



N, N-ジシクロヘキシル-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
材料および試験方法	3
試験結果および考察	7
参 考 文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

N,N-ジシクロヘキシル-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について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験を 50~5000 μg /プレート の用量で行ったところ、抗菌性が認められなかったことから、本試験は 312.5~5000 μg /プレート の用量で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも陰性対照値の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ことから、*N,N*-ジシクロヘキシル-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】

OECD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,N*-ジシクロヘキシル-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ート法により実施した。

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⁽¹⁾、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⁽²⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）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代謝活性化法とからなっている。

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。

【材料および試験方法】

〔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日にアメリカ合衆国、
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。各検定菌は、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 (*pKM101*) の有無に
ついての特性確認を行った。

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字型試験管に種菌
を接種し、 37°C 、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,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド (CAS No. 4979-32-2、
以下DCBSと略) は、分子量 346.58 の灰白色グラニュール状の物質である。純度
99.5%以上のもの (ロット番号: 不純物: ジベンゾチアジルスルフィド 0.5%
以下、) を から供与された。被験物質は、
使用時まで室温で保管した。

DCBSは、ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略、ロット番号: APQ5928、
和光純薬工業(株)) に 50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3
で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所において、DCBSのDMSO溶液中での安定性試験を低濃度 (3.125 mg/ml)
および高濃度 (50 mg/ml) の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調
製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値 (0時間) の平均に対し

て、102および 95.9%であった。これらの値は、当研究所で規定した許容範囲内にあった (Appendix 1)。

また、本試験 I に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、3.125 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、98.5~102%、50 mg/ml 溶液は、98.2~101%であった。これらの値も当研究所の規定した許容範囲内であった (Appendix 2)。

以上の結果から、DCBS は DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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	： フリカラムイド	(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, 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) 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 は蒸留水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 混液の組成〕

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) バクトアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオチン	0.5 mM

* : WP2 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、日清製粉株式会社製の最少寒天培地（ロット番号：DJ020GI、1993年7月6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
リン酸水素二カルシウム	10 g	バクタガー (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 混液（1 ml 中下記の成分を含む）

S9 ^{**}	0.1 ml	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カルシウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-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 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-297、1993年8月27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ある。

[試験方法]

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml（代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml）、検定菌液 0.1 ml を混合したのち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 DMSO、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 Table 1～3 に示した。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、陰性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、本試験は同一用量について2回実施し、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種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、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、陰性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。

【試験結果および考察】

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。

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。DCBSについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、いずれの検定菌においても、すべての用量で抗菌性は認められなかった。また、被験物質に由来する沈殿物は直接法では 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で認められた。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 2、3 に示した。DCBSについて、すべての検定菌について、直接法、代謝活性化法ともに、312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、公比を2とし、試験を2回実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、被験物質に由来する沈殿物が直接法、代謝活性化法ともにすべての用量で認められた。

DCBSについて実施した試験において、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、陰性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。

以上の結果に基づき、DCBS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。

【参 考 文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N. : Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.L. : in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and 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,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide** 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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	129	107	143	10	10	12	22	17	14	20	15	12	5	11	7	
		(126 \pm 18.1)			(11 \pm 1.2)			(18 \pm 4.0)			(16 \pm 4.0)			(8 \pm 3.1)			
	50 #	110			7			12			20			5			
	150 #	106			9			26			13			9			
	500 #	139			8			18			15			6			
	1500 #	103			9			15			22			13			
	5000 #	95			7			18			14			6			
S9Mix (+)	0	115	100	120	14	11	13	22	22	27	33	18	35	8	14	15	
		(112 \pm 10.4)			(13 \pm 1.5)			(24 \pm 2.9)			(29 \pm 9.3)			(12 \pm 3.8)			
	50 #	99			9			37			23			8			
	150 #	132			9			20			38			9			
	500 #	129			12			26			23			9			
	1500 #	159			14			23			37			8			
	5000 #	129			17			17			29			6			
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	380	406	451	231	264	253	151	159	155	635	714	634	2653	2460	2751	
		(412 \pm 35.9)			(249 \pm 16.8)			(155 \pm 4.0)			(661 \pm 45.9)			(2621 \pm 148.1)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	870	857	930	280	276	243	1442	1463	1464	435	450	450	137	241	202	
		(886 \pm 38.9)			(266 \pm 20.3)			(1456 \pm 12.4)			(445 \pm 8.7)			(193 \pm 52.5)			

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 99.5 % and dibenzothiazyl sulfide was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of
N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide** 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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	136	114	125	10	10	12	17	20	13	25	27	20	5	6	9	
		(125 ± 11.0)			(11 ± 1.2)			(17 ± 3.5)			(24 ± 3.6)			(7 ± 2.1)			
	312.5 #	102	106	99	13	14	13	19	22	11	22	23	19	5	5	6	
		(102 ± 3.5)			(13 ± 0.6)			(17 ± 5.7)			(21 ± 2.1)			(5 ± 0.6)			
	625 #	116	132	123	14	12	11	21	19	16	17	26	25	4	4	12	
		(124 ± 8.0)			(12 ± 1.5)			(19 ± 2.5)			(23 ± 4.9)			(7 ± 4.6)			
	1250 #	157	137	110	12	13	12	14	23	14	29	33	14	5	4	6	
		(135 ± 23.6)			(12 ± 0.6)			(17 ± 5.2)			(25 ± 10.0)			(5 ± 1.0)			
2500 #	133	124	123	8	17	10	15	20	16	24	28	29	6	5	7		
	(127 ± 5.5)			(12 ± 4.7)			(17 ± 2.6)			(27 ± 2.6)			(6 ± 1.0)				
5000 #	126	111	115	7	8	9	18	23	12	25	23	34	4	6	7		
	(117 ± 7.8)			(8 ± 1.0)			(18 ± 5.5)			(27 ± 5.9)			(6 ± 1.5)				
S9Mix (+)	0	116	138	126	12	9	7	14	24	22	40	45	31	8	12	8	
		(127 ± 11.0)			(9 ± 2.5)			(20 ± 5.3)			(39 ± 7.1)			(9 ± 2.3)			
	312.5 #	124	135	117	14	13	13	19	19	12	28	50	31	6	7	1	
		(125 ± 9.1)			(13 ± 0.6)			(17 ± 4.0)			(36 ± 11.9)			(5 ± 3.2)			
	625 #	138	160	127	15	19	18	24	20	17	45	41	39	3	15	9	
		(142 ± 16.8)			(17 ± 2.1)			(20 ± 3.5)			(42 ± 3.1)			(9 ± 6.0)			
	1250 #	140	144	148	14	9	11	22	12	12	27	26	38	7	2	7	
		(144 ± 4.0)			(11 ± 2.5)			(15 ± 5.8)			(30 ± 6.7)			(5 ± 2.9)			
2500 #	159	159	155	9	14	13	17	10	11	32	30	33	4	3	9		
	(158 ± 2.3)			(12 ± 2.6)			(13 ± 3.8)			(32 ± 1.5)			(5 ± 3.2)				
5000 #	117	143	127	12	17	8	21	13	7	37	33	29	8	10	5		
	(129 ± 13.1)			(12 ± 4.5)			(14 ± 7.0)			(33 ± 4.0)			(8 ± 2.5)				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	558	503	581	272	290	257	151	147	141	818	784	809	1996	1973	2086	
		(547 ± 40.1)			(273 ± 16.5)			(146 ± 5.0)			(804 ± 17.6)			(2018 ± 59.7)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1050	1112	1125	178	210	144	1211	1295	1303	323	286	295	267	265	171	
		(1096 ± 40.1)			(177 ± 33.0)			(1270 ± 51.0)			(301 ± 19.3)			(234 ± 54.9)			

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 99.5 % and dibenzothiazyl sulfide was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of
N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide** 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			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	113	107	102	9	14	13	31	27	13	15	21	17	6	11	4
		(107 \pm 5.5)			(12 \pm 2.6)			(24 \pm 9.5)			(18 \pm 3.1)			(7 \pm 3.6)		
	312.5 #	144	136	148	14	12	9	16	21	10	23	22	18	7	7	11
		(143 \pm 6.1)			(12 \pm 2.5)			(16 \pm 5.5)			(21 \pm 2.6)			(8 \pm 2.3)		
	625 #	138	153	125	11	16	8	13	22	12	18	17	19	11	5	1
		(139 \pm 14.0)			(12 \pm 4.0)			(16 \pm 5.5)			(18 \pm 1.0)			(6 \pm 5.0)		
	1250 #	138	151	108	12	11	11	13	18	13	19	17	23	8	2	7
		(132 \pm 22.1)			(11 \pm 0.6)			(15 \pm 2.9)			(20 \pm 3.1)			(6 \pm 3.2)		
2500 #	109	121	108	10	10	10	15	12	11	14	9	18	5	7	4	
	(113 \pm 7.2)			(10 \pm 0.0)			(13 \pm 2.1)			(14 \pm 4.5)			(5 \pm 1.5)			
5000 #	97	118	114	18	10	11	12	17	11	13	18	21	6	6	5	
	(110 \pm 11.2)			(13 \pm 4.4)			(13 \pm 3.2)			(17 \pm 4.0)			(6 \pm 0.6)			
S9Mix (+)	0	134	125	147	14	12	12	15	14	28	33	45	28	8	9	9
		(135 \pm 11.1)			(13 \pm 1.2)			(19 \pm 7.8)			(35 \pm 8.7)			(9 \pm 0.6)		
	312.5 #	127	145	128	13	12	15	28	28	27	22	36	35	13	17	11
		(133 \pm 10.1)			(13 \pm 1.5)			(28 \pm 0.6)			(31 \pm 7.8)			(14 \pm 3.1)		
	625 #	128	139	139	13	20	12	27	19	26	27	30	22	7	15	16
		(135 \pm 6.4)			(15 \pm 4.4)			(24 \pm 4.4)			(26 \pm 4.0)			(13 \pm 4.9)		
	1250 #	151	130	153	16	15	13	15	19	14	31	35	23	6	3	11
		(145 \pm 12.7)			(15 \pm 1.5)			(16 \pm 2.6)			(30 \pm 6.1)			(7 \pm 4.0)		
2500 #	131	142	134	13	13	9	11	13	11	21	25	25	7	4	7	
	(136 \pm 5.7)			(12 \pm 2.3)			(12 \pm 1.2)			(24 \pm 2.3)			(6 \pm 1.7)			
5000 #	137	137	156	11	14	17	11	20	13	21	18	30	6	3	13	
	(143 \pm 11.0)			(14 \pm 3.0)			(15 \pm 4.7)			(23 \pm 6.2)			(7 \pm 5.1)			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	535	542	542	250	243	265	167	158	156	846	883	800	2140	1903	1984
		(540 \pm 4.0)			(253 \pm 11.2)			(160 \pm 5.9)			(843 \pm 41.6)			(2009 \pm 120.5)		
	Number of colonies / plate	1136	1139	1122	292	256	254	1614	1683	1751	552	551	509	307	302	274
		(1132 \pm 9.1)			(267 \pm 21.4)			(1683 \pm 68.5)			(537 \pm 24.5)			(294 \pm 17.8)		

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 99.5 % and dibenzothiazyl sulfide was contained as impurity.