

最 終 報 告 書

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

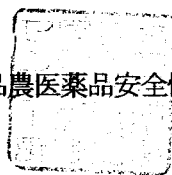
試験番号：9049 (115-200)

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.....	4
13. 被験物質.....	7
14. 試験材料および方法.....	9
15. 試験結果.....	19
16. 考察および結論.....	21
17. 参考文献.....	22

Figures

Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment].....	24
Figure 2	Growth inhibition of CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment].....	25
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment].....	26
Figure 4	Incidence of polyploid cells induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment].....	27
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Confirmative examination) [Short-term treatment: +S9]	28

Figure 6	Incidence of polyploid cells induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Confirmative examination) [Short-term treatment: +S9]	29
Figure 7	Incidence of structural aberrations induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment: 24h].....	30
Figure 8	Incidence of polyploid cells induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment: 24h].....	31
Tables		
Table 1	Results of growth inhibition test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment]	32
Table 2	Results of growth inhibition test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment].....	33
Table 3	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment: -S9]	34
Table 4	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment: +S9]	35
Table 5	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Confirmative examination) [Short-term treatment: +S9]	36
Table 6	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment: 24h].....	37

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol は染色体異常を誘起する可能性があるもの（疑陽性）と判断した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株（CHL/IU）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に染色体異常試験の用量を設定した。短時間処理法-S9 処理では 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理では 25.0, 35.0, 45.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ の 3~4 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理では、明確な染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。しかしながら、+S9 処理では、染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の有意な増加が認められたが、その出現頻度が 10%未満と低いことから、明確な陽性反応と判断できないため確認試験を実施した。確認試験では、15.0, 25.0, 35.0, 45.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、再現性が得られたものの、狭い用量範囲での出現率の上昇であること、および出現頻度が 10%未満と低いことを考慮し、陽性反応と判断できなかった。さらに、類似化合物では連続処理法で明らかに倍数性細胞の誘発が認められていることから、連続処理法 24 時間処理群においても 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理による染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。

13. 被験物質

13.1. 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)

13.2. ロット番号

13.3. 純度

99.8%

残り 0.2%不明

13.4. 提供元

13.5. 特性分析年月日

2005 年 3 月 16 日

13.6. 保存条件

気密, 室温 (1~30°C)

13.7. 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)

13.8. 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

13.9. 別名

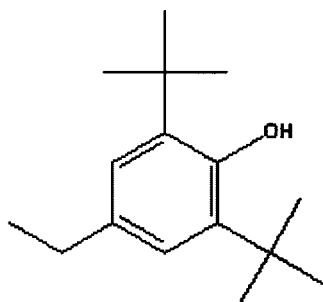
Phenol, 2,6-di-tert-buthyl-4-ethyl-

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

13.10. CAS No.

4130-42-1

13.11. 化学構造



13.12. 分子式

$C_{16}H_{26}O$

13.13. 分子量

234.38

13.14. 物質の状態

形状：結晶性粉状

色：淡黄白色

13.15. 融点／沸点

融点：45.7℃／沸点：268.6℃

13.16. 引火点

132℃（クリーブランド開放式）

13.17. 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）

13.18. 安定性

通常取り扱い条件においては安定

13.19. 分配係数（Octanol/Water）

Log Pow > 3.27

13.20. 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。

13.21. 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。

13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、約1g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。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において遺伝毒性ガイドラインで指定されていることから、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を使用した。CHL/IU 細胞は1984年11月15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、ジメチルスルホキシド（DMSO, GC 用, 純度99.9%, Lot No. K26414578, Merck）を容量比で10%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては、凍結した細胞を融解した後、3～5日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験では継代数8の細胞（Lot No. CLC-001）を、染色体異常試験では継代数14の細胞（Lot No. CLC-001）を、染色体異常試験（追加試験）では継代数21の細胞（Lot No. CLC-001）、染色体異常試験（確認試験）では継代数3の細胞（Lot No. CLC-004）を用いた。

凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査（陰性）、倍加時間の測定（Lot No. CLC-001 : 17.9 時間, Lot No. CLC-004 : 15.2 時間）、染色体数（モード数25本の細胞が, Lot No. CLC-001 : 82%, CLC-004 : 84%）の測定ならびに陰性対照および陽性対照における構造異常出現頻度の確認を実施し、異常のない細胞を試験に使用した。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（IWAKI : Lot No. 919084 【細胞増殖抑制試験】, 519045 【細胞増殖抑制試験以外】, 旭テクノグラス）に非働化（56°C, 30 分）済みの仔牛血清（Lot No. 511116 【細胞増殖抑制試験】, 5423845D 【細胞増殖抑制試験以外】, Invitrogen）を最終濃度で10%になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所（15°C 以下）に保存した。

14.3. 培養条件

CO₂インキュベーター（三洋電機バイオメディカ）を用い、CO₂濃度5%, 37°Cの条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-520 【確認試験以外】, CAM-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.

14.4.1. 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を次に示す.

	確認試験以外	確認試験
ロット番号	RAA-520	RAA-526
製造年月日	2005 年 4 月 28 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	
体重	193~237 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	24.86 mg/mL	25.58 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示す.

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1mL
KCl	33 μmol/0.1mL
G-6-P	5 μmol/0.1mL
NADP	4 μmol/0.1mL
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol/0.2mL
蒸留水	0.1 mL

14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に不溶で DMSO に易溶であり、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 時間以内に処理を行った。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 1172 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 3 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (234.4 mg/mL 溶液) を準備した。1 mL の DMSO に対し、この 234.4 mg/mL 調製原液を 1 mL 加えることにより、117.2 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、58.6, 29.3, 14.7, 7.33, 3.66, 1.83, 0.916 および 0.458 mg/mL 溶液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 85 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (8.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を以下に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (染色体異常試験)

設定濃度 (mg/mL)	被験物質液 採取元 (mg/mL)	採取量 (mL)	DMSO (mL)
7.50	8.50	3.0	0.4
6.50	7.50	2.6	0.4
5.50	6.50	2.2	0.4
4.50	5.50	1.8	0.4
3.50	4.50	1.4	0.4
2.50	3.50	1.0	0.4
1.50	2.50	0.6	0.4
0.50	1.50	0.2	0.4

追加試験では、使用直前に被験物質 75 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (7.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を次に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (追加試験)

設定濃度 (mg/mL)	被験物質液 採取元 (mg/mL)	採取量 (mL)	DMSO (mL)
6.50	7.50	2.6	0.4
5.50	6.50	2.2	0.4
4.50	5.50	1.8	0.4
3.50	4.50	1.4	0.4
2.50	3.50	1.0	0.4
1.50	2.50	0.6	0.4
0.50	1.50	0.2	0.4

確認試験では、使用直前に被験物質 65 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (6.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を以下に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (確認試験)

設定濃度 (mg/mL)	被験物質液 採取元 (mg/mL)	採取量 (mL)	DMSO (mL)
5.50	6.50	2.2	0.4
4.50	5.50	1.8	0.4
3.50	4.50	1.4	0.4
2.50	3.50	1.0	0.4
1.50	2.50	0.6	0.4
0.50	1.50	0.2	0.4

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K3G77, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, Lot No. 415ACF, 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

用量は、短時間処理法で 0.1 µg/mL, 連続処理法で 0.05 µg/mL とした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K3G77 【確認試験以外】, K4D88 【確認試験】) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP : Lot No. 4028, 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し, 1 mL ずつ分注した後, 凍結保存したものを試験に用いた。

用量は 12.5 µg/mL とした。

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 10 mM 相当の 2344 µg/mL を最高用量とし, 以下 1172, 586, 293, 147, 73.3, 36.6, 18.3, 9.16 および 4.58 µg/mL の 10 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした。

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて, 試験番号, 処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート (細胞培養用マルチプレート 12F, 住友ベークライト) の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した。培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後, 各ウェルの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 064K2309, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 µL を加え, さらに 18 時間培養を続けた。

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した。培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った。

その後の操作は 14.7.3. に記載した方法に準じた。

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した。培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行い, さらに 24 時間培養を続けた。

14.7.6. 処理量一覧

	陰性対照あるいは被験物質		
	培養液	S9 mix	溶媒／ 被験物質液
-S9 処理	600 μ L	-	6 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	6 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	6 μ L

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウェルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用，Lot No. KLH9734，和光純薬工業）を加えて10分間細胞を固定した。次いで、0.1%クリスタル・バイオレット（Lot No. K31134240，Merck）水溶液で10分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウェルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を3 mL 加え、5分間放置した。各ウェルの溶出液を96ウェルのプレート（アッセイプレート，IWAKI）に各々300 μ L 分注し、マイクロプレートリーダー（モデル450，BIO・RAD）を用いて570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求めた。

さらに、全ての処理法において細胞増殖抑制が認められたため、プロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には4.58～73.3 μ g/mL の5点（-S9 処理），18.3～73.3 μ g/mL の3点（+S9 処理）および9.16～73.3 μ g/mL の4点（24 時間処理）を用いた。

14.8. 染色体異常試験，追加試験および確認試験

14.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験の結果，全ての処理法において細胞毒性が認められ，50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ71.0（短時間処理法-S9 処理），34.3（短時間処理法+S9 処理）および52.0 μ g/mL（連続処理法24 時間処理）と算出された。したがって，染色体異常試験では，細胞の増殖を50%以上抑制すると推定される用量，すなわち，-S9 処理で85.0 μ g/mL，+S9 処理で45.0 μ g/mL，24 時間処理で65.0 μ g/mL をそれぞれ最高用量とし，次に示す5～6 用量を設定した。

処理法	用量 (μg/mL)								
-S9 処理	—	—	—	<u>35.0</u>	45.0	<u>55.0</u>	65.0	<u>75.0</u>	85.0
+S9 処理	5.00	15.0	25.0	35.0	45.0	—	—	—	—
24 時間処理	—	—	25.0	35.0	45.0	55.0	65.0	—	—

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

染色体異常試験の短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理において、全ての用量で相対細胞増殖率が 50%以上を示し、細胞の増殖を 50%以上抑制する用量が得られなかった。したがって、+S9 処理および 24 時間処理について追加試験を実施した。追加試験では、以下に示す 6 用量を設定した。

処理法	用量 (μg/mL)								
+S9 処理	5.00	15.0	<u>25.0</u>	<u>35.0</u>	<u>45.0</u>	<u>55.0</u>	—	—	—
24 時間処理	—	—	25.0	<u>35.0</u>	45.0	<u>55.0</u>	65.0	<u>75.0</u>	—

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

追加試験の短時間処理法+S9 処理において、明確に陽性であると判断ができなかったため、+S9 処理について確認試験を実施した。確認試験では、以下に示す 7 用量を設定した。

処理法	用量 (μg/mL)							
+S9 処理	5.00	<u>15.0</u>	<u>25.0</u>	<u>35.0</u>	<u>45.0</u>	<u>55.0</u>	65.0	—

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ、住友ベークライト）に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は 14.8.3. に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	陰性対照あるいは被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	溶媒/ 被験物質液	培養液	S9 mix	陽性対照 物質液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に、最終濃度で $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1252976, Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1233304 【染色体異常試験】、1263419 【追加試験および確認試験】、Invitrogen) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、 37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、 37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を 1 枚作製した。その後、染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を 1 滴滴下し、染色体標本を 2 枚作製した。スライド標本を十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Lot No. TP601474, Merck) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Lot No. OB408561 【染色体異常試験】、OB318388 【追加試験および確認試験】、Merck) で 12 分間染色した。ス

ライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 細胞増殖抑制制度の測定

染色体標本作製時に、陰性対照群、各被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、ATP フォトメーター（ルミテスターC-100LU, キッコーマン）を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を 50 μ L 添加し、攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を 100 μ L 分注し、ATP 測定用試薬キット（ルシフェール 250: キッコーマン）の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量（Relative Light Unit : RLU）を測定した。陰性対照群における RLU に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

14.8.10. 評価対象

観察用量としては、14.8.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の 50%未満になる最も低い用量を最高用量とした。なお、+S9 処理および連続処理法については追加試験において作成した標本から評価対象を選択し、+S9 処理では高用量の細胞毒性領域での染色体異常誘発性を確認するため、連続する 4 用量を評価対象（観察用量）とした。さらに、確認試験では再現性を確認する事から、追加試験で観察した最高用量から連続する 5 用量を評価対象（観察用量）とした。-S9 処理および連続処理法においては連続する 3 用量では用量間隔が狭いため、間隔を空けて 3 用量を評価対象（観察用量）とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。ただし、短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理の標本は、追加試験において作成した標本を採用した。また、確認試験の標本についてもコード化し、観察した。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下（ $\times 600$ ）で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）、染色分体切断（csb）、染色分体交換（cte）、染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも 5%未満であること。陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること。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。

14.10. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞については異常細胞数に含めないで判定した。

異常細胞の出現頻度を、Fisher の直接確率計算法（有意水準片側 2.5%）を用いて検定した。また、用量依存性については、Cochran Armitage の傾向検定（有意水準片側 2.5%）を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した.

50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法-S9 処理で 71.0 $\mu\text{g/mL}$, 短時間処理法+S9 処理では 34.3 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法 24 時間処理では 52.0 $\mu\text{g/mL}$ であった.

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時, 全ての処理の 147 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において透明油滴状の析出物が認められ, さらに 586 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では白色油滴状の析出物も認められた. 被験物質処理終了時, 全ての処理の 147 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において透明油滴状の析出物が認められた.

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, 4, Table 3 および Appendix 1 に示した.

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し, 陰性対照群 (1.0%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は, 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し, 陰性対照群 (0.0%) と同等であった. また, 用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 75.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 49.0%であった.

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では, 染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 38.0% ($p \leq 0.025$) であった.

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 3, 4, Table 4 および Appendix 2 に示した.

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 5.5%, 45.0 $\mu\text{g/mL}$ で 8.5% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 8.0% ($p \leq 0.025$) を示し, 陰性対照群 (1.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた. 倍数性細胞の出現頻度は, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 5.5% ($p \leq 0.025$), 45.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 5.0% ($p \leq 0.025$) を示し, 陰性対照群 (0.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた. しかしながら, これらの出現頻度が 10%未満と低いことから, 明確な陽性反応と判断できなかった. また, 用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 55.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 37.9%であっ

た。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 38.5% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 7, 8, Table 6 および Appendix 4 に示した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は、35.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0% を示し、陰性対照群 (1.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0% を示し、陰性対照群 (0.0%) と同等であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 27.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、75.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において白色膜状の析出物が認められた。

15.3. 染色体異常試験 (確認試験)

15.3.1. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 5, 6, Table 5 および Appendix 3 に示した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は 15.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 45.0 $\mu\text{g/mL}$ で 6.0% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5% ($p \leq 0.025$) を示し、陰性対照群 (0.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた。倍数性細胞の出現頻度は、15.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 7.0% ($p \leq 0.025$), 45.0 $\mu\text{g/mL}$ で 8.0% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 7.0% ($p \leq 0.025$) を示し、陰性対照群 (0.0%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた。しかしながら、染色体異常試験と再現性が得られたものの、狭い用量範囲での出現頻度の上昇であること、および出現頻度が 10% 未満と低いことを考慮し、陽性反応と判断できなかった。また、用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 55.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 22.9% であった。

一方、陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 47.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.3.2. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、析出あるいは培養液の色変化等の特筆すべき変化が認められなかった。

16. 考察および結論

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に、短時間処理法-S9 処理、同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では細胞毒性が顕著に認められる用量まで検討した。

その結果、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理では、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。しかしながら、+S9 処理では、染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の有意な増加が認められたが、その出現頻度が 10%未満と低いことから、明確な陽性反応と判断できないため確認試験を実施した。

確認試験の結果、染色体異常試験との再現性が得られたものの、狭い用量範囲での出現頻度の上昇であること、および出現頻度が 10%未満と低いことを考慮すると明確な陽性反応であると判断できなかった。さらに、類似化合物では連続処理法で明らかに倍數性細胞の誘発が認められている¹⁾ことから、連続処理法の標本についても追加観察したが、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

なお、陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 5) 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なされたと判断された。

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²⁾、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性 (構造異常および倍數性細胞の出現頻度の上昇)¹⁾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 (構造異常の出現頻度の上昇)⁴⁾と報告されている。このことから、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の当該試験における CHL/IU細胞への作用は、これら類縁物質の反応性に類似しているが、弱いものであると考えられた。

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 のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は疑陽性と判定した。

17. 参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 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. 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課 監修 “労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく 既存化学物質 変異原性試験データ集”, 日本化学物質安全・情報センター, 1996

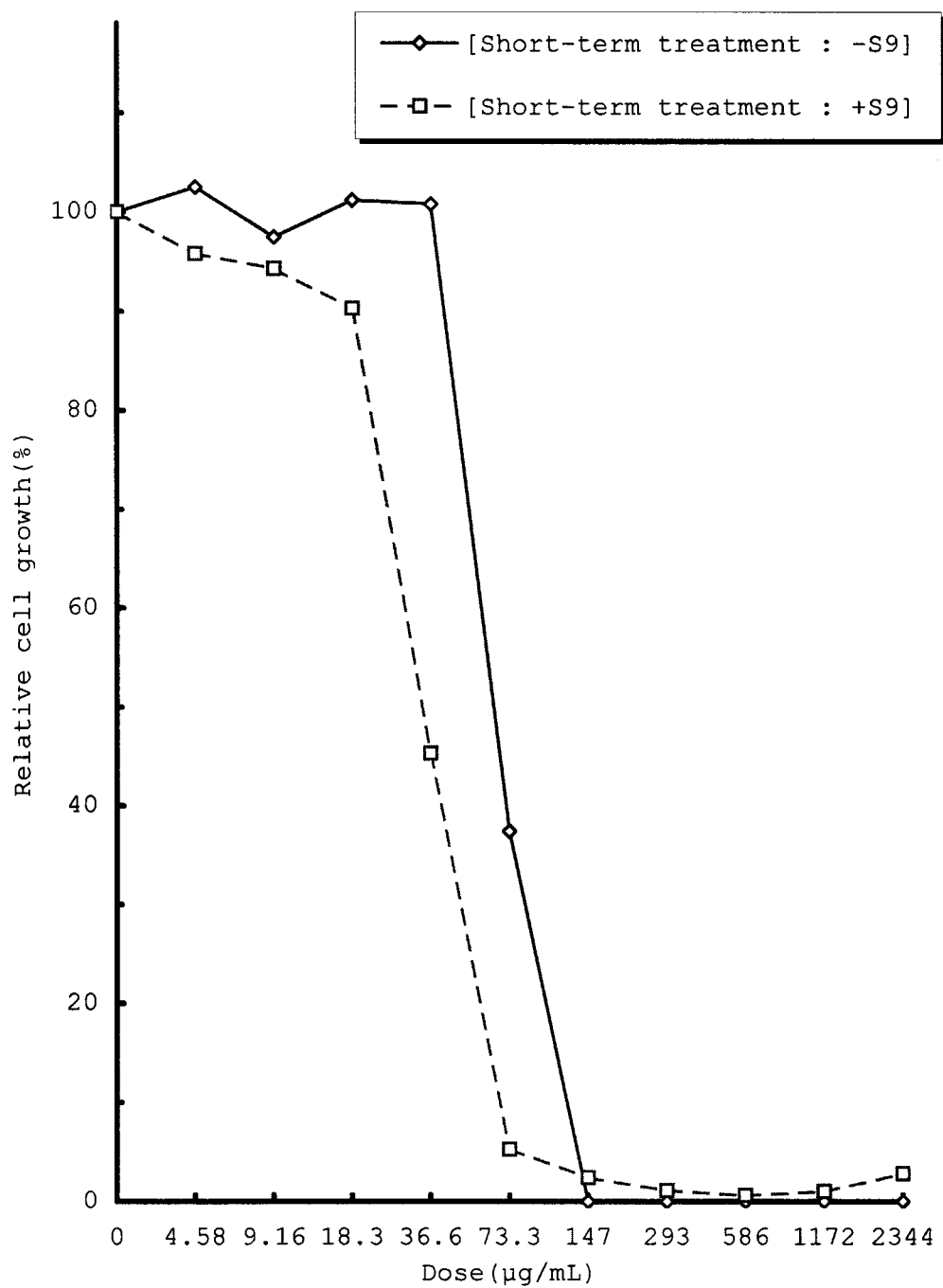


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment]

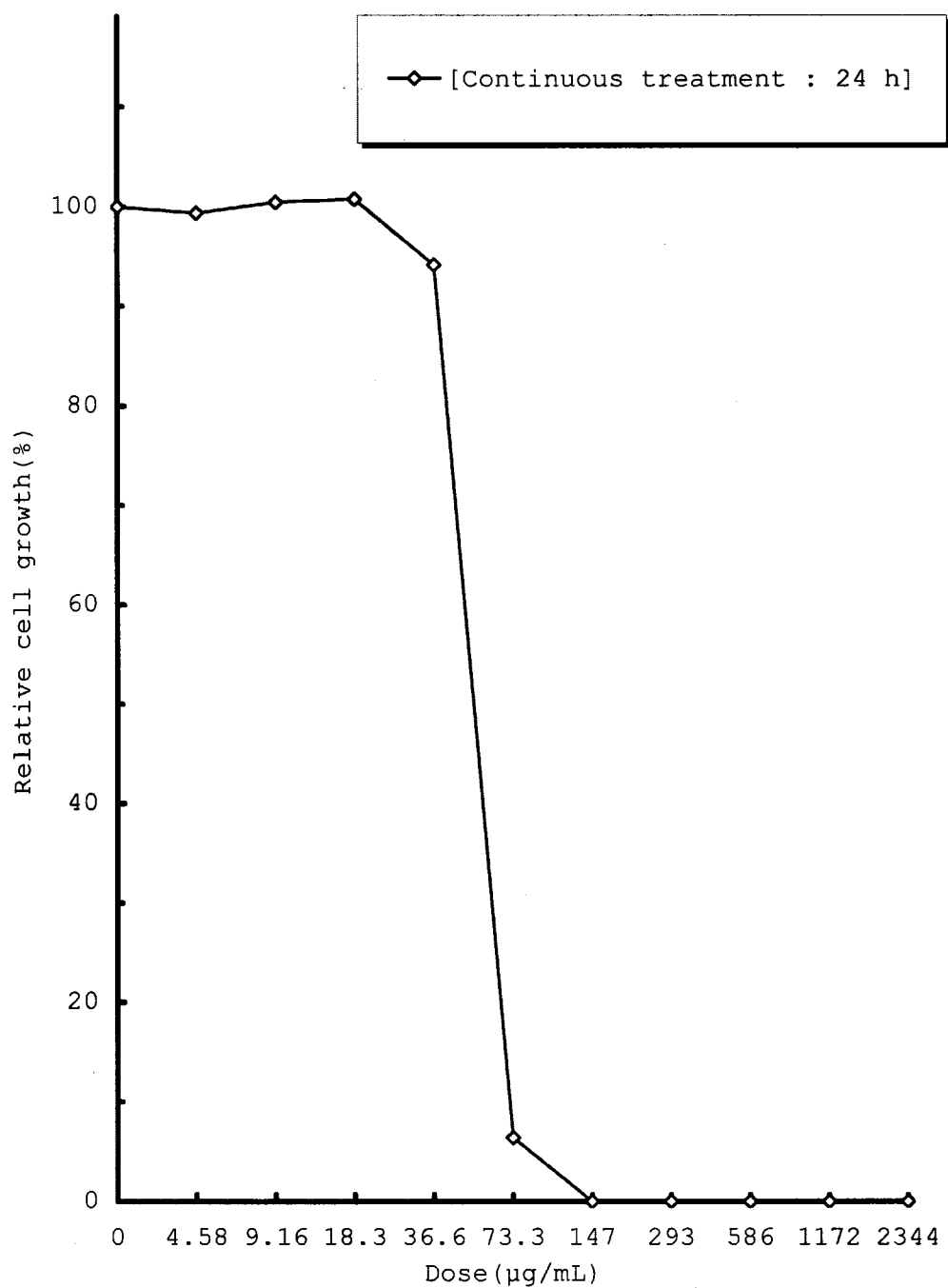


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment]

Exp. No. 9049 (115-200)

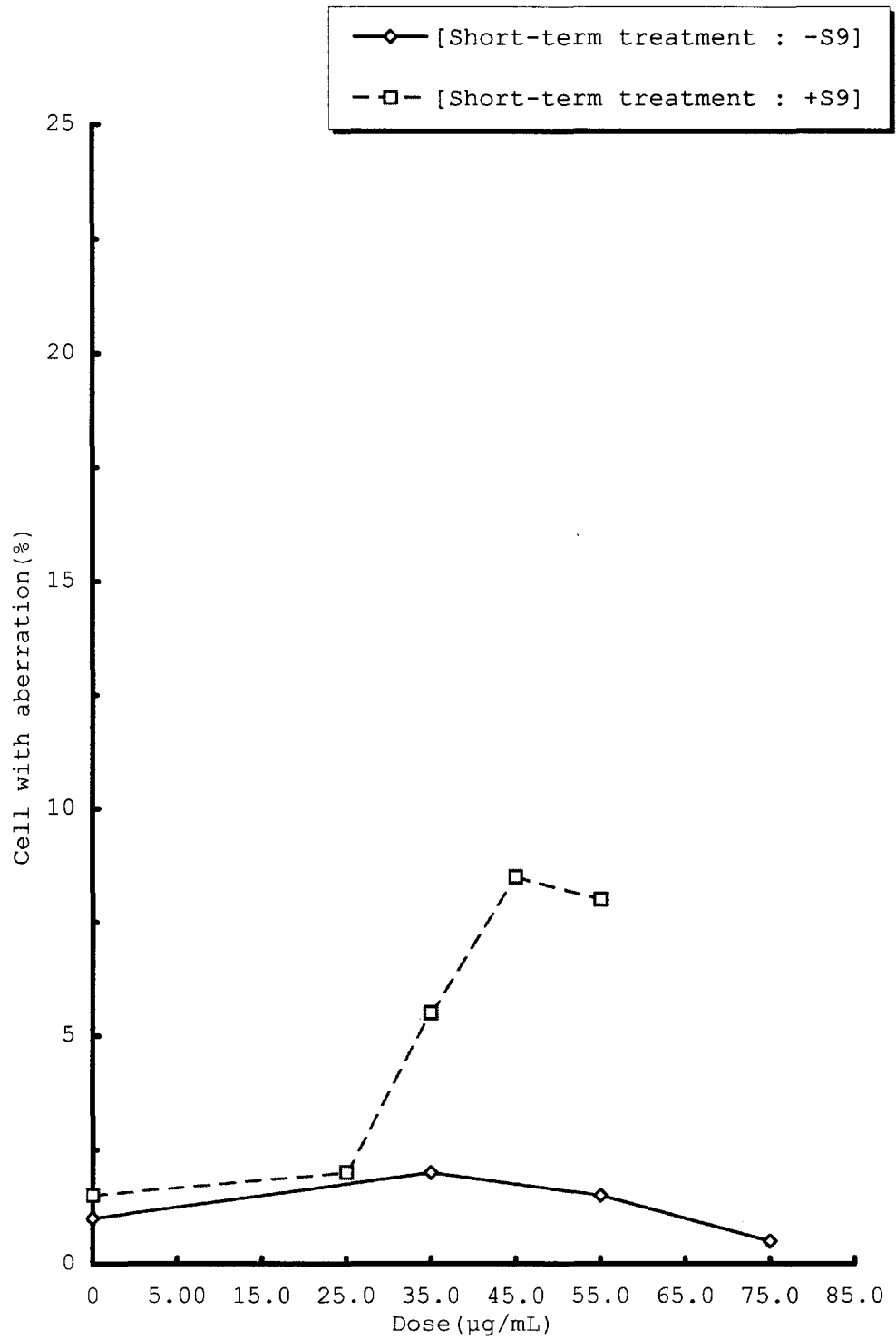


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment]

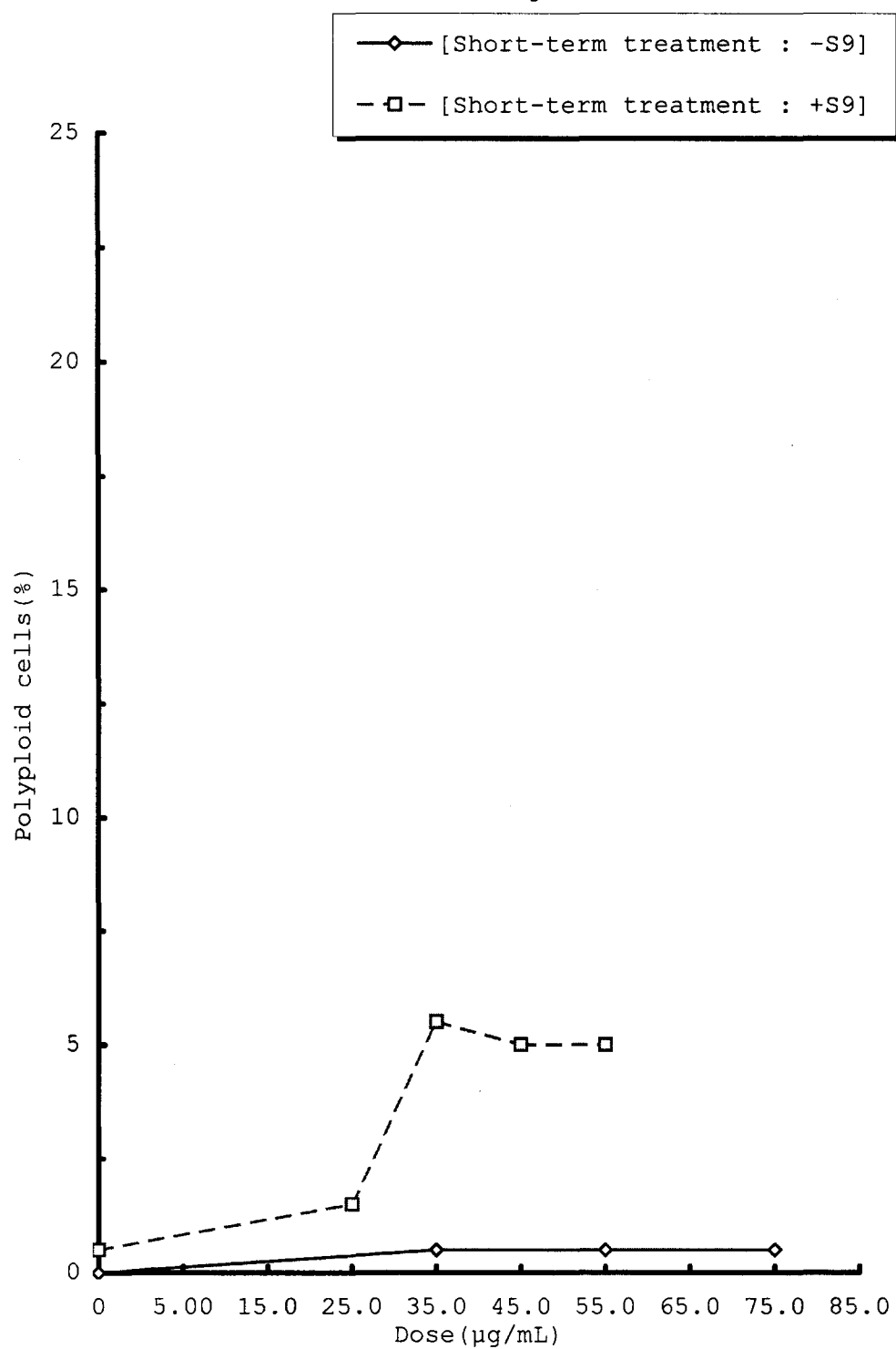


Figure 4. Incidence of polyploid cells induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment]

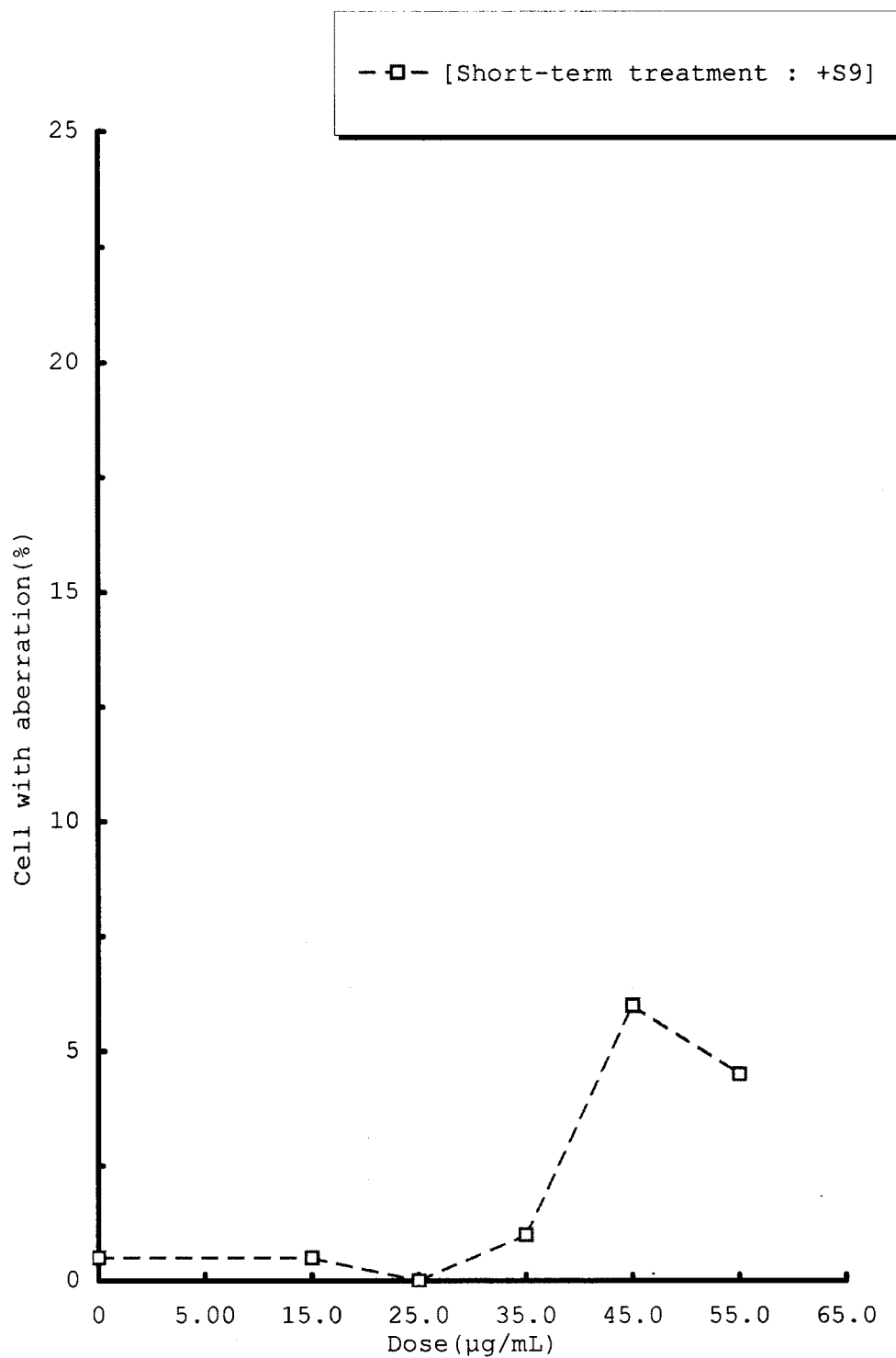


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Confirmative examination) [Short-term treatment: +S9]

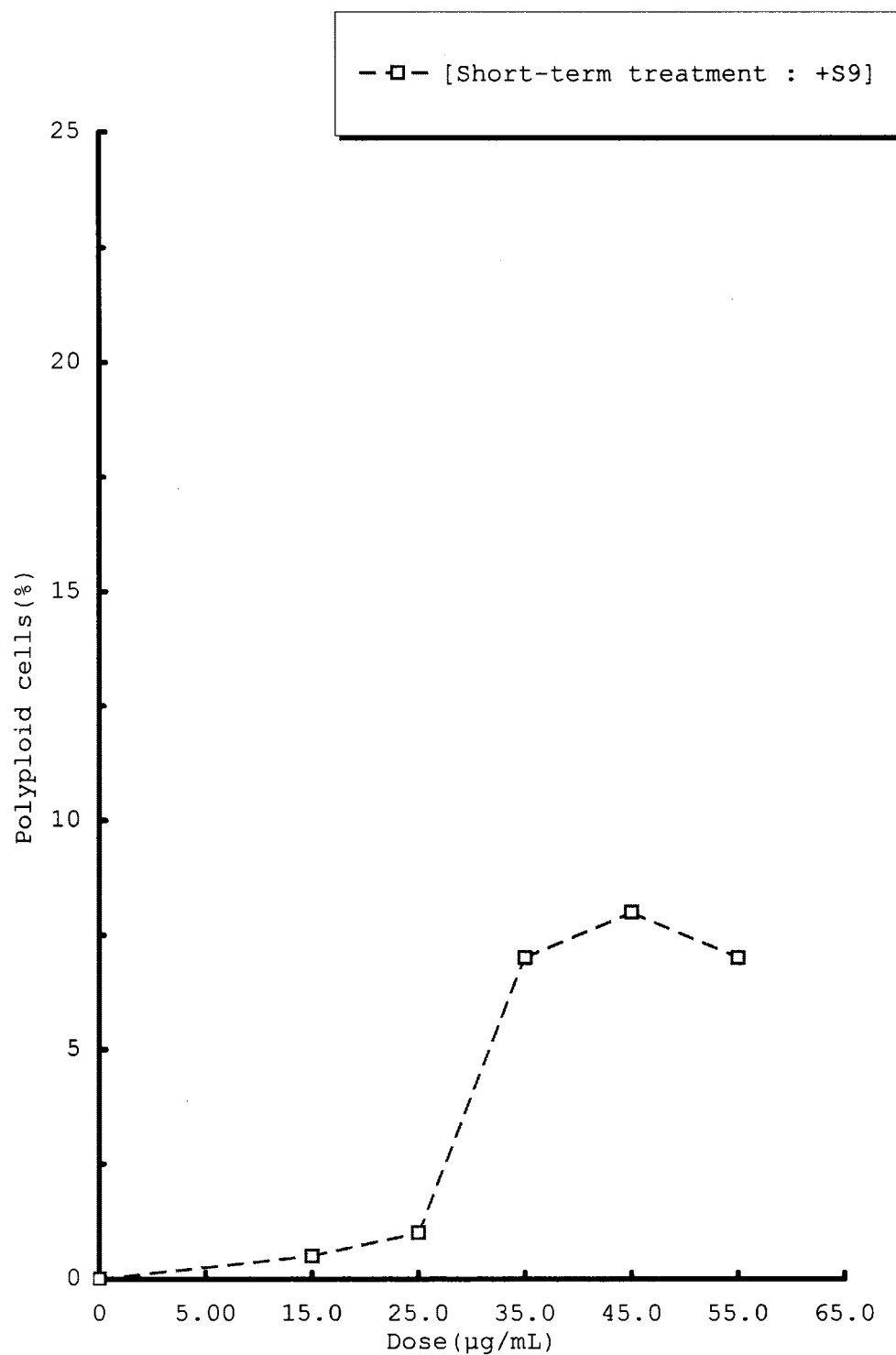


Figure 6. Incidence of polyploid cells induced
by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination)
[Short-term treatment:+S9]

Exp. No. 9049 (115-200)

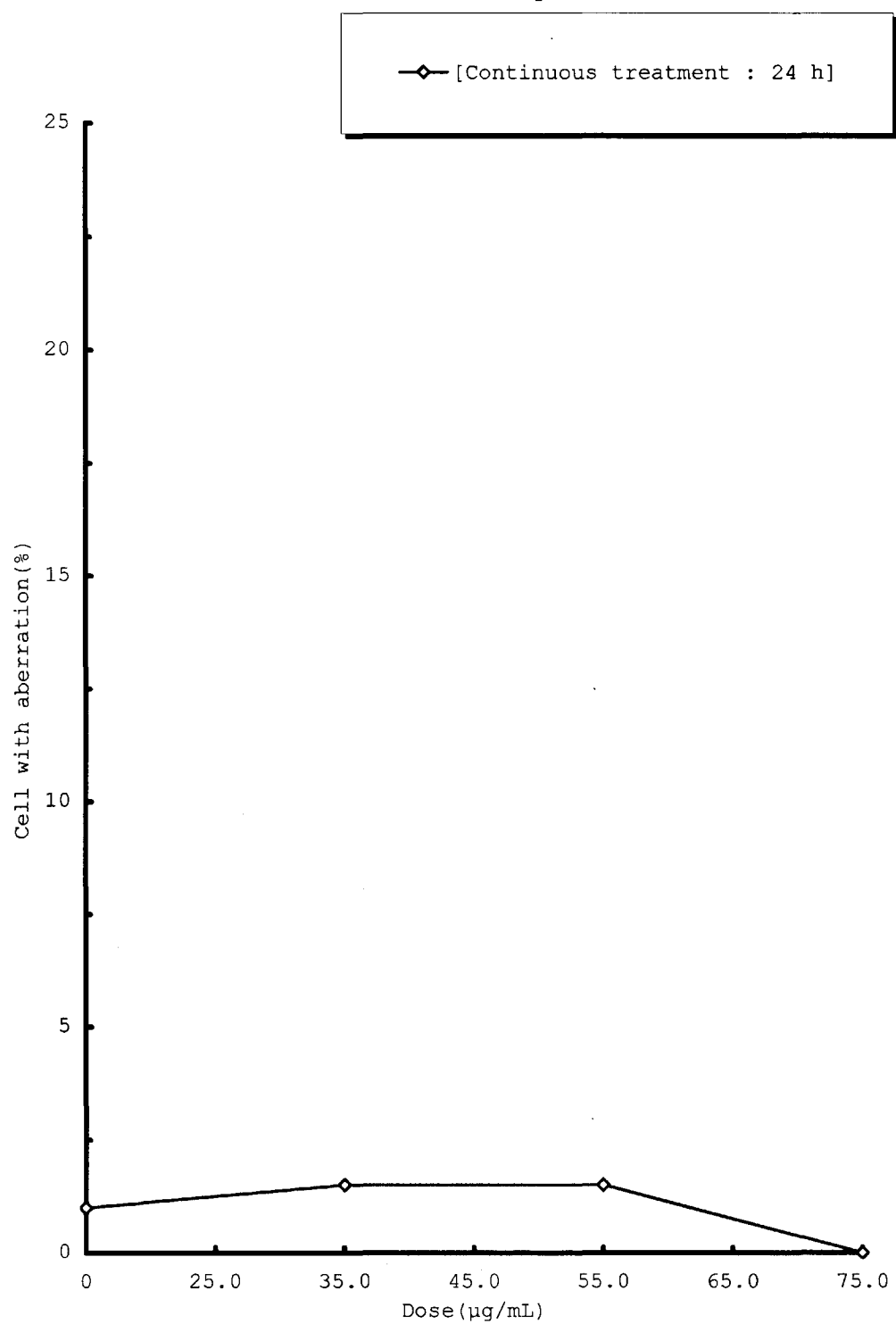


Figure 7. Incidence of structural aberrations induced by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment:24 h]

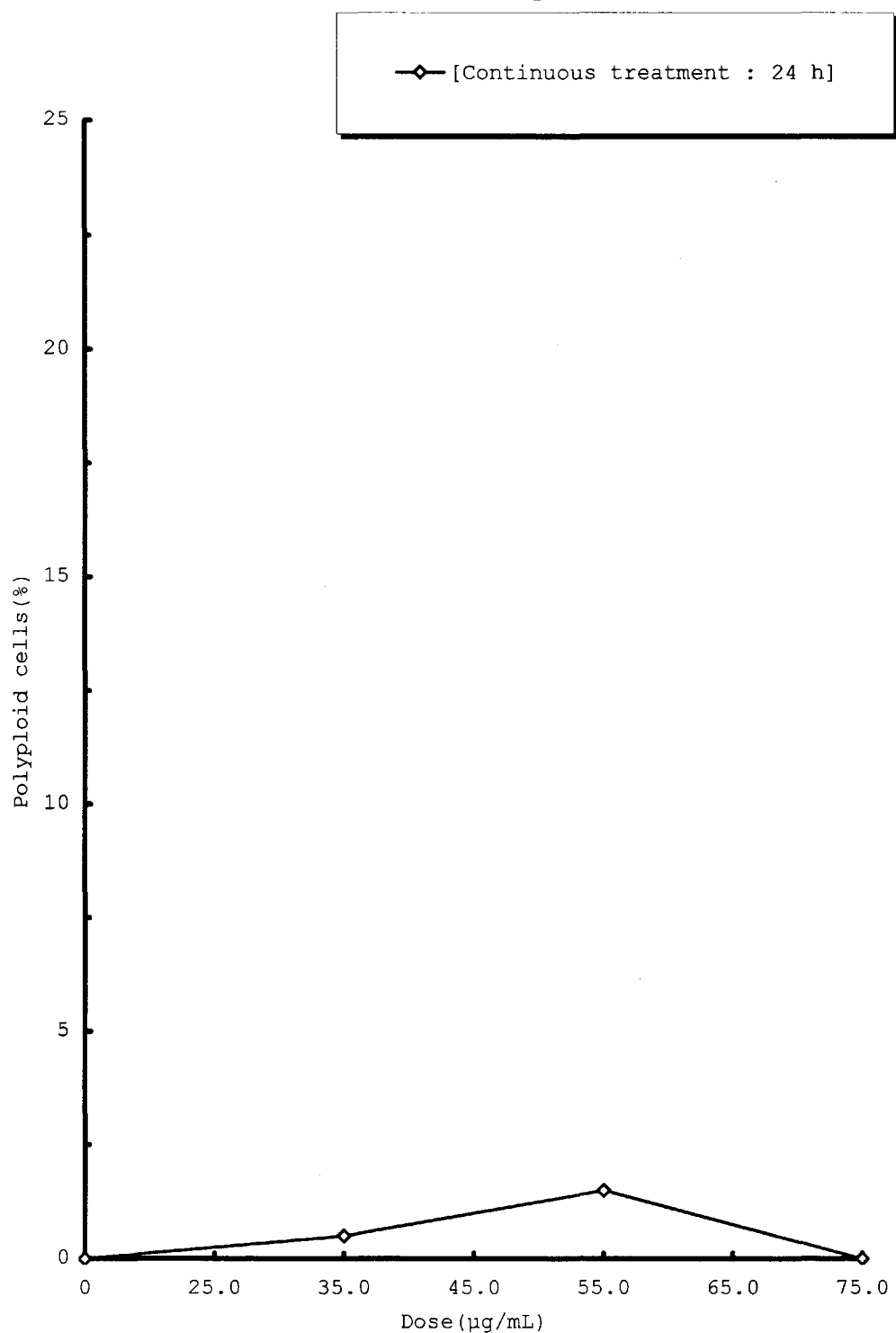


Figure 8. Incidence of polyploid cells induced
by 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment:24 h]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	4.58	101.3 103.8	[102.6]		4.58	98.7 92.9	[95.8]
	9.16	97.7 97.2	[97.5]		9.16	96.3 92.3	[94.3]
	18.3	101.2 101.1	[101.2]		18.3	93.0 87.7	[90.4]
	36.6	105.4 96.2	[100.8]		36.6	41.2 49.3	[45.3]
	73.3	38.6 36.1	[37.4]		73.3	5.3 5.2	[5.3]
	147 d)	0.0 0.0	[0.0]		147 d)	1.3 3.4	[2.4]
	293 d)	0.0 0.0	[0.0]		293 d)	0.7 1.4	[1.1]
	586 d)	0.0 0.0	[0.0]		586 d)	0.8 0.3	[0.6]
	1172 d)	0.0 0.0	[0.0]		1172 d)	0.0 2.0	[1.0]
	2344 d)	0.0 0.0	[0.0]		2344 d)	2.0 3.6	[2.8]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Short-term treatment : -S9] ——— 71.0 (µg/mL)

[Short-term treatment : +S9] ——— 34.3 (µg/mL)

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

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

Table 2. Results of growth inhibition test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	4.58	98.5 100.3	[99.4]
	9.16	98.9 102.1	[100.5]
	18.3	100.6 100.9	[100.8]
	36.6	103.8 84.5	[94.2]
	73.3	5.4 7.3	[6.4]
	147 d)	0.0 0.0	[0.0]
	293 d)	0.0 0.0	[0.0]
	586 d)	0.0 0.0	[0.0]
	1172 d)	0.0 0.0	[0.0]
	2344 d)	0.0 0.0	[0.0]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] ——— 52.0 (µg/mL)

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

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

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	200	1	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	35.0	6	130.6	200	0	1	2	1	0	0	4 (2.0)	200	1 (0.5)
	55.0	6	120.0	200	0	1	2	0	0	0	3 (1.5)	200	1 (0.5)
	75.0 d)	6	49.0	200	1	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	85.0 d)	6	20.1	NA									
MMC b)	0.1	6	78.6	200	12	34	54	0	0	0	76 (38.0) *	200	2 (1.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

NA: Not analyzed

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

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

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	200	2	2	1	0	0	0	3 (1.5) #	200	1 (0.5) #
	25.0	6	88.1	200	2	3	1	0	0	0	4 (2.0)	200	3 (1.5)
	35.0	6	89.0	200	2	5	7	0	0	0	11 (5.5)	200	11 (5.5) *
	45.0	6	50.2	200	4	10	10	1	0	0	17 (8.5) *	200	10 (5.0) *
	55.0	6	37.9	200	3	6	14	0	0	0	16 (8.0) *	200	10 (5.0) *
CP b)	12.5	6	118.9	200	5	27	64	0	0	0	77 (38.5) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

:Significant difference from control (Chochran-Armitage trend test): $p \leq 0.025$

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2,6-Bis(1,1- -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5) #	200	0 (0.0) #
	15.0	6	81.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	25.0	6	71.9	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	2 (1.0)
	35.0	6	65.0	200	1	0	2	0	0	0	2 (1.0)	200	14 (7.0) *
	45.0	6	36.4	200	3	5	11	0	0	0	12 (6.0) *	200	16 (8.0) *
	55.0	6	22.9	200	0	3	8	0	0	0	9 (4.5) *	200	14 (7.0) *
	65.0	6	6.1	Toxic									
CP b)	12.5	6	119.1	200	4	18	86	0	1	0	94 (47.0) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

:Significant difference from control (Chochran-Armitage trend test): $p \leq 0.025$

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 6. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment : 24 h]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	24	100.0	200	2	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	35.0	24	102.5	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	200	1 (0.5)
	55.0	24	104.7	200	0	3	0	0	0	0	3 (1.5)	200	3 (1.5)
	75.0 d)	24	35.6	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
MMC b)	0.05	24	138.5	200	12	18	46	0	0	0	54 (27.0) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

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