

簡易生殖毒性試験

Table 1 Organ weight of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)		0	60	200	700
Number of males		12	12	12	11
Body weight (g)		504.2 ± 26.3	505.9 ± 25.7	505.8 ± 14.9	454.3 ± 22.2**
Testes (g)		3.118 ± 0.720	3.287 ± 0.182	3.225 ± 0.750	2.961 ± 0.808
	(g%)	0.619 ± 0.143	0.652 ± 0.054	0.640 ± 0.153	0.655 ± 0.187
Epididymides (g)		1.172 ± 0.226	1.230 ± 0.083	1.211 ± 0.222	1.087 ± 0.236
	(g%)	0.233 ± 0.048	0.243 ± 0.020	0.241 ± 0.045	0.241 ± 0.052

Each value shows mean±S.D.
Significantly different from control (**:p<0.01).

Table 2 Histopathological examination of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)	0						200						700					
	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+
Incidence & grade																		
Testis	[12]						[1]						[11]					
Atrophy, seminiferous tubule	10	2	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	9	2	0	1	0	1
Proliferation, Leydig's cell	11	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	10	1	0	1	0	0
Epididymis	[12]						[1]						[11]					
Decrease, sperm	11	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	10	1	0	0	0	1
Vacuolization, duct	11	1	0	1	0	0	1	0					10	1	0	1	0	0
Spermatic granuloma	12	0					1	0					10	1	0	1	0	0

Grade of histopathological finding; ±:slight, +:mild, 2+:moderate, 3+:marked.
N:No abnormality detected.
A:Abnormality detected.
[]:Number of males examined.

Table 3 Organ weight of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)		0	60	200	700
Number of dams		12	12	12	11
Body weight (g)		289.0 ± 21.3	290.3 ± 19.2	284.0 ± 15.0	268.3 ± 14.2*
Ovaries (mg)		94.79 ± 11.71	95.51 ± 11.57	98.39 ± 10.42	108.63 ± 17.99
	(mg%)	32.90 ± 4.36	33.04 ± 4.62	34.66 ± 3.33	40.45 ± 5.92**

Each value shows mean±S.D.
Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 4 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)	0	60	200	700
Number of females	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days)				
Mean±S.D.	3.3 ± 0.5	3.3 ± 0.5	3.2 ± 0.4	2.2 ± 0.9**
Number of males	12	12	12	11
Number of males with successful copulation	12	12	12	10
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	90.9
Number of females	12	12	12	12
Number of females with successful copulation	12	12	12	11
Copulation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	91.7
Number of conceiving days (Mean ± S.D.)	2.3 ± 1.2	2.2 ± 1.2	2.3 ± 1.4	3.5 ± 3.6
Number of pregnant females	11	12	10	10
Fertility index (%) ^{c)}	91.7	100.0	83.3	90.9
Number of pregnant females with live pups	11	12	10	10

a) : (Number of males with successful copulation/number of males) × 100.

b) : (Number of females with successful copulation/number of females) × 100.

c) : (Number of pregnant females/number of females with successful copulation) × 100.

Significantly different from control (**:p<0.01).

Table 5 Observation of pups (F₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)	0	60	200	700
Number of dams	11	12	10	10
Length of gestation (days)	22.18 ± 0.40	22.08 ± 0.29	22.00 ± 0.00	22.00 ± 0.00
Corpora lutea	16.4 ± 1.3	16.8 ± 1.4	17.7 ± 2.2	17.0 ± 3.3
Implantation scars	15.5 ± 1.2	15.7 ± 1.9	15.6 ± 1.8	15.8 ± 3.2
Implantation index (%) ^{a)}	94.5 ± 4.1	93.4 ± 7.1	88.4 ± 4.7	92.8 ± 6.3
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Pups born	15.2 ± 1.7	15.2 ± 1.7	14.3 ± 1.8	14.9 ± 3.4
Delivery index (%) ^{c)}	98.1 ± 4.5	96.9 ± 4.0	91.8 ± 4.1*	94.0 ± 6.7
Live pups born	14.9 ± 1.9	15.0 ± 1.9	14.1 ± 1.6	11.3 ± 4.7
Sex ratio at birth ^{d)}	0.98 ± 0.67	1.12 ± 0.55	1.73 ± 1.09	0.78 ± 0.33
Birth index (%) ^{e)}	96.3 ± 6.5	95.8 ± 4.8	90.5 ± 5.1*	71.6 ± 26.2**
Dead pups on day 0 of lactation	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	3.6 ± 4.4**
Live birth index (%) ^{f)}	98.1 ± 3.3	98.8 ± 2.8	98.7 ± 2.8	75.9 ± 26.2**
Live pups on day 4 of lactation	14.8 ± 1.8	15.0 ± 1.9	13.7 ± 1.3	4.0 ± 5.6** (9)
Viability index (%) ^{g)}	99.5 ± 1.8	100.0 ± 0.0	97.3 ± 3.5	29.2 ± 40.4** (9)
External anomalies (%) ^{h)}	0.7 ± 2.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Anury (%)	0.7 ± 2.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Body weight of pups (g)				
Male Day 0	6.64 ± 0.31	6.15 ± 0.42*	6.22 ± 0.38	5.44 ± 0.52**
Male Day 4	9.92 ± 0.75	9.63 ± 1.16	9.57 ± 1.03	6.63 ± 1.41** (4)
Female Day 0	6.20 ± 0.30	5.88 ± 0.33	5.85 ± 0.44	4.93 ± 0.46**
Female Day 4	9.25 ± 0.84	9.19 ± 0.96	9.18 ± 1.31	5.68 ± 1.37** (5)

Each value shows mean±S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

a) : (Number of implantation scars/number of corpora lutea) × 100.

b) : (Number of dams with live pups/number of pregnant dams) × 100.

c) : (Number of pups born/number of implantation scars) × 100.

d) : (Number of male pups/number of female pups).

e) : (Number of live pups born/number of implantation scars) × 100.

f) : (Number of live pups born/number of pups born) × 100.

g) : (Number of live pups on day 4/number of live pups born) × 100.

h) : (Number of pups with external anomalies/number of live pups

born) × 100.

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Tetrahydrothiophen 1,1-dioxide on Bacteria

要約

既存化学物質安全性調査事業の一環として、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施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ート法により、用量設定試験を50~5000 µg/プレートの用量で実施したところ、すべての検定菌において抗菌性は認められなかった。したがって、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験を313~5000 µg/プレートの範囲で用量を設定して実施した。

その結果、復帰変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても増加は認められなかったことから、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

材料および試験方法

〔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¹⁾は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA*株²⁾は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを、試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシド(CAS No. 126-33-0)は、分子量120.16の無色固体である。試験には、新日本理化(株)製〔ロット番号8050074、純度99.9%以上(不純物:水分0.1%以下)]のものを、(株)日本化学工業協会から供与され、使用時まで室温保管し、使用し

た。

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、水に溶解性がよいことから、用量設定試験においては純水、本試験においては注射用蒸留水に50 mg/mlになるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの注射用蒸留水溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(3.00 mg/ml)溶液は当研究所で実施した染色体異常試験で調製したものについて、高濃度(50.0 mg/ml)溶液は当該試験の本試験Iで調製したものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、99.1および99.3%であった。また、本試験Iで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、低濃度(3.13 mg/ml)溶液は、97.9%、高濃度(50.0 mg/ml)溶液は102%であった。

〔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 (上野製薬(株))
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9混液の組成〕

1) トップアガー

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) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	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、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。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
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクトアガー (Difco)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol

** : 7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製したS9を用いた。

〔試験方法〕

プレート法により、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 およびトップアガー 2 ml を混合したのち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注射用蒸留水、または数種の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。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。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

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加あるいはS9 mix添加条件において、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、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは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〕

50~5000 μg/プレートの範囲で公比を約3として、試験を実施したところ、すべての検定菌においてS9 mix無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。

〔本試験〕

結果をそれぞれTable 1, 2に示した。テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの用量を、S9 mix無添加試験および添加試験とともに313~5000 μg/プレートの範囲で公比を2として試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた5種類の検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験において、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。

以上の結果に基づき、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、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。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173, (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
 試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子,
 清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか,
 飯田さやか, 北嶋美似子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
 Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
 Kumiko Kawakami, Yuri Shimizu,
 Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi,
 Sayaka Iida and Miiko Kitashima.
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide** in reverse mutation test (I) 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						Frameshift type				
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98	
S9mix (-)	0	90 88 89 (89 \pm 1.0)	13 10 17 (13 \pm 3.5)	20 22 24 (22 \pm 2.0)	23 25 21 (23 \pm 2.0)	9 10 10 (10 \pm 0.6)						
	313	124 107 103 (111 \pm 11.2)	10 8 14 (11 \pm 3.1)	25 35 36 (32 \pm 6.1)	22 14 27 (21 \pm 6.6)	11 7 8 (9 \pm 2.1)						
	625	103 131 120 (118 \pm 14.1)	15 10 13 (13 \pm 2.5)	36 33 27 (32 \pm 4.6)	21 16 15 (17 \pm 3.2)	9 11 6 (9 \pm 2.5)						
	1250	109 118 97 (108 \pm 10.5)	7 13 15 (12 \pm 4.2)	27 23 31 (27 \pm 4.0)	15 18 22 (18 \pm 3.5)	8 7 12 (9 \pm 2.6)						
	2500	87 142 124 (118 \pm 28.0)	9 10 13 (11 \pm 2.1)	27 27 23 (26 \pm 2.3)	26 19 15 (20 \pm 5.6)	6 6 11 (8 \pm 2.9)						
	5000	109 123 106 (113 \pm 9.1)	9 12 9 (10 \pm 1.7)	23 28 28 (26 \pm 2.9)	24 26 15 (22 \pm 5.9)	9 10 9 (9 \pm 0.6)						
S9mix (+)	0	134 135 129 (133 \pm 3.2)	9 16 18 (14 \pm 4.7)	36 28 24 (29 \pm 6.1)	30 32 38 (33 \pm 4.2)	15 12 10 (12 \pm 2.5)						
	313	95 85 117 (99 \pm 16.4)	7 10 10 (9 \pm 1.7)	42 35 35 (37 \pm 4.0)	46 40 33 (40 \pm 6.5)	8 10 16 (11 \pm 4.2)						
	625	134 134 110 (126 \pm 13.9)	13 11 12 (12 \pm 1.0)	39 38 31 (36 \pm 4.4)	33 38 33 (35 \pm 2.9)	18 20 18 (19 \pm 1.2)						
	1250	114 131 119 (121 \pm 8.7)	14 14 13 (14 \pm 0.6)	27 19 24 (23 \pm 4.0)	34 31 25 (30 \pm 4.6)	16 8 14 (13 \pm 4.2)						
	2500	122 127 159 (136 \pm 20.1)	5 13 5 (8 \pm 4.6)	28 28 30 (29 \pm 1.2)	30 33 42 (35 \pm 6.2)	14 12 14 (13 \pm 1.2)						
	5000	149 136 128 (138 \pm 10.6)	10 16 17 (14 \pm 3.8)	19 17 23 (20 \pm 3.1)	30 36 30 (32 \pm 3.5)	12 10 14 (12 \pm 2.0)						
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA						
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80						
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	858 879 838 (858 \pm 20.5)	193 193 206 (197 \pm 7.5)	122 209 194 (175 \pm 46.5)	735 788 820 (781 \pm 42.9)	1767 2148 2578 (2164 \pm 405.7)						
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA						
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2						
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1370 1381 1290 (1347 \pm 49.7)	298 281 294 (291 \pm 8.9)	1243 1223 1506 (1324 \pm 157.9)	337 335 335 (336 \pm 1.2)	287 280 283 (283 \pm 3.5)						

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

**:Purity was above 99.9% and water (below 0.1%) was contained as impurity.

Table 2. Mutagenicity of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide** in reverse mutation test (II) 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			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	112 123 125 (120 \pm 7.0)	11 18 16 (15 \pm 3.6)	17 18 33 (23 \pm 9.0)	22 24 32 (26 \pm 5.3)	12 7 8 (9 \pm 2.6)	
	313	131 127 156 (138 \pm 15.7)	15 17 17 (16 \pm 1.2)	23 31 32 (29 \pm 4.9)	21 14 23 (19 \pm 4.7)	9 17 5 (10 \pm 6.1)	
	625	137 130 128 (132 \pm 4.7)	18 16 25 (20 \pm 4.7)	29 24 22 (25 \pm 3.6)	21 19 22 (21 \pm 1.5)	12 8 10 (10 \pm 2.0)	
	1250	105 132 129 (122 \pm 14.8)	20 16 15 (17 \pm 2.6)	23 22 18 (21 \pm 2.6)	27 24 27 (26 \pm 1.7)	11 15 6 (11 \pm 4.5)	
	2500	137 145 133 (138 \pm 6.1)	9 18 12 (13 \pm 4.6)	28 20 23 (24 \pm 4.0)	38 21 20 (26 \pm 10.1)	14 9 14 (12 \pm 2.9)	
	5000	156 129 123 (136 \pm 17.6)	25 20 15 (20 \pm 5.0)	28 17 28 (24 \pm 6.4)	27 23 31 (27 \pm 4.0)	17 12 5 (11 \pm 6.0)	
S9 mix (+)	0	148 120 141 (136 \pm 14.6)	15 12 21 (16 \pm 4.6)	16 25 25 (22 \pm 5.2)	35 39 20 (31 \pm 10.0)	15 14 17 (15 \pm 1.5)	
	313	127 137 146 (137 \pm 9.5)	22 26 14 (21 \pm 6.1)	30 30 25 (28 \pm 2.9)	42 31 39 (37 \pm 5.7)	12 20 20 (17 \pm 4.6)	
	625	137 146 133 (139 \pm 6.7)	15 10 16 (14 \pm 3.2)	24 29 25 (26 \pm 2.6)	29 38 42 (36 \pm 6.7)	14 18 18 (17 \pm 2.3)	
	1250	137 142 143 (141 \pm 3.2)	17 16 19 (17 \pm 1.5)	33 25 26 (28 \pm 4.4)	26 35 27 (29 \pm 4.9)	20 19 13 (17 \pm 3.8)	
	2500	138 172 166 (159 \pm 18.1)	17 15 18 (17 \pm 1.5)	29 22 22 (24 \pm 4.0)	38 39 29 (35 \pm 5.5)	23 25 15 (21 \pm 5.3)	
	5000	134 132 159 (142 \pm 15.0)	23 17 19 (20 \pm 3.1)	19 22 28 (23 \pm 4.6)	47 30 36 (38 \pm 8.6)	9 16 13 (13 \pm 3.5)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	728 781 743 (751 \pm 27.3)	207 153 128 (163 \pm 40.4)	85 81 91 (86 \pm 5.0)	767 780 762 (770 \pm 9.3)	908 890 965 (921 \pm 39.2)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1228 1435 1409 (1357 \pm 112.8)	184 198 197 (193 \pm 7.8)	1211 1206 1296 (1238 \pm 50.6)	340 323 309 (324 \pm 15.5)	204 192 221 (206 \pm 14.6)	

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

** : Purity was above 99.9% and water (below 0.1%) was contained as impurity.

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの 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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of Tetrahydrothiophene 1,1-dioxide on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

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、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)、短時間処理(6時間)ともに1.2 mg/ml(10 mM)の濃度においても50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において1.2 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: Biocell)を10%添加したイーグルMEM(日本製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処

理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシド(略号: THTD, CAS No.:126-33-0, ロット番号: 8050074, 新日本理化(株)製造, (株)日本化学工業協会提供)は、25°Cにおいて無色固体で、水に対して易溶、芳香族炭化水素に対しても易溶で、融点28°C, 沸点287°C, 分子式C₄H₈O₂S, 分子量120.16, 純度99.9%以上(不純物として水分0.1%以下)の物質である。

被験物質原体は安定であり、溶媒中(注射用水)では、3.0~50.0 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用水(株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理とも1.2 mg/ml(10 mM)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)

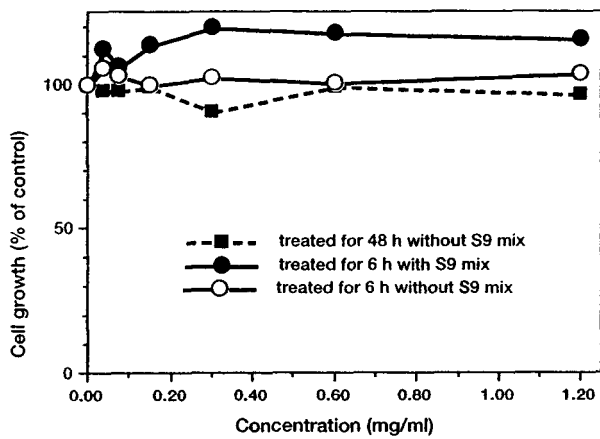


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tetrahydrothiophene 1,1-dioxide

は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林²⁾の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾($p < 0.05$)を行った。原則として以上2回の検定でともに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場

合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255(1992).
- 3) 吉村 功 編著, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 4) 吉村 功, 大橋靖夫 編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
 試験担当者: 山影康次, 日下部博一, 橋本恵子,
 長尾哲二, 太田 亮
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
 Keiko Hashimoto, Tetsuji Nagao,
 Ryo Ohta
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with tetrahydrothiophene 1,1-dioxide (THTD)* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	SA	NA
Control			200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25		
THTD	0.30	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
THTD	0.60	24	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	NT	NT
THTD	1.2	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.63		
MC	0.00005	24	200	10	67	140	0	1	0	218	0	119 (59.5)	116 (58.0)	0.00		
Solvent ¹⁾	0	48	200	1	0	1	2	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.50		
THTD	0.30	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
THTD	0.60	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	NT	NT
THTD	1.2	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
MC	0.00005	48	200	9	86	200	1	10	90	396	9	138 (69.0)	138 (69.0)	0.38		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested.

1) Water for injection was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.05$ when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p < 0.05$ by Fisher's exact test. *: Purity was more than 99.9%, and water was contained ($\leq 0.1\%$).

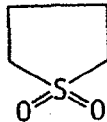
Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with tetrahydrothiophene 1,1-dioxide (THTD)* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	SA	NA
Control				200	2	0	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.63		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
THTD	0.30	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
THTD	0.60	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25	NT	NT
THTD	1.2	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50		
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.63		
THTD	0.30	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38		
THTD	0.60	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	NT	NT
THTD	1.2	+	6-(18)	200	2	3	3	0	0	0	8	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.00		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	2	161	311	0	4	440	918	0	186 (93.0)	186 (93.0)	0.00		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested.

1) Water for injection was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.05$ when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p < 0.05$ by Fisher's exact test. *: Purity was more than 99.9%, and water was contained ($\leq 0.1\%$).

SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE

CAS No.	126-33-0
Chemical Name	Tetrahydrothiophene 1,1-dioxide
Structural Formula	

SUMMARY CONCLUSIONS OF THE SIAR**Human Health**

In rats dosed intravenously at 500 mg/kg, 28%, 36% and 37% of the dose was excreted unchanged between days 0-2, 0-4 and 0-7, respectively. At 1000 mg/kg, 50% and 67.2% of the dose was excreted unchanged between days 0-2 and 0-4, respectively. The observation that the proportion of the dose recovered increased with dosage suggests that the metabolic pathway is saturable. In rabbits, dogs and squirrel monkeys given a single iv injection, this chemical was rapidly distributed throughout the body and was slowly removed from plasma with a half-life of 3.5-5 hours. One major metabolite with 85% of the urinary radioactivity was found in male rats injected intraperitoneally with this chemical. In a follow up study, the metabolite was identified as 3-hydroxysulfolane in the urine of rabbits injected intraperitoneally with this chemical.

LD₅₀ values by gavage [OECD TG 401] were 2006 mg/kg (males) and 2130 mg/kg (females) in rats. Dermal LD₅₀ in male and female rats was greater than 2000 mg/kg [84/449/EEC, B3]. Inhalation LC₅₀ in male and female rats (four hours) was greater than 12,000 mg/m³. Acute behavioural studies in rats indicated that hypothermia contributed to the behavioural effect of an interperitoneal injection of 800 mg/kg of sulfolane. Rabbits became hyperthermic, at 28°C, upon subcutaneous injection of 600 mg/kg sulfolane.

The chemical is not irritating to guinea pig and rabbit skin or to rabbit eyes. The chemical was not sensitising (0/20) in a guinea pig maximisation test [84/449/EEC, B6].

In a 28 day repeat dose toxicity study [Japanese TG] conducted under GLP, male and female rats were dosed by gavage with this chemical at 0, 60, 200 and 700 mg/kg/day. At 700 mg/kg some females showed transient reduction in locomotor activity during the early administration period. Bodyweight gain and food consumption at this dose were decreased in both males and females. Blood chemistry revealed increases in cholinesterase activity and total bilirubin levels in males and GPT in females and decreases of chloride levels in males and glucose levels in females. Histopathological examination in males dosed at 700 and 200 mg/kg/day revealed increases of hyaline droplets and eosinophilic bodies in the renal tubules which was accompanied by an increase in relative kidney weight. There was a decrease of splenic weight in females at 700 mg/kg/day, but no histological abnormalities were detected. No changes considered to be attributable to sulfolane were observed on urinary and haematological examinations at any dose. Kidney lesions tended to recover and the other changes related to the chemical disappeared after a 14 day recovery period. The NOAEL was 60 mg/kg/day for male rats and 200 mg/kg/day for female rats.

The chemical was not mutagenic in bacteria [OECD TG 471 and 472] and did not induce chromosome aberrations in mammalian cells in vitro [OECD TG 473] either with or without metabolic activation.

In a reproduction/developmental toxicity screening test [OECD 421]) rats were dosed at 0, 60, 200, or 700 mg/kg/day

This document may only be reproduced integrally. The conclusions and recommendations (and their rationale) in this document are intended to be mutually supportive, and should be understood and interpreted together.

by gavage for 41 to 50 days from 14 days prior to mating to day 3 of lactation. Some mortality occurred in the high-dose group. There was a decrease in body weight gain and food consumption of males and females during the pre-mating period, at 700 mg/kg. The number of oestrus cycles was decreased in the 700 mg/kg group. Four dams lost all their pups during the lactation period in the 700 mg/kg group. Birth index, live index, number of pups on days 1 and 4 of lactation, viability index and body weights of pups of both sexes on days 0 and 4 of lactation decreased, and the number of still births increased in the 700 mg/kg group. Birth index and the number of pups on day 0 and 4 of lactation decreased in the 200 mg/kg group. The NOAEL for reproductive and developmental toxicity was 60 mg/kg/day. There were no treatment-related findings in the external appearance, general conditions and necropsy findings in offspring.

Environment

The chemical has a log Pow of -0.77, a vapour pressure of 0.0083 hPa at 20°C and a water solubility of greater than 100 g/l. Fugacity model Mackay level III calculations suggest that the chemical will distribute almost completely to water if released to the aquatic compartment and equally to soil and water if released into air or soil separately or simultaneously to all three compartments. The chemical is not readily biodegradable (10% after 14 days), and is hydrolytically stable (t_{1/2} greater than 1 year at pH 4, 7 and 9, 25°C). It can be biodegraded after acclimatisation of activated sludge and by a variety of bacterial cultures, and may be substantially biodegradable. Inorganic sulphate has been identified as the final degradation product of sulfolane metabolism. The chemical has been shown to have low potential for bioaccumulation. Indirect photo-oxidation by hydroxy radicals is predicted to occur with a half-life estimated at 9.7 h (calculated using AOPWIN rate constant, 1.328×10^{-11} cm³/molecule/sec).

In an acute fish toxicity study [OECD TG 203, *Oryzias latipes*] a 96-hLC₅₀ > 100 mg/l was reported. In *Daphnia magna* [OECD TG 202], an acute toxicity value of 48h EC₅₀ = 852 mg/l was reported. The results in algae [OECD 201] were an E₁C₅₀ (72h) >1000 mg/l, E₁C₅₀ = 500mg/l and a NOEC_r (72 h) = 556 mg/l, NOEC_b = 171 mg/l. The chronic toxicity to *Daphnia magna* [OECD 211] was a NOEC (21d, reproduction) of 25 mg/l and an LC₅₀ (21d, parental) > 100 mg/l.

In a study to determine plant toxicity [Environment Canada protocol, lettuce (*Lactuca sativa*), carrot (*Daucus carota*), alfalfa (*Medicago sativa*) and timothy (*Phleum pratense*)] it was determined that plants were generally most sensitive to sulfolane in till and least sensitive in loam. A five day seed germination/root elongation test conducted using lettuce (*Lactuca sativa*) reported NOEC values of 290 mg/kg (root elongation) and 570 mg/kg (seed germination) for lettuce grown in fine-textured soil.

Exposure

Production of the chemical during 2003 was 1100 t/year in Japan. Global production in 2003 was approximately 13,300 t/year. Geographically, production was divided between sites in the Americas (35-45%), Asia (20-30%) and Europe/Africa (35-45%).

The major use of Sulfolane is as a solvent for extraction of aromatic hydrocarbons from oil refinery streams and acid gas purification. These uses account for approximately 80% of production. A number of minor uses (accounting for 20% of production) include fractionation of wood tars, tall oil and other fatty acids, electronic applications, textile manufacturing and finishing, as a plasticizer and as a solvent in pharmaceutical manufacturing. Other uses mentioned in the literature include solvent for jet printing inks, a component of hydraulic fluid, a curing agent for epoxy resins and medicinal application (although this latter application is thought to exist in the patent literature only).

Monitoring studies performed in the vicinity of gas processing facilities in Canada have shown that environmental release of sulfolane during its use in these facilities is possible. Sulfolane was detected in soil, bedrock and shallow till aquifers, wetlands and creeks near these facilities. It was also detected in wetland vegetation.

There is low potential for exposure to workers during production of the chemical. It is manufactured in a closed

This document may only be reproduced integrally. The conclusions and recommendations (and their rationale) in this document are intended to be mutually supportive, and should be understood and interpreted together.

system and transferred directly from the reactors into storage tanks. There is potential exposure to workers during drum filling. This operation is performed on 16 days per year for 7 hours each day. The concentration of sulfolane close to the drums has been measured at 0.2 ppm. There is potential exposure to workers at user sites. Since the predominant use of sulfolane is as a solvent in commercial extraction processes there is little potential for direct consumer exposure, however there is a potential for indirect human exposure via drinking water and food crops in areas surrounding processing plants.

RECOMMENDATION AND RATIONALE FOR THE RECOMMENDATION AND NATURE OF FURTHER WORK RECOMMENDED

Human health: The chemical is a candidate for further work. The chemical possesses properties indicating a hazard for human health (reproductive and developmental toxicity). Based on data presented by the Sponsor country worker exposure in sites manufacturing the chemical is controlled. No information is available for occupational exposure in industries using the chemical nor for indirect human exposure via drinking water and food crops in areas surrounding processing plants. It is therefore recommended that member countries perform an exposure assessment for industrial users and indirect human exposure, and if then indicated, risk assessments be performed.

Environment: The chemical is currently of low priority for further work because of its low hazard potential.