

# 1, 2, 4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル 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支之及十 秦 野 때 究 就

# 【目 次】

	頁
要約	 1
緒言	 2
材料および方法	 3
結果および考察	 7
結論	 7
特 記 事 項	 8
文献	 8
Tables $1 \sim 3$	

1, 2, 4-ベンゼントリカバン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル 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、 $S9\ mix\ 無添加および添加の条件でプレート法により用量設定試験および本試験を行った。用量設定試験を <math>50\sim5000\ \mu g/7\nu$ -トの 用量で行ったところ、すべての検定菌において  $S9\ mix\ 無添加試験および添加試験のいず れも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験では <math>S9\ mix\ 無添加試験および添加試験および添加試験を <math>313\sim5000\ \mu g/7\nu$ -トの範囲で用量を設定して実施した。

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倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、1,2,4-ベンゼントリカがン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルは、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。

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、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルトシル)エステル 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(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。、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。を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素(S9 mix)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、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毒性試験ガイドライン:471、472」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1975年10月31日に

から分与を受けた。

E. coli WP2 uvrA 株は1979年5月9日にを受けた。

から分与

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(rfa)とアンピシリン耐性因子 pKM 101(プラスミド)の有無について行った。

試験に際して、ニュートリエントブロス№ 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10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〕

1, 2, 4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル (TEBTC、CAS No. 3319-31-1) は、分子量 546.79 の淡黄色透明液体である。構造式等は Appendix 1に示した。用いた被験物質は、

ロット番号 純度 99.0%以上(不純物:不明)であり、

から供与された。被験物質は、使用時まで室温遮光保管した。

TEBTCは、アセトン(ロット番号: DSM4173、和光純薬工業(株))に 50 mg/ml になるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

TEBTCのアセトン溶液中での安定性試験、および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、低濃度(3.13~mg/ml)溶液は当該試験の本試験 I で調製したものについて、また高濃度(500~mg/ml)溶液は当研究所で実施した染色体異常試験(G-94-026)で調製したものについて、室温遮光条件下で、調製後 4 時間までの安定性を調べた。その結果、調製 4 時間後における各濃度の平均含量は、ともに初期値(0 時間)の平均値に対して、101%であった。この値は当研究所で規定している基準内(4

時間後における平均含量が初期値の90%以上)であった(Appendix 2、3)。

また、本試験 I で調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内(溶媒中での平均含量が添加量の90~110%)であった(Appendix 4)。

#### [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-(2-7)(N)-3-(5-1)(1-2-7)(N)

(上野製薬㈱ ロット番号 46, 純度99.9%)
SA: アライヒナトリウム (和光純薬工業㈱ ロット番号 TWR3330, 純度90%以上)
9AA: 9-アミノアクリラン (Sigma Chem. Co. ロット番号 96F05641, 純度98%以上)
2AA: 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%以上)

AF2, 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業㈱) に溶解したものを-20  $\mathbb C$ で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、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) 0.6% (B) L-ヒスチジン 0.5 mM 塩化ナトリウム 0.5% 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、日清製粉㈱製の最少寒天培地(ロット番号: DJ030HJ、1994年8月11日製造および DJ040KJ、同年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。

硫酸マクネシウム•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
リン酸水素二カリウム	10 g	バケトアガー (Difco)	15 g
リン酸アンモニウム	1.92 g		

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

### 3) S9 mix (1 ml中下記の成分を含む)

\$9	0.1 ml	NADH	4	$\mu$ mol
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol	NADPH	4	$\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol	ナトリウムーリン酸緩衝液	100	1
グルコースー6ーリン酸	$5 \mu mol$	(pH 7.4)	100	μшог

\*\*: 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-309、1994年 5 月13日製造および RAA-317、同年10月27日製造)を用いた。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 であり、いずれも腹腔内投与したもので、ラットの解剖および S9 の調製は5日目であった。

#### 〔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  $0.1 \, ml$  を混合したのちトップアガー  $2 \, ml$  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各Table 中に示した。培養は $37^{\circ}$ 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、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。

# 〔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 S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、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。

#### 【結果および考察】

### 〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。TEBTCについて  $50\sim5000~\mu g/1 v$ -トの範囲で公比を約3として、試験を実施したところ、すべての検定菌において S9~mix 無添加試験および添加試験のいずれ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、\$9 mix 無添加試験および添加試験とも  $5000 \text{ } \mu\text{g}/\text{TV}$ -トとした。

#### [本試験]

2回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。TEBTCの用量を、S9 mix 無添加試験および添加試験でともに  $313\sim5000~\mu g/Tv-1$  の範囲で公比を 2 として試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた5種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、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。

TEBTCについて実施したすべての試験において、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、溶媒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、本試験系の有効性が確認された。

#### 【結論】

以上の結果に基づき、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルは、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、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。

# 【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 reverse mutation test of tris(2-ethylhexyl)1,2,4-benzenetricarboxylate \*\* on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, Mear± S.D.)				
without (-)	dose					Frameshift type
S9 mix	(μg /plate)	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
	0	101 101 114 ( 105 ± 7.5 )	8 19 14	20 22 26	19 33 31	15 6 2
	50	111	19	23	20	10
	150	111	16	22	24	14
	500 #	111	14	31	24	4
S9mix	1500 #	109	20	18	19	6
(-)	5000 #	139	13	28	29	8
_	0	118 130 117 ( 122 ± 7.2 )	18 17 20 ( 18 ± 1.5 )	29 21 33 ( 28± 6.1)	44 38 29 ( 37 ± 7.5 )	13 12 13 ( 13± 0.6)
	50	112	15	26	36	15
	150	126	15	30	40	19
	500	117	18	27	28	16
S9mix	1500 #	115	16	34	36	14
(+)	5000 #	135	12	39	23	11
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA
control	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
S9 mix (-)	Number of	542 539 556	312 298 323	130 137 122	613 833 730	648 610 640
	colonies / plate	( 546± 9.1)	(311 ± 12.5)	( 130± 7.5)	( 725 ± 110.1 )	( 633 ± 20.0 )
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
control	Dose (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of	1369 1337 1260	323 243 301	1462 1479 1194	415 434 417	323 320 320
	colonies / plate	( 1322 ± 56.0 )	( 289 ± 41.3 )	( 1378±159.9 )	$(422 \pm 10.4)$	( 321 ± 1.7 )

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

<sup>#:</sup> Precipitate was observed on the surface of agar plates.

<sup>\*\*:</sup> Purity was above 99.0 %.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of tris(2-ethylhexyl)1,2,4-benzenetricarboxylate \*\* on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, Mear ± S.D.)					
without (-)	dose	Base - pair substitution type			Frameshift type		
S9 mix	(μg /plate)	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
- CONTINUE	0	96 111 91	20 11 14	20 21 22	26 10 22	6 10 5	
		( 99 ± 10.4)	( 15 ± 4.6)	( 21 ± 1.0)	( 19 ± 8.3)	$(7 \pm 2.6)$	
	313 #	117 104 125	13 11 20	26 34 31	21 26 19	12 7 10	
		( 115± 10.6)	( 15 ± 4.7)	( 30± 4.0)	( 22 ± 3.6)	( 10 ± 2.5)	
	625 #	155 112 119	15 12 26	26 21 20	25 36 22	10 9 8	
		( 129 ± 23.1 )				1	
	1250 #	117 130 130	21 14 15	19 24 25	22 23 25	8 11 11	
		$(126 \pm 7.5)$	( 17 ± 3.8)	( 23± 3.2)	<u> </u>	( 10 ± 1.7)	
S9mix	2500 #	143 142 148	15 21 12	23 28 20	21 27 23	3 5 11	
,	<b>5000</b> #	( 144 ± 3.2 )	( 16 ± 4.6)	( 24 ± 4.0 )	1	1	P44424444444444
(-)	5000 #	132 121 138	13 20 12	25 36 32	14 28 19	5 3 9	
		( 130± 8.6)	( 15 ± 4.4)	( 31 ± 5.6)	$(20 \pm 7.1)$	( 6± 3.1)	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
		······································					
					1		
	0	107 125 125	16 19 9	23 24 28	25 32 28	12 13 9	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
		( 119 ± 10.4)	( 15 ± 5.1)	$(25 \pm 2.6)$	( 28 ± 3.5)	( 11 ± 2.1)	
	313	144 118 116	12 13 11	31 27 33	38 33 42	19 18 17	
		( 126 ± 15.6)	( 12 ± 1.0)	$(30 \pm 3.1)$	( 38 ± 4.5)	( 18 ± 1.0)	
	625	168 137 137	18 13 12	35 33 23	38 29 32	19 14 14	
		( 147 ± 17.9)	( 14 ± 3.2)	$(30 \pm 6.4)$		( 16 ± 2.9)	
	1250 #	130 120 166	8 20 15	35 42 35	36 30 36	18 16 12	
	2700 "	( 139 ± 24.2 )	( 14 ± 6.0)	( 37 ± 4.0)	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	( 15 ± 3.1)	
S9mix	2500 #	138 129 107	12 15 8	32 29 25	37 39 37	10 12 8	
(1)	5000 #	( 125 ± 15.9 ) 149 144 128	$(12 \pm 3.5)$ $12 7 11$	$(29 \pm 3.5)$ 24 15 25	( 38 ± 1.2 ) 37 39 23	( 10 ± 2.0 ) 10 11 7	
(+)	3000 #	$(140 \pm 11.0)$	$(10 \pm 2.6)$		1		
		( 140 1 11.0 )	( 10 ± 2.0 )	( 211 33)	( 33 ± 6.7)	7.2.2.1	
							<del></del>
ļ							
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
control	Dose (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	<u> </u>
S9 mix (-)	Number of	499 483 527	576 533 509	107 100 111	665 569 726	798 714 804	
	colonies / plate	$(503 \pm 22.3)$	( 539 ± 33.9 )	( 106 ± 5.6)	$(653 \pm 79.1)$	( 772 ± 50.3 )	
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control	Dose (μg/plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)		1091 1292 1423		1391 1251 1387	438 455 387	252 243 261	
	colonies / plate	( 1269 ± 167.2 )	$(317 \pm 11.7)$	$(1343 \pm 79.7)$	$(427 \pm 35.4)$	( 252 ± 9.0 )	

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

<sup>#:</sup> Precipitate was observed on the surface of agar plates.

<sup>\*\*:</sup> Purity was above 99.0 %.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of tris(2-ethylhexyl)1,2,4-benzenetricarboxylate \*\* on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)					
without (-)	dose	Bas	se - pair substitution			Frameshift type	
S9 mix	(µg /plate)		TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
	0	124 106 135 ( 122 ± 14.6 )	10 11 15	29 28 25	24 28 20	9 3 12 ( 8 ± 4.6);	
	313 #	125 130 142 ( 132 ± 8.7 )	14 18 18	22 21 23	26 21 25	11 10 15 ( 12 ± 2.6)	
	625 #	125 116 141 ( 127 ± 12.7 )	18 10 16	22 31 30 ( 28 ± 4.9 )	33 13 19	9 7 10 ( 9± 1.5)	
	1250 #	134 125 127 ( 129 ± 4.7 )	17 18 7 ( 14 ± 6.1 )	21 16 23 ( 20± 3.6)	27 29 24 ( 27 ± 2.5)	9 11 6 ( 9± 2.5)	
S9mix	2500 #	129 120 124 ( 124 ± 4.5 )	11 9 12 ( 11 ± 1.5)	21 17 13 ( 17 ± 4.0)	19 22 25 ( 22 ± 3.0 )	7 10 8 ( 8± 1.5)	
(-)	5000 #	145 147 141 ( 144 ± 3.1 )	13 13 12 ( 13 ± 0.6)	18 21 21 ( 20± 1.7)	18 12 21 ( 17 ± 4.6)	12 15 13 ( 13 ± 1.5 )	
	0	138 130 126 ( 131 ± 6.1 )	9 13 12 ( 11 ± 2.1)	23 26 16 ( 22± 5.1)	26 25 41 ( 31 ± 9.0)	23 16 15 ( 18 ± 4.4)	
	313	153 125 140 ( 139 ± 14.0 )	15 20 18 ( 18 ± 2.5 )	32 20 25 ( 26± 6.0 )	33 38 34 ( 35 ± 2.6 )	26 18 16	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	625	131 140 138 ( 136 ± 4.7 )	13 17 16	26 28 24	25 32 26	14 15 19	
	1250 #	129 156 161 ( 149 ± 17.2 )	18 12 16 ( 15 ± 3.1 )	30 23 12 ( 22 ± 9.1)	32 33 40 ( 35 ± 4.4 )	17 17 15 ( 16 ± 1.2 )	
S9mix	2500 #	122 138 160 ( 140 ± 19.1 )					
(+)	5000 #	156 158 164 ( 159 ± 4.2 )	14 25 15 ( 18 ± 6.1 )	21 29 18 ( 23 ± 5.7)	29 39 30 ( 33 ± 5.5 )	16 15 15 ( 15 ± 0.6)	
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
control	Dose (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of	682 650 670	232 245 242	108 151 190	954 935 930	1103 1071 999	
	colonies / plate	( 667 ± 16.2 )	( 240 ± 6.8 )	$(150 \pm 41.0)$	( 940 ± 12.7 )	( 1058 ± 53.3 )	
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	i	1262 1111 1309		1510 1537 1546	455 457 566	300 295 294	
	colonies / plate	$(1227 \pm 103.5)$	$(286 \pm 14.8)$	$(1531 \pm 18.7)$	$(493 \pm 63.5)$	$(296 \pm 3.2)$	

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

<sup>#:</sup> Precipitate was observed on the surface of agar plates.

<sup>\*\*:</sup> Purity was above 99.0 %.