N－tert－ブチル－2－ベンゾチアゾールスルフェンアミド

# の細菌を用いる
# 復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局　委託

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

【目　　次】

頁

要　　約 …… 1

緒　　言 …… 2

材料および方法 …… 3

結果および考察 …… 7

結　　論 …… 8

特　記　事　項 …… 8

文　　献 …… 9

Tables　1～3

【要　　約】

*N-tert*-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を 50.0～5000 μg/プレート の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験では、TA1537 においてはすべての用量で、TA1535 においては 500 μg/プレート 以上で、また S9 mix 添加試験では、TA1537 において 1500 μg/プレート 以上で抗菌性が認められた。したがって、本試験は S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、最高用量を 5000 μg/プレート（TA1535 の S9 mix 無添加試験は 1000 μg/プレート、TA1537 の S9 mix 無添加試験は 100 μg/プレート、添加試験は 2000 μg/プレート）として、公比2で5～7用量を設定して実施した。しかし、TA100 と TA98 の S9 mix 無添加試験では、本試験Ⅰまたはその再試験で強い抗菌性が認められたため、本試験の最高用量をそれぞれ 2500 μg/プレート および 500 μg/プレート に下げて本試験Ⅰをやり直した。また、TA1535 の S9 mix 無添加試験では、本試験Ⅱで強い抗菌性が認められたため、最高用量を 500 μg/プレート に下げて本試験Ⅱをやり直した。

その結果、TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、本試験Ⅱでのみ変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められたが、溶媒対照値は10以下であり、用量依存性もみられなかった。また、TA1537 の S9 mix 添加試験およびその他の検定菌においては、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、*N-tert*-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

## 【緒　　言】

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、*N-tert*-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法[1)]により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異[2)]、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異[3, 4)]を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する S9 mix 添加試験と、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年３月31日、環保業第237号、薬発第 306号、62基局第 303号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」（昭和59年３月31日、環保業第39号、薬発第229 号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第 233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

## 【材料および方法】

〔検　定　菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100
*Salmonella typhimurium* TA1535
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*
*Salmonella typhimurium* TA98
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の４菌株は1975年10月31日に

から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年５月９日に　　から分与を受けた。

検定菌は－80℃以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異（rfa）とアンピシリン耐性因子 pKM 101（プラスミド）の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2（Oxoid）を入れたＬ字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

*N-tert*-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド（略称：BBTSA、CAS No. 95-31-8）は、分子量 238.37 の帯黄灰白色ペレット状である。構造式等は Appendix に示した。用いた被験物質は、ロット番号　　純度 96.0%（不純物：1.56 wt% ジベンゾチアジルジスルフィド）であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで密封して冷蔵した。なお、試験終了後に大内新興化学工業㈱において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 95.4%であった。

ＢＢＴＳＡは、ジメチルスルホキシド（DMSO、ロット番号：ESK4546、和光純薬工業㈱）に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約３ないし２で希釈し、速やかに試験に用いた。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| AF2 | : 2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ | (上野製薬㈱ | ﾛｯﾄ番号 46, | 純度99.9%) |
| SA | : ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ | (和光純薬工業㈱ | ﾛｯﾄ番号 TWR3330, | 純度90%以上) |
| 9AA | : 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ | (Sigma Chem.Co. | ﾛｯﾄ番号 96F05641, | 純度98%以上) |
| 2AA | : 2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ | (和光純薬工業㈱ | ﾛｯﾄ番号 DSF2950, | 純度90%以上) |

AF2 および 2AA は DMSO（和光純薬工業㈱）に溶解したものを－20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix の組成〕

1）トップアガー（TA菌株用）

下記の水溶液（A）および（B）を容量比 10:1 の割合で混合した。

| | | | |
|---|---|---|---|
| (A) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco) | 0.6% | (B)* L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ | 0.5 mM |
| 塩化ﾅﾄﾘｳﾑ | 0.5% | D-ﾋﾞｵﾁﾝ | 0.5 mM |

* : WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2）合成培地

培地は、極東製薬工業㈱製の最少寒天培地（ロット番号：HY0302、1995年9月29日製造および HY0603、同年12月15日製造）を用いた。なお、培地1 ℓ あたりの組成は下記のとおりである。

| | | | |
|---|---|---|---|
| 硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・7水和物 | 0.2 g | 水酸化ﾅﾄﾘｳﾑ | 0.66 g |
| ｸｴﾝ酸・1水和物 | 2 g | ｸﾞﾙｺｰｽ | 20 g |
| ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ | 10 g | ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco) | 15 g |
| ﾘﾝ酸一ｱﾝﾓﾆｳﾑ | 1.92 g | | |

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 mℓ を流して固めてある。

3） S9 mix（1 ㎖中下記の成分を含む）

| | | | |
|---|---|---|---|
| S9** | 0.1 ㎖ | NADH | 4 μmol |
| 塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ | 8 μmol | NADPH | 4 μmol |
| 塩化ｶﾘｳﾑ | 33 μmol | ﾅﾄﾘｳﾑ-ﾘﾝ酸緩衝液 (pH 7.4) | 100 μmol |
| ｸﾞﾙｺｰｽ-6-ﾘﾝ酸 | 5 μmol | | |

** ：7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および 5, 6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9（キッコーマン㈱、ロット番号 RAA-333、1995年9月8日製造および RAA-338、同年12月15日製造）を用いた。PB および BF の投与量は1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60 mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したもので、ラットの解剖および S9 の調製は5日目であった。

〔試 験 方 法〕

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 ㎖、リン酸緩衝液 0.5 ㎖（S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ㎖）、検定菌液 0.1 ㎖ を混合し、37℃で20分間往復振とう培養したのち、トップアガー2㎖を加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性の確認を行った。

〔判 定 基 準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とすることとした。

## 【結果および考察】

〔用量設定試験〕

ＢＢＴＳＡについて 50.0～5000 μg/プレート の範囲で公比を約３として、試験を実施した（Table １）。その結果、S9 mix 無添加試験では、TA1537 においてはすべての用量で、TA1535 においては 500 μg/プレート 以上の用量で、また S9 mix 添加試験では、TA1537 において 1500 μg/プレート 以上の用量で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 μg/プレート（TA1535 の S9 mix 無添加試験は 1000 μg/プレート、TA1537 の S9 mix 無添加試験は 100 μg/プレート、添加試験は 2000 μg/プレート）とした。しかし、本試験Ｉでは TA100 と TA98 の S9 mix 無添加試験において強い抗菌性が認められ、抗菌性のない用量が４用量に達しなかったため、それぞれ最高用量を 2500 および 1000 μg/プレート に下げて、本試験Ｉをやり直した。更に、TA98 では、この試験でも抗菌性のない用量が不足したため、最高用量を 500 μg/プレート に下げて本試験Ｉを再度やり直し、そのデータを本試験Ｉのデータとした。また、TA1535 の S9 mix 無添加試験においては、本試験Ⅱで抗菌性のない用量が４用量に達しなかったため、最高用量を 500 μg/プレート に下げて本試験Ⅱをやり直し、そのデータを本試験Ⅱのデータとした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験でともに、上記の最高用量に基づいて公比２で５～８用量を設定して２回の本試験を実施した（Table ２、３）。その結果、TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、本試験Ⅱの 1.56～12.5 μg/プレート の用量で溶媒対照値の２倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。しかし、その溶媒対照値は10以下で、用量依存性もみられず、また、本試験Ｉでは溶媒対照値の２倍以上となる変異コロニー数の増加が認められなかった。また、TA1537の S9 mix 添加試験およびその他の検定菌においても、溶媒対照値の２倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

*S. typhimurium* の S9 mix 無添加試験において、試験ごとに抗菌性を示す用量が大きく変動した要因を調べるために、TA1535 および TA98 について、それぞれ２回と４

回の検討試験を行った。その結果、当被験物質はこれらの検定菌の S9 mix 無添加試験において、巾広い濃度範囲で検出限界に近い微弱な抗菌性を示すために、試験条件の微妙な差異によって、“抗菌性あり”と判定される用量が大きく変動したものと判断された。

ＢＢＴＳＡについて実施したすべての試験において、陽性対照群ではいずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

## 【結　　論】

以上の結果に基づき、*N-tert*-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

## 【特　記　事　項】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態、および試験計画書からの逸脱はなかった。

## 【文　　献】


1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285

2) Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutat. Res. 113: 173-215 (1983)

3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360

4) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp. 161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of *N-tert-* butyl-2-benzothiazolesulfenamide on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (μg /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Base - pair substitution type | | | Frameshift type | | |
| | | TA100 | TA1535 | WP2 *uvrA* | TA98 | TA1537 | |
| S9mix (-) | 0 | 165 130 140 ( 145 ± 18.0 ) | 6 24 20 ( 17 ± 9.5 ) | 28 27 14 ( 23 ± 7.8 ) | 26 35 28 ( 30 ± 4.7 ) | 9 8 8 ( 8 ± 0.6 ) | |
| | 50.0 | 158 | 15 | 11 | 33 | 12 * | |
| | 150 c | 159 | 10 | 14 | 21 | 4 * | |
| | 500 c | 155 | 7 * | 11 | 26 | 3 * | |
| | 1500 c | 159 | 6 * | 16 | 16 | 2 * | |
| | 5000 c | 139 | 6 * | 20 | 21 | 2 * | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| S9mix (+) | 0 | 175 132 131 ( 146 ± 25.1 ) | 8 12 13 ( 11 ± 2.6 ) | 32 19 29 ( 27 ± 6.8 ) | 32 20 28 ( 27 ± 6.1 ) | 14 18 10 ( 14 ± 4.0 ) | |
| | 50.0 | 127 | 9 | 25 | 24 | 12 | |
| | 150 | 145 | 12 | 22 | 31 | 16 | |
| | 500 c | 123 | 14 | 14 | 19 | 12 | |
| | 1500 c | 134 | 17 | 22 | 26 | 12 * | |
| | 5000 c | 113 | 11 | 27 | 32 | 10 * | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control S9 mix (-) | Chemical | AF2 | SA | AF2 | AF2 | 9AA | |
| | Dose (μg /plate) | 0.01 | 0.5 | 0.01 | 0.1 | 80 | |
| | Number of colonies / plate | 492 440 486 ( 473 ± 28.4 ) | 323 374 306 ( 334 ± 35.4 ) | 144 124 125 ( 131 ± 11.3 ) | 744 717 710 ( 724 ± 18.0 ) | 1023 1065 1065 ( 1051 ± 24.2 ) | |
| Positive control S9 mix (+) | Chemical | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | |
| | Dose (μg /plate) | 1 | 2 | 10 | 0.5 | 2 | |
| | Number of colonies / plate | 832 827 800 ( 820 ± 17.2 ) | 264 234 231 ( 243 ± 18.2 ) | 672 603 604 ( 626 ± 39.6 ) | 316 305 287 ( 303 ± 14.6 ) | 312 324 334 ( 323 ± 11.0 ) | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 96.0% and 1.56 wt% dibenzothiazyl disulfide was contained as impurity.

Table 2-1. Results of reverse mutation test ( I ) of *N-tert-* butyl-2-benzothiazolesulfenamide on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (μg /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Base - pair substitution type | | | Frameshift type | | |
| | | TA100 | TA1535 | WP2 *uvrA* | TA98 | | |
| S9mix (-) | 0 | 103 115 100 ( 106 ± 7.9 ) | | 21 30 16 ( 22 ± 7.1 ) | | | |
| | 39.1 | 127 121 119 ( 122 ± 4.2 ) | | ND | | | |
| | 78.1 | 116 137 144 ( 132 ± 14.6 ) | | ND | | | |
| | 156 | 104 117 114 ( 112 ± 6.8 ) | | ND | | | |
| | 313 | 119 102 93 ( 105 ± 13.2 ) | | 21 17 20 ( 19 ± 2.1 ) | | | |
| | 625 c | 92 92 84 ( 89 ± 4.6 ) | | 20 19 20 ( 20 ± 0.6 ) | | | |
| | 1250 c | 98 89 103 ( 97 ± 7.1 ) | | 29 25 14 ( 23 ± 7.8 ) | | | |
| | 2500 c | 103 * 77 * 118 * ( 99 ± 20.7 ) | | 23 22 11 ( 19 ± 6.7 ) | | | |
| | 5000 c | | | 21 10 15 ( 15 ± 5.5 ) | | | |
| S9mix (+) | 0 | 135 117 120 ( 124 ± 9.6 ) | 7 9 11 ( 9 ± 2.0 ) | 37 24 17 ( 26 ± 10.1 ) | 31 37 29 ( 32 ± 4.2 ) | | |
| | 313 | 116 122 107 ( 115 ± 7.5 ) | 16 9 12 ( 12 ± 3.5 ) | 19 23 19 ( 20 ± 2.3 ) | 23 25 29 ( 26 ± 3.1 ) | | |
| | 625 c | 114 110 129 ( 118 ± 10.0 ) | 14 8 20 ( 14 ± 6.0 ) | 19 17 16 ( 17 ± 1.5 ) | 26 17 20 ( 21 ± 4.6 ) | | |
| | 1250 c | 120 108 94 ( 107 ± 13.0 ) | 15 13 13 ( 14 ± 1.2 ) | 17 25 14 ( 19 ± 5.7 ) | 19 16 26 ( 20 ± 5.1 ) | | |
| | 2500 c | 101 127 102 ( 110 ± 14.7 ) | 13 14 12 ( 13 ± 1.0 ) | 16 12 24 ( 17 ± 6.1 ) | 13 24 22 ( 20 ± 5.9 ) | | |
| | 5000 c | 81 104 88 ( 91 ± 11.8 ) | 17 15 7 ( 13 ± 5.3 ) | 16 19 15 ( 17 ± 2.1 ) | 18 21 27 ( 22 ± 4.6 ) | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control S9 mix (-) | Chemical | AF2 | | AF2 | | | |
| | Dose (μg /plate) | 0.01 | | 0.01 | | | |
| | Number of colonies / plate | 624 743 740 ( 702 ± 67.9 ) | | 270 237 270 ( 259 ± 19.1 ) | | | |
| Positive control S9 mix (+) | Chemical | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | | |
| | Dose (μg /plate) | 1 | 2 | 10 | 0.5 | | |
| | Number of colonies / plate | 313 467 416 ( 399 ± 78.4 ) | 233 256 232 ( 240 ± 13.6 ) | 393 421 453 ( 422 ± 30.0 ) | 447 333 323 ( 368 ± 68.9 ) | | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 96.0% and 1.56 wt% dibenzothiazyl disulfide was contained as impurity.

ND : Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test ( I ) of *N-tert-* butyl-2-benzothiazolesulfenamide on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (μg /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, mean± S.D.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Base - pair substitution type | | | Frameshift type | | |
| | | | TA1535 | | TA98 | TA1537 | |
| S9mix (-) | 0 | | 8 8 11 ( 9 ± 1.7 ) | | 19 18 17 ( 18 ± 1.0 ) | | |
| | 3.91 | | ND | | 18 18 18 ( 18 ± 0.0 ) | | |
| | 7.81 | | ND | | 32 24 22 ( 26 ± 5.3 ) | | |
| | 15.6 | | 10 10 11 ( 10 ± 0.6 ) | | 26 23 20 ( 23 ± 3.0 ) | | |
| | 31.3 | | 2 7 8 ( 6 ± 3.2 ) | | 33 24 25 ( 27 ± 4.9 ) | | |
| | 62.5 | | 6 6 4 ( 5 ± 1.2 ) | | 15 22 13 * ( 17 ± 4.7 ) | | |
| | 125 | | 7 12 11 ( 10 ± 2.6 ) | | 16 * 23 * 17 * ( 19 ± 3.8 ) | | |
| | 250 | | 8 * 5 * 7 * ( 7 ± 1.5 ) | | 16 * 18 * 20 * ( 18 ± 2.0 ) | | |
| | 500 c | | 6 * 6 * 9 * ( 7 ± 1.7 ) | | 12 * 18 * 17 * ( 16 ± 3.2 ) | | |
| | 1000 c | | 6 * 5 * 6 * ( 6 ± 0.6 ) | | | | |
| S9mix (+) | 0 | | | | | 20 16 16 ( 17 ± 2.3 ) | |
| | 62.5 | | | | | 11 8 11 ( 10 ± 1.7 ) | |
| | 125 | | | | | 8 9 11 ( 9 ± 1.5 ) | |
| | 250 | | | | | 16 11 17 ( 15 ± 3.2 ) | |
| | 500 c | | | | | 16 8 11 ( 12 ± 4.0 ) | |
| | 1000 c | | | | | 7 * 6 * 16 * ( 10 ± 5.5 ) | |
| | 2000 c | | | | | 8 * 5 * 12 * ( 8 ± 3.5 ) | |
| | | | | | | | |
| Positive control S9 mix (-) | Chemical | | SA | | AF2 | | |
| | Dose (μg /plate) | | 0.5 | | 0.1 | | |
| | Number of colonies / plate | | 382 328 300 ( 337 ± 41.7 ) | | 629 623 632 ( 628 ± 4.6 ) | | |
| Positive control S9 mix (+) | Chemical | | | | | 2AA | |
| | Dose (μg /plate) | | | | | 2 | |
| | Number of colonies / plate | | | | | 307 314 309 ( 310 ± 3.6 ) | |

SA: Sodium azide, AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 96.0% and 1.56 wt% dibenzothiazyl disulfide was contained as impurity.

ND : Not done

Table 2-3. Results of reverse mutation test ( I ) of *N-tert*-butyl-2-benzothiazolesulfenamide on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (μg /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Frameshift type | | |
| | | | | | | TA1537 | |
| | 0 | | | | | 11 5 8<br>( 8 ± 3.0 ) | |
| | 1.56 | | | | | 9 10 12<br>( 10 ± 1.5 ) | |
| | 3.13 | | | | | 6 11 8<br>( 8 ± 2.5 ) | |
| | 6.25 | | | | | 12 11 4<br>( 9 ± 4.4 ) | |
| S9mix | 12.5 | | | | | 9 13 10<br>( 11 ± 2.1 ) | |
| (-) | 25.0 | | | | | 5 * 11 * 4 *<br>( 7 ± 3.8 ) | |
| | 50.0 | | | | | 4 * 3 * 4 *<br>( 4 ± 0.6 ) | |
| | 100 | | | | | 8 * 3 * 8 *<br>( 6 ± 2.9 ) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control S9 mix (-) | Chemical | | | | | 9AA | |
| | Dose (μg /plate) | | | | | 80 | |
| | Number of colonies / plate | | | | | 368 455 369<br>( 397 ± 49.9 ) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

9AA: 9-Aminoacridine

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 96.0% and 1.56 wt% dibenzothiazyl disulfide was contained as impurity.

Table 3-1. Results of reverse mutation test ( II ) of *N-tert*-butyl-2-benzothiazolesulfenamide on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (μg /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Base - pair substitution type | | | Frameshift type | | |
| | | TA100 | TA1535 | WP2 *uvrA* | TA98 | | |
| S9mix (-) | 0 | 111 91 119 ( 107 ± 14.4 ) | | 22 23 21 ( 22 ± 1.0 ) | | | |
| | 39.1 | 92 102 95 ( 96 ± 5.1 ) | | ND | | | |
| | 78.1 | 114 156 115 ( 128 ± 24.0 ) | | ND | | | |
| | 156 | 120 94 90 ( 101 ± 16.3 ) | | ND | | | |
| | 313 | 69 83 101 ( 84 ± 16.0 ) | | 22 26 22 ( 23 ± 2.3 ) | | | |
| | 625 c | 106 119 117 ( 114 ± 7.0 ) | | 17 22 22 ( 20 ± 2.9 ) | | | |
| | 1250 c | 96 86 91 ( 91 ± 5.0 ) | | 18 9 20 ( 16 ± 5.9 ) | | | |
| | 2500 c | 98 * 65 * 80 * ( 81 ± 16.5 ) | | 22 11 16 ( 16 ± 5.5 ) | | | |
| | 5000 c | | | 17 16 25 ( 19 ± 4.9 ) | | | |
| S9mix (+) | 0 | 94 118 113 ( 108 ± 12.7 ) | 18 8 18 ( 15 ± 5.8 ) | 37 40 24 ( 34 ± 8.5 ) | 27 31 31 ( 30 ± 2.3 ) | | |
| | 313 | 110 117 118 ( 115 ± 4.4 ) | 10 9 14 ( 11 ± 2.6 ) | 19 32 29 ( 27 ± 6.8 ) | 28 16 21 ( 22 ± 6.0 ) | | |
| | 625 c | 82 125 101 ( 103 ± 21.5 ) | 8 13 9 ( 10 ± 2.6 ) | 12 14 20 ( 15 ± 4.2 ) | 17 19 25 ( 20 ± 4.2 ) | | |
| | 1250 c | 93 131 103 ( 109 ± 19.7 ) | 11 17 15 ( 14 ± 3.1 ) | 16 19 22 ( 19 ± 3.0 ) | 15 28 26 ( 23 ± 7.0 ) | | |
| | 2500 c | 102 71 82 ( 85 ± 15.7 ) | 19 11 7 ( 12 ± 6.1 ) | 24 21 20 ( 22 ± 2.1 ) | 23 13 23 ( 20 ± 5.8 ) | | |
| | 5000 c | 103 89 85 ( 92 ± 9.5 ) | 13 10 17 ( 13 ± 3.5 ) | 17 19 9 ( 15 ± 5.3 ) | 18 29 30 ( 26 ± 6.7 ) | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control S9 mix (-) | Chemical | AF2 | | AF2 | | | |
| | Dose (μg /plate) | 0.01 | | 0.01 | | | |
| | Number of colonies / plate | 848 756 734 ( 779 ± 60.5 ) | | 235 253 233 ( 240 ± 11.0 ) | | | |
| Positive control S9 mix (+) | Chemical | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | | |
| | Dose (μg /plate) | 1 | 2 | 10 | 0.5 | | |
| | Number of colonies / plate | 912 959 942 ( 938 ± 23.8 ) | 289 281 310 ( 293 ± 15.0 ) | 521 748 741 ( 670 ± 129.1 ) | 354 335 352 ( 347 ± 10.4 ) | | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 96.0% and 1.56 wt% dibenzothiazyl disulfide was contained as impurity.

ND : Not done

Table 3-2. Results of reverse mutation test ( II ) of *N-tert*-butyl-2-benzothiazolesulfenamide on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (μg /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Frameshift type | | |
| | | | TA1535 | | TA98 | TA1537 | |
| S9mix (-) | 0 | | 12 10 6 ( 9 ± 3.1 ) | | 25 20 27 ( 24 ± 3.6 ) | | |
| | 3.91 | | 18 11 13 ( 14 ± 3.6 ) | | 19 31 27 ( 26 ± 6.1 ) | | |
| | 7.81 | | 11 9 5 ( 8 ± 3.1 ) | | 29 33 41 ( 34 ± 6.1 ) | | |
| | 15.6 | | 8 7 6 ( 7 ± 1.0 ) | | 25 24 24 ( 24 ± 0.6 ) | | |
| | 31.3 | | 5 4 7 ( 5 ± 1.5 ) | | 20 28 28 ( 25 ± 4.6 ) | | |
| | 62.5 | | 12 * 8 * 7 * ( 9 ± 2.6 ) | | 22 35 28 ( 28 ± 6.5 ) | | |
| | 125 | | 11 * 7 * 11 * ( 10 ± 2.3 ) | | 26 * 29 * 32 * ( 29 ± 3.0 ) | | |
| | 250 | | 6 * 9 * 8 * ( 8 ± 1.5 ) | | 27 * 33 * 30 * ( 30 ± 3.0 ) | | |
| | 500 | | 9 * 6 * 5 * ( 7 ± 2.1 ) | | 28 * 21 * 30 * ( 26 ± 4.7 ) | | |
| S9mix (+) | 0 | | | | | 19 16 10 ( 15 ± 4.6 ) | |
| | 62.5 | | | | | 7 17 12 ( 12 ± 5.0 ) | |
| | 125 | | | | | 12 17 15 ( 15 ± 2.5 ) | |
| | 250 | | | | | 14 9 9 ( 11 ± 2.9 ) | |
| | 500 c | | | | | 10 22 10 ( 14 ± 6.9 ) | |
| | 1000 c | | | | | 17 7 5 ( 10 ± 6.4 ) | |
| | 2000 c | | | | | 10 * 6 * 10 * ( 9 ± 2.3 ) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control S9 mix (-) | Chemical | | SA | | AF2 | | |
| | Dose (μg /plate) | | 0.5 | | 0.1 | | |
| | Number of colonies / plate | | 315 319 336 ( 323 ± 11.2 ) | | 724 638 737 ( 700 ± 53.8 ) | | |
| Positive control S9 mix (+) | Chemical | | | | | 2AA | |
| | Dose (μg /plate) | | | | | 2 | |
| | Number of colonies / plate | | | | | 453 468 388 ( 436 ± 42.5 ) | |

SA: Sodium azide, AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 96.0% and 1.56 wt% dibenzothiazyl disulfide was contained as impurity.

Table 3-3. Results of reverse mutation test ( II ) of *N-tert*-butyl-2-benzothiazolesulfenamide on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (μg /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Frameshift type | | |
| | | | | | | TA1537 | |
| S9mix (-) | 0 | | | | | 6 5 5 ( 5 ± 0.6 ) | |
| | 1.56 | | | | | 14 12 17 ( 14 ± 2.5 ) | |
| | 3.13 | | | | | 21 15 17 ( 18 ± 3.1 ) | |
| | 6.25 | | | | | 18 15 10 ( 14 ± 4.0 ) | |
| | 12.5 | | | | | 11 9 9 ( 10 ± 1.2 ) | |
| | 25.0 | | | | | 9 9 6 ( 8 ± 1.7 ) | |
| | 50.0 | | | | | 4 * 6 * 2 * ( 4 ± 2.0 ) | |
| | 100 | | | | | 9 * 4 * 6 * ( 6 ± 2.5 ) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control S9 mix (-) | Chemical | | | | | 9AA | |
| | Dose (μg /plate) | | | | | 80 | |
| | Number of colonies / plate | | | | | 1002 1120 887 ( 1003 ± 116.5 ) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

9AA: 9-Aminoacridine

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 96.0% and 1.56 wt% dibenzothiazyl disulfide was contained as impurity.