トリス（２－エチルヘキシル）
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】

トリス（２－エチルヘキシル）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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で、本試験は 312.5～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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、トリス（２－エチルヘキシル）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】

ＯＥＣＤ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つであるトリス（２－エチルヘキシル）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 および 1674/2）を入れたＬ字型試験管に種菌を接種し、37℃、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〕

トリス（２－エチルヘキシル）フォスフェート（CAS No. 78-42-2、以下ＥＨＰと略）は、分子量 435、比重（20℃/20℃）0.926 の無色ないし淡黄色の透明の液体である。純度99.7%のもの（ロット番号：　　）を

から供与された。被験物質は、使用時まで冷所に保管した。

ＥＨＰは、アセトン（ロット番号：DSM 4173およびDSR 3251、和光純薬工業㈱）を用いて 50 mg/mℓ と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ＥＨＰのアセトン溶液中での安定性試験を染色体異常試験（H-92-292）における最高濃度（880 mg/mℓ）および最低濃度（0.550 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、103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）。安定性試験での濃度範囲は本試験における最高および最低濃度を含むものであった。

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、93.7～98.2%、3.125 mg/mℓ 溶液は、89.7～95.0%であった。これらの値も当研究所の標準操作手順書の基準を満たしていた（Appendix 2）。

以上の結果から、ＥＨＰはアセトン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：DJ030EH, DJ040IH およびDJ050JH, 1992年５月14日，同９月４日および同10月12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アセトン、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変異コロニー数の平均値が、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に示す。ＥＨＰについて、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、抗菌性は認められなかった。なお、被験物質に由来する寒天表面の沈殿物は直接法、代謝活性化法ともに 500 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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、すべての検定菌で 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とし、５用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Table 2、3に示す。ＥＨＰについて上記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、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、被験物質に由来する寒天表面の沈殿物は直接法、代謝活性化法ともに、すべての用量で認められた。

ＥＨＰ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、ＥＨＰ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 tris (2-ethylhexyl) 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	119 100 110 (110 ± 9.5)	9 9 14 (11 ± 2.9)	20 19 22 (20 ± 1.5)	30 31 28 (30 ± 1.5)	10 5 9 (8 ± 2.6)	
	50	127	13	23	25	6	
	150	123	16	16	24	5	
	500 #	111	15	27	35	8	
	1500 #	133	19	29	37	12	
	5000 #	128	22	15	17	6	
S9Mix)	0	109 136 131 (125 ± 14.4)	18 9 12 (13 ± 4.6)	16 19 25 (20 ± 4.6)	37 45 39 (40 ± 4.2)	10 10 11 (10 ± 0.6)	
	50	149	12	23	35	16	
	150	125	12	21	43	10	
	500 #	140	14	24	25	17	
	1500 #	165	14	14	27	9	
	5000 #	90	10	27	30	13	
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	441 413 419 (424 ± 14.7)	127 147 161 (145 ± 17.1)	122 128 144 (131 ± 11.4)	495 500 501 (499 ± 3.2)	2204 2208 2290 (2234 ± 48.5)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	724 674 713 (704 ± 26.3)	217 226 229 (224 ± 6.2)	864 856 888 (869 ± 16.7)	286 253 282 (274 ± 18.0)	149 128 117 (131 ± 16.3)	

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 tris (2-ethylhexyl) 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	102 128 111 (114 ± 13.2)	19 11 22 (17 ± 5.7)	20 24 28 (24 ± 4.0)	40 22 24 (29 ± 9.9)	8 11 12 (10 ± 2.1)	
	312.5 #	115 110 117 (114 ± 3.6)	16 15 19 (17 ± 2.1)	19 22 25 (22 ± 3.0)	32 27 34 (31 ± 3.6)	6 8 7 (7 ± 1.0)	
	625 #	121 105 115 (114 ± 8.1)	10 9 18 (12 ± 4.9)	34 22 23 (26 ± 6.7)	31 38 28 (32 ± 5.1)	5 4 7 (5 ± 1.5)	
	1250 #	104 126 104 (111 ± 12.7)	17 12 18 (16 ± 3.2)	29 30 35 (31 ± 3.2)	24 30 30 (28 ± 3.5)	8 6 7 (7 ± 1.0)	
	2500 #	97 112 121 (110 ± 12.1)	11 13 20 (15 ± 4.7)	15 21 21 (19 ± 3.5)	21 24 32 (26 ± 5.7)	9 9 4 (7 ± 2.9)	
	5000 #	121 125 117 (121 ± 4.0)	22 18 13 (18 ± 4.5)	28 25 20 (24 ± 4.0)	25 32 13 (23 ± 9.6)	11 7 7 (8 ± 2.3)	
S9Mix (+)	0	122 130 112 (121 ± 9.0)	11 11 9 (10 ± 1.2)	26 26 34 (29 ± 4.6)	51 49 36 (45 ± 8.1)	17 12 12 (14 ± 2.9)	
	312.5 #	139 134 117 (130 ± 11.5)	18 17 16 (17 ± 1.0)	29 28 25 (27 ± 2.1)	34 42 47 (41 ± 6.6)	14 9 18 (14 ± 4.5)	
	625 #	114 140 123 (126 ± 13.2)	17 15 16 (16 ± 1.0)	25 39 30 (31 ± 7.1)	44 47 36 (42 ± 5.7)	17 12 10 (13 ± 3.6)	
	1250 #	123 132 121 (125 ± 5.9)	9 11 12 (11 ± 1.5)	32 22 27 (27 ± 5.0)	43 41 44 (43 ± 1.5)	16 6 18 (13 ± 6.4)	
	2500 #	145 126 130 (134 ± 10.0)	11 17 11 (13 ± 3.5)	26 31 21 (26 ± 5.0)	46 36 47 (43 ± 6.1)	14 7 12 (11 ± 3.6)	
	5000 #	133 130 146 (136 ± 8.5)	14 13 19 (15 ± 3.2)	20 26 26 (24 ± 3.5)	40 38 38 (39 ± 1.2)	12 10 9 (10 ± 1.5)	
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	394 415 387 (399 ± 14.6)	184 148 171 (168 ± 18.2)	116 164 150 (143 ± 24.7)	647 707 641 (665 ± 36.5)	2388 2735 2440 (2521 ± 187.1)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	605 483 730 (606 ± 123.5)	234 211 196 (214 ± 19.1)	690 560 612 (621 ± 65.4)	294 225 424 (314 ± 101.0)	176 227 201 (201 ± 25.5)	

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.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with tris (2-ethylhexyl) 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	137 140 121 (133 ± 10.2)	11 21 17 (16 ± 5.0)	15 20 29 (21 ± 7.1)	32 29 31 (31 ± 1.5)	12 12 7 (10 ± 2.9)	
	312.5 #	151 131 139 (140 ± 10.1)	14 17 19 (17 ± 2.5)	15 18 21 (18 ± 3.0)	39 34 45 (39 ± 5.5)	7 6 9 (7 ± 1.5)	
	625 #	144 136 138 (139 ± 4.2)	20 13 20 (18 ± 4.0)	15 18 24 (19 ± 4.6)	33 28 44 (35 ± 8.2)	9 8 8 (8 ± 0.6)	
	1250 #	134 114 139 (129 ± 13.2)	15 26 13 (18 ± 7.0)	22 21 21 (21 ± 0.6)	35 32 29 (32 ± 3.0)	9 4 6 (6 ± 2.5)	
	2500 #	124 154 144 (141 ± 15.3)	11 23 17 (17 ± 6.0)	27 21 21 (23 ± 3.5)	30 39 26 (32 ± 6.7)	4 8 5 (6 ± 2.1)	
	5000 #	134 130 131 (132 ± 2.1)	16 12 19 (16 ± 3.5)	15 17 24 (19 ± 4.7)	32 30 16 (26 ± 8.7)	7 10 5 (7 ± 2.5)	
S9Mix (+)	0	137 145 137 (140 ± 4.6)	10 18 13 (14 ± 4.0)	15 27 16 (19 ± 6.7)	55 59 42 (52 ± 8.9)	12 14 12 (13 ± 1.2)	
	312.5 #	159 120 138 (139 ± 19.5)	15 21 15 (17 ± 3.5)	35 25 18 (26 ± 8.5)	34 42 44 (40 ± 5.3)	14 12 14 (13 ± 1.2)	
	625 #	172 144 99 (138 ± 36.8)	21 17 11 (16 ± 5.0)	26 26 23 (25 ± 1.7)	39 42 35 (39 ± 3.5)	16 8 12 (12 ± 4.0)	
	1250 #	150 160 154 (155 ± 5.0)	13 20 20 (18 ± 4.0)	22 23 13 (19 ± 5.5)	54 34 40 (43 ± 10.3)	9 7 10 (9 ± 1.5)	
	2500 #	145 151 129 (142 ± 11.4)	13 13 12 (13 ± 0.6)	25 25 15 (22 ± 5.8)	44 48 41 (44 ± 3.5)	16 9 14 (13 ± 3.6)	
	5000 #	156 166 158 (160 ± 5.3)	17 14 17 (16 ± 1.7)	24 20 17 (20 ± 3.5)	43 46 47 (45 ± 2.1)	7 14 9 (10 ± 3.6)	
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	503 468 501 (491 ± 19.7)	158 174 149 (160 ± 12.7)	150 139 146 (145 ± 5.6)	587 573 692 (617 ± 65.0)	3169 2909 2930 (3003 ± 144.4)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	686 711 664 (687 ± 23.5)	326 327 332 (328 ± 3.2)	532 521 569 (541 ± 25.1)	331 321 239 (297 ± 50.5)	191 238 232 (220 ± 25.6)	

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.