

最終報告書

表 題：4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールのは乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

試験番号：S R 0 8 2 2 5

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙	1
目次	5
要約	9
緒言	10
材料および方法	10
成績	21
考察	23
参考資料	24

Tables and Figure

Table 1	Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08225)	26
Figure 1	Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08225)	27
Table 2	Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR08225)	28
Table 3-1	Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (6 hours treatment without metabolic activation) (SR08225)	29
Table 3-2	Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (6 hours treatment with metabolic activation) (SR08225)	30
Table 3-3	Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (24 hours treatment without metabolic activation) (SR08225)	31

Table 4	Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (confirmatory test) (SR08225) ·····	32
Table 5	Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (24 hours treatment without metabolic activation) (confirmatory test) (SR08225) ·····	33
Table 6	Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU with metabolic activation (confirmatory test 2) (SR08225) ·····	34
Table 7	Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (6 hours treatment with metabolic activation) (confirmatory test 2) (SR08225) ·····	35

要 約

4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて検討した。試験は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列で実施した。

予備試験 [細胞増殖抑制試験 : 10.2~2620 µg/mL (10 mM 相当値)] の結果、各試験系列で 50% 以上の細胞増殖抑制が認められた。IC₅₀ 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 15.1 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 29.0 µg/mL および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 14.4 µg/mL であった。被験物質の析出が、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 328 µg/mL 以上の用量ならびに短時間処理法の代謝活性化による場合の 164 µg/mL 以上の用量で観察された。被験物質処理による培養液 pH への影響は、いずれの試験系列にも観察されなかった。

本試験 (染色体異常試験) は、予備試験の結果に基づき、各試験系列とも IC₅₀ より高用量を最高用量とした試験群を設定した。また、短時間処理法の代謝活性化による場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合については確認試験を実施した。その結果、染色体の構造異常および数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合 [評価用量 : 2.5~16.7 µg/mL (本試験)] および連続処理法の 24-0 h 処理による場合 [評価用量 : 2.5~10 µg/mL (本試験)、4~15 µg/mL (確認試験)] のいずれの用量においても 5% 未満であった。一方、短時間処理法の代謝活性化による場合 [評価用量 : 5~33.3 µg/mL (本試験)、10~33.3 µg/mL (確認試験 2)] では、細胞毒性用量で構造異常および数的異常の出現率は 5~10% の範囲となり増加がみられ、また用量との関連性が認められたことから疑陽性と判断した。なお、染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群において、染色体異常誘発性の各評価用量に被験物質の析出あるいは培養液 pH への影響はみられなかった。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は、本試験および確認試験ともに各試験系列で明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールのほ乳類の培養細胞に対する染色体異常誘発性は、本試験条件において、代謝活性化系の存在下で疑陽性と判断した。

緒 言

4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いる染色体異常試験を実施した。

材料および方法

1. 被験物質

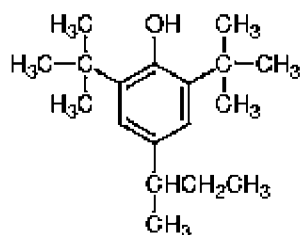
名称 : 4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール

英名 : 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol^{1), 2)}

CAS No. : 17540-75-9

官報公示整理番号 : 化審法 ; (3)-540³⁾
安衛法 ; 公表化学物質³⁾

構造式 :



分子式 : C₁₈H₃₀O²⁾

分子量 : 262.437²⁾

物理化学的性質 : 形状 ; 固体³⁾

沸点/沸騰範囲 ; 141°C/1.3kPa³⁾

融点 ; 24°C (凝固点)³⁾

引火点 ; >110°C³⁾

密度 ; 0.90³⁾

溶解性 ; 試験施設において、蒸留水 (日本薬局方注射用水)、
0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液、
ジメチルスルホキシドおよびアセトンを用いて調製

確認を行った。確認内容を、2. 被験物質の調製(10頁)に記載した。

純度(GC)	: 99.0% (Appendix 1)
入手量	: 500 g (関連試験と共通)
保存条件 ³⁾	: 密閉し、冷暗所(実測範囲: 2~8℃)に保存した。また、火気や熱源等の着火源から遠ざけ保存した。
保存場所	: 被験物質保存室および変異原性試験室
保存期間	: 2009年4月28日(受入)~2010年9月13日(最終使用日)
安定性および反応性	: 実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、被験物質の安定性について確認した(Appendix 2)。
取扱上の注意	: 換気のよい場所で取扱った。適切な保護具を着用し、粉じんが飛散しないように取扱った。
残余被験物質の処置	: 安定性分析のための製造者への送付分を除き、残余被験物質は焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

2. 被験物質の調製

試験施設において、被験物質の調製確認を行った。被験物質は蒸留水(日本薬局方注射用水、50 mg/mL の濃度まで検討)および0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液(50 mg/mL の濃度まで検討)とは混合せず、調製困難であった。ジメチルスルホキシドおよびアセトンでは500 mg/mL の濃度まで溶解し、反応性はみられなかった。以上のことから、当該試験の溶媒としてジメチルスルホキシドを選択した。

被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシド[ロット番号 TA026(予備試験および本試験)およびWF032(確認試験および確認試験2)、株式会社同仁化学研究所]を用いて溶解ならびに希釈し、所定の濃度に調製した。

予備試験では262 mg/mL 調製液を調製し、262 mg/mL 調製液から公比2の段階希釈により131、65.5、32.8、16.4、8.19、4.09、2.05および1.02 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では4.0 mg/mL 調製液を調製し、4.0 mg/mL 調製液から公比2の段階希釈により2.0、1.0、0.5および0.25 mg/mL 調製液を調製した。また、4.0 mg/mL 調製液より3.33、2.67、1.67および1.33 mg/mL 調製液を調製した。

確認試験では1.5 mg/mL 調製液を調製し、1.5 mg/mL 調製液より1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.8、0.6および0.4 mg/mL 調製液を調製した。

確認試験 2 では 4.0 mg/mL 調製液を調製し、4.0 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 2.0 および 1.0 mg/mL 調製液を調製した。また、4.0 mg/mL 調製液より 3.33 および 2.67 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験、本試験、確認試験および確認試験 2 とともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、予備試験および本試験では調製後 1.2 時間以内に、確認試験では調製後 0.7 時間以内に、確認試験 2 では調製後 0.5 時間以内に使用した。

調製はクリーンベンチ内で行い、調製に際してはマスク、手袋、保護メガネおよび白衣を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、ジメチルスルホキシド[ロット番号 TA026(使用期限 2011 年 10 月、予備試験および本試験)および WF032(使用期限 2013 年 3 月、確認試験および確認試験 2)、株式会社同仁化学研究所]をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

ジメチルスルホキシドは、プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した。

4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシン C(ロット番号 498AFJ、使用期限 2010 年 10 月、協和発酵工業株式会社)を使用した。マイトマイシン C は、購入後室温で保存し、日本薬局方注射用水(ロット番号 7C95、株式会社大塚製薬工場)を用いて 5 および 10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した。購入したマイトマイシン C は、1 瓶中に日局マイトマイシン C を 2 mg(力価)含有しており、調製の際には 1 mg(力価)を 1 mg として換算した。

代謝活性化法による場合の陽性対照物質として、ベンゾ[a]ピレン[ロット番号 KLM1182、含量 101.0%、使用期限 2009 年 8 月(購入より 5 年)、和光純薬工業株式会社、本試験]および 3,4-ベンゾピレン[ロット番号 8JB8G、含量 98.2%、使用期限 2014 年 7 月(購入より 5 年)、東京化成工業株式会社、確認試験 2]を使用した。ベンゾ[a]ピレンおよび 3,4-ベンゾピレンは、購入後冷所(2~8℃)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 TA026 および WF032、株式会社同仁化学研究所)を用いて、それぞれ 1 mg/mL の濃度に調製した。

陽性対照物質の各調製液は-20℃以下で分注凍結保存し、調製後 1 年以内に試験に使用した(使用期限は調製後 1 年)。保存調製液は解凍後 0.7 時間以内に使用した。

陽性対照物質は、それぞれプレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した。

5. 試験系

試験系として、2005 年 5 月 17 日に大日本製薬株式会社より継代数 14 で入手した CHL/IU を使用した。CHL/IU は、雌の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は 25 本(2n=22)、倍加時間の測定値は 13.3 時間(予備試験および本試験)および 15.0 時間(確認試験および確認試験 2)である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。また、供試細胞と同時に凍結保存した細胞を用いて蛍光染色法によりマイコプラズマチェックを行い、陰性であることを確認した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて 1×10^6 cells/mL 細胞浮遊液を調製し、1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内に保存した。解凍後は、75 cm² 培養フラスコを用いて 5.0%CO₂、37.0℃に設定した CO₂ インキュベーター(MCO-175、三洋電機株式会社)内で培養し、3 または 4 日毎に継代を行った。試験では、継代数 17(予備試験)、21(本試験)、19(確認試験)あるいは 22(確認試験 2)の細胞を使用した。

6. 培地

イーグル MEM 培地を以下の割合で混合し調製した。

イーグル MEM 培地 (Code 05900、ロット番号 603901、632001 および 634004、カナマイシンおよびフェノールレッド含有、日水製薬株式会社)9.4 g を日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、8L88 および 9K88、株式会社大塚製薬工場)に溶解し全量を 1 L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの 7.5%炭酸水素ナトリウム(試薬特級、ロット番号 905X1946、関東化学株式会社)溶液で pH7.2~7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液(試薬特級、L-グルタミン：ロット番号 LTP5417、PEH6211 および CDK3266、和光純薬工業株式会社)を 0.292 g/L となるように添加した。さらに牛胎児血清(ロット番号 314621 および 672248、GIBCO)を最終調製量の 10%になるように加えた。なお、牛胎児血清は 56℃で 30 分間非働化した後に使用した。オートクレーブ滅菌後は、無菌的に調製した。

7. S9 mix

S9 mix はキッコーマン株式会社より購入し[ロット番号 CAM-595(予備試験および本試験、2009 年 4 月 17 日製造)および CAM-618(確認試験 2、2010 年 7 月 30 日製造)]、-80℃以下で凍結保存したものを、製造日より 4 ヶ月以内(使用期限：製造後 6 ヶ月)に使用した。

S9 mix は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製した S9 1.05 mL に、コファクターミックス 2.45 mL を加え、次表の組成に調製されたものである。

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	[キッコーマン株式会社製 RAA-595(CAM-595)、および RAA-618(CAM-618) : S9 中蛋白含量 26.53 mg/mL (CAM-595)および 27.22 mg/mL (CAM-618)]	0.3 mL
MgCl ₂	[和光純薬工業株式会社 SDN0075]	5 μmol
KCl	[和光純薬工業株式会社 PEI.2740(CAM-595)および CDL2642(CAM-618)]	33 μmol
G-6-P	[オリエンタル酵母工業株式会社 118805(CAM-595) および 118001(CAM-618)]	5 μmol
NADP	[オリエンタル酵母工業株式会社 045818(CAM-595) および 045913(CAM-618)]	4 μmol
HEPES 緩衝液	[株式会社同仁化学研究所 PE026]	4 μmol
蒸留水		0.1 mL

8. 試験方法

(1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)

1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列について実施した。

被験物質の最高用量は、10 mM 相当値(被験物質の分子量 : 262.437)の 2620 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 9 用量(2620、1310、655、328、164、81.9、40.9、20.5 および 10.2 μg/mL)の試験群を設定した。更に、試験系列毎に陰性対照群を設定した。

各群につき 2 枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

直径 60 mm の培養プレートに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 0.4×10^4 cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では 0.6×10^4 cells/mL の細胞浮遊液をそれぞれ 5 mL ずつ播種し、5.0% CO₂、37.0°C に設定した CO₂ インキュベーター内で培養した。

3) 試験液の処理

a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、培養液3 mLに対して試験液を30 μ Lの割合で試験チューブ内で混合し、その混合液3 mLをプレートに添加し6時間培養した。6時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーのDulbeccoのリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地5 mLを加えて更に18時間培養した。

b 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、S9 mix 0.5 mLおよび培養液2.5 mLの混和液に対し試験液を30 μ Lの割合で試験チューブ内で混合し(S9の最終濃度約5 vol%)、その混合液3 mLをプレートに添加し6時間培養した。6時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーのDulbeccoのリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地5 mLを加えて更に18時間培養した。

c 連続処理法の24-0 h処理による場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、培養液5 mLに対して試験液を50 μ Lの割合で試験チューブ内で混合し、その混合液5 mLをプレートに添加した。更に、24時間培養した。

4) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

5) 被験物質による培養液pHへの影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質による培養液 pH への影響は無いものと判断した。培養液色の変化が認められた場合には、pH 試験紙(東洋濾紙株式会社)で培養液の pH を確認した。

6) 細胞増殖率の測定および50%細胞増殖抑制濃度(IC_{50})の算出

培養終了後、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーのDulbeccoのリン酸緩衝液で細胞を洗い、10%ホルマリンで約10~15分間固定した後、0.1 w/v%クリスタルバイオレットで約10~15分間の染色を行った。染色後、水道水を入れた水槽内でプレートを洗浄して風乾させた。陰性対照群のプレートを100%として、各プレートの細胞増殖率を単層培養細胞密度測定装置(MONOCELLATER II、東洋測器株式会社)で測定した。細胞増殖率が50%以下まで低下した場合には、用量を対数化した回帰計算により50%細胞増殖抑制濃度(IC_{50})を算出した。

(2) 本試験および確認試験

1) 試験群

a 本試験

予備試験の結果、各試験系列で 50%以上の細胞増殖抑制がみられたことから、各試験系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量とした計 6 用量を設定した。

b 確認試験

本試験の結果、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、評価最高用量の細胞増殖率が 50%を大きく上回り 74.0%であったことから、50%増殖抑制を示すことが想定される用量付近の用量間隔を狭めた確認試験を実施した。確認試験では、15 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公差 1 あるいは 2 $\mu\text{g/mL}$ で低下させた計 9 用量を設定した。

c 確認試験 2

本試験の結果、短時間処理法の代謝活性化による場合では、強い細胞増殖抑制がみられた用量ではあるものの評価最高用量において数的異常の出現率に軽度の増加が認められたことから、再現性確認のための確認試験 2 を実施した。確認試験 2 では、本試験での試験用量のうち高用量 5 用量と同じ用量を設定した。

本試験、確認試験および確認試験 2 とともに、陽性対照群を除く各群には被験物質の細胞増殖への影響を確認するためのサテライト群 2 枚を加えた 4 枚のプレートを使用し、陽性対照群では 2 枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1) 予備試験、2) 細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 試験液の処理

a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

8. 試験方法、(1) 予備試験、3) 試験液の処理、a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。

b 短時間処理法の代謝活性化による場合

8. 試験方法、(1) 予備試験、3) 試験液の処理、b 短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。

c 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

8. 試験方法、(1) 予備試験、3) 試験液の処理、c 連続処理法の 24-0 h 処理による場合と同様の方法で実施した。

4) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1) 予備試験、4) 被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

5) 被験物質による培養液pHへの影響の有無の確認

8. 試験方法、(1) 予備試験、5) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。

6) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1) 予備試験、6) 細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出と同様の方法で実施した。IC₅₀ は算出しなかった。

7) 染色体標本の作製

培養終了の約 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2 µg/mL のコルセミド(ロット番号 571750 および 771425、GIBCO)を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02% EDTA-0.25%トリプシン(0.5M EDTA : ロット番号 1390894、GIBCO、2.5%トリプシン : ロット番号 440795 および 690264、GIBCO)で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を同上の遠沈管に回収して 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム (ロット番号 810X1990、関東化学株式会社)を加え、穏やかにピペッティングを繰り返しながら常温で 30 分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液(メタノール : 酢酸=3 : 1、メタノール : ロット番号 004W1106 および 110N1127、関東化学株式会社、酢酸 : ロット番号 TSN6991 および EPQ3760、和光純薬工業株式会社)を加えて細胞を固定した後、1000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を 3 回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥させた。各プレートより、2 枚(細胞毒性により、得られた細胞が少ない用量については 1 枚)の染色体標本を作製した。

各スライドは、2%ギムザ液[ギムザ液 : ロット番号 WL188 および KH933、和光純薬工業株式会社、インスタント燐酸緩衝液(pH7.2) : ロット番号 R840(本試験)、株式会社 三菱化学ヤトロンならびに R942(確認試験および確認試験 2)、三菱化学メディアエンス株式会社]で 20 分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤(マリノール、ロット番号 0701201、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

8) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき 1 枚あるいは 2 枚(分裂中期細胞が少ない場合)の標本を選択してブラインド化した。以下の観察用量を選択した。

a 本試験

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では、細胞増殖率が 50%未満で標本の観察が可能な最高用量を高用量とする 5 用量を選択し、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では観察可能な最高用量を高用量とする 3 用量を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 2.5、5、10、13.3 および 16.7 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では 5、10、20、26.7 および 33.3 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 2.5、5 および 10 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量を選択した。

b 確認試験

細胞増殖率が 50%未満である用量を含む全用量を選択した。

c 確認試験 2

細胞増殖率が 50%未満で標本の観察が可能な最高用量を高用量とする 4 用量、すなわち 10、20、26.7 および 33.3 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量を選択した。

総合倍率 600 倍の顕微鏡(BX51TF、オリンパス株式会社)で、1 枚あたり 100 個の分裂中期像(分裂中期像が少ない場合には観察可能な個数)を選択して観察し、以下の分類に従って染色体異常の判定を行った。構造異常については 25 ± 2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

①構造異常(structural aberration)

・ 染色分体切断(ctb: chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合に染色分体切断として判定した。

・ 染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の 2 ヶ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。

・ 染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。

・ 染色体交換(csc: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

- ・その他 (others)

その他の構造異常として、断片化 (fragmentation) がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

②ギャップ (gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分 (染色性が全くみられない部分) で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

③数的異常 (numerical aberration)

- ・倍数体 (poly: polyploid)

染色体数 (25 ± 2) が倍加し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。

- ・その他 (others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加 (end: endoreduplication) と判定し、倍数体とは区別し計数した。

9) 観察結果の集計方法

プレート毎に以下の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常 (1 個の細胞に複数の構造異常がある場合にも、構造異常を有する細胞数は 1 として計数) および数的異常を有する細胞の total について、それぞれ出現率 (%) を求めた。出現率 (%) は、観察した細胞数 (分裂中期像の数) に対する出現数の百分率で算出した。

①構造異常について

- ・ctb: 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte: 染色分体交換をもつ細胞数
- ・csb: 染色体切断をもつ細胞数
- ・cse: 染色体交換をもつ細胞数
- ・others: その他の構造異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの構造異常をもつ細胞数

②ギャップについて

- ・gap: ギャップをもつ細胞数

③数的異常について

- ・poly: 倍数体の細胞数
- ・others: その他の数的異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が 10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは 5%以上増加する結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

なお、短時間処理法の代謝活性化による場合では構造異常あるいは数的異常の出現頻度に 5%あるいは 10%を超える増加がみられたが、非常に強い細胞毒性がみられる用量であることから、「染色体異常試験データ集、改定 1998 年版」⁴⁾に記載の染色体異常試験結果の判定を参考に、5～10%の出現率に適用される疑陽性との判定を採用した。

D₂₀ 値(細胞の 20%に異常が認められる濃度)については、陽性と判定した試験系列はなく算出を行わなかった。

成 績

1. 予備試験

細胞増殖率の結果を Table 1 および Figure 1 に、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 1 に示す。

各試験系列で 50% を超える細胞増殖抑制が認められた。IC₅₀ 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 15.1 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 29.0 µg/mL および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 14.4 µg/mL であった。

被験物質の析出が、試験液処理開始時および処理終了時ともに短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 328 µg/mL 以上の用量で、短時間処理法の代謝活性化による場合の 164 µg/mL 以上の用量で観察された。

被験物質処理による培養液 pH への影響は、いずれの試験系列にも観察されなかった。

2. 本試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 2 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 3-1～3-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50% を越える細胞増殖抑制が、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 16.7 µg/mL 以上の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合では 26.7 µg/mL 以上の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 13.3 µg/mL 以上の用量で認められた。

被験物質の析出および被験物質処理による培養液 pH の変化は、いずれの試験系列にも観察されなかった。

染色体の構造異常および数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：2.5～16.7 µg/mL)および連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量：2.5～10 µg/mL)では、いずれの用量においても 5% 未満であった。短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：5～33.3 µg/mL)では、構造異常の出現率はいずれの用量 5% 未満であったが、数的異常の出現頻度では強い細胞増殖抑制がみられた 33.3 µg/mL において 8.0% と軽度の増加が認められた。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 64.0%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 54.0%および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 60.5%であった。

3. 確認試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 4 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 5 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50%を越える細胞増殖抑制が 15 µg/mL の用量で認められた。

被験物質の析出および被験物質処理による培養液 pH の変化は観察されなかった。

染色体の構造異常および数的異常の出現率は(評価用量：4～15 µg/mL)、いずれの用量においても 5%未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、66.5%であった。

4. 確認試験 2

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 6 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 7 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50%を越える細胞増殖抑制が 33.3 µg/mL 以上の用量で認められた。

被験物質の析出および被験物質処理による培養液 pH の変化は観察されなかった。

染色体の構造異常および数的異常の出現率は(評価用量：10～33.3 µg/mL)、構造異常では 26.7 µg/mL で 5.0%および 33.3 µg/mL で 9.5%と 5%以上であり、数的異常では 26.7 µg/mL で 5.0%および 33.3 µg/mL で 18.5%と 5%あるいは 10%以上であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、42.5%であった。

考 察

4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて検討した。

本試験 (染色体異常試験) 用量は、予備試験 (細胞増殖抑制試験) の結果に基づき各試験系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量に設定した。本試験の結果、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では評価最高用量の細胞増殖率が 50% 以下とならなかったこと、また、短時間処理法の代謝活性化による場合では、強い細胞増殖抑制がみられた用量ではあったものの数的異常の出現率に軽度の増加が認められたことからそれぞれの試験系列について確認試験および確認試験 2 を実施した。

本試験、確認試験および確認試験 2 において染色体異常誘発性を検討した結果、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、構造異常および数的異常ともにその出現率は全て 5% 未満であり陰性と判断した。一方、短時間処理法の代謝活性化による場合では、数的異常の出現率は、33.3 $\mu\text{g/mL}$ の用量で本試験と確認試験 2 でそれぞれ 8.0% および 18.5% と増加が認められ、確認試験 2 では 26.7 $\mu\text{g/mL}$ の用量においても 5.0% と軽度の増加が認められた。26.7 および 33.3 $\mu\text{g/mL}$ の用量はいずれも細胞毒性用量であるが、特に 33.3 $\mu\text{g/mL}$ の用量では非常に強い細胞毒性がみられたことから当該用量の値は用量との関連性を確認するための参考値とし、数的異常について疑陽性と判断した。また、構造異常では、確認試験 2 において 26.7 および 33.3 $\mu\text{g/mL}$ の用量で 5~10% の範囲の出現率が用量との関連性をもって認められ、疑陽性と判断するのが適当と考えられた。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールのほ乳類の培養細胞に対する染色体異常誘発性は、本試験条件において、代謝活性化系の存在下で疑陽性と判断した。

参考資料

- 1) オンラインカタログ；東京化成工業株式会社
- 2) 日本化学物質辞書 Web；独立行政法人 科学技術振興機構
- 3) 製品安全データシート(2008 年 10 月 1 日改訂)、東京化成工業株式会社
- 4) 祖父尼俊雄監修、「染色体異常試験データ集、改定 1998 年版」、株式会社 エル・アイ・シー

Table 1 Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08225)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	10.2	89 , 90 (89.5)	92 , 96 (94.0)	79 , 77 (78.0)
	20.5	20 , 18 (19.0)	76 , 78 (77.0)	21 , 21 (21.0)
	40.9	19 , 20 (19.5)	23 , 23 (23.0)	23 , 21 (22.0)
	81.9	17 , 21 (19.0)	20 , 22 (21.0)	23 , 22 (22.5)
	164	20 , 22 (21.0)	22 *, 20 * (21.0)	24 , 18 (21.0)
	328	19 *, 28 * (23.5)	22 *, 27 * (24.5)	25 *, 21 * (23.0)
	655	19 *, 20 * (19.5)	20 *, 19 * (19.5)	21 *, 21 * (21.0)
	1310	19 *, 21 * (20.0)	18 *, 16 * (17.0)	20 *, 21 * (20.5)
	2620	22 *, 17 * (19.5)	19 *, 23 * (21.0)	21 *, 23 * (22.0)
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		15.1	29.0	14.4

a : Dimethyl sulfoxide

* : Precipitation at the beginning and end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

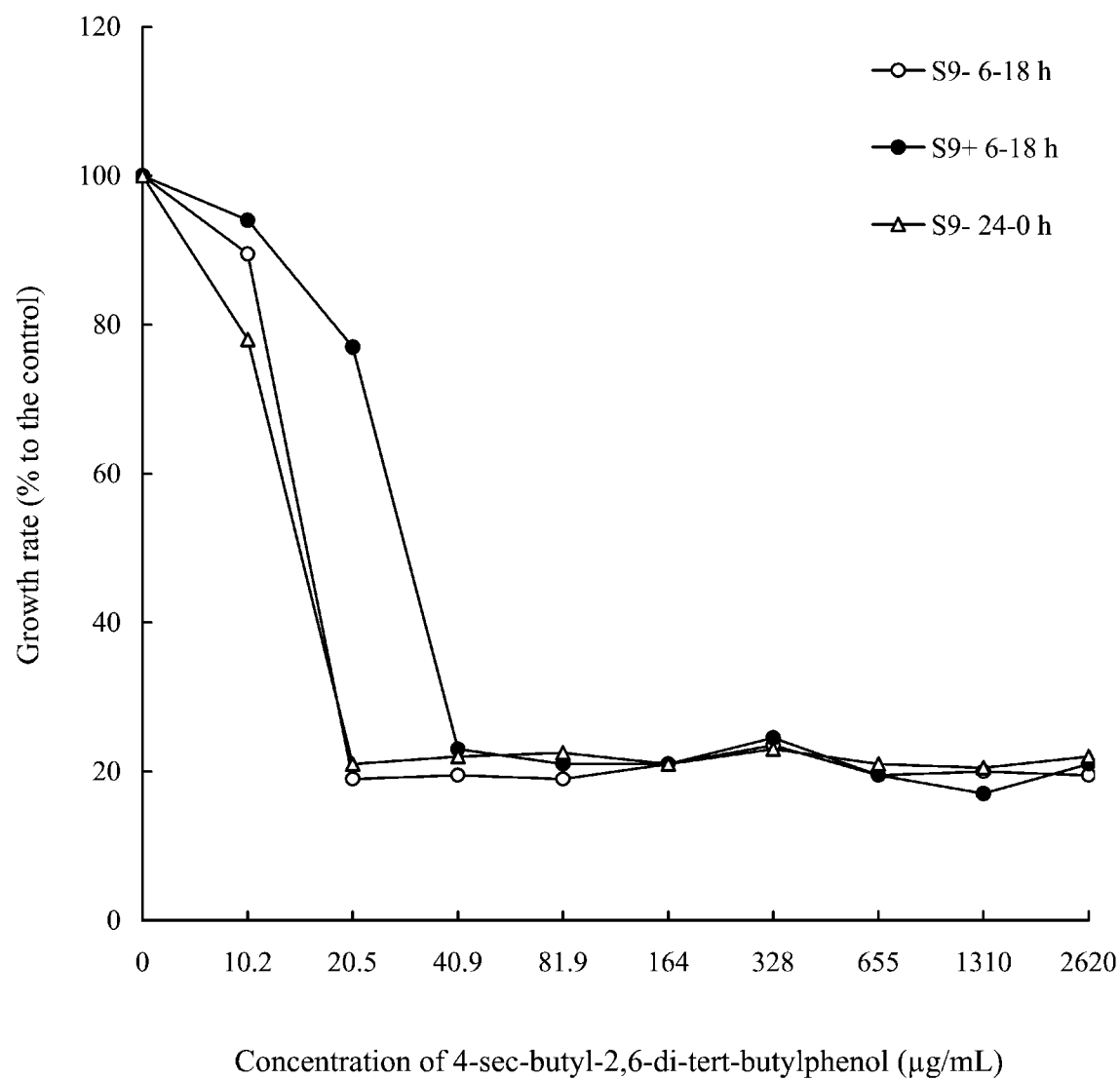


Figure 1 Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08225)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR08225)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	2.5	91 , 99 (95.0)	-	86 , 97 (91.5)
	5	89 , 105 (97.0)	98 , 95 (96.5)	96 , 88 (92.0)
	10	90 , 96 (93.0)	88 , 88 (88.0)	78 , 70 (74.0)
	13.3	79 , 78 (78.5)	-	33 , 29 (31.0)
	16.7	32 , 40 (36.0)	-	14 , 11 (12.5)
	20	15 , 14 (14.5)	72 , 74 (73.0)	12 , 8 (10.0)
	26.7	-	46 , 44 (45.0)	-
	33.3	-	28 , 25 (26.5)	-
	40	-	15 , 18 (16.5)	-

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation and changes of pH in culture medium were not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

- : Blank

Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (6 hours treatment without metabolic activation) (SR08225)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	—	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	—
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
		4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	2.5	95.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	—
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
			5	97.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			10	93.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			13.3	78.5	100	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			16.7	36.0	100	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4	
					100	0	1	0	0	0	1	0	2	0	2	
					200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0	5	1	6 (3.0)	
			20	14.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mitomycin C	0.1		100	8	64	0	1	0	67	0	0	0	0	+
					100	8	56	2	1	0	61	0	0	0	0	
					200	16	120	2	2	0	128 (64.0)	0	0	0	0 (0.0)	

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (6 hours treatment with metabolic activation) (SR08225)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	+	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)	
		4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	5	96.5	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	±
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			10	88.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)	
			20	73.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	2	1	3 (1.5)	
			26.7	45.0	100	1	3	0	0	0	4	0	1	1	2	
					100	0	3	0	0	0	3	0	2	2	4	
					200	1	6	0	0	0	7 (3.5)	0	3	3	6 (3.0)	
			33.3	26.5	100	1	3	0	0	0	3	0	4	5	9	
					100	1	1	0	0	0	1	0	2	5	7	
					200	2	4	0	0	0	4 (2.0)	0	6	10	16 (8.0)	
			40	16.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Benzo[a]pyrene	10		100	13	45	0	1	0	49	0	0	0	0	+
					100	18	50	0	2	0	59	0	1	0	1	
					200	31	95	0	3	0	108 (54.0)	0	1	0	1 (0.5)	

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative ±, equivocal +, positive

- : Blank

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (24 hours treatment without metabolic activation) (SR08225)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (μg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
24-0	—	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)	
		4-sec-Butyl-2,6-di- tert-butylphenol	2.5	91.5	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	—
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
			5	92.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			10	74.0	100	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	3	0	3 (1.5)	
			13.3	31.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			16.7	12.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			20	10.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mitomycin C	0.05		100	8	59	0	0	0	63	0	1	0	1	+
					100	7	55	0	0	0	58	0	0	0	0	
					200	15	114	0	0	0	121 (60.5)	0	1	0	1 (0.5)	

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank

Table 4 Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (confirmatory test) (SR08225)

Growth rate (% to the control)		
Group	Concentration (µg/mL)	S9-
		24-0 h (Mean)
Control ^a	—	100 , 100 (100.0)
4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	4	100 , 96 (98.0)
	6	98 , 97 (97.5)
	8	90 , 97 (93.5)
	10	92 , 88 (90.0)
	11	75 , 79 (77.0)
	12	74 , 90 (82.0)
	13	59 , 64 (61.5)
	14	57 , 53 (55.0)
	15	42 , 37 (39.5)

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation and change of pH in culture medium were not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

Table 5 Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (24 hours treatment without metabolic activation) (confirmatory test) (SR08225)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
24-0	-	Control ^b	—	100.0	100	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	-
					100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
					200	1	0	1	0	0	2 (1.0)	0	1	0	1 (0.5)	
		4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	4	98.0	100	1	1	0	0	0	2	0	1	0	1	-
					100	2	0	0	0	0	2	0	3	0	3	
					200	3	1	0	0	0	4 (2.0)	0	4	0	4 (2.0)	
			6	97.5	100	1	0	0	0	0	1	0	2	0	2	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	2	0	2 (1.0)	
			8	93.5	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			10	90.0	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			11	77.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)	
			12	82.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)	
			13	61.5	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					100	3	0	0	0	0	3	0	1	0	1	
					200	4	0	0	0	0	4 (2.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			14	55.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			15	39.5	25	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	
					14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Mitomycin C	0.05		239	1	0	1	0	0	1 (0.4)	0	3	0	3 (1.3)	+
					100	18	59	1	0	0	69	0	0	0	0	
					100	12	55	0	2	0	64	0	0	0	0	
					200	30	114	1	2	0	133 (66.5)	0	0	0	0 (0.0)	

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

Table 6 Effects of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol on growth rate of CHL/IU with metabolic activation (confirmatory test 2) (SR08225)

Growth rate (% to the control)		
Group	Concentration (µg/mL)	S9+
		6-18 h (Mean)
Control ^a	–	100 , 100 (100.0)
4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	10	97 , 88 (92.5)
	20	90 , 79 (84.5)
	26.7	61 , 54 (57.5)
	33.3	27 , 25 (26.0)
	40	16 , 14 (15.0)

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation and change of pH in culture medium were not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

Table 7 Results of the chromosomal aberration test of 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (6 hours treatment with metabolic activation) (confirmatory test 2) (SR08225)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	+	Control ^b	—	100.0	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	-
					100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
					200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0	0	0	0 (0.0)	
		4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol	10	92.5	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	±
					100	3	1	0	0	0	4	0	0	0	0	
					200	3	1	0	0	0	4 (2.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			20	84.5	100	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	
					100	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
					200	1	1	0	1	0	3 (1.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			26.7	57.5	100	3	4	0	0	0	6	1	0	6	6	
					100	1	2	1	0	0	4	0	1	3	4	
					200	4	6	1	0	0	10 (5.0)	1	1	9	10 (5.0)	
			33.3	26.0	100	1	5	0	0	0	5	0	2	14	16	
					100	5	11	0	0	0	14	0	5	16	21	
					200	6	16	0	0	0	19 (9.5)	0	7	30	37 (18.5)	
			40	15.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		3,4-Benzopyrene	10		100	7	39	0	1	0	43	0	1	1	2	+
					100	7	38	0	0	0	42	0	0	0	0	
					200	14	77	0	1	0	85 (42.5)	0	1	1	2 (1.0)	

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative ±, equivocal +, positive

- : Blank