

## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

### 1. 一般的な事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	カリウム=ジメチルジチオカルバマート		
別 名	Busan® 85		
構造式又は示性式（いずれも不明な場合はその製法の概要）	$  \begin{array}{c}  \text{H}_3\text{C}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{S})-\text{S}^- \quad \text{K}^+  \end{array}  $		
試験に供した新規化学物質の純度	99.5%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	B0116
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	128-03-0	蒸気圧	
分子量	159.31	分配係数	
融 点		常温における性状	固体
沸 点			
安定性	安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMSO	50 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン		
	その他		

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報による。なお、溶解度及び溶媒中の安定性については、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果である。

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	独立行政法人 製品評価技術基盤機構	2011年10月20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	2015年12月18日
購入の場合 Lot No.	RAA201512A
保存温度	-86.1~ -70.6°C (保存期間: 2016年1月21日~2016年3月9日)

(2) S9 の調製方法

使 用 動 物		誘 導 物 質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB& 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間及び 投与量 (mg/kg 体重)	PB4日間連続投与: 30+60+60+60(mg/kg 体重) PB投与3日目 BF投与: 80(mg/kg 体重)
体重	190~243 g		

(3) S9Mix の組成

成 分	S9Mix 1mL 中の量	成 分	S9Mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmol
MgCl <sub>2</sub>	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol	その他 ( )	

#### 4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名 称 DMSO	製 造 元 和光純薬工業 株式会社	Lot No. ECH3050	グレード JIS 規格 試薬特級	純度(%) 99.0%以上
溶媒選択の理由	水、DMSOについて溶解性試験を実施した。その結果、水に50 mg/mLで溶解せず、DMSOに50 mg/mLで溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったためDMSOを溶媒として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラーシーブス4A 1/16（和光純薬工業株式会社；Lot No. HWL7297）で脱水したDMSOを使用した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="radio"/> 溶解 <input type="radio"/> 懸濁 <input type="radio"/> その他				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法					
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用時調製・室温				
純度換算の有無	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無				

#### 5. 前培養の条件

##### (1) 条件

ニュートリエントブロス	名 称 Nutrient Broth No.2	製 造 元 OXOID LTD.	Lot No. 1239615
前 培 養 時 間	9 時間		
培養容器(形状・容器)	L字管・48mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	<i>S. typhimurium</i> 株 20 $\mu$ L <i>E. coli</i> 株 10 $\mu$ 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>	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	4.33	4.73	8.61	6.31
	本試験	4.37	4.80	8.52	5.69
測定方法		① O.D.値より換算 2. 段階希釈法 3. その他			

## 6. 最小グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 ②. 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2016年2月9日
購入の場合のLot No.	DZLH2901
使用寒天の名称・製造・Lot No.	OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1309432

## 7. 試験の方法

### (1) 試験方法とその選択理由

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 その選択理由	

### (2) 試験条件

組成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液 (直接法による場合)	0.5 mL
	S9Mix (代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トップアガー	2.0 mL
プレインキュベーション	温度	37°C
	時間	20分間
インキュベーション	温度	37°C
	時間 (用量設定試験)	48時間
	時間 (本試験)	49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 面積補正:補正值 1.21)

## 9. 試験の結果

(1) 試験の結果は別表による。

(2) 結果の判定

判 定	陽性	陰性
判定の理由		
<p>用量設定試験の結果を別表1に、本試験の結果を別表2に、比活性を別表3に示した。なお、図1~10は別表2より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データをAttached Dataとして添付した。</p> <p>用量設定試験及び本試験ともに代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 及び TA1535において復帰変異コロニー数の増加が認められ、<i>S. typhimurium</i> TA1535においては、陰性対照値の2倍以上となる用量反応性を伴う増加が認められ再現性も認められた。なお、最大比活性値は、本試験における代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA1535 の <math>1.12 \times 10^1</math> (Rev/mg) であった。</p> <p>一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下においてカリウム=ジメチルジチオカルバマートは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。</p>		

(3) 参考事項

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  $313 \mu\text{g}/\text{plate}$  以上、代謝活性化した場合の  $1250 \mu\text{g}/\text{plate}$  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。

菌に対する生育阻害は、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認められなかった。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

(別表1)

## 試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: カリウム=ジメチルジチオカルバマート

No. T-2000

試験実施期間		2016年3月3日より2016年3月7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	TA98	TA1537
S9Mix(-)	陰性対照(DMSO)	85 102 ( 94 )	6 10 ( 8 )	30 29 ( 30 )	21 26 ( 24 )	7 16 ( 12 )
	1.22	119 128 ( 124 )	6 7 ( 7 )	36 32 ( 34 )	17 13 ( 15 )	4 6 ( 5 )
	4.88	154 150 ( 152 )	10 8 ( 9 )	26 36 ( 31 )	14 16 ( 15 )	5 4 ( 5 )
	19.5	170 123 ( 147 )	7 10 ( 9 )	31 40 ( 36 )	19 12 ( 16 )	6 6 ( 6 )
	78.1	117 122 ( 120 )	6 10 ( 8 )	30 23 ( 27 )	14 10 ( 12 )	11 4 ( 8 )
	313 #	146 120 ( 133 )	4 6 ( 5 )	26 32 ( 29 )	11 13 ( 12 )	4 6 ( 5 )
	1250 #	145 146 ( 146 )	16 23 ( 20 )	36 46 ( 41 )	23 12 ( 18 )	4 4 ( 4 )
		162 194 ( 178 )	30 40 ( 35 )	26 40 ( 33 )	12 20 ( 16 )	7 13 ( 10 )
	S9Mix(+)	陰性対照(DMSO)	145 156 ( 151 )	12 16 ( 14 )	35 33 ( 34 )	36 23 ( 30 )
		1.22	136 130 ( 133 )	9 13 ( 11 )	30 34 ( 32 )	36 36 ( 36 )
		4.88	123 132 ( 128 )	20 16 ( 18 )	30 36 ( 33 )	26 26 ( 26 )
		19.5	163 183 ( 173 )	20 15 ( 18 )	28 36 ( 32 )	27 30 ( 29 )
		78.1	175 156 ( 166 )	18 21 ( 20 )	31 41 ( 36 )	30 40 ( 35 )
		313	126 178 ( 152 )	15 16 ( 16 )	46 36 ( 41 )	31 31 ( 31 )
		1250 #	182 134 ( 158 )	18 23 ( 21 )	31 36 ( 34 )	30 28 ( 29 )
			160 180 ( 170 )	16 13 ( 15 )	46 37 ( 42 )	26 20 ( 23 )
		5000 #				8 4 ( 6 )
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
		用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数/プレート	600 612 ( 606 )	246 220 ( 233 )	77 80 ( 79 )	405 432 ( 419 )
	S9Mixを必要とするもの	名称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P
		用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0
		コロニー数/プレート	666 994 ( 830 )	276 243 ( 260 )	521 509 ( 515 )	358 431 ( 395 )
						119 105 ( 112 )

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : 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

2AA : 2-アミノアントラセン

B[α]P : ベンゾ[α]ピレン

# : 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。

(別表2)

## 試験結果表(本試験)

被験物質の名称: カリウム=ジメチルジチオカルバマート

No. T-2000

試験実施期間		2016年3月8日より2016年3月11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	TA98	TA1537
S9Mix(-)	陰性対照(DMSO)	104 110 ( 107 )	14 9 ( 12 )	26 28 ( 27 )	17 16 ( 17 )	5 8 ( 7 )
	313 #	114 115 ( 115 )	16 16 ( 16 )	31 25 ( 28 )	19 15 ( 17 )	5 6 ( 6 )
	625 #	128 104 ( 116 )	12 15 ( 14 )	29 27 ( 28 )	21 14 ( 18 )	4 3 ( 4 )
	1250 #	117 127 ( 122 )	24 27 ( 26 )	27 37 ( 32 )	16 13 ( 15 )	7 4 ( 6 )
	2500 #	117 113 ( 115 )	29 28 ( 29 )	29 28 ( 29 )	16 12 ( 14 )	5 6 ( 6 )
		154 182 ( 168 )	33 34 ( 34 )	41 38 ( 40 )	15 13 ( 14 )	3 3 ( 3 )
	陰性対照(DMSO)	124 141 ( 133 )	12 13 ( 13 )	32 28 ( 30 )	35 34 ( 35 )	10 11 ( 11 )
	313	166 151 ( 159 )	22 14 ( 18 )	36 42 ( 39 )	36 24 ( 30 )	7 8 ( 8 )
S9Mix(+)	625	142 125 ( 134 )	21 22 ( 22 )	42 37 ( 40 )	25 24 ( 25 )	8 5 ( 7 )
	1250 #	147 131 ( 139 )	15 21 ( 18 )	35 34 ( 35 )	24 19 ( 22 )	6 3 ( 5 )
	2500 #	151 153 ( 152 )	20 24 ( 22 )	41 32 ( 37 )	18 17 ( 18 )	8 4 ( 6 )
		141 134 ( 138 )	19 13 ( 16 )	28 18 ( 23 )	21 16 ( 19 )	4 5 ( 5 )
	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用 量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	521 612 ( 567 )	239 208 ( 224 )	71 67 ( 69 )	305 282 ( 294 )	995 1065 ( 1030 )
	名 称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P	B[α]P
陽性対照	用 量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	981 958 ( 970 )	284 250 ( 267 )	585 611 ( 598 )	385 391 ( 388 )	98 111 ( 105 )

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : 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

2AA : 2-アミノアントラセン

B[α]P : ベンゾ[α]ピレン

# : 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。

(別表3)

## 比活性

被験物質の名称：カリウム＝ジメチルジチオカルバマート

No. T-2000

	菌株名	-S9Mix		+S9Mix	
		比活性	計算に使用した用量 ( $\mu$ g/plate)	比活性	計算に使用した用量 ( $\mu$ g/plate)
用 量 設 定 試 験	TA100				
	TA1535	$9.60 \times 10^0$	1250		
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
本 試 験	TA100				
	TA1535	$1.12 \times 10^1$	1250		
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				

図 1

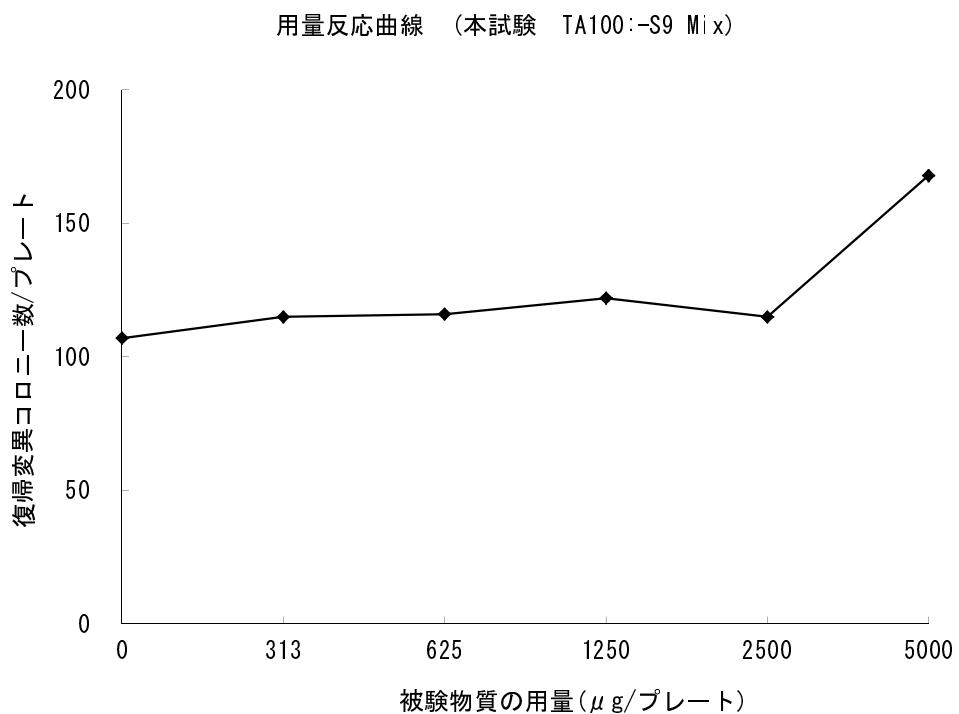


図 2

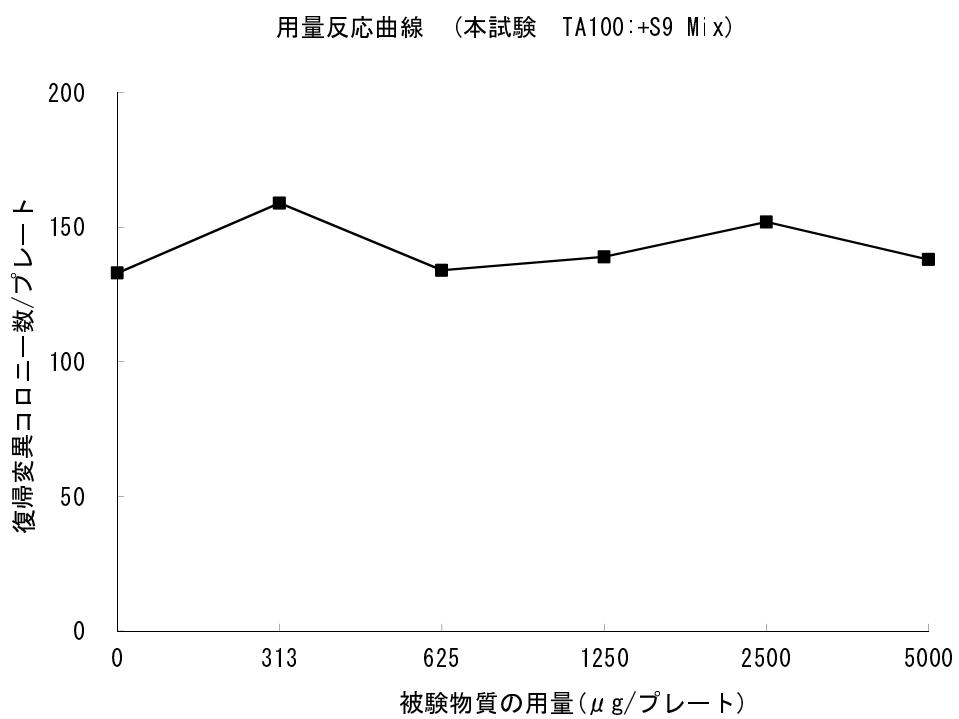


図 3

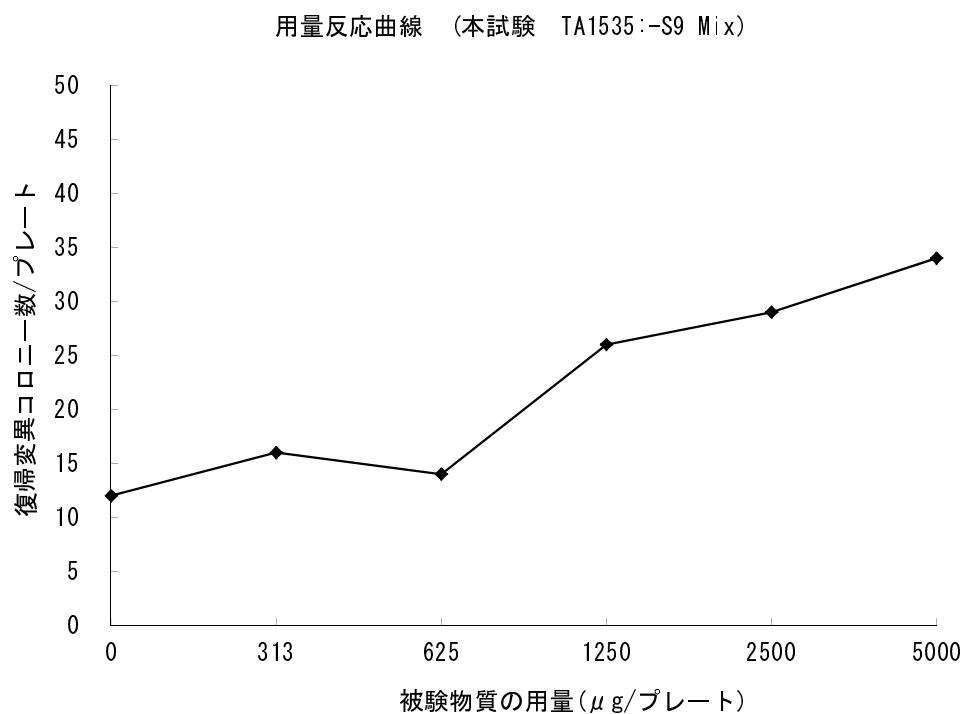


図 4

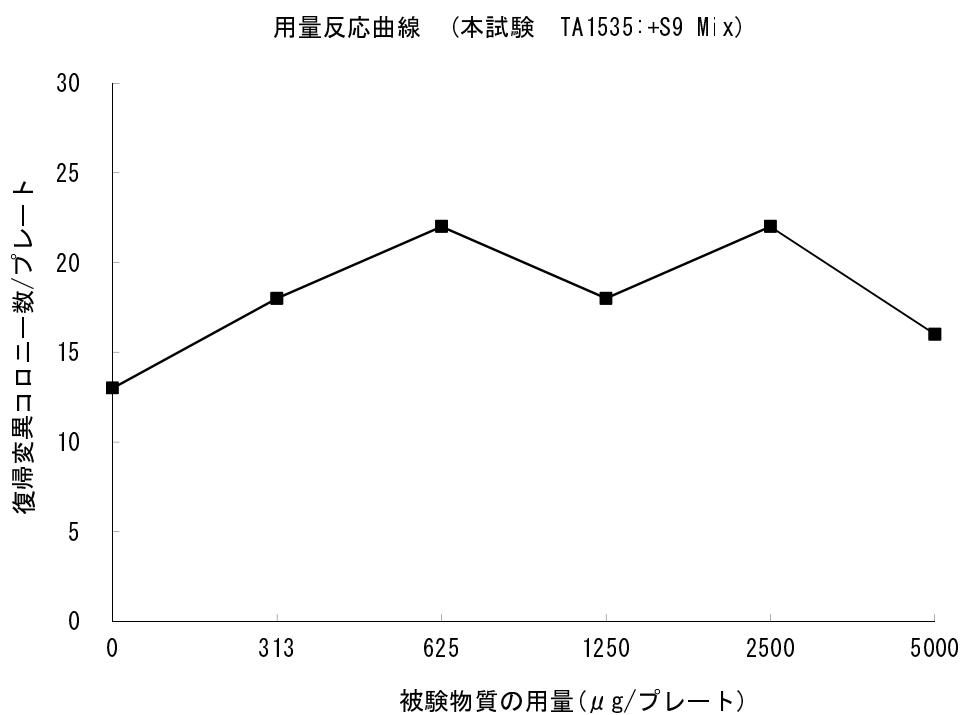


図 5

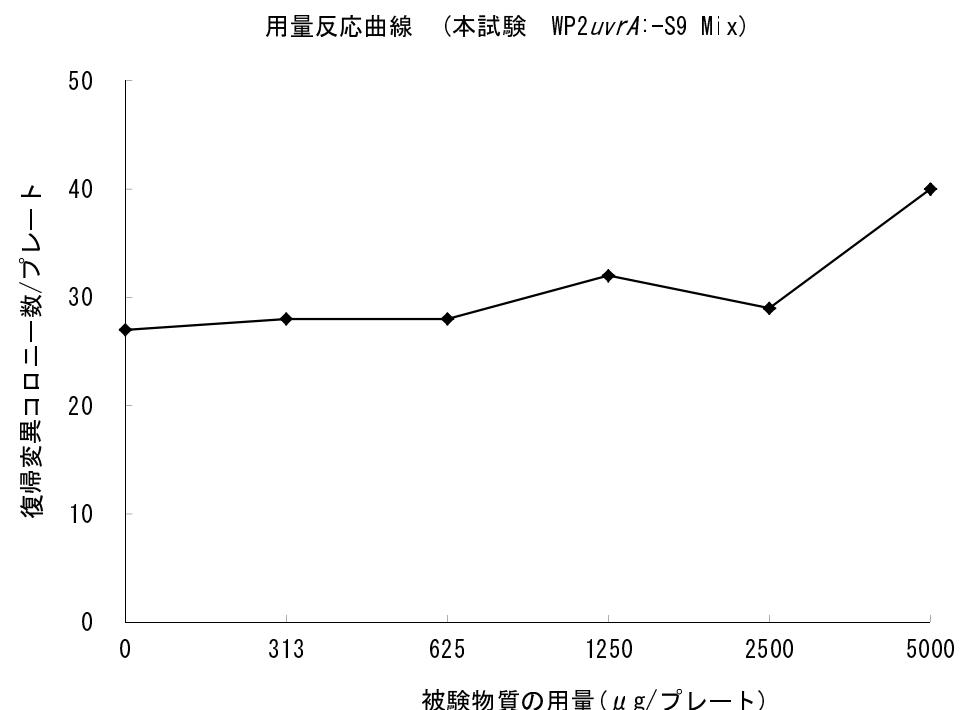


図 6

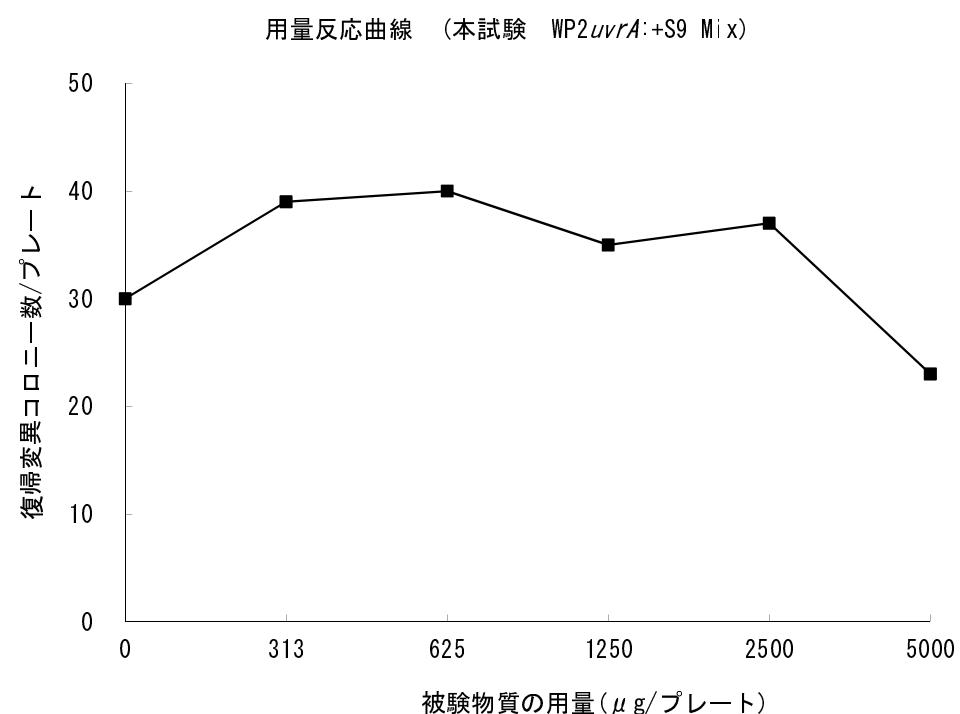


図 7

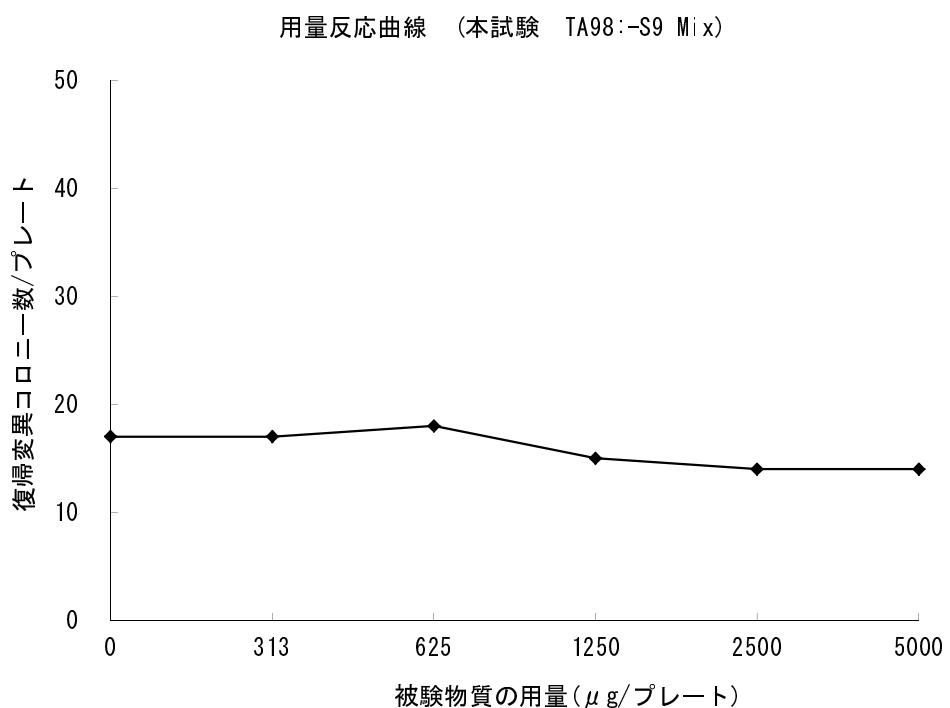


図 8

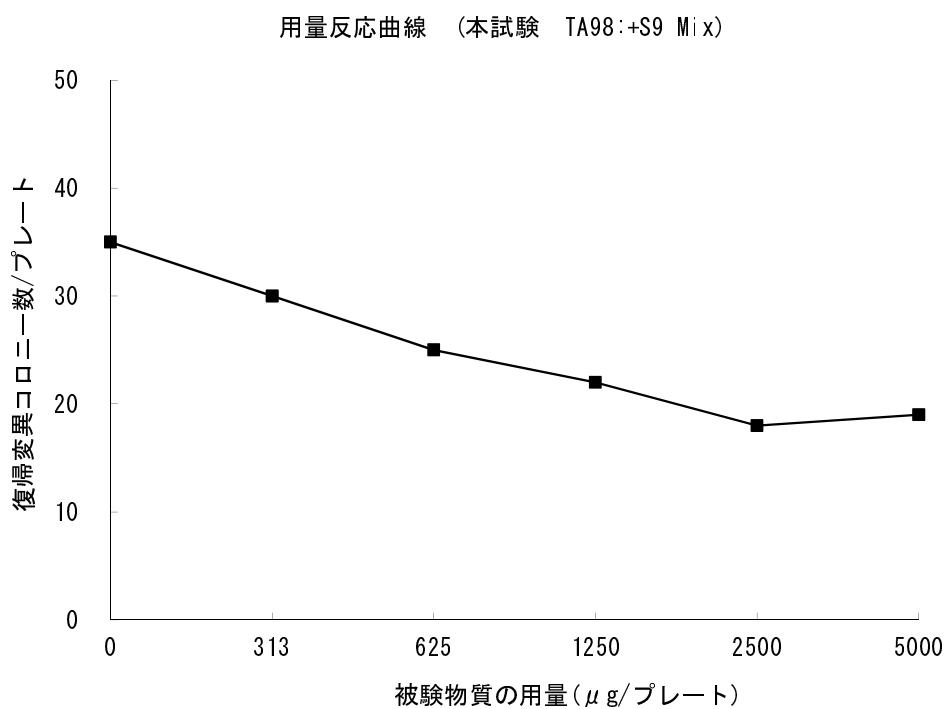


図 9

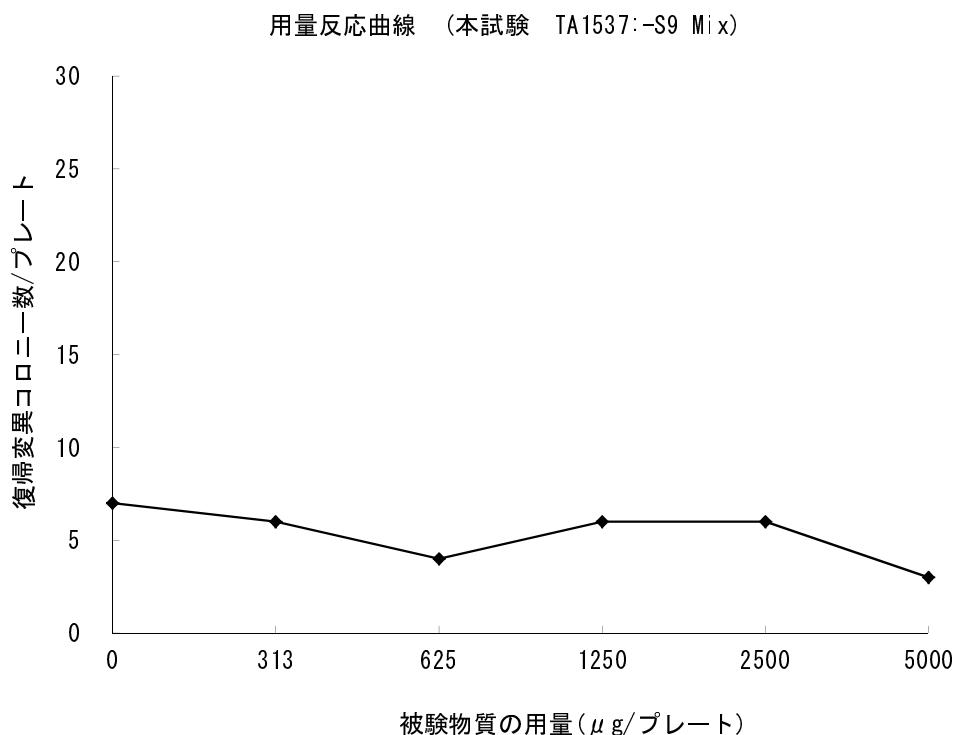


図 10

