

O,O'-ジエチルジチオリン酸の細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of *O,O'*-Diethyl dithiophosphate in Bacteria

要約

O,O'-ジエチルジチオリン酸について、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験菌株として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用いた。用量設定試験においてはS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株において2.29～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の8用量、本試験ではS9 mix無添加群のTA100で39.1～2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の7用量、TA1535で9.77～625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の7用量、WP2 *uvrA*, TA98およびTA1537で156～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量、S9 mix添加群のTA100およびTA1535で78.1～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の7用量、WP2 *uvrA*, TA98およびTA1537で156～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で試験を実施した。本試験においてS9 mix無添加群、TA1535の溶媒対照値の平均値が背景データの範囲から逸脱し、一部の試験において用量の設定が適切でなかったため、S9 mix無添加群のTA100およびTA1537で19.5～1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の7用量、TA1535で9.77～625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の7用量、S9 mix無添加群および添加群のWP2 *uvrA*ならびにS9 mix添加群のTA98で156～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量、S9 mix無添加群のTA98およびS9 mix添加群のTA100で39.1～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の8用量、S9 mix添加群のTA1535で78.1～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の7用量、TA1537で78.1～2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で再試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群のTA100, TA1535, WP2 *uvrA*ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535において用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められた。用量設定試験、本試験ならびに再試験により試験結果の再現性が確認されたことから陽性反応と判断した。

以上の結果より、本試験条件下では O,O' -ジエチルジチオリン酸は、変異原性を有する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537¹⁾ならびにトリプトファン要求性の*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア

大学のAmes BN教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成14年9月30日～10月3日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK KGaA)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80°Cで保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム[いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業)と1.15%の寒天(伊那寒天BA-30A)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5 w/v%を含む0.6 w/v% Bacto-agar (Difco)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学)-0.5 mmol/L D-ビオチン(関東化学)水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン(関東化学)水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバッフル付三角フラスコに2.5 w/v% ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2:OXOID)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック)を用い、37°Cで8時間振盪(往復振盪:100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-

Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μ mol
KCl	33 μ mol
G-6-P	5 μ mol
NADPH	4 μ mol
NADH	4 μ mol
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol
蒸留水	残量

5. 被験物質

被験物質のO,O'-ジエチルジチオリン酸(ロット番号: TCQ2466)は純度95.1%の暗灰褐色透明の液体である。本剤はDMSOに易溶である。和光純薬工業(静岡)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷蔵で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSOを用いて溶解し、調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

7. 試験用量の設定

2.29～5000 μ g/plateの8用量(公比3)を用いて用量設定試験を実施した。S9 mix無添加群のTA100, TA1535ならびにS9 mix添加群のTA1535で用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照値の2倍を超えていた。試験菌株に対する生育阻害作用はS9 mix無添加群の場合、TA100の556 μ g/plate以上、TA1537の1667 μ g/plate以上、他の3菌株の5000 μ g/plateで観察された。また、S9 mix添加群の場合はTA100の1667 μ g/plate以上、TA1537の5000 μ g/plateで観察された。被験物質処理時、S9 mix無添加群および添加群とも556 μ g/plate以上の用量で反応液が白濁し、さらに1667 μ g/plate以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。コロニー計数時、両群の5000 μ g/plateで白色粉末状の析出物が観察された。

従って、本試験においてTA100およびTA1535では、正確な用量反応曲線が得られる用量、すなわち、S9 mix無添加群のTA100において2500 μ g/plate、TA1535において625 μ g/plateを、S9 mix添加群のTA1535において5000 μ g/plateを最高用量とし、それぞれ7用量(公比2)を設定した。他の菌株については、生育阻害作用が認められると考えられる用量あるいは5000 μ g/plateを最高用量とし、S9 mix添加群のTA100では7用量(公比2)、S9 mix無添加群および添加群のWP2 *uvrA*, TA98およびTA1537ではそれぞれ6用量(公比2)を設定した。

また、本試験のTA1535(S9 mix無添加群)において、溶媒対照値の平均値が背景データの範囲から逸脱していること、一部の試験において用量の設定が適切でなかったことから再試験を実施し、S9 mix無添加群のTA100およびTA1537において1250 μ g/plateを、TA1535において625 μ g/plateを最高用量とし、それぞれ7用量(公比2)、S9 mix添加群のTA1537において2500 μ g/plateを最高用量とし6用量(公比2)、他の菌株においては5000 μ g/plateを最高用量とし、S9 mix無添加群および添加群のWP2 *uvrA*ならびにS9 mix添加群のTA98ではそれぞれ6用量(公比2)、S9 mix無添加群のTA98およびS9 mix添加群のTA100ではそれぞれ8用量(公比2)、S9 mix添加群のTA1535では7用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した調製済み陽性対照物質溶液(オリエンタル酵母工業)を使用した。

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

アジ化ナトリウム(NaN_3)

9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA)

2-アミノアントラセン(2-AA)

9. 試験方法

Amesらの原法¹⁾の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μ L、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μ L、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500 μ L添加し、さらに試験菌液100 μ Lを加え、37°Cで20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ45°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37°Cの条件下で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス)を用いた。なお、本試験におけるS9 mix無添加群、TA100およびTA1535の2500 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*およびTA98ならびにS9 mix添加群、TA1537の5000 μ g/plateさらに再試験におけるS9 mix無添加群、TA98の5000 μ g/plateでは析出物の影響によりコロニーアナライザーの使用が不適切と判断し、目視でコロニーを計数した。また、本試験のS9 mix無添加群、TA1537の5000 μ g/plateでは背景菌が目視できるほどのコロニーを形成していたことから目視でコロニーを計数した。各濃度につき3枚のプレートを使用した。

10. 結果の解析

復帰変異コロニー数が溶媒対照の2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認めら

れた場合に、陽性と判定した。なお、陽性と判定した菌株については、変異原性の強さの相対的比較値である比変異活性(比活性)を、当該濃度における誘発平均コロニー数(当該濃度での平均コロニー数-溶媒対照での平均コロニー数)を当該濃度値(mg)で除することにより算出した。コロニー数の平均値は四捨五入する以前の値を用いた。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

用量設定試験の結果をTable 1~2に、本試験の結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群のTA100, TA1535ならびにS9 mix添加群のTA1535でO,O'-ジエチルジチオリン酸処理による用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照値の2倍を超えていた。試験菌株に対する生育阻害作用はS9 mix無添加群の場合、TA100, TA1537の313 µg/plate以上、TA98の1250 µg/plate以上、WP2 uvrAの5000 µg/plateで観察された。またS9 mix添加群の場合はTA100の625 µg/plate以上、TA1537の2500 µg/plate以上の用量で観察された。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお、被験物質処理時、S9 mix無添加群の313 µg/plate以上およびS9 mix添加群の156 µg/plate以上の用量で反応液が白濁し、S9 mix無添加群の2500 µg/plate以上ならびにS9 mix添加群の625 µg/plate以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。コロニー計数時、S9 mix無添加群の2500 µg/plate以上、S9 mix添加群の1250 µg/plate以上の用量で白色粉末状の析出物が観察された。また、S9 mix無添加群のTA1535において、溶媒対照値の平均値が背景データの範囲から逸脱し、一部の試験において用量の設定が適切でなかったため、再試験を実施し、結果をTable 5~6に示した。S9 mix無添加群のTA100, TA1535, WP2 uvrAならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535でO,O'-ジエチルジチオリン酸処理による用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照値の2倍を超えていた。試験菌株に対する生育阻害作用はS9 mix無添加群の場合、TA100, TA1537の313 µg/plate以上、TA98の2500 µg/plate以上、WP2 uvrAの5000 µg/plateで観察された。また、S9 mix添加群の場合はTA100の1250 µg/plate以上、TA1537の2500 µg/plateで観察された。変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性の最高値は1691(S9 mix無添加群, TA1535, 625 µg/plate)と算出された。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株に対し、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお、被験物質処理時、S9 mix無添加群の156 µg/plate以上およびS9 mix添加群の313 µg/plate以上の用量で反応液が白濁し、S9 mix無添加群の2500 µg/plate以上ならびにS9 mix添加群の1250 µg/plate以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。コロニー計数時、S9 mix無添加群の2500 µg/plate以上、S9 mix添加群の1250 µg/plate以上

の用量で白色粉末状の析出物が観察された。

以上の試験結果から、本試験条件下において、O,O'-ジエチルジチオリン酸の微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陽性と判定した。

なお、本被験物質(O,O'-ジエチルジチオリン酸)について遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。類縁体であるO,O-diethyl S-[2-(ethylthio)ethyl] esterについてCHL細胞を用いた*in vitro*小核ならびにマウスを用いた小核試験で陽性³⁾との報告があった。O,O-diethyl S-[(ethylthio)methyl] esterについてはCHO細胞を用いた染色体異常試験で陰性⁴⁾、ラット小核試験で陽性⁵⁾との報告があった。また、diethyl dithiophosphate ammonium saltおよびdiethyl dithiophosphate potassium saltの遺伝毒性に関する報告はなかった。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 113:173-215(1983).
- 2) Green MH, Muriel WJ: Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res*, 38:3-32(1978).
- 3) Ni Z, Li S, Liu Y, Tang Y, Pang D: Induction of micronucleus by organophosphorus pesticides both in vivo and in vitro. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 24:82-86(1993).
- 4) Lin MF, Wu CL, Wang TC: Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res*, 188:241-250(1987).
- 5) Grover IS, Malhi PK: Genotoxic effects of some organophosphorous pesticides. I. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rat. *Mutation Res*, 155:131-134(1985).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 永井美穂, 田中 仁,

古屋有佳子, 仲村渠奈美子,

赤星まゆみ, 尾崎伸也,

菊池正憲

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)

Miho Nagai, Jin Tanaka,

Yukako Furuya, Namiko Nakandakari,

Mayumi Akahoshi, Shin-ya Ozaki,

Masanori Kikuchi

Biosafety Research Center, Foods, Drugs

and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Summary data of dose-finding study with *O,O'*-diethyl dithiophosphate
[non-activation method: -S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO ^{a)}	0	89	87	75	11	9	12	29	18	22	27	21	17	9	7	8
		[84 $\pm$ 8]			[11 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 6]			[22 $\pm$ 5]			[8 $\pm$ 1]		
Test substance	2.29	66	64	77	13	10	14	25	20	20	17	20	23	13	9	5
		[69 $\pm$ 7]			[12 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 3]			[20 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 4]		
	6.86	78	80	92	20	18	19	21	18	14	11	21	29	7	12	8
		[83 $\pm$ 8]			[19 $\pm$ 1]			[18 $\pm$ 4]			[20 $\pm$ 9]			[9 $\pm$ 3]		
	20.6	107	104	94	30	19	27	33	20	28	22	19	20	10	10	6
		[102 $\pm$ 7]			[25 $\pm$ 6]			[27 $\pm$ 7]			[20 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 2]		
	61.7	122	117	112	67	93	63	27	24	32	20	20	20	6	5	10
		[117 $\pm$ 5]			[74 $\pm$ 16]			[28 $\pm$ 4]			[20 $\pm$ 0]			[7 $\pm$ 3]		
	185	164	163	133	155	145	142	29	30	31	17	18	12	3	3	3
		[153 $\pm$ 18]			[147 $\pm$ 7]			[30 $\pm$ 1]			[16 $\pm$ 3]			[3 $\pm$ 0]		
	556	199*	186*	176*	495	475	541	41	50	40	16	18	22	2	3	3
		[187 $\pm$ 12]			[504 $\pm$ 34]			[44 $\pm$ 6]			[19 $\pm$ 3]			[3 $\pm$ 1]		
	1667	168*	161*	137*	425	587	480	55	35	32	19	18	23	2*	3*	4*
		[155 $\pm$ 16]			[497 $\pm$ 82]			[41 $\pm$ 13]			[20 $\pm$ 3]			[3 $\pm$ 1]		
	5000 +	0*	0*	0*	66*	77*	57*	40*	36*	30*	8*	16*	14*	0*	0*	0*
		[0 $\pm$ 0]			[67 $\pm$ 10]			[35 $\pm$ 5]			[13 $\pm$ 4]			[0 $\pm$ 0]		
Positive control		372	308	342 ^{b)}	560	565	526 ^{c)}	109	96	94 ^{b)}	562	672	603 ^{d)}	370	318	305 ^{e)}
		[341 $\pm$ 32]			[550 $\pm$ 21]			[100 $\pm$ 8]			[612 $\pm$ 56]			[331 $\pm$ 34]		

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

Table 2 Summary data of dose-finding study with O,O'-diethyl dithiophosphate
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO ^{a)}	0	101	99	108	8	14	7	19	24	22	30	32	28	23	20	24
		[103 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 4]			[22 $\pm$ 3]			[30 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 2]		
Test substance	2.29	105	101	93	11	7	4	31	32	17	36	38	34	18	28	21
		[100 $\pm$ 6]			[7 $\pm$ 4]			[27 $\pm$ 8]			[36 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 5]		
	6.86	85	94	92	8	10	7	23	24	20	51	34	25	17	24	18
		[90 $\pm$ 5]			[8 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 2]			[37 $\pm$ 13]			[20 $\pm$ 4]		
	20.6	100	128	105	9	8	14	24	27	17	42	32	31	21	21	26
		[111 $\pm$ 15]			[10 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 5]			[35 $\pm$ 6]			[23 $\pm$ 3]		
	61.7	93	116	98	19	10	7	27	18	30	36	26	39	12	24	22
		[102 $\pm$ 12]			[12 $\pm$ 6]			[25 $\pm$ 6]			[34 $\pm$ 7]			[19 $\pm$ 6]		
	185	102	89	95	13	9	13	26	20	19	37	29	30	26	19	17
		[95 $\pm$ 7]			[12 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 4]			[32 $\pm$ 4]			[21 $\pm$ 5]		
	556	90	88	81	58	46	55	25	30	20	35	39	37	19	19	19
		[86 $\pm$ 5]			[53 $\pm$ 6]			[25 $\pm$ 5]			[37 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 0]		
	1667	166*	133*	143*	212	212	232	27	38	27	28	32	30	12	14	10
		[147 $\pm$ 17]			[219 $\pm$ 12]			[31 $\pm$ 6]			[30 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 2]		
	5000 +	192*	181*	171*	198	177	141	30	25	26	32	25	37	11*	15*	16*
		[181 $\pm$ 11]			[172 $\pm$ 29]			[27 $\pm$ 3]			[31 $\pm$ 6]			[14 $\pm$ 3]		
Positive control		790	795	859 ^{b)}	275	310	323 ^{c)}	924	1099	994 ^{d)}	355	320	316 ^{e)}	155	139	143 ^{e)}
		[815 $\pm$ 38]			[303 $\pm$ 25]			[1006 $\pm$ 88]			[330 $\pm$ 21]			[146 $\pm$ 8]		

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

Table 3 Results of the bacterial reversion assay of *O,O'*-diethyl dithiophosphate
[non-activation method:-S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO ^{a)}	0	126	97	107	25	16	25	34	30	33	30	25	16	5	5	4
		[110 $\pm$ 15]			[22 $\pm$ 5]			[32 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 7]			[5 $\pm$ 1]		
Test substance	9.77				27	31	39									
					[32 $\pm$ 6]											
	19.5				53	53	29									
					[45 $\pm$ 14]											
	39.1	143	146	121	74	81	80									
		[137 $\pm$ 14]			[78 $\pm$ 4]											
	78.1	183	162	154	114	122	110									
		[166 $\pm$ 15]			[115 $\pm$ 6]											
	156	188	176	164	145	152	139	33	36	38	25	38	29	8	5	7
		[176 $\pm$ 12]			[145 $\pm$ 7]			[36 $\pm$ 3]			[31 $\pm$ 7]			[7 $\pm$ 2]		
	313	222*	234*	145*	310	429	223	41	40	35	19	29	31	4*	2*	3*
		[200 $\pm$ 48]			[321 $\pm$ 103]			[39 $\pm$ 3]			[26 $\pm$ 6]			[3 $\pm$ 1]		
	625	340*	339*	366*	741	680	751	50	58	49	17	20	26	4*	6*	9*
		[348 $\pm$ 15]			[724 $\pm$ 38]			[52 $\pm$ 5]			[21 $\pm$ 5]			[6 $\pm$ 3]		
	1250	294*	371*	362*				44	53	52	12*	14*	11*	2*	3*	9*
		[342 $\pm$ 42]						[50 $\pm$ 5]			[12 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 4]		
	2500 +	0*	0*	0*				35	32	32	11*	9*	11*	0*	0*	0*
		[0 $\pm$ 0]						[33 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 1]			[0 $\pm$ 0]		
	5000 +							33*	24*	27*	6*	7*	6*	0*	0*	0*
								[28 $\pm$ 5]			[6 $\pm$ 1]			[0 $\pm$ 0]		
Positive control		560	596	584 ^{b)}	619	619	588 ^{c)}	130	121	117 ^{b)}	645	677	651 ^{d)}	310	354	298 ^{d)}
		[580 $\pm$ 18]			[609 $\pm$ 18]			[123 $\pm$ 7]			[658 $\pm$ 17]			[321 $\pm$ 29]		

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

Table 4 Results of the bacterial reversion assay of O,O'-diethyl dithiophosphate
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO ^{a)}	0	121	84	92	17	13	17	24	26	25	24	33	33	19	22	21
		[99 $\pm$ 19]			[16 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 1]			[30 $\pm$ 5]			[21 $\pm$ 2]		
Test substance	78.1	96	129	118	20	23	18									
		[114 $\pm$ 17]			[20 $\pm$ 3]											
	156	115	102	101	12	20	20	14	38	24	33	34	42	20	27	27
		[106 $\pm$ 8]			[17 $\pm$ 5]			[25 $\pm$ 12]			[36 $\pm$ 5]			[25 $\pm$ 4]		
	313	92	102	106	19	25	16	21	18	26	18	36	34	25	21	16
		[100 $\pm$ 7]			[20 $\pm$ 5]			[22 $\pm$ 4]			[29 $\pm$ 10]			[21 $\pm$ 5]		
	625	83*	103*	98*	41	30	26	18	17	34	42	32	31	8	14	17
		[95 $\pm$ 10]			[32 $\pm$ 8]			[23 $\pm$ 10]			[35 $\pm$ 6]			[13 $\pm$ 5]		
	1250 +	99*	104*	118*	117	105	121	28	33	30	25	38	18	8	5	6
		[107 $\pm$ 10]			[114 $\pm$ 8]			[30 $\pm$ 3]			[27 $\pm$ 10]			[6 $\pm$ 2]		
	2500 +	65*	115*	81*	161	150	141	23	38	39	41	24	33	5*	6*	6*
		[87 $\pm$ 26]			[151 $\pm$ 10]			[33 $\pm$ 9]			[33 $\pm$ 9]			[6 $\pm$ 1]		
	5000 +	111*	94*	127*	159	169	148	35	32	27	34	38	37	0*	2*	4*
		[111 $\pm$ 17]			[159 $\pm$ 11]			[31 $\pm$ 4]			[36 $\pm$ 2]			[2 $\pm$ 2]		
Positive control		858	764	796 ^{b)}	314	343	322 ^{c)}	975	728	788 ^{d)}	355	370	347 ^{e)}	239	247	194 ^{e)}
		[806 $\pm$ 48]			[326 $\pm$ 15]			[830 $\pm$ 129]			[357 $\pm$ 12]			[227 $\pm$ 29]		

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

Table 5 Results of the bacterial reversion assay of *O,O'*-diethyl dithiophosphate (restudy)
[non-activation method: -S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO ^{a)}	0	88	99	103	11	10	9	33	22	27	25	13	22	11	9	11
		[97 $\pm$ 8]			[10 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 6]			[20 $\pm$ 6]			[10 $\pm$ 1]		
Test substance	9.77				9	13	9									
					[10 $\pm$ 2]											
	19.5	105	104	113	20	26	18							8	5	4
		[107 $\pm$ 5]			[21 $\pm$ 4]									[6 $\pm$ 2]		
	39.1	121	133	103	44	54	65				21	21	20	4	8	7
		[119 $\pm$ 15]			[54 $\pm$ 11]						[21 $\pm$ 1]			[6 $\pm$ 2]		
	78.1	153	181	144	131	119	118				19	22	20	12	11	6
		[159 $\pm$ 19]			[123 $\pm$ 7]						[20 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 3]		
	156	172	170	173	235	216	207	31	28	27	18	23	12	11	9	5
		[172 $\pm$ 2]			[219 $\pm$ 14]			[29 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 6]			[8 $\pm$ 3]		
	313	167*	181*	182*	496	486	434	32	31	32	14	25	15	9*	6*	5*
		[177 $\pm$ 8]			[472 $\pm$ 33]			[32 $\pm$ 1]			[18 $\pm$ 6]			[7 $\pm$ 2]		
	625	313*	315*	344*	1066	1089	1045	50	54	47	19	23	18	6*	5*	6*
		[324 $\pm$ 17]			[1067 $\pm$ 22]			[50 $\pm$ 4]			[20 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]		
	1250	435*	454*	473*				59	65	46	22	29	25	5*	5*	2*
		[454 $\pm$ 19]						[57 $\pm$ 10]			[25 $\pm$ 4]			[4 $\pm$ 2]		
	2500 +							42	51	35	13*	9*	10*			
								[43 $\pm$ 8]			[11 $\pm$ 2]					
	5000 +							47*	39*	29*	4*	7*	6*			
								[38 $\pm$ 9]			[6 $\pm$ 2]					
Positive control		387	435	449 ^{b)}	659	615	635 ^{c)}	154	127	114 ^{b)}	652	587	642 ^{d)}	350	243	320 ^{e)}
		[424 $\pm$ 33]			[636 $\pm$ 22]			[132 $\pm$ 20]			[627 $\pm$ 35]			[304 $\pm$ 55]		

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

Table 6 Results of the bacterial reversion assay of O,O'-diethyl dithiophosphate (restudy)
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO ^{a)}	0	102	92	96	11	7	11	30	23	26	31	30	28	11	21	15
		[97 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 4]			[30 $\pm$ 2]			[16 $\pm$ 5]		
Test substance	39.1	108	75	100												
		[94 $\pm$ 17]														
	78.1	121	95	94	11	12	17							12	17	4
		[103 $\pm$ 15]			[13 $\pm$ 3]									[11 $\pm$ 7]		
	156	107	96	90	9	11	9	24	25	28	25	30	17	13	14	4
		[98 $\pm$ 9]			[10 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 7]			[10 $\pm$ 6]		
	313	101	92	89	13	19	20	40	27	23	23	25	27	9	8	5
		[94 $\pm$ 6]			[17 $\pm$ 4]			[30 $\pm$ 9]			[25 $\pm$ 2]			[7 $\pm$ 2]		
	625	95	86	96	47	46	48	20	24	24	32	25	25	2	4	6
		[92 $\pm$ 6]			[47 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 4]			[4 $\pm$ 2]		
	1250 +	91*	122*	94*	235	232	237	30	23	33	25	26	32	7	9	6
		[102 $\pm$ 17]			[235 $\pm$ 3]			[29 $\pm$ 5]			[28 $\pm$ 4]			[7 $\pm$ 2]		
	2500 +	278*	277*	297*	357	319	320	38	40	28	23	31	25	11*	9*	8*
		[284 $\pm$ 11]			[332 $\pm$ 22]			[35 $\pm$ 6]			[26 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 2]		
	5000 +	212*	182*	203*	226	226	240	32	29	24	36	22	30			
		[199 $\pm$ 15]			[231 $\pm$ 8]			[28 $\pm$ 4]			[29 $\pm$ 7]					
Positive control		847	981	955 ^{b)}	329	295	301 ^{c)}	899	853	888 ^{d)}	310	312	292 ^{e)}	141	162	184 ^{e)}
		[928 $\pm$ 71]			[308 $\pm$ 18]			[880 $\pm$ 24]			[305 $\pm$ 11]			[162 $\pm$ 22]		

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

O,O'-ジエチルジチオリン酸の
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test
of *O,O'*-Diethyl dithiophosphate in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

O,O'-ジエチルジチオリン酸の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、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。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法S9 mix 非存在下では240 $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とした19.8~240 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で8用量を、S9 mix 存在下では240 $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とした28.2~240 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で7用量を設定した。S9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。S9 mix 非存在下では82.3, 118, 168 $\mu\text{g/mL}$, S9 mix 存在下では118, 168, 240 $\mu\text{g/mL}$ のそれぞれ3用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、-S9処理および+S9処理とも溶媒対照群と比較して、統計学的に有意な染色体異常の誘発が認められた。しかしながら、弱い陽性反応であったことから連続処理法24時間処理による試験を追加して実施した。175 $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とした29.4~175 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で9用量を設定した。S9 mix非存在下における24時間連続処理後、標本作製し、112, 140および175 $\mu\text{g/mL}$ の3用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、統計学的に有意な染色体異常の誘発が認められ、かつ、いずれの処理においても用量に依存した増加であった。

以上の結果より、本試験条件下では*O,O'*-ジエチルジチオリン酸は、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を選出した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、ジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK KGaA)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し3~5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制試験では継代数11、染色体異常試験(短時間処理法)では同15、染色体異常試験(連続処理法)では同6の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス)に、非働化(56°C, 30分)済み仔牛血清(Invitrogen)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液は冷暗所(4°C)に保存した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(三洋電機バイオメディカ)を用い、CO₂濃度5%, 37°Cの条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製した。また、S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 μmol
蒸留水	0.1 mL

5. 被験物質

被験物質の*O,O'*-ジエチルジチオリン酸(ロット番号: TCQ2466)は純度95.1%の暗灰褐色透明の液体で、DMSOに易溶である。和光純薬工業(静岡)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷蔵で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSOで被験物質を溶解し、調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

12ウェルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。短時間処理法

ではS9 mix非存在下(-S9処理)あるいは存在下(+S9処理)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。連続処理法の場合、24時間連続して処理を実施した。

細胞を10 vol%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業)で固定した後、0.1 w/v%クリスタル・バイオレット(関東化学)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30 vol%エタノール, 1 vol%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、分光光度計(105-50型:日立製作所)を用いて580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち相対細胞増殖率を算出し、さらにプロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

その結果、細胞増殖を50%抑制する濃度は、短時間処理法-S9処理で88.4 $\mu\text{g/mL}$, 同+S9処理で117 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法24時間処理で77.2 $\mu\text{g/mL}$ と算出された(Fig. 1~2)。

被験物質処理開始時、すべての処理法において233 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末状等の析出が観察された。さらに、931 $\mu\text{g/mL}$ 以上で培養液のpH低下が認められた。被験物質処理終了時においても466 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では白色粉末状等の析出が観察された。ただし、培養液のpHは中性域を示していた。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では短時間処理法-S9処理および+S9処理とも240 $\mu\text{g/mL}$ を

最高処理濃度とし、以下それぞれ公比1.43で減じた8または7用量ならびに溶媒対照群を設定した。また、短時間処理法において弱い陽性反応が認められたことから、連続処理法24時間処理を実施し、175 $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とし、以下公比1.25で減じた9用量および溶媒対照群を設定した。

なお、陽性対照として、短時間処理の場合、-S9処理でマイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業)を0.1 $\mu\text{g/mL}$, +S9処理でシクロホスファミド(CP:塩野義製薬)を12.5 $\mu\text{g/mL}$ の用量で、連続処理の場合MMCを0.05 $\mu\text{g/mL}$ の用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、細胞増殖抑制試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 $\mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド(Invitrogen)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2 vol%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap), 染色分体切断(ctb), 染色体切断

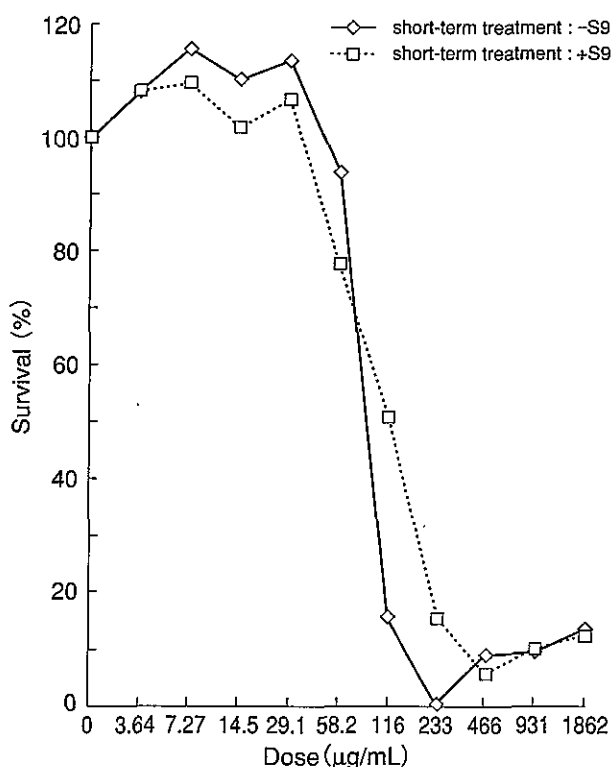


Fig. 1 Growth inhibition of CHL cells treated with *O,O'*-diethyl dithiophosphate [short-term treatment: 6 hr]

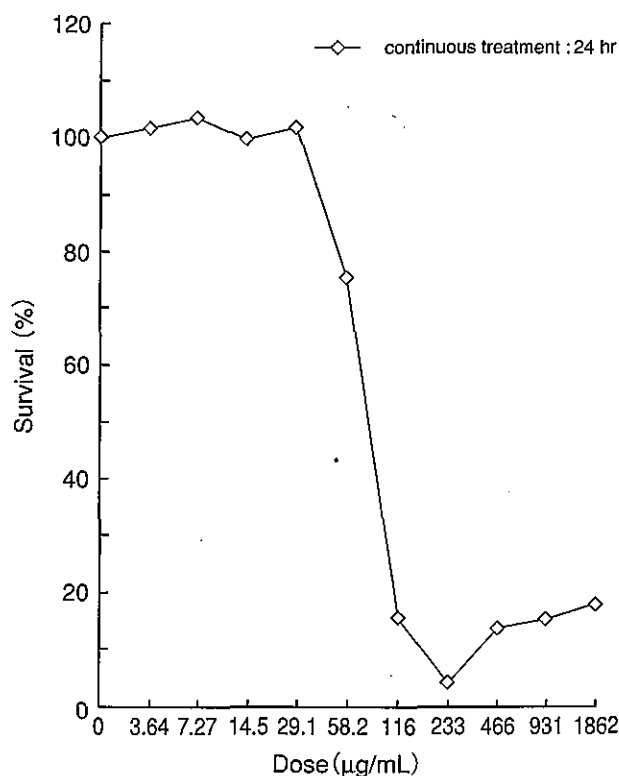


Fig. 2 Growth inhibition of CHL cells treated with *O,O'*-diethyl dithiophosphate [continuous treatment: 24 hr]