

ジフェニルクレジ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 1～4	

【要 約】

ジフェニルクレジ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、用量設定試験は直接法が 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法が 10～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、本試験では直接法および代謝活性化法のいずれも、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、ジフェニルクレジ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、ジフェニルクレジ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 を入れた
L字型試験管に種菌を接種し、37℃、約11～12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〕

ジフェニルクレジルフォスフェート (CAS No. 26444-49-5、以下DCPと略) は、分子
量 340の無色～淡黄色の液体であり、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密栓して保管した。

DCPは、ジメチルスルホキシド (以下DMSOと略, ロット番号：TWP 5445、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DCPの DMSO 溶液中での安定性試験を行った。本試験における最
高濃度 (50 mg/ml) および最低濃度 (3 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、97.6%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)。

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、100～101%、3.125 mg/ml 溶液は、103～104%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、DCP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%	ピオチン	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: DJ040IH および DJ050JH, 1992年9月4日および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
リン酸水素二カリウム	10 g	バクトアガー (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
塩化カリウム	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℃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 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℃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。用量設定試験は追加試験を含めて2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 Tables 1、2 に示した。DCP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、直接法においては、すべての検定菌で抗菌性は認められなかったが、代謝活性化法においては、すべての検定菌で強い抗菌性が認められた。しかし、10～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の広い範囲で代謝活性化法による用量設定試験を追加して行ったところ、すべての検定菌において最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でも抗菌性は認められなかった。そのため、1回目の代謝活性化試験には、何らかの技術的なエラーがあったものとし、データから削除した。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 3、4 に示した。DCP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、直接法および代謝活性化法ともに、1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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。

DCP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、DCP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 diphenylcresyl 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			
S9 Mix (-)	0	122	112	110	10	14	12	17	16	29	16	15	17	11	9	5	
		(115 \pm 6.4)			(12 \pm 2.0)			(21 \pm 7.2)			(16 \pm 1.0)			(8 \pm 3.1)			
	50	86			3			15			17			6			
	150	84			10			14			15			7			
	500	101			13			21			13			9			
	1500	97			4			20			21			11			
5000	107			7			12			11			5				
S9 Mix																	
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 (+)	Number of colonies / plate	432	427	440	156	160	185	158	176	171	583	563	592	3533	3729	3659	
		(433 \pm 6.6)			(167 \pm 15.7)			(168 \pm 9.3)			(579 \pm 14.8)			(3640 \pm 99.3)			
	Chemical																
	Dose (μg /plate)																
	Number of colonies / plate																

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

Table 2. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with diphenylcresyl 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			WP2rrvA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)																	
	0	116	112	124	15	15	14	28	21	22	30	29	33	20	12	11	
		(117 \pm 6.1)			(15 \pm 0.6)			(24 \pm 3.8)			(31 \pm 2.1)			(14 \pm 4.9)			
	10	131			11			ND			ND			16			
	20	126			15			ND			ND			9			
	40	126			19			19			43			11			
	100	123			11			31			18			10			
	200	ND			ND			25			23			ND			
	400	ND			ND			26			19			ND			
2500	126			19			21			21			11				
5000	130			15			16			26			8				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical																
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)																
	Number of colonies / plate																
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	614	648	632	189	191	204	612	642	600	213	177	195	169	179	193	
	(631 \pm 17.0)			(195 \pm 8.1)			(618 \pm 21.6)			(195 \pm 18.0)			(180 \pm 12.1)				

2AA: 2-Aminoanthracene

ND:Not done

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with diphenylcresyl 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	135	146	161	16	16	9	28	17	24	20	22	27	12	14	8	
		(147 \pm 13.1)			(14 \pm 4.0)			(23 \pm 5.6)			(23 \pm 3.6)			(11 \pm 3.1)			
	312.5 #	143	149	165	13	16	13	18	25	26	25	24	20	8	7	8	
		(152 \pm 11.4)			(14 \pm 1.7)			(23 \pm 4.4)			(23 \pm 2.6)			(8 \pm 0.6)			
	625 #	154	152	148	15	8	20	23	26	26	28	28	32	11	10	13	
		(151 \pm 3.1)			(14 \pm 6.0)			(25 \pm 1.7)			(29 \pm 2.3)			(11 \pm 1.5)			
	1250 #	155	146	132	11	14	18	25	28	23	15	23	23	9	16	5	
		(144 \pm 11.6)			(14 \pm 3.5)			(25 \pm 2.5)			(20 \pm 4.6)			(10 \pm 5.6)			
2500 #	179	119	167	20	18	13	27	21	20	25	33	35	12	18	10		
	(155 \pm 31.7)			(17 \pm 3.6)			(23 \pm 3.8)			(31 \pm 5.3)			(13 \pm 4.2)				
5000 #	140	145	150	15	16	14	18	28	24	23	25	22	10	13	14		
	(145 \pm 5.0)			(15 \pm 1.0)			(23 \pm 5.0)			(23 \pm 1.5)			(12 \pm 2.1)				
S9Mix (+)	0	156	159	163	17	19	17	25	25	28	43	37	42	14	22	27	
		(159 \pm 3.5)			(18 \pm 1.2)			(26 \pm 1.7)			(41 \pm 3.2)			(21 \pm 6.6)			
	312.5	175	136	145	19	9	16	31	34	25	38	21	21	17	18	11	
		(152 \pm 20.4)			(15 \pm 5.1)			(30 \pm 4.6)			(27 \pm 9.8)			(15 \pm 3.8)			
	625	163	166	146	20	12	12	31	20	19	39	29	39	12	12	16	
		(158 \pm 10.8)			(15 \pm 4.6)			(23 \pm 6.7)			(36 \pm 5.8)			(13 \pm 2.3)			
	1250 #	119	167	153	14	20	22	23	19	29	24	34	27	10	13	13	
		(146 \pm 24.7)			(19 \pm 4.2)			(24 \pm 5.0)			(28 \pm 5.1)			(12 \pm 1.7)			
2500 #	179	147	178	22	13	10	28	22	27	33	34	26	10	10	11		
	(168 \pm 18.2)			(15 \pm 6.2)			(26 \pm 3.2)			(31 \pm 4.4)			(10 \pm 0.6)				
5000 #	164	154	158	17	10	15	29	26	22	35	30	30	11	17	15		
	(159 \pm 5.0)			(14 \pm 3.6)			(26 \pm 3.5)			(32 \pm 2.9)			(14 \pm 3.1)				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	571	521	498	430	420	402	125	141	136	706	653	644	3272	3474	3159	
		(530 \pm 37.3)			(417 \pm 14.2)			(134 \pm 8.2)			(668 \pm 33.5)			(3302 \pm 159.6)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	874	903	887	200	186	237	546	540	637	271	288	287	234	257	260	
		(888 \pm 14.5)			(208 \pm 26.4)			(574 \pm 54.4)			(282 \pm 9.5)			(250 \pm 14.2)			

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 4. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with diphenylcresyl 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	145	139	136	15	16	8	9	12	16	19	16	19	4	8	8	
		(140 \pm 4.6)			(13 \pm 4.4)			(12 \pm 3.5)			(18 \pm 1.7)			(7 \pm 2.3)			
	312.5	157	158	136	22	13	15	25	9	14	21	24	28	11	9	13	
		(150 \pm 12.4)			(17 \pm 4.7)			(16 \pm 8.2)			(24 \pm 3.5)			(11 \pm 2.0)			
	625	137	108	128	12	15	8	14	16	21	22	21	17	11	7	8	
		(124 \pm 14.8)			(12 \pm 3.5)			(17 \pm 3.6)			(20 \pm 2.6)			(9 \pm 2.1)			
	1250 #	120	146	117	7	12	11	14	8	13	15	20	17	10	9	5	
		(128 \pm 15.9)			(10 \pm 2.6)			(12 \pm 3.2)			(17 \pm 2.5)			(8 \pm 2.6)			
2500 #	149	139	152	20	17	13	13	14	11	24	17	14	7	4	4		
	(147 \pm 6.8)			(17 \pm 3.5)			(13 \pm 1.5)			(18 \pm 5.1)			(5 \pm 1.7)				
5000 #	128	137	118	20	15	13	17	20	16	15	22	17	5	8	11		
	(128 \pm 9.5)			(16 \pm 3.6)			(18 \pm 2.1)			(18 \pm 3.6)			(8 \pm 3.0)				
S9Mix (+)	0	145	144	150	13	15	12	15	13	20	33	24	33	14	7	9	
		(146 \pm 3.2)			(13 \pm 1.5)			(16 \pm 3.6)			(30 \pm 5.2)			(10 \pm 3.6)			
	312.5	157	158	143	15	21	18	21	17	27	39	28	27	11	8	9	
		(153 \pm 8.4)			(18 \pm 3.0)			(22 \pm 5.0)			(31 \pm 6.7)			(9 \pm 1.5)			
	625 #	140	151	147	17	15	13	25	21	22	30	25	23	8	8	8	
		(146 \pm 5.6)			(15 \pm 2.0)			(23 \pm 2.1)			(26 \pm 3.6)			(8 \pm 0.0)			
	1250 #	146	151	166	18	14	8	19	14	17	32	30	26	6	8	8	
		(154 \pm 10.4)			(13 \pm 5.0)			(17 \pm 2.5)			(29 \pm 3.1)			(7 \pm 1.2)			
2500 #	127	104	165	22	15	19	18	16	18	21	33	30	6	8	10		
	(132 \pm 30.8)			(19 \pm 3.5)			(17 \pm 1.2)			(28 \pm 6.2)			(8 \pm 2.0)				
5000 #	152	159	140	10	11	12	14	13	19	26	28	19	3	8	9		
	(150 \pm 9.6)			(11 \pm 1.0)			(15 \pm 3.2)			(24 \pm 4.7)			(7 \pm 3.2)				
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	521	538	546	154	166	167	200	193	186	626	670	616	2077	2184	2021	
		(535 \pm 12.8)			(162 \pm 7.2)			(193 \pm 7.0)			(637 \pm 28.7)			(2094 \pm 82.8)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	732	727	749	167	173	174	514	648	700	172	176	183	205	192	198	
		(736 \pm 11.5)			(171 \pm 3.8)			(621 \pm 96.0)			(177 \pm 5.6)			(198 \pm 6.5)			

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.