



亜リン酸トリメチル
の細菌を用いる
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および方法	3
結果および考察	6
結 論	7
特 記 事 項	7
文 献	7
Tables 1~3	

【要 約】

亜リン酸トリメチルの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレート法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験とも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験ではS9 mix 無添加試験および添加試験を313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で5用量を設定して実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかったことから、亜リン酸トリメチルは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【緒 言】

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、亜リン酸トリメチルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異²⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する S9 mix 添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号、一部改正平成9年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第2号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471」に準拠し、「化学物質GLP基準」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【材料および方法】

〔検 定 菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に から分与された。

検定菌は -80°C 以下で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異 (*rfa*) およびアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid Ltd.) を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、 37°C で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。試験に用いた検定菌液の生菌数を Appendix 1 に示した。

〔被 験 物 質〕

亜リン酸トリメチル (略称: TMP、CAS No. 121-45-9) は、分子量 124.08 の無色液体である。構造式等は Appendix 2 に示した。用いた被験物質は、ロット番号純度 99.58wt% (不純物: メタノール 0.10%、ジメチル水素ホスファイト 0.02%、トリメチルフォスフェート 0.19%、不明成分 0.11%) であり、 から供与された。被験物質は、使用時までデシケーター中で冷蔵し、窒素封入をして保管した。

TMP は、ジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業(株)、ロット番号: TPJ5678) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2	: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業(株))	ロット番号 WTQ0059,	純度98%以上)
SA	: 7ジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))	ロット番号 DLL3931,	純度98%以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)	ロット番号 106F06681,	純度97%以上)
2AA	: 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))	ロット番号 DLH6052,	純度90%以上)

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解したものを -20°C で凍結保存し、解凍後速やかに試験に用いた。

[培地および S9 mix の組成]

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco Lab.)	0.6 %	(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5 %	D-ビオチン	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: HY2802、1997年10月16日製造、および HY2901、1997年11月21日製造) を用いた。なお、培地 1L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルシウム	10 g	大洋寒天 (清水食品)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g		

径 90 mm のシャーレ 1枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

3) S9 mix (1 mL 中下記の成分を含む)

S9**	0.1 mL	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カルシウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol		

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットにフェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与を行い、酵素誘導して作製したS9 (キッコーマン(株)、ロット番号: RAA-370、1997年10月3日製造および RAA-376、1998年1月23日製造) を購入し、 -80°C で凍結保存し、用時に解凍して用いた。PB および BF の投与量は 1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60 mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg で、いずれも腹腔内投与したものである。肝臓の摘出および S9 の調製は5日目。

〔試験方法〕

プレート法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、リン酸緩衝液 0.5 mL (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 mL)、検定菌液 0.1 mL およびトッパアガー 2 mL を加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒または陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各Table 中に示した。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、発生した変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。なお、TMPは揮発性が高いため、培養の際に同一用量のプレートをまとめて、ポリエチレン製の袋に密封した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認を行った。また、最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

〔判定基準〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

TMPについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

一方、TMPは当研究所で本試験と並行して実施されたチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では、S9 mix 存在下において染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加が認められ、陽性であった (食薬セ研第9-1945号)。また、TMPの類縁化合物の Dibutyl phosphate³⁾ については、復帰突然変異試験および染色体異常試験共に陰性の結果が、Trimethyl phosphate⁴⁾ については、染色体異常試験で陰性の結果が得られている。

TMPについて実施したすべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

以上の結果に基づき、亜リン酸トリメチルは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、試験の信頼性に影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態、および試験計画書からの逸脱はなかった。

【文 献】

- 1) Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 2) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360
- 3) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修：「化学物質毒性試験報告」、化学物質点検推進委員会 編集・発行, vol.2 (1995) pp.55-78
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修：「化学物質毒性試験報告」、化学物質点検推進委員会 編集・発行, vol.3 (1996) pp.285-303

Table 1. Cytotoxicity of trimethyl phosphite on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type						Frameshift type									
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	131	158	131	18	9	11	20	19	19	29	21	20	7	6	11	
		(140 \pm 15.6)			(13 \pm 4.7)			(19 \pm 0.6)			(23 \pm 4.9)			(8 \pm 2.6)			
	50.0	140			12			25			18			4			
	150	133			8			19			14			7			
	500	115			9			31			18			16			
	1500	113			12			24			23			8			
	5000	121			10			26			13			8			
S9 mix (+)	0	126	133	147	10	9	14	23	34	28	28	30	35	10	9	16	
		(135 \pm 10.7)			(11 \pm 2.6)			(28 \pm 5.5)			(31 \pm 3.6)			(12 \pm 3.8)			
	50.0	134			10			29			37			13			
	150	129			12			21			36			13			
	500	150			12			34			30			8			
	1500	126			13			27			22			6			
	5000	124			11			32			34			15			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	431	410	408	530	538	467	143	124	136	499	536	552	503	633	670	
		(416 \pm 12.7)			(512 \pm 38.9)			(134 \pm 9.6)			(529 \pm 27.2)			(602 \pm 87.7)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1451	1260	1247	328	423	278	1024	1020	1067	367	366	367	148	152	128	
		(1319 \pm 114.2)			(343 \pm 73.7)			(1037 \pm 26.1)			(367 \pm 0.6)			(143 \pm 12.9)			

Purity was 99.58wt% and 0.10% methanol, 0.02% dimethyl hydrogen phosphite, 0.19% trimethyl phosphite and 0.11% unknown were contained as impurities.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Table 2. Mutagenicity of trimethyl phosphite on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	127	118	155	20	12	9	25	26	29	19	15	22	7	6	9	
		(133 ± 19.3)			(14 ± 5.7)			(27 ± 2.1)			(19 ± 3.5)			(7 ± 1.5)			
	313	124	135	129	6	13	14	24	35	27	17	21	20	13	9	7	
		(129 ± 5.5)			(11 ± 4.4)			(29 ± 5.7)			(19 ± 2.1)			(10 ± 3.1)			
	625	130	125	127	8	11	15	25	26	34	20	13	19	6	8	7	
		(127 ± 2.5)			(11 ± 3.5)			(28 ± 4.9)			(17 ± 3.8)			(7 ± 1.0)			
	1250	121	145	113	11	13	9	22	24	30	20	15	19	8	5	12	
		(126 ± 16.7)			(11 ± 2.0)			(25 ± 4.2)			(18 ± 2.6)			(8 ± 3.5)			
2500	144	136	124	11	8	10	34	17	23	14	20	16	8	5	8		
	(135 ± 10.1)			(10 ± 1.5)			(25 ± 8.6)			(17 ± 3.1)			(7 ± 1.7)				
5000	117	125	126	5	9	15	31	21	30	30	16	14	6	6	4		
	(123 ± 4.9)			(10 ± 5.0)			(27 ± 5.5)			(20 ± 8.7)			(5 ± 1.2)				
S9 mix (+)	0	120	148	140	15	12	11	37	30	42	31	23	29	15	15	17	
		(136 ± 14.4)			(13 ± 2.1)			(36 ± 6.0)			(28 ± 4.2)			(16 ± 1.2)			
	313	114	145	122	11	7	11	28	25	38	29	18	27	11	13	6	
		(127 ± 16.1)			(10 ± 2.3)			(30 ± 6.8)			(25 ± 5.9)			(10 ± 3.6)			
	625	136	127	135	8	7	10	41	31	33	32	33	26	10	11	9	
		(133 ± 4.9)			(8 ± 1.5)			(35 ± 5.3)			(30 ± 3.8)			(10 ± 1.0)			
	1250	116	139	137	9	4	7	36	35	37	26	21	19	12	5	11	
		(131 ± 12.7)			(7 ± 2.5)			(36 ± 1.0)			(22 ± 3.6)			(9 ± 3.8)			
2500	137	117	113	10	8	8	39	40	22	29	30	20	9	7	12		
	(122 ± 12.9)			(9 ± 1.2)			(34 ± 10.1)			(26 ± 5.5)			(9 ± 2.5)				
5000	119	122	138	11	5	7	32	41	33	19	22	25	13	10	12		
	(126 ± 10.2)			(8 ± 3.1)			(35 ± 4.9)			(22 ± 3.0)			(12 ± 1.5)				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	456	451	472	631	536	525	172	200	142	621	599	608	403	472	517	
		(460 ± 11.0)			(564 ± 58.3)			(171 ± 29.0)			(609 ± 11.1)			(464 ± 57.4)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1408	1204	1256	321	330	286	925	965	1094	385	432	398	213	182	129	
		(1289 ± 106.0)			(312 ± 23.2)			(995 ± 88.3)			(405 ± 24.3)			(175 ± 42.5)			

Purity was 99.58wt% and 0.10% methanol, 0.02% dimethyl hydrogen phosphite, 0.19% trimethyl phosphite and 0.11% unknown were contained as impurities.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Table 3. Mutagenicity of trimethyl phosphite on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)																				
		Base - pair substitution type									Frameshift type											
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537								
S9 mix (-)	0	149	127	138	9	14	11	27	28	30	18	24	15	9	9	13	(138 \pm 11.0)	(11 \pm 2.5)	(28 \pm 1.5)	(19 \pm 4.6)	(10 \pm 2.3)	
	313	117	139	128	9	14	6	19	16	27	15	12	18	11	8	14	(128 \pm 11.0)	(10 \pm 4.0)	(21 \pm 5.7)	(15 \pm 3.0)	(11 \pm 3.0)	
	625	136	126	106	8	12	16	28	24	29	14	11	29	5	3	5	(123 \pm 15.3)	(12 \pm 4.0)	(27 \pm 2.6)	(18 \pm 9.6)	(4 \pm 1.2)	
	1250	137	141	139	15	15	18	22	26	19	11	19	13	8	6	14	(139 \pm 2.0)	(16 \pm 1.7)	(22 \pm 3.5)	(14 \pm 4.2)	(9 \pm 4.2)	
	2500	133	134	109	8	8	10	22	18	23	7	10	11	7	7	8	(125 \pm 14.2)	(9 \pm 1.2)	(21 \pm 2.6)	(9 \pm 2.1)	(7 \pm 0.6)	
	5000	103	151	131	6	13	9	18	16	26	8	11	21	11	6	3	(128 \pm 24.1)	(9 \pm 3.5)	(20 \pm 5.3)	(13 \pm 6.8)	(7 \pm 4.0)	
S9 mix (+)	0	118	126	130	13	17	11	25	19	25	41	28	28	16	10	13	(125 \pm 6.1)	(14 \pm 3.1)	(23 \pm 3.5)	(32 \pm 7.5)	(13 \pm 3.0)	
	313	139	154	137	8	8	11	18	27	19	26	24	27	6	8	8	(143 \pm 9.3)	(9 \pm 1.7)	(21 \pm 4.9)	(26 \pm 1.5)	(7 \pm 1.2)	
	625	171	130	134	7	17	11	18	23	23	30	26	29	8	7	5	(145 \pm 22.6)	(12 \pm 5.0)	(21 \pm 2.9)	(28 \pm 2.1)	(7 \pm 1.5)	
	1250	138	120	139	6	10	14	23	20	21	29	32	24	10	3	10	(132 \pm 10.7)	(10 \pm 4.0)	(21 \pm 1.5)	(28 \pm 4.0)	(8 \pm 4.0)	
	2500	123	138	145	15	13	12	28	33	25	29	26	21	13	7	15	(135 \pm 11.2)	(13 \pm 1.5)	(29 \pm 4.0)	(25 \pm 4.0)	(12 \pm 4.2)	
	5000	151	133	146	9	8	16	26	25	30	16	32	26	6	6	6	(143 \pm 9.3)	(11 \pm 4.4)	(27 \pm 2.6)	(25 \pm 8.1)	(6 \pm 0.0)	
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA								
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80								
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	520	530	519	501	532	520	157	158	165	517	562	519	324	294	392	(523 \pm 6.1)	(518 \pm 15.6)	(160 \pm 4.4)	(533 \pm 25.4)	(337 \pm 50.2)	
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA								
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2								
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1298	983	1136	274	273	282	964	853	985	359	377	401	194	172	178	(1139 \pm 157.5)	(276 \pm 4.9)	(934 \pm 70.9)	(379 \pm 21.1)	(181 \pm 11.4)	

Purity was 99.58wt% and 0.10% methanol, 0.02% dimethyl hydrogen phosphite, 0.19% trimethyl phosphite and 0.11% unknown were contained as impurities.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene