

り、1000 mg/kg 投与群の雌雄で有意差が認められた。しかし、赤血球中のコリンエステラーゼ活性に変化は認められなかった。その他、統計学的に有意差のみられた変化として、雌では、300 および 1000 mg/kg 投与群において A/G 比の低下、100 および 1000 mg/kg 投与群において尿素窒素濃度が低下し、各被験物質投与群でクレアチニン濃度の低下が認められた。さらに、300 mg/kg 投与群で LDH 活性の低下、1000 mg/kg 投与群でカリウム濃度の低下、GPT および γ -GTP 活性の上昇が認められた。一方、雄では、各被験物質投与群でカリウム濃度の低下が認められたほか、300 mg/kg 投与群でアルブミン濃度の低下およびクレアチニン濃度の上昇が認められた。しかし、これらの変化には、いずれも用量依存性は認められなかった。また、雄の 1000 mg/kg 投与群でカルシウム濃度の上昇が認められた。その他の検査項目では、溶媒対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群において雌で総コレステロール濃度、雄で GOT 活性がそれぞれ有意に上昇し、さらに雄ではカルシウム濃度およびカリウム濃度が有意に低下した。

7. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 10~11)

投与期間終了時屠殺剖検例では、1000 mg/kg 投与群の雌雄において、肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。また、300 mg/kg 投与群の雌においても肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。さらに、1000 mg/kg 投与群の雌において副腎の相対重量が有意に増加したが、その他には溶媒対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

回復試験期間終了時屠殺剖検例では、1000 mg/kg 投与群の雌の腎臓で絶対重量が有意に低下した。

2) 剖検所見

投与期間終了時屠殺剖検例では、肝臓に 1000 mg/kg 投与群の雌 5 例、雄 4 例、300 mg/kg 投与群の雌 3 例、および 100 mg/kg 投与群の雄 1 例に小葉像の明瞭化が認められ、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に腫大が認められた。また、1000 mg/kg 投与群の雌 2 例、雄 1 例および 300 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に黄色化が、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例、300 mg/kg 投与群の雌 1 例に褐色化が、1000 および 300 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に暗色化が観察された。その他、対照群あるいは被験物質投与群の 1 部の例で肺に暗色点あるいは赤色点、胃に暗色あるいは赤色点、陥凹部、ヘマチン様物質の付着、胸腺に赤色点、皮膚の脱毛あるいは痂皮が観察されたが、いずれも散発的で用量に依存した変化ではなかった。

回復試験期間終了時屠殺剖検例では、用量に依存した異常所見は認められなかった。

3) 病理組織学所見 (Table 12~13)

投与期間終了時屠殺剖検例では、雌雄の溶媒対照群を

含む各被験物質投与群の肝臓に小肉芽腫が観察され、雌では 300 mg/kg 投与群で変化の程度が有意に増強した。雄では溶媒対照群と被験物質投与群との間に発生頻度および病変の程度に差は見られなかった。また、溶媒対照群および各被験物質投与群の雌雄に小葉周辺帯に微細空胞を持つ肝細胞が観察され、1000 mg/kg 投与群の雌で、その発生頻度あるいは程度が有意に増強した。その他に、1000 mg/kg 投与群の雌の 2 例に軽微な細胞質のスリガラス状変化を伴った軽微な小葉中心性肝細胞の肥大が観察された。

腎臓では、その他、好塩基性尿細管上皮、尿細管上皮に好酸性微細顆粒あるいは eosinophilic body が観察され、好酸性円柱も認められたほか、脾臓では、単細胞壊死が、副腎では、束状帯の微細空胞化が、心臓では、右心室に小肉芽腫が観察されたが、いずれもその発生は散発的であり用量依存性も認められなかった。

回復試験期間終了時屠殺剖検例では、肝臓において、小肉芽腫が、小葉周辺帯の肝細胞の空胞化が、腎臓では、尿細管上皮に好酸性微細顆粒、eosinophilic body、軽微なリンパ球浸潤が、脾臓では、単細胞壊死が、副腎では、束状帯の空胞化が観察されたが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。なお、脾臓では、溶媒対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌雄全例に軽微から軽度の髄外造血が観察され、1000 mg/kg 投与群の雌雄ともに変化の程度が強くなる傾向が見られた。

この他、投与期間終了時あるいは回復試験期間終了時の屠殺剖検では、腎臓の鉍質沈着、脾臓の鬱血、腺胃のびらん等が観察されたが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。

考察

プラスチックあるいは合成ゴムの可塑剤、難燃剤、床磨き剤の添加剤等として家庭用品に広く使用されているリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの 100, 300 および 1000 mg/kg を、雌雄の Sprague-Dawley 系 (Cj:CD) ラットに 1 日 1 回、28 日間にわたって反復経口投与した。その結果、一般状態の変化として、1000 mg/kg 投与群の雌において、初回投与時に脱力、うずくまり、軟便等の急性症状が認められたが、3 時間前後で回復し、それ以後の投与時には認められなかった。さらに、雌雄とも被験物質投与群の全例で、投与直後に一過性の流涎が観察されたが、その多くは投与第 2 日以降に発現し、投与を重ねるに従って流涎のみられる例数が増加する傾向にあり、特に、1000 mg/kg 投与群の雌では、投与の保定時から認められることもあった。リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、粘膜に対して刺激性を有することが明らかにされていることから、本試験で観察された流涎は、被験物質の粘膜刺激性に対する反応であり、連続投与により条件反射が成立したものと考えられる。

血液生化学検査では、投与期間終了時の雌雄ともに血漿中のコリンエステラーゼ活性が用量依存的に低下する

傾向が認められ、1000 mg/kg 投与群の雌雄で有意差が認められた。リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、いわゆる有機燐剤の一つであり、ある種の有機燐剤は、コリンエステラーゼ活性阻害作用を有しており、神経接合部でのコリンエステラーゼ活性を阻害することにより神経障害を惹起することが明らかにされている²⁾。津田ら³⁾はリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの Wistar 系ラットにおける14週間反復経口(混餌)投与毒性試験において血清中のコリンエステラーゼ活性が約50%低下するが、明らかな神経症状はみられないと報告している。従って、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルがコリンエステラーゼ活性阻害作用を有している可能性が示唆されるが、本試験においてもコリンエステラーゼ活性阻害により惹起される特徴的な急性の神経症状は無く、赤血球中のコリンエステラーゼ活性にも差が認められなかったことから、その作用は非常に弱いものであると判断される。その他いくつかの検査項目で溶媒対照群と比べ有意差が認められたが、用量依存性がみられないことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。また、これらの血液生化学変化に対応した病理形態学的変化も認められなかった。

病理学検査では、投与期間終了時剖検屠殺例の肝臓において、1000 mg/kg 投与群の雌雄で絶対重量および相対重量の増加が、300 mg/kg 投与群の雌でも絶対重量および相対重量の増加が認められ、雌雄ともに、300 mg/kg 以上の投与群で小葉周辺帯の肝細胞の空胞性変化の発生頻度あるいは程度が増強する傾向が認められた。1000 mg/kg 投与群の雌の2例に軽微な小葉中心性の肝細胞の肥大が認められたが、細胞質がスリガラス状を呈していることから薬物代謝酵素が誘導されている可能性が示唆された。前述の Wistar 系ラットを用いた津田らの報告においてもリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル3%混餌投与群で小葉周辺帯の肝細胞の腫大が認められることを明らかにしていることから、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、肝細胞を標的臓器としている可能性が高いが、本試験からその作用機序を明らかにすることは出来なかった。なお、肝細胞の小肉芽腫は、通常のSD系ラットにもみられる変化であるが、雌のリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル300 mg/kg 以上の投与群で、変化の程度が増強されていることから、小葉周辺帯の肝細胞の空胞変性のみならず、壊死、脱落が加わっている可能性が高い。その他の器官においても、変化が認められたが、発生頻度も少なく、用量依存性も認められなかったことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

尿検査では、投与期間終了週において、1000 mg/kg 投与群の雌雄で尿量の増加傾向が認められたが、生理的変動の範囲内であった。また、300 mg/kg 投与群の雄の1例にビリルビン陽性が見られたが、出現頻度も少なく、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

血液学検査では、投与期間終了時の検査で、1000 mg/kg 投与群の雌および300 mg/kg 投与群の雄において、白血球数の減少が認められ、回復試験期間終了時の

検査においても1000 mg/kg 投与群の雄において白血球数の減少が認められた。しかし、これらはいずれも生理的変動範囲内の変化であり、これに伴う白血球百分比の変化がみられないことから偶発的な所見である可能性が高いと考えられる。また、その他の検査項目においても有意差が認められたが、いずれも、生理的変動範囲内を超えるものではなかった。

なお、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル投与により発現したと考えられる上記の変化は、14日間の休業した例では観察されなかったことから、休業後すみやかに回復し得る変化であると考えられる。

以上のことから、本試験条件下におけるリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの無影響量は、雌雄とも100 mg/kg であると考えられる。

文献

- 1) W. Pilz, "Methods of Enzymatic Analysis," 2nd ed. vol. 2, Academic Press, New York, 1974, p. 844.
- 2) M. Tsuda, M. Saitoh, T. Umemura, *J. Toxicol.*, 18, 421(1993).

連絡先

試験責任者：今井 清

試験担当者：関 剛幸，加藤博康，小島幸一，
稲田浩子，中尾美津男，畔上二郎，
永田伴子，三枝克彦

(財)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: Kiyosi Imai (Study Director)

Takayuki Seki, Hiroyasu Katoh,

Kohichi Kojima, Hiroko Inada,

Mitsuo Nakao, Jiro Azegami,

Tomoko Nagata, Katsuhiko Saegusa

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 Urinalysis of rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

		(at day 23)																								
Sex	Group	N	Volume (ml/24hr)	Specific gravity	Color ^{a)}			Turbidity ^{c)}					pH					Protein ^{d)} - ± + ++	Glucose ^{e)} - ± +	Ketone ^{e)} - ± +	Bilirubin ^{e)} - +	Occult blood ^{e)} - +	Urobilinogen ^{f)} - ± +			
					ly	y	-	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	5	6	7							8	9	
Female	Control	5	12.0±4.0 ^{b)}	1.058±0.009 ^{b)}	4	1	5	0	0	0	3	1	0	1	5	0	0	5	5	0	5	0				
	100 mg/kg	5	16.1±6.7	1.050±0.013	4	1	5	0	0	0	1	4	0	0	4	1	0	5	5	0	5	0				
	300 mg/kg	5	15.7±3.9	1.048±0.009	5	0	5	0	1	0	0	2	1	1	4	1	0	5	4	1	5	0	5	0		
	1000 mg/kg	5	18.7±6.0	1.043±0.010	5	0	5	1	0	2	0	2	0	0	3	1	1	5	4	1	5	0	5	4	1	
Male	Control	5	14.8±1.6	1.055±0.006	5	0	5	0	0	0	1	2	0	2	0	0	5	5	2	3	0	5	5	0	5	0
	100 mg/kg	5	12.9±2.3	1.058±0.015	3	2	5	0	0	0	1	3	0	1	0	1	4	5	2	1	2	5	0	5	5	0
	300 mg/kg	5	14.3±5.3	1.048±0.014	5	0	5	0	1	0	1	2	1	0	0	1	3	5	0	5	4	1	5	5	5	0
	1000 mg/kg	5	20.4±7.9	1.045±0.013	5	0	5	0	0	0	2	1	1	1	1	0	2	3	5	4	1	5	0	5	5	0

a) Mean±S.D.

b) ly:light yellow, y:yellow

c) -:negative, ±:trace, +:slight

d) -:negative, ±:trace, +:30 mg/dl, ++:100 mg/dl

e) -:negative,

f) ±:0.1 EU/dl, +:1.0 EU/dl

Table 2 Urinalysis (sediment) of rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

		(at day 23)										
Sex	Group	N	Red blood cell ^{a)}		Crystal ^{b)}			Cast ^{a)}	White blood cell ^{a)}		Epithelial cell ^{b)}	
			-	±	-	±	+	-	-	-	±	
Female	Control	5	5	0	5	0	5	5	5	2	3	
	100 mg/kg	5	5	0	5	0	5	5	3	2		
	300 mg/kg	5	5	0	2	3	5	5	2	3		
	1000 mg/kg	5	5	0	5	0	5	5	0	5		
Male	Control	5	5	0	3	2	5	5	2	3		
	100 mg/kg	5	5	0	3	2	5	5	1	4		
	300 mg/kg	5	5	0	3	2	5	5	0	5		
	1000 mg/kg	5	5	0	5	0	5	5	2	3		

a) -:not observed

b) -:not observed, ±:a few, +:abundant

28日間反復投与毒性試験

Table 3 Urinalysis in rats at 9-day recovery period after oral administration with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	Volume (ml/24hr)	Specific gravity	Color ^{a)}		Turbidity ^{c)}		pH					Protein ^{d)}	Glucose ^{e)}	Ketone ^{f)}	Bilirubin ^{e)}	Occult blood ^{e)}	Urobilinogen ^{f)}				
					ly	y	-	+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	-	±	+	-	-	±	+	-	-	±
Female	Control	5	21.1±4.9 ^{a)}	1.042±0.010 ^{a)}	5	0	4	1	1	0	2	1	1	5	0	0	5	5	0	0	5	5	5
	1000 mg/kg	5	18.1±3.1	1.048±0.004	5	0	4	1	0	2	1	1	1	5	0	0	5	5	0	0	5	5	5
Male	Control	5	22.0±1.2	1.048±0.002	5	0	4	1	0	0	3	1	1	0	1	4	5	0	1	4	5	5	5
	1000 mg/kg	5	30.2±14.6	1.042±0.020	4	1	3	2	0	1	0	1	3	1	2	2	5	2	2	1	5	5	5

a) Mean±S.D., b) ly:light yellow, y:yellow, c)-:negative, ±:trace, +:slight, d)-:negative, ±:trace, +:30 mg/dl, e)-:negative, f) ±:0.1 EU/dl

Table 4 Urinalysis (sediment) in rats at 9-day recovery period after oral administration with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	Red blood cell ^{a)}				Crystal ^{b)}			Cast ^{a)}	White blood cell ^{a)}			Epithelial cell ^{b)}	
			-	-	±	+	-	-	±	+	-	-	±	-	±
Female	Control	5	5	1	4	0	5	5	3	2					
	1000 mg/kg	5	5	1	4	0	5	5	2	3					
Male	Control	5	5	0	2	3	5	5	2	3					
	1000 mg/kg	5	5	0	4	1	5	5	0	5					

a)-:not observed, b)-:not observed, ±:a few, +:abundant

Table 5 Hematological findings of rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	RBC (×10 ⁶ /mm ³)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μm ³)	MCH (pg)	MCHC (%)	Reticulo-cyte (%)	WBC (×10 ³ /mm ³)	Differential count of WBC (%)							Platelet (×10 ³ /mm ³)	PT (sec)	APTT (sec)
											Neutro.	Band	Seg.	Eos.	Baso.	Mon.	Lymph.			
Female	Control	5	674 ± 33	13.9 ± 0.6	40.7 ± 1.8	60.3 ± 1.6	20.6 ± 0.8	34.2 ± 0.6	1.9 ± 0.7	74 ± 15	0 ± 0	7 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	92 ± 3	103.9 ± 4.4	12.8 ± 0.5	24.6 ± 2.5	
	100 mg/kg	5	653 ± 43	13.7 ± 0.7	39.1 ± 1.9	59.8 ± 1.1	20.9 ± 0.5	35.0* ± 0.4	2.1 ± 0.5	67 ± 11	0 ± 0	9 ± 4	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	88 ± 6	103.6 ± 9.1	12.5 ± 0.4	25.3 ± 2.2	
	300 mg/kg	5	647 ± 14	13.6 ± 0.2	38.5 ± 0.8	59.4 ± 0.6	21.0 ± 0.2	35.4** ± 0.2	2.0 ± 0.8	57 ± 8	0 ± 0	9 ± 5	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	89 ± 7	114.6 ± 11.7	12.7 ± 0.7	23.7 ± 1.9	
	1000 mg/kg	5	692 ± 30	14.2 ± 0.5	40.9 ± 1.4	59.1 ± 1.8	20.5 ± 0.9	34.7 ± 0.6	1.4 ± 0.2	51* ± 14	0 ± 0	11 ± 4	2 ± 3	0 ± 0	2 ± 2	85 ± 6	122.9* ± 10.2	13.8 ± 1.2	24.4 ± 1.9	
Male	Control	5	678 ± 13	14.1 ± 0.2	41.4 ± 0.7	61.1 ± 1.1	20.8 ± 0.3	34.1 ± 0.3	2.6 ± 0.5	78 ± 10	0 ± 0	8 ± 3	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 1	89 ± 4	120.8 ± 6.0	18.0 ± 1.6	28.8 ± 1.2	
	100 mg/kg	5	654 ± 27	13.6 ± 0.4	40.4 ± 1.5	61.8 ± 1.6	20.8 ± 0.6	33.7 ± 0.3	2.6 ± 0.8	90 ± 25	0 ± 0	11 ± 6	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	88 ± 6	115.5 ± 13.1	19.1 ± 2.8	28.6 ± 3.0	
	300 mg/kg	5	665 ± 20	13.7 ± 0.4	40.4 ± 1.0	60.9 ± 1.1	20.6 ± 0.2	33.8 ± 0.4	2.2 ± 0.2	50* ± 6	0 ± 0	10 ± 2	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	88 ± 3	110.9 ± 7.6	19.8 ± 2.2	30.6 ± 4.5	
	1000 mg/kg	5	672 ± 40	14.2 ± 0.5	41.9 ± 1.2	62.5 ± 2.7	21.2 ± 0.8	34.0 ± 0.5	2.0 ± 0.7	63 ± 13	0 ± 0	11 ± 6	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	85 ± 7	124.5 ± 10.9	22.1 ± 5.4	32.4 ± 4.7	

Parameter: mean±S.D. *:Significantly different from control, p<0.05
 **:Significantly different from control, p<0.01

Table 6 Hematological findings of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	RBC ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)	Reticulo- cyte (%)	WBC ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	Differential count of WBC(%)							Platelet ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	PT (sec)	APTT (sec)
											Neutro.		Eos.	Baso.	Mono.	Lymph.				
											Band	Seg.								
Female	Control	5	741 ± 52	14.6 ± 1.2	42.5 ± 2.4	57.6 ± 1.3	19.7 ± 0.5	34.3 ± 1.1	1.9 ± 0.8	72 ± 20	0 ± 0	11 ± 7	2 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	85 ± 9	119.4 ± 4.7	11.1 ± 0.2	23.3 ± 1.1	
	1000 mg/kg	5	763 ± 20	15.1 ± 0.6	43.6 ± 1.5	57.2 ± 1.4	19.8 ± 0.6	34.6 ± 0.6	1.8 ± 0.2	66 ± 16	0 ± 0	9 ± 5	2 ± 2	0 ± 0	1 ± 1	88 ± 3	111.7 ± 11.1	11.3 ± 0.4	24.3 ± 1.8	
Male	Control	5	740 ± 71	14.7 ± 1.1	43.0 ± 2.7	58.4 ± 2.9	20.0 ± 1.0	34.2 ± 0.5	1.9 ± 1.0	88 ± 19	0 ± 0	9 ± 7	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 1	89 ± 7	116.0 ± 9.1	13.2 ± 1.6	28.3 ± 2.9	
	1000 mg/kg	5	762 ± 29	15.0 ± 0.5	43.9 ± 1.6	57.7 ± 1.8	19.7 ± 0.6	34.1 ± 0.2	2.0 ± 0.2	57* ± 6	0 ± 0	12 ± 5	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	86 ± 7	109.7 ± 6.7	15.5 ± 2.0	30.6 ± 2.7	

Parameter: mean \pm S.D. *:Significantly different from control, $p < 0.05$

Table 7 Biochemical findings of female rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Group	N	Total	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total	Triglyceride (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)	Ca (mg/dl)
		protein (g/dl)						cholesterol (mg/dl)			
Control	5	5.5 ± 0.2	3.3 ± 0.2	1.56 ± 0.08	20 ± 3	0.8 ± 0.1	121 ± 11	65 ± 12	44 ± 5	6.8 ± 0.6	8.9 ± 0.2
100 mg/kg	5	5.6 ± 0.3	3.3 ± 0.2	1.42 ± 0.10	14** ± 3	0.6** ± 0.1	110 ± 9	71 ± 10	88 ± 34	6.3 ± 0.6	9.0 ± 0.2
300 mg/kg	5	5.7 ± 0.2	3.3 ± 0.2	1.37** ± 0.08	16 ± 2	0.7** ± 0.1	109 ± 6	74 ± 7	64 ± 30	6.1 ± 0.5	9.1 ± 0.1
1000 mg/kg	5	5.8 ± 0.2	3.2 ± 0.1	1.23** ± 0.08	14** ± 2	0.6** ± 0.1	111 ± 14	73 ± 9	73 ± 48	6.0 ± 0.5	9.1 ± 0.2

Group	N	Na	K (mEq/dl)	Cl (mEq/dl)	ALP (U/l)	LDH (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	γ -GTP (U/l)	ChE (U/l)	RBC-ChE (U/g Hb)
		(mEq/l)									
Control	5	145.8 ± 0.8	4.44 ± 0.36	108.8 ± 1.3	270 ± 80	142 ± 31	19 ± 2	54 ± 5	0 ± 0	1531 ± 638	28.2 ± 2.6
100 mg/kg	5	145.2 ± 1.2	4.08 ± 0.24	108.9 ± 1.0	227 ± 53	114 ± 27	20 ± 3	53 ± 5	0 ± 0	1070 ± 178	30.1 ± 2.0
300 mg/kg	5	144.6 ± 0.4	4.19 ± 0.08	109.6 ± 0.2	216 ± 24	89** ± 8	23 ± 3	51 ± 3	1 ± 1	772 ± 97	31.0 ± 2.4
1000 mg/kg	5	146.4 ± 1.3	3.93* ± 0.27	109.8 ± 2.3	207 ± 43	106 ± 20	25* ± 3	50 ± 7	2* ± 2	505** ± 160	32.6 ± 2.1

Parameter: Mean \pm S.D. *:Significantly different from control, $p < 0.05$ **:Significantly different from control, $p < 0.01$

Table 8 Biochemical findings of male rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Group	N	Total					Total			Inorg. phos. (mg/dl)	Ca (mg/dl)
		protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)		
Control	5	5.4 ± 0.2	3.1 ± 0.1	1.40 ± 0.13	12 ± 2	0.6 ± 0.0	120 ± 7	46 ± 11	44 ± 6	6.7 ± 0.3	8.8 ± 0.3
100 mg/kg	5	5.1 ± 0.2	2.9 ± 0.1	1.33 ± 0.09	13 ± 1	0.6 ± 0.0	111 ± 13	50 ± 10	46 ± 17	7.0 ± 0.5	8.9 ± 0.2
300 mg/kg	5	5.2 ± 0.2	2.9* ± 0.1	1.29 ± 0.16	12 ± 2	0.7* ± 0.0	117 ± 12	48 ± 4	43 ± 14	6.7 ± 0.5	8.8 ± 0.2
1000 mg/kg	5	5.6 ± 0.1	3.1 ± 0.0	1.25 ± 0.04	13 ± 1	0.6 ± 0.1	119 ± 16	51 ± 10	49 ± 14	6.7 ± 0.4	9.5** ± 0.3

Group	N	Na	K	Cl	ALP	LDH	GPT	GOT	γ-GTP	ChE	RBC-ChE
		(mEq/l)	(mEq/dl)	(mEq/dl)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/g Hb)
Control	5	144.0 ± 0.5	4.22 ± 0.11	106.8 ± 0.8	413 ± 45	174 ± 41	27 ± 4	67 ± 5	0 ± 0	382 ± 35	30.4 ± 1.5
100 mg/kg	5	144.9 ± 0.5	3.79** ± 0.12	107.6 ± 1.1	315 ± 32	132 ± 39	23 ± 4	60 ± 5	0 ± 0	341 ± 43	31.3 ± 2.2
300 mg/kg	5	145.2 ± 0.6	3.82** ± 0.11	108.3 ± 0.7	380 ± 96	228 ± 81	27 ± 5	73 ± 15	0 ± 0	335 ± 19	30.9 ± 1.5
1000 mg/kg	5	145.0 ± 0.9	3.76** ± 0.06	107.3 ± 1.5	365 ± 33	142 ± 33	27 ± 5	65 ± 5	0 ± 1	280** ± 49	31.5 ± 1.3

Parameter: Mean±S.D. *: Significantly different from control, p<0.05

**: Significantly different from control, p<0.01

Table 9 Biochemical findings of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test (recovery test)

Sex	Group	N	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)	Ca (mg/dl)
Female	Control	5	5.8 ± 0.5	3.5 ± 0.3	1.51 ± 0.10	20 ± 3	0.8 ± 0.1	151 ± 24	66 ± 14	59 ± 23	7.1 ± 1.0	9.0 ± 0.3
	1000 mg/kg	5	6.0 ± 0.4	3.5 ± 0.2	1.42 ± 0.08	21 ± 3	0.8 ± 0.0	126 ± 20	85* ± 7	54 ± 16	7.0 ± 1.5	9.2 ± 0.3
Male	Control	5	5.6 ± 0.2	3.0 ± 0.2	1.16 ± 0.14	17 ± 1	0.7 ± 0.1	136 ± 11	56 ± 12	57 ± 18	6.4 ± 0.6	9.1 ± 0.1
	1000 mg/kg	5	5.6 ± 0.3	3.2 ± 0.3	1.32 ± 0.13	17 ± 2	0.7 ± 0.0	132 ± 17	46 ± 5	48 ± 8	6.2 ± 0.3	8.8* ± 0.2

Sex	Group	N	Na (mEq/l)	K (mEq/dl)	Cl (mEq/dl)	ALP (U/l)	LDH (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	γ-GTP (U/l)	ChE (U/l)	RBC-ChE (U/g Hb)
Female	Control	5	144.9 ± 1.5	5.17 ± 0.56	109.2 ± 1.8	137 ± 35	337 ± 197	26 ± 7	64 ± 9	0 ± 0	1560 ± 681	23.2 ± 0.8
	1000 mg/kg	5	145.8 ± 1.3	4.68 ± 0.28	108.2 ± 1.4	165 ± 21	152 ± 53	21 ± 2	55 ± 5	1 ± 1	1109 ± 254	23.8 ± 2.0
Male	Control	5	147.1 ± 0.7	4.29 ± 0.30	109.7 ± 0.9	254 ± 42	183 ± 117	24 ± 3	59 ± 5	0 ± 0	396 ± 90	24.3 ± 1.3
	1000 mg/kg	5	147.7 ± 0.4	3.89* ± 0.08	109.4 ± 1.3	278 ± 81	215 ± 82	28 ± 7	73* ± 10	0 ± 1	337 ± 51	24.8 ± 0.8

Parameter: Mean±S.D. *: Significantly different from control, p<0.05

Table 10 Organ weights of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	Body weight (g)	Absolute					Relative				
				Brain (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries/Testes (mg)	Brain (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries/Testes (mg/g)
Female	Control	5	229.2 ± 11.4	1744.9 ± 58.6	7141.5 ± 592.3	1723.2 ± 121.3	59.2 ± 8.0	87.2 ± 10.8	7.630 ± 0.462	31.154 ± 1.971	7.515 ± 0.215	0.258 ± 0.025	0.381 ± 0.049
	100 mg/kg	5	232.6 ± 9.7	1801.1 ± 53.8	7593.6 ± 534.5	1693.6 ± 133.0	59.5 ± 8.0	89.5 ± 13.0	7.753 ± 0.371	32.615 ± 1.070	7.288 ± 0.624	0.255 ± 0.023	0.383 ± 0.041
	300 mg/kg	5	234.3 ± 22.8	1730.3 ± 37.3	8447.6* ± 1040.8	1804.8 ± 147.7	65.5 ± 5.3	92.3 ± 13.7	7.446 ± 0.792	36.026** ± 2.159	7.716 ± 0.364	0.280 ± 0.006	0.393 ± 0.032
	1000 mg/kg	5	227.4 ± 17.5	1712.5 ± 23.3	9288.2** ± 867.8	1753.8 ± 138.5	69.4 ± 5.1	75.5 ± 4.6	7.563 ± 0.561	40.848** ± 2.360	7.722 ± 0.491	0.306** ± 0.020	0.334 ± 0.036
Male	Control	5	363.6 ± 25.0	1971.3 ± 88.8	12306.8 ± 902.8	2562.4 ± 101.1	45.9 ± 3.7	2918.4 ± 220.2	5.440 ± 0.406	33.855 ± 1.249	7.076 ± 0.602	0.127 ± 0.018	8.086 ± 1.150
	100 mg/kg	5	351.0 ± 27.4	1924.2 ± 58.0	12336.4 ± 1655.8	2644.4 ± 217.3	48.6 ± 2.3	2946.6 ± 96.3	5.510 ± 0.476	35.070 ± 2.544	7.549 ± 0.526	0.139 ± 0.010	8.434 ± 0.670
	300 mg/kg	5	360.1 ± 14.6	1985.6 ± 42.9	12566.2 ± 1142.0	2685.7 ± 155.4	57.7 ± 20.6	3092.1 ± 132.9	5.518 ± 0.130	34.842 ± 1.892	7.455 ± 0.189	0.160 ± 0.059	8.603 ± 0.598
	1000 mg/kg	5	362.8 ± 20.5	1921.8 ± 48.4	15275.0** ± 1076.0	2668.7 ± 221.6	51.2 ± 7.5	3015.1 ± 160.4	5.306 ± 0.181	42.159** ± 2.991	7.350 ± 0.257	0.141 ± 0.021	8.334 ± 0.661

Parameter: mean±S.D. *:Significantly different from control, p<0.05
 **:Significantly different from control, p<0.01

Table 11 Organ weights of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test (recovery test)

Sex	Group	N	Body weight (g)	Absolute					Relative				
				Brain (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries/Testes (mg)	Brain (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries/Testes (mg/g)
Female	Control	5	273.4 ± 30.9	1803.9 ± 21.5	8166.7 ± 786.6	2038.9 ± 109.7	75.4 ± 15.6	90.0 ± 4.9	6.675 ± 0.851	29.976 ± 2.120	7.507 ± 0.609	0.278 ± 0.065	0.334 ± 0.054
	1000 mg/kg	5	246.7 ± 16.5	1773.2 ± 60.3	7370.0 ± 784.2	1723.7** ± 80.7	65.4 ± 5.3	83.2 ± 10.4	7.210 ± 0.487	29.877 ± 2.647	6.999 ± 0.355	0.266 ± 0.018	0.338 ± 0.044
Male	Control	5	456.6 ± 34.5	2031.3 ± 76.5	14512.9 ± 2481.9	3057.0 ± 224.3	59.2 ± 4.2	3452.8 ± 348.6	4.460 ± 0.225	31.615 ± 2.815	6.702 ± 0.344	0.130 ± 0.008	7.635 ± 1.232
	1000 mg/kg	5	420.1 ± 24.1	1984.1 ± 84.6	13268.0 ± 1322.1	2947.4 ± 136.1	58.3 ± 6.3	3277.4 ± 193.7	4.729 ± 0.187	31.524 ± 1.578	7.032 ± 0.464	0.140 ± 0.021	7.817 ± 0.537

Parameter: mean±S.D. **:Significantly different from control, p<0.01

Table 12 Summary of microscopic findings of rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twentieth-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Pathological findings	Control					100 mg/kg					300 mg/kg					1000 mg/kg								
		-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
Female	(Heart)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	microgranuloma in the right ventricle	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
	(pancreas)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	single cell necrosis	4	1	0	0	0	1	4	0	1	0	0	1	2	3	0	0	0	3	4	1	0	0	0	1
	(Liver)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	microgranuloma	1	4	0	0	0	4	0	4	1	0	0	5	0	1	4	0	0*	5	1	1	3	0	0	4
	fine vacuolation of hepatocyte																								
	in the peripheral zone	1	4	0	0	0	4	1	3	1	0	0	4	0	3	2	0	0	5	0	0	2	3	0**	5
	Kupffer cell proliferation	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	hypertrophy of hepatocyte, ground glass appearance in the central zone	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2
	(Kidney)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	basophilic tubular epithelium	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3
	infiltration of lymphocytes	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
	eosinophilic granules in the tubular epithelium	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	mineral deposits	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	eosinophilic cast	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
	(Spleen)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	extramedullary hematopoiesis	0	5	0	0	0	5	1	3	1	0	0	4	0	5	0	0	0	5	0	4	1	0	0	5
	yellow pigments	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0
	acute congestion	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
follicular hyperplasia	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	2	5	0	0	0	0	0	
(Adrenal gland)	[5]					[5]					[5]					[5]									
fine vacuolation in the zona fasciculata	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	
Male	(Pancreas)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	single cell necrosis	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	3
	(Liver)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	microgranuloma	0	3	2	0	0	5	0	2	3	0	0	5	0	3	2	0	0	5	1	1	3	0	0	4
	fine vacuolation of hepatocyte																								
	in the peripheral zone	2	3	0	0	0	3	2	2	1	0	0	3	0	2	3	0	0	5	0	2	3	0	0	5
	(Kidney)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	basophilic tubular epithelium	4	0	1	0	0	1	2	3	0	0	0	3	1	4	0	0	0	4	3	2	0	0	0	2
	eosinophilic granules in the tubular epithelium	0	3	2	0	0	5	3	2	0	0	0	2	1	1	3	0	0	4	0	0	5	0	0	5
	eosinophilic body																								
	in the tubular epithelium	4	0	1	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	2
	infiltration of lymphocytes	3	2	0	0	0	2	4	1	0	0	0	1	1	4	0	0	0	4	3	2	0	0	0	2
	eosinophilic cast	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	(spleen)	[5]					[5]					[5]					[5]								
	extramedullary hematopoiesis	0	1	3	1	0	5	0	0	5	0	0	5	0	1	4	0	0	5	0	0	4	1	0	5
(Adrenal gland)	[5]					[5]					[5]					[5]									
fine vacuolation in the zona fasciculata	3	2	0	0	0	2	2	3	0	0	0	3	3	2	0	0	0	2	2	3	0	0	0	3	

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

*, Significantly different from control $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test)**, Significantly different from control $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test)

Table 13 Summary of microscopic findings of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test (recovery test)

Pathological findings	Female				Male			
	Control		1000 mg/kg		Control		1000 mg/kg	
	-	± + +++ Pos.	-	± + +++ Pos.	-	± + +++ Pos.	-	± + +++ Pos.
(Pancreas)	[5]		[5]		[5]		[5]	
single cell necrosis	4	1 0 0 0 1	2	3 0 0 0 3	3	2 0 0 0 2	0	2 2 1 0* 5
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
microgranuloma	1	3 1 0 0 4	0	2 3 0 0 5	0	0 5 0 0 5	0	5 0 0 0** 5
fine vacuolation of hepatocyte in the peripheral zone	4	1 0 0 0 1	3	2 0 0 0 2	0	3 2 0 0 5	1	3 1 0 0 4
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]	
basophilic tubular epithelium	4	1 0 0 0 1	5	0 0 0 0 0	2	2 1 0 0 3	2	3 0 0 0 3
infiltration of lymphocytes	4	1 0 0 0 1	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	1	4 0 0 0 4#
eosinophilic granules in the tubular epithelium	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	3	0 2 0 0 2	0	0 5 0 0 5
eosinophilic body in the tubular epithelium	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	2	1 2 0 0 3
eosinophilic cast	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	4	1 0 0 0 1
(Spleen)	[5]		[5]		[5]		[5]	
extramedullary hematopoiesis	0	5 0 0 0 0	0	3 2 0 0 5	0	2 3 0 0 5	0	0 5 0 0 5
yellow pigments	3	1 1 0 0 2	4	1 0 0 0 1	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0
(Adrenal gland)	[5]		[5]		[5]		[5]	
fine vacuolation in the zona fasciculata	5	0 0 0 0 0	4	1 0 0 0 1	1	3 1 0 0 4	1	3 1 0 0 4

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

*, Significantly different from control $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test)

***, Significantly different from control $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test)

#, significantly different from control $p < 0.05$ (Fisher exact test)

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, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*^{2,3)} 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 1 ml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
バクテリアガー(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, 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.