



トリークメニ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 1～3	

【要 約】

トリ-p-クメニ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 *uvrA* を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験は 50~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、本試験では 312.5~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、トリ-p-クメニ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、トリ-p-クメニ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 *uvrA*
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 *uvrA* 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 および B-1674/2) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、約10~12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〕

トリ-p-クメニルフォスフェート (CAS No. 26967-76-0、以下TCPと略) は、分子量 452の黄色の液体である。純度 99%以上のもの(不純物として p-イソプロピルフェノールを 100ppm 含む、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遮光して保管した。被験物質は、この状態で1年以上安定あることが製造者によって確認されている。

TCPは、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略: ロット番号: TWP 5445 および APQ 5928、和光純薬工業(株))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TCPの DMSO 溶液中での安定性試験を行った。本試験および染色体異常試験における最高濃度 (900 mg/ml) および最低濃度 (3.125 mg/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、いずれも100%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、96.4~97.4%、3.125 mg/ml 溶液は、99.8~99.9%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、TCP 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 : フリルアミド	(上野製薬(株))	ロット番号 46,	純度99.9%
SA : アリ化ナトリウム	(和光純薬工業(株))	ロット番号 TWR3330,	純度>90%
9-AA : 9-アミノアクリジン	(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(株))	ロット番号 DSF2950,	純度>90%

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) 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) バクアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオニン	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 : DJ040IH, 1992年9月4日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ060KH, 1992年11月10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。

硫酸マグネシウム・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	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バクアガー (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
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH		4 μmol
塩化カルシウム	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液		
		(pH 7.4)	0.5 ml	
グルコース・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 (キッコーマン株、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°C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°C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1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 Table 1 に示した。TCP について、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 とし、試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法あるいは代謝活性化法のいずれにおいても、抗菌性は認められなかった。また被験物質に由来する、寒天平板上の沈殿物は直接法および代謝活性化法ともに、500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で認められた。

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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 2、3 に示した。TCP について 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、直接法では 312.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、代謝活性化法では、625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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。

TCP 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、TCP 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 tri-p-cumenyl phosphate

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg / plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	129	124	123	14	20	14	20	13	17	35	35	39	10	7	6	
		(125 \pm 3.2)			(16 \pm 3.5)			(17 \pm 3.5)			(36 \pm 2.3)			(8 \pm 2.1)			
	50	143			21			22			26			0			
	150	124			14			11			26			9			
	500 #	119			17			10			26			8			
	1500 #	140			18			9			34			12			
	5000 #	129			12			13			32			9			
S9Mix (+)	0	124	125	129	19	20	18	13	18	19	43	42	48	8	7	13	
		(126 \pm 2.6)			(19 \pm 1.0)			(17 \pm 3.2)			(44 \pm 3.2)			(9 \pm 3.2)			
	50	133			20			16			37			13			
	150	132			18			15			28			6			
	500 #	130			15			20			42			9			
	1500 #	125			15			16			49			9			
	5000 #	106			12			10			39			7			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	370	377	394	229	219	203	902	894	910	305	336	340	198	189	226	
		(380 \pm 12.3)			(217 \pm 13.1)			(902 \pm 8.0)			(327 \pm 19.2)			(204 \pm 19.3)			

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 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with tri-p-cumenyl phosphate

With (+) or without (-)	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							
S9 Mix (-)	0	113	130	136	11	19	11	26	20	29	16	22	24	11	7	9	(126 ± 11.9)	(14 ± 4.6)	(25 ± 4.6)	(21 ± 4.2)	(9 ± 2.0)
	312.5 #	134	124	133	15	12	18	21	29	32	15	27	12	10	7	9	(130 ± 5.5)	(15 ± 3.0)	(27 ± 5.7)	(18 ± 7.9)	(9 ± 1.5)
	625 #	124	124	97	12	11	11	22	18	33	25	23	27	14	6	12	(115 ± 15.6)	(11 ± 0.6)	(24 ± 7.8)	(25 ± 2.0)	(11 ± 4.2)
	1250 #	134	130	137	14	22	15	18	14	23	16	26	16	6	10	5	(134 ± 3.5)	(17 ± 4.4)	(18 ± 4.5)	(19 ± 5.8)	(7 ± 2.6)
	2500 #	122	118	120	16	11	15	26	20	24	17	21	23	4	5	7	(120 ± 2.0)	(14 ± 2.6)	(23 ± 3.1)	(20 ± 3.1)	(5 ± 1.5)
	5000 #	115	116	124	15	11	19	29	25	22	15	21	22	5	1	14	(118 ± 4.9)	(15 ± 4.0)	(25 ± 3.5)	(19 ± 3.8)	(7 ± 6.7)
S9 Mix (+)	0	121	128	119	10	15	12	32	28	26	31	30	32	14	23	11	(123 ± 4.7)	(12 ± 2.5)	(29 ± 3.1)	(31 ± 1.0)	(16 ± 6.2)
	312.5	155	166	139	20	17	10	20	34	32	36	20	31	24	17	19	(153 ± 13.6)	(16 ± 5.1)	(29 ± 7.6)	(29 ± 8.2)	(20 ± 3.6)
	625 #	159	131	145	20	14	21	33	31	25	42	30	30	18	18	11	(145 ± 14.0)	(18 ± 3.8)	(30 ± 4.2)	(34 ± 6.9)	(16 ± 4.0)
	1250 #	179	165	138	10	18	18	22	28	25	25	32	29	12	10	13	(161 ± 20.8)	(15 ± 4.6)	(25 ± 3.0)	(29 ± 3.5)	(12 ± 1.5)
	2500 #	128	144	148	11	11	13	17	23	23	26	33	34	18	11	14	(140 ± 10.6)	(12 ± 1.2)	(21 ± 3.5)	(31 ± 4.4)	(14 ± 3.5)
	5000 #	122	130	128	17	11	8	21	27	23	33	37	41	11	10	13	(127 ± 4.2)	(12 ± 4.6)	(24 ± 3.1)	(37 ± 4.0)	(11 ± 1.5)
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
	Number of colonies / plate	484	535	536	173	170	169	123	122	149	600	551	524	2683	2770	2862	(518 ± 29.7)	(171 ± 2.1)	(131 ± 15.3)	(558 ± 38.5)	(2772 ± 89.5)
		(792 ± 48.8)			(212 ± 7.0)			(991 ± 33.9)			(320 ± 18.9)			(297 ± 16.2)							

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 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with tri-p-cumenyl phosphate

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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	122	117	108	11	18	14	21	25	31	22	19	25	8	9	9	
		(116 \pm 7.1)			(14 \pm 3.5)			(26 \pm 5.0)			(22 \pm 3.0)			(9 \pm 0.6)			
	312.5	121	115	99	14	14	13	15	24	33	18	23	17	9	7	8	
		(112 \pm 11.4)			(14 \pm 0.6)			(24 \pm 9.0)			(19 \pm 3.2)			(8 \pm 1.0)			
	625 #	112	113	116	18	13	15	25	22	19	20	25	16	4	6	7	
		(114 \pm 2.1)			(15 \pm 2.5)			(22 \pm 3.0)			(20 \pm 4.5)			(6 \pm 1.5)			
	1250 #	111	98	96	12	15	16	28	24	13	17	27	21	8	14	6	
		(102 \pm 8.1)			(14 \pm 2.1)			(22 \pm 7.8)			(22 \pm 5.0)			(9 \pm 4.2)			
2500 #	118	121	122	18	15	17	9	24	23	16	22	26	10	8	7		
	(120 \pm 2.1)			(17 \pm 1.5)			(19 \pm 8.4)			(21 \pm 5.0)			(8 \pm 1.5)				
5000 #	115	113	124	11	19	26	17	18	21	21	20	20	4	6	8		
	(117 \pm 5.9)			(19 \pm 7.5)			(19 \pm 2.1)			(20 \pm 0.6)			(6 \pm 2.0)				
S9Mix (+)	0	141	133	121	12	18	12	31	30	34	35	27	33	7	12	12	
		(132 \pm 10.1)			(14 \pm 3.5)			(32 \pm 2.1)			(32 \pm 4.2)			(10 \pm 2.9)			
	312.5	119	104	120	14	13	8	22	21	20	31	28	17	15	12	15	
		(114 \pm 9.0)			(12 \pm 3.2)			(21 \pm 1.0)			(25 \pm 7.4)			(14 \pm 1.7)			
	625 #	127	110	128	14	12	12	16	24	21	30	29	26	14	13	11	
		(122 \pm 10.1)			(13 \pm 1.2)			(20 \pm 4.0)			(28 \pm 2.1)			(13 \pm 1.5)			
	1250 #	133	125	124	12	18	16	19	22	25	25	27	20	9	7	7	
		(127 \pm 4.9)			(15 \pm 3.1)			(22 \pm 3.0)			(24 \pm 3.6)			(8 \pm 1.2)			
2500 #	113	100	146	12	13	13	15	25	15	21	23	22	17	9	6		
	(120 \pm 23.7)			(13 \pm 0.6)			(18 \pm 5.8)			(22 \pm 1.0)			(11 \pm 5.7)				
5000 #	117	121	113	15	17	13	21	19	22	19	29	18	10	8	6		
	(117 \pm 4.0)			(15 \pm 2.0)			(21 \pm 1.5)			(22 \pm 6.1)			(8 \pm 2.0)				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate	523	490	505	93	101	126	149	134	132	666	638	606	2499	2225	2310	
		(506 \pm 16.5)			(107 \pm 17.2)			(138 \pm 9.3)			(637 \pm 30.0)			(2345 \pm 140.3)			
	Number of colonies / plate	713	829	840	188	190	189	648	701	627	340	381	355	241	240	260	
		(794 \pm 70.4)			(189 \pm 1.0)			(659 \pm 38.1)			(359 \pm 20.7)			(247 \pm 11.3)			

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.