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

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

1. 使用した細胞 ---------- 3

2. 培養液の調製 ---------- 3

3. 培養条件 ---------- 3

4. 被験物質および陽性対照物質 ---------- 3

5. 被験物質の調製 ---------- 4

6. 試験条件 ---------- 5

7. 細胞増殖抑制試験 ---------- 5

7.1 処理条件 ---------- 6

7.2 標本作製法 ---------- 6

7.3 増殖抑制の指標とその結果 ---------- 6

8. 本試験の群構成 ---------- 6

8.1 直接法 ---------- 7

8.2 代謝活性化法 ---------- 7

8.3 追加試験（*in vitro* 小核試験） ---------- 8

9. 染色体標本作製法 ---------- 8

10. 染色体分析 ---------- 9

11. 小核標本作製法と観察 ---------- 9

12. 記録と判定 ---------- 10

結果および考察 ---------- 11

結　論 ---------- 11

特記事項 ---------- 12

文　献 ---------- 12

Tables 1～6，Figures 1～4

【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 *in vitro* 染色体異常誘発性を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて検討し、陽性の結果を得た。

直接法では、50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度（約60%の増殖抑制濃度）の0.82 mg/mℓの濃度を最高処理濃度とした。一方、代謝活性化法のS9 mix存在下およびS9 mix非存在下では、細胞増殖抑制が認められなかったことより、3.5 mg/mℓ（10 mM）の濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。直接法として、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理、代謝活性化法としてS9 mix存在下および非存在下で6時間（18時間の回復時間）処理後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

直接法により、CHL/IU細胞を24時間連続処理した高濃度群（0.82 mg/mℓ）において、構造異常を有する細胞について統計学的に有意な増加が認められたが、その頻度は2.5%で、生物学的には陰性と判定した。また、48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常の有意な増加は認められなかった。一方、24時間連続処理した低濃度群（0.21 mg/mℓ）、高濃度群（0.82 mg/mℓ）および48時間連続処理したすべての処理群において、倍数性細胞の有意な増加が認められ、疑陽性の結果が得られた。そこで、*in vitro* 小核試験による追加試験を実施したところ、48時間連続処理したすべての処理群で小核と多核細胞の有意な増加が認められた。代謝活性化法では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したすべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

【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の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

上記の試験は、「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：473」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】

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク（JCRB）から入手（1988年2月、入手時：継代 4代、現在12代）したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL/IU（以下CHLと略す） 細胞を、解凍後継代 10代以内で試験に用いた。

この CHL 細胞株は、一般的に化学物質に対して検出感度が高いため常用されている。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清（FCS：JRH BIOSCIENCES、ロット番号：1C2073およびBiocell、ロット番号：4001776）を 10% 添加したイーグル MEM 培養液を用いた。MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末（日水製薬(株)）9.4 g を 1 ℓ の蒸留水に溶解し、121 ℃ で 15分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン（滅菌済み、日水製薬(株)）300 mg と 10% $NaHCO_3$ 溶液、約 12.5 mℓ を加えて調製した。2倍濃度の MEM 培養液は、上記の培地 9.4 g を 500 mℓ の蒸留水に溶解し、以下 MEM 培養液と同様に調製した。

3. 培養条件

2×10^4個の CHL 細胞を、培養液 5 mℓ を入れたディッシュ (径 6 cm、Corning) に播き、37 ℃ の CO_2 インキュベーター (5% CO_2) 内で培養した。

4. 被験物質および陽性対照物質

［被験物質］（　　本試験データより）

（名　　称）	*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
（略　　号）	DCBS
（CAS　No.）	4979-32-2
（ロット番号）	
（分子式）	$C_{19}H_{26}N_2S_2$
（分子量）	346.58
（純　　度）	99.5%以上（不純物としてdibenzthiazyl disulfide（0.5%未満）を含む）

（性　　状）　灰白色グラニュール状で、水およびアセトンに対する溶解度は、それぞれ0.003 g/100 mℓ（24℃）および5.30 g/100 mℓ（24℃）、ジメチルスルホキシド（DMSO）に不溶、融点102.5℃の物質である。

（提　供　者）

（保　存　条　件）　冷暗所・遮光保存

（安　定　性）　上記の条件下では安定。熱、光等で非常に緩やかに分解する。有効期限は10か月。

（媒体中での安定性）　秦野研究所分析化学研究室で実施した媒体中（0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液、以下0.5%CMC Na水溶液と略す）での安定性試験では、2.05～35.0 mg/ mℓ の濃度範囲で4時間は安定であった（Appendix 1）。

[陽性対照物質]

1）直接法の試験に用いる物質

（化　学　名）　マイトマイシン C

（略　　号）　MC

（ロ　ッ　ト　番　号）　926ACE

（製　造　者）　協和醗酵工業(株)

（保　存　条　件）　冷暗所保存

2）代謝活性化法の試験に用いる物質

（化　学　名）　シクロホスファミド

（略　　号）　CPA

（ロ　ッ　ト　番　号）　70H0948

（製　造　者）　Sigma Chemical Co.

（保　存　条　件）　冷暗所保存

5．被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。媒体として0.5%CMC Na（ナカライテスク(株)、ロット番号：M9G8053）水溶液を用いた。原体を媒体に懸濁して原液（増殖抑制試験で

は35 mg/mℓ、染色体異常試験では8.2 mg/mℓ および35 mg/mℓ、小核試験では8.2 mg/mℓ)を調製し、ついで原液を媒体で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験および小核試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内（媒体中での平均含量が添加量の85.0～115%）の値であった（Appendix 2、3）。

6. 試験条件

直接法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、ディッシュに培養液4.5 mℓと各濃度の被験物質調製液 0.5 mℓを加え、24時間および48時間連続処理した。

代謝活性化法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、MEM培養液、2倍濃度のMEM培養液およびS9 mixをそれぞれ14：8：5の割合で混合した溶液2.7 mℓをディッシュに加えた。また、S9 mix非存在下の処理群においては、MEM培養液 および2倍濃度のMEM培養液をそれぞれ8：1の割合で混合した溶液2.7 mℓをディッシュに加え、さらに0.3 mℓの被験物質調製液を加えて6時間処理した。処理終了後、新鮮な培養液に交換し、さらに18時間培養した。S9 mixの調製は下記の組成で行った。

追加試験として実施した *in vitro* 小核試験についても上記と同様の試験条件で実施した。

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM $MgCl_2$	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1
合計	10 mℓ

* S9 ： Sprague-Dawley系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与して調製したキッコーマン(株)のS9（ロット番号：RAA-297, 1993年8月製造）を購入し、使用時まで－80℃の超低温槽内に保存した。

7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及

ぼす影響を調べた。

7.1　処理条件

直接法では48時間処理群について、また、代謝活性化法ではS9 mix 存在下および非存在下の処理群について細胞増殖抑制試験を実施した。処理濃度は、直接法および代謝活性化法とも0.1 ～3.5 mg/mℓ (10 mM) の範囲の濃度を用いた。ディッシュは 1濃度について 2枚用いた。

7.2　標本作製法

培養終了後、培養液を捨てたのち、10% ホルマリン溶液を加え、細胞がディッシュに付着した状態で 固定した。固定後、0.1% クリスタルバイオレット液で染色した。

7.3　増殖抑制の指標とその結果

被験物質の CHL 細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（Monocellater™、オリンパス光学工業(株)）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の媒体対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、直接法における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度（約60%の増殖抑制濃度）を、60%の増殖抑制濃度をはさむ2濃度の値より算出したところ、0.82 mg/mℓであった。一方、代謝活性化法の S9 mix 存在下および非存在下 では、処理したすべての濃度範囲で60%を越える増殖抑制作用は認められなかった（Table 1、2、3 および Fig.1）。

8. 本試験の群構成

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法では 0.82 mg/mℓ、代謝活性化法では 3.5 mg/mℓ (10 mM) とし、それぞれ高濃度群の 1/2 の濃度を中濃度、1/4 の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたMC および CPA は、注射用水（大塚製薬工場(株)、ロット番号：K1H75）に溶解して調製した。それぞれ染色体異常および小核を誘発することが知られている濃度を適用した。

8.1　直接法

直接法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め下記の 11群を設け、各群 2枚のディッシュを用いた。

	群	濃度 (mg/mℓ)	処理時間 (hours)
1)	無処理対照	−	−
2)	媒体対照	0	24
3)	DCBS	0.21	24
4)	DCBS	0.41	24
5)	DCBS	0.82	24
6)	陽性対照 (MC)	0.00005	24
7)	媒体対照	0	48
8)	DCBS	0.21	48
9)	DCBS	0.41	48
10)	DCBS	0.82	48
11)	陽性対照 (MC)	0.00005	48

8.2　代謝活性化法

代謝活性化法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群として S9 mix を加えない群を含め、下記の 11群を設け、各群 2枚のディッシュを用いた。

	群	濃度 (mg/mℓ)	S9 mixの有無	処理時間 (hours)
1)	無処理対照	—	—	—
2)	媒体対照	0	−	6-(18)
3)	DCBS	0.9	−	6-(18)
4)	DCBS	1.8	−	6-(18)
5)	DCBS	3.5	−	6-(18)
6)	陽性対照 (CPA)	0.005	−	6-(18)
7)	媒体対照	0	+	6-(18)
8)	DCBS	0.9	+	6-(18)
9)	DCBS	1.8	+	6-(18)
10)	DCBS	3.5	+	6-(18)
11)	陽性対照 (CPA)	0.005	+	6-(18)

8.3　追加試験（*in vitro* 小核試験）

追加試験では、下記の3段階の被験物質処理濃度群に媒体対照と陽性対照群を加えた5群を設けた。各群2枚のディッシュを用いた。

	群	濃度 (mg/mℓ)	処理時間 (hours)
1)	媒体対照	0	48
2)	DCBS	0.21	48
3)	DCBS	0.41	48
5)	DCBS	0.82	48
5)	陽性対照 (MC)	0.00005	48

9. 染色体標本作製法

1) 培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 μg/mℓ になるように培養液に加え、培養終了後、各群の細胞をリン酸緩衝液（Ca^{++}、Mg^{++}を含まない）で洗い、ピペッティングにより細胞をはがし、10 mℓ の遠沈管に集めた。

2) 1,000～1,200 rpm で 5分間遠沈し、上清を捨てたのち、沈殿した細胞に 3 mℓ の0.075 M KCl 水溶液を加えることにより約 30分間低張処理を行った。

3) 低張処理後、低張液の上層にカルノア液（氷酢酸：メタノール = 1：3 v/v）約 6 mℓを加え、下方から静かにピペッティングしながら混和して固定し、その後 1,000～1,200 rpm で 5分間遠沈した。

4) 遠沈後上清を除き、再び新鮮なカルノア液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ、1,000～1,200 rpm で 5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。

5) 遠沈して得た白色の細胞塊に、0.2～0.5 mℓ のカルノア液を加え、十分に懸濁させた。

6) 細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。

7) スライド標本は各ディッシュにつき 6枚作製した。

8) スライドグラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入した。

9) 乾燥したスライドは、ギムザ原液（Merck）4.5 mℓ を M/15 リン酸緩衝液（pH 6.8）150 mℓ に希釈した染色液で約 8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。

10) 染色したスライド標本は、コード番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系

識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、複数の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会[1]による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析することとした。

11. 小核標本作製法と観察

1) ディッシュより細胞を剥離し、遠心して得られた細胞に3 mℓの0.15 M KCl水溶液を加えピペッティングし、約20分間低張処理した。
2) メタノール：氷酢酸（5：1）の固定液を低張液の上から加え、細胞を固定した。
3) 遠心して固定液を捨て、再び固定液を10 mℓ加えてピペッティング後、遠心した。
4) 場合によっては、3と同じ操作をもう一度行った。
5) 固定液を捨て、新たに少量の固定液を加えて細胞を浮遊させた。
6) パスツールピペットでピペッティング後、少量の細胞懸濁液をとり、スライド上に1滴滴下した。
7) 風乾した後、市販のギムザ液5 mℓをM/15リン酸緩衝液（pH 6.8）145 mℓに希釈した染色液で約10分間染色した。
8) 観察は、60倍以上の対物レンズ（接眼10倍）をつけた顕微鏡を用いて行った。
9) 1ディッシュあたり、細胞質を含み、細胞質周辺の明瞭な間期細胞1000個について観察し、小核をもった細胞を算定した。
10) 小核の判定基準は以下のように行った[2]。
    ・小核の直径が主核の1/3以下であること。
    ・光の屈折がなく、焦点をわずかにずらしても明瞭に小核と判定できること。
    ・小核の色調は主核と同じか、それより明るく見え、明らかに核由来と判定できるこ

と。

・主核に接し突起状に小核様のものがある場合は小核と見なさない。

11）本被験物質は倍数性細胞を誘発したことから、その指標となる異常な多核および異形核の出現頻度について、さらに1ディッシュあたり1000細胞分析することとした。

12. 記録と判定

無処理対照、媒体および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの Exact probability test 法により、媒体対照群と被験物質処理群間および媒体対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら[3]の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5% 未満を陰性、5% 以上 10% 未満を疑陽性、10% 以上を陽性とした。但し、疑陽性の結果が得られた場合には、染色体異常試験もしくは小核試験により、再現性、用量依存性等を検討し最終判定を行うこととした。

小核試験に関しては、Kastenbaum & Bowman の方法（1970）[4]に従って有意差検定（$p<0.05$）を行い、小核誘発の判定を行った。

【結果および考察】

直接法による染色体分析の結果を Table 4 および Fig. 2 に示した。

DCBSを加えて 24時間連続処理した高濃度群（0.82 mg/mℓ）で、染色体の構造異常の有意な増加（p=0.0304）が認められたが、その頻度は5%未満で、生物学的には陰性と判断した。また、48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常は誘発されなかった。一方、24時間連続処理した低濃度群（0.21 mg/mℓ、p=0.0454）、高濃度群（0.82 mg/mℓ、p=0.00274）および48時間連続処理したすべての処理群（$P < 8.3810^{-4}$）で、倍数性細胞の有意な増加が認められた。特に中濃度群（0.41 mg/mℓ）では、その頻度が6%となり、疑陽性の結果が得られた。そこで、再現性のための追加試験として、染色体の構造異常と数的異常を精度よく反映することができる *in vitro* 小核試験を実施した（Table 5 および Fig. 3）。その結果、48時間連続処理したすべての処理群において、小核および異形の多核細胞の有意な増加（$P < 0.05$）が認められた。異形の多核細胞は、倍数性細胞を誘発する薬剤処理によって誘発される場合が多いことから、本被験物質による異形多核細胞の生成は、倍数性細胞の誘発と関連していることが示唆された。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 6 および Fig. 4 に示した。

DCBSを加えて S9 mix 存在下および非存在下で 6時間処理したすべての処理群で、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

陽性対照として用いた直接法での MC 処理群、および S9 mix 存在下での CPA 処理群では染色分体交換 (cte) や染色分体切断 (ctb) などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。また、小核試験において陽性対照として用いた MC 処理群では、小核の有意な増加が認められた。

【結　　論】

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、直接法により、24時間および48時間連続処理した60%の増殖抑制濃度を含むすべての処理群（0.21～0.82 mg/mℓ）において、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、24時間連続処理した高濃度群（0.82 mg/mℓ）および48時間連続処理したすべての処理群で、倍数性細胞の有意な増加が認められ、48時間連続処理に関しては疑陽性の結果が得られた。

また、追加試験において、小核および多核細胞の有意な増加が認められ、倍数性細胞の誘発を強く示唆する結果が得られた。

代謝活性化法においては、S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理した10 mM の濃度を含むすべての処理群（0.9～3.5 mg/mℓ）において、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、*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は、上記の試験条件下で、試験管内の CHL 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

【特記事項】

本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

【文　　献】

1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店、1988

2) 日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法、247-251、朝倉書店、1991

3) 石館　基　監修：〈改訂〉染色体異常試験データ集、エル・アイ・シー社、1987

4) Kastenbaum M. A., Bowman K. O.: Mutation Res. 9 : 527-549, 1970

Table 1 Growth inhibition of CHL cells continuously treated with *N,N*-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide(DCBS) for 48 hours without S9 mix

Concentration of DCBS (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.1	87 ,	89	88.0
0.2	79 ,	79	79.0
0.4	67 ,	64	65.5
0.9	36 ,	36	36.0
1.8	16 ,	19	17.5
3.5	9 ,	8	8.5

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 2 Growth inhibition of CHL cells treated with *N,N*-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide(DCBS) for 6 hours with S9 mix

Concentration of DCBS (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.1	106 ,	112	109.0
0.2	97 ,	107	102.0
0.4	91 ,	104	97.5
0.9	87 ,	97	92.0
1.8	75 ,	83	79.0
3.5	59 ,	69	64.0

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 3 Growth inhibition of CHL cells treated with *N,N*-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide(DCBS) for 6 hours without S9 mix

Concentration of DCBS (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.1	102 ,	106	104.0
0.2	104 ,	101	102.5
0.4	106 ,	113	109.5
0.9	105 ,	102	103.5
1.8	104 ,	118	111.0
3.5	109 ,	118	113.5

Cell growth was measured by Monocellater^{TM} (OLYMPUS)

Table 4 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with *N,N* -dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Judgement[5]	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control[1]			200	0	1	1	1	1	1	0	5	0	5 (2.5)	5 (2.5)	0.63		
Vehicle[1]	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38		
DCBS	0.21	24	200	0	0	0	0	1	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	1.25 *	−	−
DCBS	0.41	24	200	0	0	0	3	0	5	0	8	0	1 (0.5)	1 (0.5)	1.13	−	−
DCBS	0.82	24	200	0	2	2	5	0	3	0	12	0	5 *(2.5)	5 *(2.5)	1.96 *[6]	−	−
MC	0.00005	24	200	9	47	94	3	0	4	0	157	2	98 *(49.0)	96 *(48.0)	0.25	+	−
Vehicle[1]	0	48	200	0	2	1	1	0	2	10	16	0	5 (2.5)	5 (2.5)	0.13		
DCBS	0.21	48	200	0	1	1	1	0	3	0	6	0	5 (2.5)	5 (2.5)	3.38 *	−	−
DCBS	0.41	48	200	0	1	0	2	0	2	20	25	1	5 (2.5)	5 (2.5)	6.00 *	−	±
DCBS	0.82	48	200	0	0	0	5	0	2	10	17	0	5 (2.5)	5 (2.5)	1.64 *[7]	−	−
MC	0.00005	48	200	3	32	106	10	5	5	0	161	20	90 *(45.0)	90 *(45.0)	0.25	+	−

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Seven hundred and sixty-six cells were analysed. 7) Seven hundred and ninety-four cells were analysed. * : Significantly different from solvent control at $p<0.05$. ** : Purity was more than 99.5%, and dibenzthiazyl disulfide (less than 0.5%) was contained as impurity.

Table 5 *In vitro* micronucleus test of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with *N,N*-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide(DCBS)** for 48 hours without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with MN	%	Judgement [2)]	No. of cells analysed	No. of cells with multi nuclei	%	Judgement [2)]
Vehicle[1)]	0	48	2000	5	0.3		2000	13	0.7	
DCBS	0.21	48	2000	13*	0.7	+	2000	53*	2.7	+
DCBS	0.41	48	2000	17*	0.9	+	2000	51*	2.6	+
DCBS	0.82	48	2000	24*	1.2	+	2000	147*	7.4	+
MC	0.00005	48	2000	330*	16.5	+	2000	107*	5.4	+

Abbreviations : MN : micronuclei, MC : mitomycin C. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 2) Judgement was done by statistical method of Kastenbaum and Bowman (1970).
* : Significantly different from solvent control at $p<0.05$. ** : Purity was more than 99.5%, dibenzthiazyl disulfide (less than 0.5%) was contained impurity.

Table 6 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with *N,N* -dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS)** with and wituot S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Judgement[5]	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control[1]				200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25		
Vehicle[1]	0	−	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50		
DCBS	0.9	−	6 - (18)	200	0	1	0	4	0	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00	−	−
DCBS	1.8	−	6 - (18)	200	0	1	0	2	0	2	0	5	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.25	−	−
DCBS	3.5	−	6 - (18)	200	0	1	1	1	0	2	0	5	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.38	−	−
CPA	0.005	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	−	−
Vehicle[1]	0	+	6 - (18)	200	1	0	0	0	1	1	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.50		
DCBS	0.9	+	6 - (18)	200	0	0	1	1	0	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	−	−
DCBS	1.8	+	6 - (18)	200	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	−	−
DCBS	3.5	+	6 - (18)	200	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13	−	−
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	4	59	137	0	0	8	0	208	0	99 *(49.5)	99 *(49.5)	0.25	+	−

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at $p<0.05$. ** : Purity was more than 99.5%, and dibenzthiazyl disulfide (less than 0.5%) was contained as impurity.

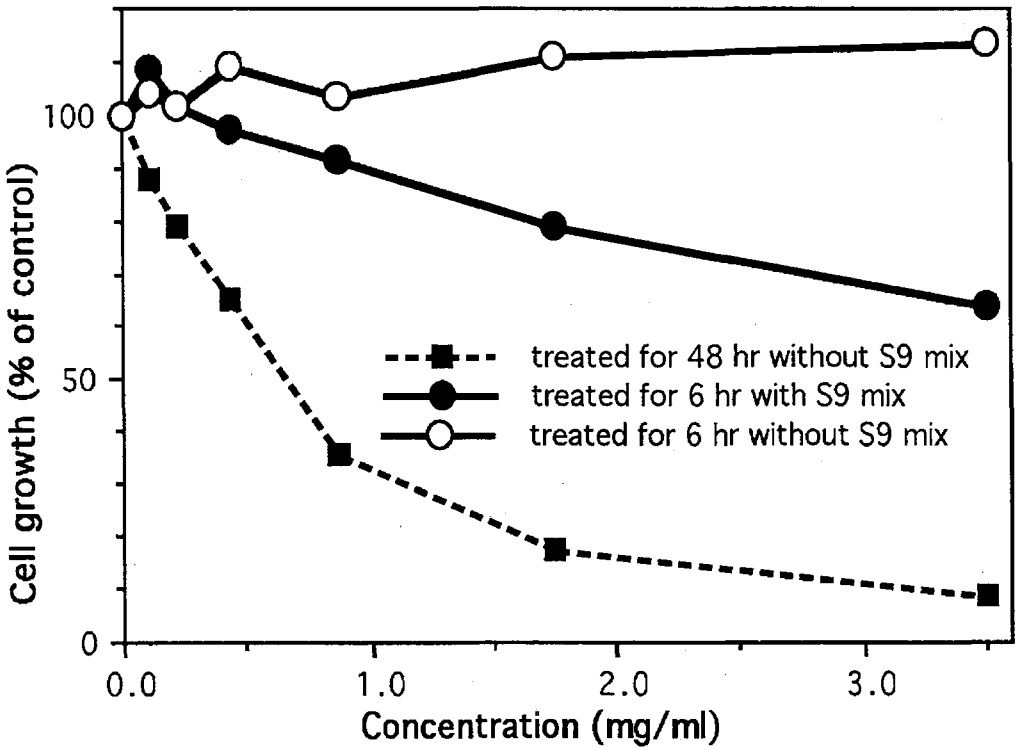

Fig.1 Growth inhibition of CHL cells treated with *N,N*-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide

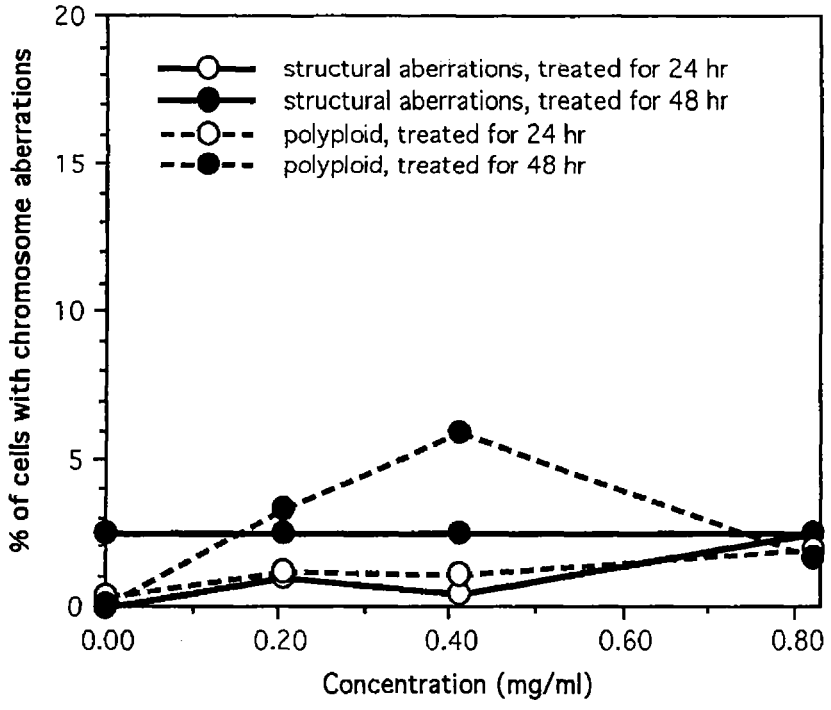

Fig. 2 **Induction of chromosome aberrations in CHL cells continuously treated with *N,N*-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide without S9 mix**

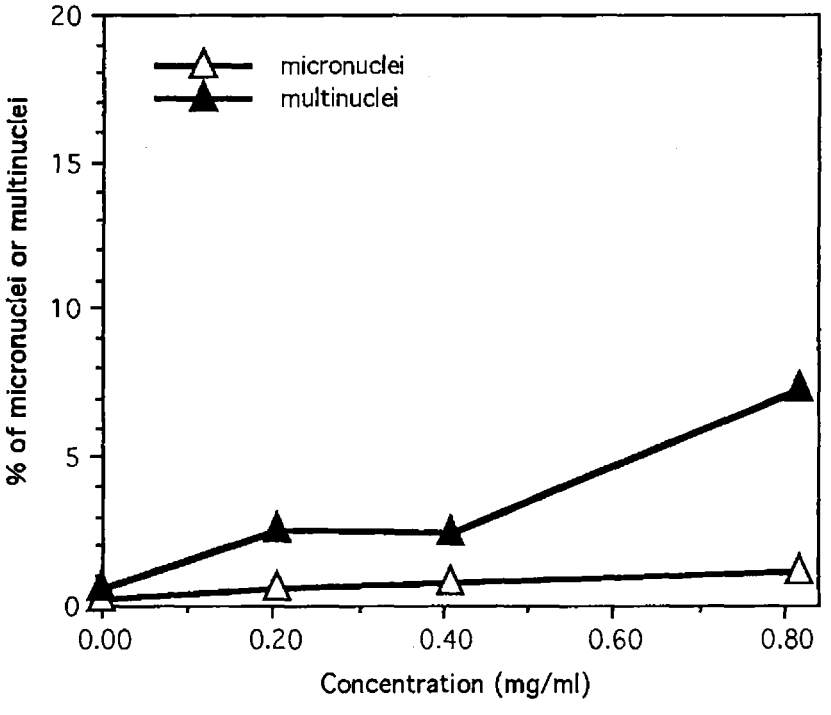

Fig. 3 **Induction of micronuclei and multinuclei in CHL cells continuously treated with *N,N*-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide without S9 mix**

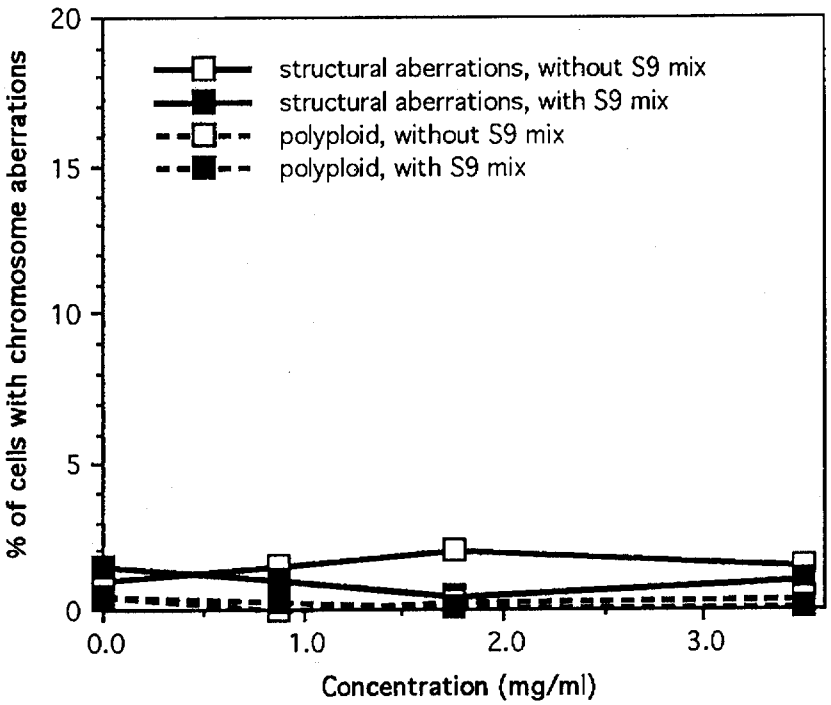

Fig. 4 **Induction of chromosome aberrations in CHL cells treated with *N,N*-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide with and without S9 mix**