

## 最終報告書

ジフェニルジスルフィドの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号：B021301)

2004年9月3日

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 目次

要約	5
材料および方法	7
1. 試験物質	7
2. テスト菌株	8
3. 培地	9
4. S9 mix	10
5. 試験方法	11
結果	14
考察および結論	15
参考文献	16
表 1 試験結果表 (予備試験)	18
表 2-1 試験結果表 (本試験 1)	19
表 2-2 試験結果表 (本試験 1)	20
表 3-1 試験結果表 (本試験 2)	21
表 3-2 試験結果表 (本試験 2)	22
図 1-1 用量-反応曲線 (本試験 1 ; -S9 mix)	23
図 1-2 用量-反応曲線 (本試験 1 ; +S9 mix)	23
図 1-3 用量-反応曲線 (本試験 1 ; -S9 mix)	24
図 1-4 用量-反応曲線 (本試験 1 ; +S9 mix)	24
図 2-1 用量-反応曲線 (本試験 2 ; -S9 mix)	25
図 2-2 用量-反応曲線 (本試験 2 ; +S9 mix)	25
図 2-3 用量-反応曲線 (本試験 2 ; -S9 mix)	26
図 2-4 用量-反応曲線 (本試験 2 ; +S9 mix)	26

## 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験でジフェニルジスルフィドの変異原性を調べた。試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した。

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88 および 1.22  $\mu\text{g}$ /プレート の 7 用量で実施した結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。

また, S9 mix 非存在下においては, TA100 および TA1535 の 4.88  $\mu\text{g}$ /プレート以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上, TA98 および TA1537 の 19.5  $\mu\text{g}$ /プレート以上で, S9 mix 存在下においては, TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 5000  $\mu\text{g}$ /プレートで菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix 非存在下および存在下の 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上でプレート上に沈殿物が認められた。

これらの結果をもとに本試験では, S9 mix 非存在下の TA100 および TA1535 については 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305, 0.153  $\mu\text{g}$ /プレートの 7 用量, WP2*uvrA*/pKM101 については 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1  $\mu\text{g}$ /プレートの 7 用量, TA98 および TA1537 については 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305  $\mu\text{g}$ /プレートの 7 用量を, S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 については 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22  $\mu\text{g}$ /プレートの 7 用量, WP2*uvrA*/pKM101 については 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1  $\mu\text{g}$ /プレートの 7 用量, TA98 および TA1537 については 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44  $\mu\text{g}$ /プレートの 7 用量をそれぞれ設定した。

2 回の本試験の結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。また, S9 mix 非存在下においては, TA100 および TA1535 の 4.88  $\mu\text{g}$ /プレート以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 625  $\mu\text{g}$ /プレート以上, TA98 および TA1537 の 9.77  $\mu\text{g}$ /プレート以上で, S9 mix 存在下においては, TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上で菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix 非存在下および存在下の 625  $\mu\text{g}$ /プレート以上でプレート上に沈殿物が認められた。

本試験の陰性 (溶媒) 対照値および陽性対照値が適正範囲の範囲内であったこと, また S9 mix 非存在下および存在下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数が,

各菌株の陰性（溶媒）対照の復帰変異コロニー数と比較して2倍を超えて増加し陽性の結果を示したことから、試験が適切に実施されたことが確認された。

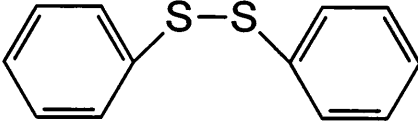
以上の結果から、ジフェニルジスルフィドは細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を有さない（陰性）と結論した。

## 材料および方法

### 1. 試験物質

#### 1.1 被験物質

から購入したジフェニルジスルフィドを冷蔵、暗所に気密保存し、使用した。試験期間中における原体の安定性は、実験開始前および実験終了後に当研究所において IR を測定して確認した。被験物質の純度、組成および物理化学的性質等は以下の通りである。

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	ジフェニルジスルフィド		
別 名	—		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
試験に供した新規化学物質の純度	99.8%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	
不純物の名称及び濃度	—		
CAS 番号	882-33-7	蒸 気 圧	—
分 子 量	218.33	分配係数	—
融 点	58 - 60 °C	常温における性状	白色粉体
沸 点	—		
安 定 性	—		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	50 mg/mL で不溶 <sup>*1</sup>	—
	DMSO	220 mg/mL で溶解 <sup>*1</sup>	安定 <sup>*2</sup>
	アセトン	27.5 mg/mL で不溶 <sup>*1</sup>	—
	生食	22 mg/mL で不溶 <sup>*1</sup>	—
	キシレン	30 mg/mL で溶解	—

DMSO : ジメチルスルホキシド, 生食 : 生理食塩液

\*1 : 当研究所での溶媒検討の結果による。

\*2 : 被験物質調製液の調製時に、発熱、発泡、変色は認められなかった。

## 1.2 対照物質

陰性（溶媒）対照物質および陽性対照物質として以下のものを用いた。これらの陽性対照物質は、細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され、OECD ガイドラインにおいても例示されている。

陰性対照	略称	入手先	ロット番号	含量（純度）
ジメチルスルホキシド	DMSO	関東化学㈱	404F1251	99.7%以上
陽性対照	略称	入手先	ロット番号	含量（純度）
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	AF-2	和光純薬工業㈱	SEL1402	99.0%
アジ化ナトリウム	NaN <sub>3</sub>	和光純薬工業㈱	TCK7533	99.2%
9-アミノアクリジン塩酸塩	9-AA	Sigma-Aldrich Fine Chemicals	080K1684	98%
2-アミノアントラセン	2-AA	和光純薬工業㈱	TCM6741	93.3%

2. テスト菌株<sup>1,2</sup>

## 2.1 テスト菌株

より 1983 年 5 月 27 日に入手したネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98, TA1537 および日本バイオアッセイ研究センターより 1997 年 9 月 18 日に入手した大腸菌株 WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いた。

## 2.2 テスト菌株の選択理由

これらの菌株は、細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され、OECD ガイドラインおよび化審法ガイドラインにおいても推奨されている。

これら菌株の遺伝的特性は以下の通りである。

菌株	変異遺伝子	付帯突然変異			検出可能な突然変異型
		DNA 修復	膜変異	薬剤耐性	
TA100	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	塩基対置換
TA1535	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	塩基対置換
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	wild type	pKM101	塩基対置換
TA98	<i>hisD</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	フレームシフト
TA1537	<i>hisC</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	フレームシフト

## 2.3 特性検査

各テスト菌株のアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特性について事前に調べ、これらの特性を備えた菌株を用いた。

## 2.4 保存方法

液体培地中に 37°C で 8 時間振盪培養した各菌懸濁液 24 mL に対し、2.1 mL の割合で DMSO (関東化学㈱, ロット番号 404F1251) を加えた。これを 200  $\mu$ L ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した。このようにして凍結した菌懸濁液は超低温冷凍庫 (日本フリーザー㈱, CL-322, 実測値: -79°C – -85°C) で保存した。

## 2.5 菌懸濁液

凍結保存された各テスト菌株を用時融解し、20  $\mu$ L を液体完全培地 10 mL に接種した。前培養開始まで 10°C に冷却し、その後 37°C で 8 時間振盪 (振盪回数: 90 回/分) 培養した。培養容器には L 字管 (容量 22 mL) を用いた。菌懸濁液は用時調製し、使用時まで室温で保存した。培養終了後、濁度計 (コロナ電気㈱, UT-11) を用いて菌懸濁液の濁度を測定した。濁度からの換算により生菌数を算出し、適切な菌濃度 ( $1 \times 10^9$  /mL 以上) であることを確認した後、試験に使用した。

各試験菌株の生菌数は以下の通りである。

菌株名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	予備試験	2.46	1.98	6.11	3.37	1.97
	本試験 1	2.60	2.08	6.11	3.29	1.94
	本試験 2	2.55	2.08	6.36	3.43	2.00

## 3. 培地

### 3.1 液体完全培地

精製水 300 mL に Oxoid Nutrient Broth No.2 (Oxoid 社, ロット番号 261002) を 7.5 g 加えて溶解した。これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌し、冷所で保存した。

### 3.2 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 {オリエンタル酵母工業㈱, 2002 年 11 月 28 日製造; ロット番号 ANI810KR [使用寒天; 伊那寒天 (BA-30A), 伊那食品工業㈱製造, ロット番号 20809 ]} を使用した。

### 3.3 トップアガー

精製水 300 mL に Bacto-agar (Difco 社, ロット番号 136958JC, 1.8 g) および塩化ナトリウム (関東化学㈱, ロット番号 111G1647, 1.5 g) を加えた. これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌して寒天溶液を調製し, 室温で保存した. この寒天を使用時に電子レンジで溶解して使用した. ネズミチフス菌用には 0.5 mmol/L D-ビオチン (和光純薬工業㈱, ロット番号 DWG7068) および 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (和光純薬工業㈱, ロット番号 TCN4471) の混合水溶液を, 大腸菌用には 0.5 mmol/L L-トリプトファン (和光純薬工業㈱, ロット番号 TCJ2266) 水溶液をそれぞれ使用直前に 1/10 量添加した. このトップアガーは使用時に約 45°C に保温した.

## 4. S9 mix

### 4.1 S9

調製 S9 (キッコーマン㈱, ロット番号 RAA-476, 2003 年 1 月 17 日製造) を使用した. この S9 はフェノバルビタール (PB : 24 時間毎に 4 回, それぞれ用量 30, 60, 60 および 60 mg/kg を腹腔内投与) と 5,6-ベンゾフラボン (フェノバルビタール投与の 3 日目に, 用量 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与) で酵素誘導した 7 週齢の SD 系雄ラット (体重 214–245 g) 肝由来である. S9 は超低温冷凍庫 (日本フリーザー㈱, CL-322, 実測値 : -79°C – -85°C) に保存した.

### 4.2 Cofactor mix

Cofactor-I (オリエンタル酵母工業㈱, ロット番号 999301, 999302) を所定濃度で滅菌精製水に溶解し, これをメンブレンフィルター (孔径 : 0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過して Cofactor mix とした. Cofactor mix は用時調製した.



### 4.3 S9 mix

Cofactor mix 9 mL に対して, S9 を 1 mL の割合で加え S9 mix とした. S9 mix 1 mL あたりの組成を以下の表に示す. S9 mix は用時調製し, 使用時まで氷中に保存した.

S9 (タンパク含量 : 27.11 mg/mL)	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol

## 5. 試験方法<sup>3</sup>

### 5.1 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

溶媒検討の結果, 被験物質は 50 mg/mL で注射用水 (DW と略す) に不溶, DMSO に溶解した. また, DMSO を添加した際に発熱, 発泡, 変色は認められなかった. この結果から, 溶媒には DMSO を用いた.

被験物質を秤量して DMSO を加え, タッチミキサー攪拌によりに溶解させて, 最高用量の被験物質溶液とした. これを同じ溶媒で段階希釈して各用量の被験物質溶液を調製した. 被験物質溶液は用時調製し, 被験物質の秤量, 希釈, 分注および調製後の保存は室温, 黄色灯下で行った.

被験物質溶液の使用までの保存時間と温度 : 予備試験 10 分 (室温)

本試験 1 15 分 (室温)

本試験 2 15 分 (室温)

陽性対照物質溶液はあらかじめ調製し, 超低温冷凍庫 (日本フリーザー(株), CL-322, 実測値: -72°C – -85°C) に保存した.  $\text{NaN}_3$  は DW (株)大塚製薬工場, ロット番号 K2D74) に, その他の陽性対照物質は DMSO (関東化学(株), ロット番号 404F1251) に溶解した.

## 5.2 被験物質用量および陽性対照物質用量

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88 および 1.22  $\mu\text{g}$ /プレートの 7 用量で実施した結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった. また, S9 mix 非存在下においては, TA100 および TA1535 の 4.88  $\mu\text{g}$ /プレート以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上, TA98 および TA1537 の 19.5  $\mu\text{g}$ /プレート以上で, S9 mix 存在下においては, TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 5000  $\mu\text{g}$ /プレートで菌の生育阻害が認められた. なお, S9 mix 非存在下および存在下の 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上でプレート上に沈殿物が認められた.

従って本試験の用量は, 以下の用量を設定した.

試験菌株	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
TA100, TA1535	9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305, 0.153	78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1	5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1
TA98, TA1537	19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305	156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44

陽性対照物質の用量は以下の通りとした. これらの用量はいずれも, それぞれの菌株に対して陽性を示すことが知られている.

菌株	S9 mix 非存在下 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 mix 存在下 ( $\mu\text{g}$ /プレート)
TA100	AF-2 0.01	2-AA 1
TA1535	NaN <sub>3</sub> 0.5	2-AA 2
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	AF-2 0.005	2-AA 2
TA98	AF-2 0.1	2-AA 0.5
TA1537	9-AA 80	2-AA 2

### 5.3 復帰突然変異試験

試験はプレインキュベーション法を用いて、S9 mix 非存在下および存在下で実施した。

各用量につき、滅菌した試験管に被験物質溶液、陰性（溶媒）対照物質または陽性対照物質を 0.1 mL、S9 mix 非存在下の場合、次いで 0.1 mol/L ナトリウムリン酸緩衝液 [pH 7.4 ; (リン酸二水素ナトリウム二水和物：和光純薬工業㈱，ロット番号 PAP2741，リン酸水素二ナトリウム無水塩：和光純薬工業，ロット番号 KSK5425) ] を 0.5 mL、S9 mix 存在下の場合、S9 mix を 0.5 mL 添加し、さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加え、37°C で 20 分間振盪してインキュベーションした。プレインキュベーション後、この混合液にトップアガーを 2 mL 加え、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37°C で 48 時間培養した。

実体顕微鏡で菌叢を観察し、被験物質による生育阻害の程度を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンター（システムサイエンス㈱，CA-11，補正の方法：面積および数え落とし補正）または目視で計測した。計測したコロニー数は実数で表示し、平均値は小数点以下を四捨五入して表示した。予備試験は各用量につき 1 枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき 3 枚のプレートを使用し、2 回実施した。

### 5.4 無菌試験

無菌試験は最高用量の被験物質溶液および S9 mix それぞれにつき 1 枚のプレートを使用し、予備試験および本試験の各試験毎に実施した。最高用量の被験物質溶液 0.1 mL または S9 mix 0.5 mL にトップアガー 2 mL を加えて混和し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37°C で 48 時間培養し、雑菌の混入について目視で確認した。

### 5.5 試験結果の判定

陰性（溶媒）対照，陽性対照および被験物質用量毎に，計測したコロニー数の平均値および標準偏差を算出した。いずれかの試験菌株で，S9 mix の有無にかかわらず，被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数（平均値）が陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上に増加し，さらにその増加に再現性が認められる場合に，当該被験物質は変異原性を有する（陽性）と判定した。その他の場合は陰性と判定した。試験結果の再現性は 2 回の本試験で確認した。試験結果には統計学的検定を実施しなかった。

## 結果

試験の結果を表 1~3 および図 1, 2 に示す。

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88 および 1.22  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量で実施した結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。

また, S9 mix 非存在下においては, TA100 および TA1535 の 4.88  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上, TA98 および TA1537 の 19.5  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で, S9 mix 存在下においては, TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 78.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix 非存在下および存在下の 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上でプレート上に沈殿物が認められた。

これらの結果をもとに本試験では, S9 mix 非存在下の TA100 および TA1535 については 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305, 0.153  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量, WP2*uvrA*/pKM101 については 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量, TA98 および TA1537 については 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量を, S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 については 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量, WP2*uvrA*/pKM101 については 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量, TA98 および TA1537 については 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量をそれぞれ設定した。

2 回の本試験の結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。また, S9 mix 非存在下においては, TA100 および TA1535 の 4.88  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上, TA98 および TA1537 の 9.77  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で, S9 mix 存在下においては, TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 78.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上, WP2*uvrA*/pKM101 の 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix 非存在下および存在下の 625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上でプレート上に沈殿物が認められた。

最高用量の被験物質溶液および S9 mix について行った無菌試験の結果, 試験に影響を及ぼすような菌, カビの混入は認められなかった。

## 考察および結論

予備試験の結果を基に本試験を実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍未満であった。

試験施設における背景データおよび背景データより算出した適正範囲を添付資料1に示した。本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値が適正範囲の範囲内であったこと、またS9 mix非存在下および存在下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数が、各菌株の陰性（溶媒）対照の復帰変異コロニー数と比較して2倍を超えて増加し陽性の結果を示したことから、試験が適切に実施されたことが確認された。

以上の結果から、ジフェニルジスルフィドは細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を有さない（陰性）と結論した。

なお、同一物質あるいは類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料2にまとめた。

## 参考文献

1. Maron, D. M. and Ames, B. N., Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 1983, 113, 173-215.
2. Green, M. H. L. and Muriel, W. J., Mutagen testing using *Trp*<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 1976, 38, 3-32.
3. 労働省安全衛生部化学物質調査課編（1991）：安衛法における変異原性試験，中央労働災害防止協会，東京

表1 試験結果表 (予備試験)

被験物質の名称 : ジフェニルジスルフィド

試験実施期間		2003年 4月 1日 より 2003年 4月 4日					
代謝活性化系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	104	15	66	13	8	
	1.22	103	11	66	11	10	
	4.88	93*	13*	52	10	6	
	19.5	0*	0*	65	0*	0*	
	78.1	0*	0*	69	0*	0*	
	313	0*	0*	52	0*	0*	
	1250†	0*	0*	43*	0*	0*	
	5000†	0*	0*	27*	0*	0*	
S9 mix (+)	陰性対照	106	9	81	25	11	
	1.22	105	8	65	28	17	
	4.88	110	10	76	24	16	
	19.5	108	8	82	19	15	
	78.1	88*	9*	84	20*	17*	
	313	0*	0*	72	0*	0*	
	1250†	0*	0*	58	0*	0*	
	5000†	0*	0*	41*	0*	0*	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>6</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	801	447	620	654	333
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	1481	183	1106	506	345

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。

†: 沈殿物が認められた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>6</sub> : 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

表 2-1 試験結果表 (本試験 1)

被験物質の名称 : ジフェニルジスルフィド

試験実施期間		2003年 4月 8日 より 2003年 4月 11日				
代謝活性 化系の 有無	被験物質 用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数(コロニ-数/プレート)				
		塩基対置換型		フレームシフト型		
		TA100	TA1535	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	陰性対照	105 99 ( $\pm 3$ )	10 9 ( $\pm 10$ )		14 24 ( $\pm 18$ )	11 16 ( $\pm 13$ )
	0. 1 5 3	118 111 ( $\pm 110$ )	9 8 ( $\pm 2$ )			
	0. 3 0 5	110 101 ( $\pm 107$ )	10 15 ( $\pm 12$ )		14 12 ( $\pm 14$ )	16 12 ( $\pm 13$ )
	0. 6 1 0	100 99 ( $\pm 101$ )	9 8 ( $\pm 9$ )		20 22 ( $\pm 21$ )	11 14 ( $\pm 12$ )
	1. 2 2	106 103 ( $\pm 108$ )	10 14 ( $\pm 11$ )		17 19 ( $\pm 18$ )	12 16 ( $\pm 13$ )
	2. 4 4	108 105 ( $\pm 104$ )	15 11 ( $\pm 12$ )		12 23 ( $\pm 15$ )	11 14 ( $\pm 13$ )
	4. 8 8	75* 87* ( $\pm 82$ )	8* 11* ( $\pm 10$ )		21 20 ( $\pm 21$ )	15 18 ( $\pm 16$ )
	9. 7 7	0* 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* ( $\pm 0$ )		11* 13* ( $\pm 13$ )	8* 10* ( $\pm 8$ )
	1 9. 5				0* 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* ( $\pm 0$ )
S 9 mix (+)	陰性対照	128 114 ( $\pm 119$ )	14 11 ( $\pm 12$ )		24 21 ( $\pm 23$ )	14 18 ( $\pm 16$ )
	1. 2 2	120 120 ( $\pm 115$ )	15 10 ( $\pm 12$ )			
	2. 4 4	127 123 ( $\pm 119$ )	10 12 ( $\pm 11$ )		17 23 ( $\pm 20$ )	23 24 ( $\pm 21$ )
	4. 8 8	130 101 ( $\pm 115$ )	15 13 ( $\pm 14$ )		27 22 ( $\pm 25$ )	20 13 ( $\pm 17$ )
	9. 7 7	103 107 ( $\pm 107$ )	15 13 ( $\pm 14$ )		28 33 ( $\pm 29$ )	19 24 ( $\pm 21$ )
	1 9. 5	117 120 ( $\pm 114$ )	14 16 ( $\pm 15$ )		19 25 ( $\pm 22$ )	23 22 ( $\pm 22$ )
	3 9. 1	103 107 ( $\pm 105$ )	9 10 ( $\pm 11$ )		15 23 ( $\pm 18$ )	18 20 ( $\pm 20$ )
	7 8. 1	86* 72* ( $\pm 79$ )	7* 8* ( $\pm 8$ )		29* 23* ( $\pm 26$ )	13* 18* ( $\pm 16$ )
	1 5 6				22* 16* ( $\pm 17$ )	9* 6* ( $\pm 7$ )
陽 性 対 照	S9 mix を必要 としな いもの	名 称 AF-2 用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) コロニ-数 / プレート	NaNo 0.5 453 451 ( $\pm 451$ ) 448 ( $\pm 3$ )		AF-2 0.1 708 628 ( $\pm 646$ ) 602 ( $\pm 55$ )	9-AA 80 438 479 ( $\pm 458$ ) 458 ( $\pm 20$ )
	S9 mix を必要 とする もの	名 称 2-AA 用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) コロニ-数 / プレート	2-AA 2 184 194 ( $\pm 191$ ) 196 ( $\pm 6$ )		2-AA 0.5 500 500 ( $\pm 504$ ) 513 ( $\pm 8$ )	2-AA 2 255 243 ( $\pm 253$ ) 261 ( $\pm 9$ )

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)  
( $\pm$ 標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaNo : ナジ化ナトリウム

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



表 2-2 試験結果表 (本試験 1)

被験物質の名称 : ジフェニルジスルフィド

試験実施期間		2003年 4月 8日 より 2003年 4月 11日		
代謝活性化系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数(コロニ-数/プレート)		
		塩基対置換型	フレームシフト型	WPZor4/pKM101
S9 mix (-)	陰性対照			71 86 (75) 68 ( $\pm 10$ )
	39.1			80 74 (73) 65 ( $\pm 8$ )
	78.1			75 72 (76) 82 ( $\pm 5$ )
	156			76 74 (77) 80 ( $\pm 3$ )
	313			86 69 (79) 83 ( $\pm 9$ )
	625†			60* 63* (62) 63* ( $\pm 2$ )
	1250†			61* 56* (60) 64* ( $\pm 4$ )
	2500†			55* 61* (58) 58* ( $\pm 3$ )
S9 mix (+)	陰性対照			87 94 (93) 99 ( $\pm 6$ )
	78.1			104 86 (95) 96 ( $\pm 9$ )
	156			98 88 (91) 88 ( $\pm 6$ )
	313			95 85 (88) 83 ( $\pm 6$ )
	625†			80 77 (79) 81 ( $\pm 2$ )
	1250†			86 81 (85) 87 ( $\pm 3$ )
	2500†			57* 57* (62) 73* ( $\pm 9$ )
	5000†			61* 54* (62) 71* ( $\pm 9$ )
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称		AF-2
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )		0.005
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称		2-AA
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )		2
		コロニ-数 / プレート		751 780 (755) 733 ( $\pm 24$ )
		コロニ-数 / プレート		1372 1238 (1298) 1284 ( $\pm 68$ )

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。

†: 沈殿物が認められた。

(平均値)

(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, 2-AA : 2-アミノアントラセン

表 3-1 試験結果表 (本試験 2)

被験物質の名称 : ジフェニルジスルフィド

試験実施期間		2003年 4月 21日 より 2003年 4月 24日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数(コロニ-数/プレート)				フレームシフト型
		塩基対置換型		フレームシフト型		
		TA100	TA1535	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	陰性対照	104 103 22 ( $\pm 11$ )	7 11 13 ( $\pm 10$ )		13 16 17 ( $\pm 15$ )	12 13 11 ( $\pm 12$ )
	0.153	100 106 103 ( $\pm 103$ )	11 14 10 ( $\pm 12$ )			
	0.305	100 102 102 ( $\pm 101$ )	15 16 12 ( $\pm 14$ )		14 21 17 ( $\pm 17$ )	12 15 11 ( $\pm 13$ )
	0.610	120 101 101 ( $\pm 107$ )	14 12 11 ( $\pm 12$ )		20 19 17 ( $\pm 19$ )	12 10 14 ( $\pm 12$ )
	1.22	108 101 102 ( $\pm 104$ )	9 14 12 ( $\pm 12$ )		17 14 18 ( $\pm 16$ )	10 12 15 ( $\pm 13$ )
	2.44	110 106 100 ( $\pm 105$ )	11 12 11 ( $\pm 11$ )		17 19 20 ( $\pm 19$ )	14 13 10 ( $\pm 12$ )
	4.88	70* 85* 94* ( $\pm 83$ )	10* 9* 8* ( $\pm 9$ )		16 17 20 ( $\pm 18$ )	10 10 12 ( $\pm 11$ )
	9.77	0* 0* 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* 0* ( $\pm 0$ )		11* 12* 12* ( $\pm 12$ )	6* 10* 6* ( $\pm 7$ )
	19.5				0* 0* 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* 0* ( $\pm 0$ )
	S 9 mix (+)	陰性対照	108 104 109 ( $\pm 107$ )	16 17 17 ( $\pm 17$ )		25 28 30 ( $\pm 28$ )
1.22		123 113 113 ( $\pm 114$ )	18 18 14 ( $\pm 17$ )			
2.44		119 119 109 ( $\pm 116$ )	17 17 18 ( $\pm 17$ )		24 24 27 ( $\pm 25$ )	16 19 15 ( $\pm 17$ )
4.88		119 108 122 ( $\pm 116$ )	18 16 18 ( $\pm 17$ )		24 24 25 ( $\pm 24$ )	19 17 20 ( $\pm 19$ )
9.77		108 109 119 ( $\pm 112$ )	19 17 14 ( $\pm 17$ )		24 24 22 ( $\pm 25$ )	19 19 19 ( $\pm 19$ )
19.5		107 104 116 ( $\pm 109$ )	14 15 15 ( $\pm 15$ )		22 29 26 ( $\pm 26$ )	18 19 18 ( $\pm 18$ )
39.1		115 107 106 ( $\pm 109$ )	14 15 14 ( $\pm 14$ )		23 26 23 ( $\pm 24$ )	18 17 15 ( $\pm 17$ )
78.1		92* 66* 96* ( $\pm 85$ )	5* 10* 8* ( $\pm 8$ )		17* 16* 15* ( $\pm 16$ )	9* 10* 12* ( $\pm 10$ )
156					13* 15* 12* ( $\pm 13$ )	9* 7* 5* ( $\pm 7$ )
陽性対照		名称	AF-2	NaN <sub>6</sub>		AF-2
	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5		0.1	80
	コロニ-数 / プレート	608 632 755 ( $\pm 665$ )	553 464 511 ( $\pm 509$ )		577 600 562 ( $\pm 580$ )	466 441 419 ( $\pm 442$ )
	名称	2-AA	2-AA		2-AA	2-AA
	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1	2		0.5	2
	コロニ-数 / プレート	1326 1320 1388 ( $\pm 38$ )	222 210 226 ( $\pm 219$ )		367 431 453 ( $\pm 417$ )	237 222 207 ( $\pm 222$ )

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)  
( $\pm$ 標準偏差)AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>6</sub> : 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

表 3-2 試験結果表 (本試験 2)

被験物質の名称 : ジフェニルジスルフィド

試験実施期間		2003年 4月 21日 より 2003年 4月 24日			
代謝活性化系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数(コロニ-数/プレート)			
		塩基対置換型		フレームシフト型	
				WP2002A/pKMI01	
S 9 mix (-)	陰性対照			61 75 (± 68) 68 (± 7)	
	39.1			61 70 (± 67) 70 (± 5)	
	78.1			70 78 (± 74) 73 (± 4)	
	156			63 73 (± 67) 65 (± 5)	
	313			75 87 (± 83) 86 (± 7)	
	625†			73* 52* (± 65) 71* (± 12)	
	1250†			65* 63* (± 60) 53* (± 6)	
	2500†			52* 56* (± 51) 44* (± 6)	
S 9 mix (+)	陰性対照			85 86 (± 87) 90 (± 3)	
	78.1			93 84 (± 88) 87 (± 5)	
	156			90 88 (± 86) 79 (± 6)	
	313			82 85 (± 82) 78 (± 4)	
	625†			70 60 (± 65) 64 (± 5)	
	1250†			64 48 (± 59) 66 (± 10)	
	2500†			56* 50* (± 50) 45* (± 6)	
	5000†			56* 60* (± 61) 66* (± 5)	
陽性対照	S9 mixを必要としな いもの	名称		AF-2	
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )		0.005	
	S9 mixを必要とする もの	名称		2-AA	
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )		2	
		コロニ-数 / プレート		1222 986 (1105) 1107 (±118)	
		コロニ-数 / プレート		1528 1599 (1497) 1364 (±121)	

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。

†: 沈殿物が認められた。

(平均値)

(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, 2-AA: 2-アミノアントラセン

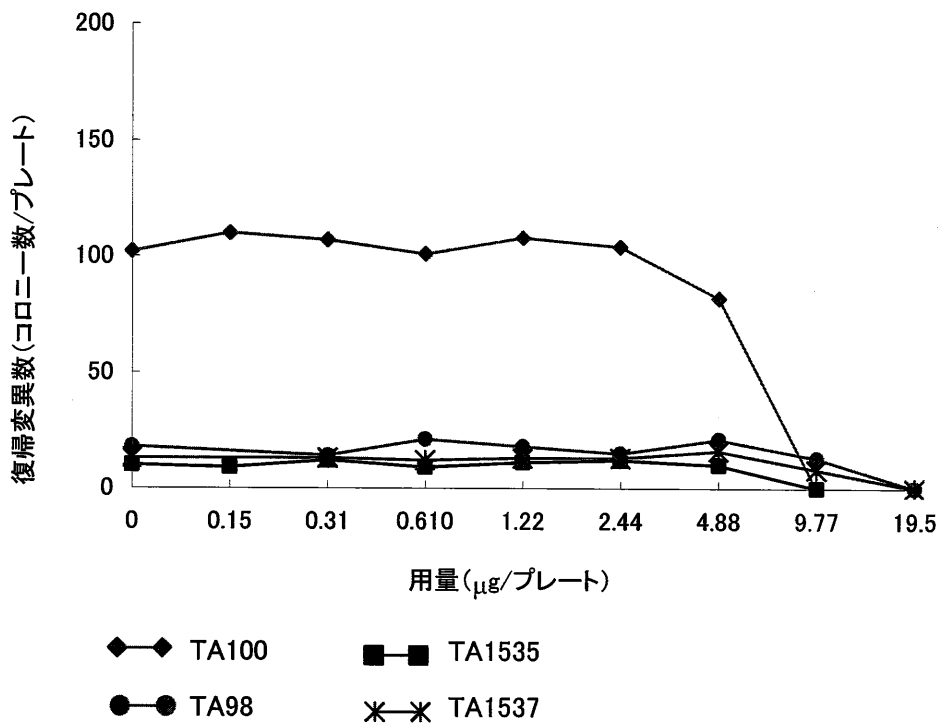


図 1-1 用量-反応曲線 (本試験 1;-S9 mix)

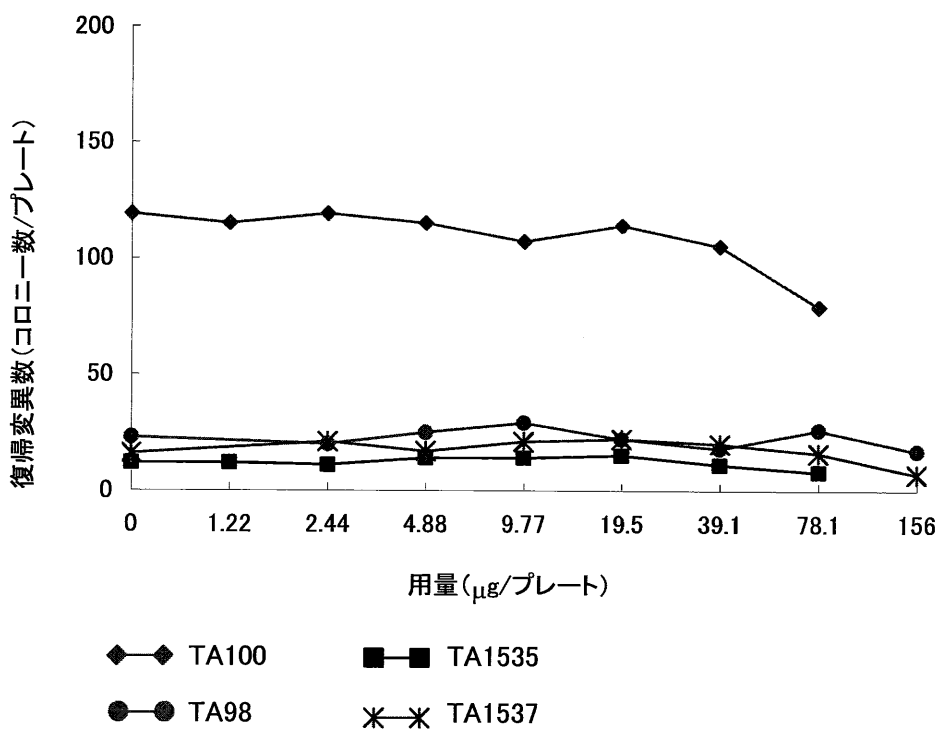


図 1-2 用量-反応曲線 (本試験 1;+S9 mix)

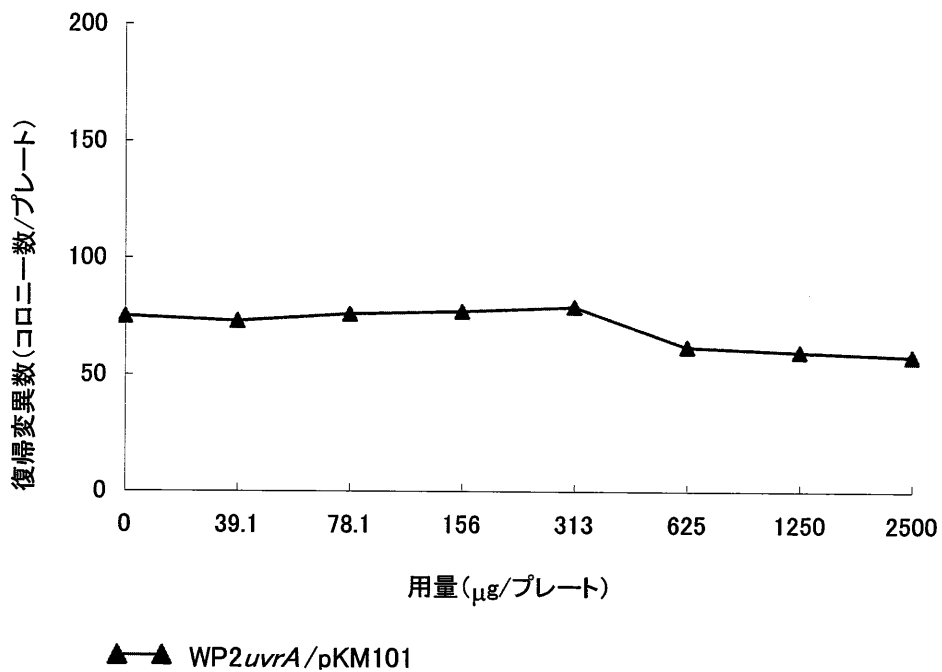


図 1-3 用量-反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

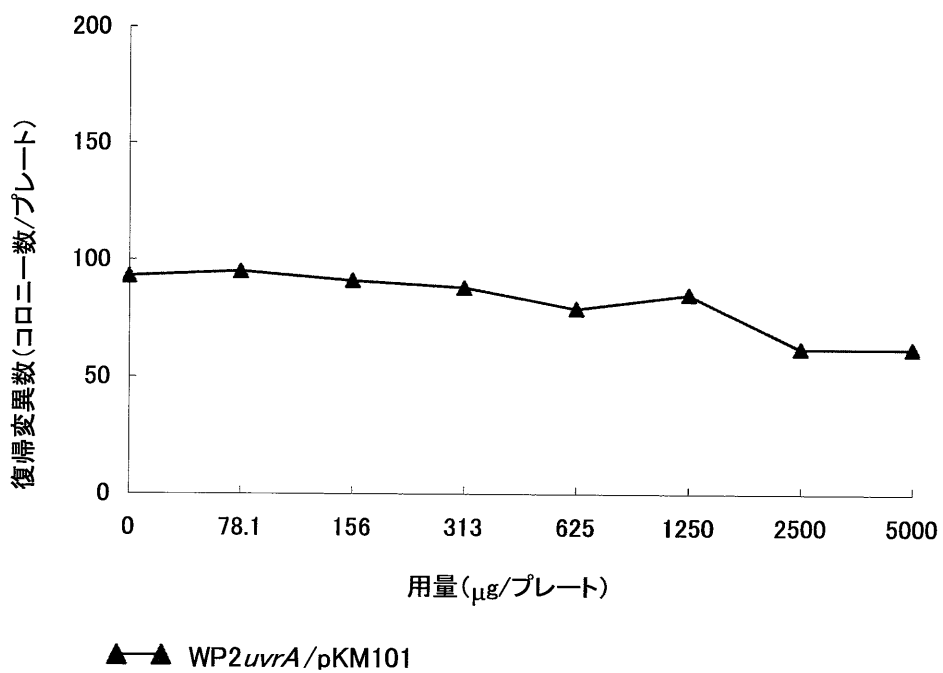


図 1-4 用量-反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)

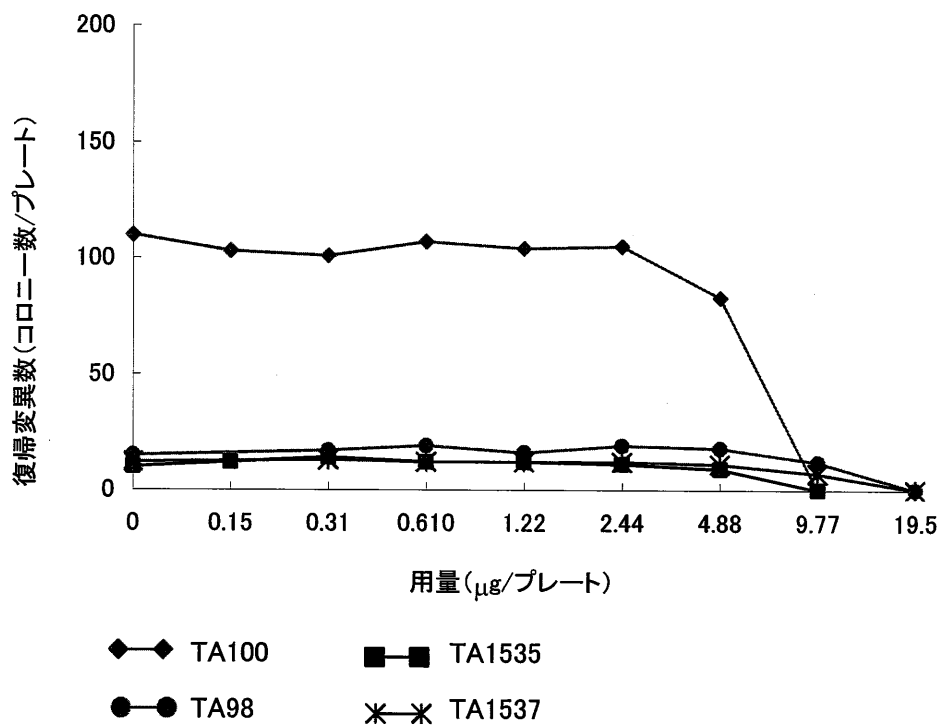


図 2-1 用量-反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

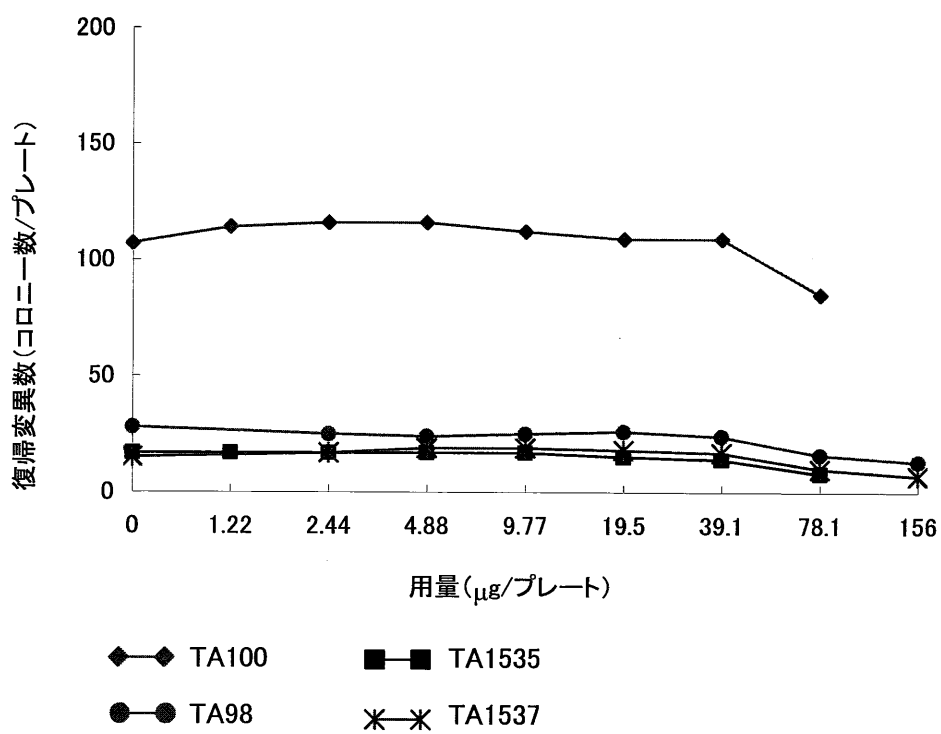


図 2-2 用量-反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)

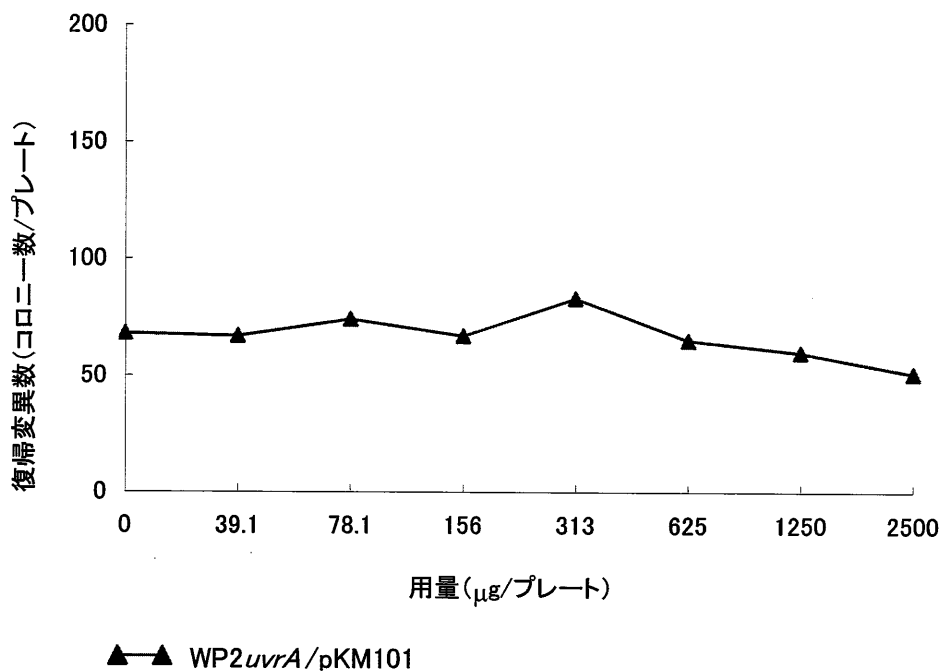


図 2-3 用量—反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

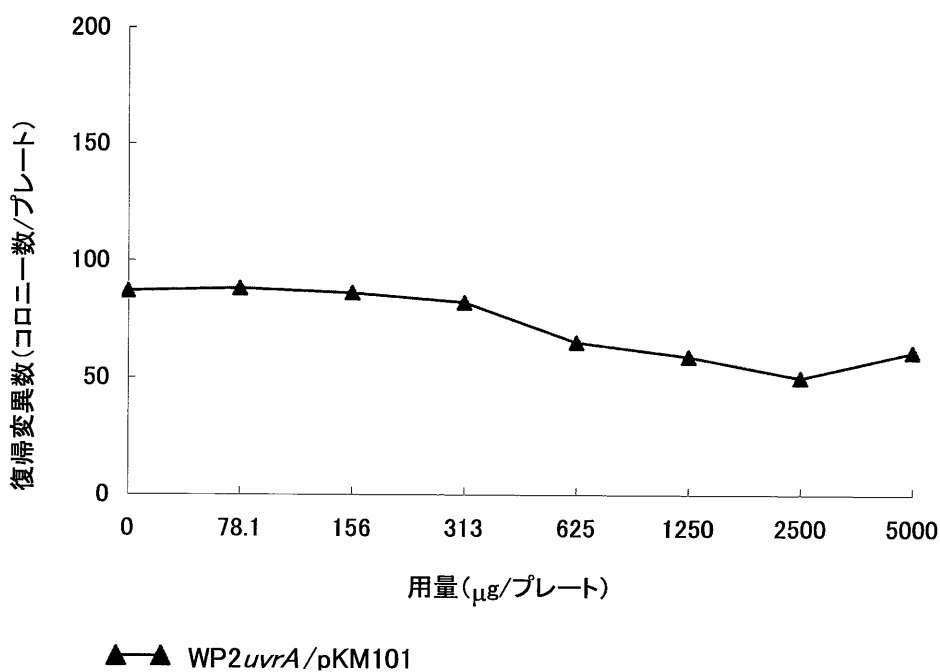


図 2-4 用量—反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)