

微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	硫化ナトリウム		
別 名	Sodium sulfide		
構造式又は示性式	$S^{2-}Na^+Na^+$		
試験に供した 化学物質の純度	99.3%	試験に供した 化学物質の Lot No.	PDF3295
不純物の名称及び 含有率 (濃度)	亜硫酸塩及びチオ硫酸塩 (SO_3 として) : $\leq 1.5\%$ 鉄 : $\leq 10ppm$		
C A S 番 号	1313-82-2	蒸 気 圧	—
分 子 量	78.04	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融 点	950°C	沸 点	—
沸 点	—	常温における性状	薄い褐色のフレーク、一部に着色の濃い部分を含む
安 定 性	水：不安定 (加水分解する。) 光：不安定 (変質する。) 熱：—		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶 媒 中 の 安 定 性
	水	15.4g/100g(10°C)	不安定 [水を加えると発熱・発泡する。]*
	DMSO	難溶[50mg/ml 未満、 (100mg/ml 以上懸濁可能)]*	— [DMSO を加えた際に発熱・発泡はみられない。]*

*日本バイオアッセイ研究センターの試験による。

2 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日
TA100	東京大学医科学研究所癌生物学研究部	1985年 6月 21日
TA1535	同 上	1988年 5月 16日
TA98	同 上	1988年 5月 16日
TA1537	同 上	1988年 5月 16日
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	同 上	1983年 6月 29日

3 S9 mix

(1) S9の入手方法等

自 製 ・ 購 入 の 別	1. 自 製 ②. 購 入 (製造元: キッコーマンバイオケミファ株式会社)
製 造 年 月 日	2014年 9月 5日 製造
購入の場合のLot No.	RAA201409A
保 存 温 度	-80℃ (保存機器名 三洋電機株式会社 MDF-392AT)

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley (Slc:SD)	名 称	フェノバルビタール(PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄		
週 齢	7 週	投与方法	腹腔内投与
体 重	188~236 g	投与期間及び投与量 (g/kg体重)	1日目(投与開始日) : PB 0.03 2日目~4日目 : PB 0.06 3日目 : BF 0.08

(3) S9 mixの組成

成 分	S9 mix 1 ml 中の量	成 分	S9 mix 1 ml 中の量
S9	0.1 ml	NADPH	4 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-リン酸緩衝液	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	その他 (-)	-

4 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グ レード	純 度 (%)
	ジメチルスルホキシド (DMSO)	SIGMA-ALDRICH Co.	SHBF0107V	anhydrous	99.99
溶媒選択の理由	被験物質に水を加えた際に反応し発熱、発泡が見られた。被験物質の溶解度は、DMSO に 50 mg/ml 未満であるが 100 mg/ml [被験物質溶液量をプレート当たり 50 μ l にした場合に 5000 μ g の被験物質量に相当する] 以上懸濁可能であり、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかったことから溶媒に DMSO を選択した。				
被験物質溶液の性状	溶 解	懸 濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	被験物質に DMSO を加え乳鉢を用い粉碎し懸濁させた。				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	30分、	25℃		
	本試験	40分、	25℃		
純度換算の有無	有		無		

5 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoid ニュートリエントブロス No.2	OXOID LTD.	941971
前 培 養 時 間	10 時間 00 分		
培養容器 (形状・容量)	形 状 : 三角フラスコ	容 量 : 62.5 ml	
培 養 液 量	15 ml	接 種 菌 量	30 μ l

(2) 前培養終了時の生菌数等

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)	用 量 設 定 試 験	2.20	3.30	3.95	2.57	2.41
	本 試 験	2.27	3.31	4.03	2.70	2.41
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと)		①. O.D. 値よりの換算		2. 段階希釈法		
		3. その他 ()				

6 最少グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 (2.) 購入(製造元：オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2014年9月2日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI440ID
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No. 等	使用寒天の名称：伊那寒天 BA-30A 製造元：伊那食品工業株式会社 Lot No. : 31122

7 試験の方法

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	(1.) プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他 ()
その他の場合は その選定理由	—

(2) 試験条件 (プレート当たり)

プレインキュベーション法		
組 成	菌懸濁液	0.1 ml
	被験物質溶液	0.05 ml
	Na-リッ酸緩衝液(直接法による場合)	0.5 ml
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5 ml
	トップアガー	2 ml
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	48 時間

8 コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル計測 (2.) 機器計測
補正の有無	1. 無 (2.) 有(補正の方法 面積及び数え落とし補正)

9 試験結果

(1) 試験の結果は別表による。

(2) 結果の判定

判 定	陽性 陰性
<p>[判定の理由]</p> <p>用量設定試験の結果を表-1に、本試験の結果を表-2及び図-1～10に示した。</p> <p>用量設定試験を最高用量5000 μg/7°プレートより公比4の7用量で実施したが、TA98、TA100、TA1535、TA1537及び WP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合に陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。生育阻害はすべての菌株の直接法による場合と代謝活性化法による場合にみられた。</p> <p>最高用量を生育阻害を示す用量とし本試験を実施したところ、用量設定試験と同様、TA98、TA100、TA1535、TA1537及び WP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合に陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。</p> <p>陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。</p> <p>以上の結果より、硫化ナトリウムの微生物に対する変異原性は、陰性と判定した。</p>	

(3) 参考事項

特記事項なし。

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：硫化ナトリウム

試験実施期間		2015年 1月 6日から 2015年 1月 9日										
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/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 (溶媒対照)	128 123	8 7	99 97	15 17	10 15	126 129 (127)	9 6 (8)	94 97 (97)	22 25 (20)	9 10 (11)	
	1.22	114 124 (119)	9 7 (8)	124 89 (107)	17 18 (18)	13 10 (12)						
	4.88	129 114 (122)	8 10 (9)	107 114 (111)	17 16 (17)	20 13 (17)						
	19.5	116 115 (116)	7 9 (8)	97 112 (105)	18 20 (19)	18 15 (17)						
	78.1	121 105 (113)	8 8 (8)	108 102 (105)	14 21 (18)	17 16 (17)						
	313	136 145 (141)	8 10 (9)	112 104 (108)	32 22 (27)	17 20 (19)						
	1250	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	122 136 (129)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)						
	5000	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)						
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	121 133	7 11	144 124	18 17	17 17	134 119 (127)	7 10 (9)	149 117 (134)	17 24 (19)	16 17 (17)
		1.22	122 116 (119)	6 6 (6)	122 129 (126)	28 29 (29)	16 16 (16)					
		4.88	137 129 (133)	10 11 (11)	106 121 (114)	18 18 (18)	26 18 (22)					
		19.5	146 119 (133)	6 3 (5)	115 124 (120)	21 17 (19)	13 17 (15)					
		78.1	126 113 (120)	14 11 (13)	102 116 (109)	24 18 (21)	14 20 (17)					
		313	145 122 (134)	13 10 (12)	114 114 (114)	28 20 (24)	9 22 (16)					
		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*)					
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称 AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA	用量(μg/プレート) 0.01	0.5	0.005	0.1	80
		コロニー数/プレート	687 720 (704)	328 347 (338)	1154 1133 (1144)	529 511 (520)	640 636 (638)					
対照	S9 mixを必要とするもの	名称 2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	用量(μg/プレート) 1	2	2	0.5	2	
	コロニー数/プレート	1478 1432 (1455)	266 286 (276)	844 851 (848)	526 531 (529)	287 263 (275)						

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

表-2

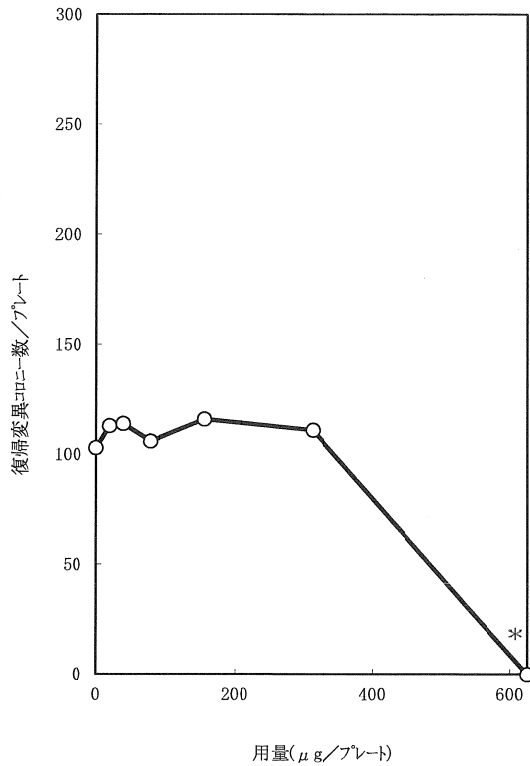
試験結果表（本試験）

被験物質の名称：硫化ナトリウム

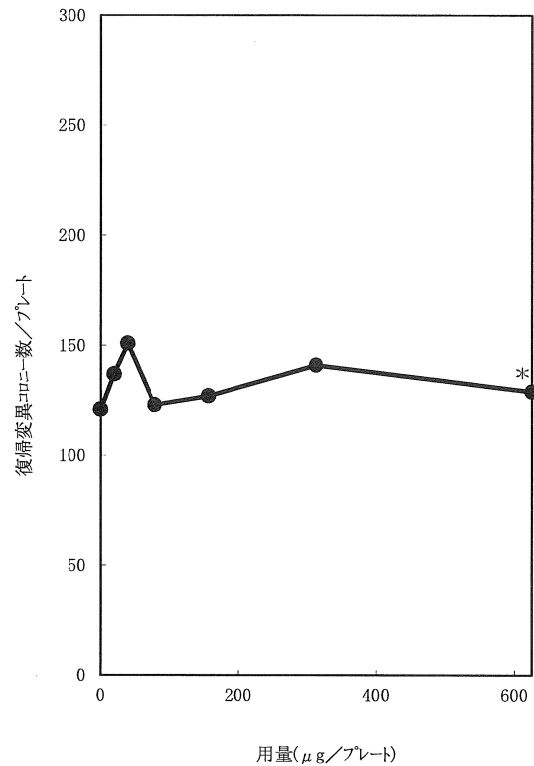
試験実施期間		2015年 1月 19日から 2015年 1月 22日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	106 107 101 98 (103)	10 15 10 17 (13)	85 104 107 87 (96)	22 13 22 22 (20)	16 15 21 17 (17)	
	19.5	117 108 (113)	17 15 (16)	/	17 17 (17)	11 11 (11)	
	39.1	100 128 (114)	20 7 (14)	/	16 15 (16)	13 15 (14)	
	78.1	101 111 (106)	13 14 (14)	93 98 (96)	13 22 (18)	11 9 (10)	
	156	121 111 (116)	16 8 (12)	92 98 (95)	20 18 (19)	6 11 (9)	
	313	112 109 (111)	11 11 (11)	102 101 (102)	17 24 (21)	8 10 (9)	
	625	0* 0* (0*)	3* 8* (6*)	112 90 (101)	0* 0* (0*)	11 8 (10)	
	1250	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	136 119 (128)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	
	2500	/	/	0* 0* (0*)	/	/	
	5000	/	/	0* 0* (0*)	/	/	
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	123 115 114 130 (121)	14 10 14 10 (12)	123 109 123 106 (115)	24 20 31 22 (24)	10 20 10 13 (13)	
	19.5	143 130 (137)	16 9 (13)	117 98 (108)	20 20 (20)	13 14 (14)	
	39.1	148 153 (151)	9 18 (14)	114 102 (108)	21 20 (21)	11 9 (10)	
	78.1	109 137 (123)	16 20 (18)	122 113 (118)	29 28 (29)	16 9 (13)	
	156	119 134 (127)	8 17 (13)	128 113 (121)	25 25 (25)	10 13 (12)	
	313	148 133 (141)	18 20 (19)	141 134 (138)	32 29 (31)	13 16 (15)	
	625	130* 127* (129*)	20* 13* (17*)	119 113 (116)	25* 21* (23*)	14* 13* (14*)	
	1250	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	703 707 (705)	311 356 (334)	1136 990 (1063)	532 506 (544)	482 444 (463)
		コロニー数/プレート	1474 1488 (1481)	294 340 (317)	849 897 (873)	534 524 (529)	290 255 (273)

【備考】

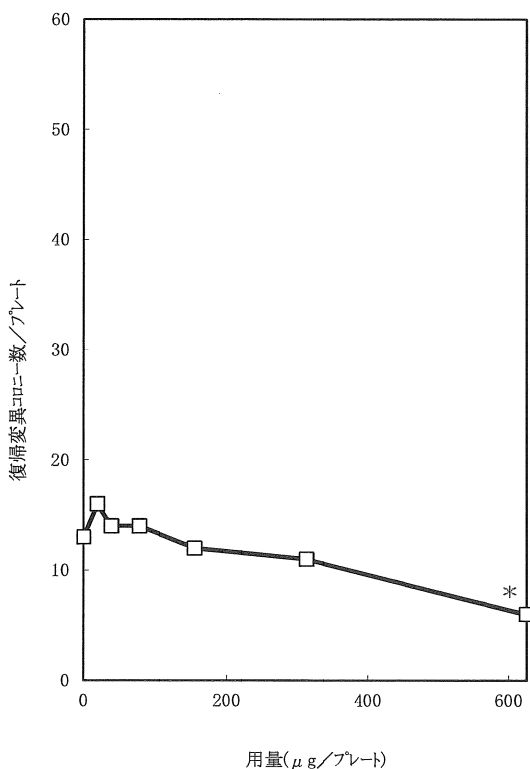
1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン



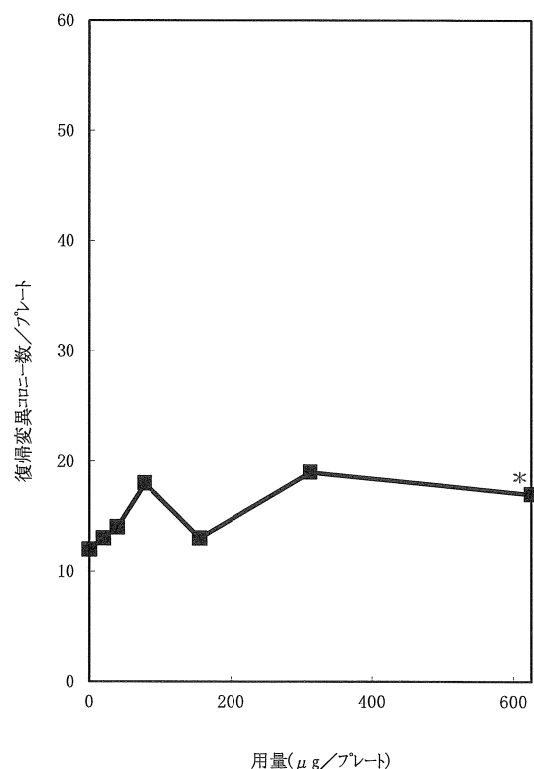
用量(μg/プレート)
 図-1 TA100における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-2 TA100における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-3 TA1535における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-4 TA1535における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

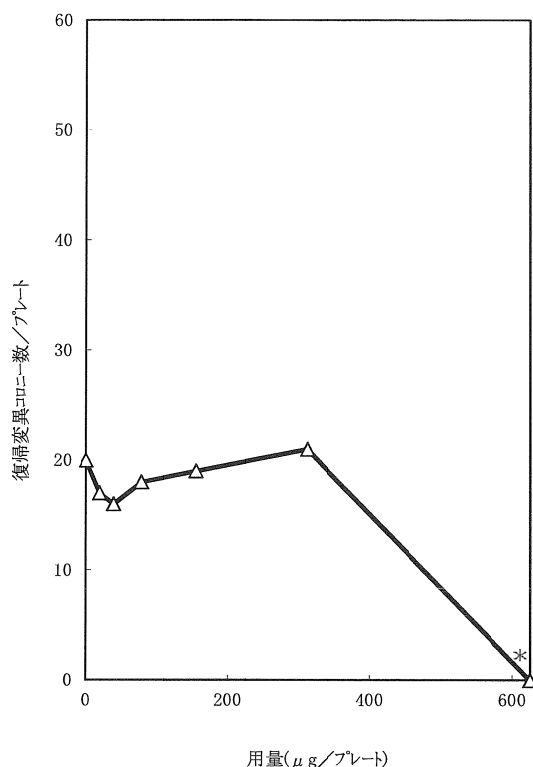


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)
(625 μg/プレートまでプロットした。)

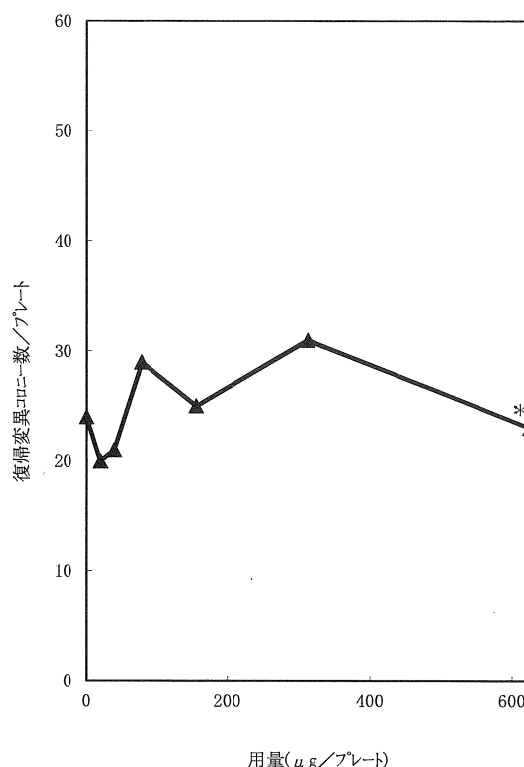


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)
(625 μg/プレートまでプロットした。)

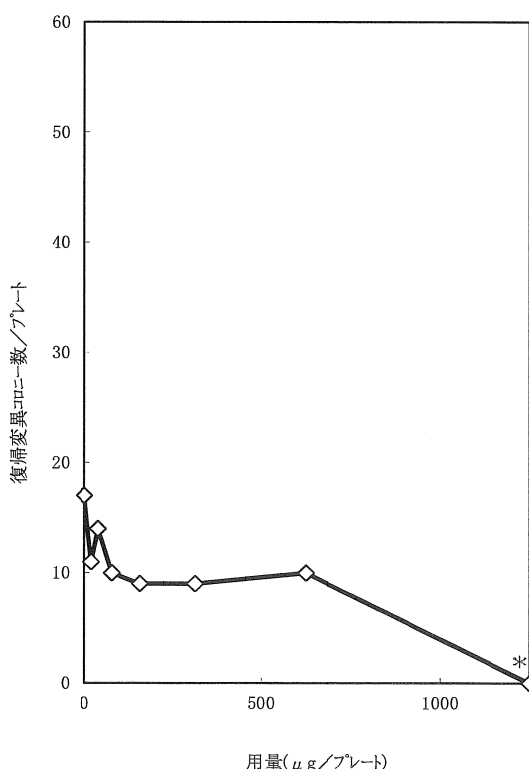


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

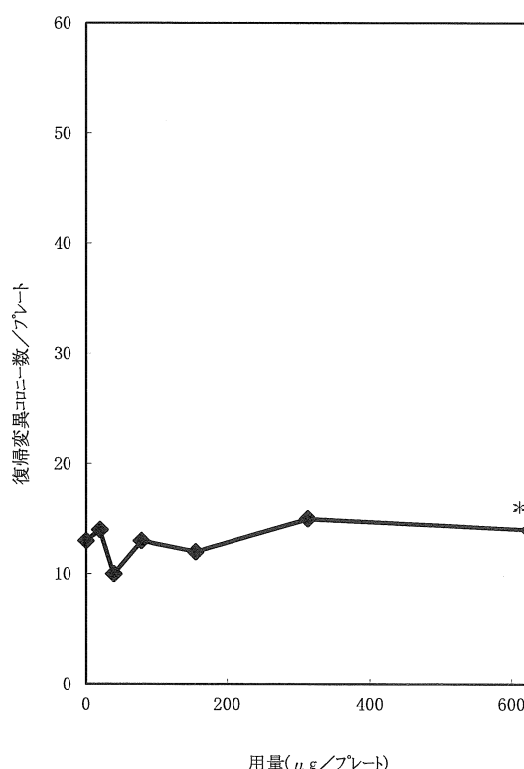


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)
(625 μg/プレートまでプロットした。)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

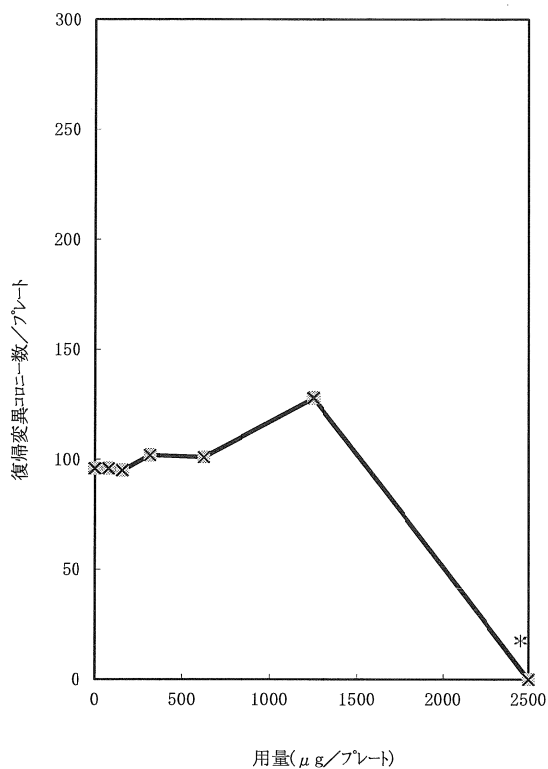


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)
(2500 μg/プレートまでプロットした。)

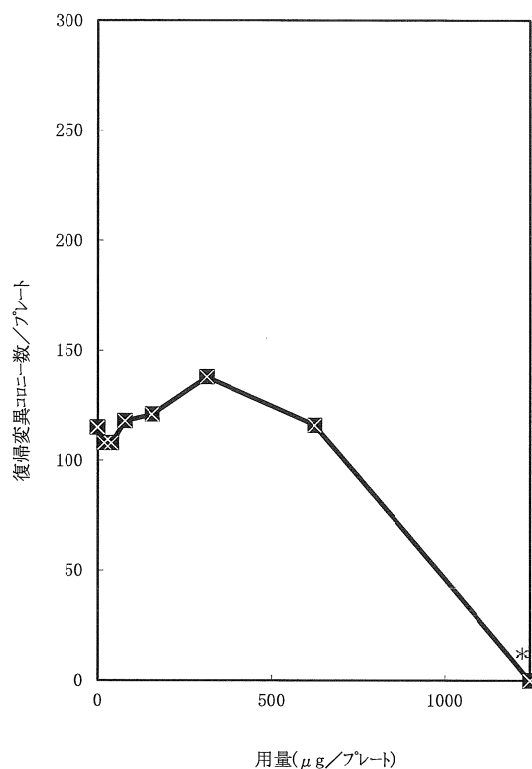


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。