

# 最終報告書

ジチオリン酸 *O,O*-ジエチルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : 6874 ( 115-171 )

平成 16 年 12 月 7 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.....  | 4  |
| 12. 被験物質.....   | 8  |
| 13. 試験材料および方法.....  | 10 |
| 14. 試験結果.....   | 18 |
| 15. 考察および結論.....  | 20 |
| 16. 参考文献.....   | 20 |
| Figure 1 Growth inhibition of CHL cells treated with Phosphorodithioic acid,<br><i>O, O'</i> - diethyl ester [short-term treatment].....          | 22 |
| Figure 2 Growth inhibition of CHL cells treated with Phosphorodithioic acid,<br><i>O, O'</i> - diethyl ester [continuous treatment].....          | 23 |
| Figure 3 Incidence of structural aberrations induced by<br>Phosphorodithioic acid, <i>O, O'</i> - diethyl ester [short-term treatment: -S9] ..... | 24 |
| Figure 4 Incidence of structural aberrations induced by<br>Phosphorodithioic acid, <i>O, O'</i> - diethyl ester [short-term treatment: +S9] ..... | 25 |
| Figure 5 Incidence of structural aberrations induced by<br>Phosphorodithioic acid, <i>O, O'</i> - diethyl ester [continuous treatment: 24h].....  | 26 |

Tables

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Table 1 | Results of growth inhibition test on<br>Phosphorodithioic acid, <i>O, O'</i> - diethyl ester [short-term treatment].....                       | 27 |
| Table 2 | Results of growth inhibition test on<br>Phosphorodithioic acid, <i>O, O'</i> - diethyl ester [continuous treatment].....                       | 28 |
| Table 3 | Chromosome aberration test on CHL cells treated with<br>Phosphorodithioic acid, <i>O, O'</i> - diethyl ester [short-term treatment: -S9] ..... | 29 |
| Table 4 | Chromosome aberration test on CHL cells treated with<br>Phosphorodithioic acid, <i>O, O'</i> - diethyl ester [short-term treatment: +S9] ..... | 30 |
| Table 5 | Chromosome aberration test on CHL cells treated with<br>Phosphorodithioic acid, <i>O, O'</i> - diethyl ester [continuous treatment: 24h].....  | 31 |

## 1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、ジチオリン酸 *O, O*-ジエチルは弱いながらも染色体異常を誘起するものと判断した。

ジチオリン酸 *O, O*-ジエチルの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に、試験用量を設定した。染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理で 82.3, 118 および 168  $\mu\text{g/mL}$ , +S9 処理で 118, 168 および 240  $\mu\text{g/mL}$  のそれぞれ 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、ジチオリン酸 *O, O*-ジエチル処理群の場合、-S9 処理, +S9 処理とも溶媒対照と比較して統計学的に有意な染色体異常の誘発が認められた。しかしながら、弱い陽性反応であったことから連続処理法 24 時間処理による試験を追加して実施した。連続処理法では 112, 140 および 175  $\mu\text{g/mL}$  のそれぞれ 3 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、統計学的に有意な染色体構造異常の誘発が認められ、かつ、いずれの処理においても用量に依存した増加であったことから最終的に陽性反応と判断した。

また、-S9 処理, +S9 処理およびの 24 時間処理の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびにシクロホスファミド (CP) は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。

12. 被験物質

試験に使用する被験物質は 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)

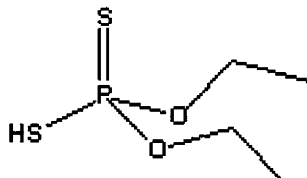
12.7. CAS No.

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 (0.93 g) を保存した。残りは安定性分析のため  
に返却した。

### 13. 試験材料および方法

#### 13.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を使用した。CHL/IU 細胞は昭和 59 年 11 月 15 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、一部についてはジメチルスルホキシド (DMSO : GC 用 ; Merck KGaA ; 純度 99.9% ; Lot No. K26414578) を容量比で 10% 添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結した細胞を融解した後、3~5 日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験では継代数 11 の細胞を、染色体異常試験 (短時間処理法) では同 15 の細胞を、染色体異常試験 (連続処理法) では同 6 の細胞を用いた。

#### 13.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : 旭テクノグラス株式会社 ; Lot No. 99560009 【用量設定試験, 短時間処理法】, 317064 【連続処理法】) に非働化 (56°C, 30 分) 済み仔牛血清 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 401294 【用量設定試験, 短時間処理法】, 472959 【連続処理法】) を最終濃度で 10% になるよう添加した。

調製後の培養液は使用時まで冷暗所 (4°C) に保存した。

#### 13.3. 培養条件

CO<sub>2</sub> インキュベーター (三洋電機バイオメディカ株式会社) を用い、CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 37°C の条件で細胞を培養した。

#### 13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社 ; Lot No. CAM-476) を試験に使用した。

使用時まで超低温フリーザーに保存 (-80°C) 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等を以下に示した。

|                |  |
|----------------|--|
| ロット番号          | RAA-476  |
| 製造年月日          | 平成 15 年 1 月 17 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)  |
| 使用動物           | ラット : Sprague-Dawley 系   |
| 性/週齢           | 雄/7 週齢   |
| 体重             | 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<br>投与回数 | PB : 30 mg/kg 1 回 (1 日目),<br>60 mg/kg 3 回 (2~4 日目)<br>BF : 80 mg/kg 1 回 (3 日目) |
| 投与方法           | 腹腔内投与  |
| 蛋白含量           | 27.11 mg/mL  |

#### 13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

|                    |               |
|--------------------|---------------|
| S9                 | 0.3 mL        |
| MgCl <sub>2</sub>  | 5 μmol/0.1mL  |
| KCl                | 33 μmol/0.1mL |
| G-6-P              | 5 μmol/0.1mL  |
| NADP               | 4 μmol/0.1mL  |
| HEPES 緩衝液 (pH 7.2) | 4 μmol/0.2mL  |
| 蒸留水                | 0.1 mL        |

#### 13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に難溶で 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 【用量設定試験, 短時間処理法】 , K31758278 【連続処理法】) に溶解させた.

用量設定試験では使用直前に調製原液 (186.2 mg/mL 液 : 10 mM 相当) を準備した. この 186.2 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し 93.1, 46.6, 23.3, 11.6, 5.82, 2.91, 1.45, 0.727 および 0.364 mg/mL 液を調製した. 調製後, 速やかに処理を行った.

染色体異常試験 (短時間処理法) の場合, 用量設定試験の結果を基に 24.0 mg/mL の



調製原液を DMSO で順次希釈し 16.8, 11.8, 8.23, 5.76, 4.03, 2.82 および 1.98 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに処理を行った。

染色体異常試験（連続処理法）の場合、用量設定試験の結果を基に 17.5 mg/mL の調製原液を DMSO で順次希釈し 14.0, 11.2, 8.96, 7.17, 5.73, 4.59, 3.67 および 2.94 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに処理を行った。

### 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（短時間処理法-S9 処理）

短時間処理法-S9 処理では注射用水（日本薬局方注射用水：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K1K76）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 339AJH）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K1D74）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。

用量は 0.1 µg/mL とした。

#### 13.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K1K76）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 1013）を生理食塩液（Lot No. K1D74）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。

試験用量は 12.5 µg/mL とした。

### 13.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

#### 13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 1862 µg/mL（10 mM 相当）を最高用量とし、以下 931, 466, 233, 116, 58.2, 29.1, 14.5, 7.27 および 3.64 µg/mL の 10 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした。

#### 13.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

試験系および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

#### 13.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト株式会社）の各ウェルに培養液を用いて  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.7.6.記載の割合で被験物質等の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Sigma Chemical

Company ; Lot No. 92K2322) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500  $\mu$ L を加え、さらに 18 時間培養を続けた。

#### 13.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウエルに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.7.6. 記載の割合で被験物質等の処理を行った。

以下の操作は 13.7.3. に記載の方法に準じた。

#### 13.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウエルに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.7.6. 記載の割合で被験物質等の処理を行った。さらに 24 時間培養を続けた。

#### 13.7.6. 処理量一覧

|         | 溶媒および被験物質   |             |           |
|---------|-------------|-------------|-----------|
|         | 培養液         | S9 mix      | 処理液       |
| -S9 処理  | 600 $\mu$ L | -           | 6 $\mu$ L |
| +S9 処理  | 500 $\mu$ L | 100 $\mu$ L | 6 $\mu$ L |
| 24 時間処理 | 600 $\mu$ L | -           | 6 $\mu$ L |

#### 13.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

#### 13.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. TCE8600）を加えて約 10 分間細胞を固定した。次いで、0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 107D2074）水溶液で 10 分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 3~4 mL 加え、5 分間放置した後、分光光度計（105-50 型：株式会社日立製作所）を用いて 580 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求めた。

さらにプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。プロビット法での算出には 14.5~233  $\mu$ g/mL の 5 点（短時間処理法-S9 処理），3.64~466  $\mu$ g/mL の 8 点（同+S9 処理），29.1~116  $\mu$ g/mL の 3 点（連続処理法 24 時間処理）を用いた。

13.8. 染色体異常試験 (短時間処理法)

13.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験結果から、細胞の増殖を50%以上抑制すると予想される用量 (240 µg/mL) を最高用量とし、7~8 用量処理した。

| 試験系              | 用量 (µg/mL) |      |      |      |             |            |            |     |
|------------------|------------|------|------|------|-------------|------------|------------|-----|
| 短時間処理法<br>-S9 処理 | 19.8       | 28.2 | 40.3 | 57.6 | <u>82.3</u> | <u>118</u> | <u>168</u> | 240 |
| 短時間処理法<br>+S9 処理 | 28.2       | 40.3 | 57.6 | 82.3 | <u>118</u>  | <u>168</u> | <u>240</u> |     |

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。  
試験系および連番を明記することにより各プレートを識別した。

13.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ:住友ベークライト株式会社) に  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL ( $4 \times 10^4$  細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.5.記載の割合で被験物質等の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Sigma Chemical Company ; Lot No. 92K2356) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.5.記載の割合で被験物質等の処理を行った。  
以下の操作は 13.8.3.に記載の方法に準じた。

13.8.5. 処理量一覧

|        | 溶媒および被験物質 |        |         | 陽性対照物質 |        |        |
|--------|-----------|--------|---------|--------|--------|--------|
|        | 培養液       | S9 mix | 処理液     | 培養液    | S9 mix | 処理液    |
| -S9 処理 | 3.0 mL    | -      | 0.03 mL | 2.7 mL | -      | 0.3 mL |
| +S9 処理 | 2.5 mL    | 0.5 mL | 0.03 mL | 2.2 mL | 0.5 mL | 0.3 mL |

13.8.6. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

13.8.7. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に最終濃度で 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるようコルセミド溶液 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1133109) を添加し, 細胞分裂を中期で停止させた. 次いで, 培養液を遠心管に全量移した後, 0.25% トリプシン溶液 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1138214) を用いてプレートから細胞を剥離し, 遠心管内の培養液に加えた. 細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後, 37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え, 37°C 中で 16 分間低張処理を行った. 遠心分離により低張液を除いた後, 4°C に冷却した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した. 固定液を 3 回交換した後, 新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし, 脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 2 滴ずつ滴下した. スライド標本を十分乾燥させ, 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 : Merck KGaA ; Lot No. TP551574 147) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. OB 132628) で 12 分間染色した. スライドを軽く水洗した後, 乾燥させた.

1 プレート当たり 2~3 枚の染色体標本作製した。

13.8.8. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照, 各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて, ATP フォトメーター (ルミテスター C-100LU : キッコーマン株式会社) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち, 1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に, 低張処理した細胞液を 50  $\mu\text{L}$  添加し攪拌してから約 20 分間静置した. 測定用チューブにこの混合液を 100  $\mu\text{L}$  分注し, ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250 : キッコーマン株式会社) の発光試薬を 100  $\mu\text{L}$  添加した後, 相対発光量 (Relative Light Unit ; RLU) を測定した. 陰性対照群における RLU に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求め, 細胞増殖抑制度とした。

13.8.9. 染色体の観察

すべての標本をコード化して観察した。

観察用量としては, 13.8.8.の細胞生存率が陰性対照群の 50%未満になる用量を最高用量とした連続する 3 用量を選択した. 各プレート当たり 100 個, すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 ( $\times 600$ ) で観察し, 染色体の形態的变化としてギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した. ただし, 染色分体あるいは染色体上に非

染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として1用量当たり200個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

### 13.9. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った。

異常細胞の出現頻度を、Fisherの直接確率計算法(有意水準0.05)を用いて検定した。また用量依存性については、Cochran Armitageの傾向検定(有意水準0.05)を用いて検定した。

陰性対照群と比較し被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、試験用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

陽性結果が得られたことからD<sub>20</sub>値(観察細胞の20%に何れかの異常がみられる濃度)ならびにTR値(単位濃度当たりのcteをもつ細胞の出現頻度の比較値)を算出した。

### 13.10. 追加試験(連続処理法24時間処理)

短時間処理法において弱い陽性反応が認められたことから代謝活性化によらない条件での連続処理法24時間処理を実施した。

#### 13.10.1. 陽性対照(連続処理法24時間処理)

注射用水(日本薬局方注射用水:株式会社大塚製薬工場; Lot No. K2K80)5 mLに溶解したマイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業株式会社; Lot No. 382BBC)を生理食塩液(日本薬局方生理食塩液:株式会社大塚製薬工場; Lot No. K2H96)を用いて希釈し、1 mLずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。

用量は0.05 µg/mLとした。

#### 13.10.2. 染色体異常試験(連続処理法24時間処理)

##### 13.10.2.1. 用量

細胞増殖抑制試験結果から、細胞の増殖を50%以上抑制すると予想される用量(175 µg/mL)を最高用量とし、9用量処理した。

| 試験系             | 用量 (µg/mL) |      |      |      |      |      |            |            |            |
|-----------------|------------|------|------|------|------|------|------------|------------|------------|
| 連続処理法<br>24時間処理 | 29.4       | 36.7 | 45.9 | 57.3 | 71.7 | 89.6 | <u>112</u> | <u>140</u> | <u>175</u> |

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

13.10.2.2. 使用プレート数および識別方法

13.8.2.に記載の方法に準じた。

13.10.2.3. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.10.2.4.に記載の割合で被験物質等の処理を行った。さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.10.2.4. 処理量一覧

|         | 溶媒および被験物質 |        |         | 陽性対照物質 |        |        |
|---------|-----------|--------|---------|--------|--------|--------|
|         | 培養液       | S9 mix | 被験物質液   | 培養液    | S9 mix | 被験物質液  |
| 24 時間処理 | 3.0 mL    | -      | 0.03 mL | 2.7 mL | -      | 0.3 mL |

13.10.2.5. 析出等の観察

13.8.6.に記載の方法に準じた。

13.10.2.6. 標本の作製

13.8.7.に記載の方法に準じた。ただし、コルセミド溶液 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1187876), 0.25%トリプシン溶液 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1208746), 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 : Merck KGaA ; Lot No. TP601374), 1.2%ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. OB 318388) を使用した。

13.10.2.7. 細胞増殖抑制度の測定

13.8.8.に記載の方法に準じた。

13.10.2.8. 染色体の観察

13.8.9.に記載の方法に準ずる。

13.11. 結果の解析

13.9.に記載の方法に準じた。

## 14. 試験結果

### 14.1. 細胞増殖抑制試験

#### 14.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した.

50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法-S9 処理では 88.4  $\mu\text{g/mL}$ , 同+S9 処理では 117  $\mu\text{g/mL}$ , 連続処理法 24 時間処理では 77.2  $\mu\text{g/mL}$  であった.

#### 14.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法-S9 処理、同+S9 処理、連続処理法 24 時間処理のいずれにおいても、233  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で白色粉末状等の析出が観察された。さらに、931  $\mu\text{g/mL}$  以上で培養液の pH 低下が認められた。被験物質処理終了時においても 466  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量では白色粉末状等の析出が観察された。ただし、培養液の pH は中性域を示していた。

### 14.2. 染色体異常試験

#### 14.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した.

ジチオリン酸 O, O-ジエチル処理群での染色体構造異常は 82.3  $\mu\text{g/mL}$  で 3.5%, 118  $\mu\text{g/mL}$  で 5.0%, 168  $\mu\text{g/mL}$  で 8.0%を示し、すべての用量群で統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加と判定された。倍数体等の出現頻度についても僅かに増加する傾向がみられ、高用量の 168  $\mu\text{g/mL}$  において統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加と判定された。構造異常および倍数体の出現頻度増加には統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な用量依存性が認められた。

また、試験用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 168  $\mu\text{g/mL}$  での細胞生存率は 22.8%であった。最高用量の 240  $\mu\text{g/mL}$  での生存率は 3.1%であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 40.5% ( $p \leq 0.05$ ) であった。

#### 14.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した.

ジチオリン酸 O, O-ジエチル処理群での染色体構造異常は 118  $\mu\text{g/mL}$  で 2.5%, 168  $\mu\text{g/mL}$  で 6.5%, 240  $\mu\text{g/mL}$  で 7.0%を示し、168 および 240  $\mu\text{g/mL}$  では統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加と判定され、用量依存性 ( $p \leq 0.05$ ) も確認された。倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群と同等であり、明確な増加傾向は観察されなかった。

また、試験用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、染色体異常評価群中の

高用量である 240 µg/mL での細胞生存率は 47.2%であった。

#### 14.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した。

ジチオリン酸 O, O'-ジエチル処理群での染色体構造異常は 112 µg/mL で 2.5%, 140 µg/mL で 4.5%, 175 µg/mL で 9.0%を示し, 中用量および高用量で統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加と判定されさらに用量依存性 ( $p \leq 0.05$ ) も確認された。倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群と同等であり, 明確な増加傾向は観察されなかった。

また, 試験用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 175 µg/mL での細胞生存率は 34.9%であった。

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 23.0% ( $p \leq 0.05$ ) であった。

#### 14.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時, 短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理の 240 µg/mL においてのみ白色粉末状の析出が観察された。被験物質処理終了時では pH の変動, 被験物質析出等の特筆すべき変化は, いずれの処理法においても観察されなかった。

#### 14.3. $D_{20}$ 値ならびにTR値算出結果

本染色体異常試験結果から算出した  $D_{20}$ 値 (mg/mL) ならびにTR値 (mg当たり) は次の通りであった。

| 試験            | 異常の種類 | $D_{20}$ 値 | TR 値 |
|---------------|-------|------------|------|
| 短時間処理法-S9 処理  | 構造異常  | 0.452      | 33.9 |
| 短時間処理法-S9 処理  | 数的異常  | 0.646      | —    |
| 短時間処理法+S9 処理  | 構造異常  | 0.673      | 23.8 |
| 連続処理法 24 時間処理 | 構造異常  | 0.404      | 37.1 |



## 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, すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため, 培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した.

細胞増殖抑制試験結果を基に, 短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理とも細胞の増殖が抑制される濃度まで検討した.

その結果, ジチオリン酸 *O, O'*-ジエチル処理では-S9 処理, +S9 処理のいずれの試験系とも染色体構造異常の出現頻度は陰性対照に比較して統計学的に有意な増加を示した. 両処理の結果はいずれも弱い陽性反応であったことから, 連続処理法 24 時間処理による染色体異常試験を追加して実施した. 連続処理法においても陽性反応が確認された. さらに, 用量依存性についても統計学的な有意が認められたことから最終的に陽性反応と判断した.

変異原性の強さに関する相対的比較値である  $D_{20}$  値の最小値は 0.404 (mg/mL) および TR 値の最大値は 37.1 とそれぞれ算出された.

なお, 数的異常については, 統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加が認められたが, 背景データによる基準値内であったことから陰性反応と判断した.

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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>, ラット小核試験で陽性<sup>3)</sup>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, 短時間処理法および連続処理法の陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データ (Appendix 4) の範囲内であり, 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'*-ジエチルのは乳類培養細胞に対する染色体異常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 1993; 24: 82-86.
- 2) Lin MF., Wu CL., Wang TC. : Mutat. Res 1987; 188: 241-250.

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

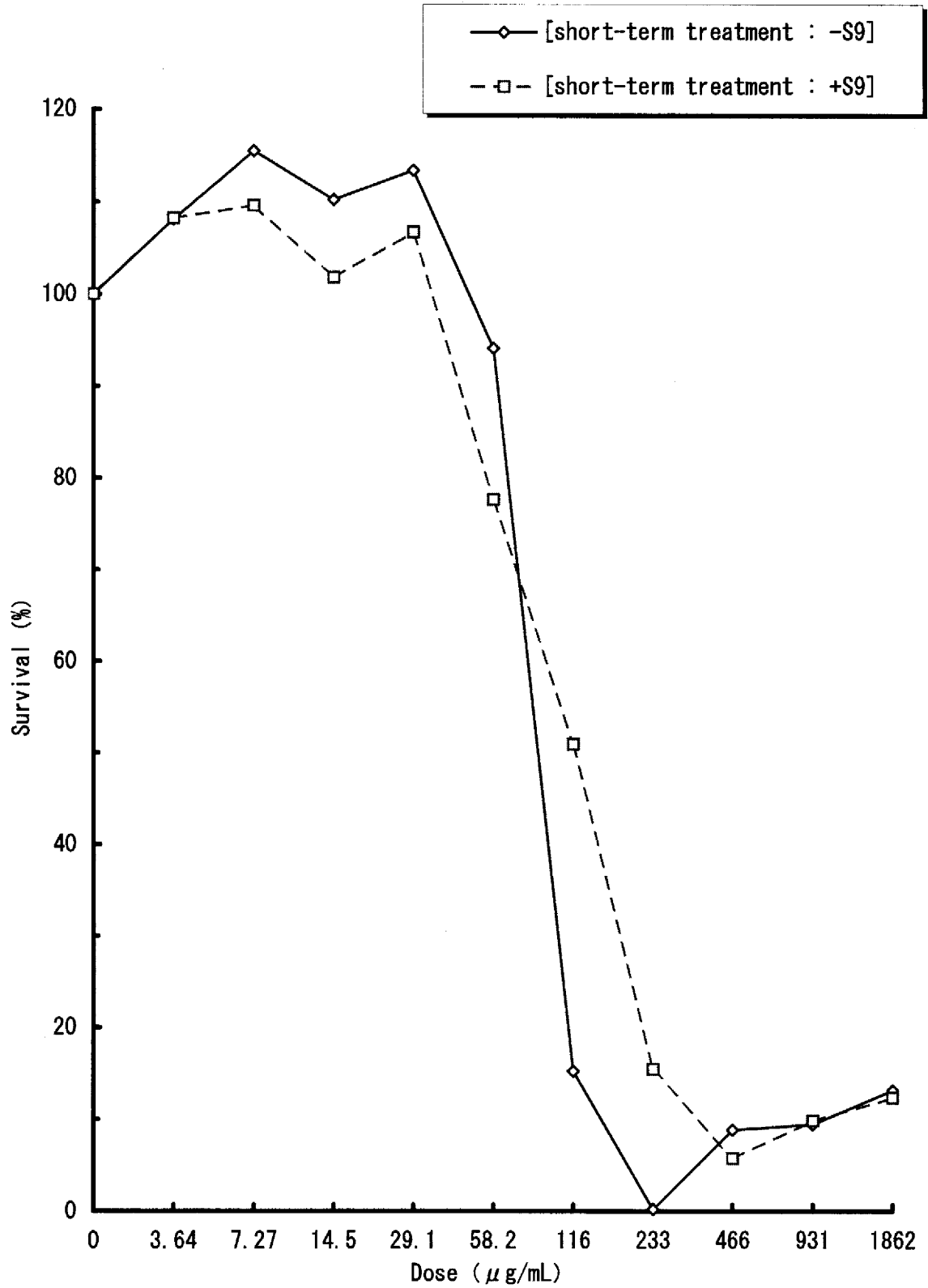


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with Phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester [short-term treatment]

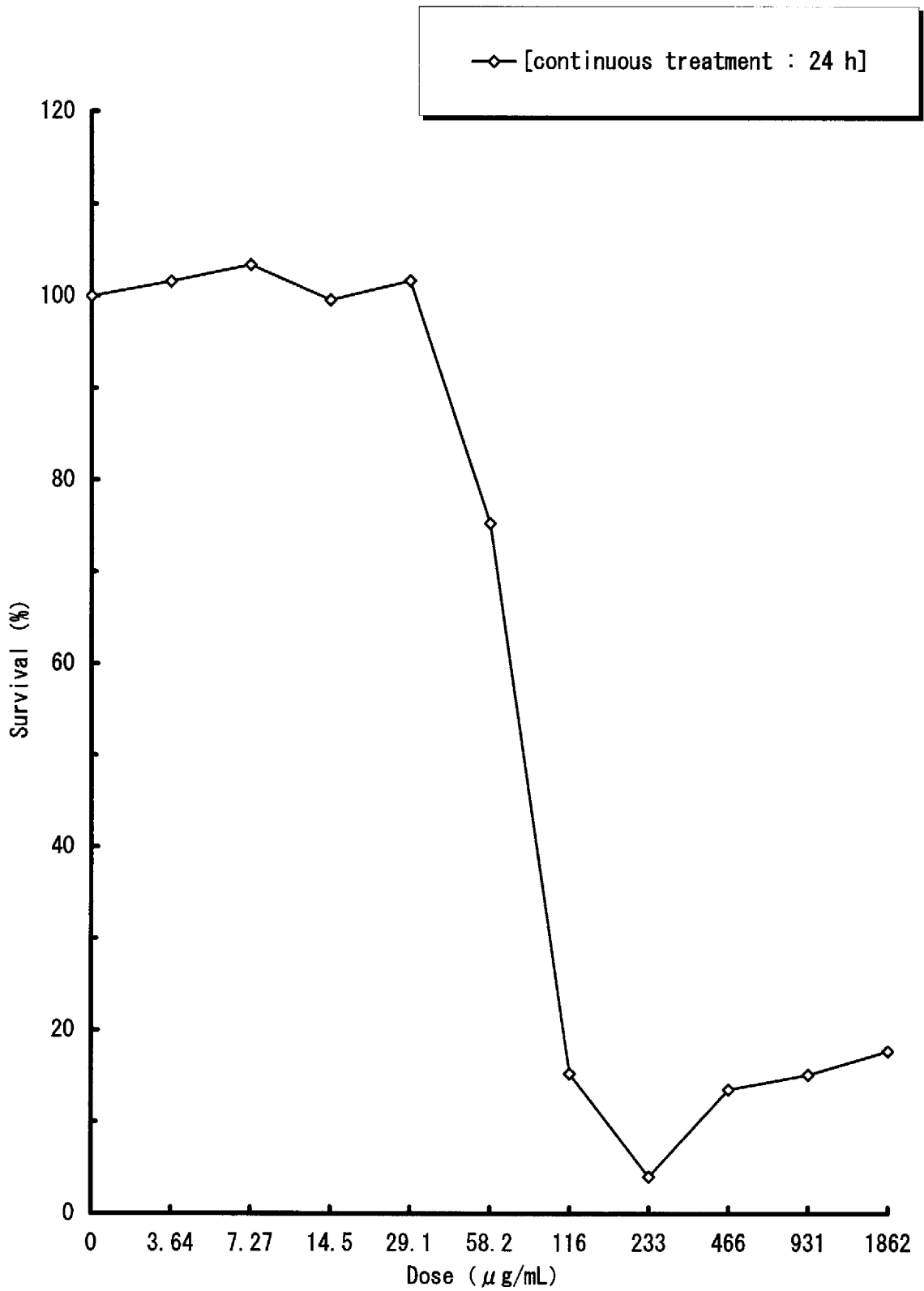


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester [continuous treatment]

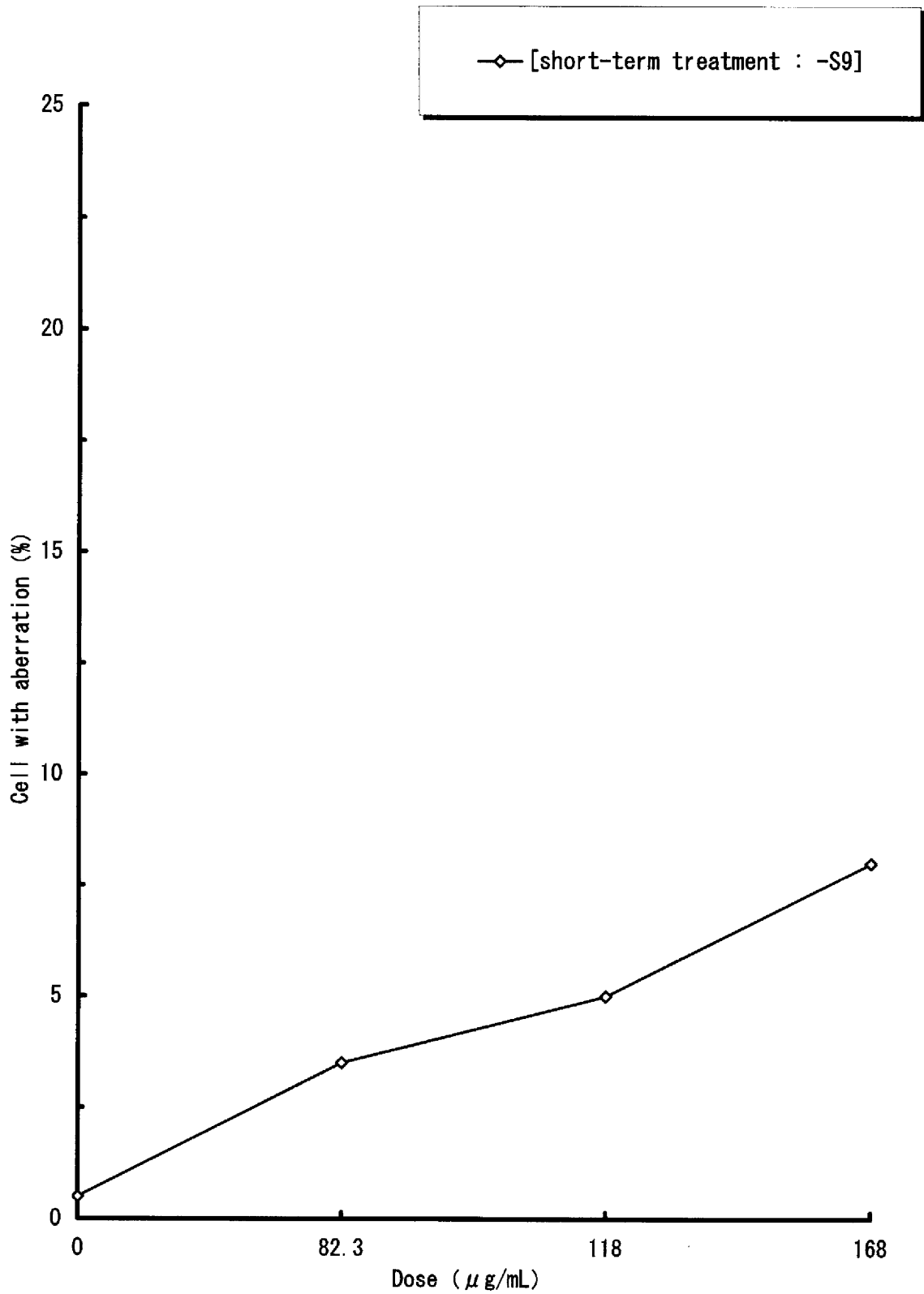


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester [short-term treatment:-S9]

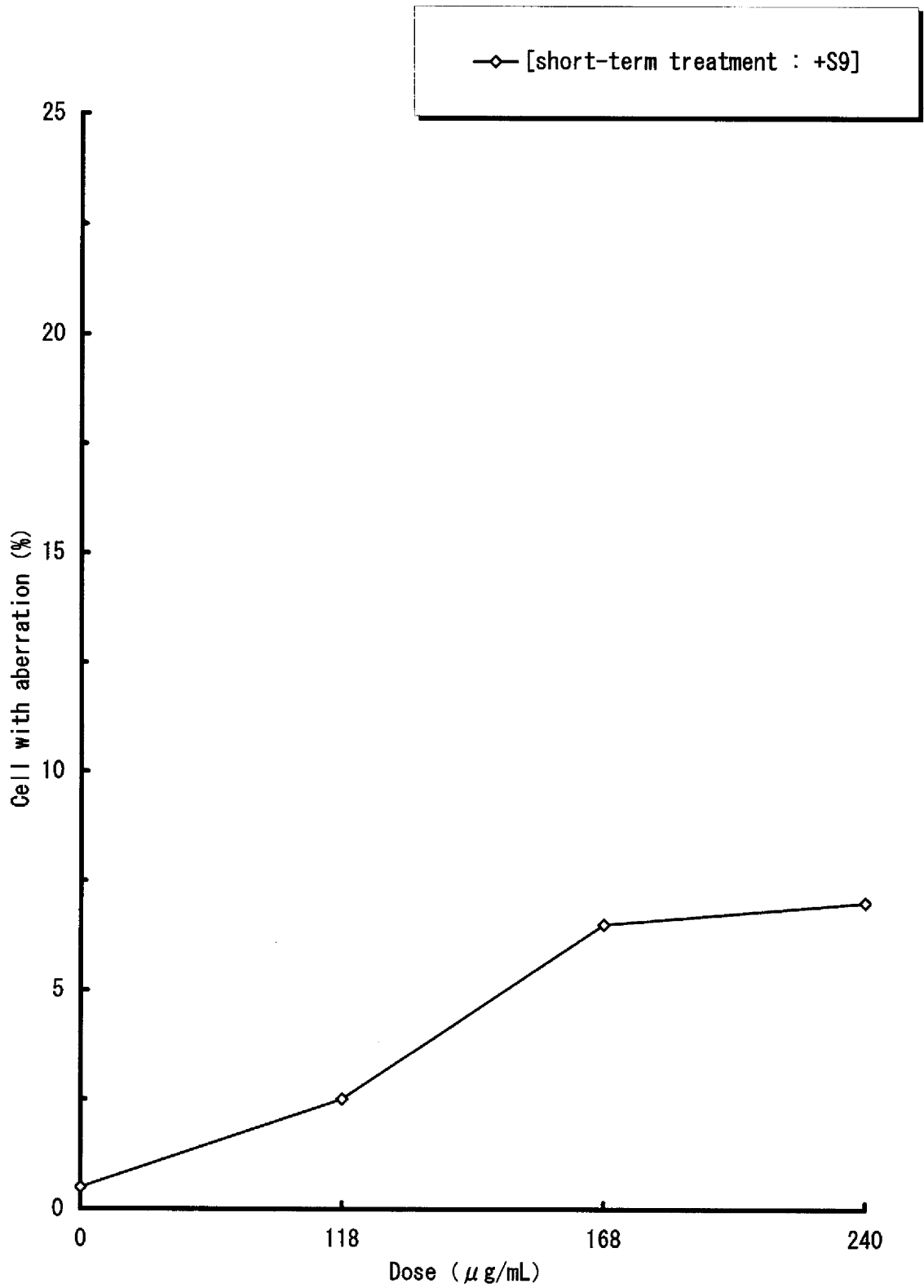


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester [short-term treatment: +S9]

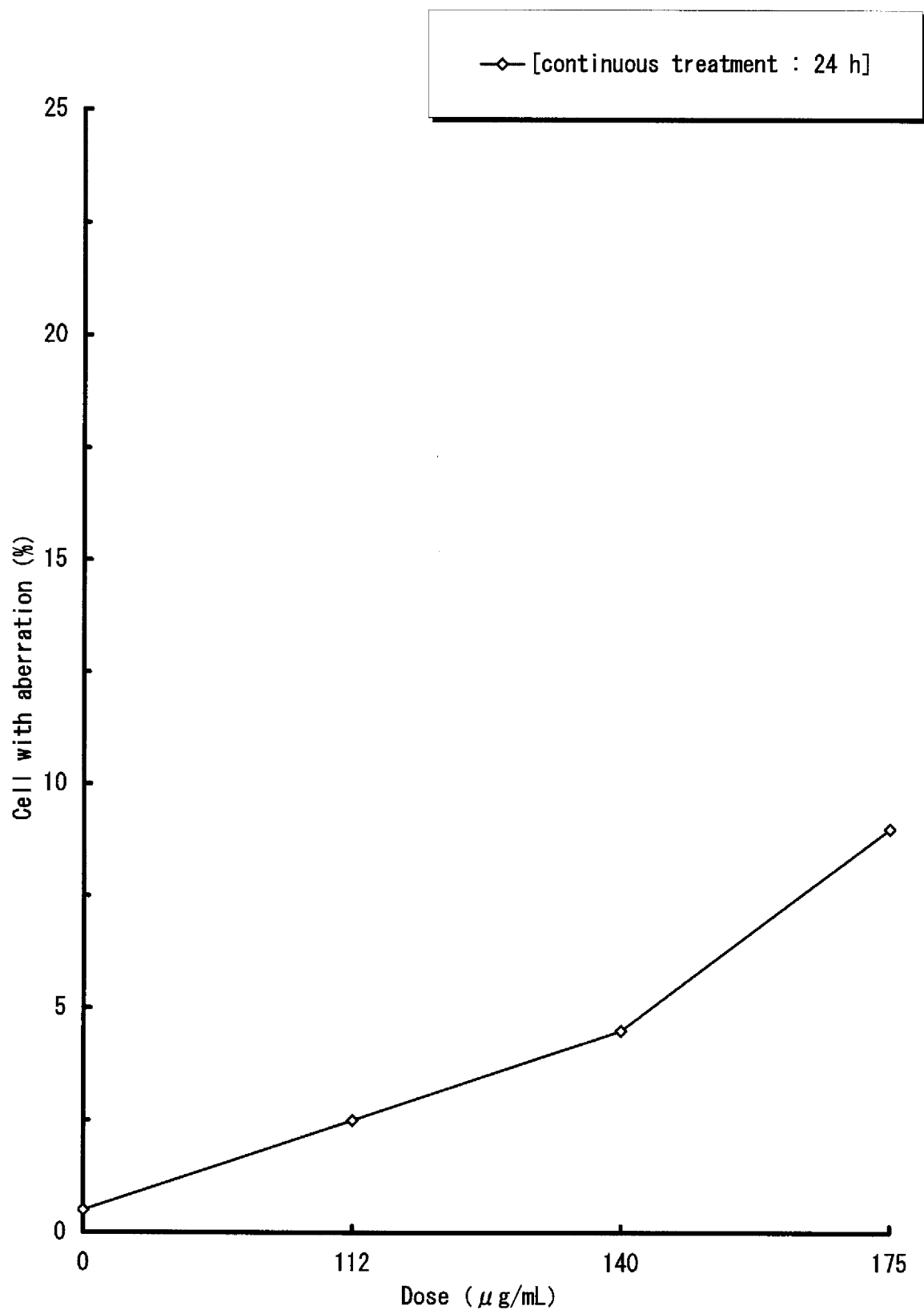


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester [continuous treatment:24 h]

Table 1. Results of growth inhibition test on Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester [short-term treatment]

Exp. No. 6874 (115-171)

| [short-term treatment : -S9] |                           |                          |           | [short-term treatment : +S9] |                           |                          |           |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------|
| Compound                     | Dose ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Relative cell growth (%) | [ Mean ]  | Compound                     | Dose ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Relative cell growth (%) | [ Mean ]  |
| DMSO a)                      | 0                         | 100.0<br>100.0           | [ 100.0 ] | DMSO a)                      | 0                         | 100.0<br>100.0           | [ 100.0 ] |
| Test substance               | 3.64                      | 108.6<br>107.6           | [ 108.1 ] | Test substance               | 3.64                      | 105.8<br>110.5           | [ 108.2 ] |
|                              |                           | 7.27                     |           |                              |                           | 114.0<br>116.9           |           |
|                              | 14.5                      | 108.0<br>112.3           | [ 110.2 ] |                              | 14.5                      | 101.9<br>101.7           | [ 101.8 ] |
|                              | 29.1                      | 113.5<br>113.3           | [ 113.4 ] |                              | 29.1                      | 102.5<br>110.8           | [ 106.7 ] |
|                              | 58.2                      | 92.8<br>95.4             | [ 94.1 ]  |                              | 58.2                      | 79.5<br>75.7             | [ 77.6 ]  |
|                              | 116                       | 20.4<br>9.9              | [ 15.2 ]  |                              | 116                       | 53.6<br>48.2             | [ 50.9 ]  |
|                              | 233                       | 0.0<br>0.3               | [ 0.2 ]   |                              | 233                       | 16.9<br>13.8             | [ 15.4 ]  |
|                              | 466 d)                    | 9.0<br>8.6               | [ 8.8 ]   |                              | 466 d)                    | 4.7<br>6.6               | [ 5.7 ]   |
|                              | 931 d)                    | 8.4<br>10.5              | [ 9.5 ]   |                              | 931 d)                    | 7.1<br>12.5              | [ 9.8 ]   |
|                              | 1862 d)                   | 13.0<br>13.1             | [ 13.1 ]  |                              | 1862 d)                   | 9.2<br>15.3              | [ 12.3 ]  |

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— 88.4 ( $\mu\text{g/mL}$ )[short-term treatment : +S9] ——— 117 ( $\mu\text{g/mL}$ )

a): Negative control

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period



Table 2. Results of growth inhibition test on Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester [continuous treatment]

Exp. No. 6874 (115-171)

| [continuous treatment : 24 h] |                           |                          |           | [continuous treatment : 24 h] |                           |                          |          |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------|
| Compound                      | Dose ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Relative cell growth (%) | [ Mean ]  | Compound                      | Dose ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Relative cell growth (%) | [ Mean ] |
| DMSO a)                       | 0                         | 100.0<br>100.0           | [ 100.0 ] |                               |                           |                          |          |
| Test substance                | 3.64                      | 100.2<br>103.0           | [ 101.6 ] |                               |                           |                          |          |
|                               | 7.27                      | 104.7<br>102.1           | [ 103.4 ] |                               |                           |                          |          |
|                               | 14.5                      | 95.3<br>103.9            | [ 99.6 ]  |                               |                           |                          |          |
|                               | 29.1                      | 102.0<br>101.4           | [ 101.7 ] |                               |                           |                          |          |
|                               | 58.2                      | 71.7<br>79.0             | [ 75.4 ]  |                               |                           |                          |          |
|                               | 116                       | 16.5<br>13.8             | [ 15.2 ]  |                               |                           |                          |          |
|                               | 233                       | 5.0<br>3.0               | [ 4.0 ]   |                               |                           |                          |          |
|                               | 466 d)                    | 12.1<br>14.8             | [ 13.5 ]  |                               |                           |                          |          |
|                               | 931 d)                    | 13.5<br>16.7             | [ 15.1 ]  |                               |                           |                          |          |
|                               | 1862 d)                   | 17.6<br>17.7             | [ 17.7 ]  |                               |                           |                          |          |

50% Growth inhibition dose was as follows:

[continuous treatment : 24 h] ——— 77.2 ( $\mu\text{g/mL}$ )

a): Negative control

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester  
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 6874 (115-171)

| Compound       | Dose<br>( $\mu$ g/mL) | Time of<br>exposure<br>(h) | Relative<br>cell<br>growth<br>(%) | Number<br>of<br>cells<br>analyzed | Number of cells with<br>structural aberrations |     |     |     |     |     | Number of cells<br>with<br>aberrations<br>-gap(%) | Number of<br>cells<br>analyzed<br>for polyploid | Number of<br>polyploid<br>cells<br>(%) | Final<br>judgement |          |   |
|----------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|--|--------------------|----------|---|
|                |                       |                            |                                   |                                   | gap  | ctb | cte | csb | cse | oth |   |   |  |                    |          |   |
| DMSO a)        | 0                     | 6                          | 100.0                             | 200                               | 2  | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1 ( 0.5)  | #   | 200                                    | 0 ( 0.0)           | #        |   |
| Test substance | 82.3                  | 6                          | 93.2                              | 200                               | 0  | 5   | 1   | 1   | 0   | 0   | 7 ( 3.5)  | *   | 200                                    | 0 ( 0.0)           |          |   |
|                | 118                   | 6                          | 63.2                              | 200                               | 4  | 2   | 8   | 0   | 0   | 0   | 10 ( 5.0)   | *   | 200                                    | 1 ( 0.5)           | Positive |   |
|                | 168                   | 6                          | 22.8                              | 200                               | 6  | 9   | 9   | 0   | 0   | 0   | 16 ( 8.0)   | *   | 200                                    | 6 ( 3.0)           |          | * |
|                | 240                   | 6                          | 3.1                               | Toxic                             |  |     |     |     |     |     |   |   |  |                    |          |   |
| MMC b)         | 0.1                   | 6                          | 99.8                              | 200                               | 9  | 34  | 59  | 1   | 0   | 0   | 81 ( 40.5)  | *   | 200                                    | 2 ( 1.0)           |          |   |

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

\*  $p \leq 0.05$  Significant difference from the negative control group (Fisher's exact test)

#  $p \leq 0.05$  Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester  
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 6874 (115-171)

| Compound       | Dose<br>( $\mu$ g/mL) | Time of<br>exposure<br>(h) | Relative<br>cell<br>growth<br>(%) | Number<br>of<br>cells<br>analyzed | Number of cells with<br>structural aberrations |     |     |     |     |     | Number of cells<br>with<br>aberrations<br>-gap (%) | Number of<br>cells<br>analyzed<br>for polyploid | Number of<br>polyploid<br>cells<br>(%) | Final<br>judgement |          |
|----------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|--|---|--|--------------------|----------|
|                |                       |                            |                                   |                                   | gap  | ctb | cte | csb | cse | oth |  |   |  |                    |          |
| DMSO a)        | 0                     | 6                          | 100.0                             | 200                               | 3  | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1 ( 0.5)   | #   | 200                                    | 1 ( 0.5)           |          |
| Test substance | 118                   | 6                          | 87.8                              | 200                               | 2  | 2   | 3   | 0   | 0   | 0   | 5 ( 2.5)   |   | 200                                    | 5 ( 2.5)           |          |
|                | 168                   | 6                          | 59.8                              | 200                               | 2  | 6   | 8   | 0   | 0   | 0   | 13 ( 6.5)  | *   | 200                                    | 5 ( 2.5)           | Positive |
|                | 240                   | 6                          | 47.2                              | 200                               | 3  | 3   | 11  | 1   | 0   | 0   | 14 ( 7.0)  | *   | 200                                    | 5 ( 2.5)           |          |
| CP b)          | 12.5                  | 6                          | 122.0                             | 200                               | 6  | 16  | 52  | 1   | 0   | 0   | 66 ( 33.0)   | *   | 200                                    | 0 ( 0.0)           |          |

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

\*  $p \leq 0.05$  Significant difference from the negative control group (Fisher's exact test)

#  $p \leq 0.05$  Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Phosphorodithioic acid, *O, O'*-diethyl ester  
[continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 6874 (115-171)

| Compound       | Dose<br>( $\mu$ g/mL) | Time of<br>exposure<br>(h) | Relative<br>cell<br>growth<br>(%) | Number<br>of<br>cells<br>analyzed | Number of cells with<br>structural aberrations |     |     |     |     | Number of cells<br>with<br>aberrations<br>-gap (%) | Number of<br>cells<br>analyzed<br>for polyploid | Number of<br>polyploid<br>cells<br>(%) | Final<br>judgement |          |          |
|----------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|--|---|--|--------------------|----------|----------|
|                |                       |                            |                                   |                                   | gap  | ctb | cte | csb | cse |  |   |  |                    | oth      |          |
| DMSO a)        | 0                     | 24                         | 100.0                             | 200                               | 3  | 0   | 1   | 0   | 0   | 0  | 1 ( 0.5)  | #                                      | 200                | 2 ( 1.0) |          |
| Test substance | 112                   | 24                         | 102.5                             | 200                               | 5  | 2   | 4   | 0   | 0   | 0  | 5 ( 2.5)  |  | 200                | 3 ( 1.5) |          |
|                | 140                   | 24                         | 66.6                              | 200                               | 2  | 3   | 6   | 1   | 0   | 0  | 9 ( 4.5)  | *                                      | 200                | 1 ( 0.5) | Positive |
|                | 175                   | 24                         | 34.9                              | 200                               | 4  | 6   | 13  | 0   | 0   | 0  | 18 ( 9.0)                                       | *                                      | 200                | 2 ( 1.0) |          |
| MMC b)         | 0.05                  | 24                         | 127.1                             | 200                               | 12   | 13  | 35  | 0   | 0   | 0  | 46 ( 23.0)                                      | *                                      | 200                | 0 ( 0.0) |          |

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

\*  $p \leq 0.05$  Significant difference from the negative control group (Fisher's exact test)#  $p \leq 0.05$  Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)