



## 最 終 報 告 書

3, 3'-チオピス (プロパン酸) の  
細菌を用いる復帰突然変異試験

M-1115

2003年 6月 4日

株式会社 **ボゾリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

## 目 次

	頁
目 次 .....	1
要 約 .....	6
緒 言 .....	7
試験材料及び方法 .....	8
1. 被験物質及び媒体 .....	8
2. 被験液の調製 .....	9
3. 対照物質 .....	10
4. 使用菌株 .....	12
5. S9 mix 及び培地の調製 .....	13
6. 試験方法 .....	15
7. 判定基準 .....	17
試験結果 .....	18
1. 濃度設定試験 .....	18
2. 本試験 .....	19
考察及び結論 .....	20
参考文献 .....	21

## Tables and Figures

Table 1	Results of the Dose-Range Finding Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test .....	24
Table 2	Results of the Dose-Range Finding Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test .....	25
Table 3	Results of the Main Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test .....	26
Table 4	Results of the Main Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test .....	27
Figure 1	Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- with <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 .....	28
Figure 2	Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- with <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 .....	29
Figure 3	Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- with <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 .....	30
Figure 4	Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- with <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 .....	31
Figure 5	Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis- with <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> .....	32

## 要 約

3, 3'-チオピス（プロパン酸）の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium*（以下、*S. typhimurium* と略す）TA100、TA98、TA1535、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli*（以下、*E. coli* と略す）WP2 *uvrA* を用いて復帰突然変異誘発試験を実施した。

試験は濃度設定試験及び本試験を実施し、非代謝活性化及び代謝活性化存在下の条件で、プレートインキュベーション法によって実施した。被験物質の媒体にはジメチルスルホキシド（以下、DMSO と略す）を用いた。

### 1. 沈殿/結晶

濃度設定試験において、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群（0.305～5000 µg/plate）で沈殿及び結晶の析出は認められなかった。同様に、本試験においても、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群（156～5000 µg/plate）で沈殿及び結晶の析出は認められなかった。

### 2. 生育阻害

濃度設定試験の全被験物質処理群（0.305～5000 µg/plate）及び本試験の全被験物質処理群（156～5000 µg/plate）において、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、生育阻害は認められなかった。

### 3. 復帰突然変異コロニー数

濃度設定試験の全被験物質処理群（0.305～5000 µg/plate）及び本試験の全被験物質処理群（156～5000 µg/plate）において、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、溶媒対照と比較して2倍以上の復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下において、3, 3'-チオピス（プロパン酸）は復帰突然変異誘発性を示さない（陰性）と判定した。

## 結 言

厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、3, 3'-チオピス（プロパン酸）の安全性試験の一環として、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

## 試験材料及び方法

## 1. 被験物質及び媒体

## 1) 被験物質

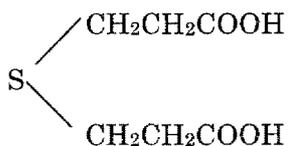
供給者 :

名称 : 3, 3'-チオビス (プロパン酸)

3, 3'-チオジプロピオン酸

Propanoic acid. 3,3'-thiobis-

構造式 :

示性式 :  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{S}$ 

純度 : 99.5%

ロット番号 :

不純物の名称及び含量

:  $\text{SO}_4$  根(0.02%)

: 水(0.04%)

CAS 番号 : 111-17-1

分子量 : 178.21

融点 : 123~134°C

分配係数 : pH2.0 (20°C飽和水溶液)

性状 : 常温で白色結晶粉末

有効期限 : 3箇年

保存方法 : 冷暗所 (保存実測温度 : 2~8°C)

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び変異原性試験室 (秤量室)

安定性 : 実験終了後の被験物質を で分析した結果、品質に問題はなく、実験期間中は安定であった (Attached Data 1)。

取扱い上の注意 : 吸湿により不安定になる。

返却 : 被験物質の残量は、すべて試験委託者に返却した。

## 2) 媒体

名 称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)  
ロット番号 : KSR1871  
規 格 : 試薬特級  
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社  
保 存 方 法 : 室温  
保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

媒体の選択理由 : 被験物質は 50.0 mg/mL の濃度で注射用水には難溶で、肉眼的には DMSO に溶解し、発泡、発熱、吸熱及び変色等の変化は認められなかった。従って DMSO を媒体として選択した。

## 2. 被験液の調製

## 1) 調製方法

## (1) 濃度設定試験

被験物質 0.25 g を 5 mL 容メスフラスコに秤取し、適当量の DMSO を徐々に加え、ミキサーを用いて目視によって固形物が認められなくなるまで攪拌した。次に、DMSO を加えてメスアップし、① 50.0 mg/mL 溶液 (最少グルコース寒天平板培地に添加した際の最終用量 : 5000 µg/plate) を最高濃度として、以下公比 4 で順次 7 段階希釈 (各濃度の被験液 1.50 mL : DMSO 4.50 mL) して、② 12.5、③ 3.13、④ 0.781、⑤ 0.195、⑥ 0.0488、⑦ 0.0122 及び⑧ 0.00305 mg/mL の計 8 濃度の被験液を調製した。

## (2) 本試験

被験物質 0.5 g を 10 mL 容メスフラスコに秤取し、適当量の DMSO を徐々に加え、ミキサーを用いて目視によって固形物が認められなくなるまで攪拌した。次に、DMSO を加えてメスアップし、① 50.0 mg/mL 溶液 (最少グルコース寒天平板培地に添加した際の最終用量 : 5000 µg/plate) を最高濃度として、以下公比 2 で順次 5 段階希釈 (各濃度の被験液 5.0 mL : DMSO 5.0 mL) して、② 25.0、③ 12.5、④ 6.25、⑤ 3.13 及び⑥ 1.56 mg/mL の計 6 濃度の被験液を調製した。

2) 調製頻度 : 使用直前に調製した。

- 3) 安定性 : 被験物質に DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱及び色調変化などは認められなかった。

### 3. 対照物質

#### 1) 陰性対照物質

DMSO を陰性対照とした。

#### 2) 陽性対照物質

以下 5 種類の変異原を陽性対照とした。

##### (1) 代謝活性化

###### ① 2-Aminoanthracene (以下、2AA と略す)

ロット番号 : M7K7000

製造元 : ナカライテスク株式会社

純度 : 96.0%

保存方法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光

保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

###### ② Benzo[a]pyrene (以下、B[a]P と略す)

ロット番号 : M5K8326

製造元 : ナカライテスク株式会社

純度 : 99.0%

保存方法 : 室温、遮光

保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

##### (2) 非代謝活性化

###### ① 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (以下、AF-2 と略す)

ロット番号 : PAE1151

製造元 : 和光純薬工業株式会社

純度 : 98.0~102.0%

保存方法 : 室温、遮光

保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

## ② Sodium azide (以下、SAZ と略す)

ロット番号 : ELP2778  
 製造元 : 和光純薬工業株式会社  
 純度 : 98.0%  
 保存方法 : 室温、遮光  
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

## ③ 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine·2HCl

(以下、ICR-191 と略す)

ロット番号 : 465901  
 製造元 : Polysciences, Inc.  
 純度 : 98.0%  
 保存方法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光  
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

## (3) 陽性対照物質の選択理由

前記毒性試験ガイドラインに準じて選択した。

## (4) 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P はジメチルスルホキシド (DMSO : 和光純薬工業株式会社、試薬特級、ロット番号 KSR1871) に溶解し、SAZ は注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 1K82N) に溶解した。それぞれの調製濃度を表 1 に示す。

表 1 陽性対照物質の調製及び処理濃度

試験菌株	非代謝活性化 (-S9)		代謝活性化 (+S9)	
	陽性対照物質	調製濃度 µg/mL	陽性対照物質	調製濃度 µg/mL
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1.0 (0.1)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5.0 (0.5)	2AA	20 (2.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10.0 (1.0)	B[a]P	50 (5.0)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100 (10.0)

( ) 内の数値は、処理濃度(µg/plate)を示す。

#### 4. 使用菌株

##### 1) 菌株

次の5種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

*S. typhimurium* TA100

*S. typhimurium* TA1535

*E. coli* WP2 *uvrA*

フレームシフト型

*S. typhimurium* TA98

*S. typhimurium* TA1537

上記菌株は、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より入手（1997年10月9日）した。

##### 2) 菌株の選択理由

前記毒性試験ガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

##### 3) 菌株の保存及び解凍

入手した菌株を培養して得られた菌懸濁液 0.8 mL に対して、DMSO（和光純薬工業株式会社、試薬特級、ロット番号 SEG4422）を 0.07 mL の割合で添加し、 $-80^{\circ}\text{C}$  設定の超低温フリーザー（日本フリーザー株式会社：CL-312）で保存し、使用する時は室温で解凍した。

##### 4) 菌株の特性検査

凍結保存した菌株を、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬物耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性及び菌増殖率の特性について検査を 2002 年 1 月 23 日から 2002 年 1 月 25 日に実施し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認した。

## 5. S9 mix 及び培地の調製

## 1) S9 mix

S9 及び補酵素 (S-9/コファクターA セット ロット番号 A020509021、オリエンタル酵母工業株式会社) を混合し調製した。調製は用時に行った。

## (1) S9

名 称 : S9  
 ロット番号 : 02050902  
 製造日 : 2002年5月9日  
 種・系統 : ラット・SD系  
 性 : 雄  
 週 齢 : 7週齢  
 体 重 : 206.7±8.4 g  
 誘導物質 : フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)  
 投 与 法 : 腹腔内投与

## 投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight  
 BF 1日間 80mg/kg body weight  
 保存方法 : 冷凍保存 (-80℃設定の超低温フリーザー庫に保存)  
 使用期限 : 2002年11月8日 (製造後6箇月以内)  
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

## (2) 補酵素

名 称 : コファクターA  
 ロット番号 : A02050702  
 製造日 : 2002年5月7日  
 保存方法 : 冷凍保存 (-80℃設定の超低温フリーザー庫に保存)  
 使用期限 : 2002年11月6日 (製造後6箇月以内)  
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

## (3) S9 mix の組成

S9	1 mL		
補酵素	9 mL	0.4M 塩化マグネシウム水溶液	0.2 mL
		1.65M 塩化カリウム水溶液	0.2 mL
		1.0M グルコース-6-リン酸水溶液	0.05 mL

0.1M 還元型ニコチンアミド-アデニン	
ジヌクレオチドリン酸(NADPH)水溶液	0.4 mL
0.1M 還元型ニコチンアミド-アデニン	
ジヌクレオチド(NADH)水溶液	0.4 mL
0.2M ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	5.0 mL
精製水	2.75 mL

## 2) 最少グルコース寒天平板培地

最少グルコース寒天平板培地は、オリエンタル酵母工業株式会社から購入したものを  
用いた。

名 称	: 最少グルコース寒天培地 BZ
ロット番号	: BZ020FR
製造日	: 2002年 6月 20日
保存方法	: 常温 (15~25℃)
使用期限	: 2002年 12月 19日 (製造後 6箇月以内)
保存場所	: 御殿場研究所 変異原性試験室

## 3) ニュートリエントブロス培養液

ニュートリエントブロス 12.5 g を精製水 500 mL に溶解し、調製した。

名 称	: ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No.2)
ロット番号	: 59365
製造元	: UNIPATH LTD.
保存方法	: 室温
保存場所	: 御殿場研究所 変異原性試験室

## 4) 0.5mM D-ビオチン-0.5mM L-ヒスチジン溶液

D-ビオチン 0.0305 g を 1N 水酸化ナトリウム 0.3 mL に溶解し、L-ヒスチジン塩酸一水和物 0.0262 g を加え、精製水 250 mL に溶解し、調製した。

① 名 称	: (+)-Biotin ((+)-ビオチン)
ロット番号	: ELP3763
製造元	: 和光純薬工業株式会社
保存方法	: 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光

- 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室
- ② 名称 : L-ヒスチジン塩酸一水和物 (L-Histidine Hydrochloride Monohydrate)
- ロット番号 : TPK3675
- 製造元 : 和光純薬工業株式会社
- 保存方法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
- 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

5) 0.5mM L-トリプトファン溶液

L-トリプトファン 0.0252 g を精製水 250 mL に溶解し、調製した。

- 名称 : L-Tryptophan
- ロット番号 : M7K7926
- 製造元 : ナカライテスク株式会社
- 保存方法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
- 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

6) トップアガー

以下に示す寒天を用いて調製した軟寒天液(0.6% Agar, 0.6% NaCl)に、*S. typhimurium* TA 株は 0.5 mM D-ビオチン-0.5 mM L-ヒスチジン溶液、*E. coli* 株では 0.5 mM L-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量加え、調製した。

- 名称 : BACTO-AGAR
- ロット番号 : 108481JA
- 製造元 : DIFCO LABORATORIES
- 保存方法 : 室温
- 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

6. 試験方法<sup>1-5)</sup>

1) 識別方法

(1) 菌株の識別

菌株の種類毎に、以下に示す色のラベルを貼り識別した。

*S. typhimurium* TA100 青

<i>S. typhimurium</i> TA98	緑
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>S. typhimurium</i> TA1537	赤
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	黄

## (2) 濃度の識別

非代謝活性化を「-」、代謝活性化を「+」とし、溶媒対照 (Solvent Control)を「SC」、陽性対照 (Positive Control)を「PC」、被験物質処理を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を明記したラベルで識別した。

## 2) 前培養条件

- (1) ニュートリエントブロス 30 mL を入れた培養用三角フラスコに、*S. typhimurium* TA株は各 60  $\mu$ L、*E. coli* 株は 30  $\mu$ L の菌懸濁液を植菌した。
- (2) 試験には、37℃で約 8 時間前培養（振盪培養装置：BIOSPIN MBS-1、東京理化工業株式会社）した後の菌懸濁液を用いた。前培養終了時に菌懸濁液の吸光度を測定（分光光度計：UVIDEC-66、協和医科器械株式会社）し、生菌数が  $1 \times 10^9$  個/mL 以上であることを確認した（表 2）。なお、菌懸濁液は、使用まで急激な温度変化を避けるため室温下に放置した。

表 2. 菌株の生菌数

菌株	濃度設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	$2.11 \times 10^9$ /mL	$1.95 \times 10^9$ /mL
<i>S. typhimurium</i> TA98	$3.19 \times 10^9$ /mL	$2.92 \times 10^9$ /mL
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$2.34 \times 10^9$ /mL	$2.53 \times 10^9$ /mL
<i>S. typhimurium</i> TA1537	$1.53 \times 10^9$ /mL	$1.47 \times 10^9$ /mL
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	$4.37 \times 10^9$ /mL	$4.45 \times 10^9$ /mL

## 3) 用量の設定

## (1) 濃度設定試験

最高用量を 5000  $\mu$ g/plate とし、以下公比 4 で希釈した 1250、313、78.1、19.5、4.88、1.22 及び 0.305  $\mu$ g/plate の計 8 用量を設定した。

(2) 本試験

濃度設定試験の結果、すべての処理用量において試験菌株の生育阻害が認められなかったため、本試験は 5000 µg/plate を最高用量とし、以下公比 2 で 5 段階希釈した 2500、1250、625、313 及び 156 µg/plate の計 6 用量を設定した。

4) プレート数

濃度設定試験及び本試験は、処理群当たり 3 枚のプレートを用いた。

5) 濃度設定試験

- (1) 非代謝活性化では 0.1M ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化では S9 mix 0.5 mL を加えた後、被験液 0.1 mL 添加し、それぞれに各菌懸濁液 0.1 mL を加えた。
- (2) 37°C で 20 分間振盪 (プレインキュベーション) し、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後、最少グルコース寒天平板培地に重層した。
- (3) 37°C で 48 時間培養した後、試験菌株の生育阻害並びに沈殿及び結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。この結果、沈殿及び結晶の析出が認められなかったため、出現した復帰突然変異コロニーは自動コロニーカウンター (バイオマルチスキャナー BMS-400、東洋測器(株)) を用いて計数した。

6) 本試験

操作は濃度設定試験と同じ手順で行った。

7) 追加確認試験

特に必要性が認められなかったため実施しなかった。

7. 判定基準

結果の判定は、被験物質処理における復帰突然変異コロニー数が自然復帰突然変異コロニー数に対して明らかに増加し (溶媒対照の 2 倍を目安とする)、この増加に用量反応性が認められ、また濃度設定試験・本試験の各判定に再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

## 試験結果

### 1. 濃度設定試験

濃度設定試験の結果を Table 1, 2 及び Figure 1~5 (上段) に示した。

#### 1) 培養終了後の観察結果

培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察においては、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群 (0.305~5000 µg/plate) において、沈殿、結晶の析出及び生育阻害は認められなかった。

#### 2) 復帰突然変異コロニー数

試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群 (0.305~5000 µg/plate) において、溶媒対照と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

#### 3) 試験系の成立条件

- (1) 陽性対照群では、各菌株の溶媒対照と比較して 2 倍以上の復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。
- (2) すべての用量群について 3 枚のプレートにおける個々の復帰突然変異コロニー数に顕著な差は認められなかった。
- (3) 試験の全処理群において雑菌の混入は認められず、培養条件等の試験環境において異常はないものと判断した。
- (4) 各菌株の代謝活性化の有無による溶媒対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データ管理値 (Attached Data 2) の範囲以内であったため、試験系は成立したものと判断した。

## 2. 本試験

本試験の結果を Table 3, 4 及び Figure 1~5 (下段) に示した。

### 1) 用量設定理由

濃度設定試験の結果、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群において、生育阻害が認められなかったため、本試験における被験物質用量は、濃度設定試験において最高用量として設定した 5000 µg/plate を本試験の最高用量とし、これを公比 2 で 5 段階希釈した 2500、1250、625、313 及び 156 µg/plate の計 6 用量を設定した。

### 2) 培養終了後の観察結果

培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察においては、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群 (156~5000 µg/plate) において、沈殿、結晶の析出及び生育阻害は認められなかった。

### 3) 復帰突然変異コロニー数

試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群 (156~5000 µg/plate) において、溶媒対照と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

### 4) 試験系の成立条件

- (1) 陽性対照群では、各菌株の溶媒対照と比較して 2 倍以上の復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。
- (2) すべての用量群について 3 枚のプレートにおける個々の復帰突然変異コロニー数に顕著な差は認められなかった。
- (3) 試験の全処理群において雑菌の混入は認められず、培養条件等の試験環境において異常はないものと判断した。
- (4) 各菌株の代謝活性化の有無による溶媒対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データ管理値 (Attached Data 2) の範囲以内であったため、試験系は成立したものと判断した。

## 考察及び結論

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、試験菌株の種類、被験物質濃度及び代謝活性化の有無に関わらず、溶媒対照と比較して2倍以上の、かつ用量反応性を伴う復帰突然変異コロニー数の増加が認められなかった。したがって、本被験物質の復帰突然変異試験の結果は陰性であると判断した。

一方、陽性対照群では各菌株の溶媒対照群と比較して2倍以上の復帰突然変異コロニー数の増加を示したことから、試験菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認された。更に、各菌株の代謝活性化の有無による溶媒対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データと比較して異常と考えられる数値を示さず、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、本被験物質と類似の化学構造を持つ脂肪酸ジカルボン酸である、citric acid、fumaric acid、L-glutamic acid、DL-malic acid、oxalic acid、succinic acid、D-tartaric acid は、いずれも細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性の結果が報告されている<sup>3,6)</sup>。

以上の試験結果より、本試験条件下において、3,3'-チオビス（プロパン酸）は細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判断した。

## 参考文献

- 1) Bruce N. Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*. 31, 347-364.
- 2) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. 113, 173-215.
- 3) 石館 基 (監修) (1991): 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦、松井道子編集)、株式会社エル・アイ・シー、東京
- 4) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集 (1992): 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q & A、pp.1-21 及び 81-89、サイエンティスト社、東京
- 5) 日本バイオアッセイ研究センター編集 (1999) : 微生物を用いる変異原性試験手法解説、pp.1-86、富士オフセット株式会社、東京
- 6) 祖父尼俊雄 (監修) (1998): 染色体異常試験データ集, 改訂 1998 年版、株式会社エル・アイ・シー、東京

Table 1 Results of the Dose-Range Finding Test on Propanoic Acid, 3,3'-thiobis- without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of revertant colonies/plate (Mean ± Standard Deviation)					
			Base-pair substitution type			Frameshift type		
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537	
Solvent control	0		89	11	29	13	17	
			96	12	29	16	17	
			96 ( 94 ± 4.0 )	11 ( 11 ± 0.6 )	31 ( 30 ± 1.2 )	13 ( 14 ± 1.7 )	17 ( 17 ± 0.0 )	
Test article	0.305		97	12	28	19	15	
			98	9	27	20	13	
				101 ( 99 ± 2.1 )	8 ( 10 ± 2.1 )	27 ( 27 ± 0.6 )	16 ( 18 ± 2.1 )	16 ( 15 ± 1.5 )
	1.22		100	9	24	19	12	
			88	12	25	19	15	
				101 ( 96 ± 7.2 )	9 ( 10 ± 1.7 )	27 ( 25 ± 1.5 )	23 ( 20 ± 2.3 )	12 ( 13 ± 1.7 )
	4.88		100	15	25	17	11	
			89	13	33	21	13	
				89 ( 93 ± 6.4 )	12 ( 13 ± 1.5 )	25 ( 28 ± 4.6 )	20 ( 19 ± 2.1 )	15 ( 13 ± 2.0 )
	19.5		88	11	21	21	13	
			93	9	24	16	17	
				89 ( 90 ± 2.6 )	8 ( 9 ± 1.5 )	29 ( 25 ± 4.0 )	17 ( 18 ± 2.6 )	20 ( 17 ± 3.5 )
	78.1		93	11	28	21	13	
			100	9	24	16	20	
				88 ( 94 ± 6.0 )	12 ( 11 ± 1.5 )	27 ( 26 ± 2.1 )	23 ( 20 ± 3.6 )	15 ( 16 ± 3.6 )
	313		84	12	23	21	19	
			93	9	28	20	15	
				96 ( 91 ± 6.2 )	9 ( 10 ± 1.7 )	25 ( 25 ± 2.5 )	20 ( 20 ± 0.6 )	15 ( 16 ± 2.3 )
	1250		100	13	25	19	13	
			96	11	33	19	12	
			98 ( 98 ± 2.0 )	11 ( 12 ± 1.2 )	28 ( 29 ± 4.0 )	17 ( 18 ± 1.2 )	17 ( 14 ± 2.6 )	
5000		101	8	25	15	13		
		104	12	31	20	15		
			102 ( 102 ± 1.5 )	8 ( 9 ± 2.3 )	29 ( 28 ± 3.1 )	16 ( 17 ± 2.6 )	17 ( 15 ± 2.0 )	
Positive control	Name		AF-2 <sup>#1</sup>	SAZ <sup>#2</sup>	AF-2 <sup>#1</sup>	AF-2 <sup>#1</sup>	ICR-191 <sup>#3</sup>	
	Dose (µg/plate)		0.01	0.50	0.01	0.10	1.00	
	Number of colonies/plate		1111	1369	634	495	2720	
			1105	1339	618	492	2567	
			1040 ( 1085 ± 39.4 )	1343 ( 1350 ± 16.3 )	637 ( 630 ± 10.2 )	497 ( 495 ± 2.5 )	2786 ( 2691 ± 112.3 )	

Solvent control: Dimethylsulfoxide

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

#2: Sodium azide

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine · 2HCl

No deposition of crystals and precipitation were observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 2 Results of the Dose-Range Finding Test on Propanoic Acid, 3,3'-thiobis- with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of revertant colonies/plate (Mean ± Standard Deviation)					
			Base-pair substitution type			Frameshift type		
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537	
Solvent control	0		134	12	29	24	13	
			138	11	25	27	9	
			132 ( 135 ± 3.1 )	8 ( 10 ± 2.1 )	29 ( 28 ± 2.3 )	27 ( 26 ± 1.7 )	15 ( 12 ± 3.1 )	
			0.305	112	9	32	31	15
				113	8	24	29	21
				108 ( 111 ± 2.6 )	11 ( 9 ± 1.5 )	28 ( 28 ± 4.0 )	25 ( 28 ± 3.1 )	19 ( 18 ± 3.1 )
			1.22	114	8	23	29	16
				109	9	23	32	20
				112 ( 112 ± 2.5 )	12 ( 10 ± 2.1 )	27 ( 24 ± 2.3 )	27 ( 29 ± 2.5 )	20 ( 19 ± 2.3 )
			4.88	109	12	27	33	21
110	15	25		31	19			
116 ( 112 ± 3.8 )	12 ( 13 ± 1.7 )	24 ( 25 ± 1.5 )		24 ( 29 ± 4.7 )	16 ( 19 ± 2.5 )			
19.5	117	9	32	28	15			
	118	12	27	27	16			
	112 ( 116 ± 3.2 )	11 ( 11 ± 1.5 )	24 ( 28 ± 4.0 )	27 ( 27 ± 0.6 )	16 ( 16 ± 0.6 )			
78.1	112	12	29	24	23			
	124	11	28	31	17			
	121 ( 119 ± 6.2 )	9 ( 11 ± 1.5 )	24 ( 27 ± 2.6 )	29 ( 28 ± 3.6 )	15 ( 18 ± 4.2 )			
313	117	9	31	31	16			
	108	11	31	25	24			
	114 ( 113 ± 4.6 )	12 ( 11 ± 1.5 )	28 ( 30 ± 1.7 )	25 ( 27 ± 3.5 )	17 ( 19 ± 4.4 )			
1250	124	9	32	28	15			
	117	11	25	31	25			
	126 ( 122 ± 4.7 )	12 ( 11 ± 1.5 )	25 ( 27 ± 4.0 )	25 ( 28 ± 3.0 )	21 ( 20 ± 5.0 )			
5000	120	11	27	29	19			
	120	13	31	28	16			
	126 ( 122 ± 3.5 )	13 ( 12 ± 1.2 )	24 ( 27 ± 3.5 )	32 ( 30 ± 2.1 )	19 ( 18 ± 1.7 )			
Positive control	Name	B[a]P <sup>#4</sup>	2AA <sup>#5</sup>	2AA	B[a]P	B[a]P		
	Dose (µg/plate)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00		
	Number of colonies/plate	606	72	166	376	74		
		593	69	172	334	65		
		588 ( 596 ± 9.3 )	69 ( 70 ± 1.7 )	153 ( 164 ± 9.7 )	354 ( 355 ± 21.0 )	70 ( 70 ± 4.5 )		

Solvent control: Dimethylsulfoxide

#4: Benzo[a]pyrene

#5: 2-Aminoanthracene

No deposition of crystals and precipitation were observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 3 Results of the Main Test on Propanoic Acid, 3,3'-thiobis- without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of revertant colonies/plate (Mean ± Standard Deviation)						
			Base-pair substitution type			Frameshift type			
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537		
Solvent control	0		109	15	28	17	12		
			100	13	36	13	16		
			108 ( 106 ± 4.9 )	12 ( 13 ± 1.5 )	29 ( 31 ± 4.4 )	16 ( 15 ± 2.1 )	17 ( 15 ± 2.6 )		
Test article	156	(-)	105	9	29	13	15		
			117	11	24	11	16		
			110 ( 111 ± 6.0 )	8 ( 9 ± 1.5 )	25 ( 26 ± 2.6 )	11 ( 12 ± 1.2 )	19 ( 17 ± 2.1 )		
	313		109	11	23	11	13		
			108	13	29	11	15		
			112 ( 110 ± 2.1 )	12 ( 12 ± 1.0 )	27 ( 26 ± 3.1 )	17 ( 13 ± 3.5 )	15 ( 14 ± 1.2 )		
	625		117	9	33	16	19		
			120	12	27	16	19		
			117 ( 118 ± 1.7 )	13 ( 11 ± 2.1 )	23 ( 28 ± 5.0 )	15 ( 16 ± 0.6 )	13 ( 17 ± 3.5 )		
	1250		116	12	32	15	15		
			110	9	27	17	16		
			106 ( 111 ± 5.0 )	9 ( 10 ± 1.7 )	29 ( 29 ± 2.5 )	15 ( 16 ± 1.2 )	17 ( 16 ± 1.0 )		
	2500		100	11	28	16	15		
			116	8	24	13	13		
			109 ( 108 ± 8.0 )	11 ( 10 ± 1.7 )	28 ( 27 ± 2.3 )	15 ( 15 ± 1.5 )	15 ( 14 ± 1.2 )		
	5000		106	8	27	11	12		
			108	12	27	17	13		
			100 ( 105 ± 4.2 )	11 ( 10 ± 2.1 )	25 ( 26 ± 1.2 )	15 ( 14 ± 3.1 )	17 ( 14 ± 2.6 )		
	Positive control		Name		AF-2 <sup>#1</sup>	SAZ <sup>#2</sup>	AF-2 <sup>#1</sup>	AF-2 <sup>#1</sup>	ICR-191 <sup>#3</sup>
			Dose (µg/plate)		0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
			Number of colonies/plate		882	1325	640	599	2459
					883	1334	630	601	2502
					887 ( 884 ± 2.6 )	1329 ( 1329 ± 4.5 )	635 ( 635 ± 5.0 )	609 ( 603 ± 5.3 )	2480 ( 2480 ± 21.5 )

Solvent control: Dimethylsulfoxide

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

#2: Sodium azide

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl

No deposition of crystals and precipitation were observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 4 Results of the Main Test on Propanoic Acid, 3,3'-thiobis- with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of revertant colonies/plate (Mean ± Standard Deviation)						
			Base-pair substitution type			Frameshift type			
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537		
Solvent control	0		124	7	25	27	12		
			125	7	27	21	11		
			129 ( 126 ± 2.6 )	11 ( 8 ± 2.3 )	25 ( 26 ± 1.2 )	27 ( 25 ± 3.5 )	13 ( 12 ± 1.0 )		
Test article	156	(+) S9 mix	114	9	36	31	16		
			121	8	28	29	20		
			112 ( 116 ± 4.7 )	11 ( 9 ± 1.5 )	25 ( 30 ± 5.7 )	23 ( 28 ± 4.2 )	15 ( 17 ± 2.6 )		
	313		110	13	35	23	19		
			113	7	33	32	17		
			104 ( 109 ± 4.6 )	12 ( 11 ± 3.2 )	32 ( 33 ± 1.5 )	29 ( 28 ± 4.6 )	17 ( 18 ± 1.2 )		
	625		110	11	29	27	17		
			120	9	24	23	15		
			118 ( 116 ± 5.3 )	12 ( 11 ± 1.5 )	28 ( 27 ± 2.6 )	25 ( 25 ± 2.0 )	16 ( 16 ± 1.0 )		
	1250		108	9	31	31	17		
			126	13	31	25	19		
			117 ( 117 ± 9.0 )	12 ( 11 ± 2.1 )	28 ( 30 ± 1.7 )	21 ( 26 ± 5.0 )	19 ( 18 ± 1.2 )		
	2500		125	8	29	32	15		
			121	8	27	23	21		
			114 ( 120 ± 5.6 )	12 ( 9 ± 2.3 )	32 ( 29 ± 2.5 )	23 ( 26 ± 5.2 )	15 ( 17 ± 3.5 )		
	5000		125	12	29	24	19		
			118	12	28	25	17		
			113 ( 119 ± 6.0 )	7 ( 10 ± 2.9 )	27 ( 28 ± 1.0 )	27 ( 25 ± 1.5 )	19 ( 18 ± 1.2 )		
	Positive control		Name		B[a]P <sup>#4</sup>	2AA <sup>#5</sup>	2AA <sup>#5</sup>	B[a]P <sup>#4</sup>	B[a]P <sup>#4</sup>
			Dose (µg/plate)		5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
			Number of colonies/plate		544	89	174	333	92
					531	98	178	302	94
					513 ( 529 ± 15.6 )	86 ( 91 ± 6.2 )	187 ( 180 ± 6.7 )	319 ( 318 ± 15.5 )	93 ( 93 ± 1.0 )

Solvent control: Dimethylsulfoxide

#4: Benzo[a]pyrene

#5: 2-Aminoanthracene

No deposition of crystals and precipitation were observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

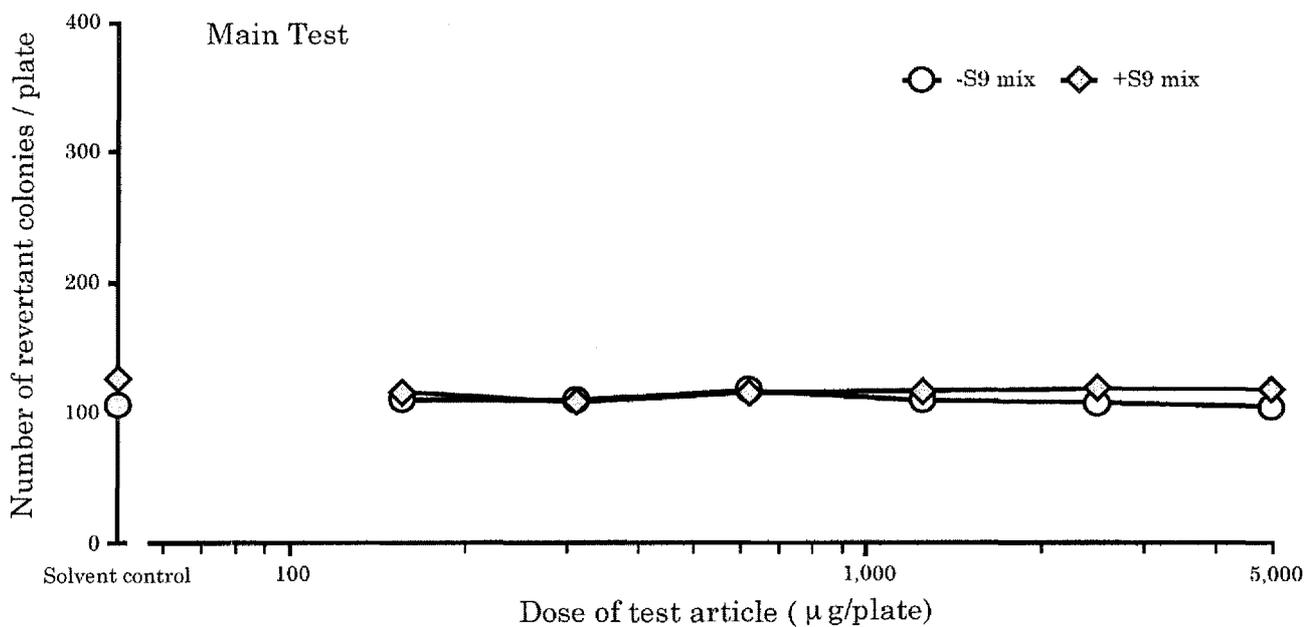
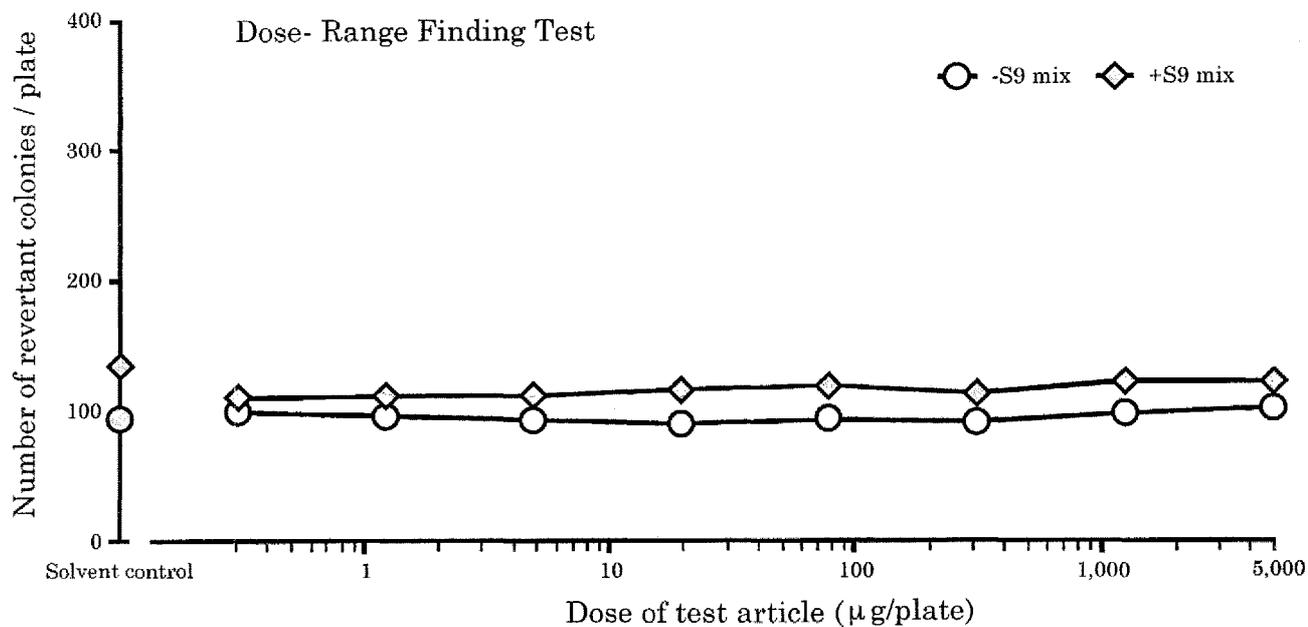


Figure 1

Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis-  
with *Salmonella typhimurium* TA100

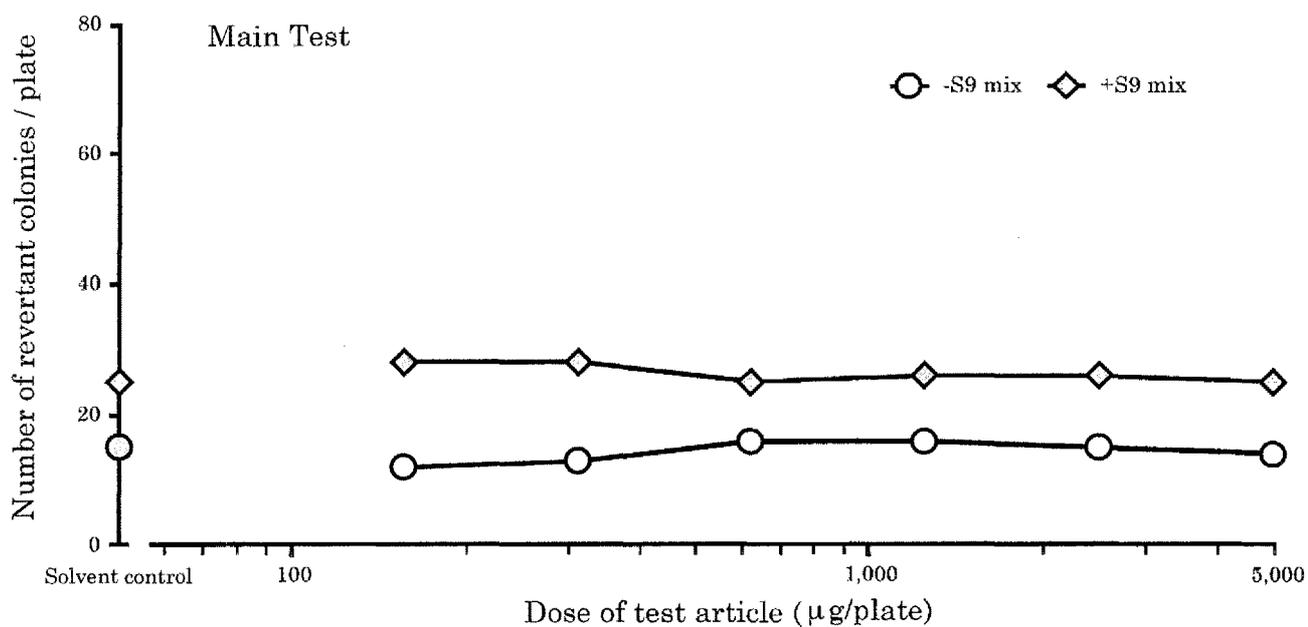
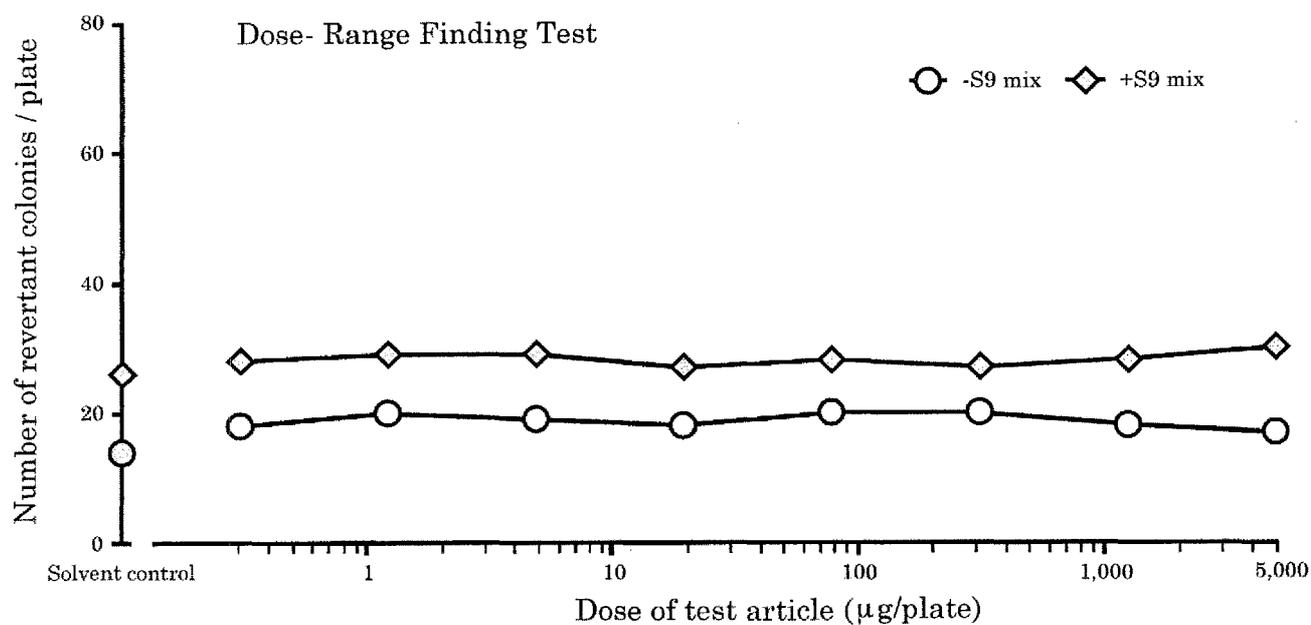


Figure 2

Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid, 3,3'-thiobis-  
with *Salmonella typhimurium* TA98

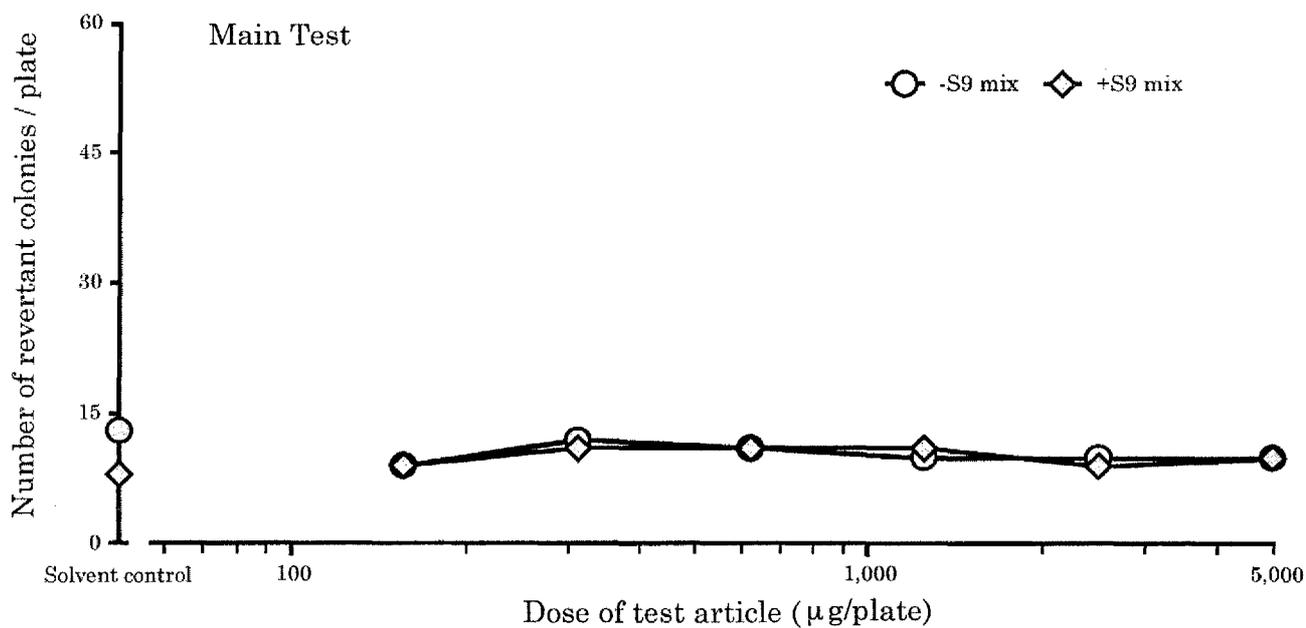
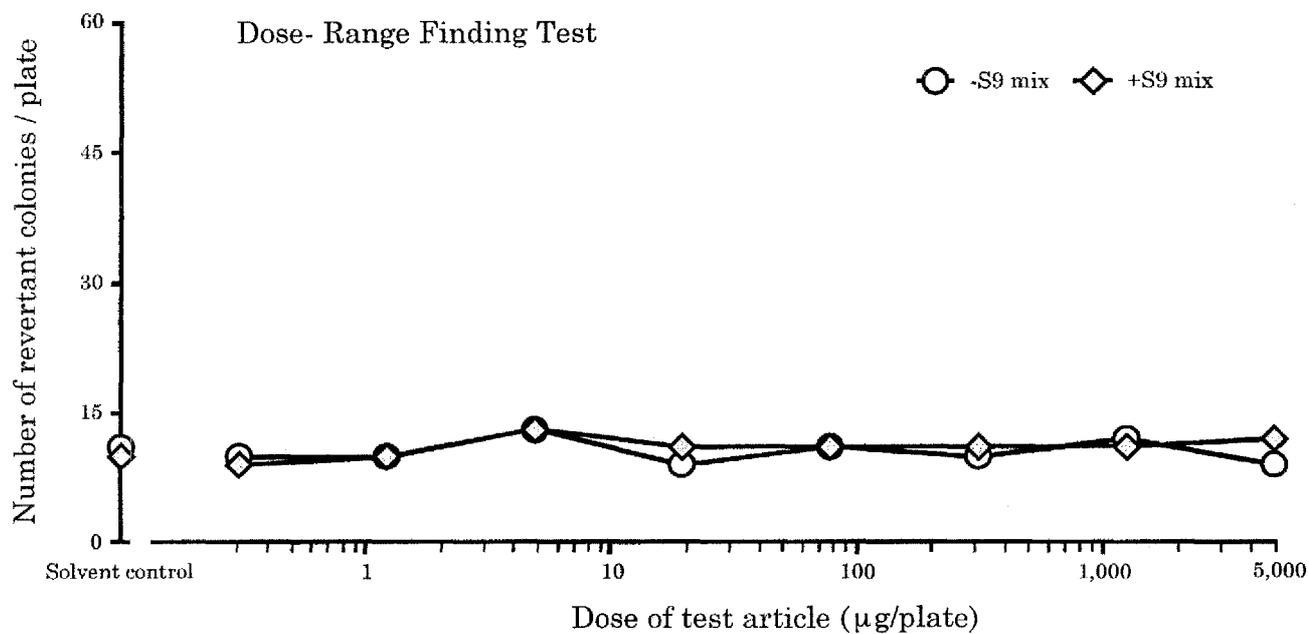


Figure 3

Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid, 3,3'-thiobis-  
with *Salmonella typhimurium* TA1535

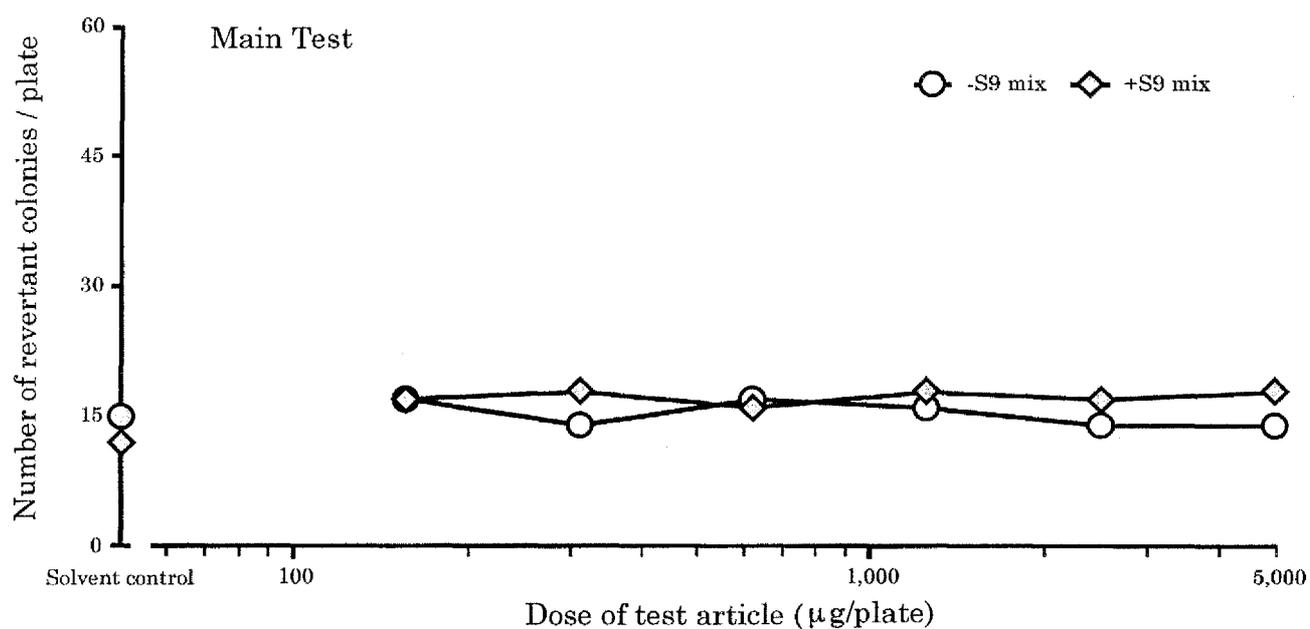
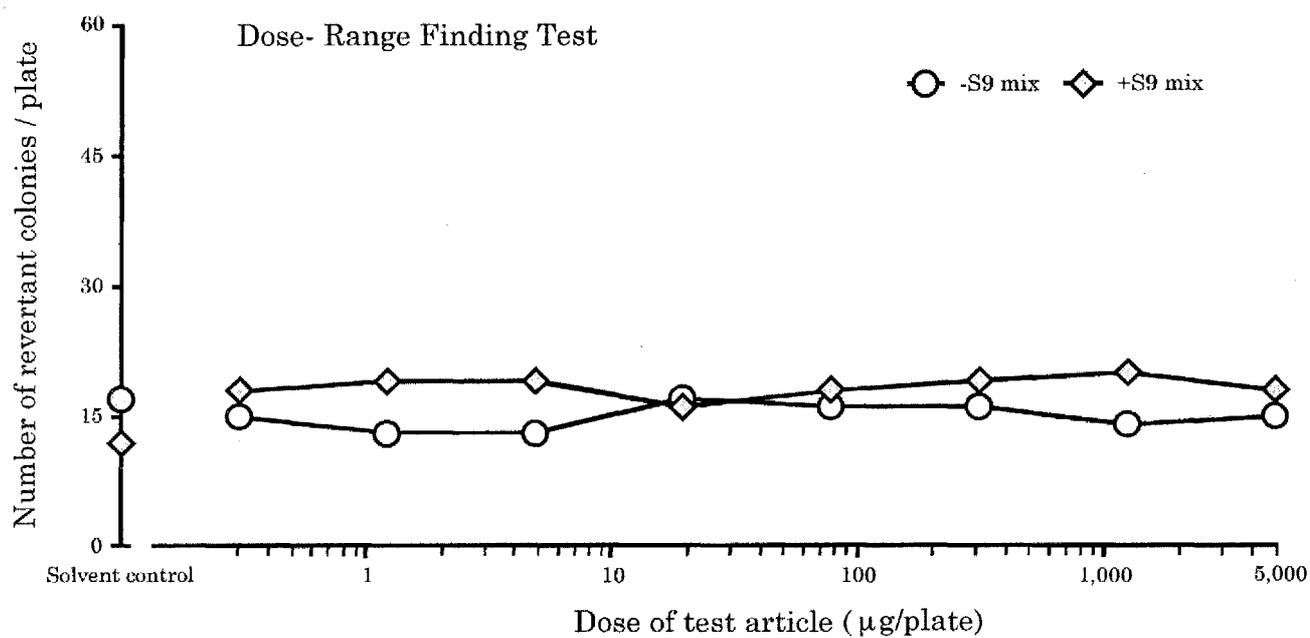


Figure 4

Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid. 3,3'-thiobis-  
with *Salmonella typhimurium* TA1537

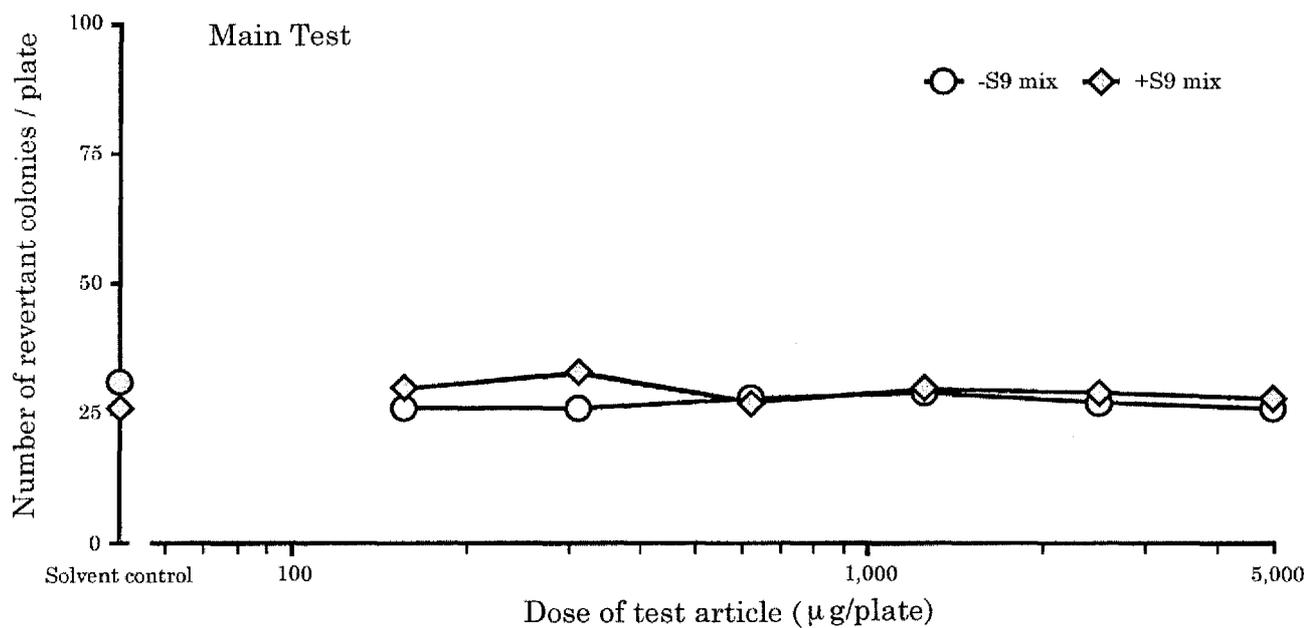
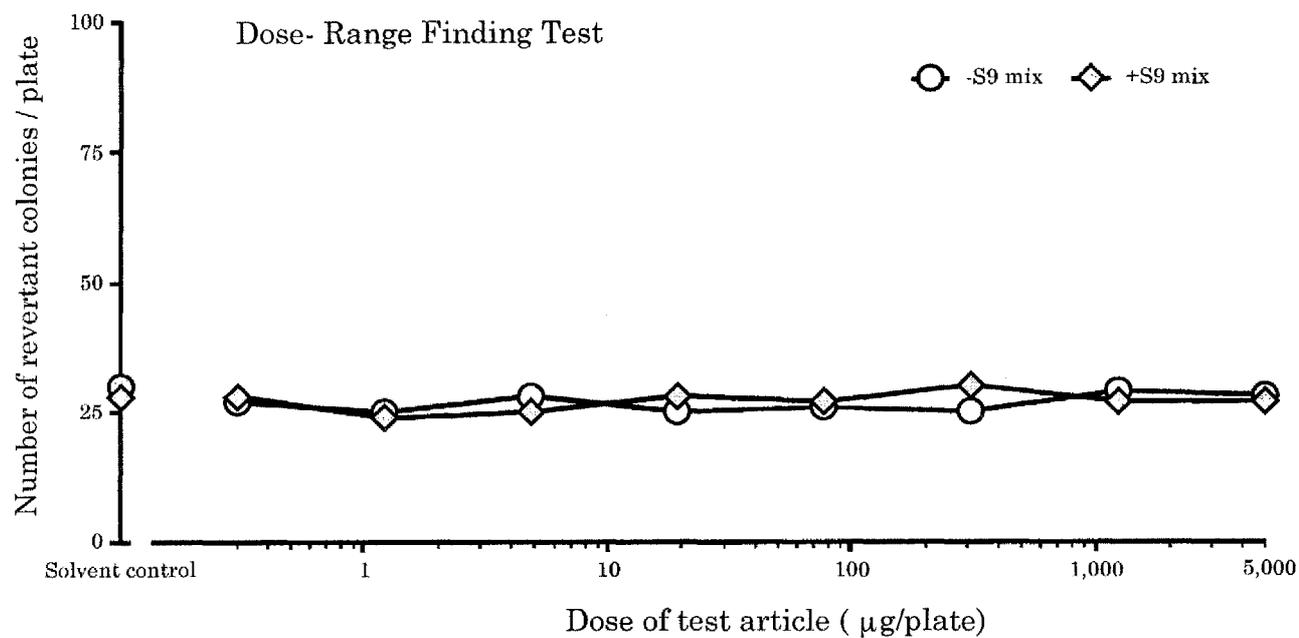


Figure 5

Results of the Reverse Mutation Test on Propanoic Acid, 3,3'-thiobis-  
with *Escherichia coli* WP2 *uvrA*