

# リン酸トリス(p-クメニル)のラットを用いる単回経口投与毒性試験

## Single Dose Oral Toxicity Test of Tris(p-cumenyl) phosphate in Rats

### 要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するために、リン酸トリス(p-クメニル)を雌雄ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は2000 mg/kgを高用量とし、以下1000 および 500 mg/kgとした。対照として、媒体のコーンオイル投与群を設けた。

投与後14日間の観察期間中に死亡発現はなかった。一般状態では、500 mg/kg以上の群の雄および1000 mg/kg以上の群の雌で投与後2~6時間以下痢がみられた。LD<sub>50</sub>値は、雌雄ともに2000 mg/kg以上であった。1000 および 2000 mg/kg群では雌雄とも投与後1日には対照群に比して有意な体重増加抑制が認められたが、剖検日には雌雄の各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。剖検では、いずれの例とも著変は認められなかった。

以上により、リン酸トリス(p-クメニル)のLD<sub>50</sub>値は雌雄ラットともに2000 mg/kg以上であり、1000 mg/kg以上の投与により投与後1日には体重増加抑制が認められるが、その後の回復は良好であることが知られた。

### 方法

#### 1. 被験物質、媒体および投与検体液

被験物質のリン酸トリス(p-クメニル)は、分子式： $C_{27}H_{33}O_4P$ 、分子量：452.57、融点：27~28℃、沸点：255℃/1 mmHgで、水にきわめて溶けにくい黄色液体である【製造元：味の素(株)、Lot No. 920909、純度99.7%】。投与終了後に製造元に保管されていた被験物質を分析した結果、純度は規格値内であり、使用期間中の安定性が確認された。媒体として、コーンオイルを用いた。

投与検体液は、被験物質をコーンオイルに用時溶解して調製した。投与日に調製した各投与検体液中の被験物質濃度を測定した結果、被験物質濃度は適正範囲内の値を示した。

#### 2. 使用動物および飼育条件

4週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット〔(SPF), Crj: CD (SD)〕を日本チャールス・リバー(株)から購入し、5日間の検疫期間およびその後3日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められない雌雄各20匹の動物を群分けして試験に用いた。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った。

動物は、室温20~24℃、湿度40~70%、明暗各12時間、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中および絶食期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。

飼料は固型飼料〔CRF-1, オリエンタル酵母工業(株)〕を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻から投与までの約19時間と、投与後約6時間まで絶食させ、その後に飼料を与えた。飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約6時間までは絶水させ、その後に飲料水を与えた。飼料および飲料水の検査の結果、いずれも試験成績は当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

#### 3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

リン酸トリス(p-クメニル)は、経口的に人に摂取される可能性が考えられたため、投与経路として胃ゾンデを用いた強制経口投与を選択した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として10 ml/kgで算出した。投与回数は1回とした。投与時の週齢は約5週齢、体重範囲は雄が114~121 g、雌が98~105 gであった。

群構成は以下の如くとした。一群の動物数は、雌雄各5匹とした。

群	試験群	投与量	雄 (動物番号)	雌 (動物番号)
第1群	対照 (Corn oil)	0 mg/kg	5 (001~005)	5 (051~055)
第2群	tris(p-cumenyl) phosphate	500 mg/kg	5 (101~105)	5 (151~155)
第3群	tris(p-cumenyl) phosphate	1000 mg/kg	5 (201~205)	5 (251~255)
第4群	tris(p-cumenyl) phosphate	2000 mg/kg	5 (301~305)	5 (351~355)

投与量設定の理由：雄ラットを用いた予備試験の結果、OECD毒性試験ガイドラインで限界用量とされている最高用量の2000 mg/kgでも死亡発現はなく、一般状態では20 mg/kg以上の群で下痢が認められた以外には、異常症状は観察されなかった。また、体重推移に異常はみられず、剖検でも著変はみられなかった。したがって、当試験では2000 mg/kgを高用量とし、以下公比2で1000および500 mg/kg群を設けた。対照として、被験物質と同一容量の媒体（コーンオイル）を投与する群を設けた。

#### 4. 観察および検査項目

観察期間は、投与後14日間とした。

一般状態および死亡の有無を、投与日は投与前および投与後6時間まで、投与翌日からの観察期間中は1日1回観察した。

体重は、投与日（投与直前）および投与後1, 3, 7, 10ならびに14日の午前中に測定した。

各動物とも、観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

#### 5. 統計学的方法

LD<sub>50</sub>値は、観察期間中の死亡率から概略値を推定した。

体重は、各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は対照群と被験物質投与各群の間で多重比較検定を用いて行い、危険率5%未満を有意とした。すなわち、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較をDunnnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は順位を利用した一元配置法による分析（Kruskal-Wallisの検定）を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用したDunnnett法を用いて行った。

### 結果および考察

#### 1. 一般状態および死亡状況

対照群では、雌雄とも一般状態の観察で異常症状はみられなかった。

一方、被験物質投与群では500 mg/kg以上の群の雄および1000 mg/kg以上の群の雌で投与後2~6時間には1~4例で下痢がみられた。下痢の発現頻度には、必ずしも投与用量に関連した変動は認められなかった。なお、投与後1日以降には雌雄のいずれの投与群とも異常症状は観察されなかった。

雌雄とも、高用量の2000 mg/kg群でも死亡発現はなかった。リン酸トリス(p-クメニル)のLD<sub>50</sub>値は、雌雄とも2000 mg/kg以上であった。

#### 2. 体重推移

投与後1日には、1000 mg/kg以上の群の雌雄で対照群に比して有意な増加抑制が認められた。個別的には、1000および2000 mg/kg群の雌で投与前の体重に比してわずかの減少を示す例もあった。500 mg/kg群では、雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

投与後3日以降は、雌雄の各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 3. 剖検所見

雌雄各群とも、剖検で著変はみられなかった。

以上のように、リン酸トリス(p-クメニル)はOECD毒性試験ガイドラインで限界用量とされている2000 mg/kgの投与によって雌雄ともに死亡発現はなく、LD<sub>50</sub>値は2000 mg/kg以上であった。投与当日には下痢がみられたが、翌日には消失していた。また、体重は1000 mg/kg以上で雌雄とも投与後1日には増加抑制が認められたが、剖検時には対照群とほぼ同程度であり、回復性は良好と考えられた。

#### 連絡先

試験責任者：和田 浩

試験担当者：藤村高志、内藤一嘉、古橋忠和、山本明義

㈱日本バイオリサーチセンター羽島研究所

〒501-62 岐阜県羽島市福寿町間島6-104

Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

#### Correspondence

Authors : Hiroshi Wada (Study director)

Takashi Fujimura, Kazuyoshi Naitou,

Tadakazu Furuhashi and

Akiyoshi Yamamoto

Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory

6-104 Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-62,

Japan

Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

# リン酸トリス(p-クメニル)のラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Tris(p-cumenyl) phosphate in Rats

### 要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するために、リン酸トリス(p-クメニル)を雌雄ラットに1日1回、28日間連続して経口投与し、その毒性について検討した。また、一部の動物については14日間の回復期間を設けた。投与段階は8, 40, 200および1000 mg/kgとし、対照として媒体のコーンオイル投与群を設けた。

一般状態の観察では、40 mg/kg以上の群の雄および200 mg/kg以上の群の雌で、投与期間の中期以降に少数例～過半数例で投与後に一過性の流涎がみられた。

投与期間中の体重は、各投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

摂餌量測定では、1000 mg/kg群の雄および200 mg/kg以上の群の雌で、投与1および2週には有意な低値が認められた。

摂水量は、1000 mg/kg群の雌で、投与4週と回復1週に有意な高値が認められた。

尿検査では、1000 mg/kg群の雌で、投与期間終了前には尿量が有意な高値、尿比重が有意な低値を示した。当変動は、回復期間終了前には消失した。

血液学的検査では、200 mg/kg以上の群の雌雄ではヘモグロビン量が、200 mg/kg以上の群の雌と1000 mg/kg群の雄ではヘマトクリット値が、200 mg/kg群の雌では赤血球数が、1000 mg/kg群の雌では平均赤血球容積が、いずれも有意な低値を示した。これらの変動は、回復期間終了時には消失した。

血液化学的検査では、1000 mg/kg群の雌で、総コレステロール量が有意な高値を示したが、回復期間終了時には消失した。

剖検では、被験物質の投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

器官重量測定では、1000 mg/kg群の雌で、肝臓絶対重量および相対重量がともに有意な高値を示した。また、200 mg/kg以上の群の雄と200 mg/kg群の雌で肝臓相対重量が、1000 mg/kg群の雌で腎臓相対重量が有意な高値を示した。これらの変動は、回復期間終了時には消失した。

病理組織学的検査では、被験物質の投与に起因すると思われる組織変化はみられなかった。

以上により、当試験条件下におけるリン酸トリス(p-クメニル)の毒性学的無影響量は、雄では8 mg/kg、雌では40 mg/kgと推察された。

### 方法

#### 1. 被験物質、媒体および投与検体液

被験物質のリン酸トリス(p-クメニル)は、分子式： $C_{27}H_{33}O_4P$ 、分子量：452.57、融点：27～28℃、沸点：255℃/1mmHgで、水にきわめて溶けにくい黄色の液体である【製造元：味の素(株)、Lot No. 920909、純度99.7%】。投与期間終了後に製造元に保管されていた被験物質を分析した結果、純度は規格値内であり、試験期間中の安定性が確認された。媒体として、コーンオイルを用いた。

投与検体液は、被験物質をコーンオイルに溶解して調製した。投与開始前および投与終了前の2回、各投与検体液中の被験物質濃度を測定した。その結果、いずれの投与検体液も適正範囲内の値を示した。コーンオイル中の1.6および200 mg/ml濃度の被験物質は、冷蔵・遮光・気密条件下で調製後7日間までの安定性が確認された。そこで、各投与検体液の調製は1週間に1回以上行い、1日分ずつ分割して冷蔵・遮光・気密条件下で保存し、用時室温に戻して投与に用いた。

#### 2. 試験動物および飼育条件

Sprague-Dawley系の4週齢の雄ラットおよび3週齢の雌ラット〔(SPF)、Crj:CD(SD)〕を、日本チャールス・リバー(株)から購入した。5日間の検疫期間およびその後雄は6日間、雌は13日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められなかった約6週齢の雌雄各60匹の動物を群分けして試験に用いた。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように、投与開始の前日に行った。

動物は、室温20～24℃、湿度40～70%、明暗各12時間、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。

飼料は固型飼料〔CRF-1、オリエンタル酵母工業(株)〕を給餌器に入れ、自由に摂取させた。飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飼料および飲料水の検査の結果、いずれも試験成績は当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

## 3. 投与経路, 投与方法, 群構成および投与量

リン酸トリス(p-クメンル)は継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため, 投与経路として胃ゾンデを用いた強制経口投与を選択した。投与液量は投与日に最も近い測定日の体重を基準とし, 5 ml/kgで算出した。投与開始時の体重範囲は, 雄が140~174g, 雌が131~155gであった。

投与期間は, 1日1回の28日間反復投与とした。また, 28日間の投与後に対照群および最高用量群の一部の

動物について14日間の回復期間を設けた。なお, 初回投与日を投与1日とし, 最終投与日の翌日を回復1日とした。

群構成は, 以下の如くとした。すなわち, 被験物質投与群として4群を設定し, その他に対照群を設けた。一群の動物数は, 雌雄それぞれ対照群および最高用量群は投与期間終了時剖検例10匹と回復期間終了時剖検例5匹の合計15匹とした。また, 被験物質の低用量, 中用量および高用量群は, 雌雄それぞれ投与期間終了時剖検例10匹とした。

群	試験群	投与量	雄 (動物番号)	雌 (動物番号)
第1群	対照 (Corn oil)	0 mg/kg	10*+5# (001~015)	10*+5# (051~065)
第2群	tris(p-cumenyl) phosphate	8 mg/kg	10* (101~110)	10* (151~160)
第3群	tris(p-cumenyl) phosphate	40 mg/kg	10* (201~210)	10* (251~260)
第4群	tris(p-cumenyl) phosphate	200 mg/kg	10* (301~310)	10* (351~360)
第5群	tris(p-cumenyl) phosphate	1000 mg/kg	10*+5# (401~415)	10*+5# (451~465)

\*:投与期間終了時剖検例数, #:回復期間終了時剖検例数

投与量設定の理由: 雄ラットを用いた2週間経口投与による予備試験 (投与段階: 0, 62.5, 125, 250, 500 および 1000 mg/kg) の結果, 最高用量の1000 mg/kg群で少数例に軟便がみられた以外には一般状態の異常は観察されなかった。また, 体重推移および剖検でも異常はみられなかった。したがって, 当試験の投与量は, 化審法のスクリーニング毒性試験ガイドラインで限界用量とされている1000 mg/kgを最高用量とし, 以下公比5により200, 40 および 8 mg/kg群を設定した。対照として, 被験物質と同一容量の媒体 (コーンオイル) を投与する群を設けた。

## 4. 観察および検査項目

- 1) 一般状態および死亡の有無: 投与期間中は投与前・後の2回, ならびに回復期間中は毎日1回観察した。
- 2) 体重: 投与期間中および回復期間中とも1週間に2回, ならびに剖検前日と剖検日に測定した。
- 3) 摂餌量: 投与期間中および回復期間中ともに連続2日間量を測定して1日量に換算し, 1週間に1回測定した。なお, 剖検前日の夕刻からは絶食とした。
- 4) 摂水量: 摂餌量測定と同様にして摂水量を測定した。ただし, 絶食期間中は給水を行った。
- 5) 尿検査: 投与期間終了前には投与期間終了時の剖検用動物について, また回復期間終了前には回復期間終了時の剖検用動物について実施した。すなわち, 採尿ケージを用いて絶食・給水下で3時間で採取した尿 (3時間尿) と引き続いて給餌・給水下で21時間で採取した尿 (21時間尿, 合計24時間尿) について, 以下の検査を実施した。
  - 3時間尿: 色調は, 外観判定とした。pH, 潜血, 蛋白, 糖, ケトン体, ウロビリノーゲンおよびビリルビンは, エームスクリニテック用検査紙 [マイルス・三共 (株)] に尿を滴下後に, エームス尿分析器 (クリニテック 200, エームス) を用いて検査した。尿沈渣は, 沈渣を尿沈渣染色液で染色後に顕微鏡下で観察した。
  - 21時間尿: 比重を, 屈折率により屈折型比重計 [ユリベット, (株) ニコン] を用いて測定した。
  - 24時間尿: 尿量を重量により測定した。

6) 血液学的検査: 最終投与の翌日および回復期間終了後に, ベントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈からカニューレーションにより血液を採取し, 以下の検査を行った。

プロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は, 3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について, 散乱光検出方式により血液凝固分析装置 [コアグマスターII, 三共 (株)] を用いて測定した。

赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 血小板数および白血球数 (WBC) は, EDTA-2K コーティングしたサンプルカップに採取した血液について, 多項目自動血球計数装置 [Sysmex E-2000, 東亜医用電子 (株)] を用いて測定した。また, 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球色素量 (MCH) および平均赤血球色素濃度 (MCHC) を算出した。

網状赤血球数は, EDTA-2K 処理した血球を Brecher 法により超生体染色してスライドグラスに塗抹後, Giemsa 染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を数えた。

白血球百分率は, EDTA-2K 処理した血液をスライドグラスに塗抹し, May-Giemsa 染色した標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

7) 血液化学的検査: 血液学的検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液から分離して得た血清について, 以下の検査を行った。

GOT および GPT は Henry 変法, ALP は p-NPP 基質法,  $\gamma$ -GTP は  $\gamma$ -G-P-NA 基質法, 総蛋白 (TP) は Biuret 法, 総ビリルビン (T-Bil) は Azobilirubin 法, 尿素窒素 (BUN) は Urease-GIDH 法, クレアチニン は Jaffe 法, ブドウ糖は Glucose dehydrogenase 法, 総コレステロール (T-Cho) は COD-DAOS 法, トリグリセライド (TG) は GPO-DAOS 法, Ca は o-CPC 法, 無機リン (IP) は Molybdenum blue 法により, いずれも自動分析装置 [AU 500, オリンパス光学工業 (株)] を用いて測定した。

Na および K はイオン選択電極法により, Cl は電量測定法により, いずれも全自動電解質分析装置 [EA04, (株) A & T] を用いて測定した。

蛋白分画は、自動電気泳動装置 [AES 600, オリジナル光学工業 (株)] を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値から、A/G比は蛋白分画値から算出した。

8) 剖検：上記のように採血した動物について、さらに放血致死させた後に、器官・組織の肉眼的観察を行った。

9) 器官重量の測定：剖検時に以下の器官を摘出し、その重量を測定した。なお、対器官は一括秤量した。さらに、剖検前に測定した体重を基準として、器官重量の体重比(相対重量)を算出した。

脳(大脳、小脳、延髄)、肝臓、腎臓、副腎、精巣または卵巣。

10) 病理組織学的検査：以下の器官・組織を摘出して10%中性緩衝ホルマリン液(ただし、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリン液)で固定し、全例について常法に従ってパラフィン包埋標本作製した。

心臓、肺、肝臓、胃、脾臓、腎臓、膀胱、精巣、卵巣、下垂体、副腎、甲状腺(上皮小体を含む)、脳(大脳、小脳、延髄)、眼球、骨髄(大腿骨)。

投与期間終了時剖検例の対照群および最高用量(1000 mg/kg)群の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および骨髄についてH-E染色組織標本作製し、病理組織学的検査を行った。また、剖検で異常がみられた1000 mg/kg群の雌の胃および対照群の1例の胃についても病理組織標本作製し、観察した。

## 5. 統計学的方法

測定値の統計学的方法は下記のように多重比較検定を行い、有意差検定は対照群とリン酸トリス(p-クメニル)の各投与群との間で行った。いずれの検定の場合も、危険率5%未満を有意とし、5%未満( $p < 0.05$ )と1%未満( $p < 0.01$ )とに分けて表示した。

体重、摂餌量、摂水量、尿量、尿比重、血液学的検査成績、血液化学的検査成績、器官重量および相対重量は、各群で平均値および標準偏差を算出した。多重比較検定では、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散ならば一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較はDunnett法(例数が等しい場合)またはJaffé法(例数が等しくない場合)により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用したDunnett法(例数が等しい場合)またはJaffé法(例数が等しくない場合)を用いて行った。

## 結果

### 1. 一般状態

対照群および8 mg/kg群の雌雄ならびに40 mg/kg群の雌では、投与期間を通じて異常症状は観察されなかった。一方、40 mg/kg群の雄および200 mg/kg以上の群の雌雄では、投与11~12日から最終投与日まで少数例~過半数例で流涎がみられた。当症状は投与終了直後から発現して約20分間みられたが、その後は消失した。また、同一例で繰り返して発現する傾向がうかがえた。その他には、異常症状は観察されなかった。

回復期間中には、対照群および1000 mg/kg群の雌雄とも異常症状は観察されなかった。

### 2. 体重 (Fig.1)

投与期間中は、各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示し、有意差は認められなかった。

回復期間中は、1000 mg/kg群の雄の体重が対照群に比して低値であり、回復11日には有意差が認められた。

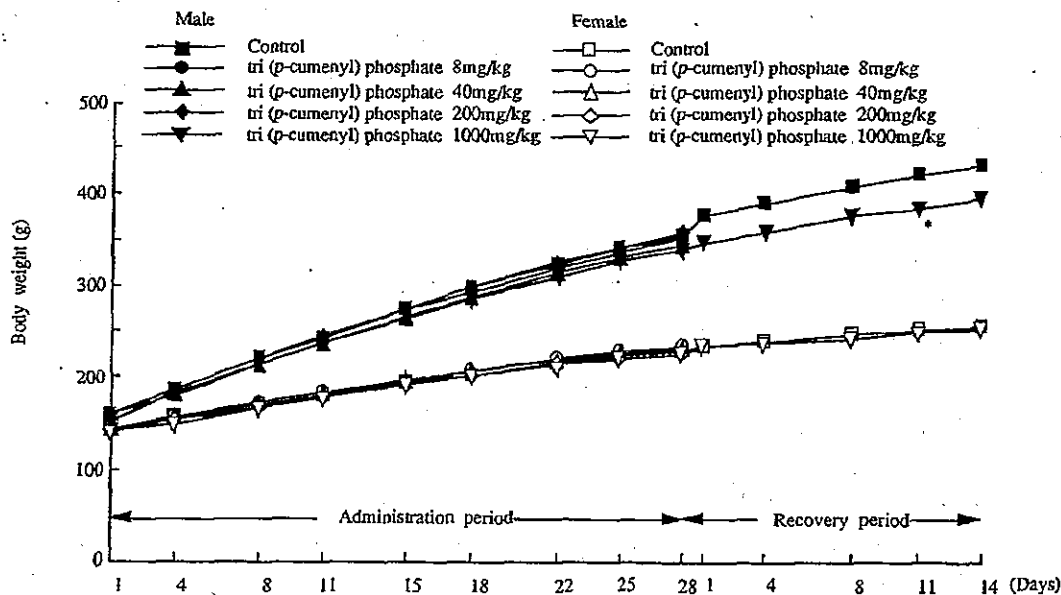


Fig.1 Body weight changes of male and female rats treated orally with tris(p-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test  
Significantly different from control (\*:  $p < 0.01$ ).

3. 摂餌量 (Fig.2)

投与期間中は、200 mg/kg群の雌および1000 mg/kg群の雌雄では投与1あるいは2週は対照群に比して低値であり、投与3日には200 mg/kg群の雌および1000 mg/kg群

の雌雄で、投与10日には1000 mg/kg群の雌で有意差が認められた。200 mg/kg以下の投与群の雄および40 mg/kg以下の投与群の雌では、対照群とほぼ同程度であった。

回復期間中は、1000 mg/kg群の雌雄とも対照群とほぼ同程度であった。

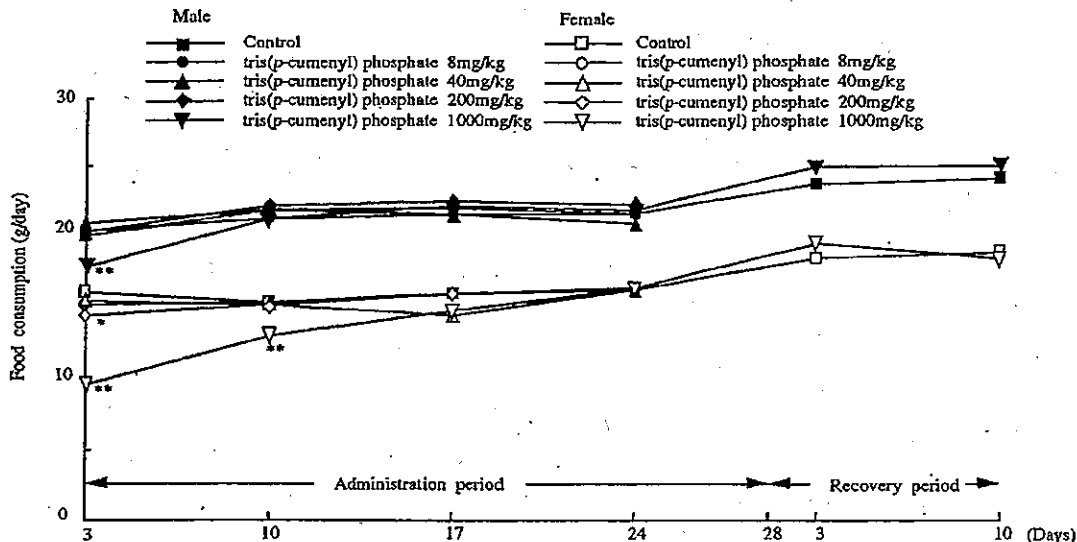


Fig.2 Food consumption of male and female rats treated orally with tris(p-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test  
Significantly different from control (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01)

4. 摂水量 (Fig.3)

投与期間中は、1000 mg/kg群の雌では投与2週以降は対照群に比して高値であり、投与24日には有意差が認め

られた。200 mg/kg以下の投与群の雌および各投与群の雄では、対照群とほぼ同程度であった。

回復期間中は、1000mg/kg群の雌で対照群に比してやや高値であり、回復3日には有意差が認められた。

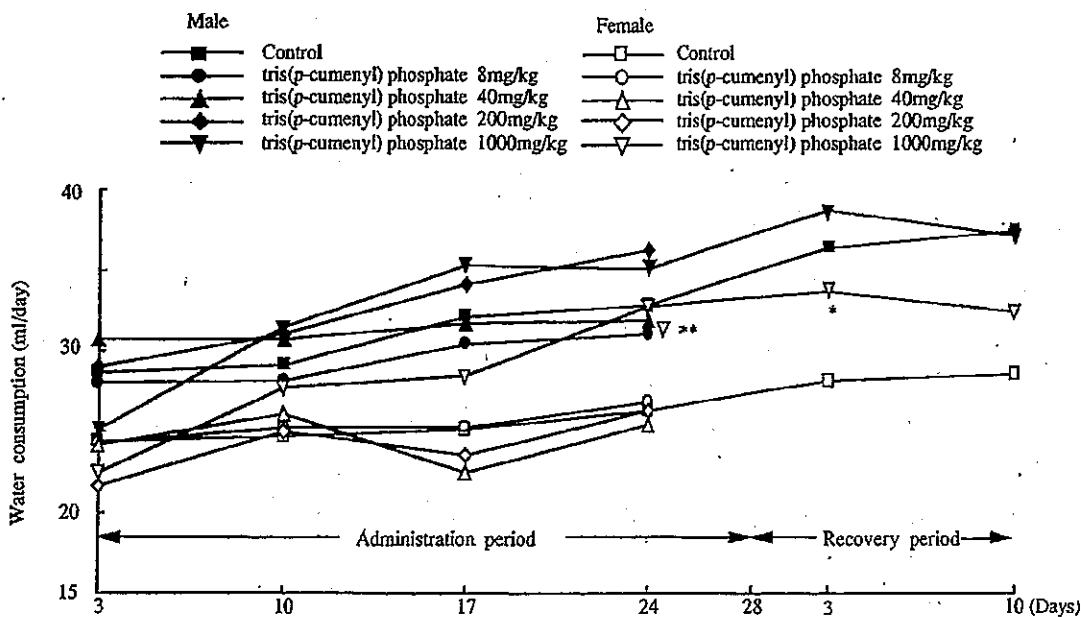


Fig.3 Water consumption of male and female rats treated orally with tris(p-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test  
Significantly different from control (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01)

## 5. 尿検査

## 1) 投与期間終了前

1000 mg/kg群の雌では対照群に比して尿量は高値、尿比重は低値であり、いずれも有意差が認められた。200 mg/kg以上の群の雄でも同様の傾向がうかがえたが、有意差は認められなかった。

色調、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンおよび沈渣は、各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様であった。

## 2) 回復期間終了前

1000 mg/kg群の雌雄の尿量および尿比重は、対照群とほぼ同程度であった。

色調、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンおよび沈渣は、1000 mg/kg群の雌雄とも対照群とほぼ同様であった。

## 6. 血液学的検査 (Table 1, 2)

## 1) 投与期間終了時

対照群に比して、各投与群の雌雄で赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値が低値傾向であり、

Table 1 Hematology of male rats treated orally with tris (p-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test

Test period Group	Termination of administration period					Termination of recovery period	
	Control	tris (p-cumenyl) phosphate				Control	tris (p-cumenyl) phosphate
		0	8	40	200		
Dose(mg/kg)	0	8	40	200	1000	0	1000
Number of males	10	10	10	10	10	5	5
RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	800.7±35.9	778.5±38.6	776.7±17.5	766.0±31.0	772.2±36.9	869.4±29.20	850.4±52.3
Hemoglobin (g/dl)	15.45±0.68	15.02±0.67	15.13±0.56	14.70±0.66*	14.66±0.53*	15.90±0.37	15.74±0.93
Hematocrit (%)	46.07±2.23	44.90±1.66	45.02±1.250	44.16±1.97	43.75±1.36*	46.82±0.46	46.22±2.06
MCV (μm <sup>3</sup> )	57.54±1.32	57.72±1.82	57.99±1.71	57.64±1.21	56.72±2.05	53.88±1.54	54.40±1.26
MCH (pg)	19.29±0.56	19.30±0.65	19.48±0.74	19.18±0.43	19.01±0.67	18.30±0.19	18.50±0.27
MCHC (g/dl)	33.56±0.70	33.46±0.59	33.61±0.71	33.27±0.36	33.52±0.59	33.96±0.63	34.04±0.61
Platelet (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	113.72±8.22	106.64±12.15	113.22±11.38	110.65±14.58	110.67±11.97	109.52±4.83	104.66±7.79
Reticulocyte (%)	30.9±5.4	28.9±4.8	27.9±3.7	28.7±4.3	29.7±2.5	26.4±3.8	25.0±2.5
PT (sec.)	15.30±1.88	14.54±1.57	13.80±0.73	15.34±2.130	13.87±2.18	12.66±0.36	17.80±6.23**
APTT (sec.)	28.77±2.33	27.60±2.46	27.58±1.79	29.55±2.16	26.30±3.25	22.58±1.09	26.80±2.21**
WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	48.6±14.1	50.0±10.1	47.9±11.70	51.0±20.1	56.7±13.2	68.6±14.00	64.2±11.6
Differential leukocyte (%)							
Lymphocyte	93.2±3.6	95.8±2.3	93.9±3.1	95.0±2.9	95.3±2.8	96.0±1.0	94.8±2.8
Neutrophil	6.0±3.4	3.5±2.5	5.4±2.5	4.7±3.0	4.2±2.5	3.6±0.5	4.4±3.0
Eosinophil	0.3±.5	0.5±0.7	0.4±0.8	0.2±0.4	0.2±0.4	0.2±0.4	0.4±0.5
Basophil	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Monocyte	0.5±0.5	0.2±0.4	0.3±0.5	0.1±0.3	0.3±0.5	0.2±0.4	0.4±0.5

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control (\*: p<0.05)

Table 2 Hematology of female rats treated orally with tris(p-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test

Test period Group	Termination of administration period					Termination of recovery period	
	Control	tris (p-cumenyl) phosphate				Control	tris (p-cumenyl) phosphate
		0	8	40	200		
Dose(mg/kg)	0	8	40	200	1000	0	1000
Number of females	10	10	10	10	10	5	5
RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	781.8±40.6	766.3±34.1	755.9±35.9	730.1±32.7**	756.1±27.4	788.4±32.5	788.0±39.3
Hemoglobin (g/dl)	14.83±0.57	14.82±0.53	14.41±0.60	14.08±0.57*	14.11±0.48*	15.14±0.30	14.80±0.48
Hematocrit (%)	44.22±1.56	43.55±1.80	42.61±1.74	41.49±1.49**	41.44±1.36**	44.52±0.60	43.10±1.88
MCV (μm <sup>3</sup> )	56.62±1.41	56.86±1.36	56.40±1.40	56.87±1.43	54.81±0.99*	56.54±1.94	54.78±2.65
MCH (pg)	18.98±0.40	19.35±0.47	19.07±0.66	19.30±0.580	18.67±0.42	19.24±0.48	18.80±0.90
MCHC (g/dl)	33.55±0.45	34.04±0.36	33.83±0.53	33.93±0.53	34.04±0.37	34.02±0.47	34.34±0.61
Platelet (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	106.25±11.22	116.97±14.87	111.05±12.64	113.24±12.58	123.11±19.58	113.22±6.430	123.52±5.10*
Reticulocyte (%)	22.7±4.2	21.6±2.8	22.5±3.6	21.4±3.7	20.2±2.1	25.4±4.6	24.6±3.4
PT (sec.)	12.37±0.33	12.60±0.25	12.27±0.24	12.34±0.34	12.04±0.39	12.80±0.37	13.14±0.23
APTT (sec.)	21.80±1.07	21.91±1.04	22.20±1.05	22.26±0.71	22.92±1.50	20.02±1.12	19.94±1.18
WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	40.8±11.2	43.1±15.5	37.5±20.2	43.6±19.1	45.8±10.9	52.8±13.8	64.0±8.9
Differential leukocyte (%)							
Lymphocyte	94.7±2.8	94.1±2.6	94.0±2.4	93.8±3.2	95.0±2.3	95.2±2.6	96.2±1.9
Neutrophil	4.9±2.5	5.3±3.0	5.3±2.8	5.7±2.8	4.4±2.3	4.2±2.6	3.4±1.8
Eosinophil	0.2±0.4	0.4±0.5	0.2±0.4	0.2±0.4	0.4±0.5	0.4±0.5	0.2±0.4
Basophil	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Monocyte	0.2±0.4	0.2±0.4	0.5±0.7	0.3±0.5	0.2±0.4	0.2±0.4	0.2±0.4

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control(\*:p<0.05,\*\*:p<0.01)

28日間反復投与毒性試験

200 mg/kg群の雌雄のヘモグロビン量, 雌の赤血球数およびヘマトクリット値, ならびに1000 mg/kg群の雌雄のヘモグロビン量およびヘマトクリット値に有意差が認められた。また, 1000 mg/kg群の雌では平均赤血球容積が有意な低値を示した。その他の検査項目には, 対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復期間終了前

投与期間終了時に認められたヘモグロビン量およびヘマトクリット値の有意差は消失した。新たに, 1000 mg/kg群の雄でプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間が有意な延長を, 雌で血小板数が有意な高値を示した。

7. 血液化学的検査 (Table 3, 4)

1) 投与期間終了時

対照群に比して, 1000 mg/kg群の雄で  $\alpha_3$ -グロブリン比が, 雌で総コレステロール値がいずれも有意な高値を示した。その他の検査項目には, 対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復期間終了時

投与期間終了時に認められた  $\alpha_3$ -グロブリン比および総コレステロール値の有意差は消失した。新たに, 1000 mg/kg群の雄で Ca が有意な低値を, 雌で Ca が有意な高値を, Cl が有意な低値を示した。

8. 剖検所見

1) 投与期間終了時

腺胃粘膜の白色化が1000 mg/kg群の雌1例に, 脾臓の白色点か200 mg/kg群の雌1例にみられた。その他には, 著変はみられなかった。

2) 回復期間終了時

対照群および1000 mg/kg群の雌雄とも, 著変はみられなかった。

9. 器官重量 (Table 5, 6)

1) 投与期間終了時

肝臓重量は各投与群の雌雄で対照群に比して高値であり, 200 mg/kg群の雌雄と1000 mg/kg群の雄で相対重量が, 1000 mg/kg群の雌で絶対重量および相対重量に有意差が認められた。また, 1000 mg/kg群の雌では腎臓相対重量も有意な高値を示した。その他には, 対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復期間終了時

投与期間終了時に認められた肝臓および腎臓の有意差は消失した。新たに, 1000 mg/kg群の雄で脳相対重量が, 雌で脳絶対重量が有意な高値を示した。

Table 3 Blood chemistry of male rats treated orally with tris(*p*-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test

Test period Group	Termination of administration period						Termination of recovery period	
	Control	tris( <i>p</i> -cumenyl) phosphate				Control	tris( <i>p</i> -cumenyl) phosphate	
		0	8	40	200			1000
Dose(mg/kg)								
Number of males	10	10	10	10	10	5	5	
GOT (IU/l)	70.47±7.57	67.41±7.95	65.24±5.31	63.46±4.74	67.79±7.24	68.92±6.35	70.46±16.72	
GPT (IU/l)	22.34±3.40	21.64±3.29	21.98±3.17	20.78±2.17	24.30±2.82	24.44±1.64	21.92±5.70	
ALP (IU/l)	176.93±36.30	202.72±24.13	186.00±23.07	187.77±33.62	200.73±35.46	146.72±29.87	149.98±20.31	
$\gamma$ -GTP (IU/l)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.22±0.49	0.22±0.49	
TP (g/dl)	5.18±0.23	5.05±0.24	5.11±0.16	4.97±0.22	5.13±0.18	5.60±0.20	5.46±0.30	
Albumin (g/dl)	2.946±0.157	2.882±0.104	2.931±0.119	2.880±0.072	2.926±0.074	3.000±0.1420	3.014±0.158	
Protein fraction (%)								
Albumin	56.89±2.76	57.15±2.72	57.37±1.81	58.03±1.61	57.08±1.22	53.58±1.33	55.24±1.96	
$\alpha_1$ -globulin	20.14±2.39	20.67±2.34	19.58±1.43	18.96±2.34	19.14±1.31	22.98±1.90	21.92±1.70	
$\alpha_2$ -globulin	5.35±0.57	5.26±0.34	5.42±0.53	5.47±0.50	5.21±0.69	5.00±0.40	4.86±0.34	
$\alpha_3$ -globulin	5.84±0.27	5.71±0.25	5.74±0.52	5.75±0.52	06.31±0.42*	6.36±0.51	6.26±0.29	
$\beta$ -globulin	9.70±0.54	9.20±0.72	9.70±0.58	9.73±0.93	10.20±0.580	9.66±0.50	9.16±0.29	
$\gamma$ -globulin	2.08±0.58	2.01±0.35	2.19±0.52	2.06±0.54	2.06±0.30	2.42±0.60	2.62±0.88	
A/G ratio	1.320±0.157	1.332±0.155	1.338±0.098	1.376±0.096	1.322±0.064	1.148±0.068	1.232±0.100	
T-Bil (mg/dl)	0.054±0.010	0.053±0.011	0.053±0.013	0.051±0.009	0.063±0.013	0.060±0.007	0.056±0.005	
BUN (mg/dl)	15.01±1.41	14.62±2.79	14.23±1.90	14.79±1.41	16.05±1.81	24.72±4.29	19.12±4.27	
Creatinine (mg/dl)	0.497±0.041	0.478±0.029	0.493±0.039	0.498±0.021	0.495±0.018	0.530±0.032	0.528±0.039	
Glucose (mg/dl)	122.72±19.86	118.85±11.98	115.77±11.05	116.16±7.47	121.42±10.81	133.28±5.59	126.10±11.04	
T-Cho (mg/dl)	48.55±11.80	49.12±7.08	52.15±9.78	47.49±12.93	56.92±7.48	51.52±10.00	43.38±7.35	
TG (mg/dl)	39.14±7.28	35.58±10.59	37.37±9.78	30.19±7.42	34.26±9.28	40.50±7.08	41.02±19.69	
Na (mEq/l)	146.43±1.98	145.96±1.50	146.15±1.19	146.81±1.22	144.93±1.48	142.40±0.87	143.18±1.01	
K (mEq/l)	4.374±0.286	4.328±0.143	4.302±0.141	4.254±0.204	4.469±0.295	4.700±0.137	4.438±0.229	
Cl (mEq/l)	108.23±2.08	107.89±1.62	108.26±1.81	108.57±0.87	108.68±1.68	104.78±1.23	105.16±1.44	
Ca (mg/dl)	10.18±0.26	10.04±0.30	10.04±0.27	10.16±0.30	10.31±0.34	10.18±0.22	9.66±0.32*	
IP (mg/dl)	8.49±0.51	8.50±0.41	8.30±0.47	8.70±0.49	8.75±0.43	7.86±0.25	7.48±0.33	

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control (\*: p<0.05)



Table 4 Blood chemistry of female rats treated orally with tris(p-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test

Test period	Group	Termination of administration period					Termination of recovery period	
		Control	tris(p-cumenyl) phosphate				Control	tris(p-cumenyl) phosphate
			0	8	40	200		
	Dose(mg/kg)							
	Number of females	10	10	10	10	10	5	5
	GOT (IU/l)	67.56±9.25	66.44±8.84	67.15±7.79	66.24±11.45	61.70±6.48	60.30±5.18	54.34±7.19
	GPT (IU/l)	19.15±4.74	19.42±3.38	17.99±2.79	22.95±12.44	19.86±5.33	17.52±3.96	21.76±3.65
	ALP (IU/l)	153.99±62.66	100.40±18.69	100.98±15.23	104.20±14.43	93.72±9.95	70.68±16.98	78.86±15.50
	γ-GTP (IU/l)	0.11±0.35	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.44±0.57	0.00±0.00	0.00±0.00
	TP (g/dl)	5.41±0.41	5.44±0.23	5.50±0.20	5.58±0.22	5.59±0.22	5.74±0.24	5.78±0.15
	Albumin (g/dl)	3.263±0.311	3.296±0.205	3.346±0.186	3.209±0.250	3.275±0.210	3.370±0.201	3.334±0.111
	Protein fraction (%)							
	Albumin	60.21±1.65	60.57±2.14	60.84±2.24	57.52±4.28	58.60±2.65	58.68±2.36	57.70±2.14
	α <sub>1</sub> -globulin	18.44±1.00	17.76±1.78	17.64±1.57	18.49±1.85	18.53±2.14	19.80±2.41	20.22±1.53
	α <sub>2</sub> -globulin	4.33±0.72	4.36±0.70	4.62±0.91	4.89±0.92	4.78±0.83	3.30±0.31	3.44±0.62
	α <sub>3</sub> -globulin	5.34±0.34	5.34±0.35	5.33±0.53	5.88±1.24	5.84±0.57	5.86±0.76	5.10±0.49
	β-globulin	8.91±0.62	9.12±0.88	8.85±0.64	10.00±1.37	9.70±1.16	9.32±0.65	9.60±0.97
	γ-globulin	2.77±0.62	2.85±0.52	2.72±0.48	3.22±0.89	3.55±0.56	3.04±0.42	3.94±0.92
	A/G ratio	1.500±0.101	1.530±0.147	1.548±0.158	1.360±0.207	1.411±0.153	1.414±0.143	1.358±0.128
	T-Bil (mg/dl)	0.061±0.013	0.065±0.007	0.064±0.013	0.056±0.016	0.061±0.012	0.070±0.010	0.080±0.012
	BUN (mg/dl)	17.11±2.70	20.06±2.34	19.97±4.64	18.56±2.46	20.69±3.05	17.48±2.13	23.26±6.21
	Creatinine (mg/dl)	0.504±0.031	0.517±0.034	0.513±0.047	0.507±0.038	0.498±0.032	0.472±0.018	0.470±0.026
	Glucose (mg/dl)	124.50±12.71	126.81±12.04	122.31±11.73	119.63±15.68	123.60±9.48	136.14±13.85	129.42±6.98 0
	T-Chol (mg/dl)	53.56±9.020	64.60±14.19	55.94±16.22	59.52±13.38	85.43±9.84**	67.66±11.81	68.68±11.07
	TG (mg/dl)	27.38±9.94	20.73±3.31	20.93±8.44	18.61±5.68	20.35±4.12	40.18±13.07	28.78±4.80 0
	Na (mEq/l)	144.97±0.97	144.52±1.30	144.57±1.32	144.74±1.61	144.74±1.45	142.06±0.39	142.04±0.24
	K (mEq/l)	4.218±0.181	4.194±0.244	4.135±0.151	4.172±0.197	4.207±0.178	4.226±0.096	4.220±0.199
	Cl (mEq/l)	108.69±1.53	107.35±1.45	107.72±1.52	109.25±1.55	108.45±1.39	106.00±1.09	104.28±0.88*
	Ca (mg/dl)	10.04±0.26	10.21±0.32	10.10±0.32	10.16±0.35	10.04±0.27	10.40±0.12	10.56±0.09*
	IP (mg/dl)	7.75±0.85	7.25±0.72	7.17±0.54	7.32±0.81	7.22±0.58	6.20±0.51	6.66±0.40

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control (\*: p&lt;0.05, \*\*: p&lt;0.01)

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with tris(p-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test

Test period	Group	Termination of administration period					Termination of recovery period	
		Control	tris(p-cumenyl) phosphate				Control	tris(p-cumenyl) phosphate
			0	8	40	200		
	Dose(mg/kg)							
	Number of males	10	10	10	10	10	5	5
	Body weight (g)	321.8±30.3	329.5±20.3	322.6±24.4	332.1±17.5	319.5±23.2	410.8±20.1	0366.0±28.1 *
	Brain (g)	1.866±0.050	1.895±0.076	1.889±0.066	1.909±0.070	1.867±0.124	1.998±0.061	01.952±0.028
	Brain (g%)	0.584±0.050	0.576±0.037	0.589±0.040	0.577±0.030	0.585±0.047	0.486±0.018	00.536±0.036*
	Liver (g)	9.607±1.242	10.012±0.961	9.772±1.150	10.557±1.118	10.441±1.009	11.890±0.498	10.764±1.175
	Liver (g%)	2.975±0.120	3.034±0.145	3.020±0.147	3.174±0.229*	3.264±0.143**	2.900±0.174	2.936±0.118
	Kidneys (g)	2.445±0.273	2.516±0.169	2.463±0.325	2.514±0.115	2.521±0.229	2.936±0.126	2.718±0.247
	Kidneys (g%)	0.759±0.047	0.763±0.019	0.763±0.056	0.759±0.028	0.789±0.046	0.716±0.013	0.744±0.039
	Adrenals (mg)	52.74±4.12	50.63±4.37	54.98±5.68	56.72±6.02	53.53±7.84	59.12±7.97	60.98±11.21
	Adrenals (mg%)	16.52±2.08	15.41±1.38	17.10±1.82	17.05±1.42	16.80±2.50	14.42±1.88	16.72±3.12
	Testes (g)	3.062±0.146	3.063±0.220	2.967±0.245	3.018±0.258	3.048±0.277	3.294±0.267	3.120±0.259
	Testes (g%)	0.958±0.105	0.933±0.079	0.922±0.073	0.911±0.088	0.958±0.113	0.806±0.075	0.856±0.086

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control (\*: p&lt;0.05, \*\*: p&lt;0.01)

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with tris(p-cumenyl) phosphate in the 28-day repeat dose toxicity test

Test period	Group	Termination of administration period					Termination of recovery period	
		Control	tris(p-cumenyl) phosphate				Control	tris(p-cumenyl) phosphate
			0	8	40	200		
	Dose(mg/kg)							
	Number of females	10	10	10	10	10	5	5
	Body weight (g)	213.5±15.5	219.7±11.4	217.8±14.0	211.4±10.9	207.1±14.3	236.4±16.7	237.0±18.1
	Brain (g)	1.823±0.058	1.803±0.072	1.843±0.055	1.808±0.053	1.793±0.061	1.784±0.054	1.898±0.072*
	Brain (g%)	0.857±0.048	0.822±0.045	0.849±0.056	0.855±0.040	0.870±0.064	0.758±0.064	0.804±0.061
	Liver (g)	6.614±0.758	6.983±0.662	6.870±0.529	7.251±0.909	7.639±0.564**	7.082±0.884	7.172±0.750
	Liver (g%)	3.097±0.272	3.176±0.214	3.154±0.138	3.427±0.359*	3.691±0.181**	2.988±0.197	3.024±0.198
	Kidneys (g)	1.673±0.155	1.698±0.107	1.743±0.126	1.716±0.144	1.727±0.131	1.714±0.192	1.810±0.116
	Kidneys (g%)	0.784±0.042	0.775±0.034	0.800±0.033	0.811±0.048	0.835±0.055*	0.726±0.056	0.764±0.048
	Adrenals (mg)	60.43±7.21	64.50±6.66	61.38±7.44	61.01±7.66	57.09±5.55	65.04±6.31	64.66±7.73
	Adrenals (mg%)	28.33±3.02	29.41±3.33	28.17±2.78	28.82±3.14	27.57±1.85	27.66±3.74	27.32±3.06
	Ovaries (mg)	84.17±9.51	87.40±13.04	87.06±8.40	88.03±12.98	77.94±11.42	81.92±21.43	82.28±15.02
	Ovaries (mg%)	39.63±5.44	39.71±5.05	40.17±5.06	41.60±5.28	37.73±5.50	34.38±7.11	34.66±5.75

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control (\*: p&lt;0.05, \*\*: p&lt;0.01)

## 10. 病理組織学的検査

## 1) 投与期間終了時

肝臓：ごく軽度～軽度の肝細胞空胞変性が、対照群および1000 mg/kg群の雌雄の6～10例にみられた。

腎臓：ごく軽度の腎症が、対照群の雌雄および1000 mg/kg群の雄の各1例にみられた。

上記の肝臓および腎臓の組織変化には、投与用量との関連性は認められなかった。

剖検で腺胃粘膜の白色化がみられた1000mg/kgの雌では、著変はみられなかった。また、心臓、脾臓、副腎および骨髄ならびに対照群の胃では、いずれも著変はみられなかった。

## 2) 回復期間終了時

投与期間終了時の検査で1000 mg/kg群に毒性所見が示唆されなかったため、回復群の検査を実施しなかった。

## 考察

リン酸トリス(p-クメニル)を雌雄ラットに8, 40, 200および1000 mg/kgの用量段階で1日1回、28日間連続して経口投与した反復投与毒性試験を実施した。また、対照群および1000 mg/kg群には14日間の回復期間を設け、回復性について検討した。

投与期間中、投与期間終了前あるいは投与期間終了時にはほぼ用量依存性を示し、対照群との間に有意差が認められた変化は、以下の如くであった。投与期間初期における摂餌量の低値(200 mg/kg以上の群の雌、1000 mg/kg群の雄)、投与期間後期における摂水量の高値(1000 mg/kg群の雌)、尿量の高値および尿比重の高値(1000 mg/kg群の雌)、赤血球数の低値(200 mg/kg群の雌)、ヘモグロビン量の低値(200 mg/kg以上の群の雌雄)、ヘマトクリット値の低値(200 mg/kg以上の群の雌、1000 mg/kg群の雄)、平均赤血球容積の低値(1000 mg/kg群の雌)、 $\alpha_2$ -グロブリン比の高値(1000 mg/kg群の雄)、総コレステロール値の高値(1000 mg/kg群の雌)、肝臓相対重量の高値(200 mg/kg以上の群の雌雄)、肝臓絶対重量の高値(1000 mg/kg群の雌)、腎臓相対重量の高値(1000 mg/kg群の雌)。また、一般状態では40 mg/kg群の雄および200 mg/kg以上の群の雌雄で、投与後に流涎が観察された。

流涎は投与期間の中期以降から最終投与日まで、少数例～過半数例でみられた。当症状は投与終了直後から発現したが、継続時間は約20分間の一過性のものであった。

摂餌量は、200 mg/kg以上の群で投与期間の初期～中期にかけて低値であった。しかしながら、体重に影響を及ぼす程の変動ではなく、投与期間の後期には対照群とはほぼ同程度まで回復した。

摂水量は、1000 mg/kg群の雌で投与4週目で高値であり、投与期間終了前の尿検査における尿量の高値と尿比重の低値との関連性が得られた。なお、摂水量の高値は

回復1週目までみられたが、その後消失した。尿量に関連する器官である腎臓は、当該群で相対重量が高値を示したものの、絶対重量には有意差は認められなかった。また、尿検査のその他の項目で異常はみられず、血液化学的検査で腎機能障害を示唆する変動はみられず、病理組織学的検査でも腎臓に著変はみられなかった。したがって、摂水量および尿検査値の変動は、機能的および器質的变化を伴わないものと思われた。

血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積などの低値が認められた。当変動の内、赤血球数には投与用量との関連性はなかったものの、200 mg/kg以上の群では貧血傾向を示したと考えられた。しかしながら、網状赤血球数に影響はなく、病理組織学的検査で骨髄に著変はなく、また肝臓および脾臓に髓外造血、褐色色素沈着などの変化はみられなかった。さらに、今回の200 mg/kg以上の群の値は当試験施設内のほぼ同週齢のラットの集積値との大きな差は認められなかった。したがって、今回の試験で認められた貧血は器質的变化を伴わないごく軽度のものと思われた。

血液化学的検査では、1000 mg/kg群の雌で総コレステロール値が高値を示した。当検査値と関連すると思われる器官の肝臓は、絶対重量および相対重量がともに高値であった。しかしながら、血液化学的検査で他の肝機能障害を示唆する変動はみられず、病理組織学的検査でも当該群に特異的な変化は認められなかった。したがって、当変動はごく軽度の機能的変化に留まるものと思われた。また、1000 mg/kg群の雄では $\alpha_2$ -グロブリン比に有意差が認められたが、その他の蛋白分画値には有意な変動がみられないことから、当変動は毒性学的な意義のない変化と考えられた。

以上の投与期間中、投与期間終了前あるいは投与期間終了時に認められた変化は、いずれも回復期間中あるいは回復期間終了時には消失する可逆性のものであった。なお、1000 mg/kg群では回復期間中あるいは回復期間終了時に対照群に比して有意差を示す検査項目がみられたが、投与期間終了時にはいずれも有意差が認められない項目であり、毒性を示唆するものとは考え難かった。

剖検では1000 mg/kg群の雌で腺胃粘膜の白色化がみられたが、1例のみであること、病理組織学的検査で著変がみられないことから、毒性所見とは思われなかった。また、病理組織学的検査では、1000 mg/kg群に被験物質の投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

以上の如く、一般状態の異常(流涎)が40 mg/kg以上の雄と200 mg/kg以上の雌で、摂餌量の低値が200 mg/kg以上の雌と1000 mg/kgの雄で、摂水量の高値が1000 mg/kgの雌でみられた。また、血液学的検査(貧血傾向)および器官重量(肝臓)への影響が200 mg/kg以上の雌雄で、尿量の高値と尿比重の低値が1000 mg/kgの雌で、血液化学的検査(総コレステロール)への影響が1000 mg/kgの雌で認められた。したがって、当試験条件下におけるリン酸トリス(p-クメニル)の毒性学的無影響量は、雄では3 mg/kg、雌では40 mg/kgと推察された。

連絡先

試験責任者：和田 浩  
試験担当者：藤村高志, 木村 均,  
渡邊ゆかり, 古橋忠和,  
山本明義

㈱日本バイオリサーチセンター羽島研究所  
〒501-62 岐阜県羽島市福寿町間島 6-104  
Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors : Hiroshi Wada (Study director)  
Takashi Fujimura, Hitoshi Kimura,  
Yukari Watanabe, Tadakazu Furuhashi  
and Akiyoshi Yamamoto

Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory  
6-104 Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-62,  
Japan  
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

# リン酸トリス(p-クメニル)の細菌を用いる 復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Tris (p-cumenyl) phosphate on Bacteria

### 要約

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、リン酸トリス(p-クメニル)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。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 uvr A 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 µg/プレート、本試験では 312.5~5000 µg/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突然変異コロニー数の増加が認められなかったことから、リン酸トリス(p-クメニル)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 uvr A  
*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。

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字型試験管に種菌を接種し、37℃、約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〕

リン酸トリス(p-クメニル) (CAS No 26967-76-0) は、分子量 452.57 の黄色の液体である。

純度 99.7% のもの (不純物として p-イソプロピルフェノールを 100ppm 含む、ロット番号: 920909, 味の素(株)製造) を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所に遮光して保管した。被験物質は、この状態で1年以上安定あることが製造者によって確認されている。

リン酸トリス(p-クメニル)は、ジメチルスルホキシド(以下 DMSO と略: ロット番号: TWP5445 および APQ5928, 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。

薬野研究所においてリン酸トリス(p-クメニル)の DMSO 溶液中での安定性試験を行った。

本試験および染色体異常試験における最高濃度 (900 mg/ml) および最低濃度 (3.125 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、いずれも 100% 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て、96.4~97.4%、3.125 mg/ml 溶液は、99.8~99.9% であった。

以上の結果から、リン酸トリス(p-クメニル)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 : フリルフラマイド (上野製薬(株))  
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))  
9-AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem.Co.)  
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

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%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
ピチオン	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)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
リン酸水素アンモニウムナトリウム 4水和物	3.5 g

グルコース	20 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中に下記の成分を含む)

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))を用いた。

(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。

小試験管中にトッブアガー2ml, 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Table 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、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。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。

(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。

結果および考察

(用量設定試験)

リン酸トリス(p-クメチル)について、50~5000 μg/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、すべての検定菌の直接法あるいは代謝活性化法のいずれにおいても、抗菌性は認められなかった。

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 μg/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 Table 1, 2 に示した。リン酸トリ(p-クメチル)について 312.5~5000 μg/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。

以上の結果に基づき、リン酸トリス(p-クメチル)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。

文献

- (1) D.M. Maron, and B.N. Ames, *Mutation Research*. 113, 173-215 (1983).
- (2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. 1984, 161-187.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹  
 試験担当者: 原 巧, 坂本京子, 加藤基恵,  
 石原尚古, 川上久美子,  
 松木容彦, 北嶋美似子  
 (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: Tohru Shibuya (Study director)  
 Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,  
 Motoe Katoh, Naoko Ishihara,  
 Kumiko Kawakami, Yasuhiko Matsuki,  
 Miiko Kitashima  
 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 Results of reverse mutation test (I) of tris-p-cumenyl phosphate \*\* on bacteria

With (+) or without (-)	Test substance dose ( $\mu$ g /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	113	130	136	11	19	11	26	20	29	16	22	24	11	7	9
		( 126 $\pm$ 11.9 )			( 14 $\pm$ 4.6 )			( 25 $\pm$ 4.6 )			( 21 $\pm$ 4.2 )			( 9 $\pm$ 2.0 )		
	312.5 #	134	124	133	15	12	18	21	29	32	15	27	12	10	7	9
		( 130 $\pm$ 5.5 )			( 15 $\pm$ 3.0 )			( 27 $\pm$ 5.7 )			( 18 $\pm$ 7.9 )			( 9 $\pm$ 1.5 )		
	625 #	124	124	97	12	11	11	22	18	33	25	23	27	14	6	12
		( 115 $\pm$ 15.6 )			( 11 $\pm$ 0.6 )			( 24 $\pm$ 7.8 )			( 25 $\pm$ 2.0 )			( 11 $\pm$ 4.2 )		
	1250 #	134	130	137	14	22	15	18	14	23	16	26	16	6	10	5
	( 134 $\pm$ 3.5 )			( 17 $\pm$ 4.4 )			( 18 $\pm$ 4.5 )			( 19 $\pm$ 5.8 )			( 7 $\pm$ 2.6 )			
S9 Mix (+)	2500 #	122	118	120	16	11	15	26	20	24	17	21	23	4	5	7
		( 120 $\pm$ 2.0 )			( 14 $\pm$ 2.6 )			( 23 $\pm$ 3.1 )			( 20 $\pm$ 3.1 )			( 5 $\pm$ 1.5 )		
	5000 #	115	116	124	15	11	19	29	25	22	15	21	22	5	1	14
	( 118 $\pm$ 4.9 )			( 15 $\pm$ 4.0 )			( 25 $\pm$ 3.5 )			( 19 $\pm$ 3.8 )			( 7 $\pm$ 6.7 )			
S9 Mix (-)	0	121	128	119	10	15	12	32	28	26	31	30	32	14	23	11
		( 123 $\pm$ 4.7 )			( 12 $\pm$ 2.5 )			( 29 $\pm$ 3.1 )			( 31 $\pm$ 1.0 )			( 16 $\pm$ 6.2 )		
	312.5	155	166	139	20	17	10	20	34	32	36	20	31	24	17	19
		( 153 $\pm$ 13.6 )			( 16 $\pm$ 5.1 )			( 29 $\pm$ 7.6 )			( 29 $\pm$ 8.2 )			( 20 $\pm$ 3.6 )		
	625 #	159	131	145	20	14	21	33	31	25	42	30	30	18	18	11
		( 145 $\pm$ 14.0 )			( 18 $\pm$ 3.8 )			( 30 $\pm$ 4.2 )			( 34 $\pm$ 6.9 )			( 16 $\pm$ 4.0 )		
	1250 #	179	165	138	10	18	18	22	28	25	25	32	29	12	10	13
	( 161 $\pm$ 20.8 )			( 15 $\pm$ 4.6 )			( 25 $\pm$ 3.0 )			( 29 $\pm$ 3.5 )			( 12 $\pm$ 1.5 )			
S9 Mix (+)	2500 #	128	144	148	11	11	13	17	23	23	26	33	34	18	11	14
		( 140 $\pm$ 10.6 )			( 12 $\pm$ 1.2 )			( 21 $\pm$ 3.5 )			( 31 $\pm$ 4.4 )			( 14 $\pm$ 3.5 )		
	5000 #	122	130	128	17	11	8	21	27	23	33	37	41	11	10	13
	( 127 $\pm$ 4.2 )			( 12 $\pm$ 4.6 )			( 24 $\pm$ 3.1 )			( 37 $\pm$ 4.0 )			( 11 $\pm$ 1.5 )			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu$ g /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	484	535	536	173	170	169	123	122	149	600	551	524	2683	2770	2862
		( 518 $\pm$ 29.7 )			( 171 $\pm$ 2.1 )			( 131 $\pm$ 15.3 )			( 558 $\pm$ 38.5 )			( 2772 $\pm$ 89.5 )		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu$ g /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	736	812	827	219	205	212	953	1002	1018	313	305	341	316	288	288
		( 792 $\pm$ 48.8 )			( 212 $\pm$ 7.0 )			( 991 $\pm$ 33.9 )			( 320 $\pm$ 18.9 )			( 297 $\pm$ 16.2 )		

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.

\*\*: Purity was above 99 % and p-isopropyl phenol (below 1%) was contained as impurity.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of tris-*p*-cumenyl phosphate \*\* on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu$ g / 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	122 117 108 ( 116 $\pm$ 7.1 )	11 18 14 ( 14 $\pm$ 3.5 )	21 25 31 ( 26 $\pm$ 5.0 )	22 19 25 ( 22 $\pm$ 3.0 )	8 9 9 ( 9 $\pm$ 0.6 )								
	312.5	121 115 99 ( 112 $\pm$ 11.4 )	14 14 13 ( 14 $\pm$ 0.6 )	15 24 33 ( 24 $\pm$ 9.0 )	18 23 17 ( 19 $\pm$ 3.2 )	9 7 8 ( 8 $\pm$ 1.0 )								
	625 #	112 113 116 ( 114 $\pm$ 2.1 )	18 13 15 ( 15 $\pm$ 2.5 )	25 22 19 ( 22 $\pm$ 3.0 )	20 25 16 ( 20 $\pm$ 4.5 )	4 6 7 ( 6 $\pm$ 1.5 )								
	1250 #	111 98 96 ( 102 $\pm$ 8.1 )	12 15 16 ( 14 $\pm$ 2.1 )	28 24 13 ( 22 $\pm$ 7.8 )	17 27 21 ( 22 $\pm$ 5.0 )	8 14 6 ( 9 $\pm$ 4.2 )								
	2500 #	118 121 122 ( 120 $\pm$ 2.1 )	18 15 17 ( 17 $\pm$ 1.5 )	9 24 23 ( 19 $\pm$ 8.4 )	16 22 26 ( 21 $\pm$ 5.0 )	10 8 7 ( 8 $\pm$ 1.5 )								
	5000 #	115 113 124 ( 117 $\pm$ 5.9 )	11 19 26 ( 19 $\pm$ 7.5 )	17 18 21 ( 19 $\pm$ 2.1 )	21 20 20 ( 20 $\pm$ 0.6 )	4 6 8 ( 6 $\pm$ 2.0 )								
S9 Mix (+)	0	141 133 121 ( 132 $\pm$ 10.1 )	12 18 12 ( 14 $\pm$ 3.5 )	31 30 34 ( 32 $\pm$ 2.1 )	35 27 33 ( 32 $\pm$ 4.2 )	7 12 12 ( 10 $\pm$ 2.9 )								
	312.5	119 104 120 ( 114 $\pm$ 9.0 )	14 13 8 ( 12 $\pm$ 3.2 )	22 21 20 ( 21 $\pm$ 1.0 )	31 28 17 ( 25 $\pm$ 7.4 )	15 12 15 ( 14 $\pm$ 1.7 )								
	625 #	127 110 128 ( 122 $\pm$ 10.1 )	14 12 12 ( 13 $\pm$ 1.2 )	16 24 21 ( 20 $\pm$ 4.0 )	30 29 26 ( 28 $\pm$ 2.1 )	14 13 11 ( 13 $\pm$ 1.5 )								
	1250 #	133 125 124 ( 127 $\pm$ 4.9 )	12 18 16 ( 15 $\pm$ 3.1 )	19 22 25 ( 22 $\pm$ 3.0 )	25 27 20 ( 24 $\pm$ 3.6 )	9 7 7 ( 8 $\pm$ 1.2 )								
	2500 #	113 100 146 ( 120 $\pm$ 23.7 )	12 13 13 ( 13 $\pm$ 0.6 )	15 25 15 ( 18 $\pm$ 5.8 )	21 23 22 ( 22 $\pm$ 1.0 )	17 9 6 ( 11 $\pm$ 5.7 )								
	5000 #	117 121 113 ( 117 $\pm$ 4.0 )	15 17 13 ( 15 $\pm$ 2.0 )	21 19 22 ( 21 $\pm$ 1.5 )	19 29 18 ( 22 $\pm$ 6.1 )	10 8 6 ( 8 $\pm$ 2.0 )								
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA								
	Dose ( $\mu$ g / plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80								
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA								
	Dose ( $\mu$ g / plate)	1	2	10	0.5	2								
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	523 490 505 ( 506 $\pm$ 16.5 )	93 101 126 ( 107 $\pm$ 17.2 )	149 134 132 ( 138 $\pm$ 9.3 )	666 638 606 ( 637 $\pm$ 30.0 )	2499 2225 2310 ( 2345 $\pm$ 140.3 )								
	Number of colonies / plate	713 829 840 ( 794 $\pm$ 70.4 )	188 190 189 ( 189 $\pm$ 1.0 )	648 701 627 ( 659 $\pm$ 38.1 )	340 381 355 ( 359 $\pm$ 20.7 )	241 240 260 ( 247 $\pm$ 11.3 )								

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.

\*\* : Purity was above 99 % and *p*-isopropyl phenol (below 1%) was contained as impurity.

# リン酸トリス(p-クメニル)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(p-cumenyl)phosphate on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

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、リン酸トリス(p-クメニル)の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/1U, 以下CHLと略す)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行ったところ、直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は0.14 mg/mlであった。一方、代謝活性化法の S9mix 存在下および S9mix 非存在下では、4.5 mg/ml (10 mM) の濃度においても50%を越える増殖抑制は認められなかった。従って、染色体異常試験において、直接法では 0.14 mg/ml、代謝活性化法では 10 mM に相当する 4.5 mg/mlの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

直接法により、CHL細胞を48時間処理した高濃度群では分裂抑制が認められ、十分な細胞数を観察できなかった。48時間処理したその他の処理群および24時間処理したすべての処理群では、構造異常の有意な増加は認められなかった。一方、倍数性細胞については、24時間および48時間処理した低濃度 (0.04 mg/ml) および中濃度群 (0.07 mg/ml) で、有意な増加が認められたが、その頻度は5%未満であった。また、代謝活性化法の S9mix 存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、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。

以上の結果からリン酸トリス(p-クメニル)は、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に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) したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL 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: JRH BIOSCIENCES, ロット番号: 1C2073) を 10% 添加したイーグル MEM 培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

$2 \times 10^4$  個の CHL 細胞を、培養液 5 ml を入れたディッシュ (径 6 cm, Corning) に播き、37 °C の CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

直接法では、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、代謝活性化法では、細胞播種3日目にS9mixの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(p-クメニル) (CAS No.: 26967-76-0, ロット番号: 920909, 味の素(株)製造, (社)日本化学工業協会提供) は黄色液体で、水に不溶、ジメチルスルホキシド (DMSO)、アセトン、エタノールに易溶である。分子式C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>P、分子量452.57、沸点255°C/mmHg、融点27~28°Cの物質で、純度は99.7%である。原体は室温、暗所で3ヶ月は安定であり、溶媒中 (DMSO) での安定性試験では、3.125~900 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

#### 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 (Sigma Chemical Co., ロット番号: 30H0608) 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。染色体異常試験の直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群の調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験

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、リン酸トリス(p-クメニル)の約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、直接法では0.14 mg/mlであった。一方、代謝活性化法の S9mix 存在下および非存在下では、4.5 mg/ml (10 mM) の濃度においても50%を越える増殖抑制は認められなかった (Fig. 1)。



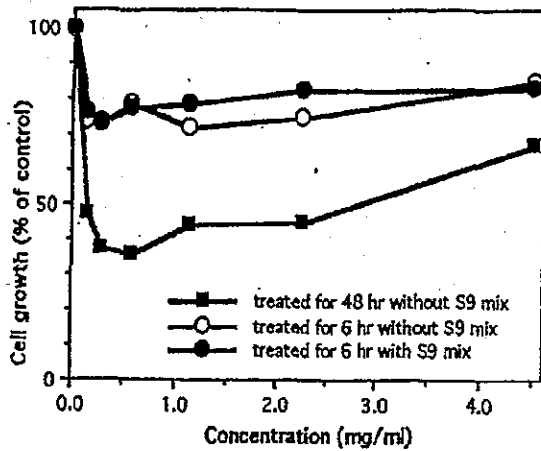


Fig. 1 Growth inhibition of CHL cells treated with tris(p-cumenyl) phosphate

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法では 0.14 mg/ml、代謝活性化法では 10mM に相当する 4.5 mg/ml とし、それぞれ高濃度群の 1/2 の濃度を中濃度、1/4 の濃度を低濃度とした。

#### 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  $\mu$ g/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。スライド標本は各シャーレにつき 6 枚作製した。作製した標本を、3% ギムザ溶液で約 10 分間染色した。

#### 9. 染色体分析

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、複数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) 分科会<sup>9)</sup> 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、フィッシャーの exact probability test 法により、溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>9)</sup> の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が 5% 未満を陰性、5% 以上 10% 未満を疑陽性、10% 以上を陽性とした。

#### 結果および考察

直接法による染色体分析の結果を Table 1 に示した。リン酸トリス(p-クメニル)を加えて 24 時間処理したすべての処理群で、染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められなかった。また、24 時間処理した低濃度群および中濃度群において、倍数性細胞の出現頻度に有意な増加 (低濃度群:  $p=0.00200$ , 中濃度群:  $p=0.0110$ ) が認められたが、その頻度は 5% 未満であり、石館らの判定基準では陰性となった。一方、リン酸トリス(p-クメニル)を加えて 48 時間処理した最高処理濃度群では、分裂抑制のため染色体分析ができなかったが、低濃度群および中濃度群では、染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められなかった。また、低濃度群および中濃度群では、倍数性細胞の出現頻度に有意な増加 (低濃度群:  $p=0.00659$ , 中濃度群:  $p=0.00544$ ) が認められたが、その頻度は 5% 未満であり、石館らの判定基準では陰性となった。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 2 に示した。リン酸トリス(p-クメニル)を加えて S9mix 存在下および非存在下で 6 時間処理した各濃度群において、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められず、すべての処理群で陰性であった。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with tris(p-cumenyl)phosphate \*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations			Polyploid <sup>9)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>		total	TAG	(%)		TA	(%)
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			
TCP	0.04	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.75 *	--	--	
TCP	0.07	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.38 *	--	--	
TCP	0.14	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.97	--	--	
MC	0.00005	24	200	7	42	117	4	0	1	0	171	3	101 * (50.5)	99 * (49.5)	0.13	+	--
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			
TCP	0.04	48	122	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2.00 *	--	--	
TCP	0.07	48	173	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2.10 *	--	--	
TCP	0.14	48	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	Tox	Tox	
MC	0.00005	48	200	10	42	128	15	7	0	10	212	10	101 * (50.5)	98 * (49.0)	0.50	+	--

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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, Tox : toxicity. 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Seven hundred and twenty-three cells were analysed. 7) Three hundred cells were analyzed. 8) Two hundred and eighty-six cells were analysed. 9) Fifty-eight cells were analysed. \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with tris(p-cumenyl)phosphate \*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations			Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>		total	TAG	(%)		TA	(%)
Control				200	0	1	1	1	1	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	--	6-(18)	200	0	0	1	1	0	0	0	2	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25		
TCP	1.1	--	6-(18)	200	1	0	0	4	0	2	0	7	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.75	--	--
TCP	2.3	--	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.75	--	--
TCP	4.5	--	6-(18)	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	--	--
CPA	0.005	--	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	--	--
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50		
TCP	1.1	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	--	--
TCP	2.3	+	6-(18)	200	0	2	0	2	0	2	0	6	2	5 (2.5)	5 (2.5)	0.50	--	--
TCP	4.5	+	6-(18)	200	0	1	0	3	0	0	0	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	--	--
CPA	0.005	+	6-(18)	200	6	53	159	7	0	0	10	235	2	122 * (61.0)	118 * (59.0)	0.00	+	--

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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. 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99%.

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, 1988.
- 2) 石館 基 監修, “〈改訂〉染色体異常試験データ  
集,” エル・アイ・シー社, 1987.

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,  
若栗 忍, 日下部博一,  
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, Kiyoshi Sasaki,  
Shinobu Wakuri;  
Hirokazu Kusakabe, 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