4，4′-スルホニルジフェノール
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 …… 6

特　記　事　項 …… 7

文　　献 …… 7

Tables　　1～3

【要　　約】

4,4'-スルホニルジフェノールの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレ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 μg/プレート の用量で行ったところ、*Salmonella* の4菌株において、S9 mix 無添加試験および添加試験でともに 5000 μg/プレート の用量で抗菌性が認められた。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験ともに *Salmonella* の4菌株は 78.1～5000 μg/プレート、WP2 *uvrA* は 156～5000 μg/プレート の範囲で6～7用量を設定して実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかったことから、4,4'-スルホニルジフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【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、4,4'-スルホニルジフェノールについて、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〕

4,4'-スルホニルジフェノール（略称：ＳＤＰ、CAS No. 80-09-1）は、分子量 250.27 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 99.80wt％（不純物：0.15wt％ 2,4'-Dihydroxydiphenylsulfone）であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

ＳＤＰは、ジメチルスルホキシド（DMSO、和光純薬工業㈱、ロット番号：TPJ5678）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)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	（和光純薬工業㈱　ﾛｯﾄ番号 WTQ0059,	純度98％以上）
SA	：	ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	（和光純薬工業㈱　ﾛｯﾄ番号 DLL3931,	純度98％以上）
9AA	：	9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	（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㈱　ﾛｯﾄ番号 DLH6052,	純度90％以上）

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解したものを－20℃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) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco Lab.)	0.6 %	(B)*	L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5 %		D-ﾋﾞｵﾁﾝ	0.5 mM

* ： WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2）合成培地

培地は、極東製薬工業㈱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 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・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	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	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
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmol	ﾅﾄﾘｳﾑ-ﾘﾝ酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
ｸﾞﾙｺｰｽ-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㈱、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℃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℃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、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37℃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 2 回、また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、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、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

ＳＤＰについて 50.0～5000 μg/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、*Salmonella* の４菌株において、S9 mix 無添加試験および添加試験でともに 5000 μg/プレート の用量で抗菌性が認められた。

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 μg/プレート とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、*Salmonella* の４菌株は、78.1～5000 μg/プレート、WP2 *uvrA* は 156～5000 μg/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、すべての検定菌において、２回の試験とも溶媒対照値の２倍以上となる変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

一方、ＳＤＰ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は、S9 mix 非存在下において染色体の構造異常が誘発され、陽性であった（食薬セ研第9-1944号）。ＳＤＰの類縁化合物については、簡単な情報検索を行ったが、変異原性に関する情報は得られなかった。

ＳＤＰ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、4,4'-スルホニルジフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【特　記　事　項】

試験の全過程を通して、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

Table 1. Cytotoxicity of 4,4'-sulfonyldiphenol 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 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	128 118 128 (125 ± 5.8)	8 10 9 (9 ± 1.0)	15 26 20 (20 ± 5.5)	20 23 23 (22 ± 1.7)	12 10 9 (10 ± 1.5)	
	50.0	140	3	14	14	8	
	150	125	10	19	19	7	
	500	91	5	21	15	3	
	1500	0	0	10	4	2	
	5000	0 *	0 *	0	0 *	0 *	
S9 mix (+)	0	102 103 110 (105 ± 4.4)	11 8 12 (10 ± 2.1)	31 30 33 (31 ± 1.5)	48 34 31 (38 ± 9.1)	16 14 17 (16 ± 1.5)	
	50.0	126	10	24	28	9	
	150	144	4	15	34	15	
	500	116	8	18	26	7	
	1500	8	0	10	13	8	
	5000	0 *	0 *	0	0 *	0 *	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	347 349 354 (350 ± 3.6)	636 584 587 (602 ± 29.2)	137 133 155 (142 ± 11.7)	401 427 384 (404 ± 21.7)	423 328 309 (353 ± 61.1)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	1063 989 956 (1003 ± 54.8)	384 371 363 (373 ± 10.6)	734 695 660 (696 ± 37.0)	488 435 482 (468 ± 29.0)	200 267 274 (247 ± 40.9)	

Purity was 99.80wt% and 0.15wt% 2,4'-dihydroxydiphenylsulfone was contained as impurity .

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Table 2. Mutagenicity of 4,4'-sulfonyldiphenol 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 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	109 142 126 (126 ± 16.5)	12 14 18 (15 ± 3.1)	10 13 13 (12 ± 1.7)	16 15 16 (16 ± 0.6)	8 17 11 (12 ± 4.6)	
	78.1	121 118 142 (127 ± 13.1)	10 10 15 (12 ± 2.9)	ND	12 13 19 (15 ± 3.8)	4 9 3 (5 ± 3.2)	
	156	150 138 95 (128 ± 28.9)	7 6 8 (7 ± 1.0)	18 11 15 (15 ± 3.5)	13 15 10 (13 ± 2.5)	6 4 5 (5 ± 1.0)	
	313	111 108 122 (114 ± 7.4)	7 10 8 (8 ± 1.5)	9 21 12 (14 ± 6.2)	13 13 12 (13 ± 0.6)	8 3 4 (5 ± 2.6)	
	625	95 88 88 (90 ± 4.0)	4 4 4 (4 ± 0.0)	18 9 9 (12 ± 5.2)	7 9 8 (8 ± 1.0)	2 3 4 (3 ± 1.0)	
	1250	35 22 26 (28 ± 6.7)	0 0 2 (1 ± 1.2)	6 15 10 (10 ± 4.5)	5 2 4 (4 ± 1.5)	0 1 1 (1 ± 0.6)	
	2500	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 5 1 (2 ± 2.6)	2 0 0 (1 ± 1.2)	0 0 0 (0 ± 0.0)	
	5000	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
S9 mix (+)	0	126 179 150 (152 ± 26.5)	10 17 12 (13 ± 3.6)	23 20 25 (23 ± 2.5)	38 35 26 (33 ± 6.2)	8 18 19 (15 ± 6.1)	
	78.1	160 147 161 (156 ± 7.8)	8 9 6 (8 ± 1.5)	ND	20 22 41 (28 ± 11.6)	5 10 8 (8 ± 2.5)	
	156	149 146 171 (155 ± 13.7)	11 9 10 (10 ± 1.0)	11 14 20 (15 ± 4.6)	29 20 32 (27 ± 6.2)	12 7 7 (9 ± 2.9)	
	313	129 179 150 (153 ± 25.1)	10 11 10 (10 ± 0.6)	15 24 20 (20 ± 4.5)	29 38 30 (32 ± 4.9)	6 7 9 (7 ± 1.5)	
	625	78 138 132 (116 ± 33.0)	9 9 3 (7 ± 3.5)	20 8 18 (15 ± 6.4)	28 23 23 (25 ± 2.9)	8 7 8 (8 ± 0.6)	
	1250	47 48 35 (43 ± 7.2)	0 0 0 (0 ± 0.0)	13 12 8 (11 ± 2.6)	12 13 9 (11 ± 2.1)	4 8 4 (5 ± 2.3)	
	2500	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)	5 2 5 (4 ± 1.7)	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)	
	5000	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	541 563 551 (552 ± 11.0)	620 614 575 (603 ± 24.4)	182 157 170 (170 ± 12.5)	539 538 604 (560 ± 37.8)	398 314 588 (433 ± 140.4)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	1327 1123 1120 (1190 ± 118.7)	389 399 423 (404 ± 17.5)	724 663 690 (692 ± 30.6)	508 425 485 (473 ± 42.9)	313 361 329 (334 ± 24.4)	

Purity was 99.80wt% and 0.15wt% 2,4'-dihydroxydiphenylsulfone was contained as impurity .

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

ND : Not done

Table 3. Mutagenicity of 4,4'-sulfonyldiphenol on bacteria (II)

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 *uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	125 146 125 (132 ± 12.1)	12 10 13 (12 ± 1.5)	30 25 23 (26 ± 3.6)	14 14 21 (16 ± 4.0)	4 4 8 (5 ± 2.3)
	78.1	152 140 127 (140 ± 12.5)	11 9 12 (11 ± 1.5)	ND	22 22 19 (21 ± 1.7)	2 6 7 (5 ± 2.6)
	156	127 113 121 (120 ± 7.0)	8 10 12 (10 ± 2.0)	22 28 26 (25 ± 3.1)	12 18 12 (14 ± 3.5)	3 10 3 (5 ± 4.0)
	313	106 117 129 (117 ± 11.5)	11 8 14 (11 ± 3.0)	19 17 16 (17 ± 1.5)	12 14 7 (11 ± 3.6)	8 2 3 (4 ± 3.2)
	625	102 92 97 (97 ± 5.0)	4 4 3 (4 ± 0.6)	21 16 18 (18 ± 2.5)	11 15 13 (13 ± 2.0)	4 7 1 (4 ± 3.0)
	1250	14 9 11 (11 ± 2.5)	0 0 2 (1 ± 1.2)	18 17 14 (16 ± 2.1)	6 8 7 (7 ± 1.0)	0 1 0 (0 ± 0.6)
	2500	1 0 0 (0 ± 0.6)	0 0 0 (0 ± 0.0)	9 9 14 (11 ± 2.9)	1 0 0 (0 ± 0.6)	0 0 0 (0 ± 0.0)
	5000	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
S9 mix (+)	0	167 165 167 (166 ± 1.2)	16 10 14 (13 ± 3.1)	23 26 32 (27 ± 4.6)	43 33 30 (35 ± 6.8)	15 17 15 (16 ± 1.2)
	78.1	151 166 147 (155 ± 10.0)	10 14 16 (13 ± 3.1)	ND	35 20 21 (25 ± 8.4)	10 11 14 (12 ± 2.1)
	156	145 139 162 (149 ± 11.9)	9 11 11 (10 ± 1.2)	22 27 35 (28 ± 6.6)	31 26 28 (28 ± 2.5)	17 9 17 (14 ± 4.6)
	313	149 166 154 (156 ± 8.7)	9 13 7 (10 ± 3.1)	28 20 20 (23 ± 4.6)	29 34 25 (29 ± 4.5)	11 10 10 (10 ± 0.6)
	625	169 141 136 (149 ± 17.8)	15 11 10 (12 ± 2.6)	23 20 19 (21 ± 2.1)	16 17 16 (16 ± 0.6)	12 5 12 (10 ± 4.0)
	1250	32 52 52 (45 ± 11.5)	2 0 0 (1 ± 1.2)	16 18 14 (16 ± 2.0)	13 6 9 (9 ± 3.5)	7 11 7 (8 ± 2.3)
	2500	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)	6 6 7 (6 ± 0.6)	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)
	5000	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 0 0 (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies / plate	492 525 468 (495 ± 28.6)	597 629 644 (623 ± 24.0)	203 188 174 (188 ± 14.5)	542 574 511 (542 ± 31.5)	631 730 745 (702 ± 61.9)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	930 932 968 (943 ± 21.4)	365 398 508 (424 ± 74.9)	615 580 704 (633 ± 63.9)	466 401 366 (411 ± 50.7)	349 348 502 (400 ± 88.6)

Purity was 99.80wt% and 0.15wt% 2,4'-dihydroxydiphenylsulfone was contained as impurity .

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

ND : Not done