

試験番号

# 最 終 報 告 書

試験番号：

表 題：ジベンジルジスルフィドの細菌を用いる復帰突然変異試験

## 1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	4
2.1	表題	4
2.2	試験番号	4
2.3	試験目的	4
2.4	参考としたガイドライン	4
2.5	試験委託者の名称および所在地	4
2.6	試験施設の名称および所在地	4
2.7	試験責任者	4
2.8	試験従事者	4
2.9	試験日程	5
2.10	予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのあ る事態および試験計画書に従わなかつたこと	5
2.11	資料の保存	5
2.12	試験責任者の署名	5
3.	要約	6
4.	被験物質および対照物質	7
4.1	被験物質	7
4.2	陰性対照物質	7
4.3	陽性対照物質	8
4.4	陽性対照溶液の調製	8
5.	指標菌株	9
5.1	試験菌株	9
5.2	菌株の識別	9
5.3	指標菌株の選択理由	9
5.4	菌株の保存および解凍	10
5.5	菌株の特性検査	10
5.6	前培養	11
6.	培地および調製試薬	11
6.1	最少グルコース寒天平板培地	11
6.2	ニュートリエントブロス No.2 培養液	12
6.3	トップアガー	12
6.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	13
6.5	S9 mix の調製方法	13
7.	試験方法	14
7.1	溶媒	14

7.2	溶媒の選択理由 .....	14
7.3	被験液の調製方法 .....	15
7.4	プレート数 .....	15
7.5	プレートの識別 .....	15
7.6	試験操作 (プレインキュベーション法) .....	15
7.7	試験系の成立条件 .....	16
7.8	判定基準 .....	16
8.	試験結果 .....	16
8.1	用量設定試験の観察結果および本試験用量の設定 .....	16
8.2	本試験の観察結果 .....	17
9.	考察 .....	17
10.	参考文献 .....	18

表

別表 1	試験結果表 (用量設定試験) .....	19
別表 2	試験結果表 (本試験) .....	20

図

別紙 1	図 1 TA100 における用量反応曲線 (本試験: -S9 mix) .....	21
	図 2 TA100 における用量反応曲線 (本試験: +S9 mix) .....	21
別紙 2	図 3 TA1535 における用量反応曲線 (本試験: -S9 mix) .....	22
	図 4 TA1535 における用量反応曲線 (本試験: +S9 mix) .....	22
別紙 3	図 5 WP2uvrA における用量反応曲線 (本試験: -S9 mix) .....	23
	図 6 WP2uvrA における用量反応曲線 (本試験: +S9 mix) .....	23
別紙 4	図 7 TA98 における用量反応曲線 (本試験: -S9 mix) .....	24
	図 8 TA98 における用量反応曲線 (本試験: +S9 mix) .....	24
別紙 5	図 9 TA1537 における用量反応曲線 (本試験: -S9 mix) .....	25
	図 10 TA1537 における用量反応曲線 (本試験: +S9 mix) .....	25

背景データ .....	26
-------------	----

## 2. 試験実施概要

### 2.1 表題

ジベンジルジスルフィドの細菌を用いる復帰突然変異試験

### 2.2 試験番号

[REDACTED]

### 2.3 試験目的

ジベンジルジスルフィドの安全性評価の一環として、細菌を用いて遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

### 2.4 参考としたガイドライン

- 「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(平成 8 年 3 月 22 日付衛化第 29 号生活衛生局長通知)

### 2.5 試験委託者の名称および所在地

名称：国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター変異遺伝部

[REDACTED]

### 2.6 試験施設の名称および所在地

名称：[REDACTED]

[REDACTED]

### 2.7 試験責任者

[REDACTED]

### 2.8 試験従事者

#### 用量設定試験

使用菌株の前培養	:	[REDACTED]
被験液の調製	:	[REDACTED]
試験操作	:	[REDACTED]
コロニーの計数	:	[REDACTED]

#### 本試験

使用菌株の前培養	:	[REDACTED]
被験液の調製	:	[REDACTED]
試験操作	:	[REDACTED]

コロニーの計数 : [REDACTED]

**2.9 試験日程**

試験開始日 : [REDACTED]  
用量設定試験開始日 : [REDACTED]  
用量設定試験終了日 : [REDACTED]  
本試験開始日 : [REDACTED]  
本試験終了日 : [REDACTED]  
試験終了日 : [REDACTED]

**2.10 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事  
態および試験計画書に従わなかつたこと**

本試験において予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事  
態および試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

**2.11 資料の保存**

試験計画書、記録文書、生データおよび報告書類を資料として、[REDACTED]  
[REDACTED]の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後3年  
間とする。期間終了後の保存については、試験委託者と[REDACTED]  
[REDACTED]間で協議し、その処置を決定する。

**2.12 試験責任者の署名**

[REDACTED] [REDACTED]  
[REDACTED]

### 3. 要約

ジベンジルジスルフィドの遺伝子突然変異誘発能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, TA1535, TA98, TA1537 および大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合および代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド (以下 DMSO) を用いた。

本試験用量を設定するため、5000 µg/plate を最高用量として以下公比 4 で 4 段階希釈した 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5 µg/plate の計 5 用量で用量設定試験を実施した。その結果より、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 についてはすべての用量で生育阻害が認められたため、19.5 µg/plate を最高用量として 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.61, 0.31 µg/plate の計 7 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 および代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 については生育阻害が認められた最低用量の 78.1 µg/plate を最高用量として 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 µg/plate の計 6 用量、代謝活性化する場合の *E. coli* WP2 *uvrA* および *S. typhimurium* TA98 については生育阻害が認められた最低用量の 313 µg/plate を最高用量として 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 µg/plate の計 6 用量、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* については生育阻害が認められた最低用量の 1250 µg/plate を最高用量として 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 µg/plate の計 6 用量で実施した。

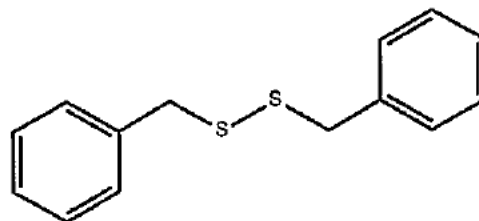
用量設定試験および本試験ともに本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下においてジベンジルジスルフィドは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない (陰性) と判定した。

#### 4. 被験物質および対照物質

##### 4.1 被験物質

名称	ジベンジルジスルフィド
供給元	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
入手日	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
風袋量込	69.641 g
ロット番号	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
CAS 番号	150-60-7
官報公示整理番号	化審法：(3)-1136 安衛法：4-(14)-37
純度	99.9 %
不純物の名称及び濃度	不明
構造式	



分子量	246.39
常温における性状	無色結晶粉末
融点	72°C
安定性	適切な条件下では安定
溶解度	水：不溶 DMSO：50 mg/mL で溶解
溶媒中での安定性	DMSO：発熱，ガスの発生等の反応性なし
保存条件	常温
有効期限	情報なし
保存場所	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
残量の取扱い	実験終了後の残量は試験委託者に返却する。

DMSO の溶解度および溶媒中での安定性は、XXXXXXXXXX で実施した溶解性試験の結果による。

##### 4.2 陰性対照物質

被験物質の調製に用いた DMSO を陰性対照物質とした。

#### 4.3 陽性対照物質<sup>1),2)</sup>

以下の変異原物質を陽性対照物質とした。試験に使用した陽性対照物質名, Lot No., 純度および保存方法を表 1 示した。

表 1 陽性対照物質

陽性対照物質	Lot No.	純度(%)	保存方法
AF-2		99.7%	室温, 遮光
NaN <sub>3</sub>		99.6%	室温, 遮光
ICR-191			室温, 遮光
2-AA		96.7%	室温, 遮光
B[a]P		99.6% 99.9%	冷蔵, 遮光

AF-2 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

(富士フイルム和光純薬株式会社; CAS No.3688-53-7, 和光特級)

NaN<sub>3</sub> Sodium azide (富士フイルム和光純薬株式会社; CAS No.26628-22-8, 試薬特級)

ICR-191 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl  
(Polysciences, Inc.; CAS No.17070-45-0)

2-AA 2-Aminoanthracene (富士フイルム和光純薬株式会社; CAS No. 613-13-8)

B[a]P Benzo[a]pyrene (富士フイルム和光純薬株式会社; CAS No.50-32-8)

保存場所

#### 4.4 陽性対照溶液の調製

陽性対照物質は DMSO (富士フイルム和光純薬株式会社, JIS 規格 試薬特級; Lot No. ) に溶解した。ただし, NaN<sub>3</sub> については注射用水 (株式会社大塚製薬工場, 日本薬局方; Lot No. ) に溶解した。調製した陽性対照溶液は, 約 1 mL ずつ分注後 -20°C 以下で保存し, 調製後 6 ヶ月以内のものを使用した。なお, 試験実施時に解凍して使用した。それぞれの名称および処理用量を表 2 に示した。

表 2 陽性対照物質調製濃度

使用菌株	代謝活性化しない場合		代謝活性化する場合	
	陽性対照物質名	処理用量 (µg/plate)	陽性対照物質名	処理用量 (µg/plate)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.01	B[a]P	5.0
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	2AA	2.0
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	2AA	10.0
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	0.1	B[a]P	5.0
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	1.0	B[a]P	5.0

5. 指標菌株 <sup>3),4),5),6),7)</sup>

## 5.1 試験菌株

*S. typhimurium* TA1535, TA98, TA1537, *E. coli* WP2 *uvrA* は独立行政法人 製品評価技術基盤機構より XXXXXXXXXX に、*S. typhimurium* TA100 は国立研究開発法人 理化学研究所より XXXXXXXXXX に入手した菌株を継代培養した菌株を使用した。

## 5.2 菌株の識別

菌株の種類毎に、以下に示す色のマーカー等を使用して識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶
<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> TA1537	緑

## 5.3 指標菌株の選択理由

当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる復帰突然変異試験に最も一般的に使用されている。試験に使用する菌株がそれぞれ保持する遺伝的な特性を表 3 に示した。

表 3 菌株の遺伝的特性

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	R 因子	
<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	塩基対置換
<i>S. typhimurium</i> TA1535	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	塩基対置換
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	+	—	塩基対置換
<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>hisD</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	フレームシフト
<i>S. typhimurium</i> TA1537	<i>hisC</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	フレームシフト

#### 5.4 菌株の保存および解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して DMSO (富士フィルム和光純薬株式会社, JIS 規格試薬特級, Lot No. XXXXXXXXXX) を 0.7 mL の割合で添加した。これを滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注し、ドライアイス-アセトンで急速凍結した後、-70°C 以下の超低温フリーザ (MDF-C8V1: パナソニックヘルスケア株式会社) で保存した。なお、使用する際は水温下で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

#### 5.5 菌株の特性検査

凍結保存菌株を用いて、各菌株のアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、生菌数、陰性対照値、陽性対照値、もどり菌の特性を検査し、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。試験に使用した菌株の凍結保存日および特性検査実施期間を表 4 に示した。

表 4 菌株の保存および特性検査実施日

菌株	凍結保存日	特性検査実施期間
<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		

5.6 前培養<sup>1),2)</sup>

- ① 滅菌済みL字型試験管(容量48 mL)にニュートリエントブロスNo.2培養液を10 mL入れ、これに凍結保存菌株を解凍した菌懸濁液を、*S. typhimurium* TA株は各20  $\mu$ L、*E. coli* WP2 *uvrA*株は10  $\mu$ L植菌し、振盪恒温槽(COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6接続型、タイテック株式会社)にセットした。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- ② プログラム制御により前培養開始まで4°C水浴中で放置した後、振盪(100回/分)しながら37°Cに加温して10時間前培養した。
- ③ 前培養終了時に各菌懸濁液の吸光度をデジタル比色計でOD値を測定し、生菌数が $1 \times 10^9$ 個/mL以上あることを確認して試験に使用した。なお、測定したOD値からの換算生菌数を表5に示した。

表5 換算生菌数(個/mL)

菌 株	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	$2.40 \times 10^9$	$2.28 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$4.94 \times 10^9$	$4.74 \times 10^9$
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	$7.42 \times 10^9$	$8.50 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA98	$4.89 \times 10^9$	$4.61 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1537	$3.31 \times 10^9$	$3.17 \times 10^9$

## 6. 培地および調製試薬

## 6.1 最少グルコース寒天平板培地

- ① 名称 : バイタルメディア AMT-S 培地  
 製造元 : 極東製薬工業株式会社  
 Lot No. :   
 製造日 :   
 購入日 :   
 保存方法 : 室温
- ② 使用寒天  
 名称 : 大洋寒天  
 製造元 : SSK セールス株式会社  
 Lot No. :

## 6.2 ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブを用いて滅菌処理 (121°C, 20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存し、1 ヶ月以内のものを使用した。

名称 : ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)  
Lot No. :   
製造元 : OXOID LTD.  
保存方法 : 室温  
保存場所 :

## 6.3 トップアガー

0.6 wt% 寒天および 0.5wt% 塩化ナトリウムの割合で調製した軟寒天液をオートクレーブで滅菌処理 (121°C, 20 分) した後、これに 0.5 mmol/L D-ビオチン-L-ヒスチジン-L-トリプトファン溶液を 10 に対して 1 の割合で加えて調製し、*S. typhimurium* TA 株と *E. coli* 株で共通で使用した。調製後は使用時まで室温で保存し、1 ヶ月以内のものを使用した。

### ① 寒天

名称 : Bacto Agar  
製造元 : Becton, Dickinson and Company  
Lot No. :   
保存方法 : 室温  
保存場所 :

### ② 塩化ナトリウム

製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社  
Lot No. :   
保存方法 : 室温  
保存場所 :

### ③ D-ビオチン

製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社  
Lot No. :   
保存方法 : 冷蔵, 遮光  
保存場所 :

### ④ L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社  
Lot No. :   
保存方法 : 室温  
保存場所 :



試験番号 [REDACTED]

保存場所 : [REDACTED] (超低温フリーザ MDF-C8V1 : パナソニック ヘルスケア株式会社)

② 補酵素

名称 : Cofactor-I  
製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社

Lot No. : [REDACTED]  
製造日 : [REDACTED]  
購入日 : [REDACTED]

保存方法 : 冷蔵

保存場所 : [REDACTED] (冷凍・冷蔵庫 MPR-414F : パナソニック ヘルスケア株式会社)

③ S9 mix の組成(1 mL 中)

水 : 0.9 mL

S9 : 0.1 mL

MgCl<sub>2</sub> : 8 μmol/mL

KCl : 33 μmol/mL

グルコース-6-リン酸 : 5 μmol/mL

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)

: 4 μmol/mL

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)

: 4 μmol/mL

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)

: 100 μmol/mL

7. 試験方法

7.1 溶媒<sup>8)</sup>

名称 : DMSO  
製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社

ロット番号 : [REDACTED]

規格 : JIS 規格 試薬特級

純度 : 100.0 %

保存方法 : 室温

保存場所 : [REDACTED]

7.2 溶媒の選択理由

本被験物質は水に不溶のため、DMSO について溶解性試験を実施した。その結果、50 mg/mL で溶解したため、DMSO を溶媒とした。

### 7.3 被験液の調製方法

#### ① 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に電子天秤を用いて被験物質を分取して秤量し、その秤量値 204.0 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算した。算出した液量 4.080 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを以下公比 4 で順次 4 段階希釈し、50, 12.5, 3.13, 0.781, 0.195 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製および試験操作は紫外線防止環境下で行い、その過程において発熱、発泡等の反応性は認められなかった。

#### ② 本試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に電子天秤を用いて被験物質を分取して秤量し、その秤量値 61.1 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算した。算出した液量 4.888 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 12 段階希釈し 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122, 0.0061, 0.0031 mg/mL の計 13 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製および試験操作は紫外線防止環境下で行い、その過程において発熱、発泡等の反応性は認められなかった。

### 7.4 プレート数

用量設定試験、本試験ともに被験物質処理群、陰性対照群および陽性対照群のいずれについても 2 枚のプレートを用いた。

### 7.5 プレートの識別

最少グルコース寒天平板培地のふたに以下の内容で、各菌株に割り当てた色のマーカーで識別した。試験番号は下 2 桁の番号とし、代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照を「SC」、陽性対照を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーでシャーレのふたに記載し、識別した。

### 7.6 試験操作 (プレインキュベーション法)<sup>1),2)</sup>

- ① 滅菌した小試験管に被験液、溶媒または陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の菌懸濁液を 0.1 mL 加え、攪拌した。
- ② 攪拌後、すぐに 37°C で 20 分間振盪 (80 回/分) しながらプレインキュベーションした。
- ③ プレインキュベーション終了後、あらかじめ電子レンジを用いて溶解し、卓上恒温槽で 45°C に保持したトップアガーを小試験管に 2.0 mL 加えて攪拌後、最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。

- ④ 無菌試験として、調製した最高用量の被験液0.1 mLおよび調製したS9 mix 0.5 mLをそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを2.0 mL加えた後に最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら①～④の一連の操作は、紫外線防止環境下で実施した。
- ⑤ 最少グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認後、最少グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°Cで用量設定試験、本試験ともに48時間培養した。
- ⑥ 培養後、プレート上の被験物質による沈殿および着色を確認した結果、代謝活性化しない場合の156 µg/plate以上、代謝活性化した場合の313 µg/plate以上の用量で沈殿が認められたため、沈殿が認められたプレートについては目視で計数した。その他のプレートはDOT COUNTER(家田貿易株式会社)を用いて計数(面積補正および数え落とし補正)した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

## 7.7 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値および陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値内であり、無菌試験および試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

## 7.8 判定基準<sup>1),2),9)</sup>

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が陰性対照値に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性および再現性が認められた場合、あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても陰性対照値に対して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

## 8. 試験結果

用量設定試験の結果を別表1、本試験の結果を別表2に示した。なお、図1~10は別表2より作成した。

### 8.1 用量設定試験の観察結果および本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mLの被験液を公比4で4段階希釈した計5用量(5000, 1250, 313, 78.1, 19.5 µg/plate)を用い、用量設定試験を実施した。

その結果、本被験物質によるプレート上の沈殿は代謝活性化の有無にかかわらず313 µg/plate以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて本被験物質処理による菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537の19.5 µg/plate以上、代謝活性化しない

場合の *S. typhimurium* TA98 および代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 の 78.1 µg/plate 以上, 代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* および *S. typhimurium* TA98 の 313 µg/plate 以上, 代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は, 代謝活性化の有無にかかわらず, いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められず, 用量反応性も認められなかった。

このため本試験は, 代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 についてはすべての用量で生育阻害が認められたため, 19.5 µg/plate を最高用量として 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.61, 0.31 µg/plate の計 7 用量, 代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 および代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 については生育阻害が認められた最低用量の 78.1 µg/plate を最高用量として 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 µg/plate の計 6 用量, 代謝活性化する場合の *E. coli* WP2 *uvrA* および *S. typhimurium* TA98 については生育阻害が認められた最低用量の 313 µg/plate を最高用量として 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 µg/plate の計 6 用量, 代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* については生育阻害が認められた最低用量の 1250 µg/plate を最高用量として 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 µg/plate の計 6 用量を設定した。

## 8.2 本試験の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は代謝活性化しない場合の 156 µg/plate 以上, 代謝活性化した場合の 313 µg/plate の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の沈殿および着色は代謝活性化の有無にかかわらず, いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて本被験物質処理による菌に対する生育阻害を観察した結果, 代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 の 19.5 µg/plate, 代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 の 78.1 µg/plate, 代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 の 39.1 µg/plate 以上, 代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 の 156 µg/plate 以上, 代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 313 µg/plate, 代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 1250 µg/plate の用量で認められた。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は, 代謝活性化の有無にかかわらず, いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められず, 用量反応性も認められなかった。

## 9. 考察

用量設定試験および本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず, 塩基対置換型およびフレームシフト型のいずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず, 用量反応性も認められなかった。

なお、類縁化合物と考えられるジフェニルジスルフィド (CAS No. 882-33-7) では Ames 試験および CHL 細胞を用いる染色体異常試験において「陰性」<sup>10)</sup>と報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下においてジベンジルジスルフィドは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

#### 10. 参考文献

- 1) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶(編): 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 2) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 3) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Nat. Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 4) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Nat. Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 5) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 6) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 7) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 8) Dorothy M. Maron, John Katzenellenbogen and Bruce N. Ames: Compatibility of Organic solvents with the Salmonella/Microsome test, Mutation Res., 88, pp.343-350, 1981.
- 9) 石館基(監修): 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, 1991.
- 10) 厚労省報告(2004), JECFA No.973 (2000)

## 試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称 : ジベンジルジスルフィド

試験番号 : [REDACTED]

試験実施期間		より [REDACTED]				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/plate)	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	TA98	TA1537
-S9 mix	陰性対照 (DMSO)	156 140 ( 148)	14 16 ( 15)	20 25 ( 23)	23 18 ( 21)	9 3 ( 6)
	19.5	108 * 116 * ( 112)	12 * 9 * ( 11)	19 24 ( 22)	19 24 ( 22)	6 * 3 * ( 5)
	78.1	91 * 88 * ( 90)	9 * 10 * ( 10)	18 17 ( 18)	12 * 12 * ( 12)	7 * 5 * ( 6)
	313 #	117 * 96 * ( 107)	8 * 1 * ( 5)	20 16 ( 18)	14 * 10 * ( 12)	1 * 4 * ( 3)
	1250 #	86 * 100 * ( 93)	12 * 8 * ( 10)	7 * 18 * ( 13)	11 * 13 * ( 12)	2 * 1 * ( 2)
	5000 #	109 * 90 * ( 100)	5 * 6 * ( 6)	17 * 14 * ( 16)	6 * 6 * ( 6)	2 * 2 * ( 2)
	+S9 mix	陰性対照 (DMSO)	134 116 ( 125)	15 16 ( 16)	24 19 ( 22)	32 35 ( 34)
19.5		123 126 ( 125)	9 11 ( 10)	24 34 ( 29)	21 20 ( 21)	4 2 ( 3)
78.1		69 * 67 * ( 68)	8 * 12 * ( 10)	18 33 ( 26)	25 26 ( 26)	6 * 3 * ( 5)
313 #		0 * 0 * ( 0)	0 * 0 * ( 0)	21 * 17 * ( 19)	0 * 0 * ( 0)	0 * 0 * ( 0)
1250 #		0 * 0 * ( 0)	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)
陽性		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2
	用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
対照	名称	B[a]P	2-AA	2-AA	B[a]P	B[a]P
	用量(µg/plate)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	コロニー数/プレート	コロニー数/プレート	コロニー数/プレート	コロニー数/プレート
		889 904 ( 897)	261 254 ( 258)	505 516 ( 511)	299 371 ( 335)	50 58 ( 54)

## 【備考】

- DMSO : ジメチルスルホキシド  
 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>3</sub> : アジ化ナトリウム  
 ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl  
 2-AA : 2-アミノアントラセン  
 B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

# : 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

( ) 内は、2枚のプレートの平均値を示す。

## 試験結果表 (本試験)

被験物質の名称 : ジベンジルジスルフィド

試験番号 : XXXXXXXXXX

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/plate)	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	TA98	TA1537
-S9 mix	陰性対照 (DMSO)	117 131 ( 124 )	19 10 ( 15 )	20 15 ( 18 )	26 28 ( 27 )	9 6 ( 8 )
	0.31	126 120 ( 123 )	14 14 ( 14 )	NT	NT	4 2 ( 3 )
	0.61	128 126 ( 127 )	8 11 ( 10 )	NT	NT	3 8 ( 6 )
	1.22	116 129 ( 123 )	18 7 ( 13 )	NT	NT	7 5 ( 6 )
	2.44	121 123 ( 122 )	10 20 ( 15 )	NT	27 26 ( 27 )	9 9 ( 9 )
	4.88	104 122 ( 113 )	7 12 ( 10 )	NT	20 32 ( 26 )	5 6 ( 6 )
	9.77	127 121 ( 124 )	9 7 ( 8 )	NT	27 34 ( 31 )	2 8 ( 5 )
	19.5	98 * 99 * ( 99 )	8 * 8 * ( 8 )	NT	30 17 ( 24 )	4 * 3 * ( 4 )
	39.1	NT	NT	23 14 ( 19 )	24 18 ( 21 )	NT
	78.1	NT	NT	25 14 ( 20 )	12 * 17 * ( 15 )	NT
	156 #	NT	NT	15 17 ( 16 )	NT	NT
	313 #	NT	NT	17 14 ( 16 )	NT	NT
	625 #	NT	NT	19 19 ( 19 )	NT	NT
	1250 #	NT	NT	12 * 10 * ( 11 )	NT	NT
+S9 mix	陰性対照 (DMSO)	153 124 ( 139 )	13 19 ( 16 )	20 15 ( 18 )	41 40 ( 41 )	13 6 ( 10 )
	2.44	116 108 ( 112 )	13 12 ( 13 )	NT	NT	10 10 ( 10 )
	4.88	154 112 ( 133 )	10 7 ( 9 )	NT	NT	3 6 ( 5 )
	9.77	117 128 ( 123 )	14 10 ( 12 )	14 20 ( 17 )	31 38 ( 35 )	8 4 ( 6 )
	19.5	119 114 ( 117 )	9 17 ( 13 )	16 17 ( 17 )	35 44 ( 40 )	7 8 ( 8 )
	39.1	110 * 106 * ( 108 )	9 * 10 * ( 10 )	20 23 ( 22 )	41 34 ( 38 )	8 * 11 * ( 10 )
	78.1	75 * 77 * ( 76 )	10 * 6 * ( 8 )	18 24 ( 21 )	42 30 ( 36 )	5 * 7 * ( 6 )
	156	NT	NT	19 21 ( 20 )	18 * 25 * ( 22 )	NT
	313 #	NT	NT	17 * 11 * ( 14 )	8 * 18 * ( 13 )	NT
陽性対照	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
S9 mixを必要としないもの	コロニー数/プレート	608 609 ( 609 )	377 374 ( 376 )	94 96 ( 95 )	453 522 ( 488 )	2326 2255 ( 2291 )
	名称	B[a]P	2-AA	2-AA	B[a]P	B[a]P
S9 mixを必要とするもの	用量(µg/plate)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	979 1015 ( 997 )	309 268 ( 289 )	548 557 ( 553 )	319 377 ( 348 )	56 59 ( 58 )

【備考】

DMSO : ジメチルスルホキシド

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>3</sub> : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2-AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

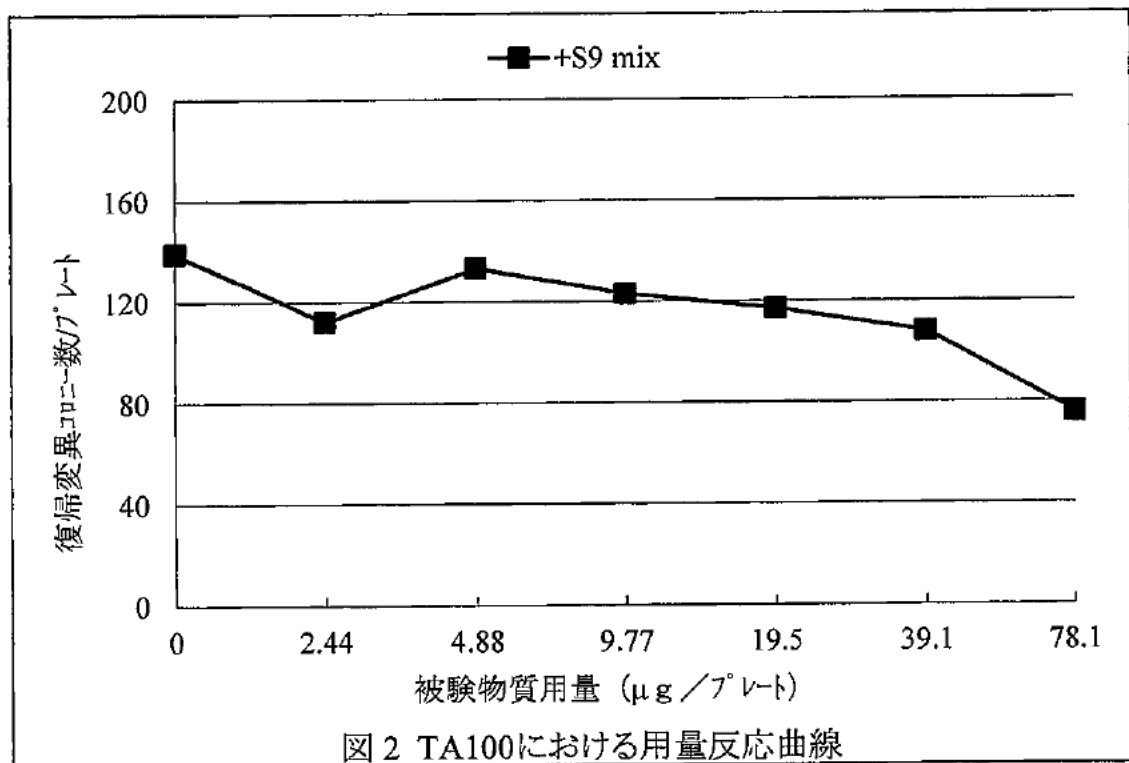
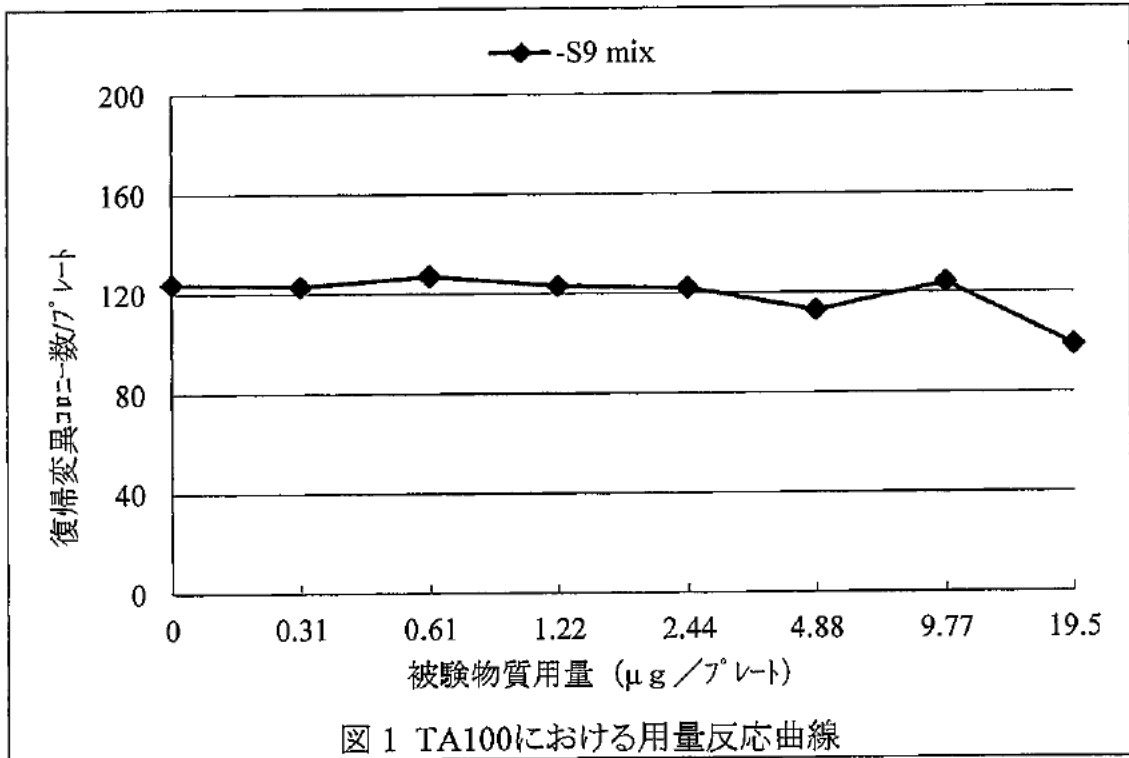
NT : 試験せず。

\* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

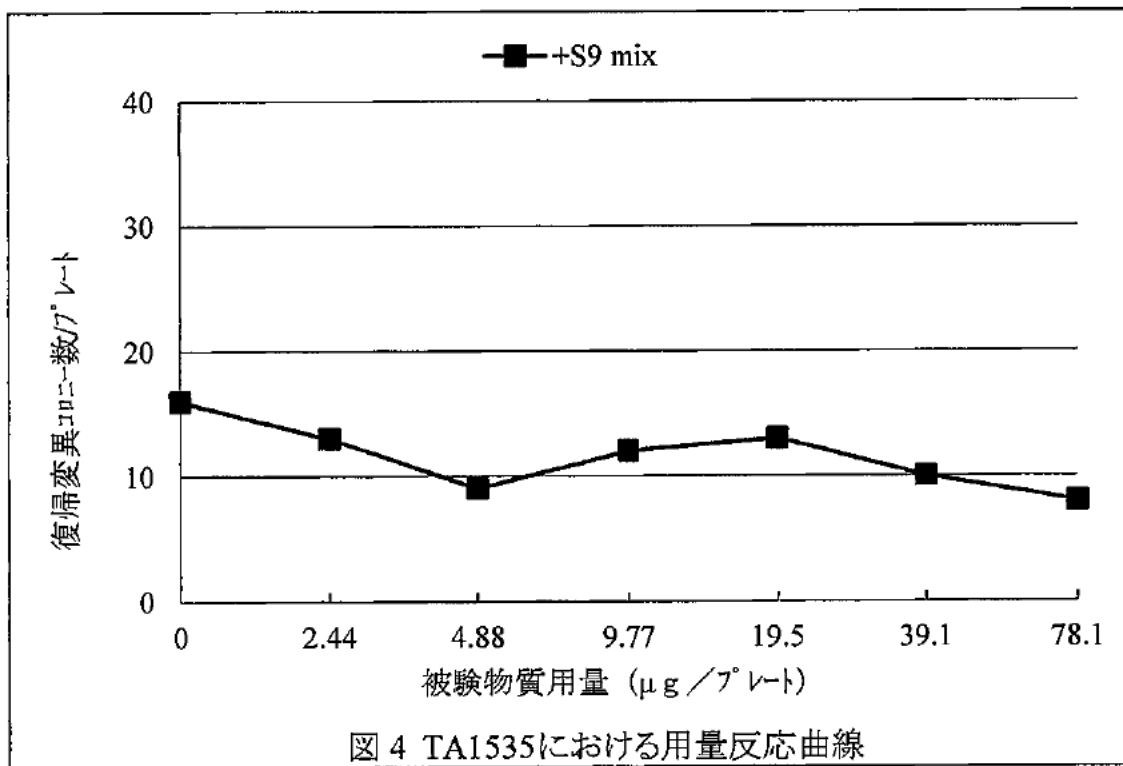
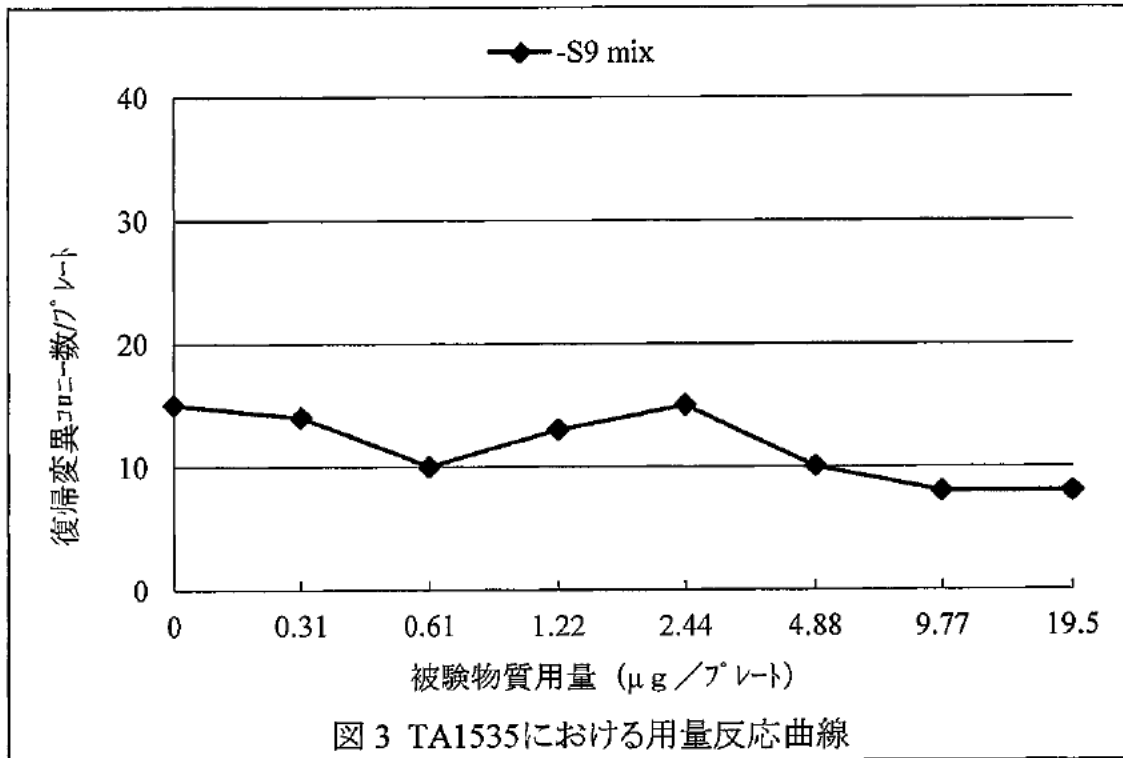
# : 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

( ) 内は、2枚のプレートの平均値を示す。

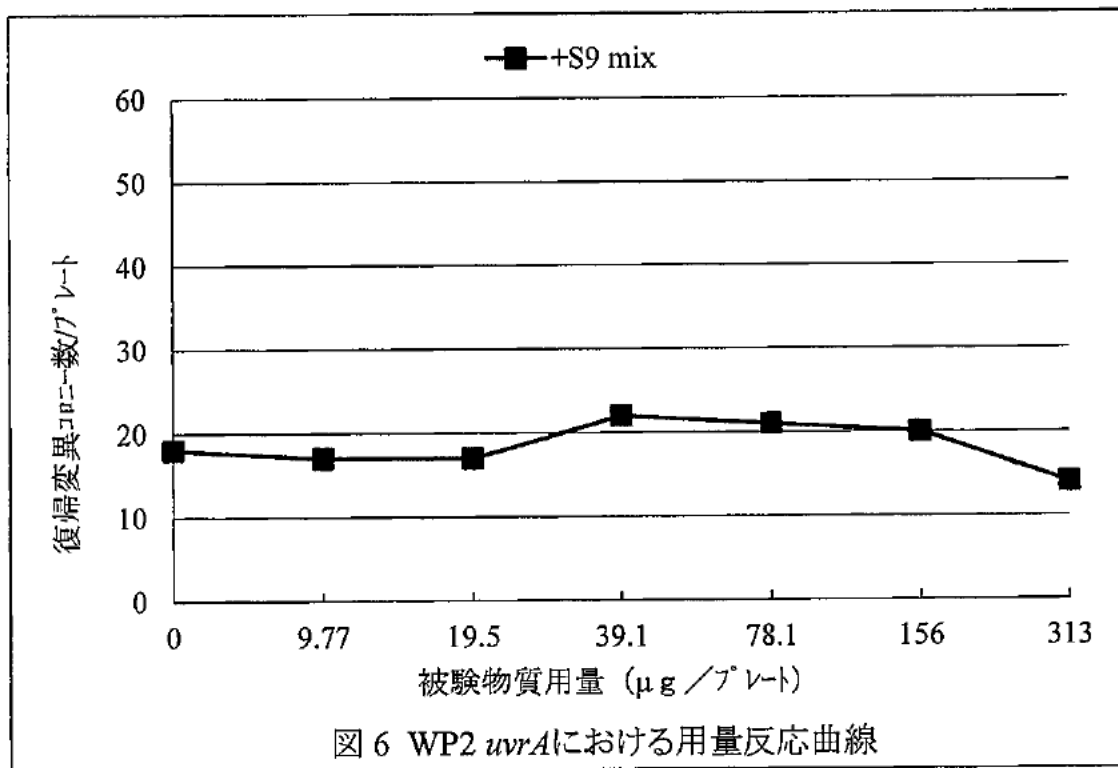
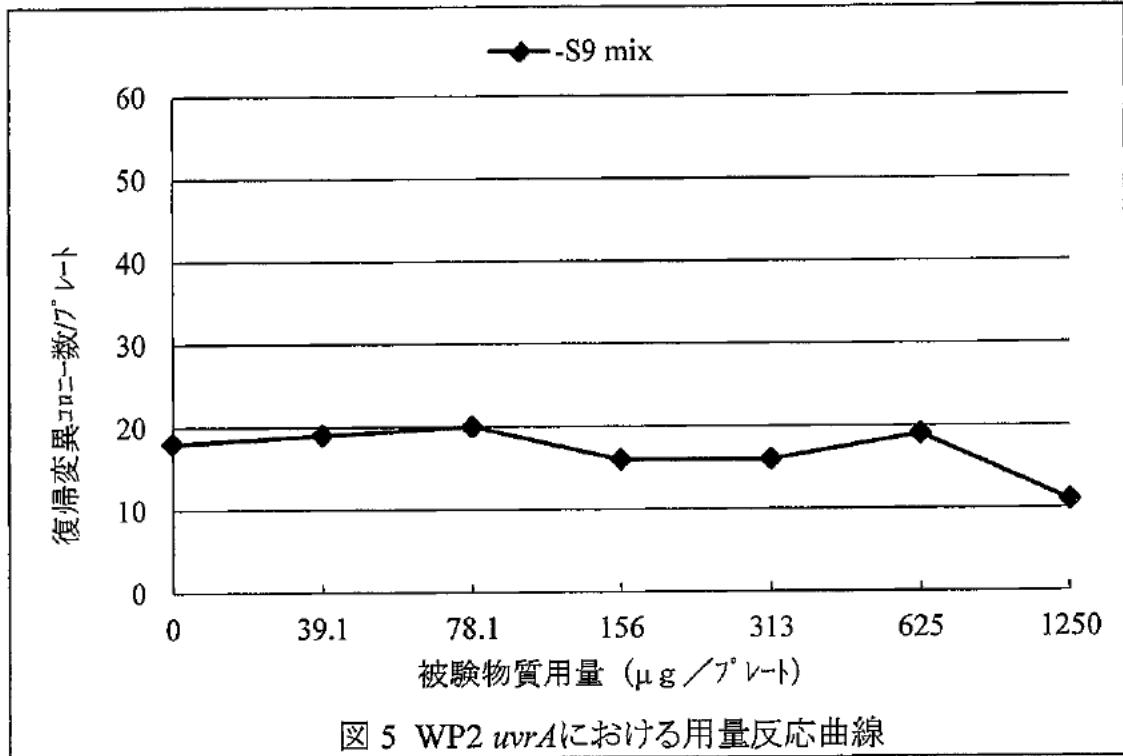
用量反応曲線(本試験)



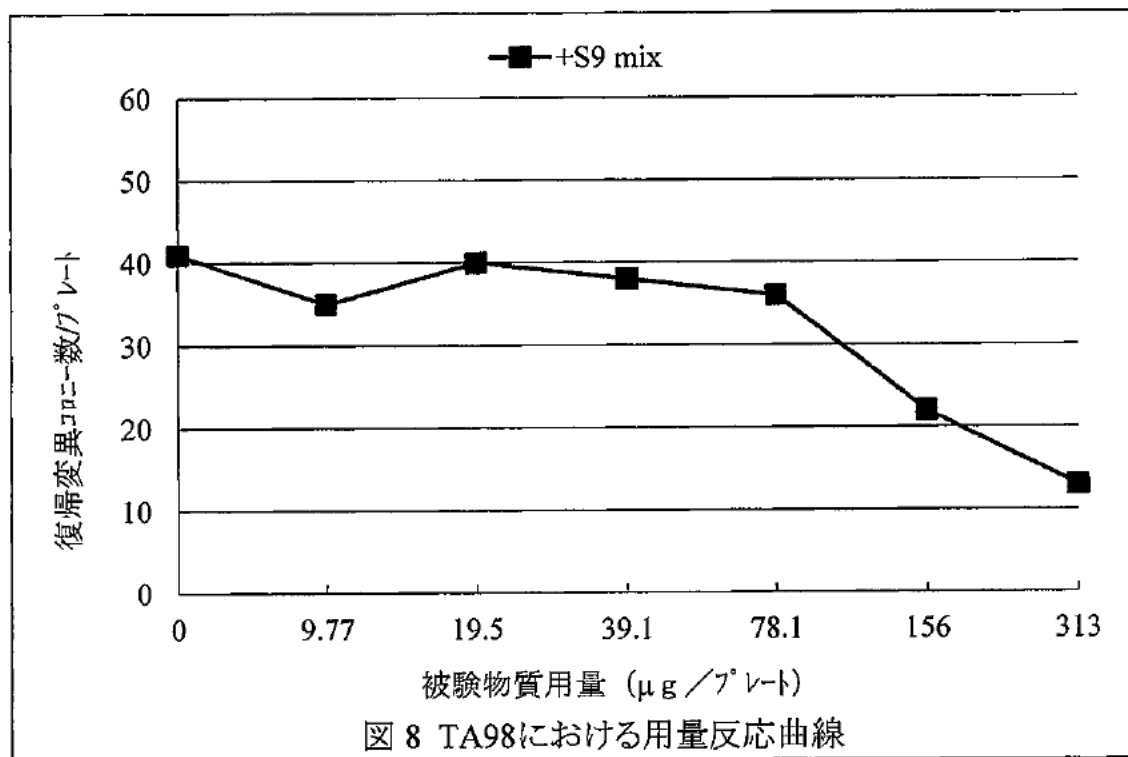
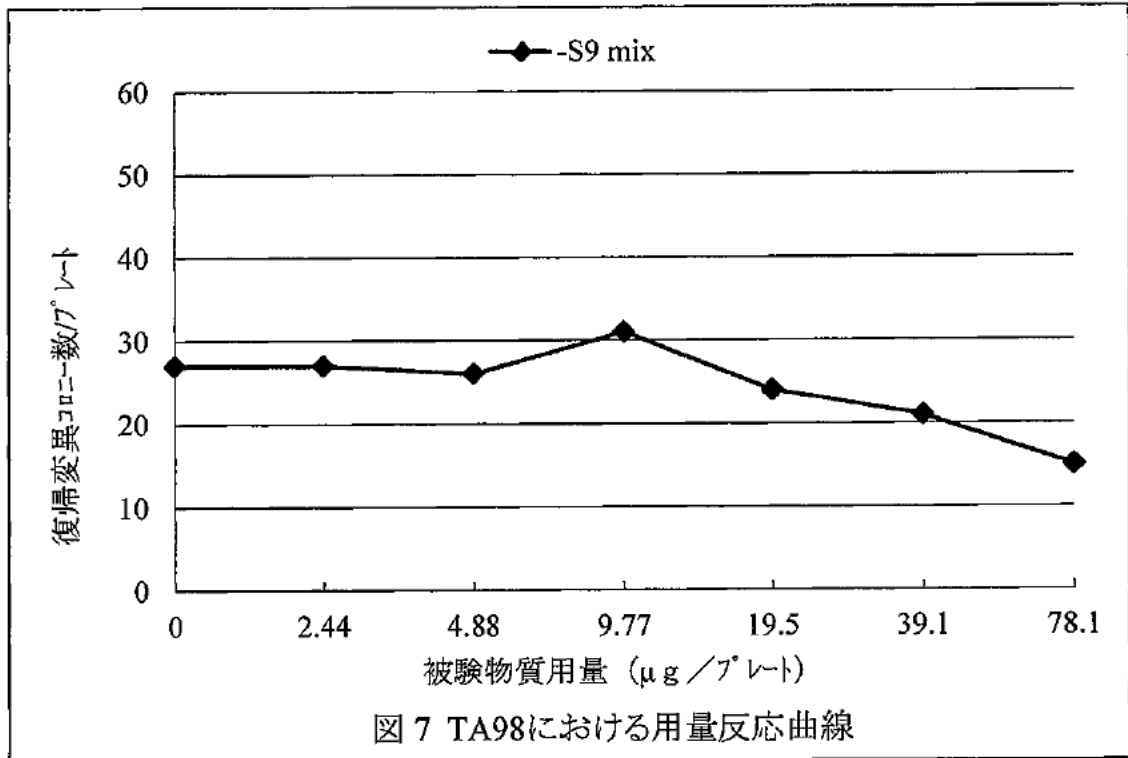
用量反応曲線(本試験)



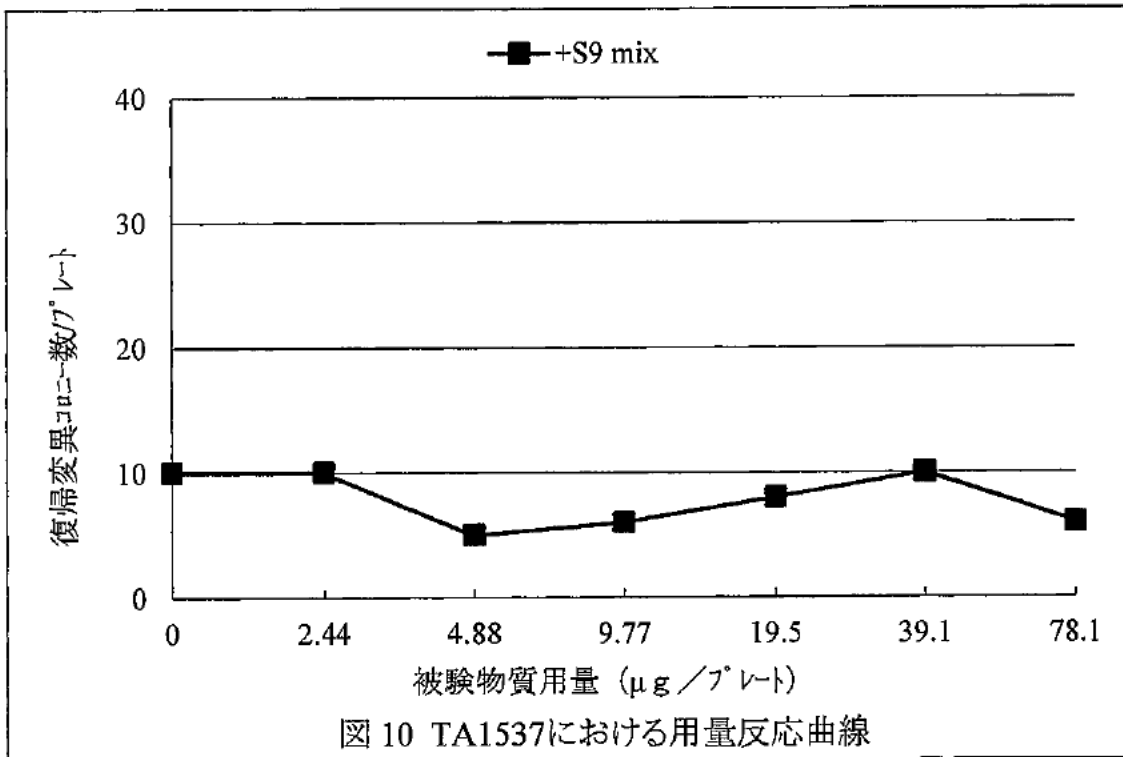
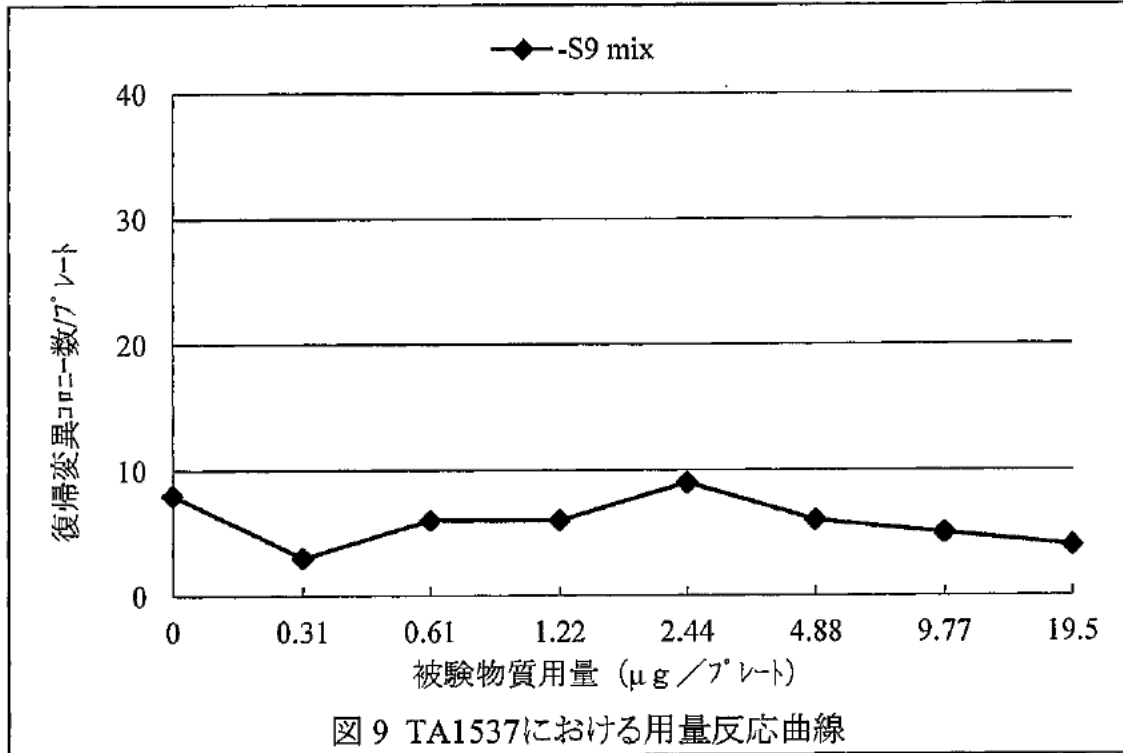
用量反応曲線(本試験)



用量反応曲線(本試験)



用量反応曲線(本試験)



**Background Data of the reverse mutation tests in bacteria**  
at [REDACTED]

CODE No. [REDACTED]

Period: [REDACTED]

(Preincubation Method)

Tester Strains	S9 mix (-) or (+)	Classification	Management ranges		Mean	Management ranges		number of plates
			-3SD	-2SD		+2SD	+3SD	
TA100	-	Solvent control	74	92	128	165	183	234
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	413	455	540	624	666	228
	+	Solvent control	78	97	137	176	196	234
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	817	927	1146	1365	1475	228
TA1535	-	Solvent control	2	5	11	18	21	234
		Positive control NaN <sub>3</sub> (0.5µg/plate)	277	331	438	546	599	228
	+	Solvent control	1	4	11	18	21	234
		Positive control 2-AA(2.0µg/plate)	214	256	340	424	466	228
WP2uvrA	-	Solvent control	6	12	24	36	42	234
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	56	72	102	133	148	228
	+	Solvent control	7	14	27	40	47	234
		Positive control 2-AA(10.0µg/plate)	320	409	587	766	855	228
TA98	-	Solvent control	4	11	24	38	45	234
		Positive control AF-2(0.1µg/plate)	430	464	532	600	634	228
	+	Solvent control	14	22	37	52	59	234
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	248	288	369	449	490	228
TA1537	-	Solvent control	1	1	7	13	16	234
		Positive control ICR-191(1.0µg/plate)	291	630	1310	1989	2329	228
	+	Solvent control	1	3	11	19	23	234
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	28	42	70	99	113	228

(Notice)

Minimal Glucose Agar Plate Medium : Vital Media AMT-S medium

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO), Acetone, *N,N*-dimethylformamide(DMF) and 1,4-Dioxane

Positive controls AF-2 :2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN<sub>3</sub> :Sodium azide

ICR-191 :2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine-2HCl

B[a]P :Benzo[*a*]pyrene

2-AA :2-aminoanthracene

S9 mix (-) :without metabolic activation

(+) :with metabolic activation