

ジフェニルジスルフィドの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of Diphenyl disulfide in Bacteria

要約

ジフェニルジスルフィドについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101 を用いる復帰変異試験を実施した。

予備試験の結果をもとに本試験では, S9 mix 非共存下の TA100, TA1535 は 9.77~0.153 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量, WP2 *uvrA*/pKM101 は 2500~39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量, TA98, TA1537 は 19.5~0.305 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量を, S9 mix 共存下の TA100, TA1535 は 78.1~1.22 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量, WP2 *uvrA*/pKM101 は 5000~78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量, TA98, TA1537 は 156~2.44 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) 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陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から, ジフェニルジスルフィドは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

方法

1. テスト菌株

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ 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 *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101²⁾ の 5 菌株を用いた。テスト菌株は菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: 関東化学)を加え, 0.2 mL 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後, 超低温槽で -80°C 以下に凍結保存したものを使用した。これら菌株はアミノ酸要求性, 紫外線感受性, 膜変異, 薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ, 特性を備えていることを確認した。

2. テスト菌株の前培養

L 字型試験管に 2.5% ニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Oxoid 社) 溶液を 10 mL 分注し, これに凍結保存した菌懸濁液を解凍して 20 μL を接種した。37°C で 8 時間振盪培養した後, 濁度計を用いて菌濃度を測定し, 生菌数が $1 \times 10^9/\text{mL}$ 以上であることを確認した。

3. 被験物質

ジフェニルジスルフィド(ロット番号: 15322AB, Sigma-Aldrich (Missouri, USA) 製造)は, 純度 99.8% の白色粉体である。被験物質は使用時まで冷蔵, 暗所に気密保存した。実験終了後, 残余被験物質を分析した結果, 安定性に問題はなかった。

4. 被験物質溶液の調製

DMSO を用いて最高用量の溶液を調製した後, 同溶媒で所定用量に段階希釈し, 速やかに試験に使用した。

5. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを用いた。陽性対照物質溶液は, あらかじめ所定の濃度に調製し, -80°C 以下に凍結保存したものを使用した。

AF-2 : 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)

NaN₃ : アジ化ナトリウム(和光純薬工業)

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩(Sigma-Aldrich Fine Chemicals)

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業)

NaN₃ は注射用水(DW: 大塚製薬工場)に, その他は DMSO に溶解したものを使用した。

6. 培地および S9 mix の組成

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として, 精製水を用いて 0.5 mmol/L D-ピオチン, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し, これをろ過滅菌後, 冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して, 粉末寒天(Bacto-agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後, 上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し, 約 45°C に保温した。

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)を購入し, 使用した。なお, 培地 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸二カリウム・無水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	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

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

*:購入したS9(キッコマン)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いた併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

7. 試験方法

試験はブレインキューベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37°Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。ブレインキューベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、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。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、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または目視で計測した。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、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

8. 試験結果の判定基準

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。なお、試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果及び考察

1. 予備試験

予備試験を *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101 を用いて5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/plate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の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下ではTA100, TA1535の4.88 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の1250 μ g/plate以上、TA98, TA1537の19.5 μ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537の78.1 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の5000 μ g/plateで抗菌性が認められた。なお、S9 mix非共存下および共存下の1250 μ g/plate以上で沈殿物が認められた。従って本試験では、S9 mix非共存下のTA100 TA1535は9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305, 0.153 μ g/plateの7用量、WP2 *uvrA*/pKM101は2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 μ g/plateの7用量、TA98, TA1537は19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305 μ g/plateの7用量を、共存下のTA100, TA1535は78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22 μ g/plateの7用量、WP2 *uvrA*/pKM101は5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1 μ g/plateの7用量、TA98, TA1537は156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 μ g/plateの7用量をそれぞれ設定した。

2. 本試験

試験の結果をTable 1, 2に示した。本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下ではTA100, TA1535の4.88 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の625 μ g/plate以上、TA98, TA1537の9.77 μ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535の78.1 μ g/plate、TA98, TA1537の78.1 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の2500 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。なお、S9 mix非共存下および共存下の625 μ g/plate以上で沈殿物が認められた。

なお、S9 mix非共存下および共存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は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。

以上の結果から、ジフェニルジスルフィドは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

なお、類似化合物であるBiphenyl³⁾は、細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 113: 173-215(1983).
- 2) Green MHL, Muriel WJ: Mutagen testing using *Trp*⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res*, 38:3-32(1976).
- 3) 祖父尼俊雄(監修): 「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(2000)p.492.

連絡先

試験責任者: 榎本佳明
試験担当者: 榎本佳明, 清水優子, 大西千絵美
(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Yoshiaki Enomoto (Study director)
Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu,
Chiemi Oonishi
Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety
Institute Ltd.
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255 Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1-1 Mutagenicity of diphenyl disulfide in bacteria (I)

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 change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535		TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	105 102 (\pm 102) 99 (\pm 3)	10 10 (\pm 10) 9 (\pm 1)		14 24 (\pm 18) 16 (\pm 5)	11 11 (\pm 13) 16 (\pm 3)
	0.153	118 101 (\pm 110) 111 (\pm 9)	9 11 (\pm 9) 8 (\pm 2)			
	0.305	110 111 (\pm 107) 101 (\pm 6)	10 10 (\pm 12) 15 (\pm 3)		14 15 (\pm 14) 12 (\pm 2)	16 12 (\pm 13) 12 (\pm 2)
	0.610	100 99 (\pm 101) 104 (\pm 3)	9 10 (\pm 9) 8 (\pm 1)		20 21 (\pm 21) 22 (\pm 1)	11 14 (\pm 12) 11 (\pm 2)
	1.22	106 116 (\pm 108) 103 (\pm 7)	10 8 (\pm 11) 14 (\pm 3)		17 19 (\pm 18) 17 (\pm 1)	12 10 (\pm 13) 16 (\pm 3)
	2.44	108 100 (\pm 104) 105 (\pm 4)	15 11 (\pm 12) 11 (\pm 2)		12 21 (\pm 15) 13 (\pm 5)	11 14 (\pm 13) 14 (\pm 2)
	4.88	75* 83* (\pm 82) 87* (\pm 6)	8* 10* (\pm 10) 11* (\pm 2)		21 21 (\pm 21) 20 (\pm 1)	15 15 (\pm 16) 18 (\pm 2)
	9.77	0* 0* (\pm 0) 0* (\pm 0)	0* 0* (\pm 0) 0* (\pm 0)		11* 14* (\pm 13) 13* (\pm 2)	8* 6* (\pm 8) 10* (\pm 2)
	19.5				0* 0* (\pm 0) 0* (\pm 0)	0* 0* (\pm 0) 0* (\pm 0)
S9 mix (+)	0	128 114 (\pm 119) 114 (\pm 8)	14 12 (\pm 12) 11 (\pm 2)		24 24 (\pm 23) 21 (\pm 2)	14 16 (\pm 16) 18 (\pm 2)
	1.22	120 104 (\pm 115) 120 (\pm 9)	15 10 (\pm 12) 11 (\pm 3)			
	2.44	127 107 (\pm 119) 123 (\pm 11)	10 12 (\pm 11) 12 (\pm 1)		17 23 (\pm 20) 19 (\pm 3)	23 17 (\pm 21) 24 (\pm 4)
	4.88	130 101 (\pm 115) 114 (\pm 15)	15 13 (\pm 14) 14 (\pm 1)		27 22 (\pm 25) 27 (\pm 3)	20 19 (\pm 17) 13 (\pm 4)
	9.77	103 107 (\pm 107) 112 (\pm 5)	15 15 (\pm 14) 13 (\pm 1)		28 26 (\pm 29) 33 (\pm 4)	19 19 (\pm 21) 24 (\pm 3)
	19.5	117 120 (\pm 114) 106 (\pm 7)	14 16 (\pm 15) 15 (\pm 1)		19 25 (\pm 22) 23 (\pm 3)	23 22 (\pm 22) 22 (\pm 1)
	39.1	103 105 (\pm 105) 107 (\pm 2)	9 13 (\pm 11) 10 (\pm 2)		15 17 (\pm 18) 23 (\pm 4)	18 21 (\pm 20) 20 (\pm 2)
	78.1	86* 72* (\pm 79) 79* (\pm 7)	7* 8* (\pm 8) 8* (\pm 1)		29* 23* (\pm 26) 25* (\pm 3)	13* 18* (\pm 16) 17* (\pm 3)
	156				22* 16* (\pm 17) 14* (\pm 4)	9* 6* (\pm 7) 7* (\pm 2)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 ^{a)}	NaN ₃ ^{b)}		AF-2	9-AA ^{c)}
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5		0.1	80
	Number of colonies/plate	752 707 (\pm 745) 777 (\pm 35)	453 451 (\pm 451) 448 (\pm 3)		708 628 (\pm 646) 602 (\pm 55)	438 477 (\pm 458) 458 (\pm 20)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA ^{d)}	2-AA		2-AA	2-AA
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2		0.5	2
	Number of colonies/plate	1587 1477 (\pm 1534) 1538 (\pm 55)	184 194 (\pm 191) 196 (\pm 6)		500 500 (\pm 504) 513 (\pm 8)	255 243 (\pm 253) 261 (\pm 9)

a) AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

b) NaN₃:sodium azide

c) 9-AA:9-aminoacridine hydrochloride

d) 2-AA:2-aminoanthracene

*:Microbial toxicity was observed.

Table 1-2 Mutagenicity of diphenyl disulfide in bacteria (I)

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 change type		Frameshift type	
				WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	
S9 mix (-)	0			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 (+)	0			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 6)	
	1250†			86 81 (85) 87 (\pm 3)	
	2500†			57* 57* (62) 73* (\pm 9)	
	5000†			61* 54* (62) 71* (\pm 9)	
Positive control S9 mix (-)	Name			AF-2 ^a	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			0.005	
	Number of colonies/plate			751 780 (755) 733 (\pm 24)	
Positive control S9 mix (+)	Name			2-AA ^b	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			2	
	Number of colonies/plate			1372 1238 (1298) 1284 (\pm 68)	

a) AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

b) 2-AA:2-aminoanthracene

*: Microbial toxicity was observed.

†: Precipitates were observed.

Table 2-1 Mutagenicity of diphenyl disulfide in bacteria (II)

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 change type		Frameshift type	
		TA100	TA1535	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	104 103 (\pm 110) 122 (\pm 11)	7 11 (\pm 10) 13 (\pm 3)	13 16 (\pm 15) 17 (\pm 2)	12 13 (\pm 12) 11 (\pm 1)
	0.153	100 106 (\pm 103) 103 (\pm 3)	11 14 (\pm 12) 10 (\pm 2)		
	0.305	100 102 (\pm 101) 102 (\pm 1)	15 16 (\pm 14) 12 (\pm 2)	14 21 (\pm 17) 17 (\pm 4)	12 15 (\pm 13) 11 (\pm 2)
	0.610	120 100 (\pm 107) 101 (\pm 11)	14 12 (\pm 12) 11 (\pm 2)	20 17 (\pm 19) 19 (\pm 2)	12 10 (\pm 12) 14 (\pm 2)
	1.22	108 101 (\pm 104) 102 (\pm 4)	9 14 (\pm 12) 12 (\pm 3)	17 14 (\pm 16) 18 (\pm 2)	10 12 (\pm 12) 15 (\pm 3)
	2.44	110 106 (\pm 105) 100 (\pm 5)	11 12 (\pm 11) 11 (\pm 1)	17 19 (\pm 19) 20 (\pm 2)	14 13 (\pm 12) 10 (\pm 2)
	4.88	70* 85* (\pm 83) 94* (\pm 12)	10* 9* (\pm 9) 8* (\pm 1)	16 17 (\pm 18) 20 (\pm 2)	10 10 (\pm 11) 12 (\pm 1)
	9.77	0* 0* (\pm 0) 0* (\pm 0)	0* 0* (\pm 0) 0* (\pm 0)	11* 12* (\pm 12) 12* (\pm 1)	6* 10* (\pm 7) 6* (\pm 2)
	19.5			0* 0* (\pm 0) 0* (\pm 0)	0* 0* (\pm 0) 0* (\pm 0)
S9 mix (+)	0	108 104 (\pm 107) 109 (\pm 3)	16 19 (\pm 17) 17 (\pm 2)	25 28 (\pm 28) 30 (\pm 3)	14 16 (\pm 15) 16 (\pm 1)
	1.22	123 106 (\pm 114) 113 (\pm 9)	18 18 (\pm 17) 14 (\pm 2)		
	2.44	119 119 (\pm 116) 109 (\pm 6)	17 17 (\pm 17) 18 (\pm 1)	24 24 (\pm 25) 27 (\pm 2)	16 19 (\pm 17) 15 (\pm 2)
	4.88	119 108 (\pm 116) 122 (\pm 7)	18 16 (\pm 17) 18 (\pm 1)	24 24 (\pm 24) 25 (\pm 1)	19 17 (\pm 19) 20 (\pm 2)
	9.77	108 109 (\pm 112) 119 (\pm 6)	19 17 (\pm 17) 14 (\pm 3)	24 28 (\pm 25) 22 (\pm 3)	19 19 (\pm 19) 19 (\pm 0)
	19.5	107 104 (\pm 109) 116 (\pm 6)	14 15 (\pm 15) 15 (\pm 1)	22 29 (\pm 26) 26 (\pm 4)	18 19 (\pm 18) 18 (\pm 1)
	39.1	115 107 (\pm 109) 106 (\pm 5)	14 15 (\pm 14) 14 (\pm 1)	23 26 (\pm 24) 23 (\pm 2)	18 17 (\pm 17) 15 (\pm 2)
	78.1	92* 66* (\pm 85) 96* (\pm 16)	5* 10* (\pm 8) 8* (\pm 3)	17* 16* (\pm 16) 15* (\pm 1)	9* 10* (\pm 10) 12* (\pm 2)
	156			13* 15* (\pm 13) 12* (\pm 2)	9* 7* (\pm 7) 5* (\pm 2)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 ^a	NaN ₃ ^b	AF-2	9-AA ^c
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.1	80
	Number of colonies/plate	608 632 (\pm 665) 755 (\pm 79)	553 464 (\pm 509) 511 (\pm 45)	577 600 (\pm 580) 562 (\pm 19)	466 441 (\pm 442) 419 (\pm 24)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA ^d	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	0.5	2
	Number of colonies/plate	1326 1320 (\pm 1345) 1388 (\pm 38)	222 210 (\pm 219) 226 (\pm 8)	367 431 (\pm 417) 453 (\pm 45)	237 222 (\pm 222) 207 (\pm 15)

a) AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

b) NaN₃: sodium azide

c) 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride

d) 2-AA: 2-aminoanthracene

*: Microbial toxicity was observed.

Table 2-2 Mutagenicity of diphenyl disulfide in bacteria (II)

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 change type		Frameshift type
			WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	
S9 mix (-)	0		61 75 (68) 68 (\pm 7)	
	39.1		61 70 (67) 70 (\pm 5)	
	78.1		70 78 (74) 73 (\pm 4)	
	156		63 73 (67) 65 (\pm 5)	
	313		75 87 (83) 86 (\pm 7)	
	625†		73* 52* (65) 71* (\pm 12)	
	1250†		65* 63* (60) 53* (\pm 6)	
	2500†		52* 56* (51) 44* (\pm 6)	
S9 mix (+)	0		85 86 (87) 90 (\pm 3)	
	78.1		93 84 (88) 87 (\pm 5)	
	156		90 88 (86) 79 (\pm 6)	
	313		82 85 (82) 78 (\pm 4)	
	625†		70 60 (65) 64 (\pm 5)	
	1250†		64 48 (59) 66 (\pm 10)	
	2500†		56* 50* (50) 45* (\pm 6)	
	5000†		56* 60* (61) 66* (\pm 5)	
Positive control S9 mix (-)	Name		AF-2 ^{a)}	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.005	
	Number of colonies/plate		1222 986 (1105) 1107 (\pm 118)	
Positive control S9 mix (+)	Name		2-AA ^{b)}	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		2	
	Number of colonies/plate		1528 1599 (1497) 1364 (\pm 121)	

a) AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

b) 2-AA:2-aminoanthracene

*: Microbial toxicity was observed.

†: Precipitates were observed.

In Vitro Chromosomal Aberration Test of Diphenyl disulfide in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

ジフェニルジスルフィドの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を調べるため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下では30 µg/mLを、短時間処理法のS9 mix非存在下ならびに連続処理法の24時間処理では25 µg/mLを最高濃度として、各々公差5で5濃度を設定した。

短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下ならびに24時間連続処理の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出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下ではジフェニルジスルフィドは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

大日本製薬から入手(2002年3月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代4週間以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(Invitrogen Corp., ロット番号:353445)を10vol%添加したイーグルMEM(日本製薬)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5%CO₂)内で培養した。

短時間処理法では、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。また連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。

4. 被験物質

ジフェニルジスルフィド(ロット番号:15322AB, Sigma-Aldrich(Missouri, USA))は、純度99.8%の白色粉末である。被験物質は使用時まで冷蔵、暗所に気密保存した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に

問題はなかった。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。ジメチルスルホキシド(関東化学, ロット番号:411F1738, 純度:99.7%以上)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1 vol%になるように加えた。

6. 細胞増殖抑制試験

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(オリンパス光学工業)を用いて測定し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、ジフェニルジスルフィドによって約50%の細胞増殖抑制を示す濃度を、細胞増殖率が50%を示す濃度を挟む2点を結ぶ直線式より算出したところ、短時間処理法のS9 mix存在下で17 µg/mL, 非存在下で13 µg/mL, 連続処理法の24時間処理で8 µg/mLであった(Fig.1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下では30 µg/mLを、短時間処理法のS9 mix

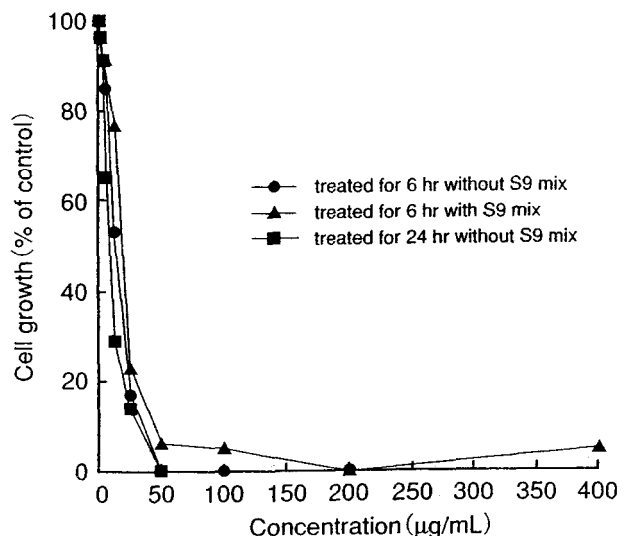


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with diphenyl disulfide

非存在下ならびに連続処理法の24時間処理では25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、各々公差5で5濃度を設定した。

陽性対照として、短時間処理法のS9 mix存在下では、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業, ロット番号:GG01)の濃度を20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, S9 mix非存在下では、マイトマイシンC(協和発酵工業, ロット番号:380ABC)の濃度を0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 連続処理法では、マイトマイシンCの濃度を0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

各濃度4枚のディッシュに処理し、2枚を染色体標本作製, 2枚を細胞増殖率測定に使用した。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように染色体標本作成用ディッシュの培養液に加えた。染色体標本の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2枚作製した。作製した標本を、3 vol%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)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切断、交換などの構造異常およびギャップの有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。ギャップは構造異常には含めなかった。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

11. 細胞増殖の測定

染色体標本作製と同一のサンプルにおける細胞増殖を測定した。細胞増殖測定用のディッシュを用いて、細胞増殖抑制試験と同様に測定した。

結果および考察

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。ジフェニルジスルフィドを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、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。

連続処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。ジフェニルジスルフィドを加えて24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。

以上の結果から、ジフェニルジスルフィドは本試験条件下において、染色体異常を誘発しないと結論した。

なお、類似化合物であるBiphenylは、染色体異常試験で陽性の結果が報告されている²⁾。また、Diphenylamineは、染色体異常試験で陰性の結果が報告されている²⁾。

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)pp.16-37.
- 2) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(2000)p.77, p.202.

連絡先

試験責任者: 成見香瑞範

試験担当者: 堀 一成, 齋藤 準, 石毛裕子,
齋藤宏美, 梶原昭彦

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Kazunori Narumi (Study director)
Kazushige Hori, Hitoshi Saitou,
Yuko Ishige, Hiromi Saitou,
Akihiko Kajiwara

Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety
Institute Ltd.
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255 Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with diphenyl disulfide with and without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid ^{b)} (%)	Judgement ^{c)}	
						ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent ^{a)}	0	-	6-18	100	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	5	-	6-18	93	200	1	0	1	1	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
	10	-	6-18	73	200	1	0	2	1	0	4	4(2.0)	0	0.5	-	-
	15	-	6-18	53	200	0	1	2	0	0	3	3(1.5)	0	1.0	-	-
	20	-	6-18	41	200	0	2	1	0	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
	25	-	6-18	24	200	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	0	0.0	-	-
MMC	0.1	-	6-18	N.D.	200	10	37	2	0	0	49	46(23.0)	0	0.0	+	-
Solvent	0	+	6-18	100	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	10	+	6-18	84	200	1	0	1	1	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
	15	+	6-18	62	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
	20	+	6-18	40	200	0	2	0	0	0	2	2(1.0)	0	0.5	-	-
	25	+	6-18	24	200	0	1	2	0	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
	30	+	6-18	7	200	4	2	0	0	0	6	6(3.0)	0	0.0	-	-
BP	20	+	6-18	N.D.	200	8	96	2	0	0	106	103(51.5)	1	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C (positive control), BP:benzo[a]pyrene (positive control)

N.D.:Not determined

a)Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b)Two hundred cells were analyzed in each group.

c)Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.*(1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with diphenyl disulfide without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid ^{b)} (%)	Judgement ^{c)}	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent ^{a)}	0	24	100	200	1	2	0	1	0	4	4(2.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	5	24	90	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
	10	24	57	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
	15	24	24	200	0	1	1	0	0	2	2(1.0)	0	1.0	-	-
	20	24	15	200	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	0	1.0	-	-
	25	24	7	200	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	0	0.0	-	-
MMC	0.05	24	N.D.	200	14	42	1	0	0	57	53(26.5)	0	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C (positive control)

N.D.:Not determined

a)Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b)Two hundred cells were analyzed in each group.

c)Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.*(1987).