

(A)

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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、またS9 mix 添加試験では、TA1537 において1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1535のS9 mix 無添加試験は1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1537のS9 mix 無添加試験は100 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、添加試験は2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ および500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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°C 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°C 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(株)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: BSK4546、和光純薬工業(株)) 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)アクリルアミド (上野製薬(株))	ロット番号 46,	純度99.9%
SA	: アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))	ロット番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン (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(株))	ロット番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2 および 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを -20°C 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) バクアガー (Difco)	0.6%	(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	D-ピロリン酸	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(株)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。

硫酸マグネシウム・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	グルコース	20 g
リン酸水素二カウム	10 g	バクアガー (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 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml	NADH	4 μ mol
塩化マグネシウム	8 μ mol	NADPH	4 μ mol
塩化カルシウム	33 μ mol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol		

** : 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 (キッコーマン株、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 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合し、37°Cで20分間往復振とう培養したのち、トッパアガー 2 ml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°C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事とした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

BBTSAについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で、また S9 mix 添加試験では、TA1537 において 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1535 の S9 mix 無添加試験は 1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1537 の S9 mix 無添加試験は 100 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、添加試験は 2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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とともに、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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	165	130	140	6	24	20	28	27	14	26	35	28	9	8	8	
		(145 \pm 18.0)			(17 \pm 9.5)			(23 \pm 7.8)			(30 \pm 4.7)			(8 \pm 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	8	12	13	32	19	29	32	20	28	14	18	10	
		(146 \pm 25.1)			(11 \pm 2.6)			(27 \pm 6.8)			(27 \pm 6.1)			(14 \pm 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	492	440	486	323	374	306	144	124	125	744	717	710	1023	1065	1065	
		(473 \pm 28.4)			(334 \pm 35.4)			(131 \pm 11.3)			(724 \pm 18.0)			(1051 \pm 24.2)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	832	827	800	264	234	231	672	603	604	316	305	287	312	324	334	
		(820 \pm 17.2)			(243 \pm 18.2)			(626 \pm 39.6)			(303 \pm 14.6)			(323 \pm 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 <i>uvrA</i>			TA98		
S9mix (-)	0	103	115	100				21	30	16			
		(106 ± 7.9)						(22 ± 7.1)					
	39.1	127	121	119				ND					
		(122 ± 4.2)											
	78.1	116	137	144				ND					
		(132 ± 14.6)											
	156	104	117	114				ND					
		(112 ± 6.8)											
S9mix (+)	313	119	102	93				21	17	20			
		(105 ± 13.2)						(19 ± 2.1)					
	625 c	92	92	84				20	19	20			
		(89 ± 4.6)						(20 ± 0.6)					
	1250 c	98	89	103				29	25	14			
	(97 ± 7.1)						(23 ± 7.8)						
S9mix (+)	2500 c	103 *	77 *	118 *				23	22	11			
		(99 ± 20.7)						(19 ± 6.7)					
	5000 c							21	10	15			
								(15 ± 5.5)					
	0	135	117	120	7	9	11	37	24	17	31	37	29
		(124 ± 9.6)			(9 ± 2.0)			(26 ± 10.1)			(32 ± 4.2)		
	313	116	122	107	16	9	12	19	23	19	23	25	29
		(115 ± 7.5)			(12 ± 3.5)			(20 ± 2.3)			(26 ± 3.1)		
625 c	114	110	129	14	8	20	19	17	16	26	17	20	
	(118 ± 10.0)			(14 ± 6.0)			(17 ± 1.5)			(21 ± 4.6)			
1250 c	120	108	94	15	13	13	17	25	14	19	16	26	
	(107 ± 13.0)			(14 ± 1.2)			(19 ± 5.7)			(20 ± 5.1)			
2500 c	101	127	102	13	14	12	16	12	24	13	24	22	
	(110 ± 14.7)			(13 ± 1.0)			(17 ± 6.1)			(20 ± 5.9)			
5000 c	81	104	88	17	15	7	16	19	15	18	21	27	
	(91 ± 11.8)			(13 ± 5.3)			(17 ± 2.1)			(22 ± 4.6)			
Positive control	Chemical	AF2						AF2					
	Dose (µg /plate)	0.01						0.01					
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	624	743	740				270	237	270			
		(702 ± 67.9)						(259 ± 19.1)					
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	313	467	416	233	256	232	393	421	453	447	333	323
		(399 ± 78.4)			(240 ± 13.6)			(422 ± 30.0)			(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	19	18	17	
		(9 ± 1.7)			(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	26	23	20	
		(10 ± 0.6)			(23 ± 3.0)			
	31.3	2	7	8	33	24	25	
	(6 ± 3.2)			(27 ± 4.9)				
62.5	6	6	4	15	22	13 *		
	(5 ± 1.2)			(17 ± 4.7)				
125	7	12	11	16 *	23 *	17 *		
	(10 ± 2.6)			(19 ± 3.8)				
250	8 *	5 *	7 *	16 *	18 *	20 *		
	(7 ± 1.5)			(18 ± 2.0)				
500 c	6 *	6 *	9 *	12 *	18 *	17 *		
	(7 ± 1.7)			(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			
Positive control S9 mix (+)	Chemical				2AA			
	Dose (µg /plate)				2			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	382	328	300	629	623	632	
		(337 ± 41.7)			(628 ± 4.6)			
Positive control S9 mix (+)	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 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 \pm S.D.)													
		Base - pair substitution type						Frameshift type							
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98				
S9mix (-)	0	111	91	119				22	23	21					
		(107 \pm 14.4)						(22 \pm 1.0)							
	39.1	92	102	95				ND							
		(96 \pm 5.1)													
	78.1	114	156	115				ND							
		(128 \pm 24.0)													
	156	120	94	90				ND							
		(101 \pm 16.3)													
S9mix (-)	313	69	83	101				22	26	22					
		(84 \pm 16.0)						(23 \pm 2.3)							
	625 c	106	119	117				17	22	22					
		(114 \pm 7.0)						(20 \pm 2.9)							
	1250 c	96	86	91				18	9	20					
	(91 \pm 5.0)						(16 \pm 5.9)								
S9mix (+)	2500 c	98 *	65 *	80 *				22	11	16					
		(81 \pm 16.5)						(16 \pm 5.5)							
	5000 c							17	16	25					
								(19 \pm 4.9)							
S9mix (+)	0	94	118	113	18	8	18	37	40	24	27	31	31		
		(108 \pm 12.7)			(15 \pm 5.8)			(34 \pm 8.5)			(30 \pm 2.3)				
	313	110	117	118	10	9	14	19	32	29	28	16	21		
		(115 \pm 4.4)			(11 \pm 2.6)			(27 \pm 6.8)			(22 \pm 6.0)				
	625 c	82	125	101	8	13	9	12	14	20	17	19	25		
		(103 \pm 21.5)			(10 \pm 2.6)			(15 \pm 4.2)			(20 \pm 4.2)				
	1250 c	93	131	103	11	17	15	16	19	22	15	28	26		
		(109 \pm 19.7)			(14 \pm 3.1)			(19 \pm 3.0)			(23 \pm 7.0)				
S9mix (+)	2500 c	102	71	82	19	11	7	24	21	20	23	13	23		
		(85 \pm 15.7)			(12 \pm 6.1)			(22 \pm 2.1)			(20 \pm 5.8)				
	5000 c	103	89	85	13	10	17	17	19	9	18	29	30		
	(92 \pm 9.5)			(13 \pm 3.5)			(15 \pm 5.3)			(26 \pm 6.7)					
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2						AF2							
	Dose (μg /plate)	0.01						0.01							
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA				
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5				
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	912	959	942	289	281	310	521	748	741	354	335	352		
		(938 \pm 23.8)			(293 \pm 15.0)			(670 \pm 129.1)			(347 \pm 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	25	20	27			
		(9 ± 3.1)			(24 ± 3.6)					
	3.91	18	11	13	19	31	27			
		(14 ± 3.6)			(26 ± 6.1)					
	7.81	11	9	5	29	33	41			
		(8 ± 3.1)			(34 ± 6.1)					
	15.6	8	7	6	25	24	24			
		(7 ± 1.0)			(24 ± 0.6)					
S9mix (+)	31.3	5	4	7	20	28	28			
		(5 ± 1.5)			(25 ± 4.6)					
	62.5	12 *	8 *	7 *	22	35	28			
		(9 ± 2.6)			(28 ± 6.5)					
	125	11 *	7 *	11 *	26 *	29 *	32 *			
	(10 ± 2.3)			(29 ± 3.0)						
250	6 *	9 *	8 *	27 *	33 *	30 *				
	(8 ± 1.5)			(30 ± 3.0)						
500	9 *	6 *	5 *	28 *	21 *	30 *				
	(7 ± 2.1)			(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									
	Dose (µg /plate)									
Positive control S9 mix (+)	Chemical									
	Dose (µg /plate)									
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	315	319	336	724	638	737			
		(323 ± 11.2)			(700 ± 53.8)					
S9 mix (+)	Chemical									
	Dose (µg /plate)									
S9 mix (+)	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 \pm S.D.)					
		Frameshift type					
		TA1537					
S9mix (-)	0					6 5 5 (5 \pm 0.6)	
	1.56					14 12 17 (14 \pm 2.5)	
	3.13					21 15 17 (18 \pm 3.1)	
	6.25					18 15 10 (14 \pm 4.0)	
	12.5					11 9 9 (10 \pm 1.2)	
	25.0					9 9 6 (8 \pm 1.7)	
	50.0					4 * 6 * 2 * (4 \pm 2.0)	
	100					9 * 4 * 6 * (6 \pm 2.5)	
Positive control	Chemical					9AA	
	Dose (μg /plate)					80	
S9 mix (-)	Number of colonies / plate					1002 1120 887 (1003 \pm 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.