



二酸化チオ尿素
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	6
結 論	7
特 記 事 項	7
文 献	8
Tables 1~4	

【要 約】

二酸化チオ尿素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、陽性の結果を得た。

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インキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験と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5用量を設定して実施した。また、WP2 *uvrA* については、再現性の確認のために本試験と同一用量で再現性試験を実施した。

その結果、TA1535 の S9 mix 無添加試験および添加試験で、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある変異コロニー数の増加が認められたことから、二酸化チオ尿素は用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定した。

【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、二酸化チオ尿素について、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（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²⁾、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³⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、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、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成9年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第2号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471」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1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に から分与された。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異 (*rfa*) およびアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid Ltd.) を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。試験に用いた検定菌液の生菌数を Appendix 1 に示した。

〔被験物質〕

二酸化チオ尿素 (略称: TUD、CAS No. 4189-44-0) は、分子量 108.12 の白色粉末である。構造式等は Appendix 2 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.7wt% (不純物: 不明) であり、 から供与された。被験物質は、使用時まで室温で防湿、遮光して保管した。

TUDは、45~50℃で温浴しながら超音波洗滌器および THERMO MIXER® を用いて、局方注射用水 (ロット番号: K6I94、(株)大塚製薬工場) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。

〔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	(和光純薬工業株)	ロット番号 WTQ0059,	純度98%以上)
SA	: アジ化ナトリウム	(和光純薬工業株)	ロット番号 DLL3931,	純度98%以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 106F06681,	純度97%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 DLH6052,	純度90%以上)

AF2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業(株)) に、SA は超純水に溶解したものを -20°C で凍結保存し、解凍後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) バクアガー (Difco Lab.)	0.6 %	(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5 %	D-ビチン	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、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: HY2802、1997年10月16日製造、および HY2901、1997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
リン酸水素二カウム	10 g	大洋寒天 (清水食品)	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 を流して固めたものである。

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
塩化カルウム	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 系雄ラットにフェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与を行い、酵素誘導して作製したS9 (キッコーマン(株)、ロット番号: RAA-370、1997年10月3日製造および RAA-376、1998年1月23日製造) を購入し、 -80°C で凍結保存し、用時に解凍して用いた。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、いずれも腹腔内投与したものである。肝臓の摘出および S9 の調製は5日目。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法により、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、37°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、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使用溶媒または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。同時に実施した試験については、陽性対照群を共通とした。培養は 37°C で 48 時間行い、発生した変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。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。また、WP2 *uvrA* の S9 mix 添加試験については、再現性試験を実施した。なお、最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

〔判定基準〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた 5 種の検定菌のうち、1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、溶媒対照値の 2 倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合には、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。

また、陽性結果が得られた検定菌に関しては、本試験で変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍以上となった用量について、変異コロニー数の平均値から溶媒対照値を差し引いた値を用量で除して比活性（誘発復帰変異コロニー数/mg）を求めた。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

TUDについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれ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 無添加試験および添加試験とも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験および再現性試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、TA1535 の S9 mix 無添加試験および添加試験では、2回の本試験とも変異コロニー数の用量依存的な増加が認められ、625 または 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で溶媒対照値の2倍以上となった。WP2 *uvrA* の S9 mix 添加試験でも2回の本試験とも変異コロニー数の用量依存的な増加が認められ、本試験 I では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で溶媒対照値の2倍に達したが、本試験 II では溶媒対照値の2倍以上となる用量は認められなかった。そこで、再現性を確認するために本試験と同一用量で再現性試験を実施した (Table 4)。その結果、変異コロニー数は用量依存的な増加を示したが、溶媒対照値の2倍には達しなかった。

WP2 *uvrA* の S9 mix 無添加試験および TA100、TA98 および TA1537 においては、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。

これらの結果から、TUDは TA1535 の S9 mix 無添加試験および添加試験において復帰突然変異を誘発するものと考えられる。TA1535 の本試験における比活性を Appendix 3 に示した。当被験物質の最大比活性は 34.4 (本試験 II、S9 mix 無添加の 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) で、同一条件下における陽性対照物質2-アミノアントラセンの値 (1094000) の約30000分の1であった。

また、TUDは当研究所で本試験と並行して実施されたチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも、S9 mix 非存在下および存在下で染色体の構造異常を誘発し陽性であった (食薬セ研第9-1942号)。一方、TUDの類縁化合物であるチオ尿

素では、細菌を用いる復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で、ともに陰性の結果が報告されている⁴⁾。

TUDについて実施したすべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値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、二酸化チオ尿素は、用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定した。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、試験の信頼性に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) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360
- 4) 石館 基 監修: 染色体異常試験データ集, リアライズ社, 東京. (1983)

Table 1. Cytotoxicity of thiourea dioxide 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	171	130	172	7	14	8	24	25	31	21	22	23	6	12	6	
		(158 ± 24.0)			(10 ± 3.8)			(27 ± 3.8)			(22 ± 1.0)			(8 ± 3.5)			
	50.0	156			11			18			20			7			
	150	166			18			27			21			9			
	500	147			24			32			24			6			
	1500	140			57			24			27			9			
	5000	154			89			34			22			4			
S9 mix (+)	0	171	177	169	11	16	13	30	16	34	34	28	42	7	10	12	
		(172 ± 4.2)			(13 ± 2.5)			(27 ± 9.5)			(35 ± 7.0)			(10 ± 2.5)			
	50.0	165			16			24			42			14			
	150	172			6			34			38			16			
	500	169			30			27			37			6			
	1500	213			51			37			32			11			
	5000	192			113			64			19			8			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	647	674	640	621	643	603	200	196	204	620	619	608	415	410	359	
		(654 ± 18.0)			(622 ± 20.0)			(200 ± 4.0)			(616 ± 6.7)			(395 ± 31.0)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	999	1127	1090	423	401	350	769	810	736	508	498	536	345	403	369	
		(1072 ± 65.9)			(391 ± 37.4)			(772 ± 37.1)			(514 ± 19.7)			(372 ± 29.1)			

Purity was 99.7wt%.

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

Table 2. Mutagenicity of thiourea dioxide on bacteria (I)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	126	101	142	12	14	21	37	25	26	22	22	21	8	9	15	
		(123 ± 20.7)			(16 ± 4.7)			(29 ± 6.7)			(22 ± 0.6)			(11 ± 3.8)			
	313	147	155	129	25	23	25	36	31	20	18	24	21	2	5	10	
		(144 ± 13.3)			(24 ± 1.2)			(29 ± 8.2)			(21 ± 3.0)			(6 ± 4.0)			
	625	134	159	123	23	32	34	23	26	34	22	20	22	4	8	9	
		(139 ± 18.4)			(30 ± 5.9)			(28 ± 5.7)			(21 ± 1.2)			(7 ± 2.6)			
	1250	160	124	130	43	27	44	31	31	27	18	20	18	8	10	6	
		(138 ± 19.3)			(38 ± 9.5)			(30 ± 2.3)			(19 ± 1.2)			(8 ± 2.0)			
2500	146	134	145	53	51	58	28	30	41	17	17	20	7	2	6		
	(142 ± 6.7)			(54 ± 3.6)			(33 ± 7.0)			(18 ± 1.7)			(5 ± 2.6)				
5000	147	144	158	77	63	66	29	32	35	16	17	19	5	4	5		
	(150 ± 7.4)			(69 ± 7.4)			(32 ± 3.0)			(17 ± 1.5)			(5 ± 0.6)				
S9 mix (+)	0	150	139	145	15	13	15	25	23	27	24	29	39	11	18	16	
		(145 ± 5.5)			(14 ± 1.2)			(25 ± 2.0)			(31 ± 7.6)			(15 ± 3.6)			
	313	178	168	168	21	25	18	30	29	31	26	25	37	14	6	16	
		(171 ± 5.8)			(21 ± 3.5)			(30 ± 1.0)			(29 ± 6.7)			(12 ± 5.3)			
	625	197	181	155	34	30	35	27	26	32	36	36	23	10	7	14	
		(178 ± 21.2)			(33 ± 2.6)			(28 ± 3.2)			(32 ± 7.5)			(10 ± 3.5)			
	1250	188	201	185	53	44	48	30	37	32	36	28	25	8	6	12	
		(191 ± 8.5)			(48 ± 4.5)			(33 ± 3.6)			(30 ± 5.7)			(9 ± 3.1)			
2500	178	202	213	80	59	59	39	28	45	25	25	16	9	11	11		
	(198 ± 17.9)			(66 ± 12.1)			(37 ± 8.6)			(22 ± 5.2)			(10 ± 1.2)				
5000	186	178	154	99	83	82	52	50	50	16	27	20	9	8	10		
	(173 ± 16.7)			(88 ± 9.5)			(51 ± 1.2)			(21 ± 5.6)			(9 ± 1.0)				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	522	507	480	554	512	577	170	171	175	518	562	563	401	350	380	
		(503 ± 21.3)			(548 ± 33.0)			(172 ± 2.6)			(548 ± 25.7)			(377 ± 25.6)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1241	1073	1020	526	387	397	876	693	718	549	515	570	357	394	365	
		(1111 ± 115.4)			(437 ± 77.5)			(762 ± 99.2)			(545 ± 27.8)			(372 ± 19.5)			

Purity was 99.7wt%.

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

Table 3. Mutagenicity of thiourea dioxide on bacteria (II)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537				
S9 mix (-)	0	147 159 161 (156 \pm 7.6)	13 10 14 (12 \pm 2.1)	21 24 32 (26 \pm 5.7)	31 22 23 (25 \pm 4.9)	7 8 8 (8 \pm 0.6)												
	313	127 169 154 (150 \pm 21.3)	23 20 23 (22 \pm 1.7)	23 24 17 (21 \pm 3.8)	18 21 16 (18 \pm 2.5)	9 7 8 (8 \pm 1.0)												
	625	143 144 152 (146 \pm 4.9)	32 22 39 (31 \pm 8.5)	31 22 32 (28 \pm 5.5)	18 25 20 (21 \pm 3.6)	11 8 5 (8 \pm 3.0)												
	1250	153 168 149 (157 \pm 10.0)	61 59 45 (55 \pm 8.7)	18 27 31 (25 \pm 6.7)	28 19 21 (23 \pm 4.7)	4 13 11 (9 \pm 4.7)												
	2500	173 132 167 (157 \pm 22.1)	91 76 87 (85 \pm 7.8)	25 19 35 (26 \pm 8.1)	22 18 27 (22 \pm 4.5)	6 10 10 (9 \pm 2.3)												
	5000	161 164 167 (164 \pm 3.0)	100 83 90 (91 \pm 8.5)	36 29 36 (34 \pm 4.0)	19 23 26 (23 \pm 3.5)	8 11 7 (9 \pm 2.1)												
S9 mix (+)	0	155 158 187 (167 \pm 17.7)	11 12 12 (12 \pm 0.6)	31 33 30 (31 \pm 1.5)	39 42 37 (39 \pm 2.5)	12 11 16 (13 \pm 2.6)												
	313	168 170 203 (180 \pm 19.7)	14 20 17 (17 \pm 3.0)	33 28 35 (32 \pm 3.6)	29 32 33 (31 \pm 2.1)	16 8 14 (13 \pm 4.2)												
	625	204 185 215 (201 \pm 15.2)	29 29 39 (32 \pm 5.8)	32 25 35 (31 \pm 5.1)	38 35 25 (33 \pm 6.8)	20 9 12 (14 \pm 5.7)												
	1250	174 211 203 (196 \pm 19.5)	54 43 55 (51 \pm 6.7)	32 27 33 (31 \pm 3.2)	35 26 32 (31 \pm 4.6)	10 13 19 (14 \pm 4.6)												
	2500	182 178 193 (184 \pm 7.8)	73 85 82 (80 \pm 6.2)	45 40 52 (46 \pm 6.0)	36 34 23 (31 \pm 7.0)	13 10 8 (10 \pm 2.5)												
	5000	222 204 211 (212 \pm 9.1)	126 91 98 (105 \pm 18.5)	51 57 52 (53 \pm 3.2)	28 29 16 (24 \pm 7.2)	8 6 10 (8 \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												
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	939 909 948 (932 \pm 20.4)	357 372 388 (372 \pm 15.5)	675 652 609 (645 \pm 33.5)	388 473 472 (444 \pm 48.8)	443 483 361 (429 \pm 62.2)												

Purity was 99.7wt%.

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

Table 4. Confirmation of mutagenicity of thiourea 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					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (+)	0			33 31 37 (34 \pm 3.1)			
	313			30 37 39 (35 \pm 4.7)			
	625			32 23 35 (30 \pm 6.2)			
	1250			42 48 37 (42 \pm 5.5)			
	2500			62 49 52 (54 \pm 6.8)			
	5000			60 55 65 (60 \pm 5.0)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			10			
	Number of colonies / plate			615 580 704 (633 \pm 63.9)			

Purity was 99.7wt%.

2AA: 2-Aminoanthracene