

最 終 報 告 書

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：9048 (115－199)

平成 18 年 9 月 11 日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	5
12. 被験物質.....	8
13. 試験材料および方法.....	11
14. 試験結果.....	20
15. 考察および結論.....	22
16. 参考文献.....	22

Figures

Figure 1	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA100	25
Figure 2	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1535	26
Figure 3	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain WP2uvrA	27
Figure 4	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA98	28
Figure 5	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1537	29
Figure 6	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain TA100.....	30
Figure 7	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain TA1535.....	31

Figure 8	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain WP2 <i>uvrA</i>	32
Figure 9	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain TA98.....	33
Figure 10	Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain TA1537.....	34
Figure 11	Bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA100	35
Figure 12	Bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1535 ...	36
Figure 13	Bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain WP2 <i>uvrA</i>	37
Figure 14	Bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA98	38
Figure 15	Bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1537 ...	39
Figure 16	Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA100	40
Figure 17	Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1535	41
Figure 18	Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain WP2 <i>uvrA</i>	42
Figure 19	Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA98	43
Figure 20	Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1537	44
Tables		
Table 1	Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Non-activation method: -S9].....	45
Table 2	Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Activation method: +S9].....	46
Table 3	Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) [Non-activation method: -S9].....	47
Table 4	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Non-activation method: -S9].....	49
Table 5	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Activation method: +S9].....	51
Table 6	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Confirmative examination) [Non-activation method: -S9].....	52
Table 7	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Confirmative examination) [Activation method: +S9].....	54

1. 要約

当該試験条件下において、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理では、1.31~5000 µg/プレート のいずれの用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験 (追加試験)、本試験および本試験 (確認試験) により、試験結果の再現性が確認された。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (日本名 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール)

12.2. ロット番号

12.3. 純度

99.8%

残り 0.2%不明

12.4. 提供元

12.5. 特性分析年月日

2005 年 3 月 16 日

12.6. 保存条件

気密, 室温 (1~30°C)

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-3 : 実測値 23.8~25.3°C, 2005 年 5 月 11 日~2005 年 5 月 26 日; 6 号館 2 階被験物質調製室内スーパードライ ch. 40 (C-3) : 実測値 17.8~26.6°C, 2005 年 5 月 26 日~2005 年 11 月 29 日)

12.8. 化学名

2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール

2,6-Ditert-butyl-4-ethylphenol

12.9. 別名

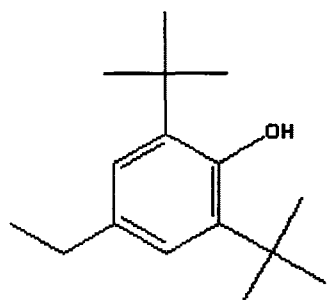
Phenol, 2,6-di-tert-buthyl-4-ethyl-

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol

12.10. CAS No.

4130-42-1

12.11. 化学構造



12.12. 分子式

C₁₆H₂₆O

12.13. 分子量

234.38

12.14. 物質の状態

形状：結晶性粉状

色：淡黄白色

12.15. 融点／沸点

融点：45.7℃／沸点：268.6℃

12.16. 引火点

132℃（クリーブランド開放式）

12.17. 溶解性

水に不溶

アルコール，トルエン，ヘプタン，クロロホルム，ガソリン，ベンゼンに可溶

DMSO に易溶（> 240 mg/mL：当施設の試験による）

12.18. 安定性

通常取り扱い条件においては安定

12.19. 分配係数（Octanol/Water）

Log Pow > 3.27

12.20. 取り扱い上の注意

適切な保護具（マスク・手袋等）を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れたりしないようにする。

12.21. 急性毒性

経口投与における LD₅₀ は、雄ラットでは 4800 mg/kg、雌マウスでは 7450 mg/kg である。

12.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、約 1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは安定性分析のため、被験物質等管理責任者を介して被験物質提供元に返却した。分析の結果（2005 年 12 月 20 日付報告）、被験物質が試験期間中安定であったことが確認された。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において遺伝毒性ガイドラインでは試験菌株が指定されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は1983年9月9日にカリフォルニア大学から、また、大腸菌については1983年3月16日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。

2004年9月6日～同年9月9日および2005年8月30日～同年9月1日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K30049278 および K31758278, Merck)を容量比 80:7 の割合で添加した後、凍結保存用チューブに 0.2 mL ずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-U71V, 三洋電機バイオメディカ; 設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下)に保存した。

13.2. 培地の調製

13.2.1. 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(2005年6月23日製造, Lot No. ANI510FU, オリエンタル酵母工業)を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した。

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
D(+) グルコース	20	g
寒天(BA-30A, Lot No. 41201, 伊那食品工業)	12.0	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天 (Bacto-agar, Lot No. 3069265, BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した。ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275, 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 008D2026 【確認試験以外】、211D2047 【確認試験】、関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた。

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した。フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し、培養開始までの間、設定温度 4°C に静置した。その後、37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATPフォトメーター (ルミテスターK-100, キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が 1.0×10^9 /mL以上であることを確認した。生菌数を次の表に示した。

試験	生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
用量設定試験	4.69	3.77	3.39	3.31	1.70
用量設定試験 (追加試験)	3.60	3.67	3.90	3.15	1.62
本試験	3.64	3.68	3.68	3.21	1.43
本試験 (確認試験)	3.01	2.41	2.98	2.09	1.23

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-523 【確認試験以外】、FSM-526 【確認試験】、キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法等を次の表に示した。

	確認試験以外	確認試験
ロット番号	RAA-523	RAA-526
製造年月日	2005 年 6 月 17 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)	2005 年 7 月 29 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系	
性/週齢	雄/7 週齢	雄/7 週齢
体重	207~243 g	215~259 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量および投与回数	PB : 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF : 80 mg/kg 1 回 (3 日目)	
投与方法	腹腔内投与	
蛋白含量	26.05 mg/mL	25.58 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.1	mL
MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に不溶で DMSO に易溶 (>240 mg/mL) であり, DMSO と混合後, 4 時間以内では発熱, 発色, 発煙等の変化がなかった. したがって, 溶媒にはモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K31758278, Merck) を使用し, 調製後は 4 時間以内に使用した.

用量設定試験では, 使用直前に被験物質 400 mg を目盛付き試験管に精密に量り, 約 4 mL の DMSO (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 8 mL に定容し, 調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した. 4.5 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を加えることにより, 20.0 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶

液を調製した。

用量設定試験（追加試験）では、使用直前に被験物質 200 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 2 mL の DMSO（使用溶媒）を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 4 mL に定容し、調製原液（50.0 mg/mL 溶液）を準備した。3 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 2 mL を加えることにより 20.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205, 0.0819, 0.0328 および 0.0131 mg/mL 溶液を調製した。

本試験および本試験（確認試験）では、使用直前に被験物質 400 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 4 mL の DMSO（使用溶媒）を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 8 mL に定容し、調製原液（50.0 mg/mL 溶液）を準備した。4 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 4 mL を加えることにより 25.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195 および 0.0977 mg/mL 溶液を調製した。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液（保証期限：2006 年 9 月 1 日，オリエンタル酵母工業）を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー（設定値：-80℃，基準値：-60℃ 以下）に保存した。陽性対照物質名および用量等を以下に示した。

AF-2	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
NaN ₃	アジ化ナトリウム
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩
2-AA	2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	化合物名	陽性対照 調製日	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	陽性対照 溶液濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2005.2.3	0.1	1.0	050203AF10
ネズミチフス菌 TA1535	NaN_3	2005.2.2	0.5	5.0	050202N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2005.2.3	80	800	050203A9
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2005.2.2	1.0	10	050202A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2005.2.2	0.5	5.0	050202A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	2005.2.2	10	100	050202A2100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験－テストガイドラインと GLP」
(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液 (調製原液) ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 25 μL あるいは S9 mix 500 μL にトップアガーを 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験 (予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量とし、以下 2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の計 8 用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて試験菌株, S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを確認した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L を添加した。次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ L、代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合、S9 mix を 500 μ L 分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液 100 μ L を加えた後、ウォーターバスシェーカー (MM-10, タイテック) を用いて 37°C の条件で 20 分間振盪 (120 回/分, プレインキュベーション) した。振盪終了後、トップアガー 2 mL を添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器 (SSV-R11DA, 池田理化) を用い、各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した。

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において、処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 40$) を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。計測に際しては、コロニーアナライザー (CA-11, システムサイエンス) を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。ただし、析出物の影響により、-S9 処理および+S9 処理の 5000 μ g/プレートの用量ではコロニーアナライザーの使用が不適当であったため、目視でコロニーを計数した。

13.8. 用量設定試験 (追加試験)

用量設定試験の結果において、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA98 株および TA1537 株についてのみ生育阻害が低用量までみられ、他の菌株と乖離した結果が得られたことから、追加試験を実施した。

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果において、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA98 株および TA1537 株についてのみ生育阻害が低用量までみられたが、その他の菌株では 5000 μ g/プレートの用量においても生育阻害が認められなかった。したがって、用量設定試験 (追加試験) における被験物質の用量として、5000 μ g/プレートを最高用量に次表の 10 段階を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

菌株	用量 (μg/プレート)									
TA100	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA1535	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
WP2 _{uvrA}	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA98	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA1537	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.9. 本試験

13.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験（追加試験）の結果、代謝活性化系非存在下（-S9 処理）の TA100 株、TA98 株および TA1537 株について生育阻害がみられたが、その他については 5000 μg/プレートの用量においても生育阻害が認められなかった。また、いずれの被験物質処理群においても変異原性は認められなかった。したがって、本試験では生育阻害が認められると考えられる用量あるいは 5000 μg/プレートを最高用量とし、次表に示す 6～7 用量（公比 2）を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA1535	—	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 _{uvrA}	—	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。ただし、析出物の影響により、-S9 処理および+S9 処理の 2500 μg/プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用が不適当であったため、目視でコロニーを計数した。

13.10. 本試験（確認試験）

用量設定試験では、塩化ナトリウム濃度が規定値 (0.5 w/v%) と異なったトップアガー (0.4 w/v%含有) を使用した上、さらに寒天の秤量値も生データ上で保証できない（風袋引きをした証拠がない）ことが判明したので、当該用量設定試験の結果を最終評価（再現性確認）に採用することは出来ないと判断した。したがって、本試験との再現性をみる確認試験を実施した。

13.10.1. 用量

本試験の結果、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA100 株、TA98 株および TA1537 株について生育阻害がみられたが、その他については 5000 μg/プレートの用量においても生育阻害が認められなかった。また、変異原性は認められなかった。したがって、本試験（確認試験）では、次表に示す 6~7 用量（公比 2）を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	—	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA1535	—	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	—	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	—	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000	
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000	

13.10.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.10.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.10.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.10.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.11. 試験成立条件

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、背景データから求めた基準値内であること。陽性対照のコロニー数は同時陰性対照値の2倍を超えること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

13.12. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の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陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1～5 および Table 1, 2 に示した.

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合, -S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかった. 試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA98 株および TA1537 株についてのみ低用量まで認められ, 生育阻害を示さない用量が 4 用量に満たなかった.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.1.1. 被験物質の析出等

処理開始時に, -S9 処理では 128 μg /プレート以上の用量で白濁, 5000 μg /プレートの用量で白色の塊状, 粉末状ならびに膜状の析出物が認められた.+S9 処理では 320 μg /プレート以上の用量で白色および透明油滴状の析出物および白濁が認められた.

コロニー数計測時には, -S9 処理および+S9 処理の両処理の 2000 μg /プレートの用量で透明油滴状, 5000 μg /プレートの用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた.

14.2. 用量設定試験 (追加試験)

結果を Figure 6～10 および Table 3 に示した.

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合, いずれの試験菌株においても, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかった. 試験菌株に対する生育阻害作用は TA100 株, TA98 株および TA1537 株の 320 μg /プレート以上の用量についてのみ認められた.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.2.1. 被験物質の析出等

処理開始時に, 128 μg /プレート以上の用量で白濁, 800 μg /プレート以上の用量で白色の粉末状ならびに膜状の析出物, 5000 μg /プレートの用量で白色塊状の析出物が認められた. プレインキュベーション終了後, 800～2000 μg /プレート以上の用量で処理開始時に認められた白色粉末状が消失していた.

コロニー数計測時には, 2000 μg /プレート以上の用量で透明油滴状, 5000 μg /プレートの用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた.

14.3. 本試験

結果を Figure 11～15 および Table 4, 5 に示した.

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合, -S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかった. また, 試験

菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA100 株および TA98 株の 625 μg /プレート, TA1537 株の 156 μg /プレート以上の用量についてのみ認められた.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.3.1. 被験物質の析出等

処理開始時に, -S9 処理では 156 μg /プレート以上の用量で白濁, 625 μg /プレート以上の用量で白色の粉末状ならびに膜状の析出物が認められた. +S9 処理では 313 μg /プレート以上の用量で白色および透明油滴状の析出物および白濁が認められた. プレインキュベーション終了後, -S9 処理では 2500 μg /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が認められた.

コロニー数計測時には, 両処理の 1250 μg /プレート以上の用量で透明油滴状, 2500 μg /プレート以上の用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた.

14.4. 本試験 (確認試験)

結果を Figure 16~20 および Table 6, 7 に示した.

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかった. また, 試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA100 株および TA98 株の 625 μg /プレート, TA1537 株の 313 μg /プレート以上の用量についてのみ認められた.

一方, 陽性対照物質は, 試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.4.1. 被験物質の析出等

処理開始時に, -S9 処理では 156 μg /プレート以上の用量で白濁, 625 μg /プレート以上の用量で白色粉末状ならびに透明油滴状の析出物が認められた. +S9 処理では 156 μg /プレート以上の用量で白濁, 313 μg /プレート以上の用量で透明油滴状の析出物が認められた. プレインキュベーション終了後, -S9 処理では 313 μg /プレート以上の用量で透明油滴状の, 5000 μg /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が認められ, +S9 処理では 5000 μg /プレート以上の用量で白色の塊状および粉末状の析出物が認められた.

コロニー数計測時には, 両処理の 1250 μg /プレート以上の用量で透明油滴状, 2500 μg /プレート以上の用量で白色粉末状, 5000 μg /プレートの用量で白色塊状が認められた.

以上, 用量設定試験 (追加試験), 本試験および本試験 (確認試験) により, 代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両処理法において再現性が確認された.

15. 考察および結論

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは生育阻害作用を示す用量まで検討した結果、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

用量設定試験（追加試験）、本試験および本試験（確認試験）によりこれら両処理法での試験結果の再現性が確認された。

これまでに 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はない。

類縁体である *p-tert*-ブチルフェノールについては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性¹⁾、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性²⁾と報告されている。また、4-エチルフェノールについては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性³⁾、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁴⁾と報告されている。

なお、陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ（Appendix 1）から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 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。

16. 参考文献

- 1) 澁谷徹，坂本京子，川上久美子，原巧，堀谷尚古，松本容彦，中込まどか，飯田さやか，化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 295-299, 1996.
- 2) 田中憲穂，山影康次，中川ゆづき，日下部博一，橋本恵子，水谷正寛，古畑紀久子，化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 301-304, 1996.
- 3) 澁谷徹，川上久美子，原巧，山本朋子，三枝克彦，加藤初美，化学物質毒性試験報告書 Vol. 8(1), 567-571, 2001.
- 4) 山影康次，日下部博一，佐々木澄志，高橋俊孝，若栗忍，橋本恵子，化学物質毒性試験報告書 Vol. 8(1), 572-575, 2001.

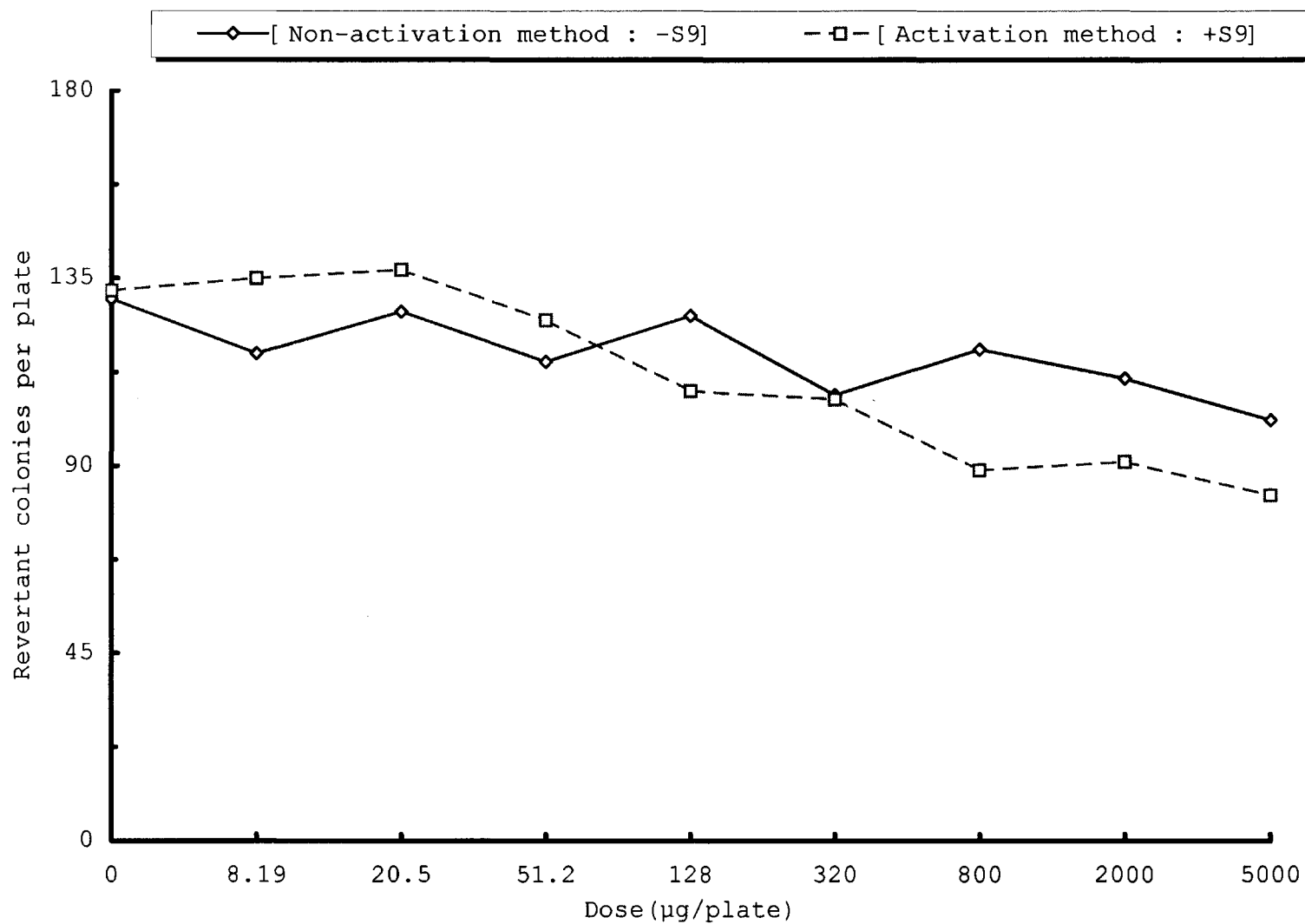


Figure 1. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA100

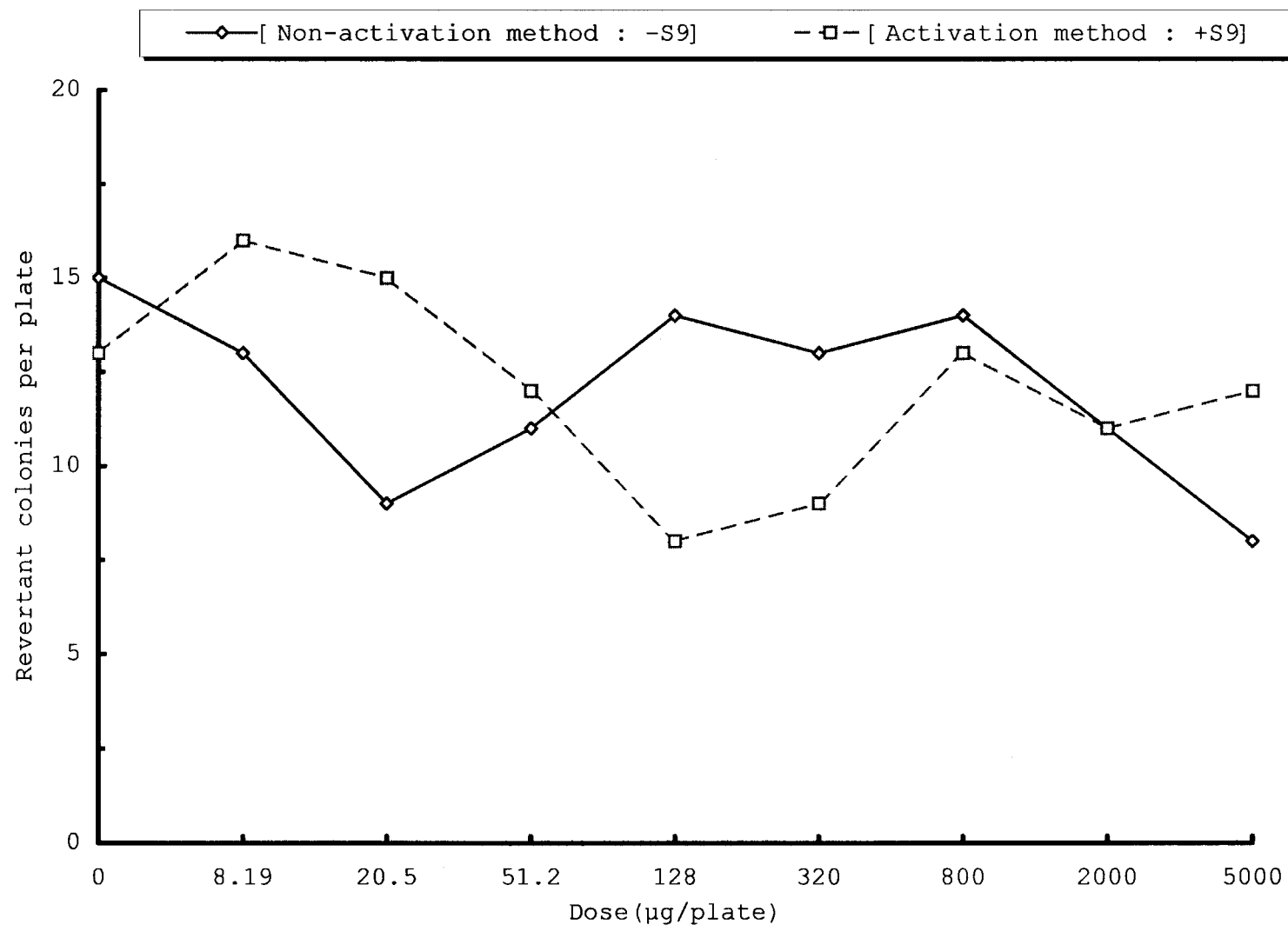


Figure 2. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1535

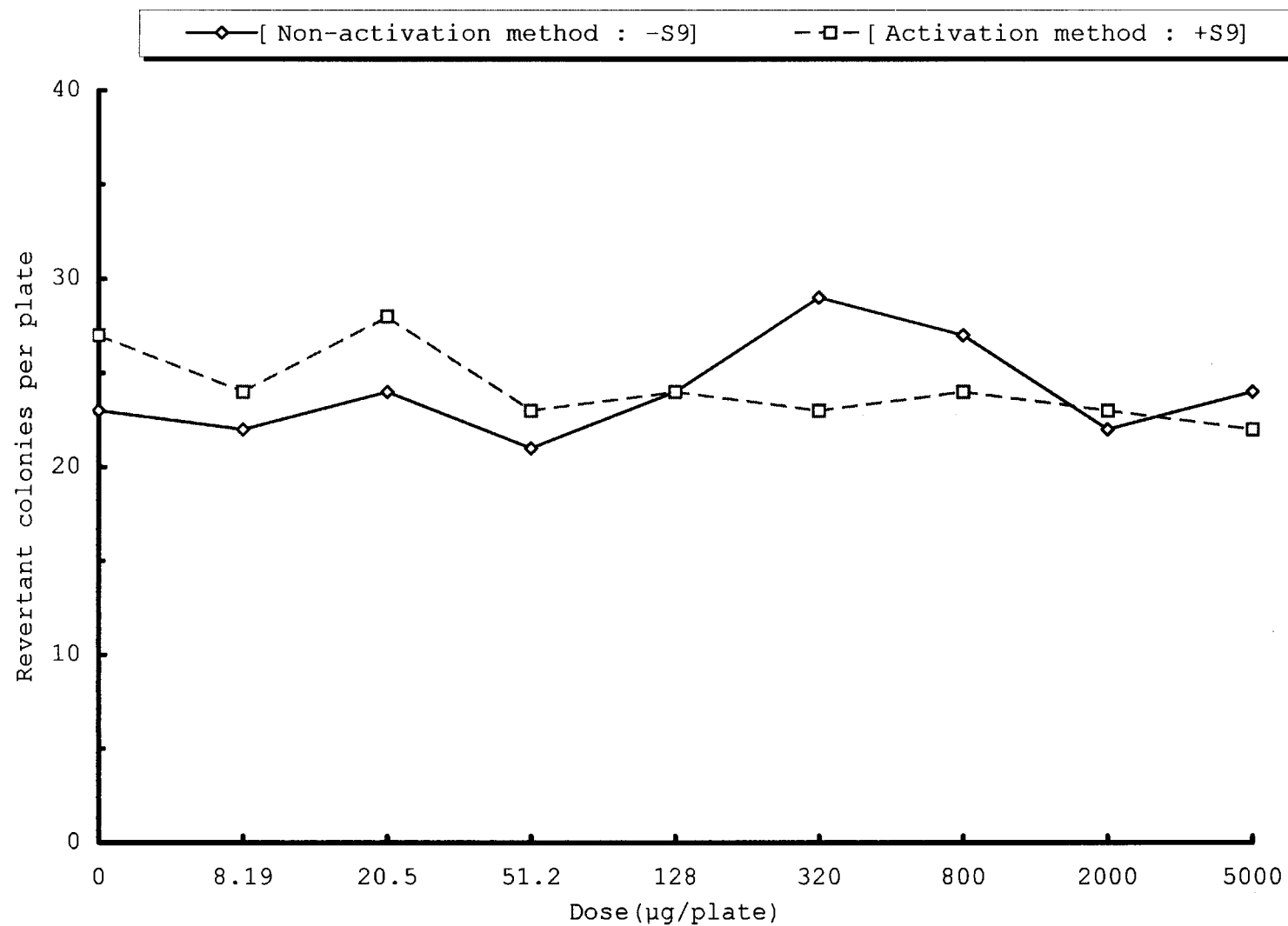


Figure 3. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain WP2uvrA

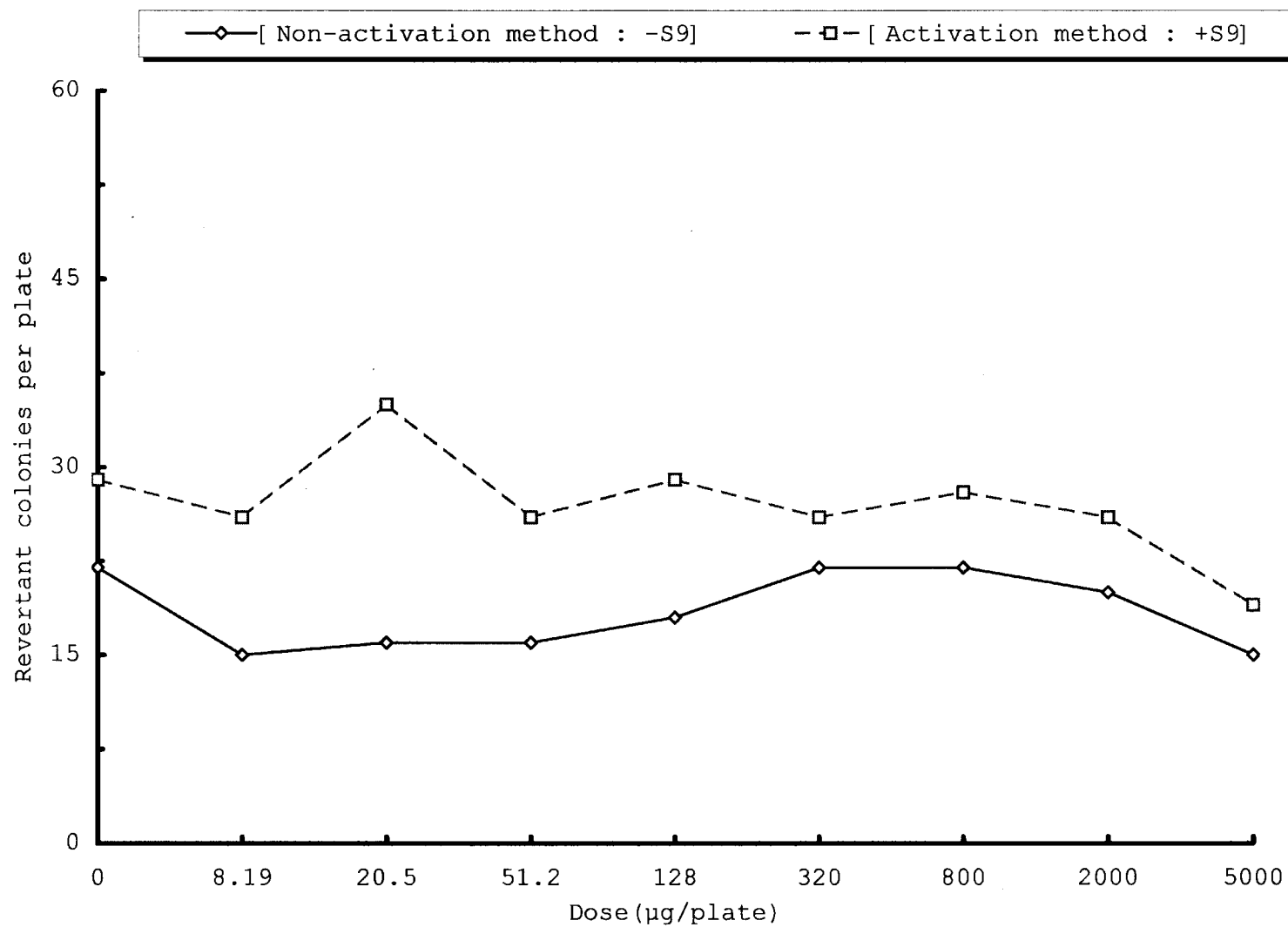


Figure 4. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA98

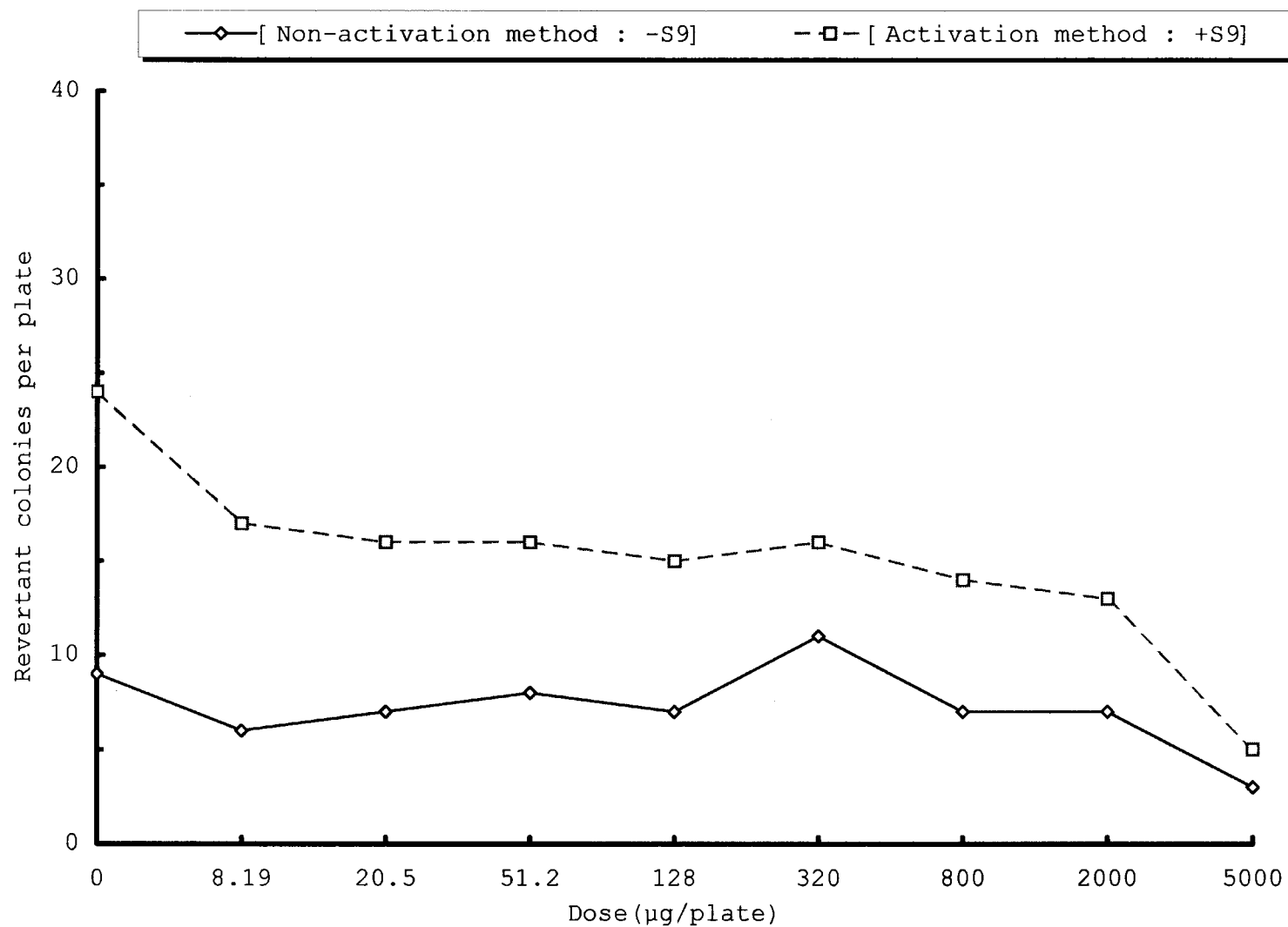


Figure 5. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1537

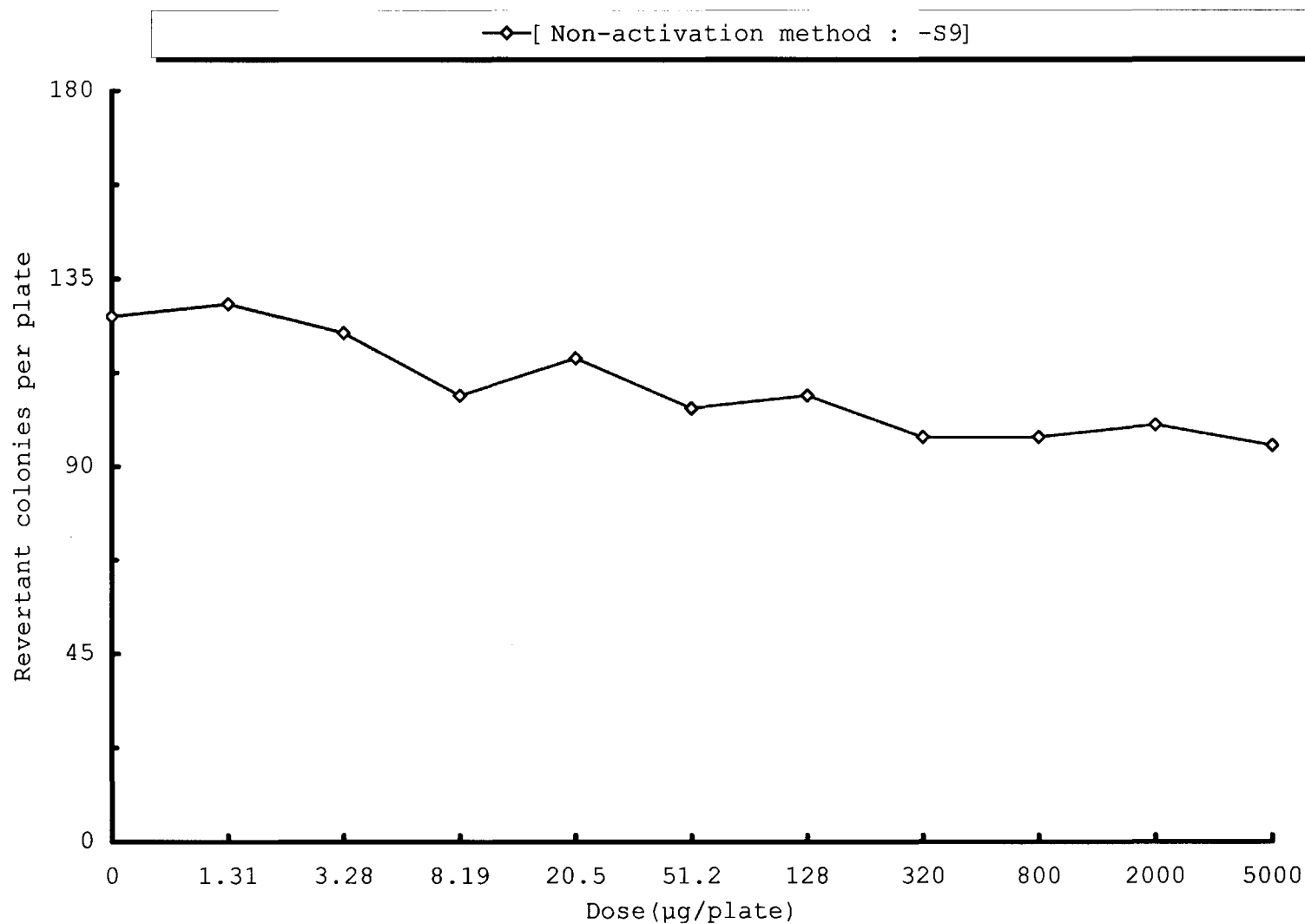


Figure 6. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain TA100

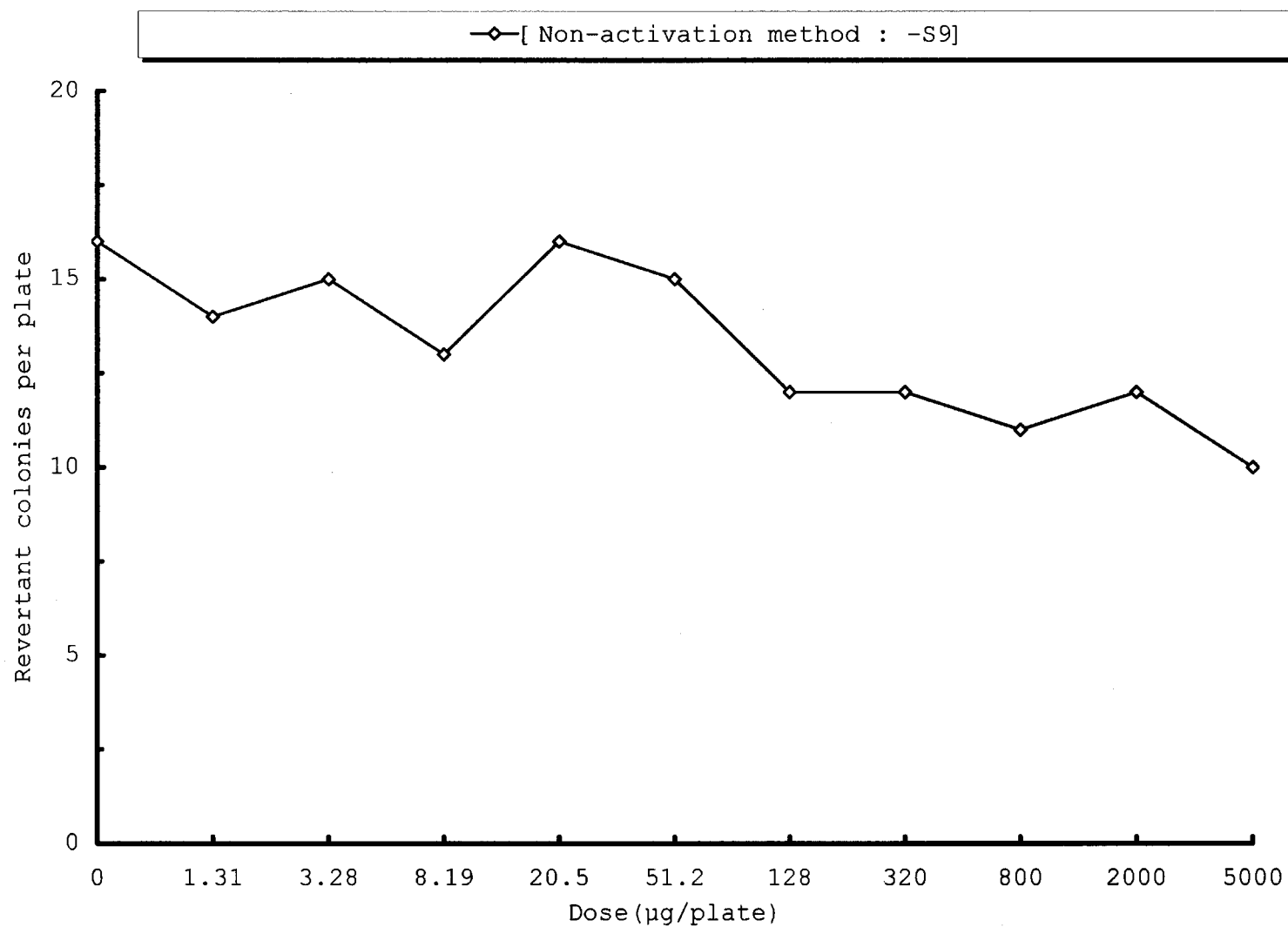


Figure 7. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain TA1535

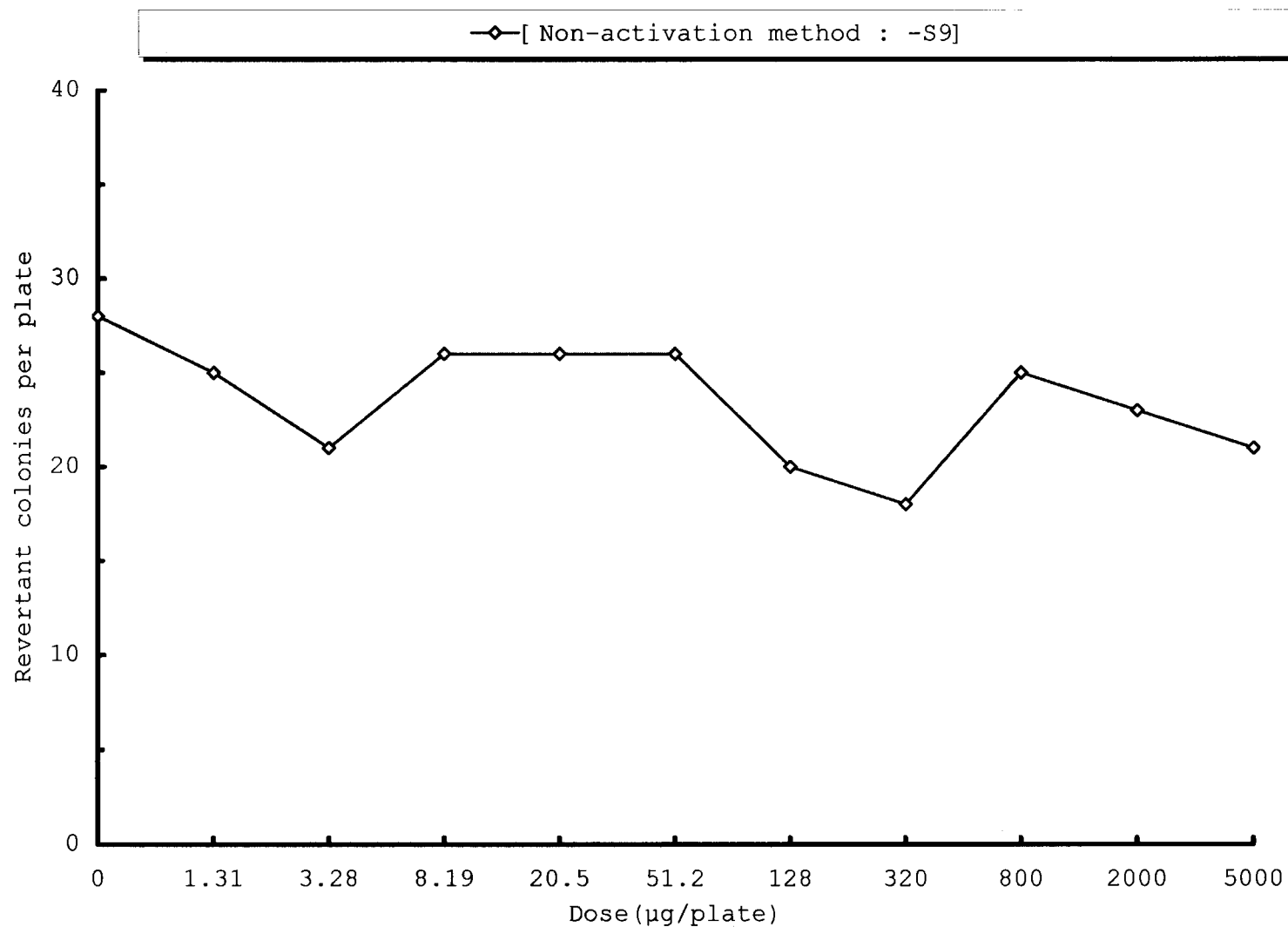


Figure 8. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain WP2uvrA

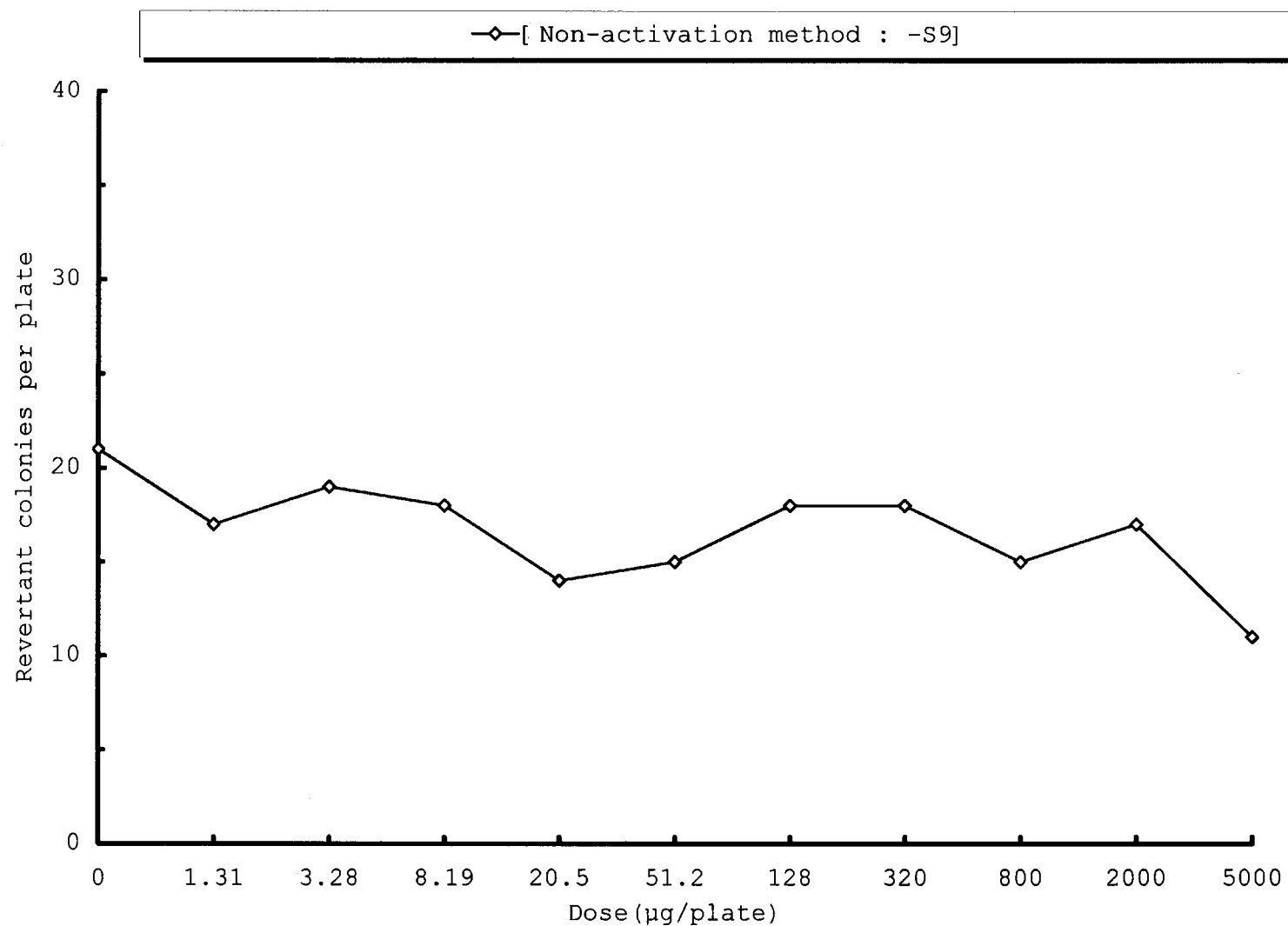


Figure 9. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain TA98

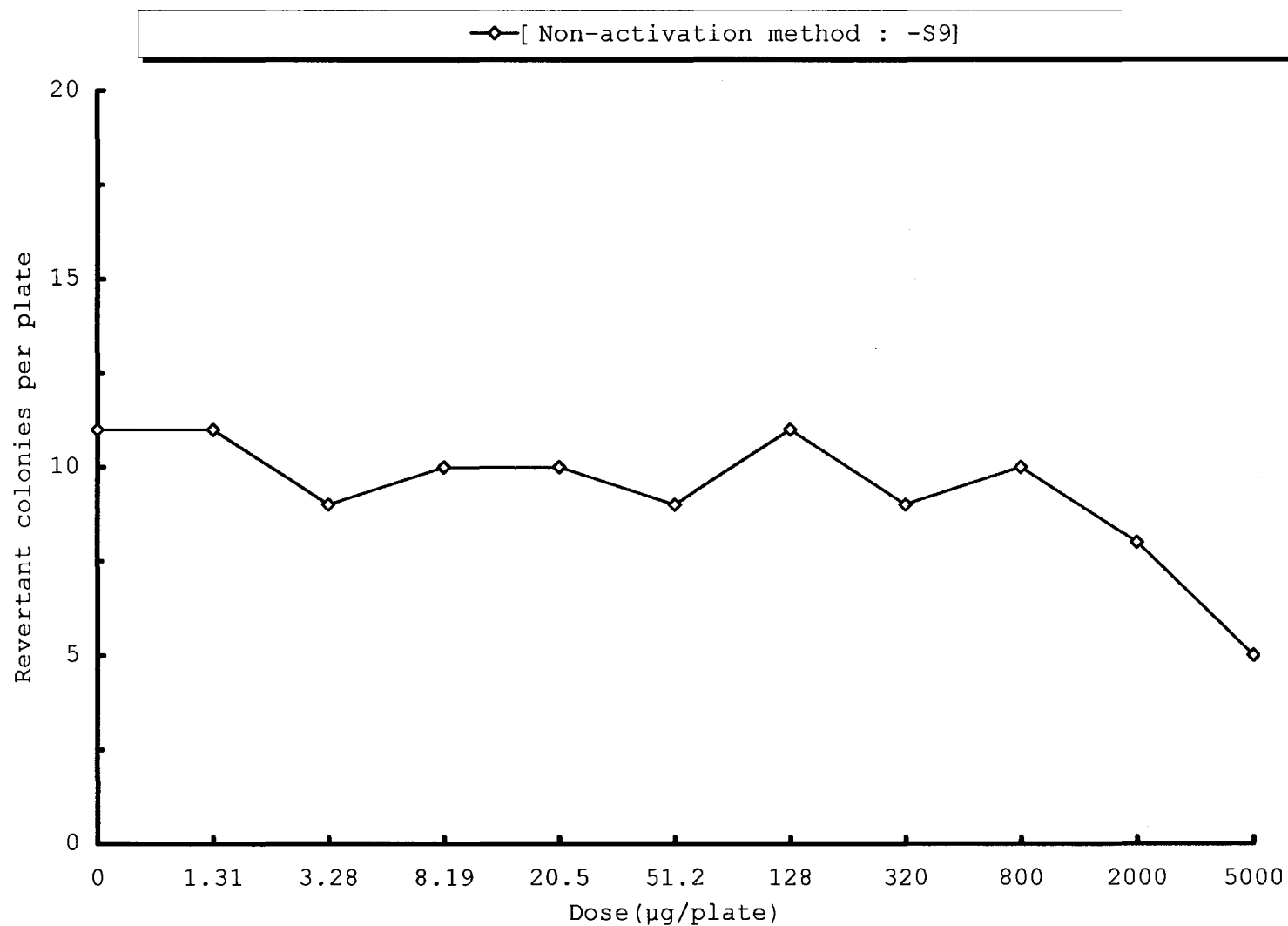


Figure 10. Dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study) in strain TA1537

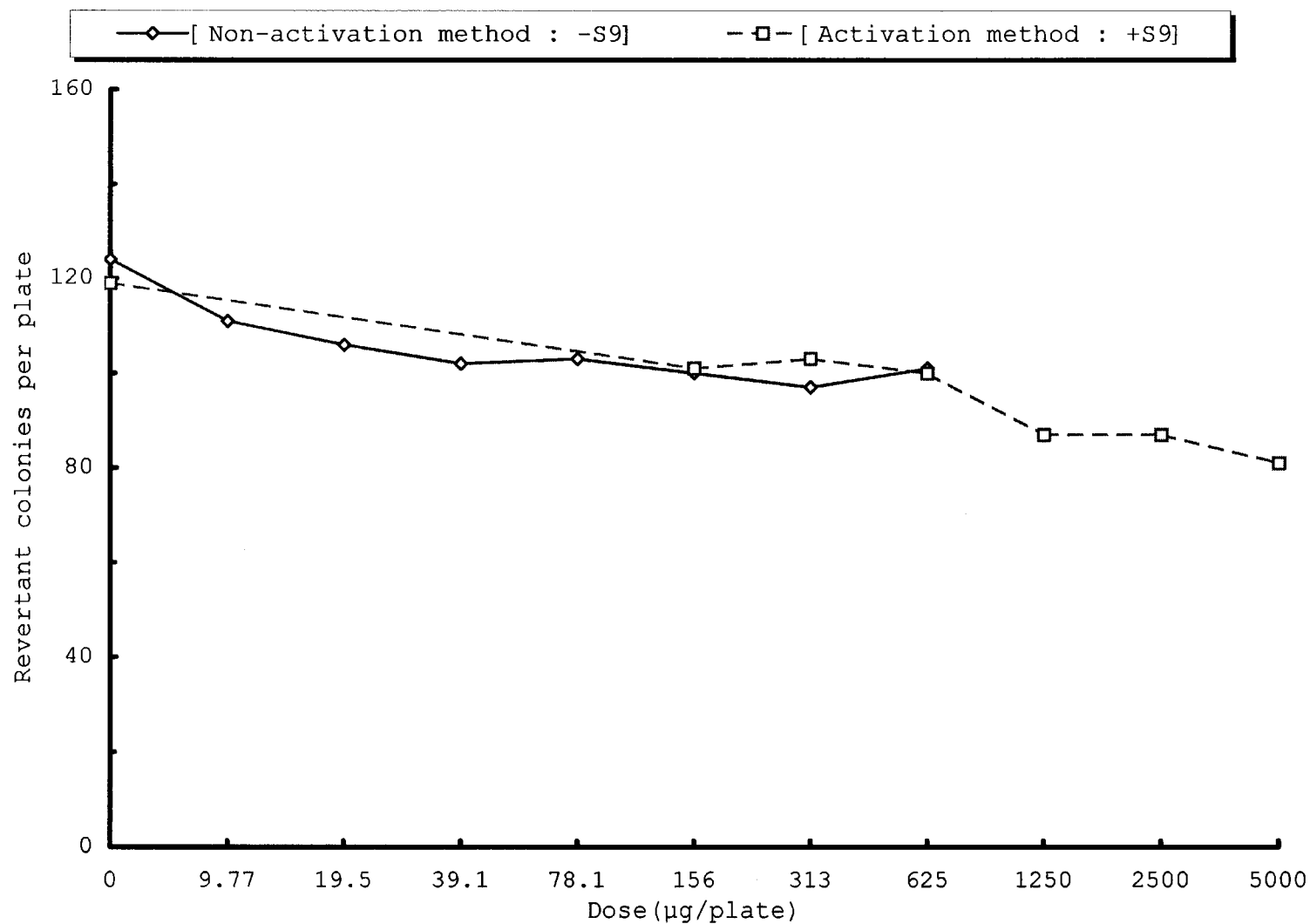


Figure 11. Bacterial reversion assay of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA100

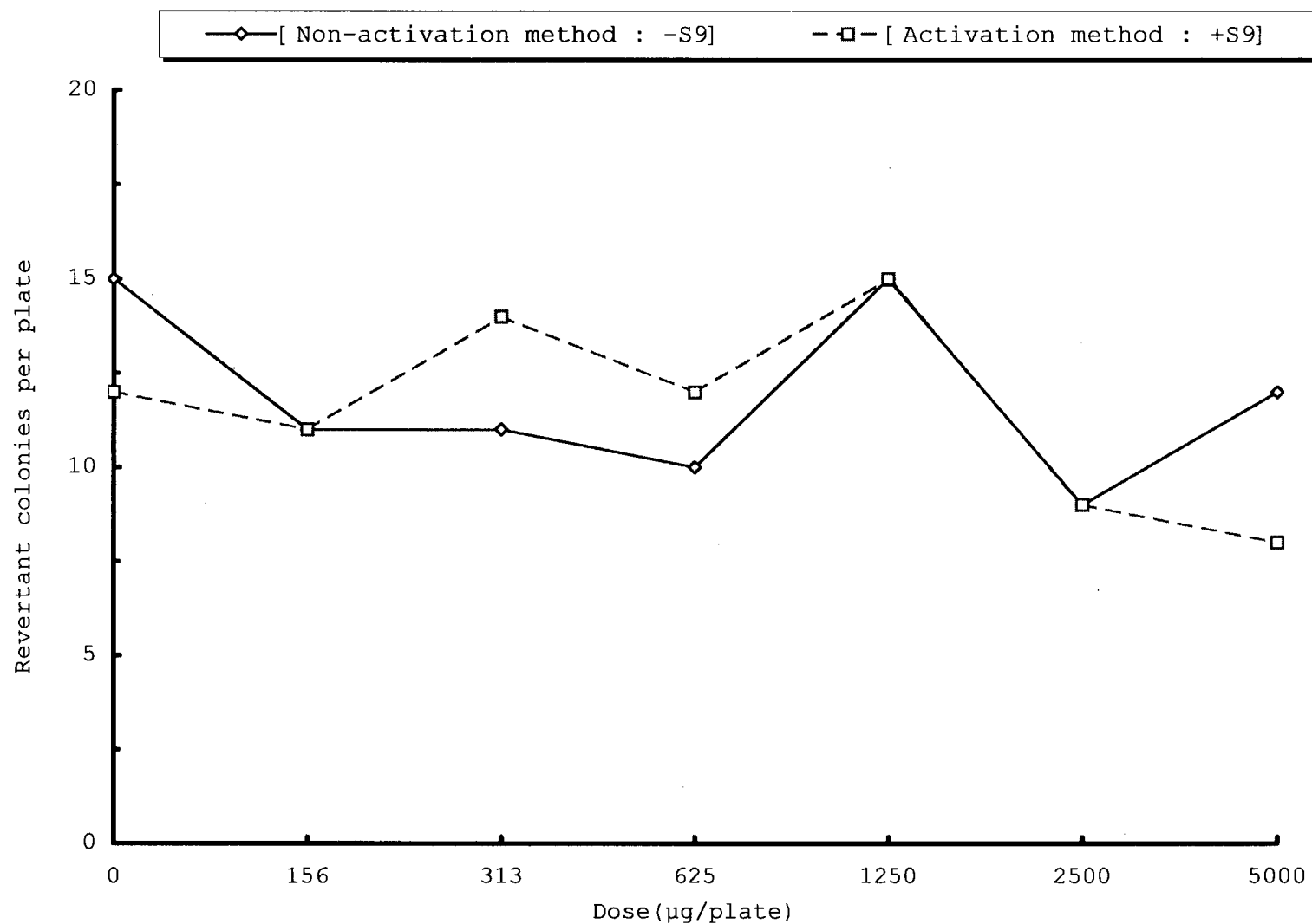


Figure 12. Bacterial reversion assay of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1535

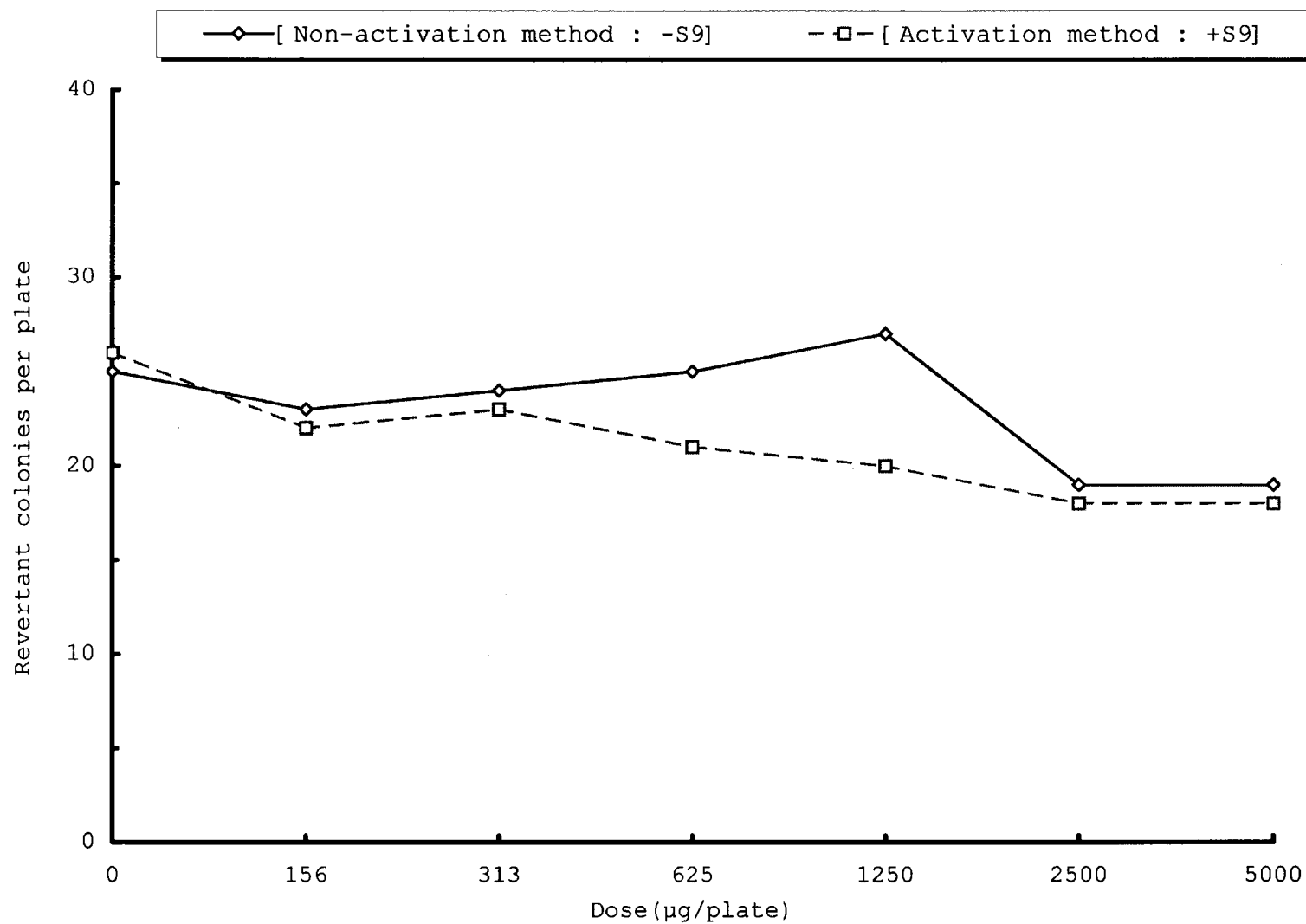


Figure 13. Bacterial reversion assay of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain WP2uvrA

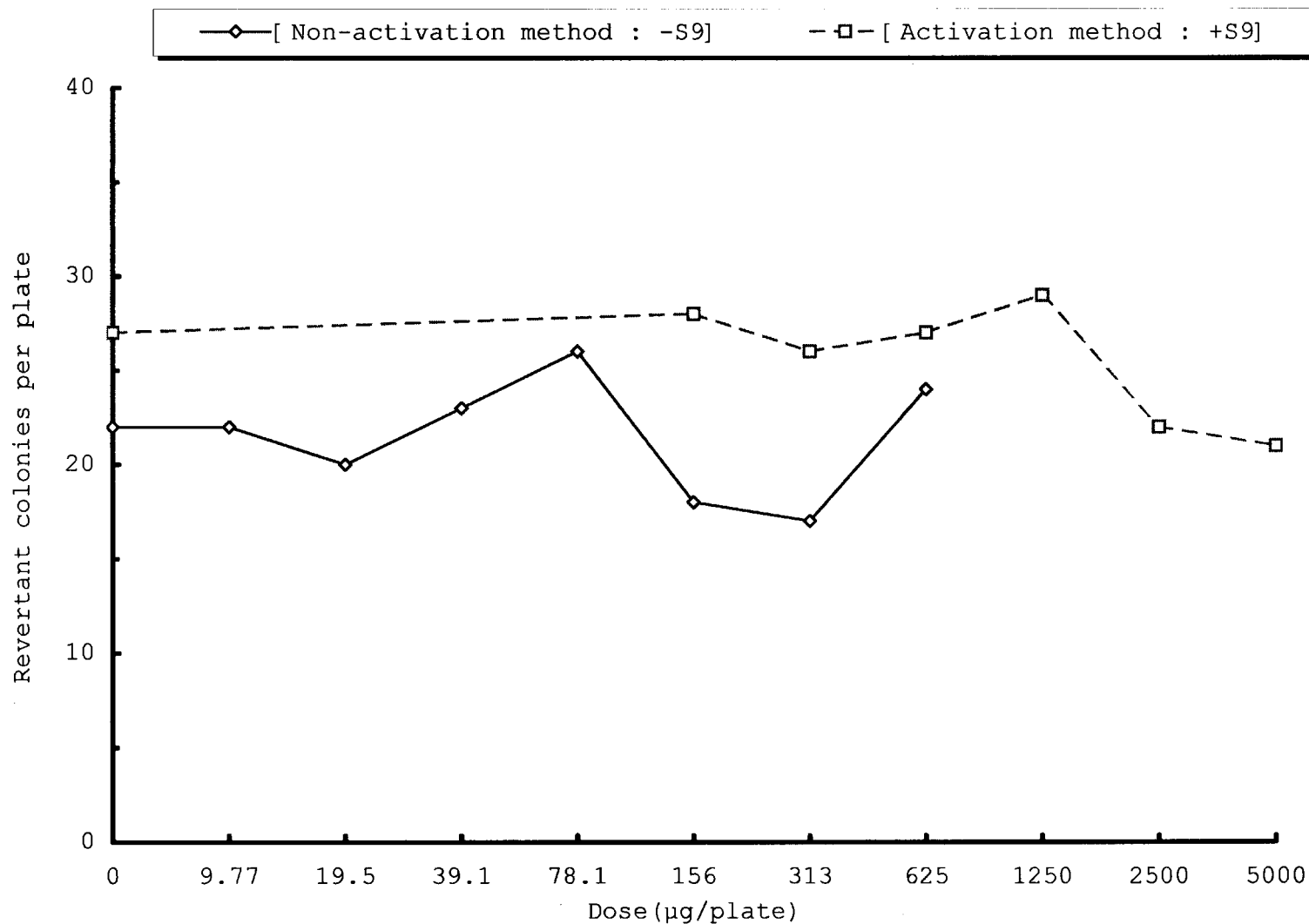


Figure 14. Bacterial reversion assay of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA98

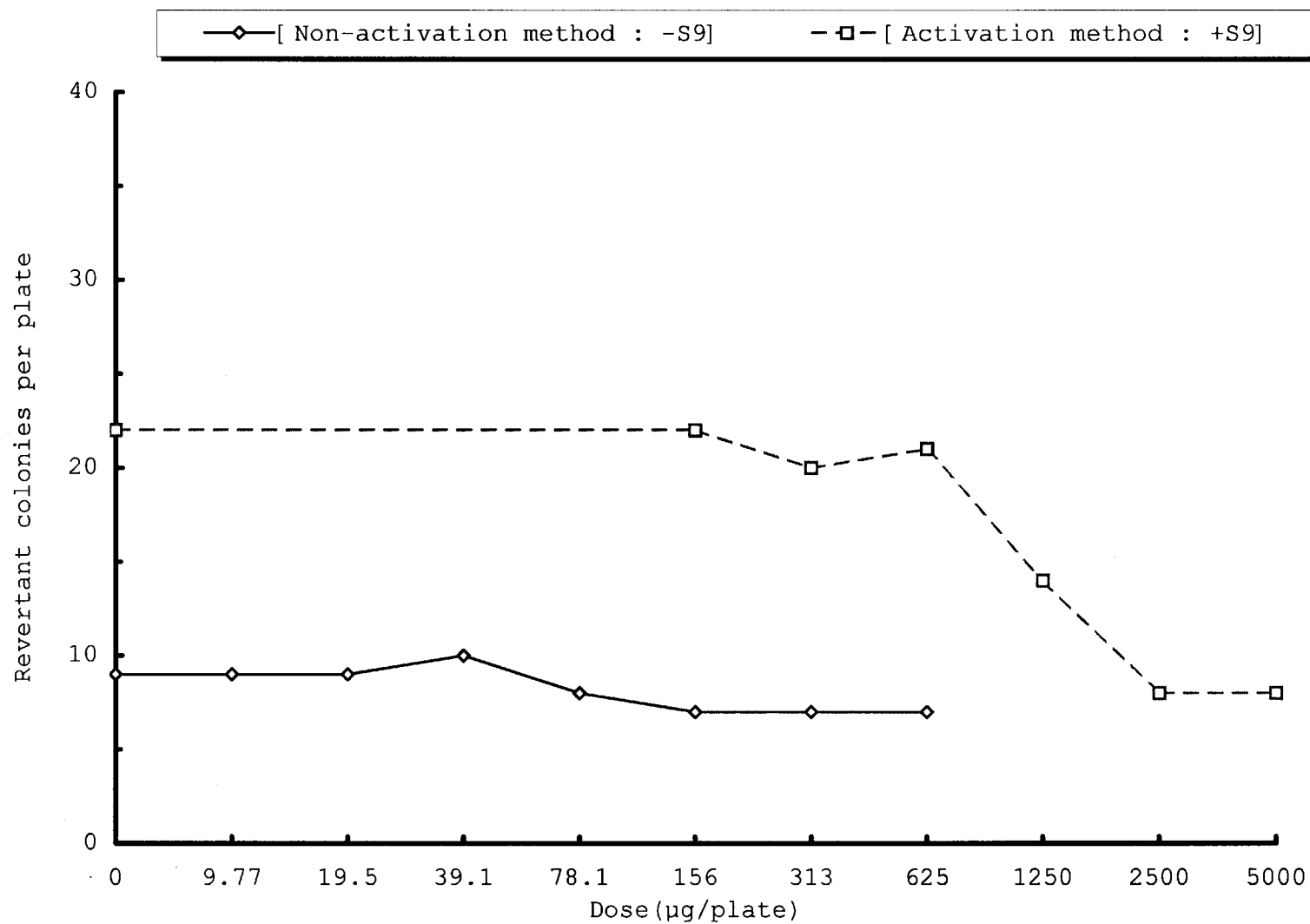


Figure 15. Bacterial reversion assay of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1537

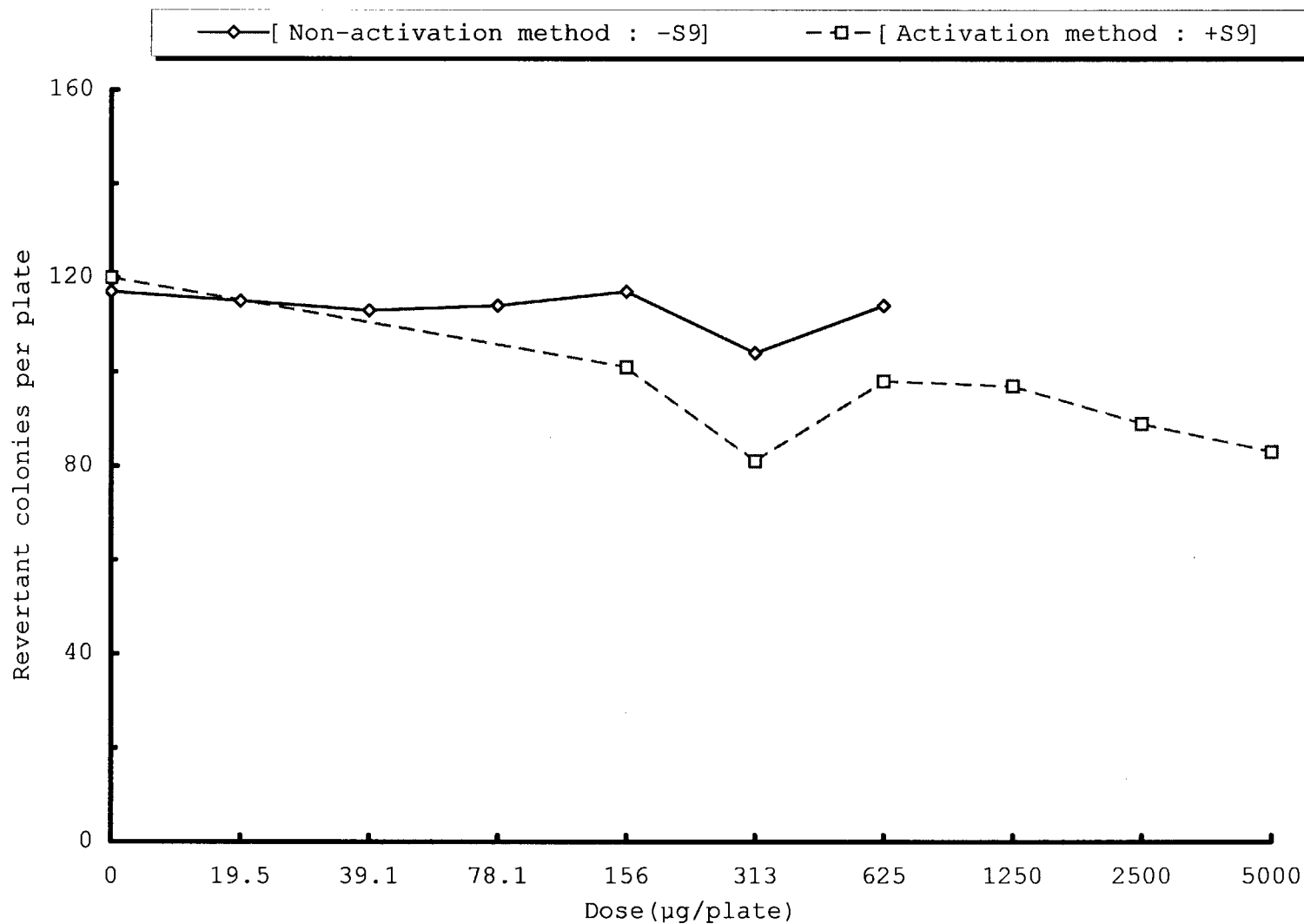


Figure 16. Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA100

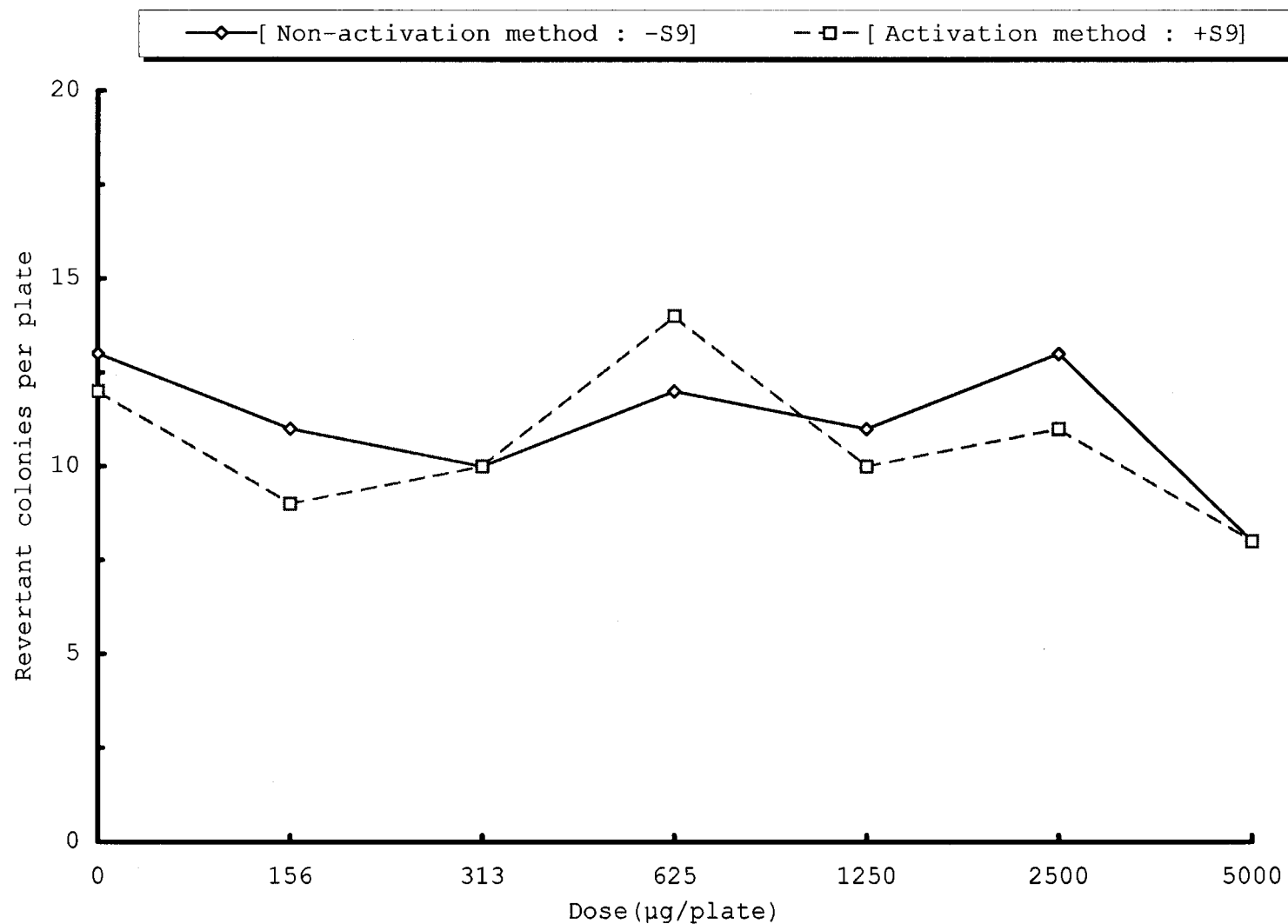


Figure 17. Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1535

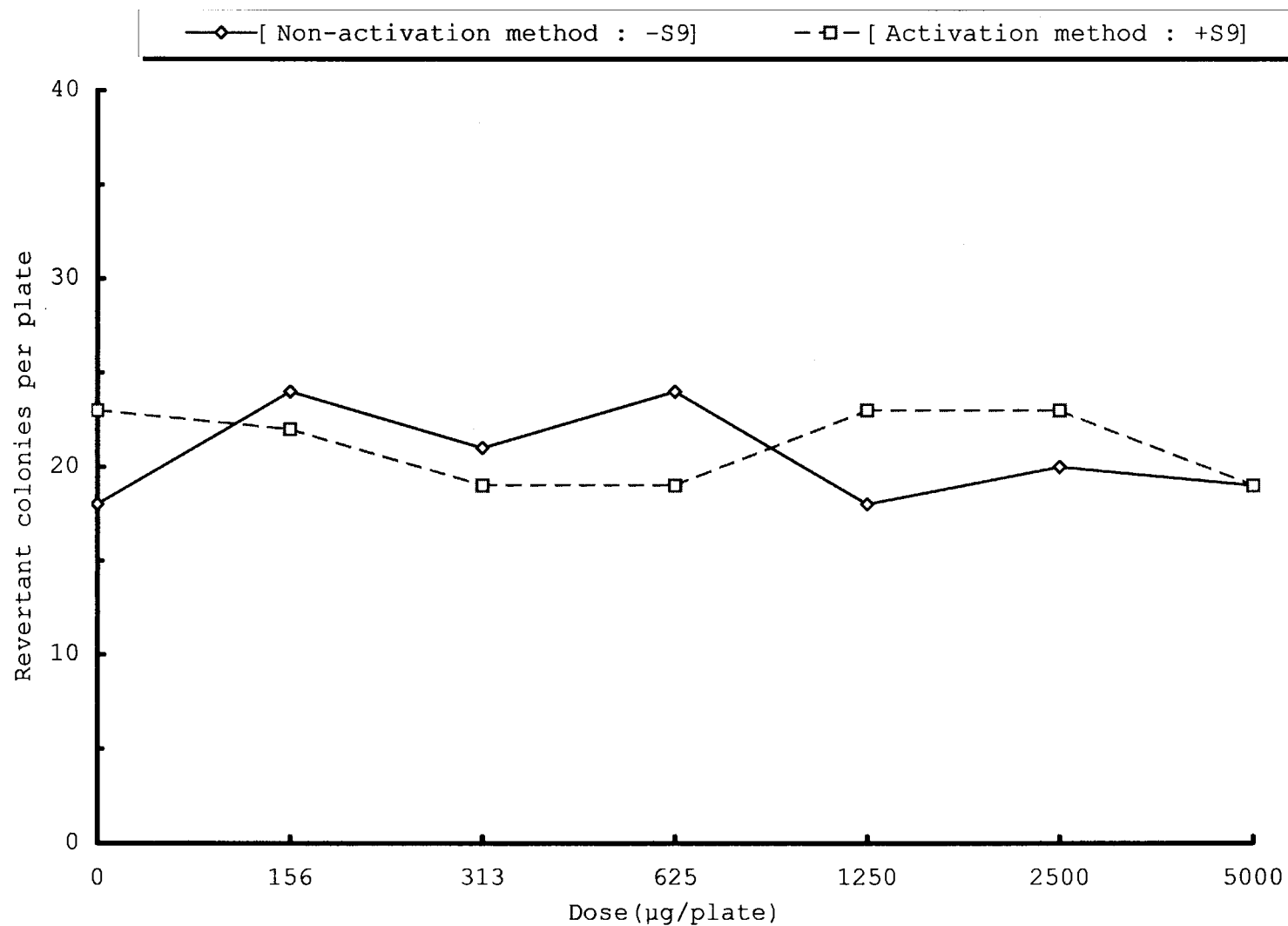


Figure 18. Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain WP2uvrA

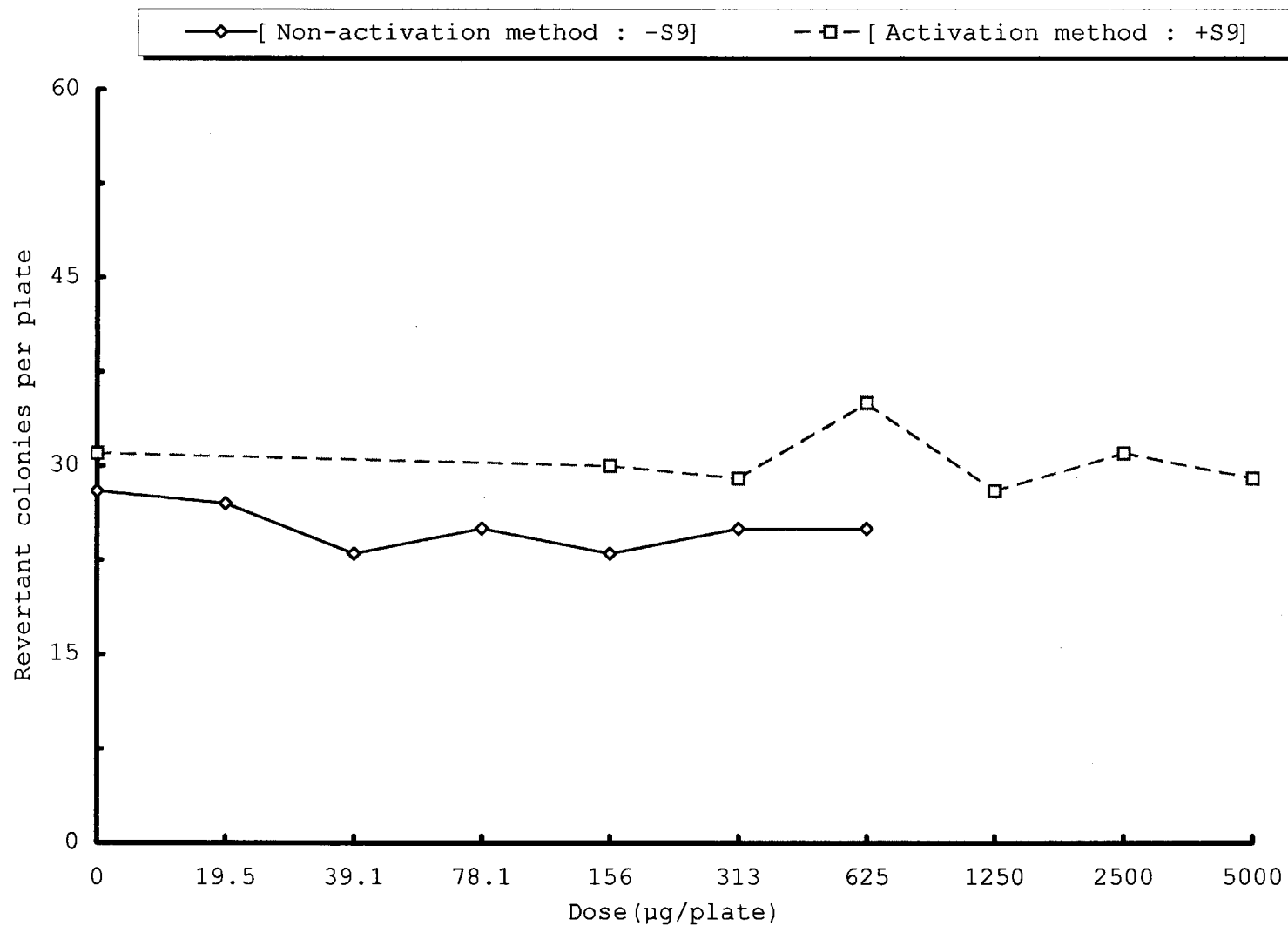


Figure 19. Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA98

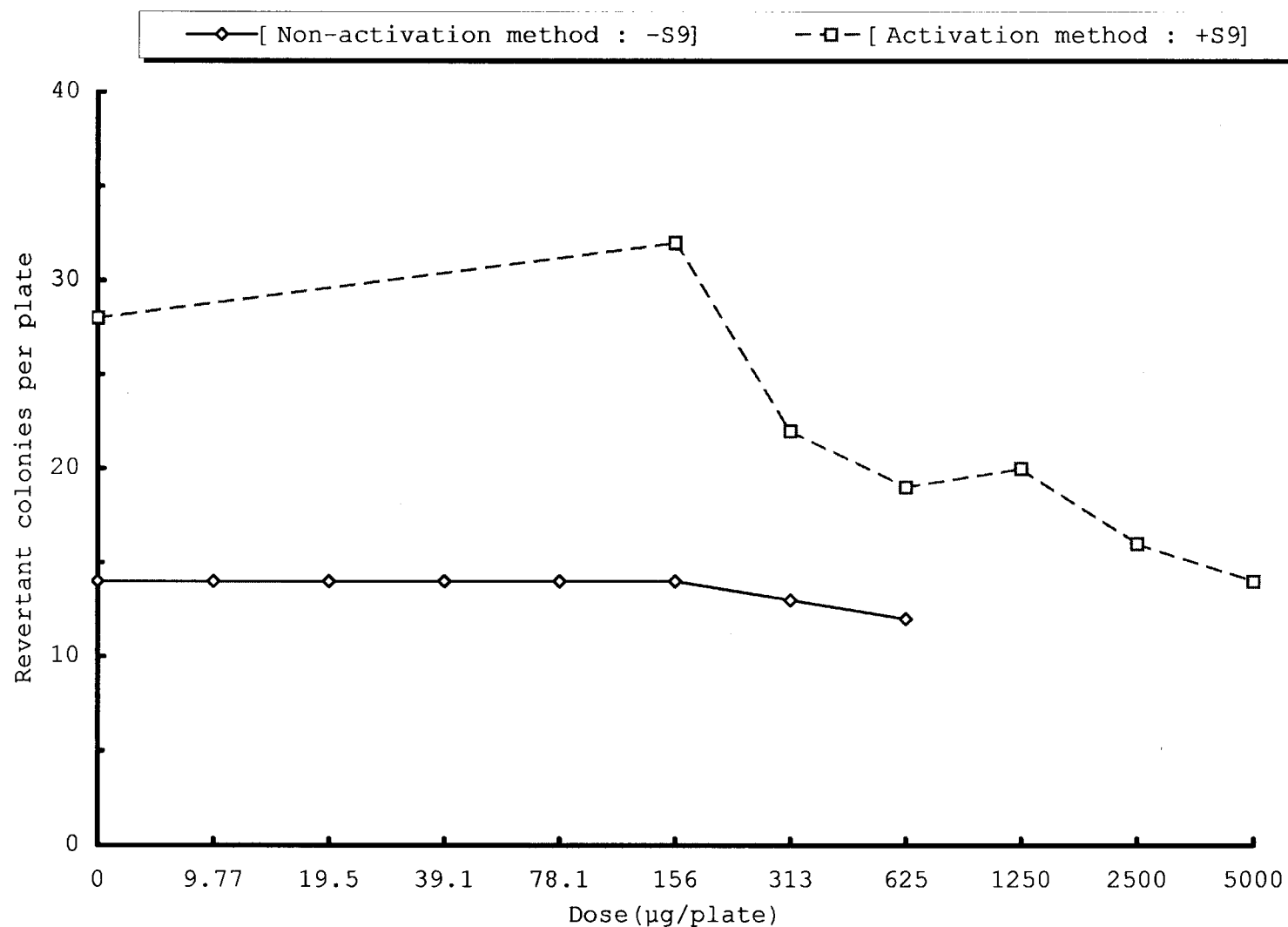


Figure 20. Confirmative examination of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol in strain TA1537

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	129 [130	124 ±	136 6]	14 [15	14 ±	18 2]	28 [23	21 ±	19 5]	24 [22	21 ±	21 2]	8 [9	12 ±	8 2]
	8.19	116 [117	120 ±	116 2]	14 [13	10 ±	14 2]	20 [22	25 ±	20 3]	15 [15	18 ±	13 3]	5 [6	7 ±	6 1]
	20.5	137 [127	123 ±	121 9]	7 [9	7 ±	13 3]	22 [24	28 ±	23 3]	16 [16	17 ±	14 2]	6 [7	5 ±	10 3]
	51.2	111 [115	115 ±	119 4]	16 [11	9 ±	9 4]	25 [21	20 ±	19 3]	15 [16	17 ±	16 1]	9 [8	6 ±	9 2]
	128	118 [126	130 ±	131 7]	15 [14	15 ±	12 2]	24 [24	26 ±	23 2]	18* [18	15* ±	20* 3]	6* [7	6* ±	8* 1]
	320	107 [107	106 ±	107 1]	11 [13	13 ±	15 2]	31 [29	23 ±	32 5]	21* [22	24* ±	20* 2]	12* [11	10* ±	10* 1]
	800	126 [118	129 ±	99 17]	15 [14	16 ±	12 2]	30 [27	22 ±	28 4]	20* [22	21* ±	24* 2]	7* [7	8* ±	5* 2]
	2000 +	109 [111	120 ±	104 8]	13 [11	10 ±	11 2]	20 [22	24 ±	22 2]	17* [20	22* ±	20* 3]	7* [7	8* ±	5* 2]
	5000 +	101 [101	100 ±	103 2]	10 [8	7 ±	8 2]	23 [24	22 ±	26 2]	17* [15	16* ±	13* 2]	5* [3	2* ±	3* 2]
Positive control		911 [897	894 ±	886 b) 13]	604 [582	557 ±	584 c) 24]	162 [156	158 ±	147 b) 8]	673 [665	674 ±	647 d) 15]	248 [259	247 ±	281 e) 19]

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	129 [132	136 ±	132 4]	14 [13	11 ±	13 2]	24 [27	28 ±	29 3]	31 [29	27 ±	28 2]	24 [24	26 ±	23 2]
	8.19	131 [135	129 ±	145 9]	14 [16	19 ±	16 3]	28 [24	23 ±	22 3]	28 [26	24 ±	26 2]	18 [17	18 ±	14 2]
	20.5	131 [137	139 ±	141 5]	16 [15	14 ±	14 1]	27 [28	31 ±	26 3]	33 [35	38 ±	34 3]	16 [16	16 ±	15 1]
	51.2	120 [125	127 ±	128 4]	13 [12	12 ±	10 2]	24 [23	25 ±	21 2]	21 [26	30 ±	28 5]	13 [16	16 ±	19 3]
	128	112 [108	105 ±	106 4]	9 [8	7 ±	8 1]	23 [24	28 ±	21 4]	28 [29	32 ±	26 3]	14 [15	15 ±	16 1]
	320	106 [106	108 ±	105 2]	10 [9	8 ±	8 1]	24 [23	23 ±	23 1]	29 [26	24 ±	26 3]	17 [16	14 ±	17 2]
	800	86 [89	95 ±	86 5]	11 [13	15 ±	14 2]	24 [24	24 ±	25 1]	28 [28	28 ±	27 1]	12 [14	14 ±	16 2]
	2000 +	89 [91	99 ±	85 7]	11 [11	13 ±	10 2]	21 [23	26 ±	23 3]	27 [26	29 ±	23 3]	16 [13	11 ±	11 3]
Positive control	5000 +	76 [83	86 ±	87 6]	9 [12	14 ±	14 3]	23 [22	24 ±	20 2]	19 [19	21 ±	18 2]	5 [5	4 ±	6 1]
		1013 [1054	1048 ±	1101 b) 44]	321 [332	341 ±	335 c) 10]	498 [501	510 ±	494 d) 8]	387 [377	367 ±	378 e) 10]	180 [185	179 ±	196 c) 10]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 µg/plate c): 2-AA, 2 µg/plate d): 2-AA, 10 µg/plate e): 2-AA, 0.5 µg/plate

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study)
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	122 [126	125 $\pm$	132 5]	16 [16	17 $\pm$	14 2]	27 [28	34 $\pm$	24 5]	19 [21	22 $\pm$	22 2]	9 [11	14 $\pm$	11 3]
	1.31	126 [129	130 $\pm$	132 3]	15 [14	12 $\pm$	15 2]	22 [25	25 $\pm$	27 3]	19 [17	14 $\pm$	19 3]	9 [11	11 $\pm$	13 2]
	3.28	121 [122	130 $\pm$	115 8]	15 [15	12 $\pm$	18 3]	21 [21	20 $\pm$	21 1]	18 [19	24 $\pm$	16 4]	9 [9	7 $\pm$	10 2]
	8.19	114 [107	104 $\pm$	102 6]	13 [13	14 $\pm$	12 1]	26 [26	26 $\pm$	27 1]	15 [18	19 $\pm$	20 3]	11 [10	11 $\pm$	8 2]
	20.5	113 [116	113 $\pm$	123 6]	17 [16	18 $\pm$	14 2]	27 [26	24 $\pm$	28 2]	12 [14	12 $\pm$	19 4]	12 [10	9 $\pm$	8 2]
	51.2	100 [104	106 $\pm$	105 3]	15 [15	14 $\pm$	15 1]	23 [26	28 $\pm$	26 3]	14 [15	17 $\pm$	13 2]	10 [9	10 $\pm$	6 2]
	128	106 [107	113 $\pm$	103 5]	12 [12	16 $\pm$	8 4]	18 [20	21 $\pm$	20 2]	17 [18	20 $\pm$	18 2]	12 [11	11 $\pm$	9 2]
	320	99* [97	95* $\pm$	96* 2]	10 [12	13 $\pm$	12 2]	15 [18	20 $\pm$	20 3]	16* [18	17* $\pm$	21* 3]	8* [9	12* $\pm$	8* 2]

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

Table 3. Continued

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	800	99 *	91 *	102 *	13	10	9	25	26	24	15 *	14 *	17 *	9 *	9 *	12 *
		[97	±	6]	[11	±	2]	[25	±	1]	[15	±	2]	[10	±	2]
	2000 +	102 *	95 *	103 *	11	13	12	24	23	21	19 *	14 *	18 *	8 *	9 *	6 *
		[100	±	4]	[12	±	1]	[23	±	2]	[17	±	3]	[8	±	2]
	5000 +	97 *	98 *	91 *	9	12	10	18	25	20	10 *	9 *	13 *	5 *	5 *	4 *
		[95	±	4]	[10	±	2]	[21	±	4]	[11	±	2]	[5	±	1]
Positive control		830	726	767 b)	516	592	553 c)	150	164	142 b)	679	700	649 d)	167	239	224 e)
		[774	±	52]	[554	±	38]	[152	±	11]	[676	±	26]	[210	±	38]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 4. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	125	130	118	12	19	15	21	32	23	25	19	21	10	9	9
		[124	±	6]	[15	±	4]	[25	±	6]	[22	±	3]	[9	±	1]
	9.77	108	112	114							23	24	20	8	12	8
		[111	±	3]							[22	±	2]	[9	±	2]
	19.5	103	119	96							26	22	13	9	10	7
		[106	±	12]							[20	±	7]	[9	±	2]
	39.1	110	110	85							21	27	22	12	8	9
		[102	±	14]							[23	±	3]	[10	±	2]
	78.1	111	102	97							25	22	30	9	8	8
		[103	±	7]							[26	±	4]	[8	±	1]
	156	92	105	102	8	13	13	22	19	27	14	15	24	7 *	7 *	6 *
		[100	±	7]	[11	±	3]	[23	±	4]	[18	±	6]	[7	±	1]
	313	83	103	104	14	13	7	23	28	21	17	15	20	9 *	5 *	7 *
		[97	±	12]	[11	±	4]	[24	±	4]	[17	±	3]	[7	±	2]
	625	88 *	103 *	111 *	8	15	8	28	25	22	23 *	26 *	22 *	5 *	7 *	8 *
		[101	±	12]	[10	±	4]	[25	±	3]	[24	±	2]	[7	±	2]

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

* : Growth inhibition was observed.

Table 4. Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	1250 +				16	14	15	25	34	22						
					[15	$\pm$	1]	[27	$\pm$	6]						
	2500 +				8	11	9	21	12	23						
					[9	$\pm$	2]	[19	$\pm$	6]						
	5000 +				12	11	12	22	17	19						
					[12	$\pm$	1]	[19	$\pm$	3]						
Positive control		493	510	494 b)	565	570	592 c)	151	137	135 b)	713	673	658 d)	272	272	219 e)
		[499	$\pm$	10]	[576	$\pm$	14]	[141	$\pm$	9]	[681	$\pm$	28]	[254	$\pm$	31]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	117	127	114	16	10	9	28	23	26	21	25	35	24	22	19
		[119	±	7]	[12	±	4]	[26	±	3]	[27	±	7]	[22	±	3]
	156	98	101	104	9	13	10	23	23	20	25	28	32	25	23	19
		[101	±	3]	[11	±	2]	[22	±	2]	[28	±	4]	[22	±	3]
	313	100	103	106	17	16	8	30	24	16	29	25	23	17	26	18
		[103	±	3]	[14	±	5]	[23	±	7]	[26	±	3]	[20	±	5]
	625	99	97	104	16	8	12	17	33	14	32	28	22	19	24	20
		[100	±	4]	[12	±	4]	[21	±	10]	[27	±	5]	[21	±	3]
	1250 +	87	94	80	16	12	16	18	17	24	27	35	26	13	11	17
		[87	±	7]	[15	±	2]	[20	±	4]	[29	±	5]	[14	±	3]
	2500 +	90	88	83	12	10	6	21	18	15	23	19	23	9	8	6
		[87	±	4]	[9	±	3]	[18	±	3]	[22	±	2]	[8	±	2]
	5000 +	86	73	85	7	6	10	18	16	20	23	21	20	9	8	6
		[81	±	7]	[8	±	2]	[18	±	2]	[21	±	2]	[8	±	2]
Positive control		939	842	954 b)	371	318	359 c)	482	559	561 d)	406	415	362 e)	120	150	142 c)
		[912	±	61]	[349	±	28]	[534	±	45]	[394	±	28]	[137	±	16]

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 µg/plate c):2-AA, 2 µg/plate d):2-AA, 10 µg/plate e):2-AA, 0.5 µg/plate

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	121 [117	119 ±	110 6]	16 [13	12 ±	12 2]	19 [18	19 ±	17 1]	29 [28	22 ±	34 6]	14 [14	15 ±	14 1]
	9.77													15 [14	13 ±	14 1]
	19.5	124 [115	102 ±	118 11]							22 [27	30 ±	29 4]	8 [14	16 ±	17 5]
	39.1	122 [113	102 ±	116 10]							22 [23	26 ±	22 2]	16 [14	11 ±	16 3]
	78.1	120 [114	114 ±	108 6]							26 [25	27 ±	22 3]	16 [14	10 ±	16 3]
	156	119 [117	112 ±	121 5]	9 [11	12 ±	11 2]	28 [24	21 ±	24 4]	23 [23	19 ±	27 4]	17 [14	12 ±	13 3]
	313	100 [104	107 ±	106 4]	8 [10	11 ±	12 2]	24 [21	19 ±	21 3]	27 [25	26 ±	21 3]	14* [13	17* ±	8* 5]
	625	116* [114	112* ±	113* 2]	12 [12	8 ±	15 4]	24 [24	25 ±	22 2]	21* [25	22* ±	31* 6]	11* [12	11* ±	14* 2]

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

* : Growth inhibition was observed.

Table 6. Continued

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	1250 +				14	9	11	22	15	16						
					[11	±	3]	[18	±	4]						
	2500 +				15	12	11	22	21	17						
					[13	±	2]	[20	±	3]						
	5000 +				6	9	9	20	20	17						
					[8	±	2]	[19	±	2]						
Positive control		677	699	722 b)	564	622	556 c)	155	156	141 b)	725	699	768 d)	173	221	167 e)
		[699	±	23]	[581	±	36]	[151	±	8]	[731	±	35]	[187	±	30]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 7. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	117	123	119	17	10	8	22	28	19	26	40	28	34	27	24
		[120	$\pm$	3]	[12	$\pm$	5]	[23	$\pm$	5]	[31	$\pm$	8]	[28	$\pm$	5]
	156	96	101	106	7	8	12	20	23	23	36	27	27	32	29	34
		[101	$\pm$	5]	[9	$\pm$	3]	[22	$\pm$	2]	[30	$\pm$	5]	[32	$\pm$	3]
	313	84	84	74	10	12	7	16	16	24	28	24	36	23	23	21
		[81	$\pm$	6]	[10	$\pm$	3]	[19	$\pm$	5]	[29	$\pm$	6]	[22	$\pm$	1]
	625	108	89	96	12	17	13	20	17	21	31	35	40	23	16	19
		[98	$\pm$	10]	[14	$\pm$	3]	[19	$\pm$	2]	[35	$\pm$	5]	[19	$\pm$	4]
	1250 +	95	98	98	14	7	10	22	20	28	28	33	23	24	17	20
		[97	$\pm$	2]	[10	$\pm$	4]	[23	$\pm$	4]	[28	$\pm$	5]	[20	$\pm$	4]
	2500 +	87	85	96	10	9	15	25	21	22	34	32	27	15	19	13
		[89	$\pm$	6]	[11	$\pm$	3]	[23	$\pm$	2]	[31	$\pm$	4]	[16	$\pm$	3]
	5000 +	87	78	85	7	9	9	19	18	20	29	28	24	12	16	13
		[83	$\pm$	5]	[8	$\pm$	1]	[19	$\pm$	1]	[27	$\pm$	3]	[14	$\pm$	2]
Positive control		1027	1142	1047 b)	338	381	348 c)	558	499	524 d)	478	409	461 e)	162	169	200 c)
		[1072	$\pm$	61]	[356	$\pm$	23]	[527	$\pm$	30]	[449	$\pm$	36]	[177	$\pm$	20]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.