

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on Bacteria

要約

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニ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*)を用い、プレインキュベーション法により実施した。予備試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000~313 μg /プレート(公比2)の5濃度を設定した。

2回の本試験の結果とも、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではリン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルは、変異原性を有さない(陰性)と判定された。

方法

〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および東京大学医科学研究所 松島教授より1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用いた。各使用菌株は超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その20 μl をニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath社)25 gを1 lの精製水に溶解して作成した液体完全培地10 mlに接種し、37℃で8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

〔被験物質〕

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステル(CAS No.:1241-94-7, ロット番号:K70801, 純度:91.4%; 大八化学工業(株)製造)は、分子量362.44の水に不溶の無色透明液体であり通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルはジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:708S1611, 関東化学(株))を用いて最高濃度(50 mg/ml)の溶液を調製した後、同溶媒で公比2で希釈したものを用いた。

〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(純度:98.8%, 和光純薬工業(株))
- NaN₃ : アジ化ナトリウム(純度:96.5%, 和光純薬工業(株))
- ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン(純度:99.0%, Sigma Chemical Co.)
- 9-AA : 9-アミノアクリジン(純度:99%, Sigma Chemical Co.)
- 2-AA : 2-アミノアントラセン(純度:98.0%, 和光純薬工業(株))

NaN₃は注射用水(株大塚製薬工場)に、その他はDMSOに溶解したものを使用した。

〔培地およびS9 mixの組成〕

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いてD-ピオチン、L-ヒスチジンおよびL-トリプトファン(0.5 mM混合水溶液)を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水100 mlに対して、粉末寒天(Bacto-Agar; Difco社)0.6 g, 塩化ナトリウム0.5 gの割合で加え、オートクレープで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を1/10量加えて混和し、約45℃に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディアAM-N培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。なお、培地1 lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム七水塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	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
ブドウ糖	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	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

S9 mix 1 mlあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 μmol

塩化カリウム	33 μmol
D-グルコース6-リン酸	5 μmol
β -NADPH	4 μmol
β -NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol
滅菌精製水	残量

*: 購入したS9(キッコーマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄性SD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いて併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

〔試験方法〕

試験はプレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mlを分注し、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mlと菌懸濁液0.1 mlを加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で20分間振盪した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 ml加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2 mlを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}\text{C}$ で48時間培養した。実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各濃度あたり1枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

〔試験結果の判定基準〕

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

結果および考察

〔予備試験〕

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μg /プレートの濃度で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000, 2500, 1250, 625, 313 μg /プレートの5濃度を設定した。

〔本試験〕

結果をTable 1,2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともにS9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかつ

た。また、抗菌性も、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても認められなかった。

S9 mix非共存下および共存下の625 μg /プレート以上で沈殿物が認められた。

以上の結果から、リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの変異原性は陰性と結論した。

文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3-32(1976).

連絡先

試験責任者: 水野 文夫
 試験担当者: 榎本 佳明, 石毛 裕子
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Fumio Mizuno (Study director)
 Yoshiaki Enomoto, Yuko Ishige
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on bacteria

With(+)or Without(-) S9 Mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 Mix (-)	0	103 126 (110) 102 (± 14)	17 16 (15) 12 (± 3)	33 27 (34) 43 (± 8)	13 15 (14) 14 (± 1)	9 10 (11) 13 (± 2)
	313	132 95 (111) 105 (± 19)	15 14 (16) 18 (± 2)	24 56 (39) 37 (± 16)	14 20 (15) 12 (± 4)	11 13 (11) 8 (± 3)
	625 C	121 94 (105) 100 (± 14)	10 9 (12) 16 (± 4)	56 32 (41) 34 (± 13)	14 20 (18) 21 (± 4)	9 5 (8) 10 (± 3)
	1250 C	124 122 (117) 105 (± 10)	10 14 (14) 17 (± 4)	43 46 (42) 37 (± 5)	15 19 (17) 18 (± 2)	8 8 (8) 7 (± 1)
	2500 C	106 83 (107) 133 (± 25)	16 11 (14) 15 (± 3)	42 42 (38) 29 (± 8)	14 19 (18) 21 (± 4)	7 14 (11) 13 (± 4)
	5000 C	104 113 (107) 105 (± 5)	20 15 (16) 13 (± 4)	37 34 (38) 42 (± 4)	20 14 (18) 21 (± 4)	12 9 (10) 9 (± 2)
S9 Mix (+)	0	118 122 (118) 114 (± 4)	19 16 (16) 18 (± 4)	35 50 (42) 41 (± 8)	35 30 (31) 29 (± 3)	13 9 (12) 14 (± 3)
	313	143 131 (126) 103 (± 21)	14 14 (14) 13 (± 1)	31 43 (35) 31 (± 7)	30 25 (28) 30 (± 3)	10 13 (11) 9 (± 2)
	625 C	121 146 (132) 130 (± 13)	21 16 (20) 23 (± 4)	50 42 (44) 39 (± 6)	25 28 (27) 27 (± 2)	14 9 (12) 14 (± 3)
	1250 C	121 138 (129) 127 (± 9)	20 11 (15) 14 (± 5)	42 31 (39) 44 (± 7)	38 22 (27) 20 (± 10)	11 13 (10) 7 (± 3)
	2500 C	118 129 (126) 120 (± 6)	14 20 (17) 18 (± 3)	38 24 (35) 44 (± 10)	26 26 (26) 25 (± 1)	15 8 (10) 7 (± 4)
	5000 C	135 115 (122) 129 (± 10)	16 24 (18) 15 (± 5)	33 35 (39) 50 (± 9)	24 27 (24) 20 (± 4)	7 10 (10) 13 (± 3)
Positive control S9 Mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of revertants	656 638 (659) 684 (± 23)	303 335 (315) 307 (± 17)	518 599 (549) 529 (± 44)	516 508 (516) 523 (± 8)	383 539 (474) 499 (± 81)
Positive control S9 Mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	906 945 (921) 913 (± 21)	354 359 (337) 297 (± 34)	1272 1270 (1239) 1176 (± 55)	292 236 (262) 257 (± 28)	199 171 (181) 173 (± 16)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃:sodium azideENNG:*N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene(Mean)
(\pm S.D.)

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on bacteria

With (+) or Without (-) S9 Mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 Mix (-)	0	98 118 (105) 98 (± 12)	10 7 (9) 10 (± 2)	21 27 (23) 21 (± 3)	14 35 (26) 28 (± 11)	8 6 (9) 14 (± 4)
	313	91 108 (97) 92 (± 10)	10 11 (12) 16 (± 3)	20 31 (27) 29 (± 6)	24 36 (32) 35 (± 7)	3 5 (5) 7 (± 2)
	625 C	98 85 (97) 107 (± 11)	6 13 (9) 8 (± 4)	29 39 (32) 28 (± 6)	29 39 (29) 18 (± 11)	9 5 (8) 10 (± 3)
	1250 C	105 105 (111) 124 (± 11)	16 14 (13) 10 (± 3)	34 31 (31) 29 (± 3)	38 20 (31) 35 (± 10)	11 8 (9) 7 (± 2)
	2500 C	111 105 (111) 118 (± 7)	11 5 (8) 7 (± 3)	29 26 (32) 41 (± 8)	31 30 (27) 21 (± 6)	10 9 (10) 10 (± 1)
	5000 C	93 113 (97) 84 (± 15)	10 8 (9) 9 (± 1)	32 28 (34) 42 (± 7)	31 27 (29) 30 (± 2)	11 4 (7) 5 (± 4)
S9 Mix (+)	0	116 124 (120) 119 (± 4)	21 15 (17) 16 (± 3)	31 35 (34) 37 (± 3)	39 33 (37) 39 (± 3)	10 13 (12) 12 (± 2)
	313	96 121 (117) 135 (± 20)	9 12 (11) 11 (± 2)	40 38 (39) 38 (± 1)	37 34 (36) 36 (± 2)	11 10 (10) 9 (± 2)
	625 C	119 136 (126) 123 (± 9)	14 12 (12) 10 (± 2)	37 42 (39) 37 (± 3)	30 30 (33) 39 (± 5)	10 15 (15) 20 (± 5)
	1250 C	126 123 (129) 137 (± 7)	13 22 (15) 11 (± 6)	31 37 (31) 26 (± 6)	45 38 (40) 37 (± 4)	14 16 (15) 15 (± 1)
	2500 C	149 129 (136) 129 (± 12)	13 13 (15) 18 (± 3)	34 46 (37) 30 (± 8)	38 27 (34) 38 (± 6)	15 16 (12) 6 (± 6)
	5000 C	119 129 (122) 119 (± 6)	14 20 (17) 18 (± 3)	44 33 (33) 23 (± 11)	33 41 (39) 42 (± 5)	15 13 (15) 16 (± 2)
Positive control S9 Mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 Mix (-)	Number of revertants	787 755 (758) 733 (± 27)	351 323 (329) 313 (± 20)	884 828 (828) 772 (± 56)	564 521 (539) 531 (± 23)	471 435 (446) 432 (± 22)
	Positive control S9 Mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 Mix (+)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1014 974 (984) 963 (± 27)	370 368 (379) 400 (± 18)	1051 1053 (1064) 1087 (± 20)	258 360 (307) 303 (± 51)	111 192 (167) 198 (± 49)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃:sodium azide
 NNG:N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)
(\pm S.D.)

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの 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 Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を、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。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法の24時間処理では50 µg/ml, 48時間処理では25 µg/ml, 短時間処理法のS9 mix存在下では200 µg/ml, S9 mix非存在下では80 µg/mlを最高濃度とし、以下、それぞれ公比2で4用量を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、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出現頻度は5%未満であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下の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出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下ではリン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1994年8月, 入手時:継代14代, 凍結時:17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5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(CS:GIBCO LABORATORIES, ロット番号:43N1140)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 × 10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたデイツシュ(径6cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37℃のCO₂インキュベーター(5%CO₂)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix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(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステル(CAS No.:1241-94-7, ロット番号:K70801, 純度:91.4%, 大八化学工業(株)製造)は、分子量362.44の水に不溶な無色透明液体であり通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はアセトン(和光純薬工業(株), ロット番号:ESP2354)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1(v/v)%になるように加えた。なお、被験物質の秤量に際しては、純度換算を実施した。

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細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の生存細胞を数え、陰性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(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの約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、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ33, 13 µg/mlであった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ131, 57 µg/mlであった(Fig.1)。

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最高濃度は、連続処理法の24時間処理では50 µg/ml, 48時間処理では25 µg/ml, 短時間処理法のS9 mix存在下では200 µg/ml, S9 mix非存在下では80 µg/mlとし、以下、それぞれ公比2で4用量を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:051AEG)を0.03 µg/ml, 短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:AX01)を20 µg/mlを設定した。

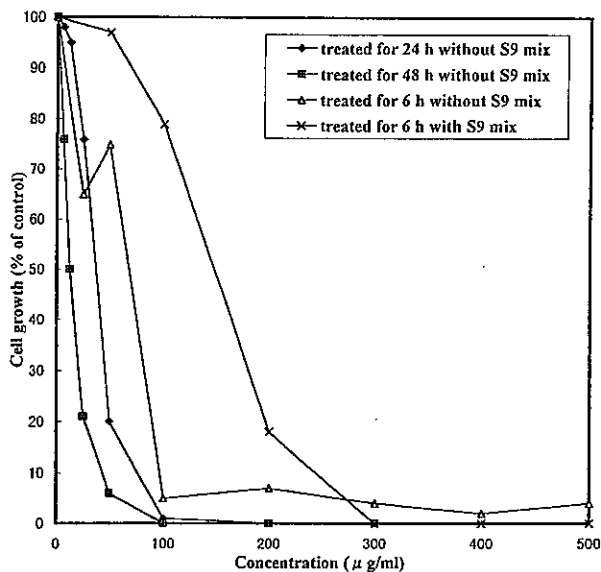


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate

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。染色体標本之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2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20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枚のディッシュから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)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、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾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

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルを加えて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。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニ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。

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: 西富 保
 試験担当者: 水野 文夫, 太田 絵律奈
 中川 宗洋, 穴澤(岩井)由美子
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Tamotsu Nishitomi (Study director)
 Fumio Mizuno, Erina Ohta
 Munehiro Nakagawa,
 Yumiko Anazawa (Iwai)
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate without S9 mix

Group	Concentration (µg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations			Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)	SA		NA	
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
DEP	6.25	24	200	1	1	0	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.5	-	-	
	12.5	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	25	24	200	0	0	1	1	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	50	24	200	0	1	2	0	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-	
MC	0.03	24	200	1	27	18	0	1	0	47	41 (20.5)	41 (20.5)	0.0	+	-	
Solvent	0	48	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
DEP	3.13	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	6.25	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	12.5	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
	25	48	200	0	0	0	1	1	0	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
MC	0.03	48	200	0	14	32	5	1	1	53	48 (24.0)	48 (24.0)	0.0	+	-	

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), -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DEP: diphenyl 2-ethylhexyl phosphate, MC: mitomycin C

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate with and without S9 mix

Group	Concentration (µg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations			Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)	SA		NA	
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-	
DEP	10	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	20	-	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	40	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
	80	-	6-(18)	100	0	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.5	-	-	
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
DEP	25	+	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	50	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
	100	+	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.5	-	-	
BP	20	+	6-(18)	Toxic 200	4	55	162	0	0	0	221	166 (83.0)	167 (83.5)	0.0	+	-	

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), -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DEP: diphenyl 2-ethylhexyl phosphate, BP: benzo[a]pyrene

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).