

階以上の陽性グレードがみられた所見については Bartlett の等分散性検定後、一元配置分散分析法あるいは Kruskal-Wallis 法により解析し、有意な場合は、Dunnett の検定法あるいは Mann-Whitney の U-検定法により、対照群と 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル各投与群との比較を行った。

対照群との検定に際しては、有意水準を 5 および 1 % とした。

結果

1. 反復投与毒性

(1) 一般状態

雌雄ともに、いずれの群にも異常は認められなかった。

(2) 体重推移 (Table 1, 2), 摂餌量および器官重量

雌雄ともに、被験物質投与と関連した変化は認められなかった。

(3) 剖検

雄では、腎臓に腎盂の拡張が 300 mg/kg 群で 1 例に、嚢胞が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められた。他に精巢上体に黄白色斑が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められ、いずれも先天的な異常と考えられた。

雌では、頭頂骨の隆起が 100 mg/kg 群の交尾不成立の 1 例に、空腸の憩室が 300 mg/kg 群の 1 例に認められた。

(4) 病理組織学検査 (Table 3, 4)

雄では、精巢の病理組織学検査で、精母細胞および精子細胞の軽度の減少が 300 mg/kg 群で 2 例、1000 mg/kg 群で 11 例、中等度の同所見が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められた。中等度の精母細胞および精子細胞の減少が認められた 1000 mg/kg 群の 1 例では精細管内に多核巨細胞の軽度の出現およびセルトリ細胞の軽度の空胞化も認められ、精巢上体には管腔内に中等度の細胞残屑ならびに精子の中等度の減少が認められた。また、剖検で精巢上体に黄白色斑が認められた 1000 mg/kg 群の 1 例では、精母細胞および精子細胞の軽度の減少の他に、精巢上体に軽度の精子肉芽腫が認められた。対照群でも 2 例に精巢で精細管の軽度の萎縮が認められ、これら 2 例では精巢上体の管腔内に軽度の細胞残屑が認められ、そのうち 1 例で精巢上体管内精子の軽度の減少が認められた。

精巢の精上皮細胞数を計数した結果、Group 1 (ステージ I ~ VI) では 300 mg/kg 群で精子細胞 (round および elongate) の低値、1000 mg/kg 群で精母細胞および精子細胞 (round および elongate) の低値が認められ、Group 2 (ステージ VII ~ VIII) では 1000 mg/kg 群で精子細胞 (round) および精子細胞 (round) のセルトリ細胞比の低値が認められた。Group 3 (ステージ IX ~ XI) では 1000 mg/kg 群で精子細胞 (elongate) および精子細胞の (elongate) のセルトリ細胞比の低値が認められ、Group 4 (ステージ XII ~ XIV) では 1000 mg/kg 群で精母細胞、精子細胞 (elongate) および精子細胞 (elongate) のセルトリ細胞比の低値が認められた。雌では、黄体嚢胞が 300

mg/kg 群の 2 例に認められた。100 mg/kg 群の交尾不成立の 1 例、対照群および 100 mg/kg 群の各 1 例では、卵巣に異常は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

(1) 生殖能検査 (Table 5)

いずれの群にも交尾成立までの日数、交尾率および受胎率に有意差は認められなかった。雌の性周期観察では、被験物質投与との関連を示唆する変化は認められなかった。なお、発情休止期の継続が投与期間に 100 mg/kg 群の 1 例で認められ、同例は交尾不成立であった。不妊例が対照群および 100 mg/kg 群で各 1 組に認められた。

(2) 分娩および母性行動 (Table 6)

いずれの群にも分娩および母性行動の観察項目に被験物質投与と関連した変化は認められなかった。

(3) 新生児の生存率 (Table 6)

いずれの群にも被験物質投与と関連した変化は認められなかった。

(4) 新生児の一般状態

いずれの例にも被験物質投与との関連を示唆する症状は認められなかった。

(5) 新生児の体重推移 (Table 6)

300 mg/kg 群の雄で哺育 4 日体重および哺育 4 日までの体重増加量に低値が認められ、同群の雌でも哺育 1 および 4 日ならびに哺育 4 日までの体重増加量に低値が認められた。

しかし、100 および 1000 mg/kg 群では対照群と比較して有意差は認められなかった。

(6) 新生児の剖検

死亡例および哺育 4 日に屠殺した新生児の剖検では、被験物質投与との関連を示唆する所見は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

雄では、精巢の病理組織学検査で 300 mg/kg 群の 2 例、1000 mg/kg 群の 12 例全例に精母細胞および精子細胞の減少が認められた。300 mg/kg 群および 1000 mg/kg 群では体重増加抑制および副生殖器の萎縮性変化は認められないことから、栄養障害あるいはホルモンのアンバランスによるものではなく、被験物質が直接、精母細胞に影響を及ぼした可能性が考えられた。一方、本スクリーニング試験と同じく 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルの 100, 300 および 1000 mg/kg/day を 28 日間経口反復投与した試験²⁾では精細胞に影響は認められていない。今回の試験で精巢上体に精子の減少が認められたのは 1000 mg/kg 群の 1 例のみであり、その他の例では精巢上体管内の精子数に異常はみられないことから、本スクリーニング試験において認められた精細胞への影響は 46 日間の投与期間の後期に発現したと考えられた。

精巣上体では1000 mg/kg群の1例で精子肉芽腫が認められたが、この所見は自然発生的にも認められ、被験物質投与によるものとは考えられなかった。

上記の他に、雌雄の一般状態、摂餌量、剖検所見および生殖器重量ならびに雌の卵巣の病理組織学所見に被験物質投与による影響は認められなかった。

以上のことから、本試験における1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル¹⁾の反復投与による無影響量は、雄で100 mg/kg/day、雌で1000 mg/kg/dayであると判断された。

2. 生殖発生毒性

生殖能検査では交尾率および受胎率などに影響は認められず、300 mg/kg群および1000 mg/kg群の全例で交尾および妊娠が成立した。このことから、前述のように46日間の投与で精細胞の減少がみられるものの、本試験における交配前14日間の投与では妊娠の成立に影響を及ぼすものではなかったと考えられた。

なお、100 mg/kg群で認められた交尾不成立例1組では雌で頭頂骨の隆起がみられたが、生殖器に交尾不成立の原因を示唆する病理組織学所見は認められず、発情休止期の継続により交尾不成立となったと考えられ、より高用量の300および1000 mg/kg群で性周期に異常は認められず、全例で交尾が成立していることから、100 mg/kg群の交尾不成立例は被験物質投与との関連はないものと考えられた。

その他、雌の性周期に対して被験物質投与による影響は認められなかった。

新生児の観察では、300 mg/kg群で新生児の雌雄に体重の低値がみられたが、用量依存性は認められないことから、被験物質投与による影響とは考えられなかった。

他に、新生児の生存性、一般状態および剖検所見に被験物質投与による影響は認められなかった。

以上のことから、本スクリーニング試験における1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル¹⁾の親世代の生殖に対する無影響量は雄で100 mg/kg/day、雌で1000 mg/kg/day、次世代の発生に対する無影響量は1000 mg/kg/dayであると判断された。

文献

- 1) H. Matsui et al., *J. Toxicol. Pathol.*, 9, 285(1996).
- 2) 井上博之ら, 化学物質毒性試験報告, 4, 701(1996).

連絡先

試験責任者: 吉村浩幸
試験担当者: 茂野 均, 古川正敏, 河村公太郎,
武田みよ子, 引地のゆみ
(株)化合物安全性研究所
〒004-0839 北海道札幌市清田区真栄363番24号
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)
Hitoshi Shigeno, Masatoshi Furukawa,
Kohtarō Kawamura, Miyoko Takeda,
Noyumi Hikichi
Safety Research Institute for Chemical
Compounds Co., Ltd.
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,
004-0839, Japan
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Body weight changes of male rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	400.3 ± 17.6	402.2 ± 16.7	400.0 ± 15.1	402.5 ± 14.4
2	400.2 ± 16.9	400.2 ± 19.1	399.5 ± 14.9	401.3 ± 17.5
5	420.7 ± 20.8	419.8 ± 23.0	419.8 ± 18.6	421.3 ± 18.1
7	430.4 ± 21.9	429.3 ± 23.7	430.7 ± 19.4	432.9 ± 20.0
10	443.3 ± 23.6	444.3 ± 28.4	445.8 ± 21.7	446.9 ± 20.6
14	461.1 ± 24.3	463.5 ± 33.0	463.0 ± 23.1	463.7 ± 20.0
21	486.3 ± 24.7	491.3 ± 38.3	489.2 ± 26.9	484.6 ± 21.0
28	511.4 ± 27.2	519.3 ± 45.2	514.1 ± 27.0	511.3 ± 22.5
35	537.6 ± 31.2	554.0 ± 46.5(11)	542.1 ± 28.2	538.2 ± 25.0
42	555.8 ± 34.3	571.7 ± 50.7(11)	561.6 ± 35.3	552.8 ± 27.4
46	566.4 ± 33.8	585.5 ± 51.1(11)	576.6 ± 34.9	560.2 ± 29.0
Day 1-46, gain	166.2 ± 24.5	181.5 ± 38.5(11)	176.6 ± 26.5	157.7 ± 21.4
Body weight gain ^a (%)	41.5 ± 5.9	44.7 ± 8.3(11)	44.1 ± 6.2	39.2 ± 5.1

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram).

Values in parentheses are no. of animals examined.

a): (Body weight gain/body weight on day 1)×100

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Before gestation period				
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	238.3 ± 14.0	239.0 ± 9.2	236.8 ± 11.6	235.4 ± 11.1
2	238.6 ± 11.1	240.2 ± 10.8	237.3 ± 13.7	237.5 ± 12.5
5	245.6 ± 15.6	248.7 ± 10.7	243.5 ± 13.8	242.3 ± 12.7
7	251.8 ± 12.5	252.6 ± 11.1	250.7 ± 12.0	247.6 ± 12.4
10	254.3 ± 15.0	258.3 ± 13.6	252.8 ± 16.2	251.4 ± 16.7
14	261.3 ± 18.0	264.1 ± 15.8	258.5 ± 17.9	257.8 ± 16.9
Day 1-14, gain	22.9 ± 10.4	25.1 ± 10.3	21.8 ± 10.8	22.3 ± 8.8
Body weight gain ^a (%)	9.6 ± 4.3	10.5 ± 4.2	9.2 ± 4.6	9.4 ± 3.6
During gestation period				
No. of animals	11	10	12	12
Day 0	267.0 ± 16.7	274.7 ± 16.5	265.6 ± 17.4	266.7 ± 18.4
1	270.8 ± 17.1	280.1 ± 16.7	273.3 ± 15.4	271.5 ± 17.3
3	285.9 ± 20.0	291.3 ± 17.6	286.8 ± 17.2	285.7 ± 18.4
5	296.2 ± 20.7	302.0 ± 17.0	295.0 ± 15.3	296.1 ± 17.7
7	304.9 ± 21.5	309.9 ± 16.7	305.0 ± 15.4	304.9 ± 19.1
10	319.2 ± 23.2	323.3 ± 18.5	319.3 ± 16.1	318.7 ± 21.7
14	343.1 ± 25.7	348.3 ± 20.0	342.7 ± 17.8	344.3 ± 20.6
17	372.1 ± 24.8	378.4 ± 23.9	372.3 ± 22.1	375.2 ± 21.6
20	420.1 ± 27.9	428.9 ± 27.0	422.2 ± 28.7	426.1 ± 22.0
Day 0-20, gain	153.1 ± 15.2	154.2 ± 15.5	156.6 ± 17.8	159.4 ± 14.9
Body weight gain ^b (%)	57.4 ± 4.9	56.2 ± 5.4	59.1 ± 6.4	60.1 ± 7.3
During lactation period				
No. of animals	11	10	12	12
Day 0	328.9 ± 28.1	327.6 ± 22.3	321.6 ± 19.6	329.5 ± 27.6
1	325.5 ± 25.4	331.5 ± 23.3	323.8 ± 23.0	326.1 ± 22.0
4	337.6 ± 26.9	343.2 ± 25.5	336.8 ± 20.6	336.6 ± 23.5
Day 0-4, gain	8.7 ± 10.1	15.6 ± 8.1	15.3 ± 8.5	7.1 ± 17.8
Body weight gain ^b (%)	2.7 ± 3.3	4.7 ± 2.4	4.8 ± 2.8	2.4 ± 5.3

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram).

a): (Body weight gain/body weight on day 1)×100

b): (Body weight gain/body weight on day 0)×100

Table 3 Number of cells in seminiferous tubules of male rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5	5
Group 1 (Stage I - VI)				
No. of Sertoli cells	20.12 ± 3.18	19.08 ± 1.49	18.52 ± 1.45	18.08 ± 1.45
Spermatogonia				
No.	16.80 ± 5.65	20.52 ± 2.58	18.48 ± 3.17	15.76 ± 2.61
ratio ^{a)}	0.85 ± 0.29	1.08 ± 0.19	1.01 ± 0.21	0.87 ± 0.11
Spermatocytes				
No.	50.80 ± 7.44	51.80 ± 4.84	43.64 ± 2.63	40.84 ± 5.63*
ratio	2.53 ± 0.13	2.72 ± 0.26	2.37 ± 0.24	2.25 ± 0.16
Round spermatids				
No.	138.36 ± 17.20	128.00 ± 8.89	117.68 ± 5.59*	112.60 ± 3.11**
ratio	6.91 ± 0.35	6.75 ± 0.84	6.39 ± 0.70	6.26 ± 0.48
Elongate spermatids				
No.	130.00 ± 21.71	132.32 ± 11.17	103.28 ± 12.34*	95.36 ± 8.44**
ratio	6.53 ± 1.15	6.98 ± 0.88	5.62 ± 0.90	5.30 ± 0.69
Group 2 (Stage VII - VIII)				
No. of Sertoli cells	16.96 ± 2.63	17.04 ± 2.17	16.64 ± 2.73	16.52 ± 2.23
Spermatogonia				
No.	2.92 ± 1.06	2.40 ± 0.93	2.04 ± 0.68	2.60 ± 1.10
ratio	0.18 ± 0.09	0.14 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.16 ± 0.06
Spermatocytes				
No.	91.68 ± 10.37	94.68 ± 6.55	84.44 ± 6.99	82.32 ± 6.70
ratio	5.45 ± 0.56	5.60 ± 0.51	5.16 ± 0.79	5.03 ± 0.54
Round spermatids				
No.	142.08 ± 13.39	131.64 ± 13.72	123.96 ± 8.23	118.76 ± 8.28*
ratio	8.45 ± 0.62	7.75 ± 0.39	7.66 ± 1.66	7.25 ± 0.62*
Elongate spermatids				
No.	129.24 ± 17.37	128.32 ± 16.88	114.72 ± 9.80	105.64 ± 13.47
ratio	7.78 ± 1.54	7.56 ± 0.72	7.09 ± 1.62	6.46 ± 1.05
Group 3 (Stage IX - XI)				
No. of Sertoli cells	19.28 ± 1.92	20.52 ± 1.55	19.20 ± 1.58	19.32 ± 2.18
Spermatogonia				
No.	4.52 ± 1.32	4.20 ± 1.50	4.92 ± 1.63	3.32 ± 1.02
ratio	0.23 ± 0.05	0.21 ± 0.08	0.26 ± 0.11	0.18 ± 0.05
Spermatocytes				
No.	102.52 ± 10.83	99.08 ± 8.42	97.56 ± 4.50	89.04 ± 9.00
ratio	5.34 ± 0.56	4.85 ± 0.50	5.10 ± 0.36	4.62 ± 0.32
Elongate spermatids				
No.	145.24 ± 11.01	130.64 ± 9.90	131.68 ± 19.71	119.24 ± 15.90*
ratio	7.56 ± 0.61	6.37 ± 0.23	6.88 ± 1.04	6.21 ± 0.83*
Group 4 (Stage XII - XIV)				
No. of Sertoli cells	19.16 ± 2.81	20.92 ± 1.73	18.64 ± 1.72	16.72 ± 0.92
Spermatogonia				
No.	4.04 ± 0.89	3.72 ± 0.72	3.64 ± 0.48	3.64 ± 0.71
ratio	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.05
Spermatocytes				
No.	109.80 ± 13.15	110.36 ± 9.22	99.44 ± 4.54	88.76 ± 4.33**
ratio	5.76 ± 0.29	5.28 ± 0.12	5.36 ± 0.34	5.32 ± 0.46
Elongate spermatids				
No.	159.76 ± 15.91	150.28 ± 18.99	137.08 ± 17.70	105.16 ± 18.34**
ratio	8.39 ± 0.63	7.19 ± 0.71	7.35 ± 0.62	6.33 ± 1.31**

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group ; *; p≤0.05,**; p≤0.01.

a) : (No. of spermatogenic cells/no. of Sertoli cells in a seminiferous tubule)

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル

Table 4 Histopathological findings in rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in preliminary reproduction toxicity screening test

Item		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of male animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings					
	Grade				
Testis:					
Decrease, spermatocyte and spermatid	Total	0	0	2	12**
	+	0	0	2	11
	++	0	0	0	1
Multinuclear giant cell, seminiferous tubule	+	0	0	0	1
Vacuolization, Sertoli cell	+	0	0	0	1
Atrophy, seminiferous tubule	+	2	0	0	0
Epididymis:					
Cell debris, lumen	Total	2	0	0	1
	+	2	0	0	0
	++	0	0	0	1
Decrease, sperm	Total	1	0	0	1
	+	1	0	0	0
	++	0	0	0	1
Granuloma, spermatic	+	0	0	0	1
No. of female animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings					
Ovary:					
Cyst, corpus luteum	<+>	0	0	2	0

Values are no. of animals with findings.
Grade: +=slight, ++=moderate change and <+>=detected.
Significantly different from 0 mg/kg group; **: p≤0.01.

Table 5 Influence of tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate on reproductive performances of rats in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation	12	11	12	12
Duration of mating (days, Mean±S.D.)	2.1 ± 1.2	2.3 ± 1.3	2.7 ± 1.2	2.7 ± 1.1
Copulation index ^a (%)	100.0	91.7	100.0	100.0
No. of pregnant animals	11	10	12	12
Fertility index ^b (%)	91.7	90.9	100.0	100.0

a): (No. of pairs with successful copulation/no. of pairs mated)×100

b): (No. of pregnant animals/no. of pairs with successful copulation)×100

Table 6 Influence of tris (2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate on developmental performances of rats in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pregnant animals	11	10	12	12
No. of corpora lutea	16.8 ± 1.5	17.3 ± 1.3	17.0 ± 2.3	17.9 ± 2.2
No. of implantation sites	15.5 ± 1.7	16.6 ± 1.3	16.0 ± 2.0	16.3 ± 2.3
Implantation index ^a (%)	92.5 ± 7.2	96.2 ± 6.6	94.5 ± 8.4	91.3 ± 8.8
No. of pups born (%)	13.7 ± 3.1	15.0 ± 1.7	15.0 ± 1.8	15.1 ± 2.7
Delivery index ^b (%)	87.6 ± 15.4	90.3 ± 6.8	94.1 ± 7.2	92.2 ± 9.6
Live pups born				
No.	13.3 ± 2.9	14.7 ± 2.0	14.9 ± 2.0	15.0 ± 2.7
Live birth index ^c (%)	97.1 ± 5.6	97.8 ± 3.6	99.2 ± 2.6	99.4 ± 2.1
Sex ratio (M/F)	1.09 ± 0.69	1.05 ± 0.50	1.17 ± 0.75	0.76 ± 0.44
Dead pups born				
No.	0.5 ± 0.9	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3
Gestation length (day)	22.7 ± 0.5	22.7 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.6 ± 0.5
Gestation index ^d (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Nursing index ^e (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Live pups on day 4				
No.	13.2 ± 2.8	14.6 ± 2.1	14.4 ± 2.9	14.5 ± 2.9
Viability index ^f (%)	99.5 ± 1.8	99.3 ± 2.3	95.6 ± 11.5	96.7 ± 6.7
Body weight of pups (g)				
Male				
Day 0	7.32 ± 0.77	7.13 ± 0.52	6.69 ± 0.55	6.87 ± 0.84
Day 4	11.71 ± 1.76	11.09 ± 0.93	10.23 ± 0.98*	10.60 ± 1.47
Day 0-4, gain (g)	4.39 ± 1.04	3.96 ± 0.53	3.54 ± 0.77*	3.73 ± 0.80
Body weight gain ^g (%)	59.41 ± 8.87	55.54 ± 6.16	53.19 ± 11.91	54.39 ± 9.50
Female				
Day 0	6.93 ± 0.83	6.63 ± 0.64	6.33 ± 0.58	6.58 ± 0.62
Day 4	11.08 ± 1.71	10.28 ± 1.01	9.48 ± 1.01*	10.03 ± 1.46
Day 0-4, gain (g)	4.16 ± 1.00	3.65 ± 0.56	3.14 ± 0.79*	3.46 ± 0.96
Body weight gain (%)	59.63 ± 10.42	55.24 ± 8.07	49.95 ± 13.09	52.17 ± 11.10

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group ; * : p ≤ 0.05.

a) : (No. of implantation sites/no. of corpora lutea) × 100

b) : (No. of pups born/no. of implantation sites) × 100

c) : (No. of live pups born/no. of pups born) × 100

d) : (No. of females with live pups delivered/no. of pregnant females) × 100

e) : (No. of females nursing live pups/no. of females with normal delivery) × 100

f) : (No. of live pups on day 4/no. of live pups born) × 100

g) : (Body weight gain/body weight on day 0) × 100

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルの 細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate on Bacteria

要約

既存化学物質安全性調査事業の一環として、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により用量設定試験を50~5000 μg /プレートの用量で実施したところ、いずれの検定菌においても、抗菌性は認められなかった。したがって、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験を313~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた検定菌のいずれについても、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

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¹⁾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²⁾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、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

〔被験物質〕

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステル(CAS No. 3319-31-1)は、分子量546.87の淡黄色透明液体である。試験には、大八化学工業(株)製〔ロット番号:N-60601, 純度99.0%以上(不純物:不明)]を、

(注)日本化学工業協会から供与された、使用時まで室温遮光保管して用いた。

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルは、アセトンに溶解性がよいことから、アセトンに50 mg/mlになるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルのアセトン溶液中での安定性試験、および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(3.13 mg/ml)溶液は本試験Iで調製したものについて、また高濃度(500 mg/ml)溶液は染色体異常試験で調製したものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、ともに初期値(0時間)の平均値に対して、101%であった。また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、低濃度は91.4%、高濃度は91.7%であった。

〔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, 2AAはジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9 mixの組成〕

1) トップアガー

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、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、

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
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクタアガー (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 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol

** : 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〕

プレート法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験 においては S9 mix 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合したのちトップアガー 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アセトン、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。培養は 37°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、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回、本試験は同一用量について 2 回実施し、結果の再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた 5 種の検定菌のうち、1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50 ~ 5000 μ g/プレート の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、すべての検定菌において S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。

〔本試験〕

結果をそれぞれ Table 1, 2 に示した。1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル の用量を、S9 mix 添加試験および添加試験とともに 313 ~ 5000 μ g/プレート の範囲で公比を 2 として試験を実施した。その結果、2 回の試験のいずれも、用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルは、用いた試験系において変異原性を有しないもの (陰性) と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutation Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) 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.

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,
 清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか,
 飯田さやか
 (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: Tohru Shibuya (Study Director)
 Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
 Kumiko Kawakami, Yuri Shimizu,
 Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi
 and Syaka Iida
 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. Mutagenicity of tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate** 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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	96 111 91 (99 \pm 10.4)	20 11 14 (15 \pm 4.6)	20 21 22 (21 \pm 1.0)	26 10 22 (19 \pm 8.3)	6 10 5 (7 \pm 2.6)	
	313 #	117 104 125 (115 \pm 10.6)	13 11 20 (15 \pm 4.7)	26 34 31 (30 \pm 4.0)	21 26 19 (22 \pm 3.6)	12 7 10 (10 \pm 2.5)	
	625 #	155 112 119 (129 \pm 23.1)	15 12 26 (18 \pm 7.4)	26 21 20 (22 \pm 3.2)	25 36 22 (28 \pm 7.4)	10 9 8 (9 \pm 1.0)	
	1250 #	117 130 130 (126 \pm 7.5)	21 14 15 (17 \pm 3.8)	19 24 25 (23 \pm 3.2)	22 23 25 (23 \pm 1.5)	8 11 11 (10 \pm 1.7)	
	2500 #	143 142 148 (144 \pm 3.2)	15 21 12 (16 \pm 4.6)	23 28 20 (24 \pm 4.0)	21 27 23 (24 \pm 3.1)	3 5 11 (6 \pm 4.2)	
	5000 #	132 121 138 (130 \pm 8.6)	13 20 12 (15 \pm 4.4)	25 36 32 (31 \pm 5.6)	14 28 19 (20 \pm 7.1)	5 3 9 (6 \pm 3.1)	
S9mix (+)	0	107 125 125 (119 \pm 10.4)	16 19 9 (15 \pm 5.1)	23 24 28 (25 \pm 2.6)	25 32 28 (28 \pm 3.5)	12 13 9 (11 \pm 2.1)	
	313	144 118 116 (126 \pm 15.6)	12 13 11 (12 \pm 1.0)	31 27 33 (30 \pm 3.1)	38 33 42 (38 \pm 4.5)	19 18 17 (18 \pm 1.0)	
	625	168 137 137 (147 \pm 17.9)	18 13 12 (14 \pm 3.2)	35 33 23 (30 \pm 6.4)	38 29 32 (33 \pm 4.6)	19 14 14 (16 \pm 2.9)	
	1250 #	130 120 166 (139 \pm 24.2)	8 20 15 (14 \pm 6.0)	35 42 35 (37 \pm 4.0)	36 30 36 (34 \pm 3.5)	18 16 12 (15 \pm 3.1)	
	2500 #	138 129 107 (125 \pm 15.9)	12 15 8 (12 \pm 3.5)	32 29 25 (29 \pm 3.5)	37 39 37 (38 \pm 1.2)	10 12 8 (10 \pm 2.0)	
	5000 #	149 144 128 (140 \pm 11.0)	12 7 11 (10 \pm 2.6)	24 15 25 (21 \pm 5.5)	37 39 23 (33 \pm 8.7)	10 11 7 (9 \pm 2.1)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	499 483 527 (503 \pm 22.3)	576 533 509 (539 \pm 33.9)	107 100 111 (106 \pm 5.6)	665 569 726 (653 \pm 79.1)	798 714 804 (772 \pm 50.3)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	1091 1292 1423 (1269 \pm 167.2)	326 304 322 (317 \pm 11.7)	1391 1251 1387 (1343 \pm 79.7)	438 455 387 (427 \pm 35.4)	252 243 261 (252 \pm 9.0)	

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

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

**:Purity was above 99.0 % and impurity was unknown.

Table 2. Mutagenicity of tris (2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate** 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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	124 106 135 (122 \pm 14.6)	10 11 15 (12 \pm 2.6)	29 28 25 (27 \pm 2.1)	24 28 20 (24 \pm 4.0)	9 3 12 (8 \pm 4.6)	
	313 #	125 130 142 (132 \pm 8.7)	14 18 18 (17 \pm 2.3)	22 21 23 (22 \pm 1.0)	26 21 25 (24 \pm 2.6)	11 10 15 (12 \pm 2.6)	
	625 #	125 116 141 (127 \pm 12.7)	18 10 16 (15 \pm 4.2)	22 31 30 (28 \pm 4.9)	33 13 19 (22 \pm 10.3)	9 7 10 (9 \pm 1.5)	
	1250 #	134 125 127 (129 \pm 4.7)	17 18 7 (14 \pm 6.1)	21 16 23 (20 \pm 3.6)	27 29 24 (27 \pm 2.5)	9 11 6 (9 \pm 2.5)	
	2500 #	129 120 124 (124 \pm 4.5)	11 9 12 (11 \pm 1.5)	21 17 13 (17 \pm 4.0)	19 22 25 (22 \pm 3.0)	7 10 8 (8 \pm 1.5)	
	5000 #	145 147 141 (144 \pm 3.1)	13 13 12 (13 \pm 0.6)	18 21 21 (20 \pm 1.7)	18 12 21 (17 \pm 4.6)	12 15 13 (13 \pm 1.5)	
S9 mix (+)	0	138 130 126 (131 \pm 6.1)	9 13 12 (11 \pm 2.1)	23 26 16 (22 \pm 5.1)	26 25 41 (31 \pm 9.0)	23 16 15 (18 \pm 4.4)	
	313	153 125 140 (139 \pm 14.0)	15 20 18 (18 \pm 2.5)	32 20 25 (26 \pm 6.0)	33 38 34 (35 \pm 2.6)	26 18 16 (20 \pm 5.3)	
	625	131 140 138 (136 \pm 4.7)	13 17 16 (15 \pm 2.1)	26 28 24 (26 \pm 2.0)	25 32 26 (28 \pm 3.8)	14 15 19 (16 \pm 2.6)	
	1250 #	129 156 161 (149 \pm 17.2)	18 12 16 (15 \pm 3.1)	30 23 12 (22 \pm 9.1)	32 33 40 (35 \pm 4.4)	17 17 15 (16 \pm 1.2)	
	2500 #	122 138 160 (140 \pm 19.1)	9 12 13 (11 \pm 2.1)	19 18 20 (19 \pm 1.0)	37 32 33 (34 \pm 2.6)	16 22 22 (20 \pm 3.5)	
	5000 #	156 158 164 (159 \pm 4.2)	14 25 15 (18 \pm 6.1)	21 29 18 (23 \pm 5.7)	29 39 30 (33 \pm 5.5)	16 15 15 (15 \pm 0.6)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	682 650 670 (667 \pm 16.2)	232 245 242 (240 \pm 6.8)	108 151 190 (150 \pm 41.0)	954 935 930 (940 \pm 12.7)	1103 1071 999 (1058 \pm 53.3)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1262 1111 1309 (1227 \pm 103.5)	299 270 290 (286 \pm 14.8)	1510 1537 1546 (1531 \pm 18.7)	455 457 566 (493 \pm 63.5)	300 295 294 (296 \pm 3.2)	

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

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

** : Purity was above 99.0 % and impurity was unknown.

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルの 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-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate on Cultured Chinese Hamster Cells

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、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルの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/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)、短時間処理(6時間)ともに5.0 mg/ml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ことから、すべての試験において5.0 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における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。

CHL/IU細胞を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、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルは、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: Biocell)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を入れたディッシュ(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

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル(略号:TEBTC, CAS No.: 3319-31-1, ロット番号: N-60601, 大八化学工業(株)製造, (株)日本化学工業協会提供)は、淡黄色透明液体、水に対しては不溶で、DMSOおよびアセトンには極めてよく溶け、凝固点-30°C、沸点430°C(760 mmHg)、蒸気圧0.01 mmHg以下(25°C)、分子式C₃₃H₅₄O₆、分子量546.87、純度99.0%以上(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体は高温時、水により加水分解を受ける。溶媒中(アセトン)では、3.13~500 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はアセトン(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1%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。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、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった(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高濃度群を、連続処理、短時間処理とも5.0 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃