

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Tris(2-butoxyethyl) phosphate on Bacteria

要約

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537⁺ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²³ の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験は S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、15.6~500 μg /プレートの範囲(S9 mix 無添加試験の TA100 と TA1537は 7.81~250 μg /プレート、添加試験の TA98 および WP2 *uvrA* は 78.1~2500 μg /プレート) で実施した。

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。

以上の結果から、リン酸トリス(2-ブトキシエチル) 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。

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、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

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 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

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〕

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステル(CAS No. 78-51-3)は、分子量 398.54 の無色透明液体である。用いた被験物質は、大八化学工業(株)製造、ロット番号 K70702、純度 98.2% (不純物:不明)であり、大八化学工業(株)から供与された。被験物質は、使用時まで遮光、密封して室温で保管した。なお、試験終了後に大八化学工業(株)において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 97.2% であった。

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルは、ジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号:ESK4546、和光純薬工業(株))に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、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。

〔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))

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA は DMSO 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) バクトアガー (Difco) 0.6%

塩化ナトリウム 0.5%

(B)* L-ヒスチジン 0.5 mM

D-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、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物 0.2 g

クエン酸・1水和物 2 g

リン酸水素二カリウム 10 g

リン酸-アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクテアガー(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 mix

1 ml 中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 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を用いた。

〔試験方法〕

ブレインキューベーション法⁹⁾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, 37°C で 20 分間往復振とう培養したのち, トップアガー 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。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。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, 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。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依

存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルについて 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。その結果, S9 mix 無添加試験では, TA100 と TA1537 においては 150 μg/プレート以上で, TA1535 と TA98 においては 500 μg/プレート以上で, WP2 *uvrA* においては 5000 μg/プレートで抗菌性が認められた。また, S9 mix 添加試験では, TA100, TA1535 および TA1537 においては 500 μg/プレート以上で, TA98 と WP2 *uvrA* では 1500 μg/プレート以上で抗菌性が認められた。

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 500 μg/プレート (S9 mix 無添加試験の TA100 と TA1537 は 250 μg/プレート, WP2 *uvrA* は 5000 μg/プレート, S9 mix 添加試験の TA98 と WP2 *uvrA* は 2500 μg/プレート) とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験とともに, 上記の最高用量に基づいて公比 2 で 6 用量を設定して 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, いずれの検定菌においても, 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。

以上の結果に基づき, リン酸トリス(2-ブトキシエチル)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)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子
財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Kumiko Kawakami
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1-1. Mutagenicity of tris (2-butoxyethyl) phosphate in reverse mutation test (I) 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		TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	110 107 95 (104 \pm 7.9)	10 7 9 (9 \pm 1.5)		18 13 19 (17 \pm 3.2)	6 10 7 (8 \pm 2.1)	
	7.81	122 134 106 (121 \pm 14.0)	ND		ND	5 8 7 (7 \pm 1.5)	
	15.6	141 93 139 (124 \pm 27.2)	8 14 5 (9 \pm 4.6)		21 23 17 (20 \pm 3.1)	5 5 7 (6 \pm 1.2)	
	31.3	117 116 117 (117 \pm 0.6)	17 11 14 (14 \pm 3.0)		15 26 23 (21 \pm 5.7)	7 3 6 (5 \pm 2.1)	
	62.5	128 122 108 (119 \pm 10.3)	8 8 15 (10 \pm 4.0)		15 17 14 (15 \pm 1.5)	8 9 7 (8 \pm 1)	
	125	127 118 112 (119 \pm 7.5)	11 8 11 (10 \pm 1.7)		21 24 14 (20 \pm 5.1)	6 3 7 (5 \pm 2.1)	
	250	89* 73* 94* (85 \pm 11.0)	1* 6* 6* (4 \pm 2.9)		18* 17* 20* (18 \pm 1.5)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
	500		2* 2* 4* (3 \pm 1.2)		23* 13* 9* (15 \pm 7.2)		
S9 mix (+)	0	145 121 138 (135 \pm 12.3)	9 7 18 (11 \pm 5.9)			11 9 10 (10 \pm 1.0)	
	15.6	163 140 148 (150 \pm 11.7)	11 17 15 (14 \pm 3.1)			13 6 15 (11 \pm 4.7)	
	31.3	142 150 172 (155 \pm 15.5)	11 15 7 (11 \pm 4.0)			9 13 12 (11 \pm 2.1)	
	62.5	180 121 172 (158 \pm 32)	10 9 8 (9 \pm 1)			12 12 16 (13 \pm 2.3)	
	125	153 129 137 (140 \pm 12.2)	7 9 10 (9 \pm 1.5)			12 6 12 (10 \pm 3.5)	
	250	111 135 151 (132 \pm 20.1)	11 15 6 (11 \pm 4.5)			12 14 12 (13 \pm 1.2)	
	500	133* 150* 134* (139 \pm 9.5)	10* 5* 12* (9 \pm 3.6)			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
Positive control	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5		0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	775 794 860 (810 \pm 44.6)	378 396 365 (380 \pm 15.6)		724 638 737 (700 \pm 53.8)	725 1204 1329 (1086 \pm 318.8)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA			2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2			2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	632 740 739 (704 \pm 62.1)	301 300 326 (309 \pm 14.7)			315 338 356 (336 \pm 20.6)	

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

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 98.2 %.

ND:Not done

Table 1-2. Mutagenicity of tris (2-butoxyethyl) phosphate in reverse mutation test (I) 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		
				WP2 <i>uvrA</i>	TA98		
S9 mix (-)	0			15 20 18 (18 \pm 2.5)			
	156			24 19 27 (23 \pm 4.0)			
	313			16 24 23 (21 \pm 4.4)			
	625			18 22 21 (20 \pm 2.1)			
	1250			25 13 18 (19 \pm 6.0)			
	2500 c			20 18 25 (21 \pm 3.6)			
	5000 c			11 20 17 (16 \pm 4.6)			
S9 mix (+)	0			31 14 23 (23 \pm 8.5)	26 26 19 (24 \pm 4.0)		
	78.1			21 20 20 (20 \pm 0.6)	21 31 25 (26 \pm 5)		
	156			15 22 22 (20 \pm 4.0)	30 28 16 (25 \pm 7.6)		
	313			20 19 28 (22 \pm 4.9)	25 25 25 (25 \pm 0.0)		
	625			17 25 18 (20 \pm 4.4)	12 29 25 (22 \pm 8.9)		
	1250			18 17 20 (18 \pm 1.5)	20 15* 18* (18 \pm 2.5)		
	2500			21* 21* 19* (20 \pm 1.2)	18* 25* 13* (19 \pm 6.0)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			0.01			
	Number of colonies/plate			314 275 290 (293 \pm 19.7)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA	2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			10	0.5		
	Number of colonies/plate			688 780 749 (739 \pm 46.8)	282 318 334 (311 \pm 26.6)		

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA:2-Aminoanthracene

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. c:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 98.2 %.

Table 2-1. Mutagenicity of tris (2-butoxyethyl) phosphate in reverse mutation test (II) 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		TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	117 108 101 (109 \pm 8)	11 10 14 (12 \pm 2.1)		19 21 14 (18 \pm 3.6)	11 16 13 (13 \pm 2.5)	
	7.81	112 107 107 (109 \pm 2.9)	ND		ND	6 7 2 (5 \pm 2.6)	
	15.6	107 83 93 (94 \pm 12.1)	9 8 7 (8 \pm 1)		25 20 21 (22 \pm 2.6)	8 4 11 (8 \pm 3.5)	
	31.3	104 104 94 (101 \pm 5.8)	9 5 11 (8 \pm 3.1)		19 23 18 (20 \pm 2.6)	9 6 10 (8 \pm 2.1)	
	62.5	100 112 100 (104 \pm 6.9)	8 8 8 (8 \pm 0)		22 22 16 (20 \pm 3.5)	4 4 8 (5 \pm 2.3)	
	125	100 104 116 (107 \pm 8.3)	11 10 8 (10 \pm 1.5)		10 21 21 (17 \pm 6.4)	7 7 6* (7 \pm 0.6)	
	250	60* 73* 60* (64 \pm 7.5)	5* 5* 5* (5 \pm 0)		12* 15* 11 (13 \pm 2.1)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
	500		3* 2* 4* (3 \pm 1)		12* 9* 10* (10 \pm 1.5)		
S9 mix (+)	0	112 106 107 (108 \pm 3.2)	12 6 8 (9 \pm 3.1)			22 8 6 (12 \pm 8.7)	
	15.6	97 100 104 (100 \pm 3.5)	7 12 16 (12 \pm 4.5)			11 10 5 (9 \pm 3.2)	
	31.3	114 100 88 (101 \pm 13)	11 10 10 (10 \pm 0.6)			13 8 14 (12 \pm 3.2)	
	62.5	132 122 90 (115 \pm 21.9)	8 13 12 (11 \pm 2.6)			14 13 12 (13 \pm 1.0)	
	125	116 92 125 (111 \pm 17.1)	7 8 12 (9 \pm 2.6)			11 6 13 (10 \pm 3.6)	
	250	92 90 108 (97 \pm 9.9)	9 13 11 (11 \pm 2.0)			11 9 9 (10 \pm 1.2)	
	500	80* 80* 91* (84 \pm 6.4)	7* 7* 9* (8 \pm 1.2)			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5		0.1	80	
	Number of colonies/plate	563 575 567 (568 \pm 6.1)	380 384 351 (372 \pm 18)		531 522 545 (533 \pm 11.6)	1349 1188 1356 (1298 \pm 95.0)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA			2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2			2	
	Number of colonies/plate	512 607 650 (590 \pm 70.6)	274 271 345 (297 \pm 41.9)			227 292 311 (277 \pm 44)	

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

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 98.2 %.

ND: Not done

Table 2-2. Mutagenicity of tris(2-butoxyethyl) phosphate in reverse mutation test (II) 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		
				WP2 <i>uvrA</i>	TA98		
S9 mix (-)	0			28 19 24 (24 \pm 4.5)			
	156			28 22 24 (25 \pm 3.1)			
	313			22 22 19 (21 \pm 1.7)			
	625			17 22 30 (23 \pm 6.6)			
	1250			20 17 15 (17 \pm 2.5)			
	2500 c			16 24 20 (20 \pm 4.0)			
	5000 c			16 20 20 (19 \pm 2.3)			
S9 mix (+)	0			25 23 40 (29 \pm 9.3)	30 31 22 (28 \pm 4.9)		
	78.1			24 24 45 (31 \pm 12.1)	25 16 25 (22 \pm 5.2)		
	156			31 28 24 (28 \pm 3.5)	28 18 20 (22 \pm 5.3)		
	313			24 34 27 (28 \pm 5.1)	29 28 31 (29 \pm 1.5)		
	625			23 23 36 (27 \pm 7.5)	23 18 26 (22 \pm 4.0)		
	1250			24 30 24 (26 \pm 3.5)	24* 17* 19* (20 \pm 3.6)		
	2500			19* 22* 20* (20 \pm 1.5)	17* 12* 16* (15 \pm 2.6)		
Positive control	Chemical			AF2			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			0.01			
S9 mix(-)	Number of colonies/plate			303 312 331 (315 \pm 14.3)			
Positive control	Chemical			2AA	2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			10	0.5		
S9 mix(+)	Number of colonies/plate			485 499 470 (485 \pm 14.5)	308 348 287 (314 \pm 31.0)		

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA:2-Aminoanthracene

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. c:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 98.2 %.

リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of Tris(2-butoxyethyl) phosphate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下では0.090 mg/ml、短時間処理(6時間)のS9 mix存在下では0.40 mg/mlであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、それぞれ公比2で5濃度設定した。連続処理では、S9 mix非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下では0.090 mg/ml、48時間連続処理および短時間処理のS9 mix存在下ではそれぞれ0.045 mg/mlおよび0.20 mg/mlの濃度であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した高濃度群(0.090 mg/ml)では、細胞毒性により倍数性細胞の観察細胞が規定に満たなかったが、24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS:Cansera International)

を10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたデイスユ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル(略号:TBEP, CAS No.:78-51-3, ロット番号:K70702, 大八化学工業(株))は、無色透明液体で、水に対しては0.11%(25°C)、DMSOでは1 l/l、アセトンおよびエタノールで1 l/lで溶解し、融点-70°C以下、沸点222°C/5.3 hpaで、分子式C₁₈H₃₉O₇P、分子量398.54、純度98.2 wt%(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体は、通常の取り扱い条件においては安定であるが、水、熱、アルカリ中では分解する。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5%(v/v)になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下における50%の増殖抑制濃度は、0.090 mg/mlであった。また、短時間処理のS9 mix存在下では、0.40 mg/mlであった(Fig. 1, 2)。

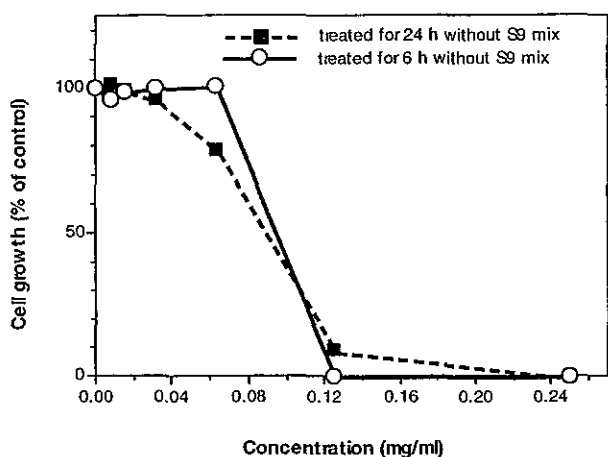


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tris(2-butoxyethyl) phosphate

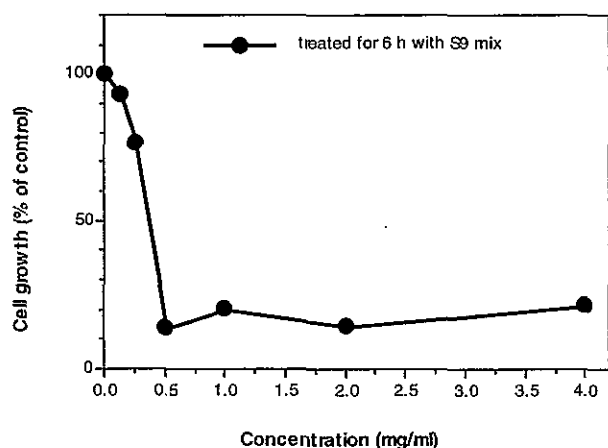


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tris(2-butoxyethyl) phosphate

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50% 増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(24時間および48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下:0.011, 0.023, 0.045, 0.090, 0.18 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下:0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/ml). 陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚ディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約

0.1 μg/ml になるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20% 以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2), 24時間連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下では0.090 mg/ml, 48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、それぞれ0.045 mg/ml および0.20 mg/ml が、染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)研究会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法²⁾(多重性を考慮して familywise の有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコクラン・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p < 0.05$)を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルを加えて24時間連続処理した高濃度群(0.090 mg/ml)では、細胞毒性により倍数性細胞の観察細胞が規定に満たなかったが、24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルを加えて S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性

細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp.218-223.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂

試験担当者: 山影康次, 佐々木澄志,

中川ゆづき, 若栗 忍, 日下部博一,

古畑紀久子, 渡辺美香, 出石由紀,

橋本恵子

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)

Kohji Yamakage, Sasaki Kiyoshi,

Yuzuki Nakagawa, Shinobu Wakuri,

Hirokazu Kusakabe, Kikuko Furuhata

Mika Watanabe, Yuki Izushi,

Keiko Hashimoto

Hatano Research Institute, Food and Drug

Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) continuously treated with tris(2- butoxyethyl) phosphate(TBEP)* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)		
												with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)		Trend test ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)			SA	NA
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			100.0
TBEP	0.023	24	200	1	1	0	0	0	10	12	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13			85.5
TBEP	0.045	24	200	0	1	0	2	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	NT	NT	79.0
TBEP	0.090	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.40 ⁷⁾			45.0
TBEP	0.18 **	24	-											-			0.0
MC	0.00005	24	200	3	61	96	5	1	10	176	0	93 (46.5)	91 (45.5)	0.00			-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63			100.0
TBEP	0.011	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			107.0
TBEP	0.023	48	200	0	1	0	3	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	NT	NT	101.5
TBEP	0.045	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			86.0
TBEP	0.090 **	48	-											-			18.5
TBEP	0.18 **	48	-											-			0.0
MC	0.00005	48	200	1	47	124	3	3	0	178	9	95 (47.5)	95 (47.5)	0.50			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, NT:not tested.

1)Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done(p<0.05)when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control(p<0.05)by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7)Seven hundred and fifty-seven cells were analysed. *:Purity was 98.2 %. **:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) treated with tris(2- butoxyethyl) phosphate(TBEP)* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)		
													with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)		Trend test ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)			SA	NA
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			-	
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0	
TBEP	0.023	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			99.5	
TBEP	0.045	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	NT	NT	105.0	
TBEP	0.090	-	6-(18)	200	0	1	0	2	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25			80.5	
TBEP	1.8 **	-	6-(18)	-										-			0.0	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	2	0	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.50			-	
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			100.0	
TBEP	0.050	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	2	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			99.0	
TBEP	0.10	+	6-(18)	200	1	1	0	4	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.38	NT	NT	91.5	
TBEP	0.20	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			87.0	
TBEP	0.40 **	+	6-(18)	-										-			7.5	
TBEP	0.80 **	+	6-(18)	-										-			16.5	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	0	102	226	7	1	50	386	0	134 (67.0)	134 (67.0)	0.00			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2)More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done(p<0.05)when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control(p<0.05)by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. *:Purity was 98.2 %. **:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.