



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センター
秦野 隆 亮 研

【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 1～3	

【要 約】

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50~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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S9 mix 無添加試験および添加試験を313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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(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、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 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⁽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突然変異⁽²⁾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
から分与
を受けた。

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No.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-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (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%以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン (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(株) 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(株)) に溶解したものを-20℃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(株)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 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	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	バクトアガー (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	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)

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	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
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-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℃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 50~5000 μg /プレート 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、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 μg /プレート 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とともに 313~5000 μg /プレート 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 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	101	101	114	8	19	14	20	22	26	19	33	31	15	6	2	
		(105 \pm 7.5)			(14 \pm 5.5)			(23 \pm 3.1)			(28 \pm 7.6)			(8 \pm 6.7)			
	50	111			19			23			20			10			
	150	111			16			22			24			14			
	500 #	111			14			31			24			4			
	1500 #	109			20			18			19			6			
	5000 #	139			13			28			29			8			
S9mix (+)	0	118	130	117	18	17	20	29	21	33	44	38	29	13	12	13	
		(122 \pm 7.2)			(18 \pm 1.5)			(28 \pm 6.1)			(37 \pm 7.5)			(13 \pm 0.6)			
	50	112			15			26			36			15			
	150	126			15			30			40			19			
	500	117			18			27			28			16			
	1500 #	115			16			34			36			14			
	5000 #	135			12			39			23			11			
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	542	539	556	312	298	323	130	137	122	613	833	730	648	610	640	
		(546 \pm 9.1)			(311 \pm 12.5)			(130 \pm 7.5)			(725 \pm 110.1)			(633 \pm 20.0)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1369	1337	1260	323	243	301	1462	1479	1194	415	434	417	323	320	320	
		(1322 \pm 56.0)			(289 \pm 41.3)			(1378 \pm 159.9)			(422 \pm 10.4)			(321 \pm 1.7)			

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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

** : 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 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	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 ± 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)			(18 ± 7.4)			(22 ± 3.2)			(28 ± 7.4)		(9 ± 1.0)			
	1250 #	117	130	130	21	14	15	19	24	25	22	23	25	8	11	11
		(126 ± 7.5)			(17 ± 3.8)			(23 ± 3.2)			(23 ± 1.5)		(10 ± 1.7)			
2500 #	143	142	148	15	21	12	23	28	20	21	27	23	3	5	11	
	(144 ± 3.2)			(16 ± 4.6)			(24 ± 4.0)			(24 ± 3.1)		(6 ± 4.2)				
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 ± 7.1)		(6 ± 3.1)				
S9mix (+)	0	107	125	125	16	19	9	23	24	28	25	32	28	12	13	9
		(119 ± 10.4)			(15 ± 5.1)			(25 ± 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 ± 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 ± 6.4)			(33 ± 4.6)		(16 ± 2.9)			
	1250 #	130	120	166	8	20	15	35	42	35	36	30	36	18	16	12
		(139 ± 24.2)			(14 ± 6.0)			(37 ± 4.0)			(34 ± 3.5)		(15 ± 3.1)			
2500 #	138	129	107	12	15	8	32	29	25	37	39	37	10	12	8	
	(125 ± 15.9)			(12 ± 3.5)			(29 ± 3.5)			(38 ± 1.2)		(10 ± 2.0)				
5000 #	149	144	128	12	7	11	24	15	25	37	39	23	10	11	7	
	(140 ± 11.0)			(10 ± 2.6)			(21 ± 5.5)			(33 ± 8.7)		(9 ± 2.1)				
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		
Positive control S9 mix (-)	Number of colonies / plate	499	483	527	576	533	509	107	100	111	665	569	726	798	714	804
		(503 ± 22.3)			(539 ± 33.9)			(106 ± 5.6)			(653 ± 79.1)			(772 ± 50.3)		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1091	1292	1423	326	304	322	1391	1251	1387	438	455	387	252	243	261
		(1269 ± 167.2)			(317 ± 11.7)			(1343 ± 79.7)			(427 ± 35.4)			(252 ± 9.0)		

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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

**: 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 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	124	106	135	10	11	15	29	28	25	24	28	20	9	3	12	
		(122 \pm 14.6)			(12 \pm 2.6)			(27 \pm 2.1)			(24 \pm 4.0)			(8 \pm 4.6)			
	313 #	125	130	142	14	18	18	22	21	23	26	21	25	11	10	15	
		(132 \pm 8.7)			(17 \pm 2.3)			(22 \pm 1.0)			(24 \pm 2.6)			(12 \pm 2.6)			
	625 #	125	116	141	18	10	16	22	31	30	33	13	19	9	7	10	
		(127 \pm 12.7)			(15 \pm 4.2)			(28 \pm 4.9)			(22 \pm 10.3)			(9 \pm 1.5)			
	1250 #	134	125	127	17	18	7	21	16	23	27	29	24	9	11	6	
		(129 \pm 4.7)			(14 \pm 6.1)			(20 \pm 3.6)			(27 \pm 2.5)			(9 \pm 2.5)			
2500 #	129	120	124	11	9	12	21	17	13	19	22	25	7	10	8		
	(124 \pm 4.5)			(11 \pm 1.5)			(17 \pm 4.0)			(22 \pm 3.0)			(8 \pm 1.5)				
5000 #	145	147	141	13	13	12	18	21	21	18	12	21	12	15	13		
	(144 \pm 3.1)			(13 \pm 0.6)			(20 \pm 1.7)			(17 \pm 4.6)			(13 \pm 1.5)				
S9mix (+)	0	138	130	126	9	13	12	23	26	16	26	25	41	23	16	15	
		(131 \pm 6.1)			(11 \pm 2.1)			(22 \pm 5.1)			(31 \pm 9.0)			(18 \pm 4.4)			
	313	153	125	140	15	20	18	32	20	25	33	38	34	26	18	16	
		(139 \pm 14.0)			(18 \pm 2.5)			(26 \pm 6.0)			(35 \pm 2.6)			(20 \pm 5.3)			
	625	131	140	138	13	17	16	26	28	24	25	32	26	14	15	19	
		(136 \pm 4.7)			(15 \pm 2.1)			(26 \pm 2.0)			(28 \pm 3.8)			(16 \pm 2.6)			
	1250 #	129	156	161	18	12	16	30	23	12	32	33	40	17	17	15	
		(149 \pm 17.2)			(15 \pm 3.1)			(22 \pm 9.1)			(35 \pm 4.4)			(16 \pm 1.2)			
2500 #	122	138	160	9	12	13	19	18	20	37	32	33	16	22	22		
	(140 \pm 19.1)			(11 \pm 2.1)			(19 \pm 1.0)			(34 \pm 2.6)			(20 \pm 3.5)				
5000 #	156	158	164	14	25	15	21	29	18	29	39	30	16	15	15		
	(159 \pm 4.2)			(18 \pm 6.1)			(23 \pm 5.7)			(33 \pm 5.5)			(15 \pm 0.6)				
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			
	Number of colonies / plate	682	650	670	232	245	242	108	151	190	954	935	930	1103	1071	999	
		(667 \pm 16.2)			(240 \pm 6.8)			(150 \pm 41.0)			(940 \pm 12.7)			(1058 \pm 53.3)			
	Number of colonies / plate	1262	1111	1309	299	270	290	1510	1537	1546	455	457	566	300	295	294	
		(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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 99.0 %.