ジフェニルクレジルフォスフェート 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

材料および試験方法 …… 3

試験結果および考察 …… 6

参　考　文　献 …… 7

Tables　1～4

【要　　約】

ジフェニルクレジルフォスフェートの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvr*A を用い、用量設定試験は直接法が 50～5000 μg/プレート、代謝活性化法が 10～5000 μg/プレート、本試験では直接法および代謝活性化法のいずれも、312.5～5000 μg/プレート の用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、ジフェニルクレジルフォスフェートは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

【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、難分解性既存化学物質の１つである、ジフェニルクレジルフォスフェートについて、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（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変異[(2)]を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）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代謝活性化法とからなっている。

本試験は、「新規化学物質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）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471，472に準拠し、化学物質GLP（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。

【材料および試験方法】

〔検　定　菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvr*A
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の４菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、

から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvr*A 株は1979年５月９日に　　から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.２（OXOID, ロット番号：B-1674/1 を入れたＬ字型試験管に種菌を接種し、37℃、約11～12時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

ジフェニルクレジルフォスフェート（CAS No. 26444-49-5、以下ＤＣＰと略）は、分子量 340の無色～淡黄色の液体であり、ロット番号：　　を

から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所に密栓して保管した。

ＤＣＰは、ジメチルスルホキシド（以下DMSOと略, ロット番号：TWP 5445、和光純薬工業㈱）を用いて 50 mg/mℓ になるように調製した後、同溶媒で更に公比２ないし３で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所においてＤＣＰの DMSO 溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度（50 mg/mℓ）および最低濃度（３mg/mℓ）の２濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後４時間における各３サンプルの平均含量は、それぞれ初期値（０時間）の平均に対して、97.6%および 101%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たしていた（Appendix 1）。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/mℓ 溶液の含量は既定濃度に対し、100～101%、3.125 mg/mℓ 溶液は、103～104%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた（Appendix 2）。

以上の結果から、ＤＣＰは DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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。

AF-2 : ﾌﾘﾙﾌﾗﾏｲﾄﾞ	(上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%)
SA : ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度>90%)
9-AA : 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	(Sigma Chem. Co.	ﾛｯﾄ番号 96F05641,	純度>98%)
2-AA : 2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度>90%)

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業㈱) に溶解したものを、-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 混液の組成〕

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) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B) L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ *	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	ﾋﾞｵﾁﾝ	0.5 mM

* : WP2 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、日清製粉株式会社製の最少寒天培地 (用量設定試験においてはロット番号 : DJ030EH, 1992年 5 月14日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ040IH および DJ050JH, 1992年 9 月 4 日および10月12日製造) を用いた。なお、培地 1 ℓ あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・7水和物	0.2 g	ﾘﾝ酸水素ｱﾝﾓﾆｳﾑﾅﾄﾘｳﾑ・4水和物	3.5 g
ｸｴﾝ酸・1水和物	2 g	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mℓ を流して固めてある。

3） S9 混液（1 mℓ中下記の成分を含む）

S9**	0.1 mℓ	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 mℓ
ｸﾞﾙｺｰｽ・6ﾘﾝ酸	5 μmol		

** ：7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9（キッコーマン㈱、ロット番号RAA-280、1992年7月24日製造およびRAA-285、1992年11月20日製造）を -80℃で凍結保存し、用時に解凍した。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であり、いずれも腹腔内投与したものである。

〔試 験 方 法〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 mℓ、被験物質調製液 0.1 mℓ、リン酸緩衝液 0.5 mℓ(代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 mℓ）、検定菌液 0.1 mℓ を混合したのち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 DMSO、または数種の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表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。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、陰性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。用量設定試験は追加試験を含めて2回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

〔判 定 基 準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは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。

【試験結果および考察】

試験の全過程を通して、信頼性に悪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。

〔用量設定試験〕

結果を Tables 1、2 に示した。ＤＣＰについて、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、直接法においては、すべての検定菌で抗菌性は認められなかったが、代謝活性化法においては、すべての検定菌で強い抗菌性が認められた。しかし、10～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の広い範囲で代謝活性化法による用量設定試験を追加して行ったところ、すべての検定菌において最高用量の 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ でも抗菌性は認められなかった。そのため、1回目の代謝活性化試験には、何らかの技術的なエラーがあったものとし、データから削除した。以上の結果から、本試験における最高用量を直接法、代謝活性化法ともに、すべての検定菌において、5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とし、公比2で5用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 3、4 に示した。ＤＣＰについて 312.5～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の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。なお、直接法および代謝活性化法ともに、1250 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 以上の用量で被験物質に由来する沈殿物が寒天平板上に認められた。

ＤＣＰについて実施した試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群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、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、ＤＣＰ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。

【参 考 文 献】

(1) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)

(2) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp. 161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with diphenylcresyl phosphate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	122 112 110 (115 ± 6.4)	10 14 12 (12 ± 2.0)	17 16 29 (21 ± 7.2)	16 15 17 (16 ± 1.0)	11 9 5 (8 ± 3.1)	
	50	86	3	15	17	6	
	150	84	10	14	15	7	
	500	101	13	21	13	9	
	1500	97	4	20	21	11	
	5000	107	7	12	11	5	
S9Mix							
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	432 427 440 (433 ± 6.6)	156 160 185 (167 ± 15.7)	158 176 171 (168 ± 9.3)	583 563 592 (579 ± 14.8)	3533 3729 3659 (3640 ± 99.3)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical						
	Dose (μg /plate)						
	Number of colonies / plate						

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

Table 2. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with diphenylcresyl phosphate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)							
S9Mix	0	116 112 124 (117± 6.1)	15 15 14 (15± 0.6)	28 21 22 (24± 3.8)	30 29 33 (31± 2.1)	20 12 11 (14± 4.9)	
	10	131	11	ND	ND	16	
	20	126	15	ND	ND	9	
	40	126	19	19	43	11	
	100	123	11	31	18	10	
	200	ND	ND	25	23	ND	
	400	ND	ND	26	19	ND	
	2500	126	19	21	21	11	
	5000	130	15	16	26	8	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical						
	Dose (µg /plate)						
	Number of colonies / plate						
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	614 648 632 (631 ± 17.0)	189 191 204 (195 ± 8.1)	612 642 600 (618 ± 21.6)	213 177 195 (195 ± 18.0)	169 179 193 (180 ± 12.1)	

2AA: 2-Aminoanthracene

ND:Not done

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with diphenylcresyl phosphate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	135 146 161 (147 ± 13.1)	16 16 9 (14 ± 4.0)	28 17 24 (23 ± 5.6)	20 22 27 (23 ± 3.6)	12 14 8 (11 ± 3.1)	
	312.5 #	143 149 165 (152 ± 11.4)	13 16 13 (14 ± 1.7)	18 25 26 (23 ± 4.4)	25 24 20 (23 ± 2.6)	8 7 8 (8 ± 0.6)	
	625 #	154 152 148 (151 ± 3.1)	15 8 20 (14 ± 6.0)	23 26 26 (25 ± 1.7)	28 28 32 (29 ± 2.3)	11 10 13 (11 ± 1.5)	
	1250 #	155 146 132 (144 ± 11.6)	11 14 18 (14 ± 3.5)	25 28 23 (25 ± 2.5)	15 23 23 (20 ± 4.6)	9 16 5 (10 ± 5.6)	
	2500 #	179 119 167 (155 ± 31.7)	20 18 13 (17 ± 3.6)	27 21 20 (23 ± 3.8)	25 33 35 (31 ± 5.3)	12 18 10 (13 ± 4.2)	
	5000 #	140 145 150 (145 ± 5.0)	15 16 14 (15 ± 1.0)	18 28 24 (23 ± 5.0)	23 25 22 (23 ± 1.5)	10 13 14 (12 ± 2.1)	
S9Mix (+)	0	156 159 163 (159 ± 3.5)	17 19 17 (18 ± 1.2)	25 25 28 (26 ± 1.7)	43 37 42 (41 ± 3.2)	14 22 27 (21 ± 6.6)	
	312.5	175 136 145 (152 ± 20.4)	19 9 16 (15 ± 5.1)	31 34 25 (30 ± 4.6)	38 21 21 (27 ± 9.8)	17 18 11 (15 ± 3.8)	
	625	163 166 146 (158 ± 10.8)	20 12 12 (15 ± 4.6)	31 20 19 (23 ± 6.7)	39 29 39 (36 ± 5.8)	12 12 16 (13 ± 2.3)	
	1250 #	119 167 153 (146 ± 24.7)	14 20 22 (19 ± 4.2)	23 19 29 (24 ± 5.0)	24 34 27 (28 ± 5.1)	10 13 13 (12 ± 1.7)	
	2500 #	179 147 178 (168 ± 18.2)	22 13 10 (15 ± 6.2)	28 22 27 (26 ± 3.2)	33 34 26 (31 ± 4.4)	10 10 11 (10 ± 0.6)	
	5000 #	164 154 158 (159 ± 5.0)	17 10 15 (14 ± 3.6)	29 26 22 (26 ± 3.5)	35 30 30 (32 ± 2.9)	11 17 15 (14 ± 3.1)	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	571 521 498 (530 ± 37.3)	430 420 402 (417 ± 14.2)	125 141 136 (134 ± 8.2)	706 653 644 (668 ± 33.5)	3272 3474 3159 (3302 ± 159.6)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	874 903 887 (888 ± 14.5)	200 186 237 (208 ± 26.4)	546 540 637 (574 ± 54.4)	271 288 287 (282 ± 9.5)	234 257 260 (250 ± 14.2)	

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with diphenylcresyl phosphate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	145 139 136 (140 ± 4.6)	15 16 8 (13 ± 4.4)	9 12 16 (12 ± 3.5)	19 16 19 (18 ± 1.7)	4 8 8 (7 ± 2.3)	
	312.5	157 158 136 (150 ± 12.4)	22 13 15 (17 ± 4.7)	25 9 14 (16 ± 8.2)	21 24 28 (24 ± 3.5)	11 9 13 (11 ± 2.0)	
	625	137 108 128 (124 ± 14.8)	12 15 8 (12 ± 3.5)	14 16 21 (17 ± 3.6)	22 21 17 (20 ± 2.6)	11 7 8 (9 ± 2.1)	
	1250 #	120 146 117 (128 ± 15.9)	7 12 11 (10 ± 2.6)	14 8 13 (12 ± 3.2)	15 20 17 (17 ± 2.5)	10 9 5 (8 ± 2.6)	
	2500 #	149 139 152 (147 ± 6.8)	20 17 13 (17 ± 3.5)	13 14 11 (13 ± 1.5)	24 17 14 (18 ± 5.1)	7 4 4 (5 ± 1.7)	
	5000 #	128 137 118 (128 ± 9.5)	20 15 13 (16 ± 3.6)	17 20 16 (18 ± 2.1)	15 22 17 (18 ± 3.6)	5 8 11 (8 ± 3.0)	
S9Mix (+)	0	145 144 150 (146 ± 3.2)	13 15 12 (13 ± 1.5)	15 13 20 (16 ± 3.6)	33 24 33 (30 ± 5.2)	14 7 9 (10 ± 3.6)	
	312.5	157 158 143 (153 ± 8.4)	15 21 18 (18 ± 3.0)	21 17 27 (22 ± 5.0)	39 28 27 (31 ± 6.7)	11 8 9 (9 ± 1.5)	
	625 #	140 151 147 (146 ± 5.6)	17 15 13 (15 ± 2.0)	25 21 22 (23 ± 2.1)	30 25 23 (26 ± 3.6)	8 8 8 (8 ± 0.0)	
	1250 #	146 151 166 (154 ± 10.4)	18 14 8 (13 ± 5.0)	19 14 17 (17 ± 2.5)	32 30 26 (29 ± 3.1)	6 8 8 (7 ± 1.2)	
	2500 #	127 104 165 (132 ± 30.8)	22 15 19 (19 ± 3.5)	18 16 18 (17 ± 1.2)	21 33 30 (28 ± 6.2)	6 8 10 (8 ± 2.0)	
	5000 #	152 159 140 (150 ± 9.6)	10 11 12 (11 ± 1.0)	14 13 19 (15 ± 3.2)	26 28 19 (24 ± 4.7)	3 8 9 (7 ± 3.2)	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	521 538 546 (535 ± 12.8)	154 166 167 (162 ± 7.2)	200 193 186 (193 ± 7.0)	626 670 616 (637 ± 28.7)	2077 2184 2021 (2094 ± 82.8)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	732 727 749 (736 ± 11.5)	167 173 174 (171 ± 3.8)	514 648 700 (621 ± 96.0)	172 176 183 (177 ± 5.6)	205 192 198 (198 ± 6.5)	

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.