最 終 報 告 書

ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：6873 （ 115－170 ）

平成 16 年 11 月 8 日

試験委託者
厚生労働省　医薬食品局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目　次

1. 要約 7

12. 被験物質 11
13. 試験材料および方法 13
14. 試験結果 22
15. 考察および結論 25
16. 参考文献 26

Figures F-01~15
Figure 1 Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA100 F-01
Figure 2 Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA1535 F-02
Figure 3 Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain WP2*uvrA* F-03
Figure 4 Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA98 F-04
Figure 5 Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA1537 F-05

Figure 6	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA100	F-06
Figure 7	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA1535	F-07
Figure 8	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain WP2*uvrA*	F-08
Figure 9	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA98	F-09
Figure 10	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA1537	F-10
Figure 11	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA100 (restudy)	F-11
Figure 12	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA1535 (restudy)	F-12
Figure 13	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain WP2*uvrA* (restudy)	F-13
Figure 14	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA98 (restudy)	F-14
Figure 15	Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester in strain TA1537 (restudy)	F-15
Tables		T-1~6
Table 1	Summary data of dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester [non-activation method : –S9]	T-1
Table 2	Summary data of dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester [non-activation method : –S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester [activation method : +S9]	T-4
Table 5	Results of the bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester (restudy) [non-activation method : –S9]	T-5
Table 6	Results of the bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester (restudy) [activation method : +S9]	T-6

1. 要約

本試験条件下において，ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチルには遺伝子突然変異を誘起する作用があるものと判断した．

ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチルの変異原性について，遺伝子突然変異誘発性を検討するため，ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA100，TA98，TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌（*Escherichia coli*）WP2*uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った．

その結果，ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチル処理では代謝活性化系非存在下の TA100 および TA1535 ならびに代謝活性化系存在下の TA1535 において用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加が認められた．用量設定試験，復帰突然変異試験ならびに同再試験により試験結果の再現性が確認されたことから陽性反応と判断した．

一方，代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下での陽性対照物質は，それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した．

12. 被験物質

試験に使用する被験物質は[illegible]から購入した．試験責任者は当該被験物質の受領から返却までの間の管理を行った．

12.1. 被験物質名

ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチル

12.2. ロット番号

12.3. 純度

95.1 wt%

12.4. 製造元

12.5. 保存条件

冷蔵保存

12.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫（C-1）

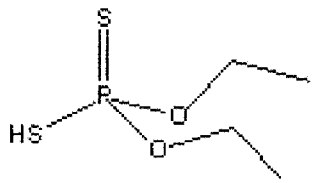
12.7. CAS No.

298-06-6

12.8. 化学名

Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester

12.9. 化学構造



12.10. 分子式

$C_4H_{11}O_2PS_2$

12.11. 分子量

186.22

12.12.　物質の状態

暗灰褐色透明の液体

12.13.　残余被験物質の処理

被験物質の一部を保存した．残りは安定性分析のため
へ返却した．

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから，試験菌株として次の 5 種類の菌株を使用した．

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2*uvrA*	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は昭和 58 年 9 月 9 日にカリフォルニア大学

から，また，大腸菌については昭和 58 年 3 月 16 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受けた．

平成 14 年 9 月 30 日～10 月 3 日に菌株の特性検査を実施し，規定の特性を保持している菌株を試験に使用した．各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO : GC 用 ; Merck KGaA ; 純度 99.9%, Lot No. K27073678) を容量比 80 : 7 の割合で添加した後，凍結保存用チューブに 0.2 mL ずつ分注した．これを液体窒素を用いて凍結した後，超低温フリーザー (MDF-U71V : 三洋電機バイオメディカ株式会社) に保存 (–80°C) した．

13.2. 培地の調製

13.2.1. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

テスメディア AN 培地 (オリエンタル酵母工業株式会社 : 平成 14 年 9 月 18 日製造, Lot No. ANI610IR) を試験に使用した．本プレートは, Vogel-Bonner 最少培地 E を含む組成の溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである．

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した.

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸・1水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	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
寒天（BA-30A：伊那食品工業株式会社；Lot No. 20108）	11.5	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー（軟寒天）

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天（Bacto-agar：Difco Laboratories；Lot No. 0340002）0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した後，ネズミチフス菌を用いる試験の場合，0.5 mmol/L **L**-ヒスチジン（関東化学株式会社；Lot No. 107D2017）および 0.5 mmol/L **D**-ビオチン（関東化学株式会社；Lot No. 301C2275）水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え，大腸菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L **L**-トリプトファン（関東化学株式会社；Lot No. 008D2026）水溶液を同じく 1 容量加えた.

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス（Nutrient Broth No. 2：Oxoid Limited；Lot No. 218041）培養液を 25 mL 分注し，これに融解した菌懸濁液を 50 μL 接種した．培養開始までの間冷却ユニット（ECS-1：東京理化器械株式会社）を用いて 4°C に保存し，その後ウォーターバスシェーカー（MM-10：タイテック株式会社）を用い，37°C で 8 時間振盪（100 回／分）培養した．試験毎に菌株の培養を実施し，菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した.

ATP フォトメーター（ルミテスター K-100：キッコーマン株式会社）を用いて計測した生菌数を以下に示した.

試験	試験生菌数（× 10^9／mL）				
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	4.15	3.86	4.77	2.49	2.00
復帰突然変異試験	3.34	3.10	4.12	2.51	1.68
再試験	3.48	3.63	4.74	2.87	2.25

13.4. S9 mix

製造後 6 ヵ月以内の S9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. FSM-475【用量設定試験，復帰突然変異試験】，FSM-476【復帰突然変異試験（再試験）】）を試験に使用した.

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した.

	用量設定試験および復帰突然変異試験	復帰突然変異試験（再試験）
ロット番号	RAA-475	RAA-476
製造年月日	平成 14 年 12 月 6 日 （誘導物質投与開始後 5 日目）	平成 15 年 1 月 17 日 （同左）
使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系	
性／週齢	雄／7 週齢	
体重	198～223 g	214～245 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital（PB）および 5,6-Benzoflavone（BF）	
投与量 および 投与回数	PB： 30 mg/kg 1 回（1 日目）， 60 mg/kg 3 回（2～4 日目） BF： 80 mg/kg 1 回（3 日目）	
投与方法	腹腔内投与	
蛋白含量	25.55 mg/mL	27.11 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を次に示した.

S9	0.1	mL
$MgCl_2$	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na－リン酸緩衝液（pH 7.4）	100	μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であることからモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO（GC 用；Merck KGaA；純度 99.9%, Lot No. K27073678）に溶解させた.

用量設定試験では使用直前に調製原液（50.0 mg/mL 液）を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し 16.67, 5.56, 1.85, 0.617, 0.206, 0.0686 および 0.0229 mg/mL 液を調製した後, 速やかに処理を行った.

復帰突然変異試験の場合, 用量設定試験の結果を基に 50.0 mg/mL の調製原液を DMSO で順次希釈し, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195 および 0.0977 mg/mL 溶液を調製した後, 速やかに処理を行った. 復帰突然変異試験（再試験）においても同様に調製した.

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒（DMSO）で試験した.

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液（オリエンタル酵母工業株式会社；Lot No. M0001）を試験に使用した. 陽性対照物質名および用量を以下に示した.

AF-2　2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド
NaN_3　アジ化ナトリウム
9-AA　9-アミノアクリジン塩酸塩
2-AA　2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

AF-2	0.01	μg／プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
AF-2	0.1	μg／プレート	(ネズミチフス菌：TA98)
NaN_3	0.5	μg／プレート	(ネズミチフス菌：TA1535)
9-AA	80	μg／プレート	(ネズミチフス菌：TA1537)
AF-2	0.01	μg／プレート	(大腸菌：WP2*uvrA*)

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

2-AA	1	μg／プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
2-AA	0.5	μg／プレート	(ネズミチフス菌：TA98)
2-AA	2	μg／プレート	(ネズミチフス菌：TA1535)
2-AA	2	μg／プレート	(ネズミチフス菌：TA1537)
2-AA	10	μg／プレート	(大腸菌：WP2*uvrA*)

なお，これらの試験用量は旧労働省安全衛生部化学物質調査課編「安衛法における変異原性試験－テストガイドラインと GLP」に準じて設定した.

13.6.3.　無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した. すなわち，調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトップアガーをそれぞれ 2 mL 添加し，プレート上に注いだ. 37°C の条件で 48 時間培養した後，雑菌汚染の有無を確認した.

調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した.

用量設定試験，復帰突然変異試験および復帰突然変異試験（再試験）でのジチオリン酸 *O, O'*-ジエチル調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において，菌の増殖は認められなかった.

13.7. 用量設定試験（予備試験）

13.7.1. 試験用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 μg／プレートを最高用量とし，以下 1667，556，185，61.7，20.6，6.86 および 2.29 μg／プレートの 8 用量を用量設定試験の用量とした.

13.7.2. 使用プレート数および識別

用量当たり 3 枚のプレートを用いた.

試験菌株の別，S9 mix の有無および試験用量を明記することにより各プレートを識別した.

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に使用溶媒，被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μL，次いで代謝活性化系非存在下（–S9 mix）の場合，0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500 μL，代謝活性化系存在下（+S9 mix）の場合，S9 mix を 500 μL 分注した. さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μL を加えた後，ウォーターバスシェーカー（MM-10：タイテック株式会社）を用いて 37°C で 20 分間振盪（120 回／分；プレインキュベーション）した. 振盪終了後，トップアガーを 2 mL 添加し，内容物を混合した. その後，混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた. 恒温器（MT-62：株式会社池田理化）を用いて 37°C の条件で 48 時間各プレートを培養した.

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において処理開始およびコロニー数計測時に析出等の有無を肉眼で観察した.

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため，プレート上の試験菌株（背景菌）の生育状態について実体顕微鏡（× 60）を用いて観察した. 次いで，復帰突然変異により生じたコロニーを計測した. 計測に際しては，コロニーアナライザー（CA-11：システムサイエンス株式会社）を用い，面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した.

13.8. 復帰突然変異試験

13.8.1. 試験用量

用量設定試験の結果から変異原性が疑われる TA100（–S9 処理）および TA1535（–S9 および+S9 処理）については正確な用量反応曲線が得られる用量を設定した．他の 3 菌株については，生育阻害が認められると考えられる用量あるいは 5000 μg／プレートを最高用量として，それぞれ 6～7 用量を設定した．

《代謝活性化系非存在下：–S9 mix》

菌株	試験用量（μg／プレート）						
TA100	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500
TA1535	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625
WP2*uvrA*	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000	

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

菌株	試験用量（μg／プレート）						
TA100	78.1	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	78.1	156	313	625	1250	2500	5000
WP2*uvrA*	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000	

TA1535 株，–S9 処理の陰性対照値の平均値が背景データの範囲から逸脱していること，一部の試験において用量の設定が適切でなかったことから以下に示す 6～8 用量を用いた復帰突然変異試験（再試験）を実施した．

《代謝活性化系非存在下：–S9 mix》

菌株	試験用量（μg／プレート）							
TA100	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250	
TA1535	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	
WP2*uvrA*	156	313	625	1250	2500	5000		
TA98	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250	

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

菌株	試験用量（μg／プレート）							
TA100	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	78.1	156	313	625	1250	2500	5000	
WP2*uvrA*	156	313	625	1250	2500	5000		
TA98	156	313	625	1250	2500	5000		
TA1537	78.1	156	313	625	1250	2500		

13.8.2. 使用プレート数および識別

13.7.2.に記載の方法に準じた.

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載の方法に準じた．ただし，復帰突然変異試験においてはウォーターバスシェーカー（M-100^{N}：タイテック株式会社）および恒温器（SSV-R11DA：株式会社池田理化）を用いた.

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載の方法に準じた.

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載の方法に準じた.

ただし，復帰突然変異試験の代謝活性化系非存在下（–S9 処理），TA100 および TA1537 の 2500 μg／プレート以上，WP2*uvrA* および TA98，代謝活性化系存在下（+S9 処理），TA1537 の 5000 μg／プレートさらに復帰突然変異試験（再試験）における–S9 処理，TA98 の 5000 μg／プレートでは析出物の影響によりコロニーアナライザーの使用が不適切と判断し，目視でコ

ロニーを計数した．また，復帰突然変異試験の–S9 処理，TA1537 の 5000 μg／プレートでは背景菌が目視できるほどのコロニーを形成していたことから目視でコロニーを計数した．

13.9. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し，かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した．なお，陽性と判定した場合には，変異原性の強さの相対的比較値である比活性を下式で求めた．コロニー数の平均値は四捨五入する以前の値を用いた．

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった．

$$\frac{(\text{当該濃度での平均コロニー数}) - (\text{陰性対照での平均コロニー数})}{\text{当該濃度値 (mg)}}$$

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

14.1.1. 試験結果

試験結果を Figure 1～5 および Table 1，2 に示した．

ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチル処理の場合，代謝活性化系非存在下（–S9 処理）の TA100，TA1535 ならびに代謝活性化系存在下（+S9 処理）の TA1535 で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加が認められ，陰性対照値の 2 倍を超えていた．試験菌株に対する生育阻害作用は–S9 処理の場合，TA100 の 556 μg／プレート以上，TA1537 の 1667 μg／プレート以上，他の 3 菌株の 5000 μg／プレートで観察された．また，+S9 処理の場合は TA100 の 1667 μg／プレート以上，TA1537 の 5000 μg／プレートで観察された．

一方，陽性対照物質はそれぞれの菌株において，陰性対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した．

14.1.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時，–S9 処理，+S9 処理とも 556 μg／プレート以上の用量で反応液が白濁し，さらに 1667 μg／プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた．コロニー計数時，両試験法の 5000 μg／プレートで白色粉末状の析出物が観察された．

14.2. 復帰突然変異試験

14.2.1. 試験結果

試験結果を Figure 6～10 および Table 3，4 に示した．

被験物質処理群の場合，–S9 処理 TA100，TA1535 ならびに+S9 処理の TA1535 で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加が認められ，陰性対照値の 2 倍を超えていた．試験菌株に対する生育阻害作用は–S9 処理の場合，TA100，TA1537 の 313 μg／プレート以上，TA98 の 1250 μg／プレート以上，WP2*uvrA* の 5000 μg／プレートで観察された．また，+S9 処理の場合は TA100 の 625 μg／プレート以上，TA1537 の 2500 μg／プレート以上の用量で観察された．

一方，陽性対照物質は各試験菌株に対し，復帰突然変異を顕著に誘発した．

14.2.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時，–S9 処理の 313 μg／プレート以上および+S9 処理の 156 μg／プレート以上の用量で反応液が白濁し，–S9 処理の 2500 μg／プレート以上ならびに+S9 処理の 625 μg／プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた．コロニー計数時，–S9 処理の 2500 μg／プレート以上，+S9 処理の 1250 μg／プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が観察された．

14.3. 復帰突然変異試験（再試験）

14.3.1. 試験結果

試験結果を Figure 11～15 および Table 5，6 に示した．

被験物質処理群の場合，–S9 処理 TA100，TA1535，WP2*uvrA* ならびに+S9 処理の TA100，TA1535 で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加が認められ，陰性対照値の 2 倍を超えていた．試験菌株に対する生育阻害作用は–S9 処理の場合，TA100，TA1537 の 313 μg／プレート以上，TA98 の 2500 μg／プレート以上，WP2*uvrA* の 5000 μg／プレートで観察された．また，+S9 処理の場合は TA100 の 1250 μg／プレート以上，TA1537 の 2500 μg／プレートで観察された．

一方，陽性対照物質は各試験菌株に対し，復帰突然変異を顕著に誘発した．

14.3.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時，–S9 処理の 156 μg／プレート以上および+S9 処理の 313 μg／プレート以上の用量で反応液が白濁し，–S9 処理の 2500 μg／プレート以上ならびに+S9 処理の 1250 μg／プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた．コロニー計数時，–S9 処理の 2500 μg／プレート以上，+S9 処理の 1250 μg／プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が観察された．

14.4. 比活性

前述の結果から求めた変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性（mg 当たり）は，以下の通りであった．

試験	S9	菌株	試験用量		比活性
用量設定試験	–	TA100	556	μg／プレート	186
	–	TA1535	61.7	μg／プレート	1032
	+	TA1535	1667	μg／プレート	125
復帰突然変異試験	–	TA100	625	μg／プレート	381
	–	TA1535	39.1	μg／プレート	1441
	+	TA1535	1250	μg／プレート	79
復帰突然変異試験（再試験）	–	TA100	625	μg／プレート	364
	–	TA1535	625	μg／プレート	1691
	–	WP2*uvrA*	1250	μg／プレート	23
	+	TA100	2500	μg／プレート	75
	+	TA1535	1250	μg／プレート	180

15. 考察および結論

ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチルの変異原性，すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため，微生物（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した．

最高用量として 5000 μg／プレートあるいは正確な用量反応曲線が求められるような用量範囲を検討した．その結果，ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチル処理群では代謝活性化系非存在下（–S9 処理）の TA100，TA1535 および代謝活性化系存在下（+S9 処理）の TA1535 で試験用量に依存した復帰突然変異コロニー数の明確な増加が認められた．本結果から変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性の最高値は 1691（–S9 処理，TA1535，625 μg／プレート）と算出された．

また，本被験物質ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチル（Phosphorodithioic acid, *O, O'*- diethyl ester）の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった．

類縁体である *O,O*-diethyl S-[2-(ethylthio)ethyl] ester について CHL 細胞を用いた *in vitro* 小核ならびにマウスを用いた小核試験で陽性[1)]との報告があった．*O,O*-diethyl S-[(ethylthio)methyl] ester については CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陰性[2)]，ラット小核試験で陽性[3)]との報告があった．また，Diethyl dithiophosphate ammonium salt および Diethyl dithiophosphate potassium salt の遺伝毒性に関する報告はなかった．

なお，陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数は，いずれも当施設での背景データ（Appendix 1）の概ね範囲内であり，本試験は適切な条件でなされたと判断された．

以上の試験結果から，本試験条件下においてジチオリン酸 *O, O'*-ジエチルの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した．

16. 参考文献

1) Ni Z., Li S., Liu Y., Tang Y., Pang D. : Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao, 24, 82-86, 1993

2) Lin MF., Wu CL., Wang TC. : Mutat. Res., 188, 241-250, 1987

3) Grover IS., Malhi PK. : Mutat. Res., 155, 131-134, 1985

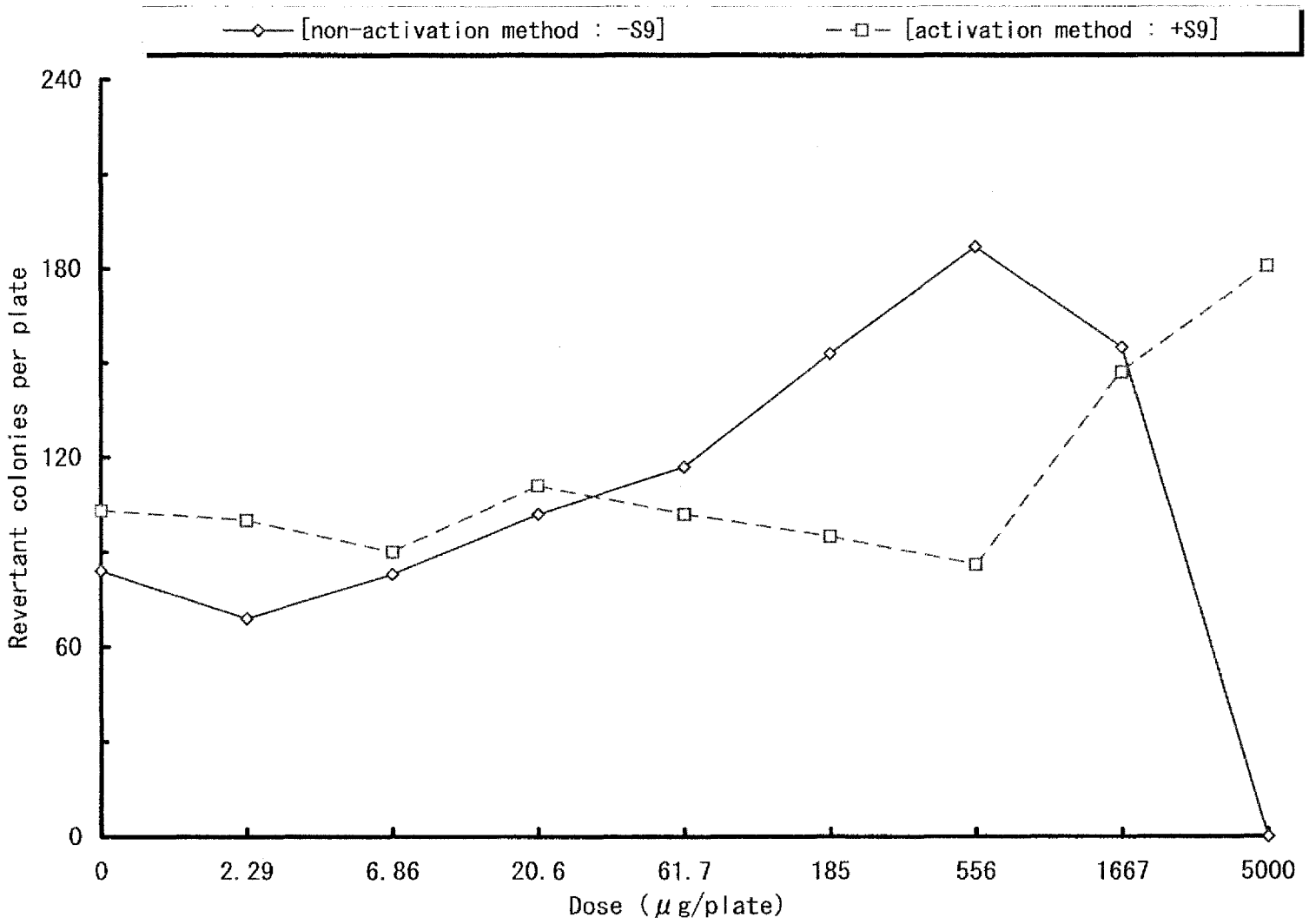


Figure 1. Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester in strain TA100

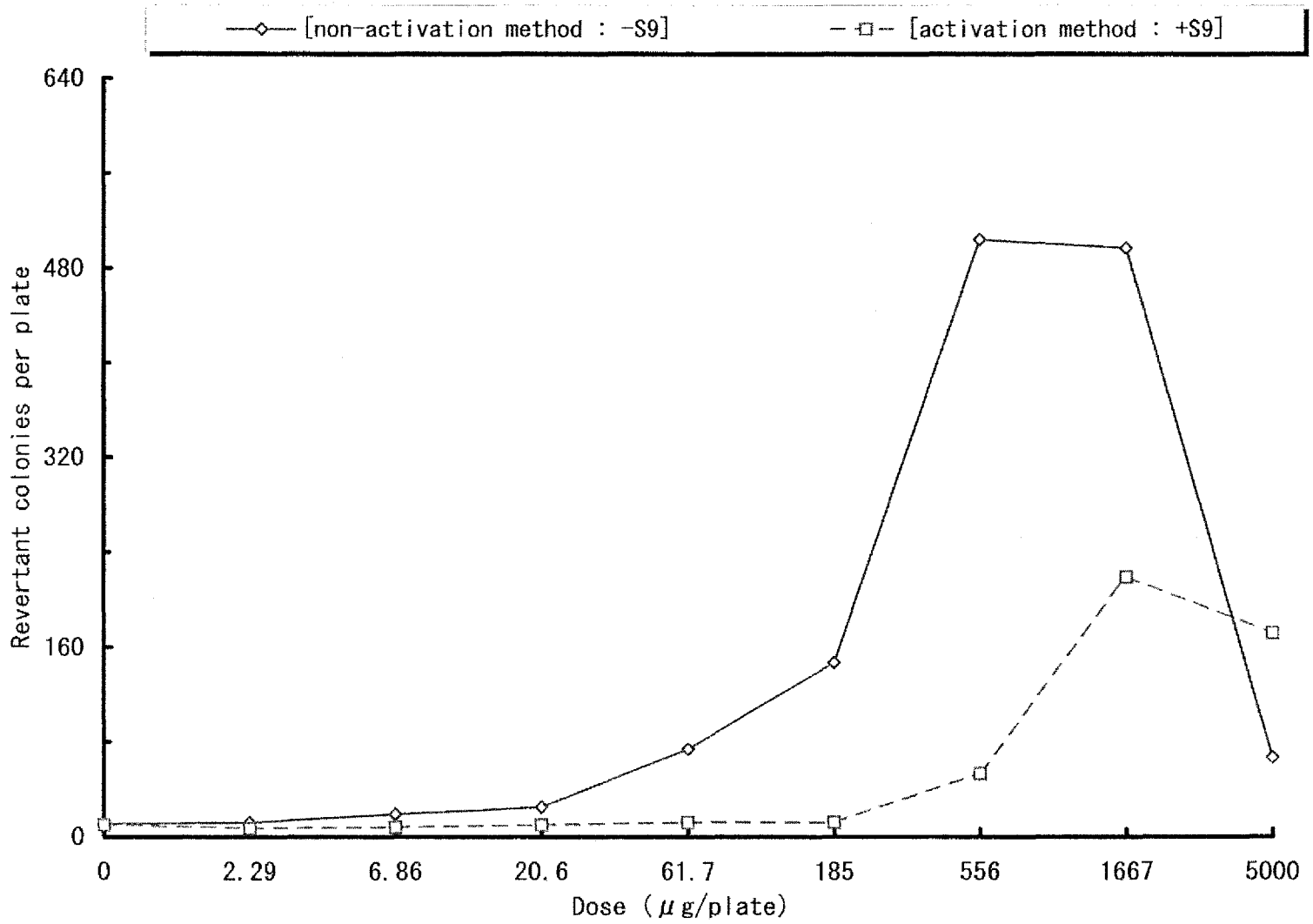


Figure 2. Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester in strain TA1535

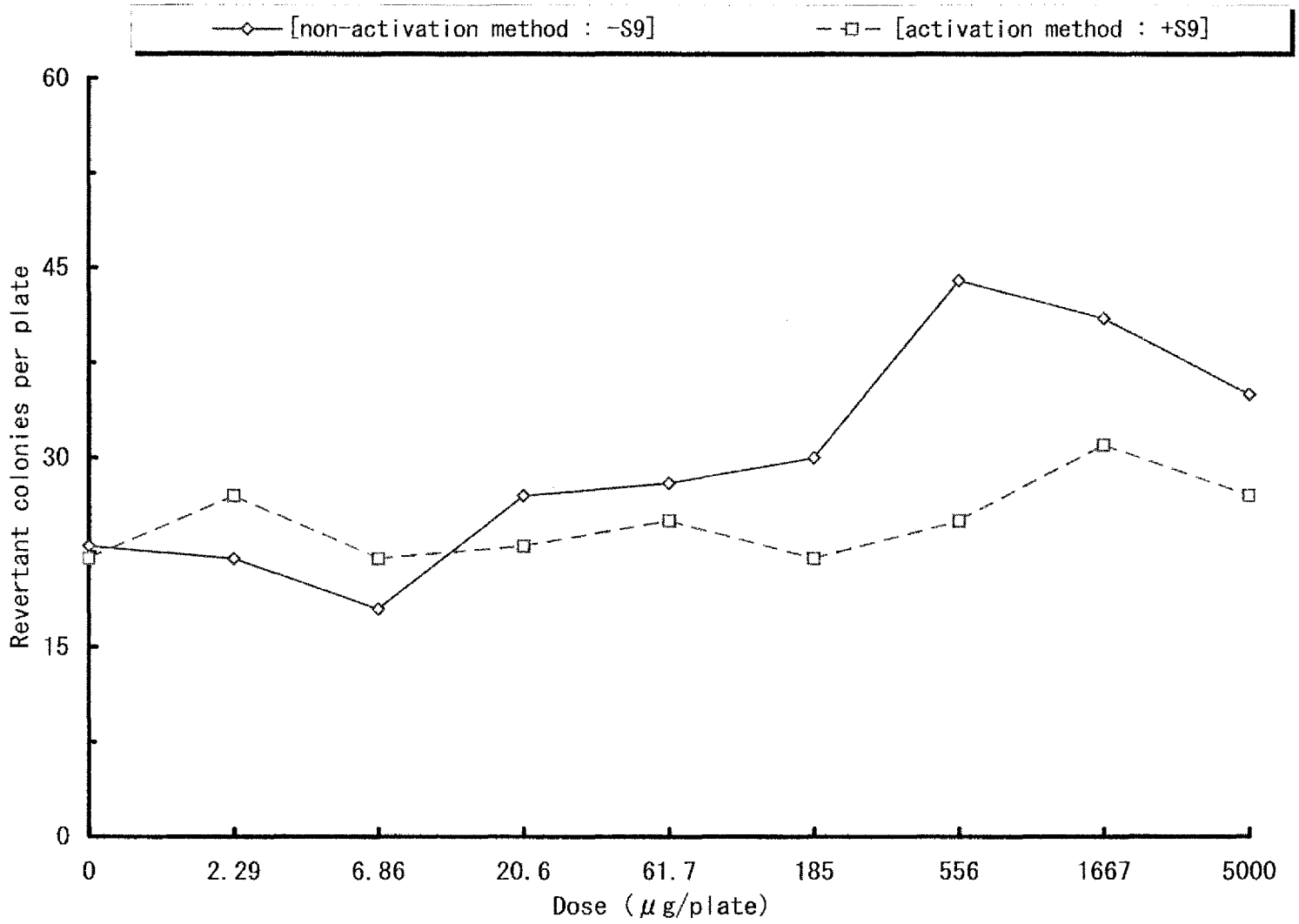


Figure 3. Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain WP2*uvrA*

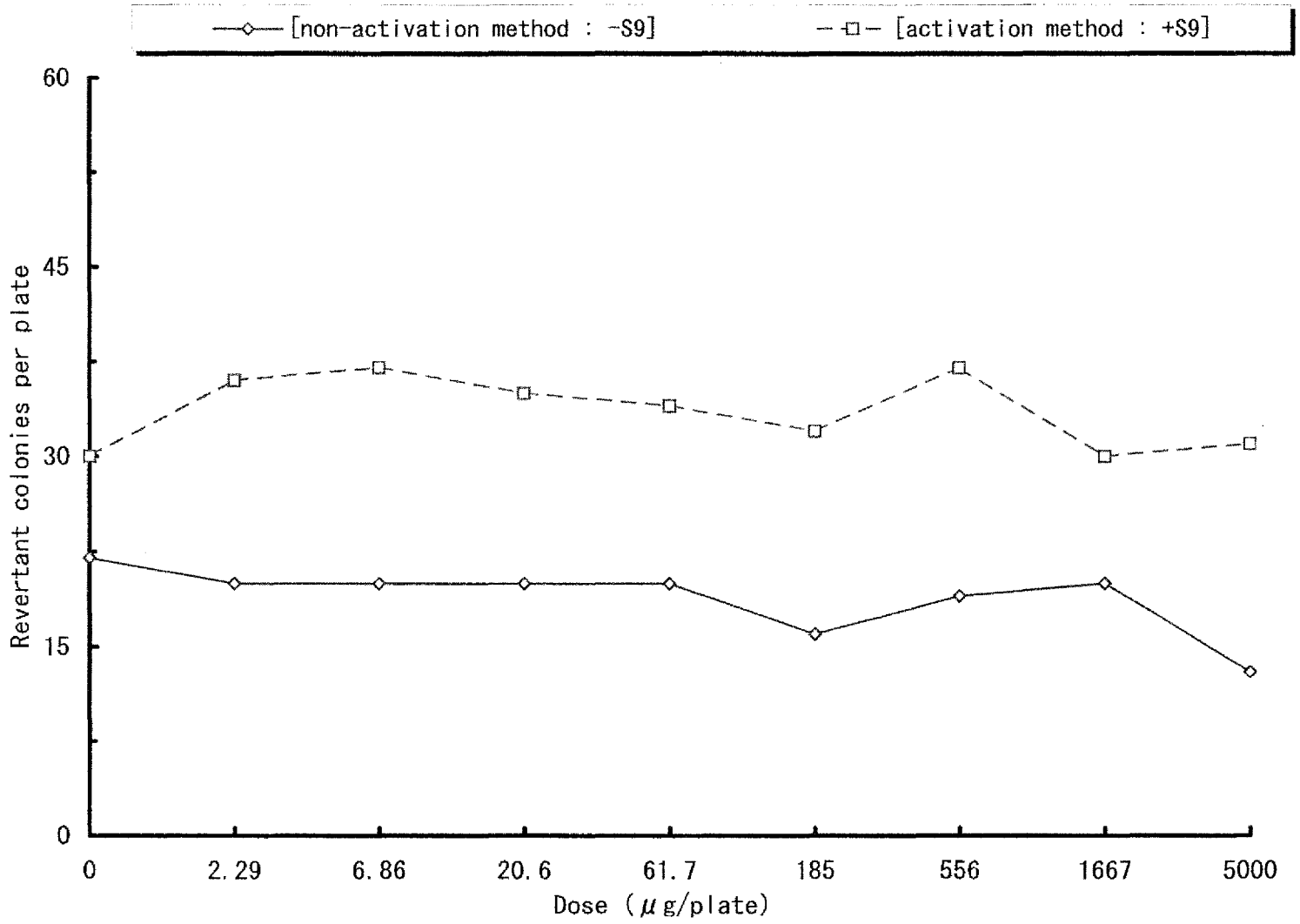


Figure 4. Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester in strain TA98

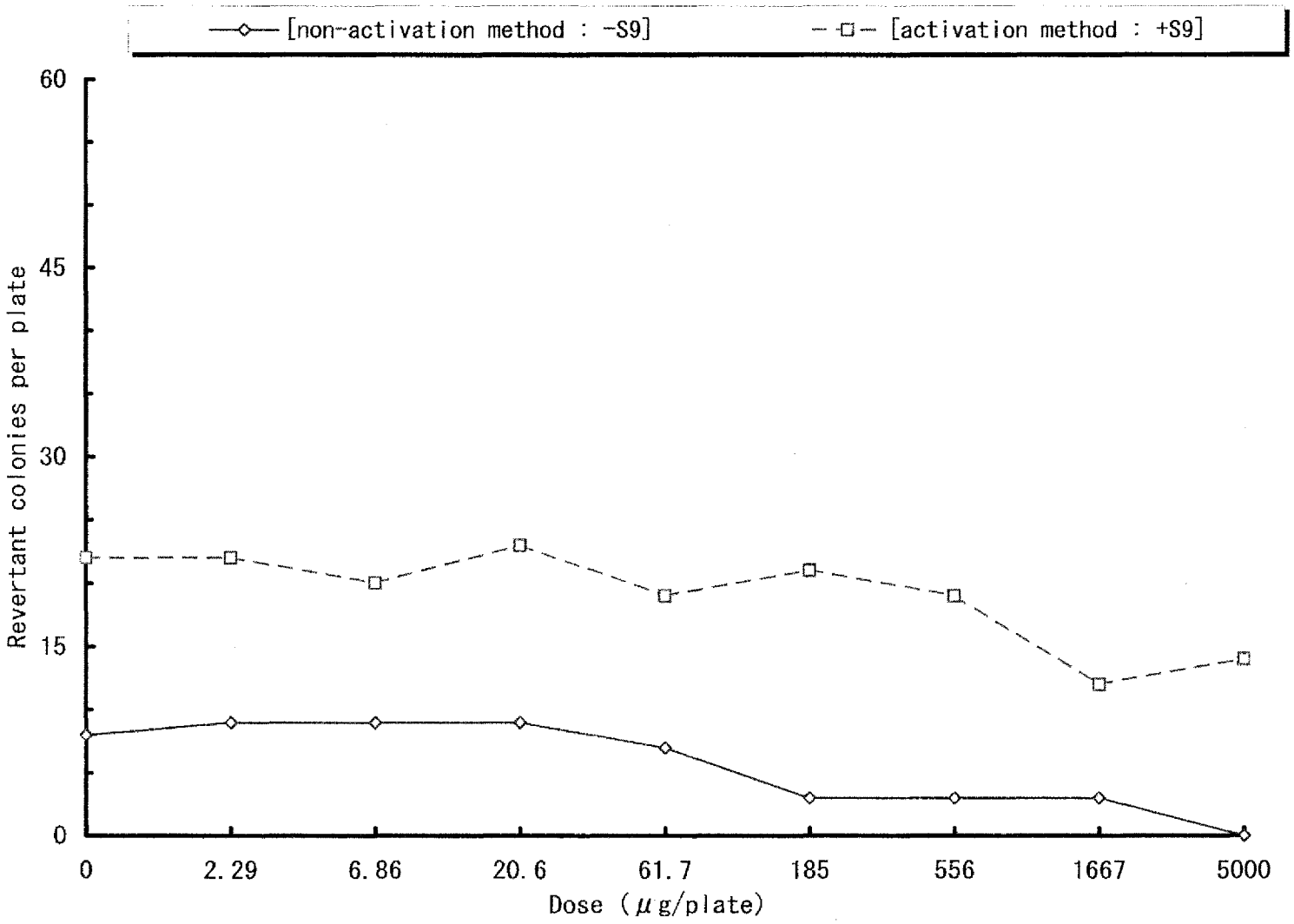


Figure 5. Dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester in strain TA1537

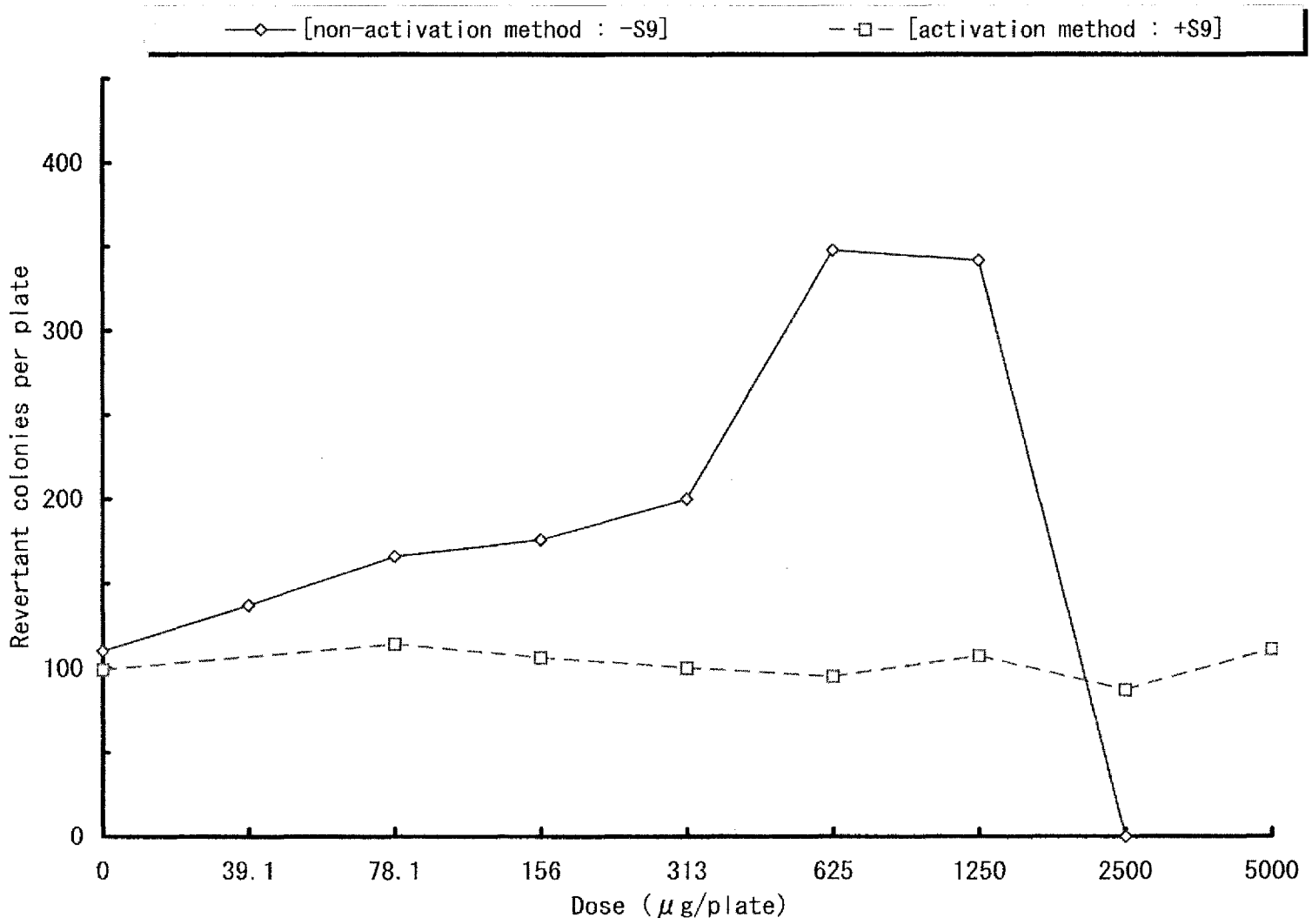


Figure 6. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain TA100

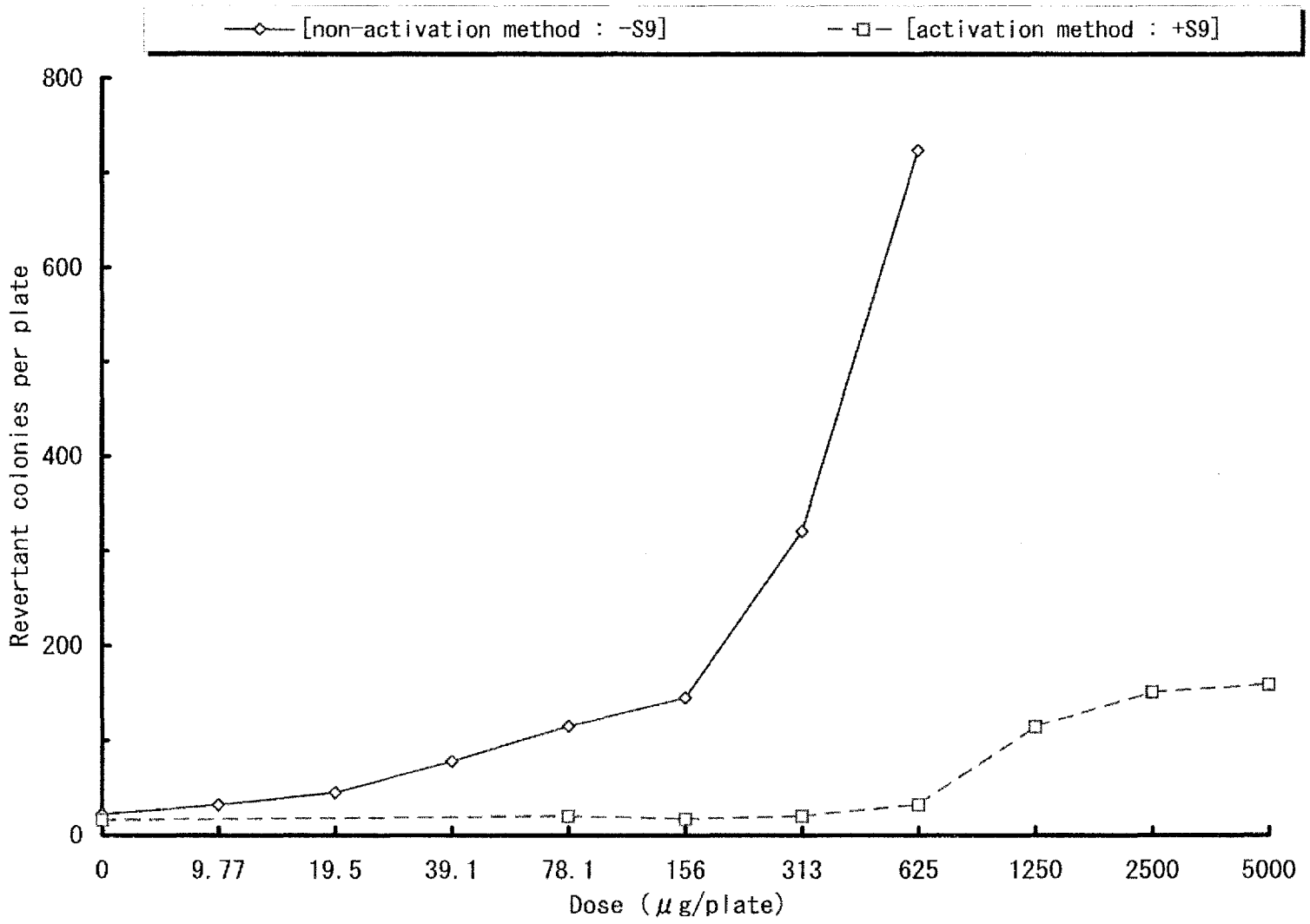


Figure 7. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester in strain TA1535

Exp. No. 6873 (115-170)

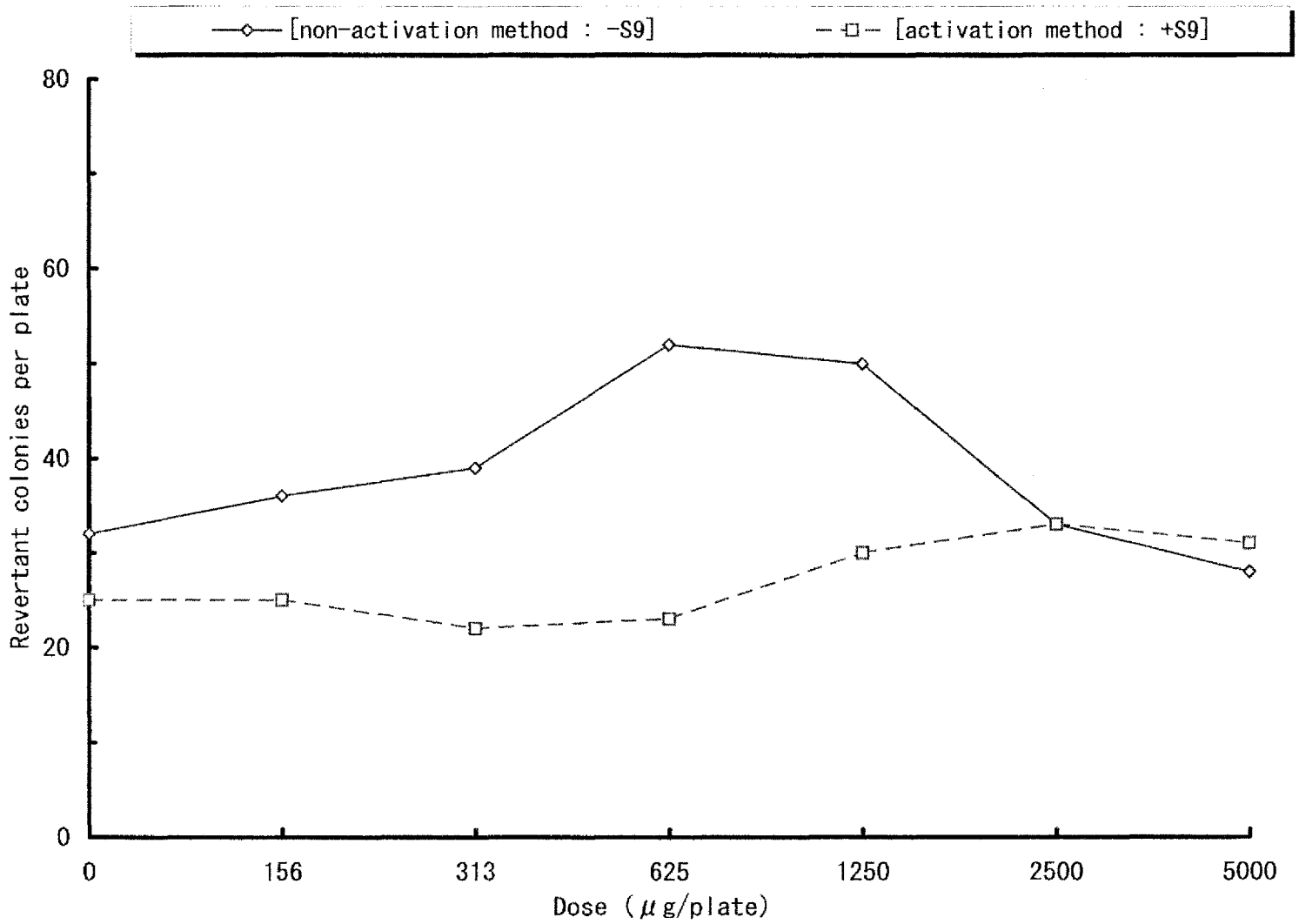


Figure 8. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain WP2*uvrA*

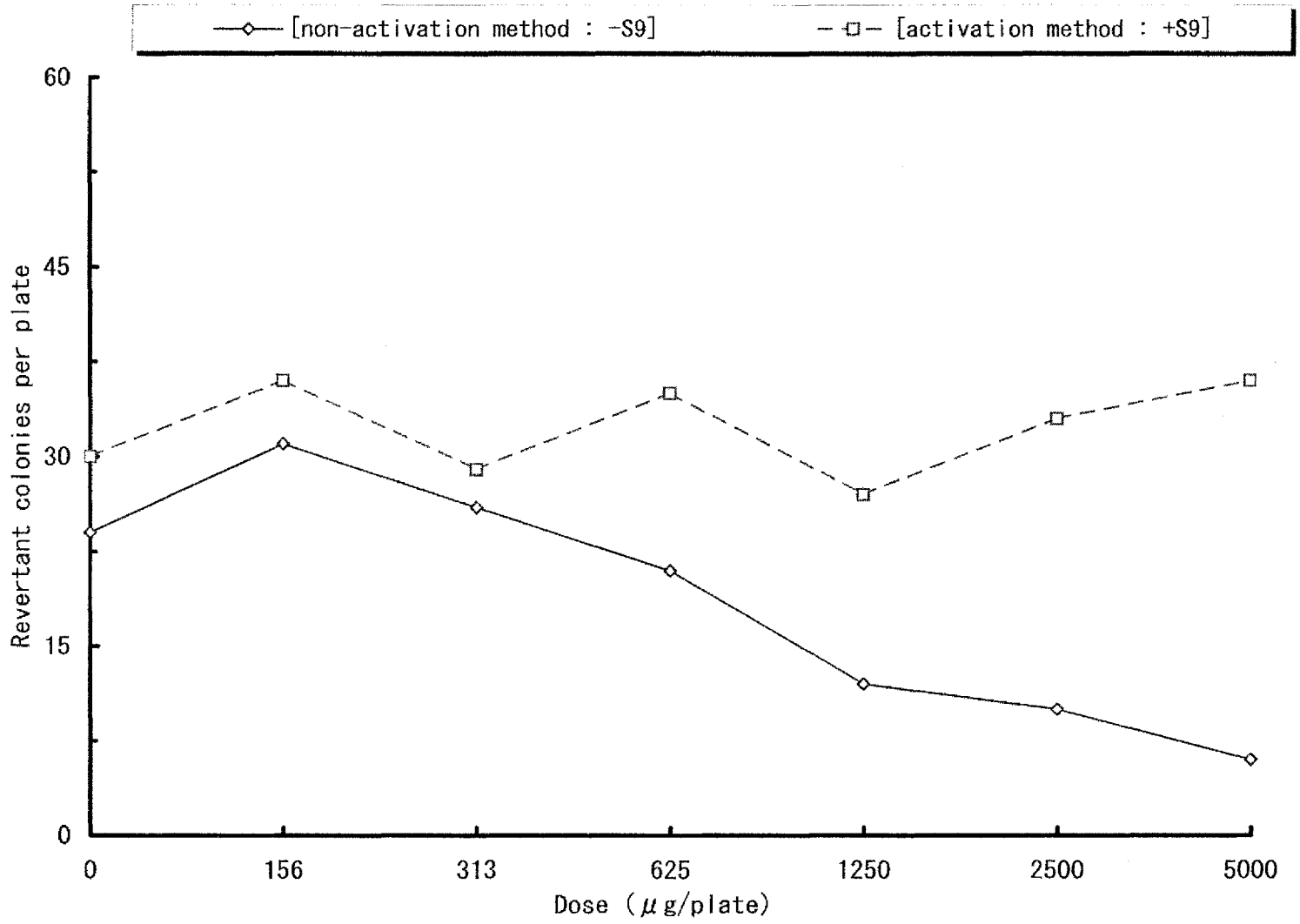


Figure 9. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain TA98

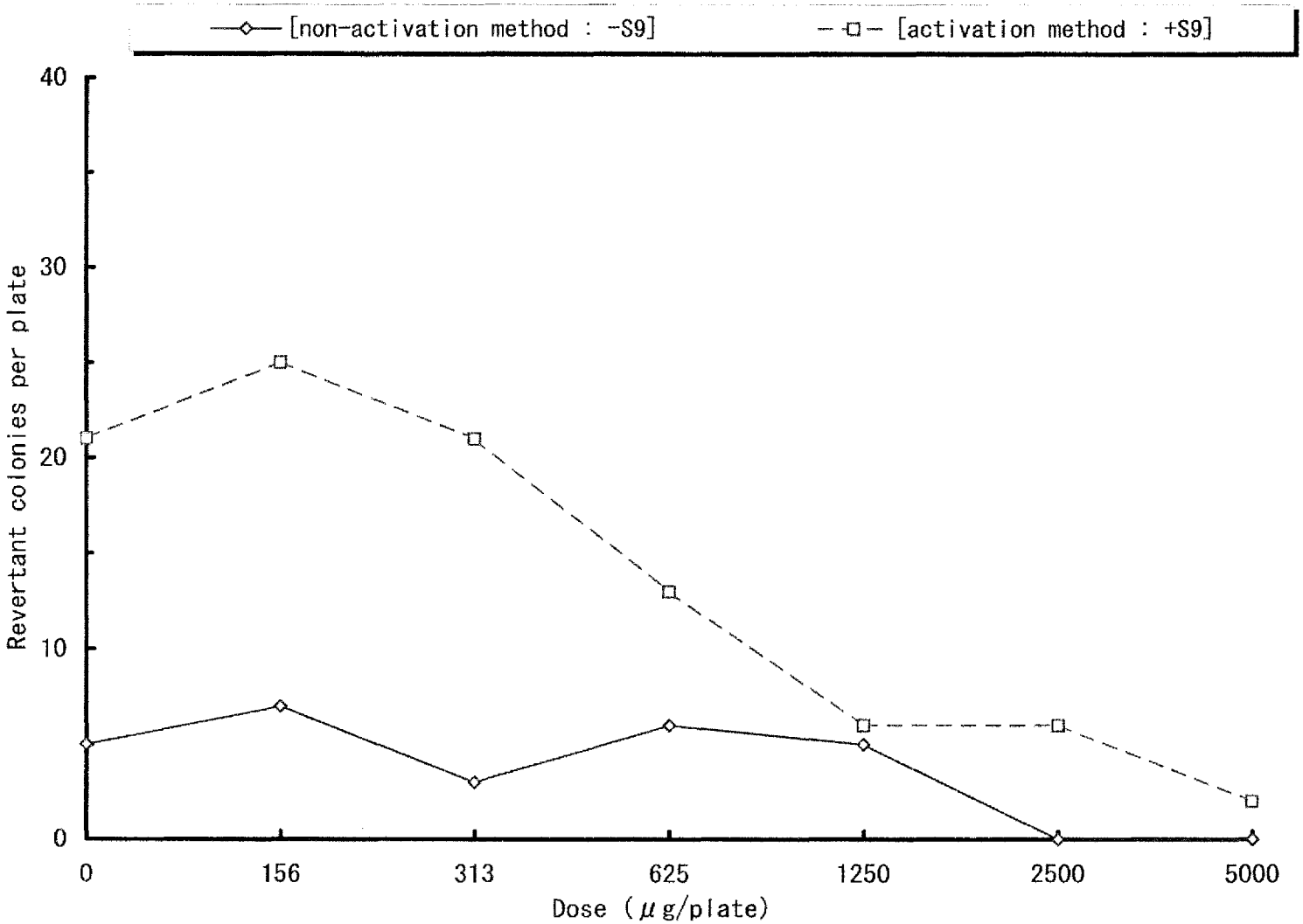


Figure 10. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain TA1537

Exp. No. 6873 (115-170)

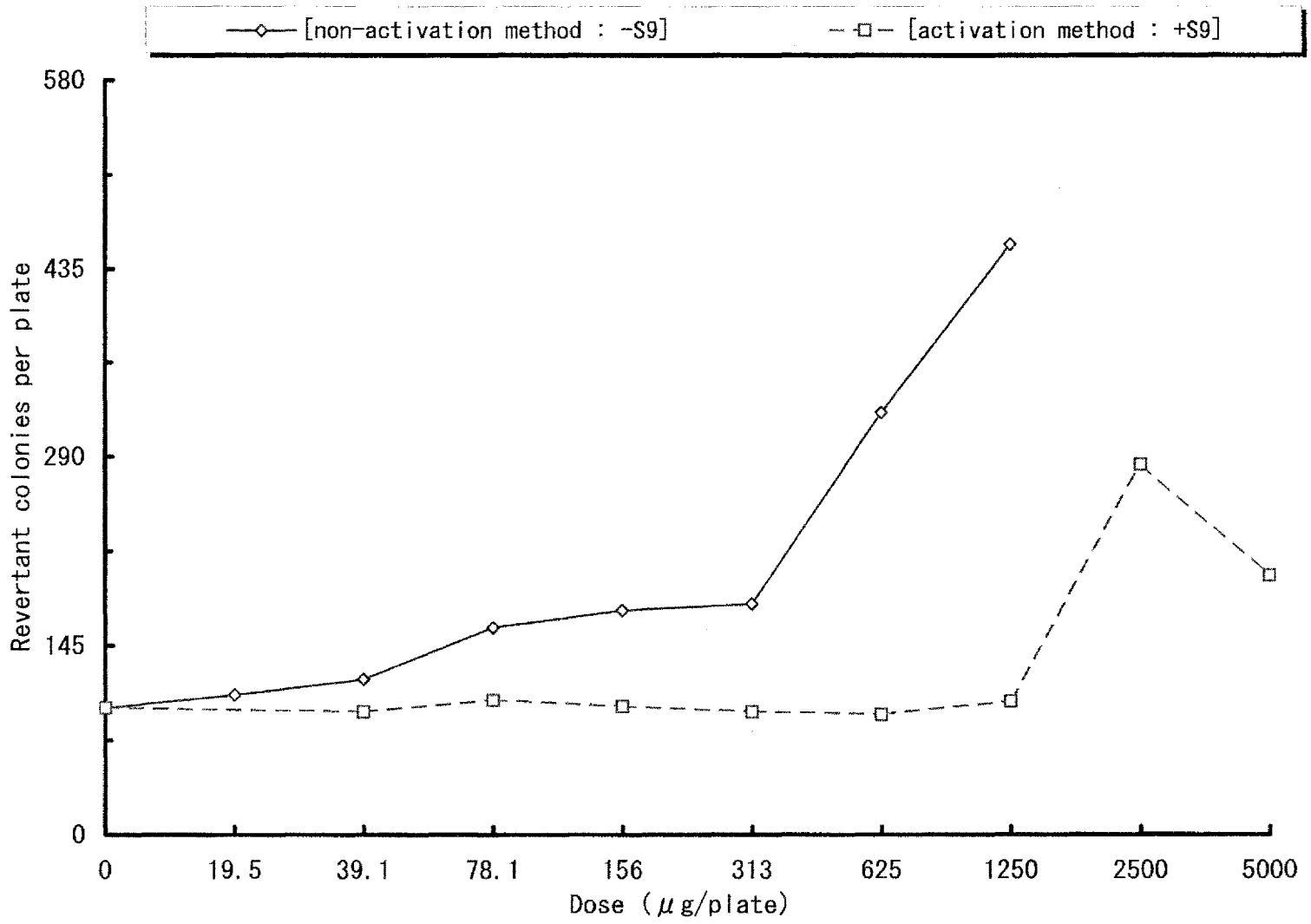


Figure 11. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain TA100 (restudy)

Exp. No. 6873 (115-170)

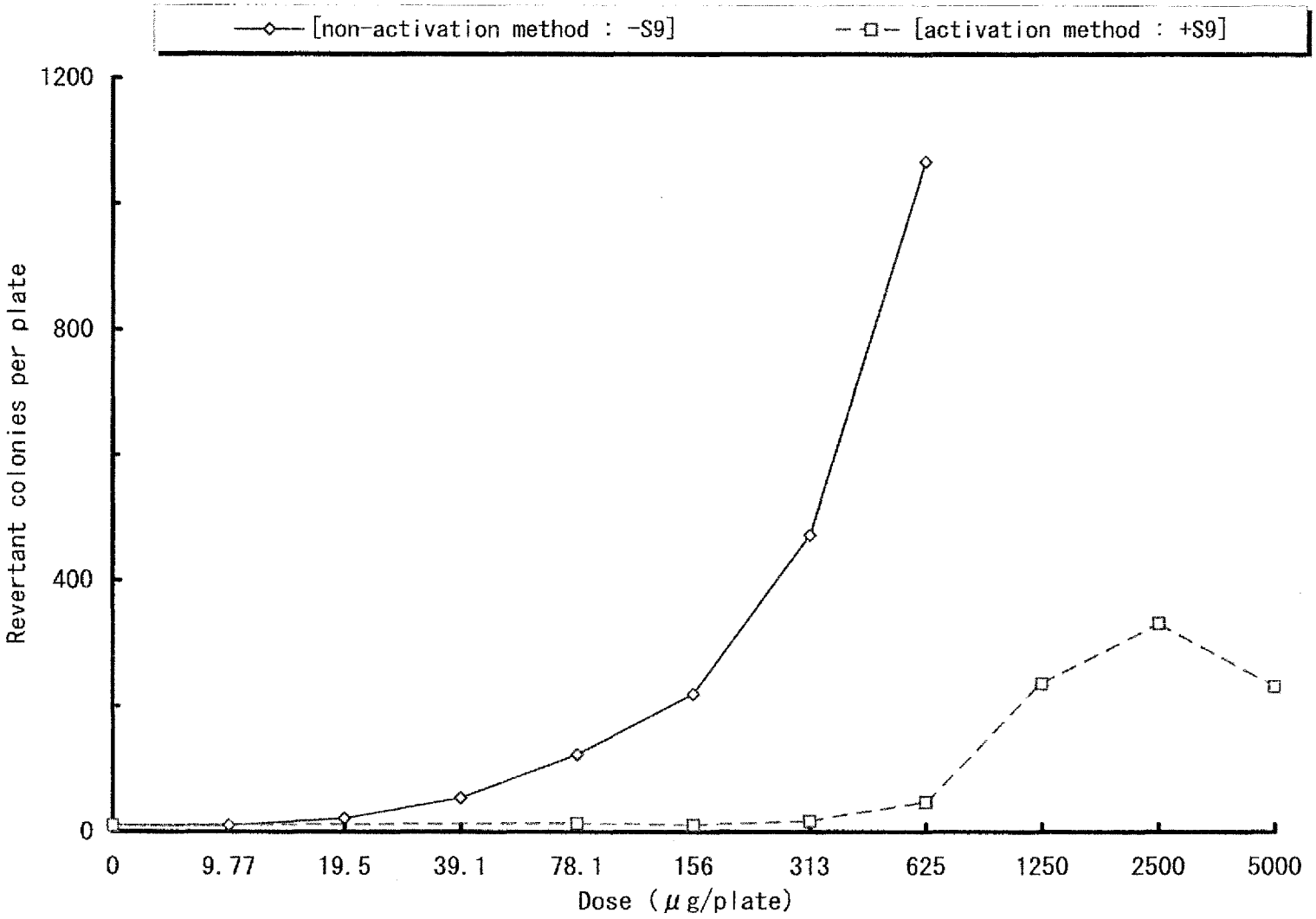


Figure 12. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain TA1535 (restudy)

Exp. No. 6873 (115-170)

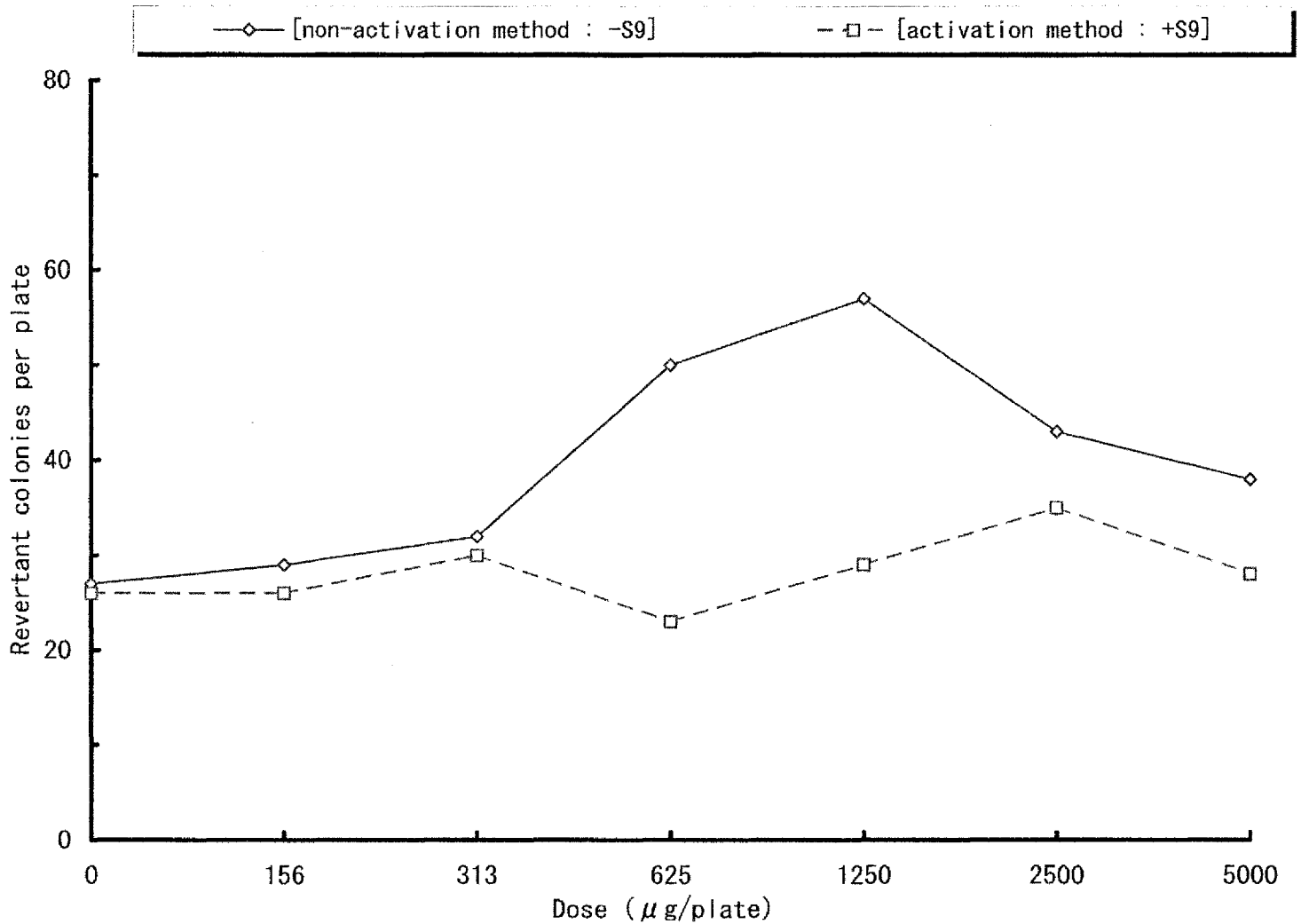


Figure 13. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain WP2*uvrA* (restudy)

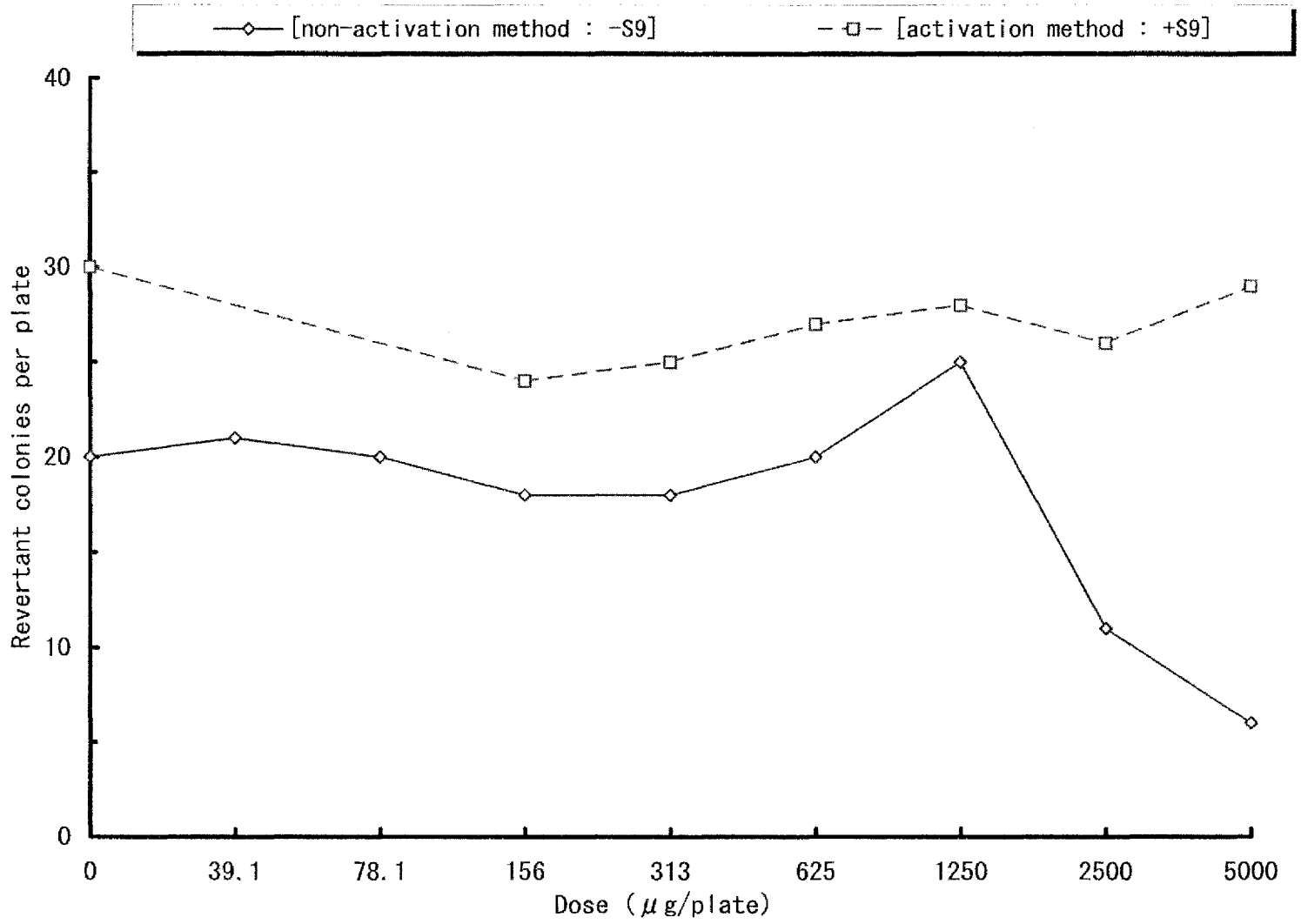


Figure 14. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain TA98 (restudy)

Exp. No. 6873 (115-170)

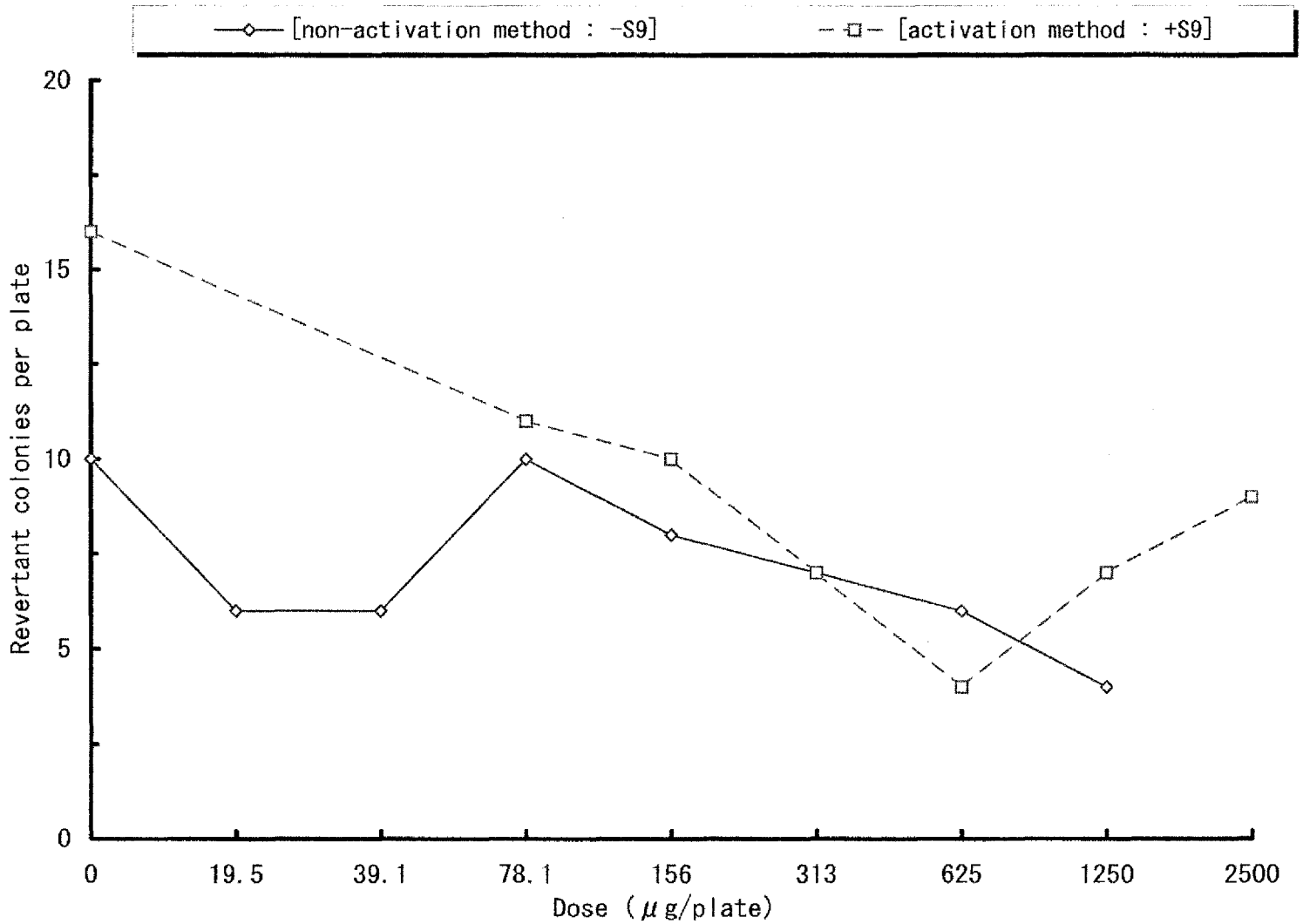


Figure 15. Bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester in strain TA1537 (restudy)

Table 1. Summary data of dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester [non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
DMSO	0	89 87 75 [84 ± 8]	11 9 12 [11 ± 2]	29 18 22 [23 ± 6]	27 21 17 [22 ± 5]	9 7 8 [8 ± 1]
Test substance	2.29	66 64 77 [69 ± 7]	13 10 14 [12 ± 2]	25 20 20 [22 ± 3]	17 20 23 [20 ± 3]	13 9 5 [9 ± 4]
	6.86	78 80 92 [83 ± 8]	20 18 19 [19 ± 1]	21 18 14 [18 ± 4]	11 21 29 [20 ± 9]	7 12 8 [9 ± 3]
	20.6	107 104 94 [102 ± 7]	30 19 27 [25 ± 6]	33 20 28 [27 ± 7]	22 19 20 [20 ± 2]	10 10 6 [9 ± 2]
	61.7	122 117 112 [117 ± 5]	67 93 63 [74 ± 16]	27 24 32 [28 ± 4]	20 20 20 [20 ± 0]	6 5 10 [7 ± 3]
	185	164 163 133 [153 ± 18]	155 145 142 [147 ± 7]	29 30 31 [30 ± 1]	17 18 12 [16 ± 3]	3 3 3 [3 ± 0]
	556	199 * 186 * 176 * [187 ± 12]	495 475 541 [504 ± 34]	41 50 40 [44 ± 6]	16 18 22 [19 ± 3]	2 3 3 [3 ± 1]
	1667	168 * 161 * 137 * [155 ± 16]	425 587 480 [497 ± 82]	55 35 32 [41 ± 13]	19 18 23 [20 ± 3]	2 * 3 * 4 * [3 ± 1]
	5000 +	0 * 0 * 0 * [0 ± 0]	66 * 77 * 57 * [67 ± 10]	40 * 36 * 30 * [35 ± 5]	8 * 16 * 14 * [13 ± 4]	0 * 0 * 0 * [0 ± 0]
Positive control		372 308 342 a) [341 ± 32]	560 565 526 b) [550 ± 21]	109 96 94 a) [100 ± 8]	562 672 603 c) [612 ± 56]	370 318 305 d) [331 ± 34]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate
+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period
* : Growth inhibition was observed

Table 2. Summary data of dose-finding study with Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester [activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
DMSO	0	101 99 108 [103 ± 5]	8 14 7 [10 ± 4]	19 24 22 [22 ± 3]	30 32 28 [30 ± 2]	23 20 24 [22 ± 2]
Test substance	2.29	105 101 93 [100 ± 6]	11 7 4 [7 ± 4]	31 32 17 [27 ± 8]	36 38 34 [36 ± 2]	18 28 21 [22 ± 5]
	6.86	85 94 92 [90 ± 5]	8 10 7 [8 ± 2]	23 24 20 [22 ± 2]	51 34 25 [37 ± 13]	17 24 18 [20 ± 4]
	20.6	100 128 105 [111 ± 15]	9 8 14 [10 ± 3]	24 27 17 [23 ± 5]	42 32 31 [35 ± 6]	21 21 26 [23 ± 3]
	61.7	93 116 98 [102 ± 12]	19 10 7 [12 ± 6]	27 18 30 [25 ± 6]	36 26 39 [34 ± 7]	12 24 22 [19 ± 6]
	185	102 89 95 [95 ± 7]	13 9 13 [12 ± 2]	26 20 19 [22 ± 4]	37 29 30 [32 ± 4]	26 19 17 [21 ± 5]
	556	90 88 81 [86 ± 5]	58 46 55 [53 ± 6]	25 30 20 [25 ± 5]	35 39 37 [37 ± 2]	19 19 19 [19 ± 0]
	1667	166 * 133 * 143 * [147 ± 17]	212 212 232 [219 ± 12]	27 38 27 [31 ± 6]	28 32 30 [30 ± 2]	12 14 10 [12 ± 2]
	5000 +	192 * 181 * 171 * [181 ± 11]	198 177 141 [172 ± 29]	30 25 26 [27 ± 3]	32 25 37 [31 ± 6]	11 * 15 * 16 * [14 ± 3]
Positive control		790 795 859 a) [815 ± 38]	275 310 323 b) [303 ± 25]	924 1099 994 c) [1006 ± 88]	355 320 316 d) [330 ± 21]	155 139 143 b) [146 ± 8]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μg/plate b) : 2-AA, 2 μg/plate c) : 2-AA, 10 μg/plate d) : 2-AA, 0.5 μg/plate
+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period
* : Growth inhibition was observed

Exp. No. 6873 (115-170)

Table 3. Results of the bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester [non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
DMSO	0	126 97 107 [110 ± 15]	25 16 25 [22 ± 5]	34 30 33 [32 ± 2]	30 25 16 [24 ± 7]	5 5 4 [5 ± 1]
Test substance	9.77		27 31 39 [32 ± 6]			
	19.5		53 53 29 [45 ± 14]			
	39.1	143 146 121 [137 ± 14]	74 81 80 [78 ± 4]			
	78.1	183 162 154 [166 ± 15]	114 122 110 [115 ± 6]			
	156	188 176 164 [176 ± 12]	145 152 139 [145 ± 7]	33 36 38 [36 ± 3]	25 38 29 [31 ± 7]	8 5 7 [7 ± 2]
	313	222 * 234 * 145 * [200 ± 48]	310 429 223 [321 ± 103]	41 40 35 [39 ± 3]	19 29 31 [26 ± 6]	4 * 2 * 3 * [3 ± 1]
	625	340 * 339 * 366 * [348 ± 15]	741 680 751 [724 ± 38]	50 58 49 [52 ± 5]	17 20 26 [21 ± 5]	4 * 6 * 9 * [6 ± 3]
	1250	294 * 371 * 362 * [342 ± 42]		44 53 52 [50 ± 5]	12 * 14 * 11 * [12 ± 2]	2 * 3 * 9 * [5 ± 4]
	2500 +	0 * 0 * 0 * [0 ± 0]		35 32 32 [33 ± 2]	11 * 9 * 11 * [10 ± 1]	0 * 0 * 0 * [0 ± 0]
	5000 +			33 * 24 * 27 * [28 ± 5]	6 * 7 * 6 * [6 ± 1]	0 * 0 * 0 * [0 ± 0]
Positive control		560 596 584 a) [580 ± 18]	619 619 588 b) [609 ± 18]	130 121 117 c) [123 ± 7]	645 677 651 c) [658 ± 17]	310 354 298 d) [321 ± 29]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate
+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period
* : Growth inhibition was observed

Table 4. Results of the bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O, O'* diethyl ester [activation method : +S9]

Exp. No. 6873 (115-170)

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2*uvrA*			TA98			TA1537		
DMSO	0	121	84	92	17	13	17	24	26	25	24	33	33	19	22	21
		[99	±	19]	[16	±	2]	[25	±	1]	[30	±	5]	[21	±	2]
Test substance	78.1	96	129	118	20	23	18									
		[114	±	17]	[20	±	3]									
	156	115	102	101	12	20	20	14	38	24	33	34	42	20	27	27
		[106	±	8]	[17	±	5]	[25	±	12]	[36	±	5]	[25	±	4]
	313	92	102	106	19	25	16	21	18	26	18	36	34	25	21	16
		[100	±	7]	[20	±	5]	[22	±	4]	[29	±	10]	[21	±	5]
	625	83 *	103 *	98 *	41	30	26	18	17	34	42	32	31	8	14	17
		[95	±	10]	[32	±	8]	[23	±	10]	[35	±	6]	[13	±	5]
	1250 +	99 *	104 *	118 *	117	105	121	28	33	30	25	38	18	8	5	6
		[107	±	10]	[114	±	8]	[30	±	3]	[27	±	10]	[6	±	2]
	2500 +	65 *	115 *	81 *	161	150	141	23	38	39	41	24	33	5 *	6 *	6 *
		[87	±	26]	[151	±	10]	[33	±	9]	[33	±	9]	[6	±	1]
	5000 +	111 *	94 *	127 *	159	169	148	35	32	27	34	38	37	0 *	2 *	4 *
		[111	±	17]	[159	±	11]	[31	±	4]	[36	±	2]	[2	±	2]
Positive control		858	764	796 a)	314	343	322 b)	975	728	788 c)	355	370	347 d)	239	247	194 b)
		[806	±	48]	[326	±	15]	[830	±	129]	[357	±	12]	[227	±	29]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate
+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period
* : Growth inhibition was observed

Exp. No. 6873 (115-170)

Table 5. Results of the bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester (restudy)
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2*uvrA*			TA98			TA1537		
DMSO	0	88	99	103	11	10	9	33	22	27	25	13	22	11	9	11
		[97	±	8]	[10	±	1]	[27	±	6]	[20	±	6]	[10	±	1]
Test substance	9.77				9	13	9									
					[10	±	2]									
	19.5	105	104	113	20	26	18							8	5	4
		[107	±	5]	[21	±	4]							[6	±	2]
	39.1	121	133	103	44	54	65				21	21	20	4	8	7
		[119	±	15]	[54	±	11]				[21	±	1]	[6	±	2]
	78.1	153	181	144	131	119	118				19	22	20	12	11	6
		[159	±	19]	[123	±	7]				[20	±	2]	[10	±	3]
	156	172	170	173	235	216	207	31	28	27	18	23	12	11	9	5
		[172	±	2]	[219	±	14]	[29	±	2]	[18	±	6]	[8	±	3]
	313	167 *	181 *	182 *	496	486	434	32	31	32	14	25	15	9 *	6 *	5 *
		[177	±	8]	[472	±	33]	[32	±	1]	[18	±	6]	[7	±	2]
	625	313 *	315 *	344 *	1066	1089	1045	50	54	47	19	23	18	6 *	5 *	6 *
		[324	±	17]	[1067	±	22]	[50	±	4]	[20	±	3]	[6	±	1]
	1250	435 *	454 *	473 *				59	65	46	22	29	25	5 *	5 *	2 *
		[454	±	19]				[57	±	10]	[25	±	4]	[4	±	2]
	2500 +							42	51	35	13 *	9 *	10 *			
								[43	±	8]	[11	±	2]			
	5000 +							47 *	39 *	29 *	4 *	7 *	6 *			
								[38	±	9]	[6	±	2]			
Positive control		387	435	449 a)	659	615	635 b)	154	127	114 a)	652	587	642 c)	350	243	320 d)
		[424	±	33]	[636	±	22]	[132	±	20]	[627	±	35]	[304	±	55]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate
+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period
* : Growth inhibition was observed

Exp. No. 6873 (115-170)

Table 6. Results of the bacterial reversion assay of Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester (restudy)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2*uvrA*			TA98			TA1537		
DMSO	0	102	92	96	11	7	11	30	23	26	31	30	28	11	21	15
		[97	±	5]	[10	±	2]	[26	±	4]	[30	±	2]	[16	±	5]
Test substance	39.1	108	75	100												
		[94	±	17]												
	78.1	121	95	94	11	12	17							12	17	4
		[103	±	15]	[13	±	3]							[11	±	7]
	156	107	96	90	9	11	9	24	25	28	25	30	17	13	14	4
		[98	±	9]	[10	±	1]	[26	±	2]	[24	±	7]	[10	±	6]
	313	101	92	89	13	19	20	40	27	23	23	25	27	9	8	5
		[94	±	6]	[17	±	4]	[30	±	9]	[25	±	2]	[7	±	2]
	625	95	86	96	47	46	48	20	24	24	32	25	25	2	4	6
		[92	±	6]	[47	±	1]	[23	±	2]	[27	±	4]	[4	±	2]
	1250 +	91 *	122 *	94 *	235	232	237	30	23	33	25	26	32	7	9	6
		[102	±	17]	[235	±	3]	[29	±	5]	[28	±	4]	[7	±	2]
	2500 +	278 *	277 *	297 *	357	319	320	38	40	28	23	31	25	11 *	9 *	8 *
		[284	±	11]	[332	±	22]	[35	±	6]	[26	±	4]	[9	±	2]
	5000 +	212 *	182 *	203 *	226	226	240	32	29	24	36	22	30			
		[199	±	15]	[231	±	8]	[28	±	4]	[29	±	7]			
Positive control		847	981	955 a)	329	295	301 b)	899	853	888 c)	310	312	292 d)	141	162	184 b)
		[928	±	71]	[308	±	18]	[880	±	24]	[305	±	11]	[162	±	22]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μg/plate b) : 2-AA, 2 μg/plate c) : 2-AA, 10 μg/plate d) : 2-AA, 0.5 μg/plate
+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period
* : Growth inhibition was observed