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

【目 次】

			頁
要		約	 1
緒		耆	 2
材料およて	が試験フ	方法	3
試験結果は	さよびホ	考察	 7
参考	文	献	 8
Tables	1 ~	~ 3	

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 $50\sim5000~\mu g/7\nu$ -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 $312.5\sim5000~\mu g/7\nu$ -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】

OBCD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。、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。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 を受けた。 から分与

検定菌は、-80℃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、ニュートリエントプロス№ 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:ジベンゾチアジルジスルフィド 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/nl) および高濃度 (50 mg/nl) 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、 $98.5 \sim 102\%$ 、50 mg/ml 溶液は、 $98.2 \sim 101\%$ 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 : フリルフラマイト (上野製薬㈱ ロット番号 46, 純度99.9%)
SA : アラ化ナトリウム (和光純薬工業㈱ ロット番号 TWR3330, 純度90%以上)
9AA : 9-アミノアクリラン (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, 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) パクトアガー (Difco) 0.6% (B) L-ヒスチジン 0.5 mM 塩化ナトリウム 0.5% ビオチン 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1ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マクネシウム・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
リン酸水素二かりウム	10 g	パケトアガー (Difco)	15 g
リン酸ー・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	μ mol
塩化マクネシウム	8 μ mol	NADPH	4	μ mol
塩化がりかる	33 μ mol	ナトリウム-リン 酸緩衝 液 (pH 7.4)	100	// mo.1
グルコースー6ーリン酸	5 μ mol	(pn 1.4)	100	μшоι

**: 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。

小試験管中にトップアガー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℃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、 $50\sim5000~\mu g/7\nu$ -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 $150~\mu g/7\nu$ -ト、代謝活性化法では $500~\mu g/7\nu$ -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 µg/7v-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、 $312.5\sim5000~\mu\text{g}/\text{TV}$ -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	Test substance dose	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)					
without (-)		Ba	se - pair substitution t	уре		Frameshift type	
S9 Mix	(µg /plate)	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
	0	129 107 143 (126 ± 18.1)	10 10 12 (11 ± 1.2)	22 17 14 (18 ± 4.0)	20 15 12 (16 ± 4.0	5 11 7) (8± 3.1)	
	50 #	110	7	12	20	5	
	150 #	106	9	26	13	9	
	500 #	139	8	18	15	6	
S9Mix	1500 #	103	9	15	22	13	
(-)	5000 #	95	7	18	14	6	
							
	0	115 100 120	14 11 13	22 22 27	33 18 35	8 14 15	
	,	(112 ± 10.4)	(13 ± 1.5)	Ī	ſ	ì	
	50 #	99	9	37	23	8	
	150 #	132	9	20	38	9	
	500 #	129	12	26	23	9	
S9Mix	1500 #	159	14	23	37	8	
(+)	5000 #	129	1/	1/	29	6	-
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
control	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 Mix (-)	Number of	380 406 451	231 264 253	151 159 155		2653 2460 2751	·
	colonies / plate	(412 ± 35.9)	(249 ± 16.8)	(155 ± 4.0).	(661 ± 45.9)	'	
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control	Dose (µg/plate)	11	2	10	0.5	2	
S9 Mix (+)	Number of	870 857 930	280 276 243	1442 1463 1464	435 450 450	137 241 202	
	colonics / plate	(886 ± 38.9)	(266 ± 20.3)	(1456± 12.4)	(445 ± 8.7)	(193 ± 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	ith (+) or Test substance Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)						
without (-)	dose	Ba	se - pair substitution t			Frameshift type	
S9 Mix	(µg /plate)	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
37 1112	0	136 114 125	10 10 12	17 20 13	25 27 20	5 6 9	
		(125 ± 11.0)		1		1	
	312.5 #	102 106 99	13 14 13	19 22 11	22 23 19	5 5 6	
	3.2.3	(102 ± 3.5)	(13 ± 0.6)	į.		1	
	625 #	116 132 123	14 12 11	21 19 16	17 26 25	4 4 12	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	522	(124 ± 8.0)	•		(23 ± 4.9	1	
	1250 #	157 137 110	12 13 12	14 23 14	29 33 14	5 4 6	
	1250	(135 ± 23.6)			1	1 - 1	
S9Mix	2500 #	133 124 123	8 17 10	15 20 16	24 28 29	6 5 7	
SHATTY		(127 ± 5.5)	(12 ± 4.7)	1	ľ	1 1	
(-)	5000 #	126 111 115	7 8 9	18 23 12	25 23 34	4 6 7	
	3 000 x	(117± 7.8)			1		
		, ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,			3.5	,	
					 		
				1			
							
)	
	0	116 138 126	12 9 7	14 24 22	40 45 31	8 12 8	
		(127 ± 11.0)	(9± 2.5)	1			1
	312.5 #	124 135 117	14 13 13	19 19 12	28 50 31	6 7 1	
		(125 ± 9.1)	(13 ± 0.6)	į	1	1 - 1	
	625 #	138 160 127	15 19 18	24 20 17	45 41 39	3 15 9	
		(142 ± 16.8)	(17 ± 2.1)		l .	1	
	1250 #	140 144 148	14 9 11	22 12 12	27 26 38	7 2 7	
		(144 ± 4.0)		ļ	ŀ	(5± 2.9)	1
S9Mix	2500 #	159 159 155	9 14 13	17 10 11	32 30 33	4 3 9	
JANUA	2300	(158 ± 2.3)		(ĺ	i f	
(+)	5000 #	117 143 127	12 17 8	21 13 7	37 33 29	8 10 5	-
(.)	3000 "	(129 ± 13.1)		1		1	
		(12/ - 13/1)	<u> </u>			(02 2.5)	
						}	ł
			<u> </u>				
				-			
				}			
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
control	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 Mix (-)	Number of	558 503 581	272 290 257	151 147 141	818 784 809	1996 1973 2086	
J	colonies / plate	(547 ± 40.1)	(273 ± 16.5)	(146 ± 5.0)	(i	
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 Mix (+)	Number of	1050 1112 1125		1211 1295 1303	323 286 295	267 265 171	
J. MIM (*)	colonies / plate	(1096 ± 40.1)	(177 ± 33.0)	(1270 ± 51.0)	(301 ± 19.3)	(234 ± 54.9)	
L		(10,00 - 10,12)	-ida SA: Sadium	<u> </u>	1 201 - 19.3 /	(437 4 34,7)	

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	Test substance	substance Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)					
without (-)	dose	Ва	se - pair substitution t		Frameshift type		
S9 Mix	(µg /plate)		TA1535	WP2uvtA	TA98 TA1537		
J) WILL	0	113 107 102 (107 ± 5.5)	9 14 13	31 27 13	15 21 17	6 11 4	· ·
	312.5 #	144 136 148 (143 ± 6.1)	14 12 9	16 21 10	23 22 18 (21 ± 2.6	7 7 11 (8± 2.3)	
	625 #	138 153 125 (139 ± 14.0)		13 22 12 (16 ± 5.5)			
	1250 #	138 151 108 (132 ± 22.1)		13 18 13 (15 ± 2.9)			
S9Mix	2500 #	109 121 108 (113 ± 7.2)		15 12 11 (13 ± 2.1)	 		
(-)	5000 #	97 118 114 (110±11.2)	18 10 11 (13± 4.4)	12 17 11 (13 ± 3.2)	13 18 21 (17± 4.0	6 6 5 (6± 0.6)	
	ï						
	0	134 125 147 (135 ± 11.1)	14 12 12 (13± 1.2)	15 14 28 (19± 7.8)	33 45 28 (35 ± 8.7)	8 9 9 (9± 0.6)	
	312.5 #	127 145 128 (133 ± 10.1)			22 36 35 (31 ± 7.8)	T	·
	625 #	128 139 139 (135 ± 6.4)					
	1250 #	151 130 153 (145 ± 12.7)				1	
S9Mix	2500 #	131 142 134 (136 ± 5.7)				7 4 7 (6± 1.7)	
(+)	5000 #	137 137 156 (143 ± 11.0)	11 14 17 (14± 3.0)	11 20 13 (15± 4.7)	21 18 30 (23 ± 6.2)	6 3 13 (7± 5.1)	
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
control	Dose (ug /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	535 542 542 (540 ± 4.0)			846 883 800 (843 ± 41.6)	2140 1903 1984 (2009 ± 120.5)	
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control	Dose (µg /plate)		2	10	0.5	2	
S9 Mix (+)	Number of	1136 1139 1122	1	1614 1683 1751	552 551 509	307 302 274	
	colonies / plate	(1132 ± 9.1)				(294 ± 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.