



チオフェンの
細菌を用いる
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および方法	3
結果および考察	7
結 論	7
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

チオフェンの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、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および本試験を行った。用量設定試験を50~5000 μg /プレート の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験、添加試験のいずれもプレートあたり TA1537では1500 μg 以上で、TA100, TA1535, TA98の3菌株では5000 μg で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA* のみ5000 μg においても抗菌性は認められなかった。したがって、本試験ではS9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも、TA1537では78.1~2500 μg /プレート、WP2 *uvrA* では313~5000 μg /プレート、その他は156~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定して試験を実施した。

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ことから、チオフェン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。

【結 言】

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、チオフェンについて、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。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異⁽¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異⁽²⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する S9 mix 添加試験と、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【材料および方法】

〔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、
から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年 5 月 9 日に から分与
を受けた。

検定菌は -80°C 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) の有無について行った。

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°C 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〕

チオフェン (CAS No. 110-02-1) は、分子量 84.14 の無色透明の液体である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は ロット番号 純度 98% (不純物：不明) のものを購入した。被験物質は、使用時まで冷蔵保管した。

チオフェンは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号：KCL2807、KCG5200、和光純薬工業(株)) に 50 mg/ml または 25 mg/ml の割合で溶解した後、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。

チオフェンの DMSO 溶液中での安定性試験および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、低濃度 (0.781 mg/ml) 溶液は当該試験の本試験 II で調製したものについて、また高濃度 (168 mg/ml) 溶液は当研究所で実施した染色体異常試験 (G-94-017) で調製したものについて、室温遮光条件下で、調製後 4 時間までの安定性を調べた。その結果、調製 4 時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値 (0 時間) の平均値に対して、100および101%であった。これらの値は当研究所で規定

している基準内（4時間後における平均含有量が初期値の90%以上）であった（Appendix 2、3）。

また、本試験Ⅱで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、高濃度は当研究所の規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の90～110%）であったが、低濃度は基準値をわずかに下まわった。しかし低濃度の調製液を用いたのは TA1537 のみであり、またすべての試験を通して抗菌性を示す用量から判定に必要と考えられる用量まで十分に網羅されているため結果の判定には影響しないと判断した（Appendix 4）。

〔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)アクリルミド (上野製薬(株) ロット番号 46, 純度99.9%)
SA	: アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株) ロット番号 TWR3330, 純度90%以上)
9AA	: 9-アミノアクリン (Sigma Chem. Co. ロット番号 96F05641, 純度98%以上)
2AA	: 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株) ロット番号 DSF2950, 純度90%以上)

AF2, 2AA 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。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%	(B) L-ヒスチジン [*]	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピチン	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（ロット番号：DJ030HJ、1994年8月11日製造および DJ010BK、1995年2月6日製造）を用いた。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・7水和物	0.2 g	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バクタアガー (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 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	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
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、ロット番号 RAA-309、1994年 5 月 13 日製造および RAA-317、同年 10 月 27 日製造、RAA-321、1995年 1 月 20 日製造)を用いた。PB および BF の投与量は 1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したもので、ラットの解剖および S9 の調製は 5 日目であった。

(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。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、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。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。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。チオフェンについて 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験、添加試験のいずれも TA1537 では 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、また TA100、TA1535、TA98 の 3 菌株では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA* のみ最高用量においても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は S9 mix 無添加試験、添加試験のいずれも TA1537 のみ 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、その他は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。チオフェンの用量を、S9 mix 無添加試験、添加試験のいずれも TA1537 では 78.1～2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* では 313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他は 156～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を 2 として 6 用量 (WP2 *uvrA* のみ 5 用量) を設定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。

チオフェンについて実施したすべての試験において、陽性対照群ではいずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

以上の結果に基づき、チオフェンは、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。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態、および試験計画書からの逸脱はなかった。

【文 献】

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

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of thiophene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, $\text{Mea} \pm \text{S.D.}$)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	137	90	97	11	16	13	24	29	20	16	26	28	9	8	10	
		(108 \pm 25.4)			(13 \pm 2.5)			(24 \pm 4.5)			(23 \pm 6.4)			(9 \pm 1.0)			
	50	74			7			9			13			17			
	150	80			5			11			15			7			
	500	95			6			13			16			5			
	1500	81			7			15			16			6 *			
	5000	2 *			11 *			24			12 *			5 *			
S9mix (+)	0	128	134	117	14	13	9	30	30	23	31	41	28	12	15	13	
		(126 \pm 8.6)			(12 \pm 2.6)			(28 \pm 4.0)			(33 \pm 6.8)			(13 \pm 1.5)			
	50	100			8			3			30			7			
	150	97			12			2			22			10			
	500	105			13			9			29			6			
	1500	107			5			5			34			8 *			
	5000	70 *			0 *			8			17 *			2 *			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	643	622	606	244	294	335	163	143	130	891	862	816	1240	970	1230	
		(624 \pm 18.6)			(291 \pm 45.6)			(145 \pm 16.6)			(856 \pm 37.8)			(1147 \pm 153.1)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1467	1261	941	253	311	356	1664	1692	1470	475	451	463	152	150	139	
		(1223 \pm 265.1)			(307 \pm 51.6)			(1609 \pm 120.9)			(463 \pm 12.0)			(147 \pm 7.0)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was 98 % and impurity was unknown.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of thiophene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies /plate, Mean ± S.D.)																			
		Base - pair substitution type						Frameshift type													
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537							
S9mix (-)	0	97	114	127	11	18	9	29	21	23	28	14	21	9	4	5	(113 ± 15.0)	(13 ± 4.7)	(24 ± 4.2)	(21 ± 7.0)	(6 ± 2.6)
	78.1	ND			ND			ND			ND			4	8	6	(6 ± 2.0)				
	156	97	113	101	7	7	13	ND			18	21	24	7	5	8	(104 ± 8.3)	(9 ± 3.5)	(21 ± 3.0)	(7 ± 1.5)	
	313	107	106	111	12	11	8	13	12	20	23	18	18	6	5	4	(108 ± 2.6)	(10 ± 2.1)	(15 ± 4.4)	(20 ± 2.9)	(5 ± 1.0)
	625	113	94	86	11	11	14	27	16	18	19	20	23	7	6	9	(98 ± 13.9)	(12 ± 1.7)	(20 ± 5.9)	(21 ± 2.1)	(7 ± 1.5)
	1250	78	96	86	15	14	14	20	20	16	18	29	21	7	6	5	(87 ± 9.0)	(14 ± 0.6)	(19 ± 2.3)	(23 ± 5.7)	(6 ± 1.0)
	2500	79	99	94	12	13	10	17	16	20	21	19	28	4 *	2 *	3 *	(91 ± 10.4)	(12 ± 1.5)	(18 ± 2.1)	(23 ± 4.7)	(3 ± 1.0)
	5000	83 *	75 *	72 *	6 *	11 *	9 *	16 *	24	13	18 *	15 *	13 *				(77 ± 5.7)	(9 ± 2.5)	(18 ± 5.7)	(15 ± 2.5)	
S9mix (+)	0	124	127	132	15	12	12	28	27	23	27	32	44	18	7	9	(128 ± 4.0)	(13 ± 1.7)	(26 ± 2.6)	(34 ± 8.7)	(11 ± 5.9)
	78.1	ND			ND			ND			ND			11	14	11	(12 ± 1.7)				
	156	121	127	124	11	11	19	ND			28	34	22	15	8	8	(124 ± 3.0)	(14 ± 4.6)	(28 ± 6.0)	(10 ± 4.0)	
	313	120	107	98	19	12	12	33	13	24	34	16	25	17	25	18	(108 ± 11.1)	(14 ± 4.0)	(23 ± 10.0)	(25 ± 9.0)	(20 ± 4.4)
	625	119	105	120	13	13	11	19	21	24	23	26	31	18	8	15	(115 ± 8.4)	(12 ± 1.2)	(21 ± 2.5)	(27 ± 4.0)	(14 ± 5.1)
	1250	131	98	119	12	12	10	30	34	25	29	36	33	10	16	8	(116 ± 16.7)	(11 ± 1.2)	(30 ± 4.5)	(33 ± 3.5)	(11 ± 4.2)
	2500	110	117	116	9	10	16	21	14	10	21	19	26	12 *	7 *	12 *	(114 ± 3.8)	(12 ± 3.8)	(15 ± 5.6)	(22 ± 3.6)	(10 ± 2.9)
	5000	82 *	91 *	104 *	8 *	9 *	15 *	17	18	25	25 *	14 *	22 *				(92 ± 11.1)	(11 ± 3.8)	(20 ± 4.4)	(20 ± 5.7)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
	Number of colonies / plate	618	627	632	174	215	208	119	117	113	840	892	847	1965	1673	1991	(626 ± 7.1)	(199 ± 21.9)	(116 ± 3.1)	(860 ± 28.2)	(1876 ± 176.6)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
	Number of colonies / plate	1068	1025	1025	270	272	221	1270	1435	1069	450	432	416	328	294	362	(1039 ± 24.8)	(254 ± 28.9)	(1258 ± 183.3)	(433 ± 17.0)	(328 ± 34.0)

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was 98 % and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of thiophene ** 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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	120	114	135	20	17	14	23	32	30	30	32	20	17	16	23	
		(123 \pm 10.8)			(17 \pm 3.0)			(28 \pm 4.7)			(27 \pm 6.4)			(19 \pm 3.8)			
	78.1	ND			ND			ND			ND			14	17	11	
		(14 \pm 3.0)															
	156	131	117	83	7	6	13	ND			18	14	20	24	18	23	
		(110 \pm 24.7)			(9 \pm 3.8)						(17 \pm 3.1)			(22 \pm 3.2)			
	313	104	81	120	11	12	13	20	21	21	21	19	17	18	12	31	
		(102 \pm 19.6)			(12 \pm 1.0)			(21 \pm 0.6)			(19 \pm 2.0)			(20 \pm 9.7)			
625	105	93	100	16	9	9	29	16	18	19	16	24	17	14	19		
	(99 \pm 6.0)			(11 \pm 4.0)			(21 \pm 7.0)			(20 \pm 4.0)			(17 \pm 2.5)				
1250	88	83	85	10	9	13	23	12	22	17	17	19	26	25	18		
	(85 \pm 2.5)			(11 \pm 2.1)			(19 \pm 6.1)			(18 \pm 1.2)			(23 \pm 4.4)				
2500	76 *	84 *	78 *	9 *	6 *	8 *	23	12	21	18 *	18 *	21 *	6 *	12 *	11 *		
	(79 \pm 4.2)			(8 \pm 1.5)			(19 \pm 5.9)			(19 \pm 1.7)			(10 \pm 3.2)				
5000	78 *	70 *	91 *	6 *	5 *	9 *	13	17	15	17 *	10 *	11 *					
	(80 \pm 10.6)			(7 \pm 2.1)			(15 \pm 2.0)			(13 \pm 3.8)							
S9mix (+)	0	126	129	117	16	13	10	44	24	21	37	34	28	8	17	16	
		(124 \pm 6.2)			(13 \pm 3.0)			(30 \pm 12.5)			(33 \pm 4.6)			(14 \pm 4.9)			
	78.1	ND			ND			ND			ND			11	11	9	
		(10 \pm 1.2)															
	156	122	116	134	13	10	11	ND			23	37	29	13	12	6	
		(124 \pm 9.2)			(11 \pm 1.5)						(30 \pm 7.0)			(10 \pm 3.8)			
	313	114	96	108	11	11	8	9	21	21	25	29	39	6	11	5	
		(106 \pm 9.2)			(10 \pm 1.7)			(17 \pm 6.9)			(31 \pm 7.2)			(7 \pm 3.2)			
625	114	91	97	23	9	11	16	27	24	22	29	27	12	9	9		
	(101 \pm 11.9)			(14 \pm 7.6)			(22 \pm 5.7)			(26 \pm 3.6)			(10 \pm 1.7)				
1250	119	101	96	13	14	14	22	24	20	35	28	25	9	17	3		
	(105 \pm 12.1)			(14 \pm 0.6)			(22 \pm 2.0)			(29 \pm 5.1)			(10 \pm 7.0)				
2500	74 *	107 *	99 *	7 *	10 *	12 *	14	25	24	25 *	28 *	29 *	10 *	11 *	10 *		
	(93 \pm 17.2)			(10 \pm 2.5)			(21 \pm 6.1)			(27 \pm 2.1)			(10 \pm 0.6)				
5000	63 *	69 *	71 *	4 *	2 *	6 *	11 *	25 *	12 *	19 *	22 *	26 *					
	(68 \pm 4.2)			(4 \pm 2.0)			(16 \pm 7.8)			(22 \pm 3.5)							
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1056	1405	1231	291	292	293	1477	1388	1534	501	502	487	208	280	208	
		(1231 \pm 174.5)			(292 \pm 1.0)			(1466 \pm 73.6)			(497 \pm 8.4)			(232 \pm 41.6)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was 98 % and impurity was unknown.

ND : Not done