

厚生省生活衛生局 殿

試 験 報 告 書

(2-エチルナキシル)ジフェニルメタン誘導体の細菌を用いる復帰変異試験

(試験番号：5L556)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目 次

要 約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. テスト菌株	8
3. 培 地	9
4. S9 mix	10
5. 試験方法	10
結果および結論	12
参考文献	12
表	13
図	16

要 約

(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート について、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA の 5 菌株を指標とする復帰変異試験を実施した。

予備試験を 5000 ~ 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比 4) の 7 濃度で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って、5000 ~ 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比 2) の 5 濃度で本試験を 2 回繰り返した。2 回の本試験ともに、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート は本試験条件下では変異原性を有さないと結論した。

材料および方法

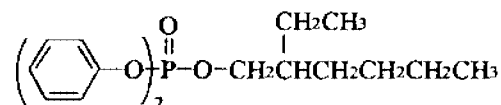
1. 試験物質

1.1 被験物質

から提供された(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート(CAS No. 1241-94-7, ロット番号： 純度 91.4%)を室温、暗所に密封して保存し、使用した。被験物質は下記の化学名、構造式、分子量および不純物を有する水に不溶の無色透明液体である。試験に使用したロットの安定性は、被験物質供給者が実験開始前および実験終了後に分析し、確認した。

化学名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート

構造式：



分子量：362.39

不純物：ジ(2-エチルヘキシル)フェニルフォスフェート : 7.0 %
 トリフェニルフォスフェート : 1.3 %
 トリス-2-エチルヘキシルフォスフェート : 0.2 %
 不明成分 : 0.1 %

1.2 対照物質

陰性(溶媒)対照物質および陽性対照物質として、以下のものを用いた。

対照物質名	略称	入手先	ロット番号	純度(%)
陰性対照 ジメチルスルホキシド	DMSO	関東化学(株)	708S1611	99.7
陽性対照 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド	AF-2	和光純薬工業(株)	PTQ1296	98.8
アジ化ナトリウム	NaN ₃	和光純薬工業(株)	KWE6685	96.5
N-エチル-N'-ニトロ-N'-ニトロソアジシン	ENNG	Sigma Chemical Company	56F-3651	99.0
9-アミノアクリジン	9-AA	Sigma Chemical Company	80F-0186	99
2-アミノアトラセン	2-AA	和光純薬工業(株)	TWH2355	98.0

2. テスト菌株^{1) 2)}

2.1 テスト菌株

より1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および

よ

り 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2*uvrA* の 5 菌株を用いた。

これら菌株の遺伝的特性は以下のとおりである。

菌 株	変異遺伝子	付帯突然変異			突然変異型
		修復	膜	R 因子	
TA98	<i>hisD</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	フレームシフト
TA100	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	塩基対置換
TA1535	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	塩基対置換
TA1537	<i>hisC</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	フレームシフト
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	+	—	塩基対置換

2.2 特性検査

各テスト菌株のアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特性を事前に調べ、これらの特性を備えた菌株を用いた。

2.3 保存方法

液体完全培地中で 37 °C で 8 時間振盪培養した各菌懸濁液 4 ml に対し、0.35 ml の割合で DMSO(ロット番号 610E1229)を加える。これを 200 μ l ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結し、超低温槽に -80 °C 以下で凍結保存したものを使用した。

2.4 菌懸濁液

凍結保存した各菌懸濁液を解凍後、各々 20 μ l を液体完全培地 10 ml に接種し、37 °C で 8 時間振盪培養した。菌懸濁液は、濁度計を用いて菌濃度を測定した。

3. 培 地

3.1 液体完全培地

精製水 1 l に対し、ニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2 ; Unipath 社、ロット番号 067 54134) 20 g の割合で溶解し、オートクレーブ滅菌 (121 °C, 15 分間 ; 以下同様) した。

3.2 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業(株)、ロット番号 AN020IK) を購入し、使用した。

3.3 トップアガー

精製水 100 ml に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar ; Difco 社、ロット番号 37430AJA)

0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブ滅菌し完全に溶解した。その後, 予め調製しておいた 0.5 mM D- ビオチン, L- ヒスチジンおよび L- トリプトファン混合水溶液を 1/10 量添加した。使用時まで約 45 °C に保温した。

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール(1日目 30 mg/kg, 2日目以降 60 mg/kg を3回反復腹腔内投与)および 5,6-ベンゾフラボン(3日目に 80 mg/kg を1回腹腔内投与)で酵素誘導したSD系雄ラット肝由来 S9(キッコーマン㈱, ロット番号 RAA-337)を購入し, 使用した。使用時まで -80 °C 以下で保存した。

4.2 S9 mix

S9 mix 1ml あたり以下の組成で調製し, 使用時まで氷中に保存した。

S9	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	

5. 試験方法³⁾

5.1 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

溶媒検討の結果, 50 mg/ml の濃度で水に不溶, 500 mg/ml の濃度で DMSO に溶解したため溶媒には DMSO を用いた。

被験物質を 50 mg/ml の濃度で DMSO に溶解し, これを希釈して各濃度の被験物質溶液を調製した。調製に際しては, 純度換算 (91.4%) を実施した。

陽性対照物質の NaN_3 は注射用水 (㈱大塚製薬工場, ロット番号 K5A81) に, その他は DMSO に溶解した。

5.2 被験物質濃度

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/7 μ l の各濃度で実施した結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って, 5000, 2500, 1250, 625, 313 μ g/7 μ l の 5 濃度を設定し, 本試験を 2 回実施した。

5.3 復帰変異試験

試験はプレインキュベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を 0.1 ml, 0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH7.4) を 0.5 ml および菌懸濁液を 0.1 ml 加え, 37 °C で 20 分間振盪培養した。S9 mix を共存させる場合には, 0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液の代わりに S9 mix を 0.5 ml 添加した。トップアガー 2 ml を上記の混合液に加え混和し, 最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後, 37 °C で 48 時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し, 被験物質による抗菌性の有無を調べた後, プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各濃度あたり 1 枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり 3 枚のプレートを使用し, 再現性を確認するため 2 回実施した。

陰性対照物質および陽性対照物質についても同様に実施した。

菌 株	S9 mix 非共存下 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		S9 mix 共存下 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	NaN ₃	0.5	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
WP2 _{uvrA}	ENNG	2	2-AA	10

5.4 無菌試験

最高濃度の被験物質溶液または S9 mix のみを, トップアガーとともに最少グルコース寒天平板培地上に播き, 雑菌の混入がないことを確認した。

5.5 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で, S9 mix の有無によらず, 被験物質濃度の増加にともなって復帰変異コロニー数 (平均値) が陰性対照値の 2 倍以上に増加し, さらにその増加に再現性が認められる場合に, 当該被験物質は変異原性を有する (陽性) と判定し, その他の場合はすべて陰性と判定した。試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果および結論

結果を表1～3および図1～10に示す。

予備試験を5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の各濃度で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。

この結果をもとに、5000, 2500, 1250, 625, 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の5濃度で本試験を2回繰り返した。2回の本試験ともに、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、抗菌性も、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても認められなかった。

S9 mix非共存下および共存下の625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の濃度で沈殿物が認められた。

以上の結果から、(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェートは本試験条件下では変異原性を有さない(陰性)と結論した。

参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N.; Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215. (1983)
- 2) Green, M.H.L., Muriel, W.J.; Mutagen testing using *trp*⁺ reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **38**, 3-32. (1976)
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課(編), “安衛法における変異原性試験”, 中央労働災害防止協会, 東京. (1991)

表 1

予備試験結果表

被験物質の名称 : (2-エチルヘキシル)シ⁷フェニルフォスフェート (No. 5L556)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{v}$)	復帰変異数(コロニ-数/ 7°v)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
S 9 mix (-)	溶媒対照	106	16	21	25	8
	1. 2 2	109	18	16	14	9
	4. 8 8	102	18	26	30	8
	1 9. 5	111	26	19	29	9
	7 8. 1	91	19	19	23	5
	3 1 3	92	21	18	15	5
	1 2 5 0	114 C	23 C	24 C	22 C	9 C
	5 0 0 0	91 C	22 C	16 C	27 C	9 C
S 9 mix (+)	溶媒対照	115	16	30	33	11
	1. 2 2	125	30	30	28	15
	4. 8 8	129	19	19	30	16
	1 9. 5	127	15	27	37	18
	7 8. 1	124	20	22	38	20
	3 1 3	121	21	24	30	9
	1 2 5 0	133 C	22 C	24 C	34 C	11 C
	5 0 0 0	134 C	22 C	34 C	36 C	9 C

(備考) C: 沈殿物が認められた。

表 2

試験結果表 (本試験 1)

被験物質の名称 : (2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート (No. 5L556)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (µg/プレート)	復帰変異数(コロニ-数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
S9mix (-)	溶媒対照	103 126 (110) 102 (± 14)	17 16 (15) 12 (± 3)	33 27 (34) 43 (± 8)	13 15 (14) 14 (± 1)	9 10 (11) 13 (± 2)	
	3 1 3	132 95 (111) 105 (± 19)	15 14 (16) 18 (± 2)	24 56 (39) 37 (± 16)	14 20 (15) 12 (± 4)	11 13 (11) 8 (± 3)	
	6 2 5	121 C 94 C(105) 100 C(± 14)	10 C 9 C(12) 16 C(± 4)	56 C 32 C(41) 34 C(± 13)	14 C 20 C(18) 21 C(± 4)	9 C 5 C(8) 10 C(± 3)	
	1 2 5 0	124 C 122 C(117) 105 C(± 10)	10 C 14 C(14) 17 C(± 4)	43 C 46 C(42) 37 C(± 5)	15 C 19 C(17) 18 C(± 2)	8 C 8 C(8) 7 C(± 1)	
	2 5 0 0	106 C 83 C(107) 133 C(± 25)	16 C 11 C(14) 15 C(± 3)	42 C 42 C(38) 29 C(± 8)	14 C 19 C(18) 21 C(± 4)	7 C 14 C(11) 13 C(± 4)	
	5 0 0 0	104 C 113 C(107) 105 C(± 5)	20 C 15 C(16) 13 C(± 4)	37 C 34 C(38) 42 C(± 4)	20 C 14 C(18) 21 C(± 4)	12 C 9 C(10) 9 C(± 2)	
S9mix (+)	溶媒対照	118 122 (118) 114 (± 4)	19 11 (16) 18 (± 4)	35 50 (42) 41 (± 8)	35 30 (31) 29 (± 3)	13 9 (12) 14 (± 3)	
	3 1 3	143 131 (126) 103 (± 21)	14 14 (14) 13 (± 1)	31 43 (35) 31 (± 7)	30 25 (28) 30 (± 3)	10 13 (11) 9 (± 2)	
	6 2 5	121 C 146 C(132) 130 C(± 13)	21 C 16 C(20) 23 C(± 4)	50 C 42 C(44) 39 C(± 6)	25 C 28 C(27) 27 C(± 2)	14 C 9 C(12) 14 C(± 3)	
	1 2 5 0	121 C 138 C(129) 127 C(± 9)	20 C 11 C(15) 14 C(± 5)	42 C 31 C(39) 44 C(± 7)	38 C 22 C(27) 20 C(± 10)	11 C 13 C(10) 7 C(± 3)	
	2 5 0 0	118 C 129 C(122) 120 C(± 6)	14 C 20 C(17) 18 C(± 3)	38 C 24 C(35) 44 C(± 10)	26 C 26 C(26) 25 C(± 1)	15 C 8 C(10) 7 C(± 4)	
	5 0 0 0	135 C 115 C(126) 129 C(± 10)	16 C 24 C(18) 15 C(± 5)	33 C 35 C(39) 50 C(± 9)	24 C 27 C(24) 20 C(± 4)	7 C 10 C(10) 13 C(± 3)	
陽性	S9mixを必要としないもの	名称 濃度 (µg/プレート) コロニ-数 / プレート	AF-2 0.01 656 638 (659) 684 (± 23)	NaN ₃ 0.5 309 335 (315) 307 (± 17)	ENNG 2 518 599 (549) 529 (± 44)	AF-2 0.1 516 508 (516) 523 (± 8)	9-AA 80 383 539 (474) 499 (± 81)
	対照	S9mixを必要とするもの	名称 濃度 (µg/プレート) コロニ-数 / プレート	2-AA 1 906 945 (921) 913 (± 21)	2-AA 2 354 359 (337) 297 (± 34)	2-AA 10 1272 1270 (1239) 1176 (± 55)	2-AA 0.5 292 236 (262) 257 (± 28)

(備考) C: 沈殿物が認められた。

(平均値)

(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃ : ナトリウム過酸化ナトリウム,
ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアクリジン

表 3

試験結果表 (本試験 2)

被験物質の名称 : (2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフォート (No. 5L556)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニ数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	溶媒対照	98 118 (105) 98 (± 12)	10 7 (9) 10 (± 2)	21 27 (23) 21 (± 3)	14 35 (26) 28 (± 11)	8 6 (9) 14 (± 4)	
	3 1 3	91 108 (97) 92 (± 10)	10 11 (12) 16 (± 3)	20 31 (27) 29 (± 6)	24 36 (32) 35 (± 7)	3 5 (5) 7 (± 2)	
	6 2 5	98 C 85 C(97) 107 C(± 11)	6 C 13 C(9) 8 C(± 4)	29 C 39 C(32) 28 C(± 6)	29 C 39 C(29) 18 C(± 11)	9 C 5 C(8) 10 C(± 3)	
	1 2 5 0	105 C 105 C(111) 124 C(± 11)	16 C 14 C(13) 10 C(± 3)	34 C 31 C(31) 29 C(± 3)	38 C 20 C(31) 35 C(± 10)	11 C 8 C(9) 7 C(± 2)	
	2 5 0 0	111 C 105 C(111) 118 C(± 7)	11 C 5 C(8) 7 C(± 3)	29 C 26 C(32) 41 C(± 8)	31 C 30 C(27) 21 C(± 6)	10 C 9 C(10) 10 C(± 1)	
	5 0 0 0	93 C 113 C(97) 84 C(± 15)	10 C 8 C(9) 9 C(± 1)	32 C 28 C(34) 42 C(± 7)	31 C 27 C(29) 30 C(± 2)	11 C 4 C(7) 5 C(± 4)	
S 9 mix (+)	溶媒対照	116 124 (120) 119 (± 4)	21 15 (17) 16 (± 3)	31 35 (34) 37 (± 3)	39 33 (37) 39 (± 3)	10 13 (12) 12 (± 2)	
	3 1 3	96 121 (117) 135 (± 20)	9 12 (11) 11 (± 2)	40 38 (39) 38 (± 1)	37 34 (36) 36 (± 2)	11 10 (10) 9 (± 1)	
	6 2 5	119 C 136 C(126) 123 C(± 9)	14 C 12 C(12) 10 C(± 2)	37 C 42 C(39) 37 C(± 3)	30 C 30 C(33) 39 C(± 5)	10 C 15 C(15) 20 C(± 5)	
	1 2 5 0	126 C 123 C(129) 137 C(± 7)	13 C 22 C(15) 11 C(± 6)	31 C 37 C(31) 26 C(± 6)	45 C 38 C(40) 37 C(± 4)	14 C 16 C(15) 15 C(± 1)	
	2 5 0 0	149 C 129 C(136) 129 C(± 12)	13 C 13 C(15) 18 C(± 3)	34 C 46 C(37) 30 C(± 8)	38 C 27 C(34) 38 C(± 6)	15 C 16 C(12) 6 C(± 6)	
	5 0 0 0	119 C 129 C(122) 119 C(± 6)	14 C 20 C(17) 18 C(± 3)	44 C 33 C(33) 23 C(± 11)	33 C 41 C(39) 42 C(± 5)	15 C 13 C(15) 16 C(± 2)	
陽性	S9mixを必要としなもの	名称 濃度 (μg/プレート) コロニ数 / プレート	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	ENNG 2	AF-2 0.1	9-AA 80
			787 755 (758) 733 (± 27)	351 323 (329) 313 (± 20)	884 828 (828) 772 (± 56)	564 521 (539) 531 (± 23)	471 435 (446) 432 (± 22)
対照	S9mixを必要とするもの	名称 濃度 (μg/プレート) コロニ数 / プレート	2 AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2
			1014 974 (984) 963 (± 27)	370 368 (379) 400 (± 18)	1051 1053 (1064) 1087 (± 20)	258 360 (307) 303 (± 51)	111 192 (167) 198 (± 49)

(備考) C : 沈殿物が認められた。

(平均値)

(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃ : ナン化ナトリウム,
ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン, 9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアクリジン

図 1 (本試験 1)

被験物質名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスファイト

No.5L556

用量-反応曲線 (TA100)

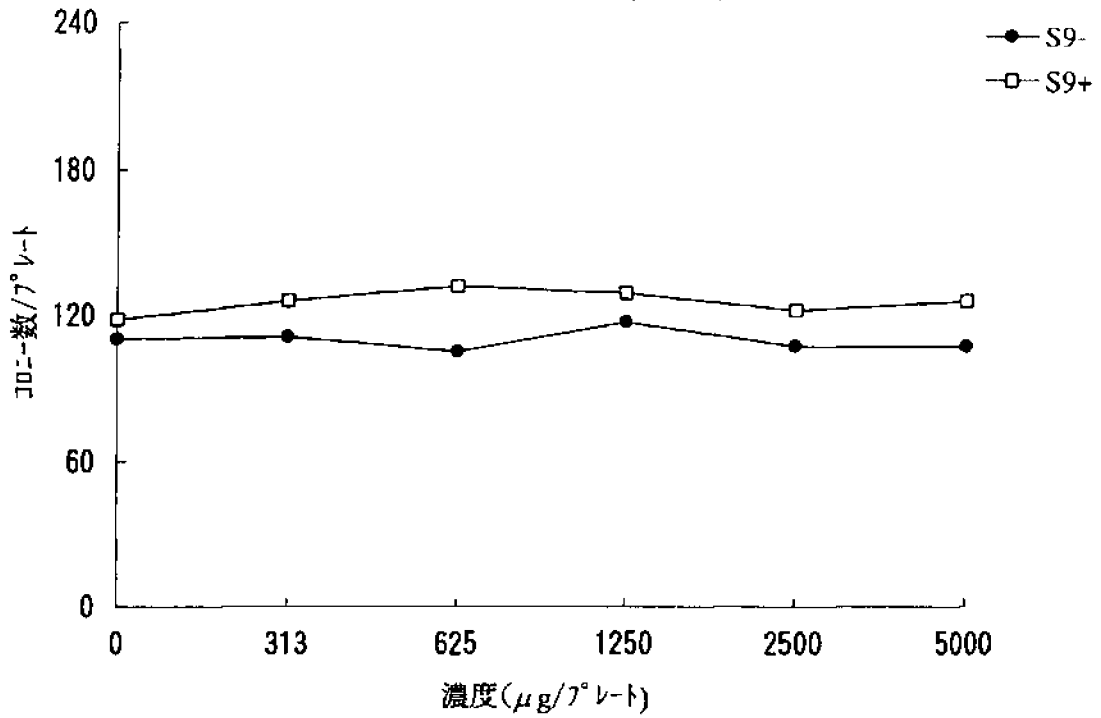


図 2 (本試験 1)

被験物質名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスファイト

No.5L556

用量-反応曲線 (TA1535)

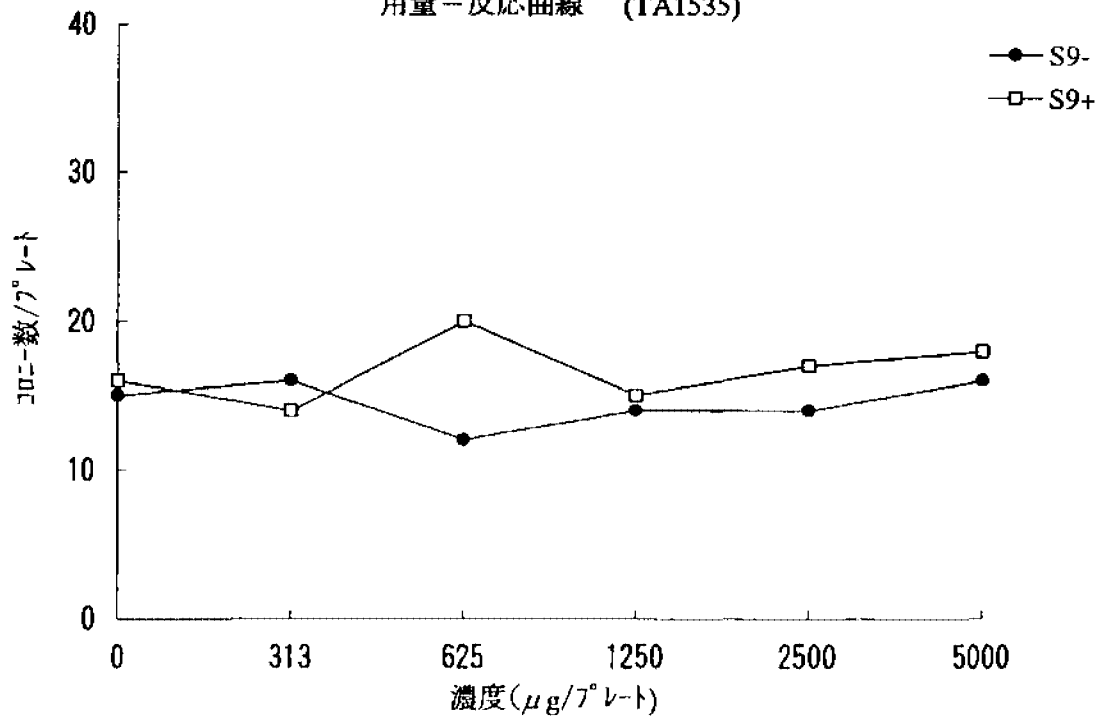


図 3 (本試験 1)

被験物質名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート

No.5L556

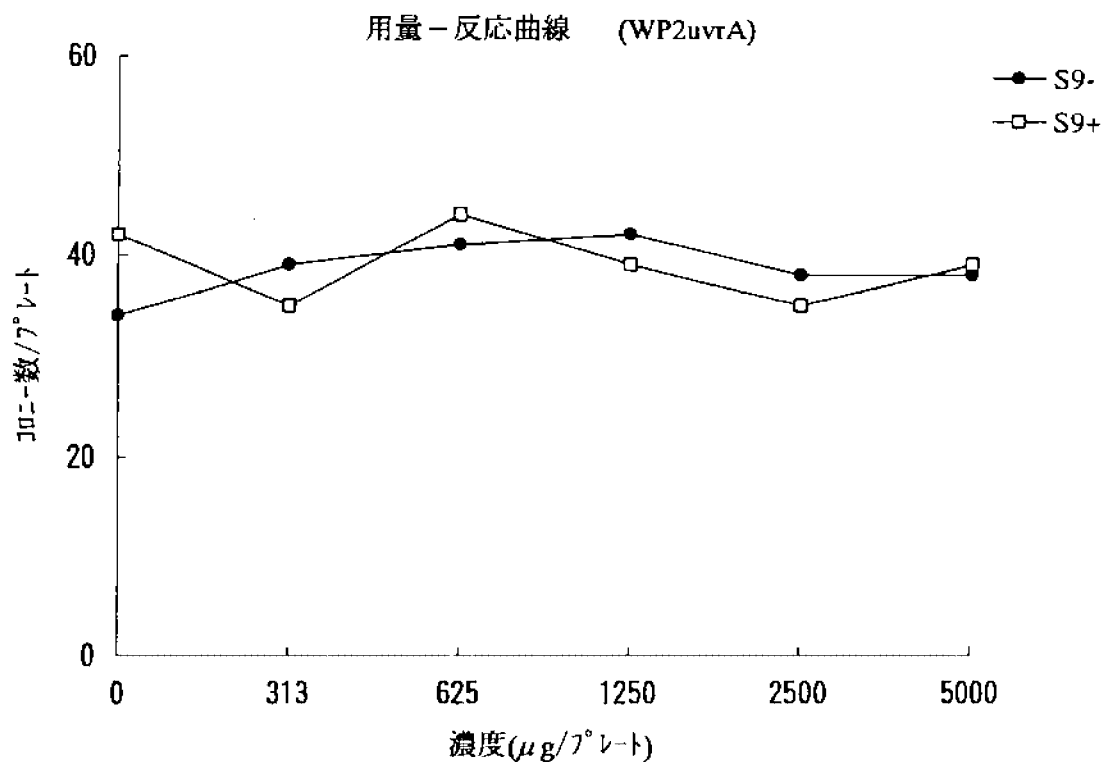


図 4 (本試験 1)

被験物質名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート

No.5L556

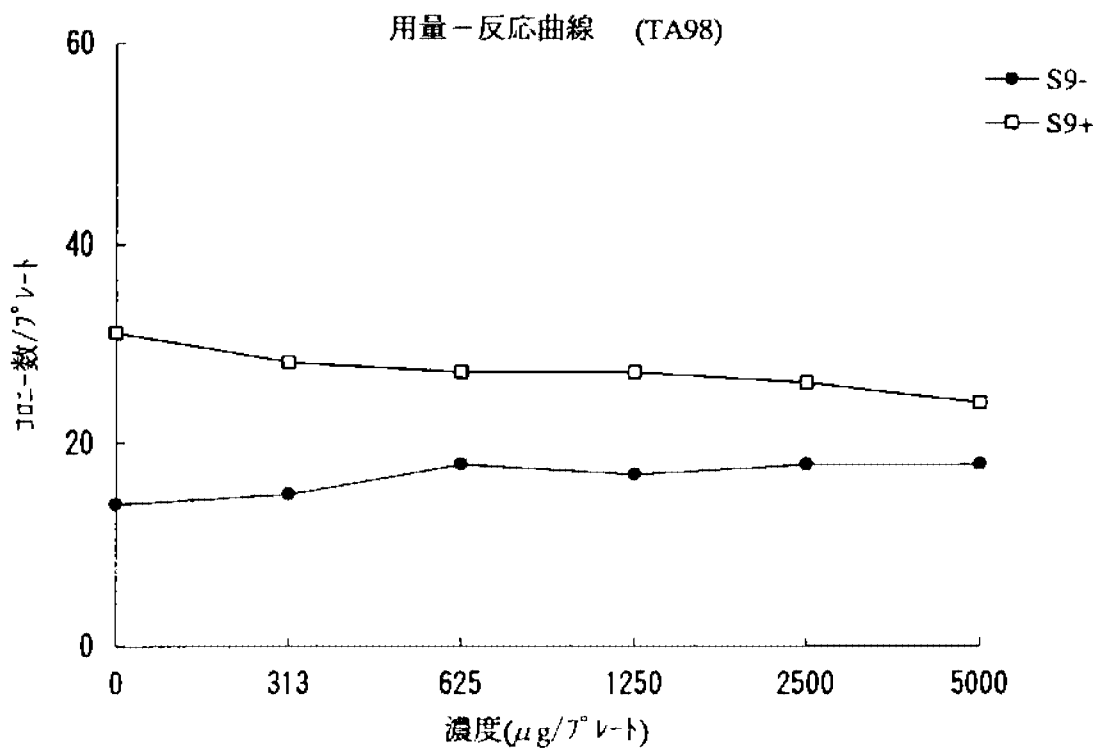


図 5 (本試験 1)

被験物質名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート

No.5L556

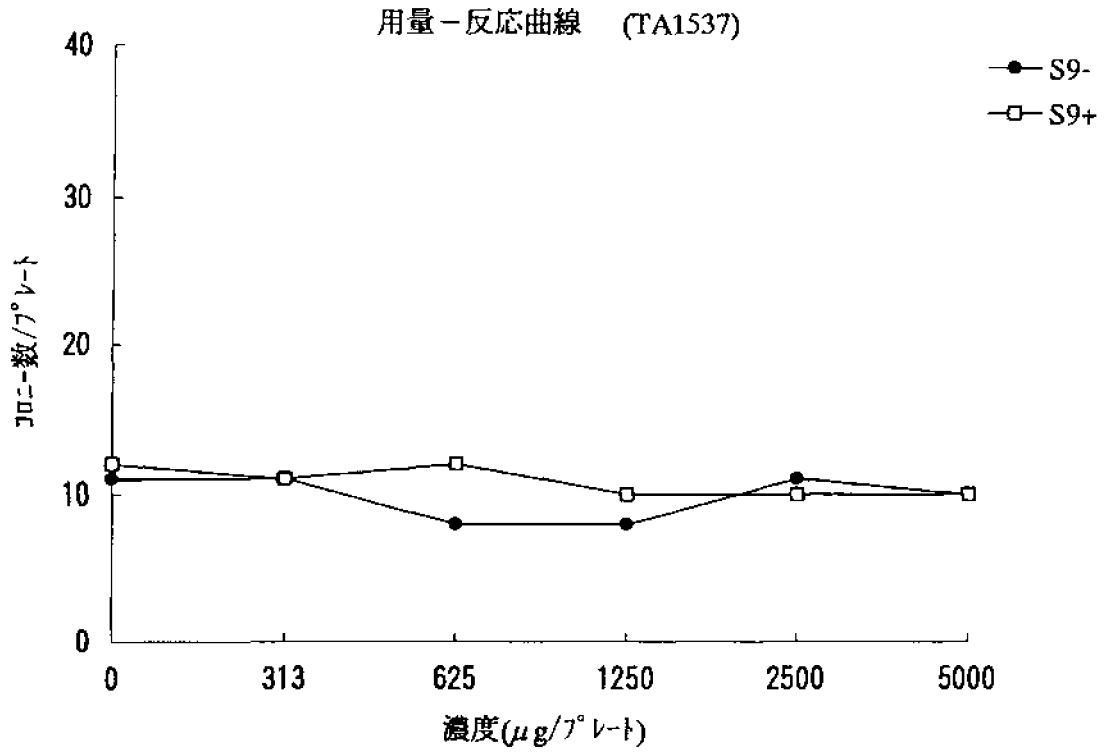


図 6 (本試験 2)

被験物質名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート

No.5L556

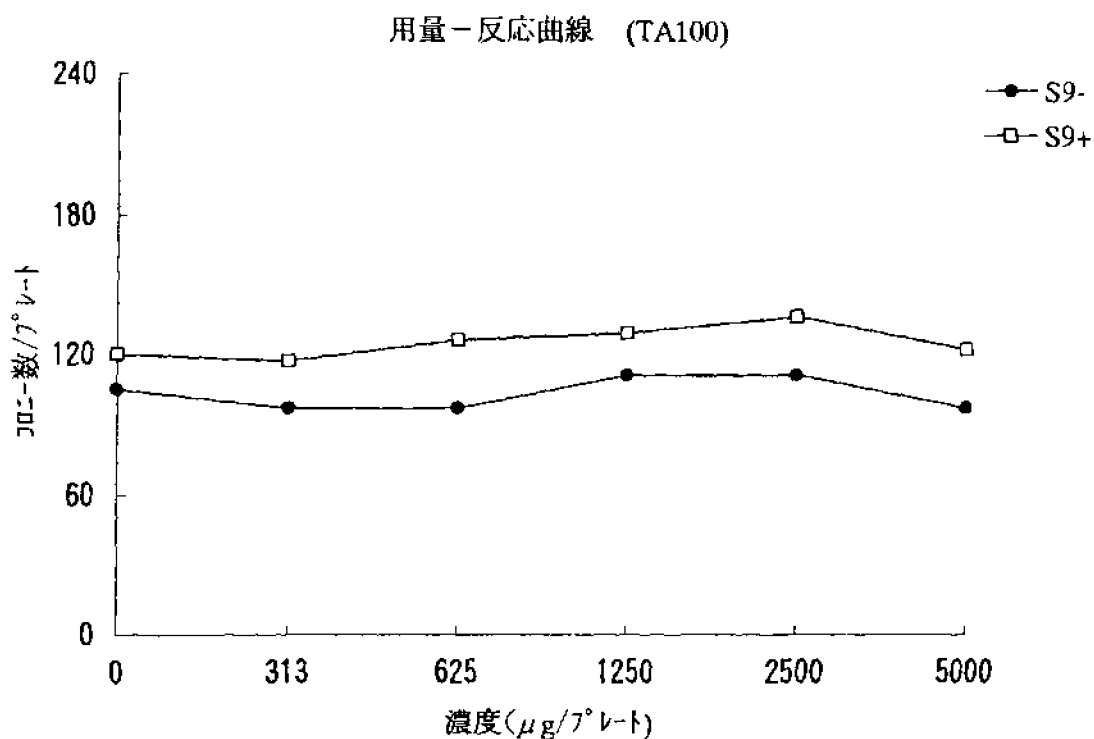


図 7 (本試験 2)

被験物質名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート

No.5L556

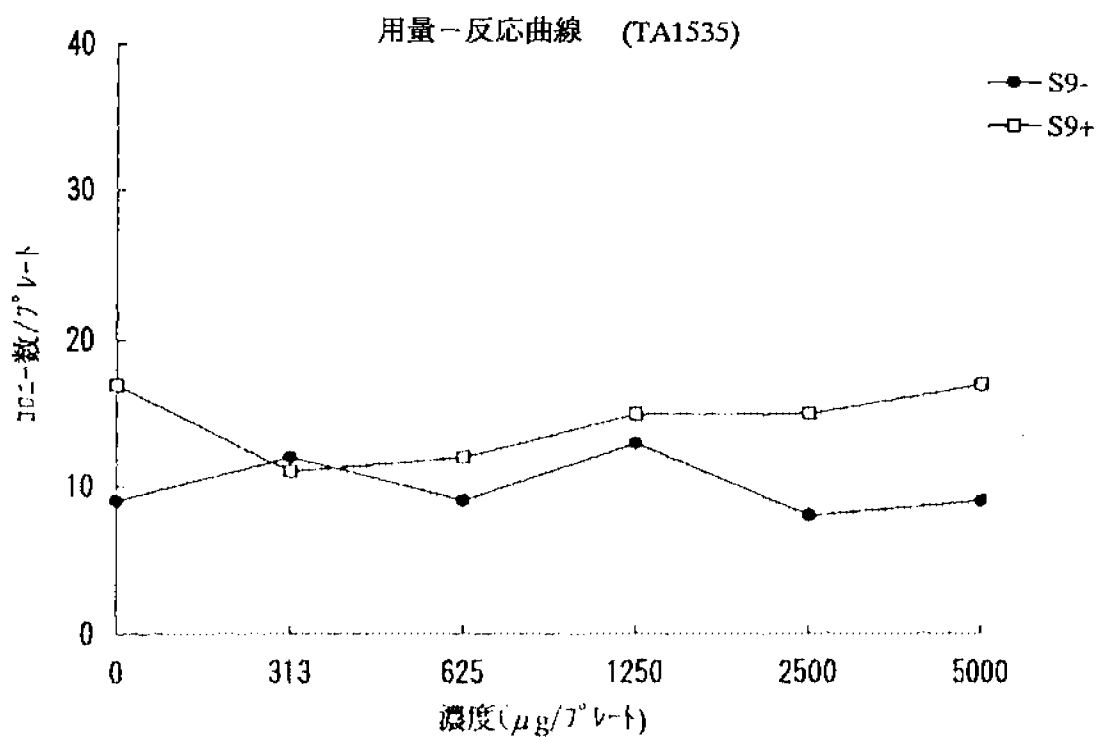


図 8 (本試験 2)

被験物質名 : (2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート

No.5L556

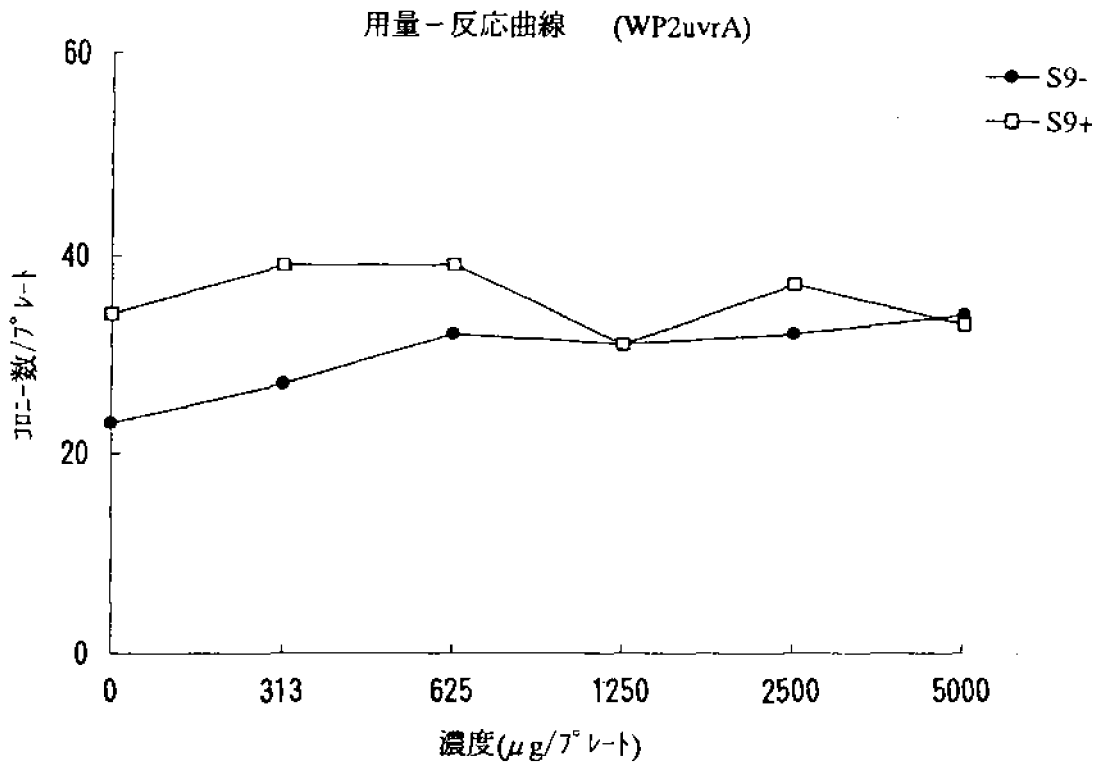


図 9 (本試験 2)

被験物質名 : (2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフェート

No.5L556

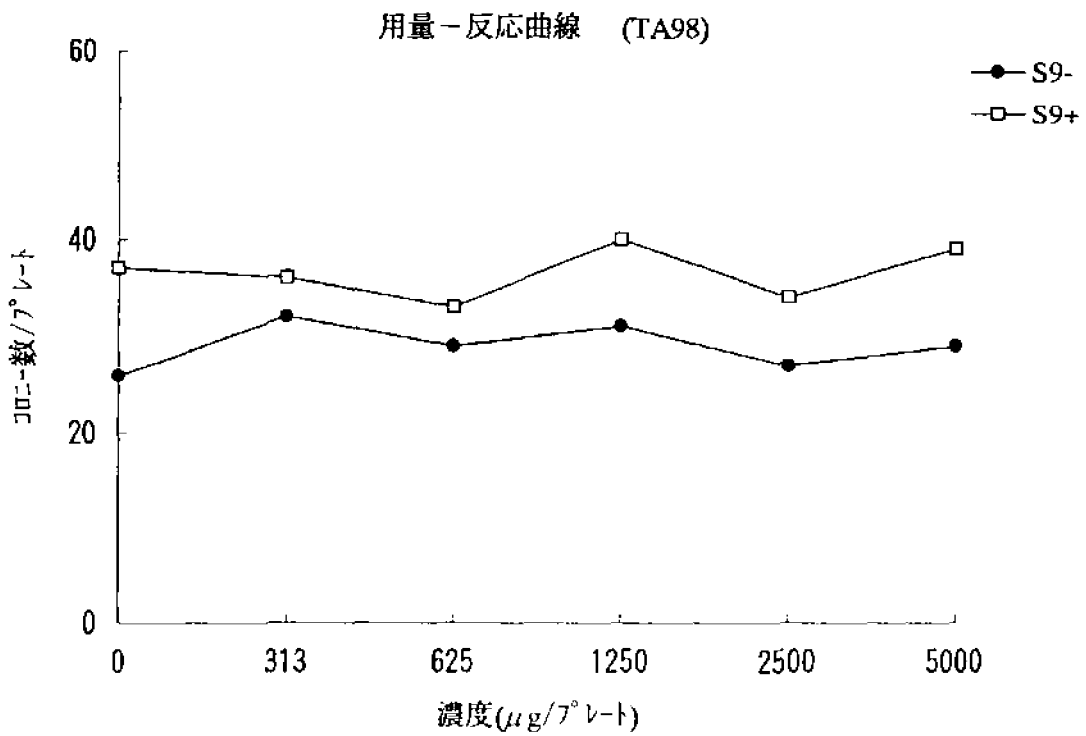


図 10 (本試験 2)

被験物質名：(2-エチルヘキシル)ジフェニルフォスフォート

No.5L556

