

微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	硫化水素ナトリウム		
別 名	/		
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)	H S— Na		
試験に供した新規 化学物質の純度	73.5%	試験に供した新規化 学物質の Lot No.	V3P2077
不純物の名称及び濃度	不明		
CAS 番号	16721-80-5	蒸気圧	6.53 kPa
分子量	56.06	分配係数	/
融 点	55°C	常温における性状	固体
沸 点	160°C		
安定性	適切な条件下においては安定。		
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 で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMSO	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン	100 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	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 DMSO 及びアセトン中で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。水中で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被験液の調製時に得られた結果である。

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	2013年10月25日製造
購入の場合 Lot No.	RAA20131025
保存温度	-87.6~-78.8°C (保存期間: 2013年12月3日~2014年2月26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	195-247 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 ₂	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	製造元	Lot No.	グレード	純度(%)
	注射用水	株式会社 大塚製薬工場	K3J84	日本薬局方	
溶媒選択の理由	水、DMSO、アセトンについて溶解性試験を実施した。その結果、水に 50mg/mL で溶解したが若干の発熱が認められた。しかし、この発熱は構造から溶解熱による発熱と推測されるため、水中において構造的には安定であると判断した。なお、DMSO に 50 mg/mL、アセトンに 100 mg/mL で溶解しなかったが、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかった。以上の結果より、注射用水を溶媒として試験を実施した。				
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	製造元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2	OXOID LTD.	876774
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 µL <i>E. coli</i> 株 10 µL

(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	5.43	6.60	8.82	6.70	4.64
	本試験	5.37	6.64	8.79	6.69	5.40
	追加確認試験			8.76	6.61	
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	2013年11月29日製造
購入の場合の Lot No.	DZLEBT01
使用寒天の名称・製造・Lot No.	OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1213483-02

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)	49.5時間
	時間 (本試験)	48.5時間
	時間 (追加確認試験)	48.5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
<p>判定の理由</p> <p>用量設定試験の結果を別表 1、本試験の結果を別表 2、追加確認試験の結果を別表 3、比活性値表を別表 4 に示した。なお、図 1~10 は別表 2、図 11、12 は別表 3 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 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニーの用量反応性を伴う増加が認められた。代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA98 及び代謝活性化した場合の <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> についても、用量設定試験及び追加確認試験または本試験及び追加確認試験において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニーの用量反応性を伴う増加が認められた。代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 についても、陰性対照値の 2 倍には満たないが、復帰変異コロニー数の用量反応性の伴う増加が認められた。代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA1535、TA1537 及び代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA98 については、陰性対照値の 2 倍以上となる増加も、用量反応性も認められなかった。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> TA100 の 1.76×10^2 (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硫化水素ナトリウムは、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及び着色は、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* TA98 の 2000 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 2500 µg/plate 以上の用量で認められた。

代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 及び代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* については、用量設定試験及び本試験において、陰性対照値の 2 倍以上の増加に再現性が得られなかったため、追加確認試験を実施した。追加確認試験の用量は 5000 µg/plate を最高用量として、以下公差 1000 で 4 段階希釈した計 5 用量及び 500 µg/plate (500、1000、2000、3000、4000、5000 µg/plate) とした。

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。

10. その他

試験実施施設	名 称	株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
	所在地	東京都世田谷区羽根木 1-3-11 電話 03(3327)2114 FAX03(3327)2115
試験責任者	職 氏 名	
	経験年数	
試験番号	T-1467	
試験期間	2013年12月19日より2014年3月20日	

(別表1)

試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称： 硫化水素ナトリウム

No. T-1467

試験実施期間		2014年2月3日 より 2014年2月6日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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 (注射用水)	118 131 (125)	8 11 (10)	13 16 (15)	13 16 (15)	8 7 (8)
	1.22	100 124 (112)	11 8 (10)	21 14 (18)	27 21 (24)	8 10 (9)
	4.88	139 130 (135)	13 19 (16)	13 15 (14)	18 13 (16)	9 5 (7)
	19.5	126 133 (130)	8 15 (12)	13 11 (12)	19 21 (20)	5 4 (5)
	78.1	113 99 (106)	17 11 (14)	18 14 (16)	19 21 (20)	7 10 (9)
	313	155 157 (156)	7 10 (9)	22 18 (20)	24 24 (24)	13 9 (11)
	1250	276 223 (250)	13 11 (12)	52 36 (44)	25 24 (25)	7 10 (9)
	5000	113 * 116 * (115)	0 * 0 * (0)	85 99 (92)	61 * 64 * (63)	5 * 1 * (3)
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	126 117 (122)	16 15 (16)	29 20 (25)	33 47 (40)
1.22		134 150 (142)	13 6 (10)	13 18 (16)	46 32 (39)	7 13 (10)
4.88		113 136 (125)	8 8 (8)	18 14 (16)	33 28 (31)	13 7 (10)
19.5		132 123 (128)	14 10 (12)	18 18 (18)	31 28 (30)	11 14 (13)
78.1		129 130 (130)	13 8 (11)	17 18 (18)	38 28 (33)	12 8 (10)
313		140 143 (142)	8 8 (8)	17 21 (19)	36 35 (36)	11 19 (15)
1250		155 150 (153)	9 11 (10)	30 28 (29)	31 41 (36)	11 10 (11)
5000		205 182 (194)	11 7 (9)	53 37 (45)	52 39 (46)	10 16 (13)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	620 683 (652)	246 289 (268)	63 59 (61)	338 285 (312)	1403 1434 (1419)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	984 1076 (1030)	271 317 (294)	1107 1105 (1106)	324 388 (356)	88 112 (100)

(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[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。
()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： 硫化水素ナトリウム

No. T-1467

試験実施期間		2014年2月19日 より 2014年2月22日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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 (注射用水)	117 125 (121)	6 7 (7)	16 28 (22)	19 21 (20)	5 6 (6)	
	156	131 144 (138)	9 10 (10)	NT	19 22 (21)	7 5 (6)	
	313	139 113 (126)	10 11 (11)	19 15 (17)	13 18 (16)	6 5 (6)	
	625	200 202 (201)	10 10 (10)	23 22 (23)	20 20 (20)	10 7 (9)	
	1250	349 333 (341)	10 15 (13)	89 68 (79)	30 38 (34)	11 8 (10)	
	2500	303 * 215 * (259)	7 * 3 * (5)	127 100 (114)	27 * 37 * (32)	8 * 7 * (8)	
	5000	77 * 110 * (94)	0 * 0 * (0)	99 85 (92)	20 * 18 * (19)	0 * 0 * (0)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	138 138 (138)	7 12 (10)	20 22 (21)	31 27 (29)	7 7 (7)
313		154 134 (144)	16 8 (12)	18 19 (19)	27 31 (29)	7 10 (9)	
625		139 145 (142)	10 3 (7)	26 26 (26)	23 38 (31)	7 5 (6)	
1250		128 125 (127)	7 8 (8)	38 50 (44)	33 29 (31)	6 8 (7)	
2500		162 165 (164)	9 7 (8)	68 60 (64)	30 50 (40)	12 13 (13)	
5000		182 180 (181)	9 5 (7)	80 100 (90)	38 41 (40)	8 7 (8)	
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		S9Mixを必要としないもの 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	660 649 (655)	235 253 (244)	70 60 (65)	406 339 (373)	2192 2090 (2141)	
	S9Mixを必要とするもの 名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0		
コロニー数/プレート	886 1045 (966)	221 275 (248)	878 1006 (942)	373 373 (373)	82 105 (94)		

(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[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。

NT : 試験せず。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表3)

試験結果表 (追加確認試験)

被験物質の名称： 硫化水素ナトリウム

No. T-1467

試験実施期間		2014年2月25日 より 2014年2月28日	
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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
		WP2uvrA	TA98
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	19	28
		16 (18)	28 (28)
	500		42
			31 (37)
	1000		32
			40 (36)
	2000		69 *
			50 * (60)
	3000		69 *
			70 * (70)
	4000		49 *
			35 * (42)
	5000		62 *
			46 * (54)
S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	18	
		16 (17)	
	500	13	
		21 (17)	
	1000	71	
		27 (49)	
	2000	30	
		64 (47)	
	3000	91	
		82 (87)	
	4000	81	
		91 (86)	
	5000	86	
		77 (82)	
陽性対照	名称	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要としないもの	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01
		コロニー数/プレート	51
			66 (59)
			384
			366 (375)
	名称	2AA	
	S9Mixを必要とするもの	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	10.0
		コロニー数/プレート	711
			856 (784)

(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

2AA : 2-アミノアントラセン

*: 被験物質による生育阻害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 4)

比 活 性

被験物質名：硫化水素ナトリウム

No.T-1467

	菌株名	-S9Mix		+S9Mix	
		比活性	計算に使用した用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	比活性	計算に使用した用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
用量 設定 試験	TA100	1.00×10^2	1250		
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>	2.32×10^1	1250		
	TA98	9.60×10^0	5000		
	TA1537				
本 試 験	TA100	1.76×10^2	1250		
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>	4.56×10^1	1250	1.84×10^1	1250
	TA98				
	TA1537				
追 加 試 験 確 認	WP2 <i>uvrA</i>			3.20×10^1	1000
	TA98	1.60×10^1	2000		

図 1

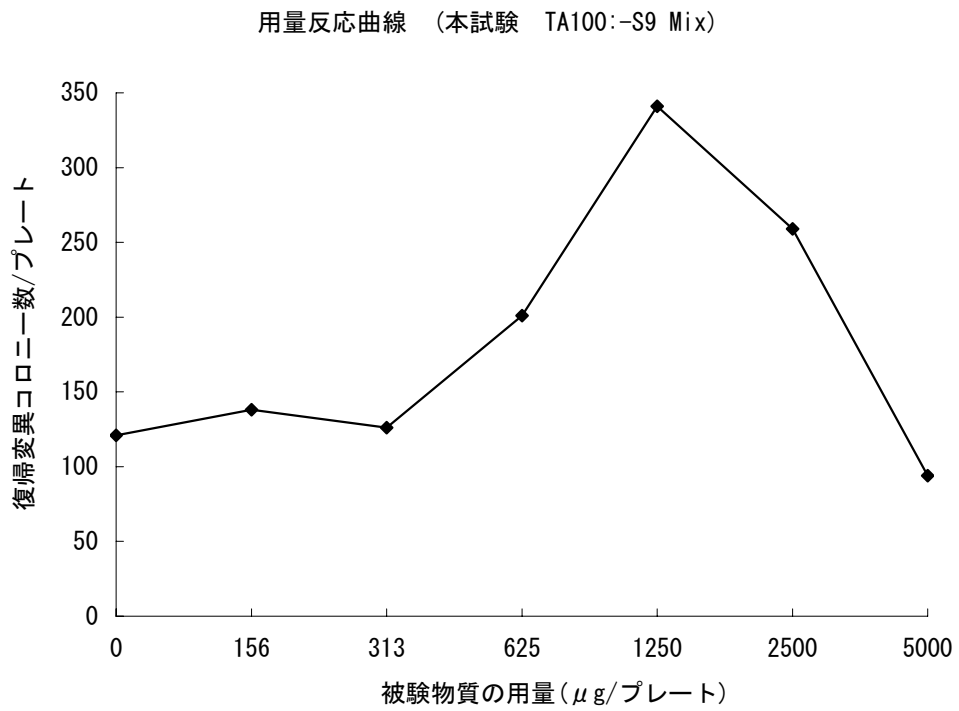


図 2

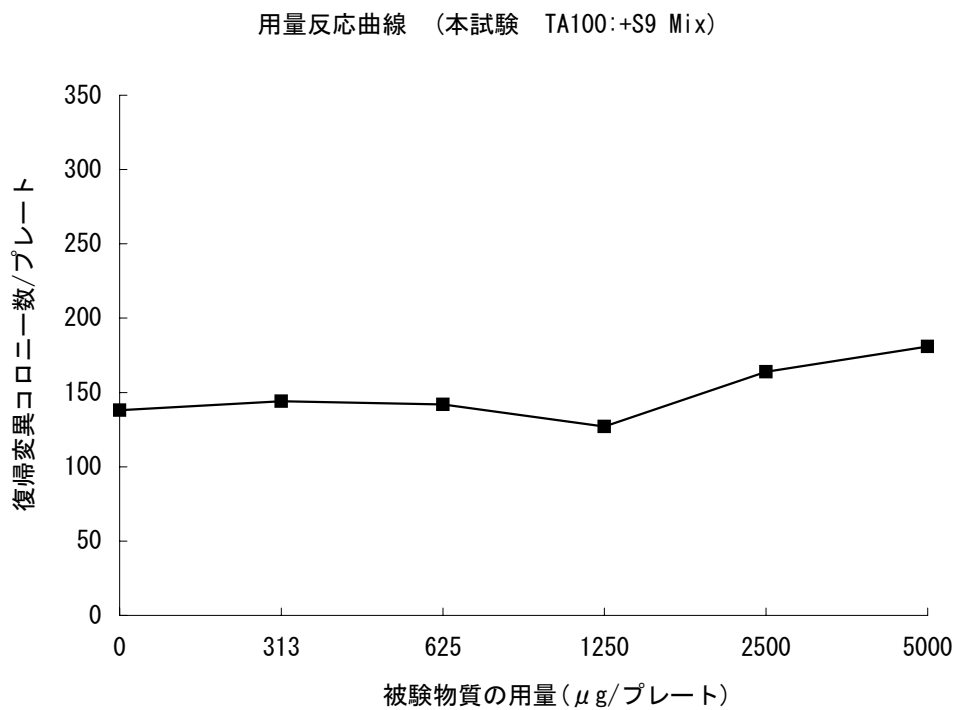


図 3

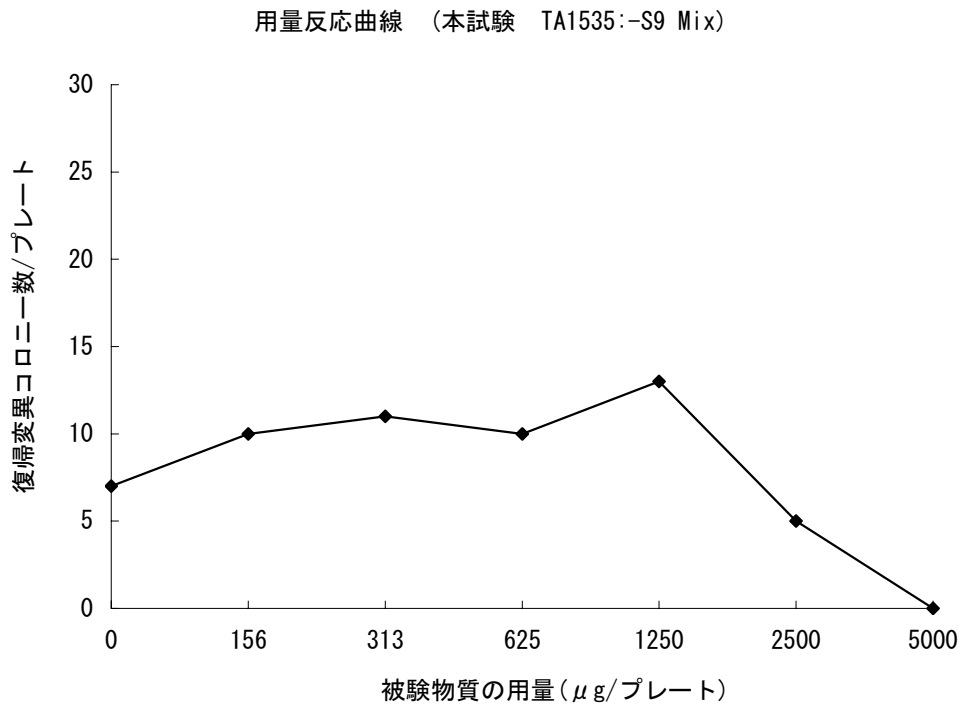


図 4

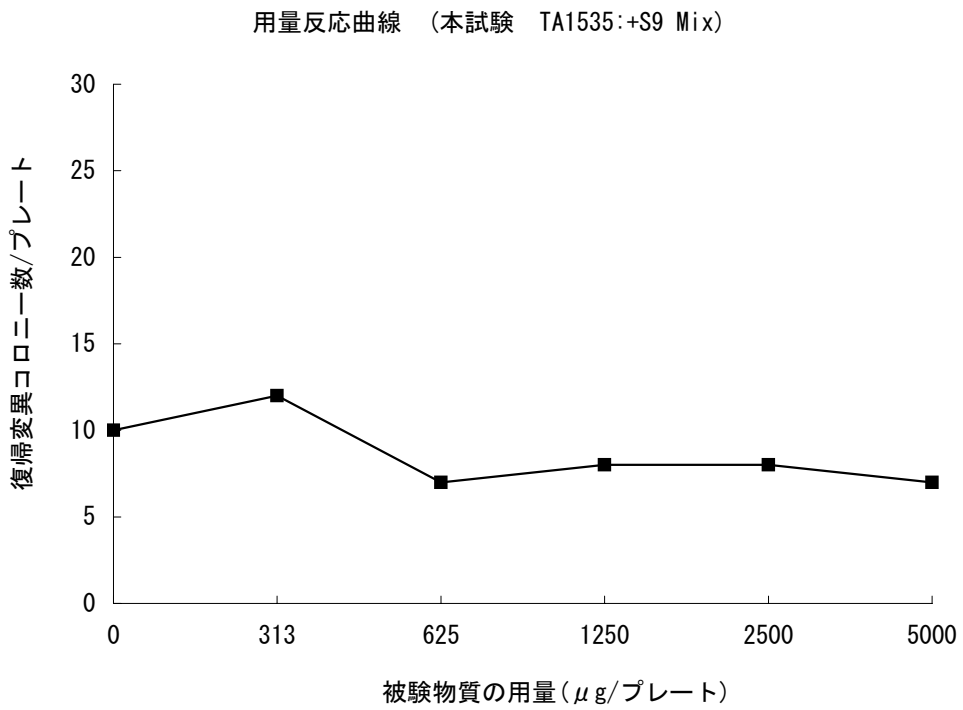


図 5

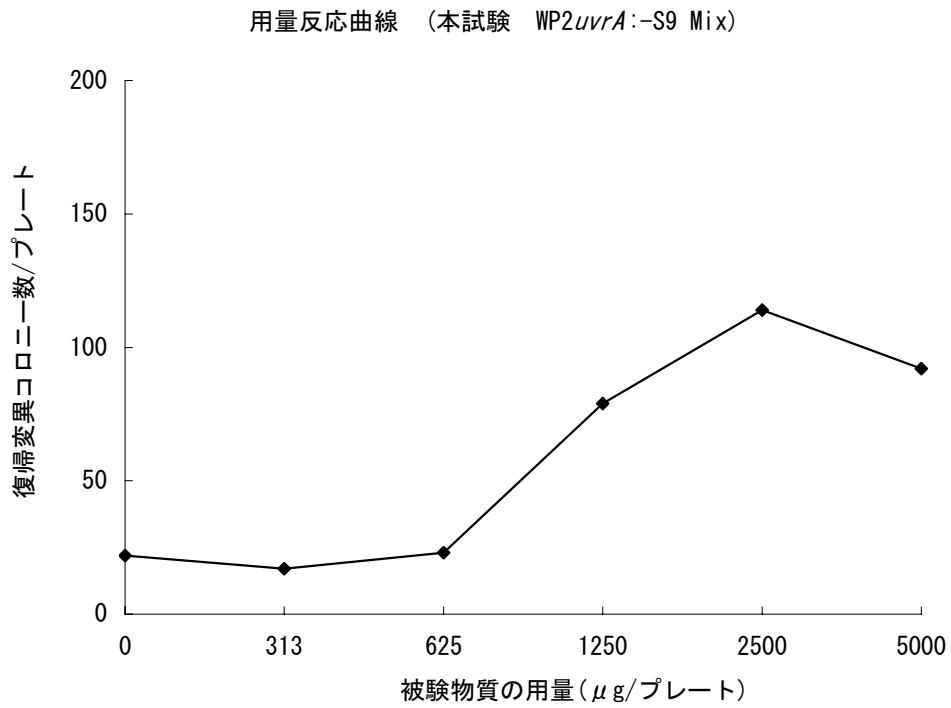


図 6

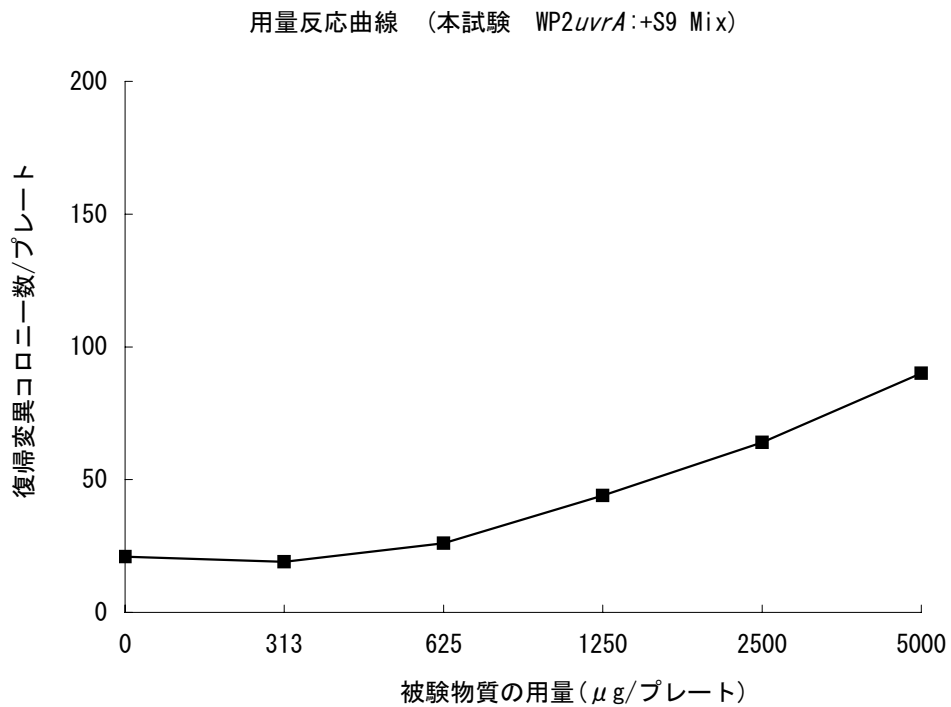


図 7

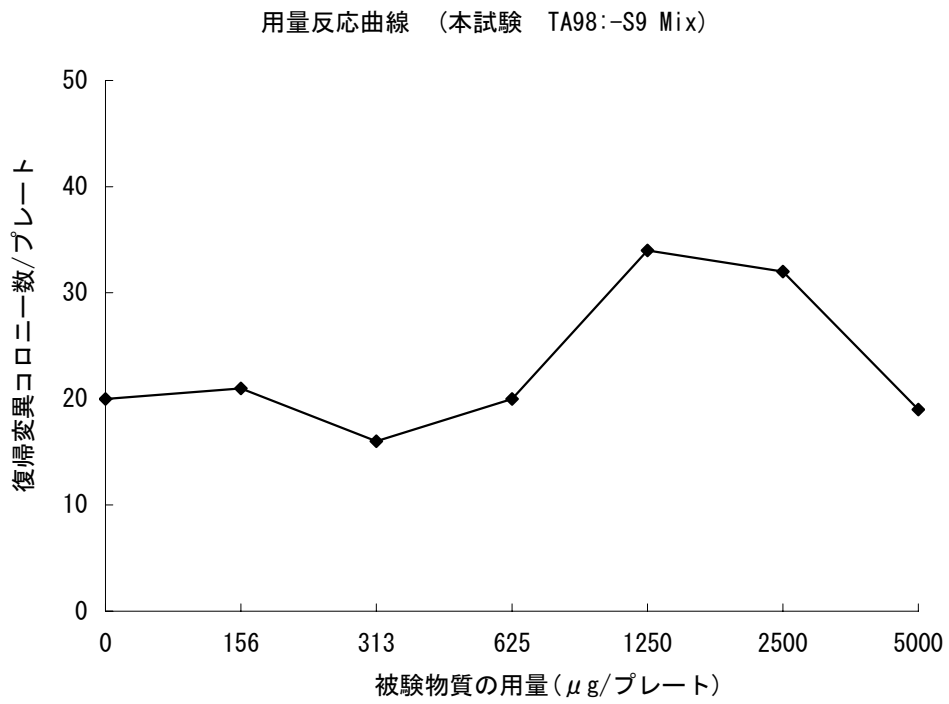


図 8

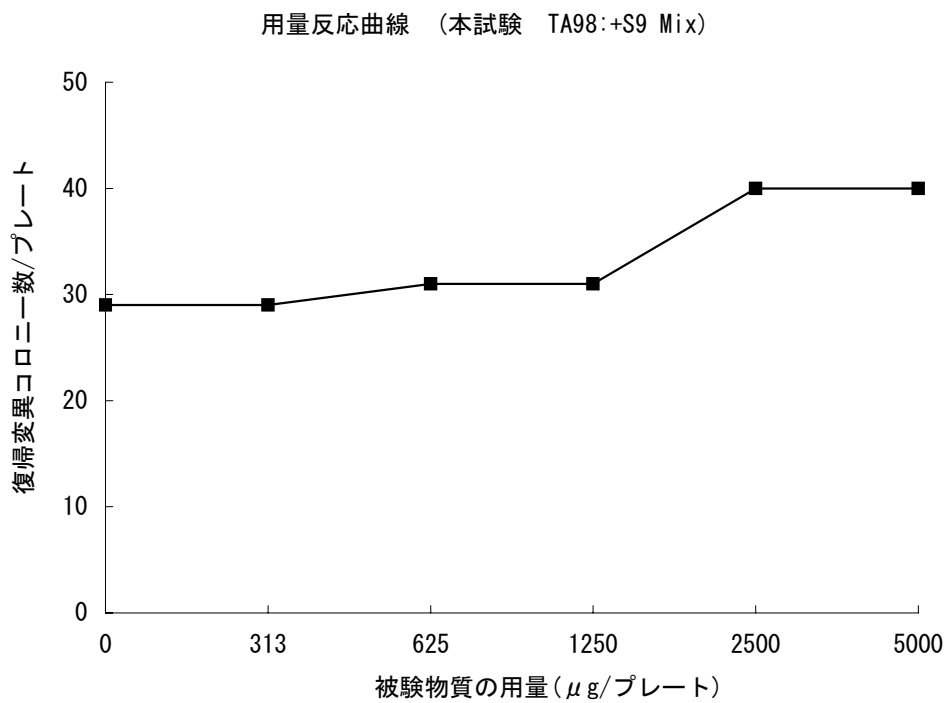


図 9

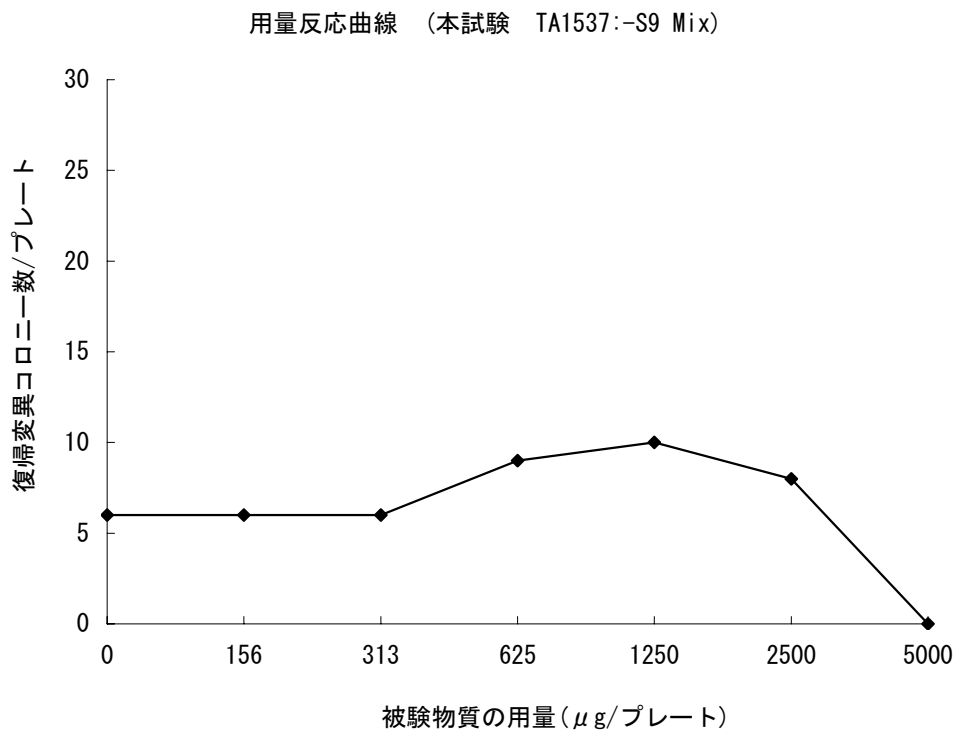


図 10

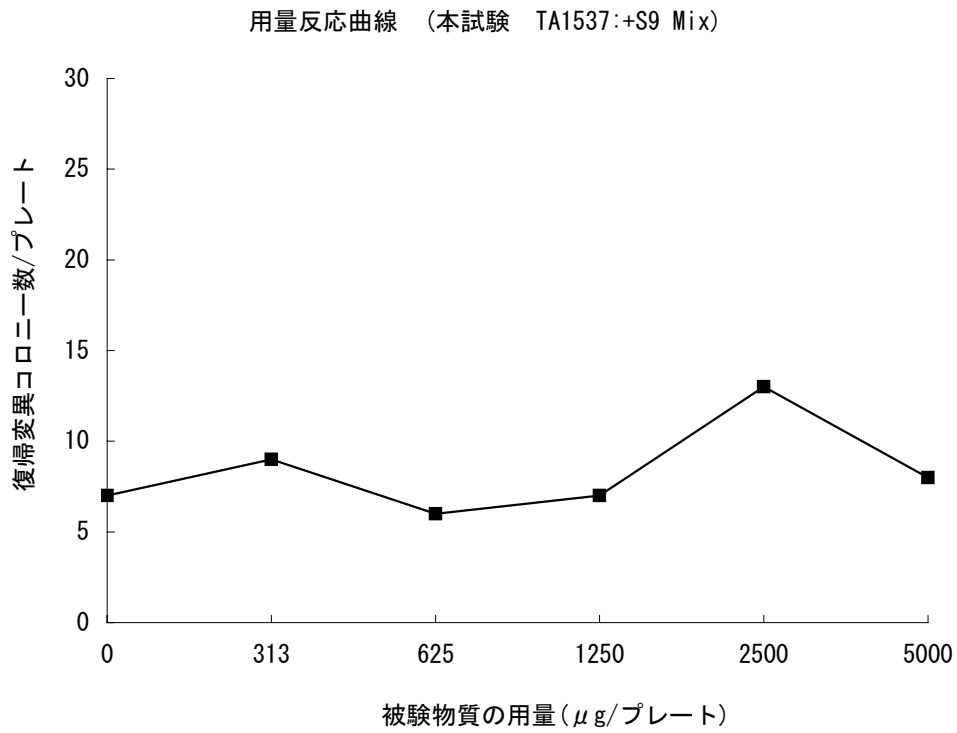


図 11

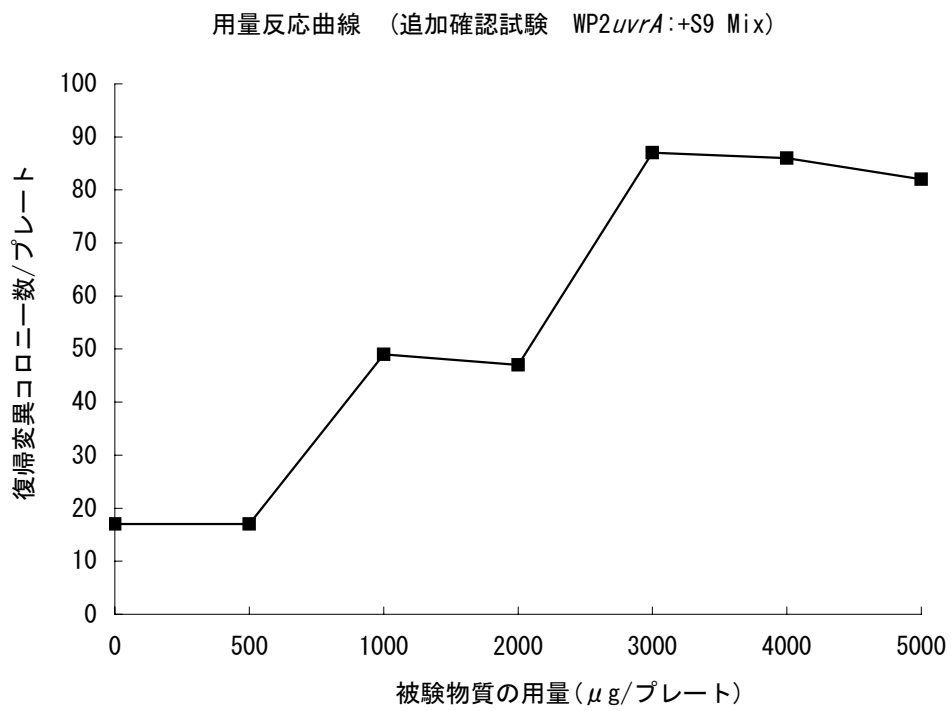


図 12

