



テトラヒドロチオフェン-1, 1-ジオキシド 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】

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシド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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、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。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験を 313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、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。

【緒 言】

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、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドについて、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℃以下で凍結保存したものを用い、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 pKM 101 (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℃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〕

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシド (THTD、CAS No. 126-33-0) は、分子量 120.16 の無色固体である。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 99.9%以上 (不純物：水分 0.1%以下) で
あり、 から供与された。被験物質は、使用時まで室温保管した。

THTDは、用量設定試験においては純水、本試験においては注射用蒸留水 (ロット番号：A3A25、小林製薬工業㈱) 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。

THTDの注射用蒸留水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 (3.00 mg/ml) 溶液は当研究所で実施した染色体異常試験 (G-94-033) で調製したものについて、高濃度 (50.0 mg/ml) 溶液は当該試験の本試験 I 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、99.1および99.3%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時間後の平均含量が初期値の90%以上)であった(Appendix 2、3)。

また、本試験I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、いずれも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(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)アクリルアミド (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-アミノアクリジン (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 (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(ロット番号:DJ030HJ、1994年8月11日製造およびDJ040KJ、同年11月21日製造)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	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	バクトアガー (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)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、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 およびトップアガー 2 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。THTD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、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。

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 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。THTDの用量を、S9 mix 無添加試験および添加試験とともに 313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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。

THTD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、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、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 tetrahydrothiophene-1,1-dioxide ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, $\text{Mean} \pm \text{S.D.}$)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	118	99	119	18	13	16	18	20	30	31	33	21	8	10	15	
		(112 \pm 11.3)			(16 \pm 2.5)			(23 \pm 6.4)			(28 \pm 6.4)			(11 \pm 3.6)			
	50	85			6			21			21			8			
	150	106			11			16			28			7			
	500	69			8			23			18			6			
	1500	87			12			25			15			5			
	5000	85			19			14			19			7			
S9mix (+)	0	122	111	97	21	13	19	13	27	24	41	37	38	11	15	10	
		(110 \pm 12.5)			(18 \pm 4.2)			(21 \pm 7.4)			(39 \pm 2.1)			(12 \pm 2.6)			
	50	113			9			2			41			6			
	150	97			21			3			18			5			
	500	104			5			19			34			5			
	1500	102			11			6			24			7			
	5000	124			15			15			28			10			
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	542	539	556	312	298	323	130	137	122	613	833	730	648	610	640	
		(546 \pm 9.1)			(311 \pm 12.5)			(130 \pm 7.5)			(725 \pm 110.1)			(633 \pm 20.0)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1369	1337	1260	323	243	301	1462	1479	1194	415	434	417	323	320	320	
		(1322 \pm 56.0)			(289 \pm 41.3)			(1378 \pm 159.9)			(422 \pm 10.4)			(321 \pm 1.7)			

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

** : Purity was above 99.9 % and water (below 0.1 %) was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /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	90	88	89	13	10	17	20	22	24	23	25	21	9	10	10	(89 \pm 1.0)	(13 \pm 3.5)	(22 \pm 2.0)	(23 \pm 2.0)	(10 \pm 0.6)	
	313	124	107	103	10	8	14	25	35	36	22	14	27	11	7	8	(111 \pm 11.2)	(11 \pm 3.1)	(32 \pm 6.1)	(21 \pm 6.6)	(9 \pm 2.1)	
	625	103	131	120	15	10	13	36	33	27	21	16	15	9	11	6	(118 \pm 14.1)	(13 \pm 2.5)	(32 \pm 4.6)	(17 \pm 3.2)	(9 \pm 2.5)	
	1250	109	118	97	7	13	15	27	23	31	15	18	22	8	7	12	(108 \pm 10.5)	(12 \pm 4.2)	(27 \pm 4.0)	(18 \pm 3.5)	(9 \pm 2.6)	
	2500	87	142	124	9	10	13	27	27	23	26	19	15	6	6	11	(118 \pm 28.0)	(11 \pm 2.1)	(26 \pm 2.3)	(20 \pm 5.6)	(8 \pm 2.9)	
	5000	109	123	106	9	12	9	23	28	28	24	26	15	9	10	9	(113 \pm 9.1)	(10 \pm 1.7)	(26 \pm 2.9)	(22 \pm 5.9)	(9 \pm 0.6)	
S9mix (+)	0	134	135	129	9	16	18	36	28	24	30	32	38	15	12	10	(133 \pm 3.2)	(14 \pm 4.7)	(29 \pm 6.1)	(33 \pm 4.2)	(12 \pm 2.5)	
	313	95	85	117	7	10	10	42	35	35	46	40	33	8	10	16	(99 \pm 16.4)	(9 \pm 1.7)	(37 \pm 4.0)	(40 \pm 6.5)	(11 \pm 4.2)	
	625	134	134	110	13	11	12	39	38	31	33	38	33	18	20	18	(126 \pm 13.9)	(12 \pm 1.0)	(36 \pm 4.4)	(35 \pm 2.9)	(19 \pm 1.2)	
	1250	114	131	119	14	14	13	27	19	24	34	31	25	16	8	14	(121 \pm 8.7)	(14 \pm 0.6)	(23 \pm 4.0)	(30 \pm 4.6)	(13 \pm 4.2)	
	2500	122	127	159	5	13	5	28	28	30	30	33	42	14	12	14	(136 \pm 20.1)	(8 \pm 4.6)	(29 \pm 1.2)	(35 \pm 6.2)	(13 \pm 1.2)	
	5000	149	136	128	10	16	17	19	17	23	30	36	30	12	10	14	(138 \pm 10.6)	(14 \pm 3.8)	(20 \pm 3.1)	(32 \pm 3.5)	(12 \pm 2.0)	
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								
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	858	879	838	193	193	206	122	209	194	735	788	820	1767	2148	2578	(858 \pm 20.5)	(197 \pm 7.5)	(175 \pm 46.5)	(781 \pm 42.9)	(2164 \pm 405.7)	
	Number of colonies / plate	1370	1381	1290	298	281	294	1243	1223	1506	337	335	335	287	280	283	(1347 \pm 49.7)	(291 \pm 8.9)	(1324 \pm 157.9)	(336 \pm 1.2)	(283 \pm 3.5)	

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

** : Purity was above 99.9 % and water (below 0.1 %) was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide ** 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	112	123	125	11	18	16	17	18	33	22	24	32	12	7	8	(120 \pm 7.0)	(15 \pm 3.6)	(23 \pm 9.0)	(26 \pm 5.3)	(9 \pm 2.6)
	313	131	127	156	15	17	17	23	31	32	21	14	23	9	17	5	(138 \pm 15.7)	(16 \pm 1.2)	(29 \pm 4.9)	(19 \pm 4.7)	(10 \pm 6.1)
	625	137	130	128	18	16	25	29	24	22	21	19	22	12	8	10	(132 \pm 4.7)	(20 \pm 4.7)	(25 \pm 3.6)	(21 \pm 1.5)	(10 \pm 2.0)
	1250	105	132	129	20	16	15	23	22	18	27	24	27	11	15	6	(122 \pm 14.8)	(17 \pm 2.6)	(21 \pm 2.6)	(26 \pm 1.7)	(11 \pm 4.5)
	2500	137	145	133	9	18	12	28	20	23	38	21	20	14	9	14	(138 \pm 6.1)	(13 \pm 4.6)	(24 \pm 4.0)	(26 \pm 10.1)	(12 \pm 2.9)
	5000	156	129	123	25	20	15	28	17	28	27	23	31	17	12	5	(136 \pm 17.6)	(20 \pm 5.0)	(24 \pm 6.4)	(27 \pm 4.0)	(11 \pm 6.0)
S9mix (+)	0	148	120	141	15	12	21	16	25	25	35	39	20	15	14	17	(136 \pm 14.6)	(16 \pm 4.6)	(22 \pm 5.2)	(31 \pm 10.0)	(15 \pm 1.5)
	313	127	137	146	22	26	14	30	30	25	42	31	39	12	20	20	(137 \pm 9.5)	(21 \pm 6.1)	(28 \pm 2.9)	(37 \pm 5.7)	(17 \pm 4.6)
	625	137	146	133	15	10	16	24	29	25	29	38	42	14	18	18	(139 \pm 6.7)	(14 \pm 3.2)	(26 \pm 2.6)	(36 \pm 6.7)	(17 \pm 2.3)
	1250	137	142	143	17	16	19	33	25	26	26	35	27	20	19	13	(141 \pm 3.2)	(17 \pm 1.5)	(28 \pm 4.4)	(29 \pm 4.9)	(17 \pm 3.8)
	2500	138	172	166	17	15	18	29	22	22	38	39	29	23	25	15	(159 \pm 18.1)	(17 \pm 1.5)	(24 \pm 4.0)	(35 \pm 5.5)	(21 \pm 5.3)
	5000	134	132	159	23	17	19	19	22	28	47	30	36	9	16	13	(142 \pm 15.0)	(20 \pm 3.1)	(23 \pm 4.6)	(38 \pm 8.6)	(13 \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	1228	1435	1409	184	198	197	1211	1206	1296	340	323	309	204	192	221	(1357 \pm 112.8)	(193 \pm 7.8)	(1238 \pm 50.6)	(324 \pm 15.5)	(206 \pm 14.6)

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

** : Purity was above 99.9 % and water (below 0.1 %) was contained as impurity.