精密に量り、アセトニトリルに溶解して正確に 50 mL とした。この液 1 mL を正確に採り、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした (10 µg/mL)。10 µg/mL の液を 1 mL 正確に採り、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に 20、10 および 10 mL とし、標準溶液 (約 0.5、1 および 4 µg/mL、各濃度 n=1) を調製した。

⑤ 試料溶液の調製

投与検体の 1 mL を正確に採り、アセトニトリルで適宜希釈し、試料溶液 (約 1 µg/mL) を調製した。試料溶液は、投与検体の採取から n=3 で調製した。

⑥ 検量線の作成および投与検体中被験物質濃度の算出

試料溶液および標準溶液を高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により測定した。標準溶液は n=3 で測定し、得られた 2,4-DTAP のピーク面積と調製濃度を基に、最小二乗法により検量線を作成した。試料溶液は各 n=1 で測定し、得られた 2,4-DTAP のピーク面積から、先の検量線を用いて、試料溶液中の 2,4-DTAP 濃度を求めた。さらに、希釈計数を乗じて投与検体中の 2,4-DTAP 濃度を算出し、調製濃度に対する割合 (%) および各測定濃度の平均値に対するばらつき (%) を算出した。

⑦ HPLC 測定条件

検出器	紫外分光光度計 (測定波長 225 nm)
分析カラム	XTerra RP18 (内径 3.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 3.5 µm、Waters)
移動相	蒸留水/アセトニトリル混液 (4:6 v/v)
流量	0.8 mL/min
カラム設定温度	40°C
試料注入量	20 µL
オートインジェクタ洗浄液	アセトニトリル
システムの適合性	測定開始前および測定終了後に標準溶液 (1.000 µg/mL) を 1 回ずつ測定し、ピーク保持時間および強度 (ピーク面積) の変動 (測定開始前に対する測定終了後の偏差%) が許容基準内 (ピーク保持時間が ±3.0% 以内、ピーク強度が ±5.0% 以内) であることを確認した。

⑧ 数値の取り扱い

被験物質の秤量:有効数字 3 桁以上

標準物質の秤量:有効数字 4 桁以上

投与検体の濃度:有効数字 3 桁(有効数字 4 桁目を四捨五入)

標準溶液の濃度:有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の濃度およびそれらの平均値:有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の含量(%),ばらつき(%),および残存率(%)ならびにそれらの平均値:

小数点以下第 1 位(小数点以下第 2 位を四捨五入)

Appendix 5

安定性試験結果

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

ロット番号: XPX4F

媒体: DMSO

調製年月日 2011年11月8日

測定年月日 A 2011年11月8日(調製直後)

B 2011年11月9日(調製後24時間)

保存条件 室温、遮光

調製濃度 (mg/mL)	A				B				
	試料 番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 ^{a)} (%)	ばらつき ^{b)} (%)	試料 番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 ^{a)} (%)	ばらつき ^{b)} (%)	残存率 ^{c)} (%)
0.0100	1	0.01058	105.8	100.3	7	0.01063	106.3	100.0	100.8
	2	0.01055	105.5	100.0	8	0.01068	106.8	100.5	101.2
	3	0.01054	105.4	99.9	9	0.01058	105.8	99.5	100.3
	平均	0.01055	105.6		平均	0.01063	106.3		100.8
250	4	254.5	101.8	100.4	10	253.7	101.5	99.9	100.1
	5	253.1	101.2	99.8	11	255.3	102.1	100.5	100.7
	6	253.0	101.2	99.8	12	253.1	101.2	99.6	99.8
	平均	253.5	101.4		平均	254.0	101.6		100.2

a): 各測定時の測定濃度／調製濃度×100

b): 各測定時の測定濃度／各測定時の平均測定濃度×100

c): 各測定時の測定濃度／初回の平均測定濃度×100

安定性の判断基準(溶液検体)

調製直後および保管後の平均含量がそれぞれ調製濃度の90.0～110.0%以内であり、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の90.0～110.0%以内であり、かつ、調製直後の測定平均値に対する保管後の残存率の平均値が90.0%以上を示す期間とする。

信頼性保証書

表題 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)のチャイニーズ・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

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 10 月 31 日	2011 年 10 月 31 日
試験計画書変更書		
G-11-031-No.1	2011 年 11 月 30 日	2011 年 11 月 30 日
G-11-031-No.2	2011 年 12 月 13 日	2011 年 12 月 13 日
被験物質原体の安定性(実験開始前)	2011 年 11 月 7 日	2011 年 11 月 7 日
溶媒中の安定性(調製直後)	2011 年 11 月 8 日	2011 年 11 月 8 日
検体調製および細胞処理	2011 年 12 月 5 日	2011 年 12 月 5 日
標本観察	2012 年 1 月 6 日	2012 年 1 月 6 日
報告書草案・生データ	2012 年 2 月 21～23 日	2012 年 2 月 23 日
最終報告書	2012 年 3 月 15 日	2012 年 3 月 15 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について」(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 15 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

