



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 $\mu\text{g}/\text{Pl-}$ ト の用量で、本試験は 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{Pl-}$ 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 *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、ニュートリエントプロスNa 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(株)) 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 : フリルアミド	(上野製薬株)	ロット番号 46,	純度99.9%)
SA : アジ化ナトリウム	(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%	ビオチン	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 : DJ030BH, 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 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
リン酸水素二カルシウム	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。

小試験管中にトッパアガー 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°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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、すべての検定菌で5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	0	119	100	110	9	9	14	20	19	22	30	31	28	10	5	9	
		(110 \pm 9.5)			(11 \pm 2.9)			(20 \pm 1.5)			(30 \pm 1.5)			(8 \pm 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			
S9 Mix)	0	109	136	131	18	9	12	16	19	25	37	45	39	10	10	11	
		(125 \pm 14.4)			(13 \pm 4.6)			(20 \pm 4.6)			(40 \pm 4.2)			(10 \pm 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	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			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	441	413	419	127	147	161	122	128	144	495	500	501	2204	2208	2290	
		(424 \pm 14.7)			(145 \pm 17.1)			(131 \pm 11.4)			(499 \pm 3.2)			(2234 \pm 48.5)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	724	674	713	217	226	229	864	856	888	286	253	282	149	128	117	
		(704 \pm 26.3)			(224 \pm 6.2)			(869 \pm 16.7)			(274 \pm 18.0)			(131 \pm 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 \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type						Frameshift type									
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	102	128	111	19	11	22	20	24	28	40	22	24	8	11	12	
		(114 \pm 13.2)			(17 \pm 5.7)			(24 \pm 4.0)			(29 \pm 9.9)			(10 \pm 2.1)			
	312.5 #	115	110	117	16	15	19	19	22	25	32	27	34	6	8	7	
		(114 \pm 3.6)			(17 \pm 2.1)			(22 \pm 3.0)			(31 \pm 3.6)			(7 \pm 1.0)			
	625 #	121	105	115	10	9	18	34	22	23	31	38	28	5	4	7	
		(114 \pm 8.1)			(12 \pm 4.9)			(26 \pm 6.7)			(32 \pm 5.1)			(5 \pm 1.5)			
	1250 #	104	126	104	17	12	18	29	30	35	24	30	30	8	6	7	
		(111 \pm 12.7)			(16 \pm 3.2)			(31 \pm 3.2)			(28 \pm 3.5)			(7 \pm 1.0)			
2500 #	97	112	121	11	13	20	15	21	21	21	24	32	9	9	4		
	(110 \pm 12.1)			(15 \pm 4.7)			(19 \pm 3.5)			(26 \pm 5.7)			(7 \pm 2.9)				
5000 #	121	125	117	22	18	13	28	25	20	25	32	13	11	7	7		
	(121 \pm 4.0)			(18 \pm 4.5)			(24 \pm 4.0)			(23 \pm 9.6)			(8 \pm 2.3)				
S9Mix (+)	0	122	130	112	11	11	9	26	26	34	51	49	36	17	12	12	
		(121 \pm 9.0)			(10 \pm 1.2)			(29 \pm 4.6)			(45 \pm 8.1)			(14 \pm 2.9)			
	312.5 #	139	134	117	18	17	16	29	28	25	34	42	47	14	9	18	
		(130 \pm 11.5)			(17 \pm 1.0)			(27 \pm 2.1)			(41 \pm 6.6)			(14 \pm 4.5)			
	625 #	114	140	123	17	15	16	25	39	30	44	47	36	17	12	10	
		(126 \pm 13.2)			(16 \pm 1.0)			(31 \pm 7.1)			(42 \pm 5.7)			(13 \pm 3.6)			
	1250 #	123	132	121	9	11	12	32	22	27	43	41	44	16	6	18	
		(125 \pm 5.9)			(11 \pm 1.5)			(27 \pm 5.0)			(43 \pm 1.5)			(13 \pm 6.4)			
2500 #	145	126	130	11	17	11	26	31	21	46	36	47	14	7	12		
	(134 \pm 10.0)			(13 \pm 3.5)			(26 \pm 5.0)			(43 \pm 6.1)			(11 \pm 3.6)				
5000 #	133	130	146	14	13	19	20	26	26	40	38	38	12	10	9		
	(136 \pm 8.5)			(15 \pm 3.2)			(24 \pm 3.5)			(39 \pm 1.2)			(10 \pm 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	394	415	387	184	148	171	116	164	150	647	707	641	2388	2735	2440	
		(399 \pm 14.6)			(168 \pm 18.2)			(143 \pm 24.7)			(665 \pm 36.5)			(2521 \pm 187.1)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	605	483	730	234	211	196	690	560	612	294	225	424	176	227	201	
		(606 \pm 123.5)			(214 \pm 19.1)			(621 \pm 65.4)			(314 \pm 101.0)			(201 \pm 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 \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	137	140	121	11	21	17	15	20	29	32	29	31	12	12	7	
		(133 \pm 10.2)			(16 \pm 5.0)			(21 \pm 7.1)			(31 \pm 1.5)			(10 \pm 2.9)			
	312.5 #	151	131	139	14	17	19	15	18	21	39	34	45	7	6	9	
		(140 \pm 10.1)			(17 \pm 2.5)			(18 \pm 3.0)			(39 \pm 5.5)			(7 \pm 1.5)			
	625 #	144	136	138	20	13	20	15	18	24	33	28	44	9	8	8	
		(139 \pm 4.2)			(18 \pm 4.0)			(19 \pm 4.6)			(35 \pm 8.2)			(8 \pm 0.6)			
	1250 #	134	114	139	15	26	13	22	21	21	35	32	29	9	4	6	
		(129 \pm 13.2)			(18 \pm 7.0)			(21 \pm 0.6)			(32 \pm 3.0)			(6 \pm 2.5)			
2500 #	124	154	144	11	23	17	27	21	21	30	39	26	4	8	5		
	(141 \pm 15.3)			(17 \pm 6.0)			(23 \pm 3.5)			(32 \pm 6.7)			(6 \pm 2.1)				
5000 #	134	130	131	16	12	19	15	17	24	32	30	16	7	10	5		
	(132 \pm 2.1)			(16 \pm 3.5)			(19 \pm 4.7)			(26 \pm 8.7)			(7 \pm 2.5)				
S9Mix (+)	0	137	145	137	10	18	13	15	27	16	55	59	42	12	14	12	
		(140 \pm 4.6)			(14 \pm 4.0)			(19 \pm 6.7)			(52 \pm 8.9)			(13 \pm 1.2)			
	312.5 #	159	120	138	15	21	15	35	25	18	34	42	44	14	12	14	
		(139 \pm 19.5)			(17 \pm 3.5)			(26 \pm 8.5)			(40 \pm 5.3)			(13 \pm 1.2)			
	625 #	172	144	99	21	17	11	26	26	23	39	42	35	16	8	12	
		(138 \pm 36.8)			(16 \pm 5.0)			(25 \pm 1.7)			(39 \pm 3.5)			(12 \pm 4.0)			
	1250 #	150	160	154	13	20	20	22	23	13	54	34	40	9	7	10	
		(155 \pm 5.0)			(18 \pm 4.0)			(19 \pm 5.5)			(43 \pm 10.3)			(9 \pm 1.5)			
2500 #	145	151	129	13	13	12	25	25	15	44	48	41	16	9	14		
	(142 \pm 11.4)			(13 \pm 0.6)			(22 \pm 5.8)			(44 \pm 3.5)			(13 \pm 3.6)				
5000 #	156	166	158	17	14	17	24	20	17	43	46	47	7	14	9		
	(160 \pm 5.3)			(16 \pm 1.7)			(20 \pm 3.5)			(45 \pm 2.1)			(10 \pm 3.6)				
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	686	711	664	326	327	332	532	521	569	331	321	239	191	238	232	
		(687 \pm 23.5)			(328 \pm 3.2)			(541 \pm 25.1)			(297 \pm 50.5)			(220 \pm 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.