

最 終 報 告 書

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 6252 (115-160)

平成 15 年 12 月 26 日

試験委託者
厚生労働省 医薬局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目次

1.	要約	7
13.	被験物質	11
14.	試験材料および方法	13
15.	試験結果	21
16.	考察および結論	23
17.	参考文献	24

Figures		F-01 ~ 15
Figure 1	Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA100	F-01
Figure 2	Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1535	F-02
Figure 3	Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-03
Figure 4	Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA98	F-04

Figure 5	Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1537	F-05
Figure 6	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA100	F-06
Figure 7	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1535	F-07
Figure 8	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-08
Figure 9	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA98	F-09
Figure 10	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1537	F-10
Figure 11	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA100 (additional study)	F-11
Figure 12	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1535 (additional study)	F-12
Figure 13	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain WP2 <i>uvrA</i> (additional study)	F-13
Figure 14	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA98 (additional study)	F-14
Figure 15	Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1537 (additional study)	F-15
Tables		T-1~6
Table 1	Summary data of dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [non-activation method : -S9]	T-1
Table 2	Summary data of dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [non-activation method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [activation method : +S9]	T-4

Table 5	Results of the bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- (additional study) [non-activation method : -S9]	T-5
Table 6	Results of the bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- (additional study) [activation method : +S9]	T-6

1. 要約

本試験条件下において、Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-の変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理では 2.29~5000 µg/プレート のいずれの試験用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

一方、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

13.2. ロット番号

13.3. 純度／含量

98.4 wt%

13.4. 不純物の名称および純度

知見なし

13.5. 提供元

13.6. 保存条件

冷蔵保存

13.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-1)

13.8. 一般名

ノクセラー MDB-P

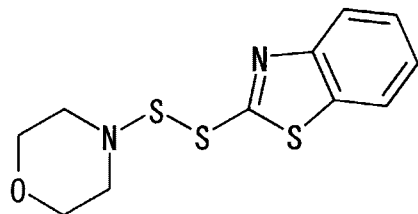
13.9. 化学名

2-(4-Morpholinyldithio)benzothiazol

13.10. CAS No.

95-32-9

13.11. 化学構造



13.12. 分子式

$C_{11}H_{12}N_2OS_3$

13.13. 分子量

284.43

13.14. 物質の状態

淡黄白色，固体

13.15. 沸点

知見なし

13.16. 融点

131.9~134.5°C

13.17. 溶解性

水：0.006 g/100 mL (20.8°C)，メタノール：0.39 g/100 mL (23.2°C)，アセトン：1.93 g/100 mL (25.5°C)，トルエン：3.90 g/100 mL (21.0°C)

13.18. 蒸気圧

知見なし

13.19. 取り扱い上の注意

暴露防止のため長袖の作業衣，保護手袋，保護マスク，保護眼鏡を着用し，換気をして作業を行った。

吸入，皮膚への接触を防ぎ，目に入らぬよう適切な保護具を着用した。

13.20. 残余被験物質の処理

被験物質の一部を保管した後，残余は，被験物質提供元に返却した。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

- a. ネズミチフス菌 TA100 (ヒスチジン要求性, 塩基対置換型)
- b. ネズミチフス菌 TA98 (ヒスチジン要求性, フレームシフト型)
- c. ネズミチフス菌 TA1535 (ヒスチジン要求性, 塩基対置換型)
- d. ネズミチフス菌 TA1537 (ヒスチジン要求性, フレームシフト型)
- e. 大腸菌 WP2 *uvrA* (トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。

平成13年10月2～5日(TA100 および TA98), 平成13年10月19～22日(TA1535 および WP2 *uvrA*) および平成14年5月23～27日(TA1537)に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: GC用; Merck KGaA; 純度99.7%以上, Lot No. K26414578 013【TA1537以外】, Lot No. K26414578 032【TA1537】)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-U71V: 三洋電機メディカシステム株式会社)に保存(-80°C)した。

14.2. 培地の調製

14.2.1. 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業株式会社: 平成14年1月8日製造, Lot No. ANI010AR)を試験に使用した。本プレートは, Vogel-Bonner 最少培地 E を含む組成の溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した.

硫酸マグネシウム・7 水塩	0.2	g
クエン酸・1 水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	10	g
リン酸一アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
グルコース	20	g
寒天 (BA-30A : 伊那食品工業株式会社 ; Lot No. 10301)	15	g
精製水	1000	mL

14.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天 (Bacto-agar : Difco Laboratories ; Lot No. 0340002) 0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した後, ネズミチフス菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (関東化学株式会社 ; Lot No. 107D2017) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (関東化学株式会社 ; Lot No. 301C2275) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え, 大腸菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-トリプトファン (関東化学株式会社 ; Lot No. 008D2026) 水溶液を同じく 1 容量加えた.

14.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2 : Oxoid Limited ; Lot No. 219916) 培養液を 25 mL 分注し, これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した. 培養開始までの間冷却ユニット (ECS-1 : 東京理化器械株式会社) を用いて 4°C に保存し, その後ウォーターバスシェーカー (MM-10 : タイテック株式会社) を用い, 37°C で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した. 試験毎に菌株の培養を実施し, 菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した.

ATP フォトメーター（ルミテスター K-100：キッコーマン株式会社）を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試験	試験生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.50	3.38	3.86	3.56	1.64
復帰突然変異試験	2.85	3.25	3.83	2.85	1.53
追加試験	4.47	3.73	4.92	3.65	2.44

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. FSM-457【追加試験以外】，FSM-465【追加試験】）を試験に使用した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した。

ロット番号	RAA-457	RAA-465
調製日	平成 14 年 1 月 18 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)	平成 14 年 6 月 14 日 (同左)
使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系	同左
性／週齢	雄／7 週齢	同左
体重	207～243 g	213～245 g
臓器	肝臓	同左
誘導物質	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF)	同左
投与量 および 投与回数	PB： 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2～4 日目) BF： 80 mg/kg 1 回 (3 日目)	同左
投与方法	腹腔内投与	同左
蛋白含量	27.32 mg/mL	26.80 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を次に示した.

S9	0.1	mL
MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水, アセトンに難溶であるが, DMSO 中での分散性が良好であり, かつ同溶液中で安定であるため, 被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Merck KGaA ; Lot No. K26414578 032) に懸濁あるいは溶解し, 調製原液とした. この調製原液を使用溶媒を用いて順次希釈した後, 速やかに処理を行った.

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒で試験した.

14.6.2. 陽性対照

陽性対照として以下の物質を使用した. 各陽性対照物質は DMSO (Lot No. K26414578 032) を用いて溶解し, 小分けした後凍結保存 (-20°C) したものを試験に使用した.

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド
(和光純薬工業株式会社 ; 純度 99.1% ; Lot No. PAE1151)

NaN₃ アジ化ナトリウム
(和光純薬工業株式会社 ; 純度 99.9% ; Lot No. KSE1776)

9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩
(Aldrich Chemical Co., Inc. ; 純度 98.8% ; Lot No. 03024JR)

2-AA 2-アミノアントラセン

(和光純薬工業株式会社；純度 96.6%；Lot No. KSE1917)

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

a.	AF-2	0.01	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	AF-2	0.1	"	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	NaN ₃	0.5	"	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	9-AA	80	"	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	AF-2	0.01	"	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

a.	2-AA	1	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	2-AA	0.5	"	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	2-AA	2	"	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	2-AA	2	"	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	2-AA	10	"	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

なお、これらの試験用量は労働省安全衛生部化学物質調査課編「安衛法における変異原性試験－テストガイドラインと GLP」に準じて設定した。

14.6.3. 無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトップアガーをそれぞれ 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。

調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

14.7. 用量設定試験（予備試験）

14.7.1. 試験用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 μg /プレートを最高用量とし、以下 1667, 556, 185, 61.7, 20.6, 6.86 および 2.29 μg /プレートの 8 用量（公比 3）を設定した。

14.7.2. 使用プレート数および識別

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

試験菌株の別、S9 mix の有無および試験用量を明記することにより各プレートを識別した。

14.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

試験管に使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μL 、次いで代謝活性化系非存在下（-S9 mix）の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500 μL 、代謝活性化系存在下（+S9 mix）の場合、S9 mix を 500 μL 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μL を加えた後、ウォーターバスシェーカー（MM-10：タイテック株式会社）を用いて 37°C で 20 分間振盪（120 回/分；プレインキュベーション）した。振盪終了後、トップアガーを 2 mL 添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器（SSV-R11DA：株式会社池田理化）を用いて 37°C の条件で 48 時間各プレートを培養した。

14.7.4. 析出等の観察

各処理法において処理開始時およびコロニー数計測時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株（背景菌）の生育状態について実体顕微鏡（ $\times 60$ ）を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計測した。計測に際しては、コロニーアナライザー（CA-11：システムサイエンス株式会社）を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

代謝活性化系非存在下の 556 μg /プレート以上および代謝活性化系存在下の 1667 μg /プレート以上の用量において、被験物質の析出により、コロニーアナライザーの使用が不適当であったため、目視で計数した。

14.8. 復帰突然変異試験

14.8.1. 試験用量

用量設定試験の結果、中用量以上で生育阻害作用が認められたため、生育阻害作用を指標に、本試験においては次に示した用量を最高用量とし、代謝活性化系存在下 TA1535 においては 6 用量、それ以外は 7 用量 (公比 2) を設定した。

試験系	最高用量 (μg/プレート)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
代謝活性化系 非存在下	150	150	150	150	150
代謝活性化系 存在下	600	300	300	300	300

14.8.2. 使用プレート数および識別

14.7.2.に記載の方法に準じた。

14.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

14.7.3.に記載の方法に準じた。但し、プレインキュベーションではウォータースシェーカー (M-100^N: タイテック株式会社) を用いた。

14.8.4. 析出等の観察

14.7.4.に記載の方法に準じた。

14.8.5. コロニー数計測

目視による計数を除いた 14.7.5.に記載の方法に準じた。

14.9. 復帰突然変異試験 (追加試験)

14.9.1. 試験用量

用量設定試験および復帰突然変異試験の結果、用量設定試験の代謝活性化系非存在下における全菌株ならびに復帰突然変異試験の代謝活性化系存在下における TA100 において、生育阻害作用のため評価できる用量が 4 用量に満たなかった。したがって、試験の再現性を確認するために追加試験を実施した。追加試験は、次に示した用量を最高用量とし、それぞれ 7 用量 (公比 2) を設定した。

試験系	最高用量 (μg/プレート)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
代謝活性化系 非存在下	150	150	150	150	150
代謝活性化系 存在下	300	—	—	—	—

14.9.2. 使用プレート数および識別

14.7.2.に記載の方法に準じた。

14.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

14.8.3.に記載の方法に準じた。

14.9.4. 析出等の観察

14.7.4.に記載の方法に準じた。

14.9.5. コロニー数計測

14.7.5.に記載の方法に準じた。

14.10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

15. 試験結果

15.1. 用量設定試験

結果を Figure 1～5 および Table 1, 2 に示した.

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理での復帰突然変異コロニー数は、各試験菌株のいずれの用量においても明確な増加傾向は認められなかった. 生育阻害作用は、代謝活性化系非存在下 TA1535 以外で 61.7 μg /プレート以上, TA1535 では 61.7, 185 μg /プレートならびに代謝活性化系存在下 TA100 および TA1535 以外では 185 μg /プレート以上, TA100 では 556 μg /プレート以上, TA1535 では 185～1667 μg /プレートの用量において観察された. また、顕微鏡下でみられる被験物質の析出物が存在する場所は、その周辺が阻止円の様な生育阻害作用も認められた. なお、代謝活性化系非存在下における全菌株において、生育阻害作用のため評価できる用量が 4 用量に満たなかった.

一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、陰性対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した.

15.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

被験物質処理時、懸濁処理のため両試験法 1667 μg /プレート以上の用量で被験物質の残存が認められた. また、両試験法 185 μg /プレート以上の用量で白濁ならびに白色粉末状の析出物が認められた. コロニー計数時、代謝活性化系非存在下の 185 μg /プレート以上で白色粉末状, 5000 μg /プレートで白色塊状の析出物ならびに 1667 μg /プレート以上で被験物質の残存が観察された. また、代謝活性化系存在下の 556 μg /プレート以上で白色粉末状, 5000 μg /プレートで白色塊状の析出物ならびに 5000 μg /プレートで被験物質の残存が観察された.

15.3. 復帰突然変異試験

試験結果を Figure 6～10 および Table 3, 4 に示した.

被験物質処理群の場合、代謝活性化系非存在下、代謝活性化系存在下ともいずれの菌株においても復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった. 代謝活性化系存在下の TA100 を除く各試験菌株のいずれの処理群においても、試験菌株に対する生育阻害作用が高用量群で観察された. また、顕微鏡下でみられる被験物質の析出物が存在する場所は、その周辺が阻止円の様な生育阻害作用も認められた. なお、代謝活性化系存

在下の TA100 において、生育阻害作用のため評価できる用量が 4 用量に満たなかった。

一方、陽性対照物質は各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

15.4. 被験物質の析出等（復帰突然変異試験）

被験物質処理時、両試験法 75.0 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。また、代謝活性化系非存在下の 75.0 μg /プレート以上および代謝活性化系存在下の 150 μg /プレート以上で白濁が認められた。コロニー計数時、析出物は目視で観察されなかった。

15.5. 復帰突然変異試験（追加試験）

試験結果を Figure 11~15 および Table 5, 6 に示した。

被験物質処理群の場合、いずれの菌株においても復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。各試験菌株のいずれの処理群においても、試験菌株に対する生育阻害作用が高用量群で観察された。また、顕微鏡下でみられる被験物質の析出物が存在する場所は、その周辺が阻止円の様な生育阻害作用も認められた。

一方、陽性対照物質は各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

15.6. 被験物質の析出等（追加試験）

被験物質処理時、両試験法 75.0 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。また、代謝活性化系非存在下の 75.0 μg /プレート以上および代謝活性化系存在下の 150 μg /プレート以上で白濁が認められた。コロニー計数時、析出物は目視で観察されなかった。

16. 考察および結論

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-の変異原性、すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、微生物（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

最高用量として 5000 µg/プレートあるいは生育阻害作用が認められる用量まで検討した。その結果、Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理群では代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照と比較し復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

また、本被験物質 Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-について Ames 試験で陰性との報告¹⁾があった。類縁体である benzothiazol についても Ames 試験で陰性との報告¹⁾があった。さらに、類縁体である Morpholine についても Ames 試験および染色体異常試験で陰性結果^{2), 3)}であったが、長期毒性試験で経口投与されたラットの肝臓と肺に腫瘍が少し認められたとの報告³⁾があった。

なお、陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数は、いずれも当施設での背景データ (Appendix 1) の範囲内であり、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、本試験条件下において Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-の微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

17. 参考文献

- 1) HPV Chemical Challenge Program: Benzothiazole-based thiazoles Category, American Chemistry Council. Available from URL:
<http://www.epa.gov/chemrtk/bnzthict/c13324tc.htm>, November, 2001.
- 2) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修：労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集，社団法人日本化学物質安全・情報センター，1996. p.68.
- 3) IARC MONOGRAPHS: Morpholine 1989; VOL. 47: p.199-213.

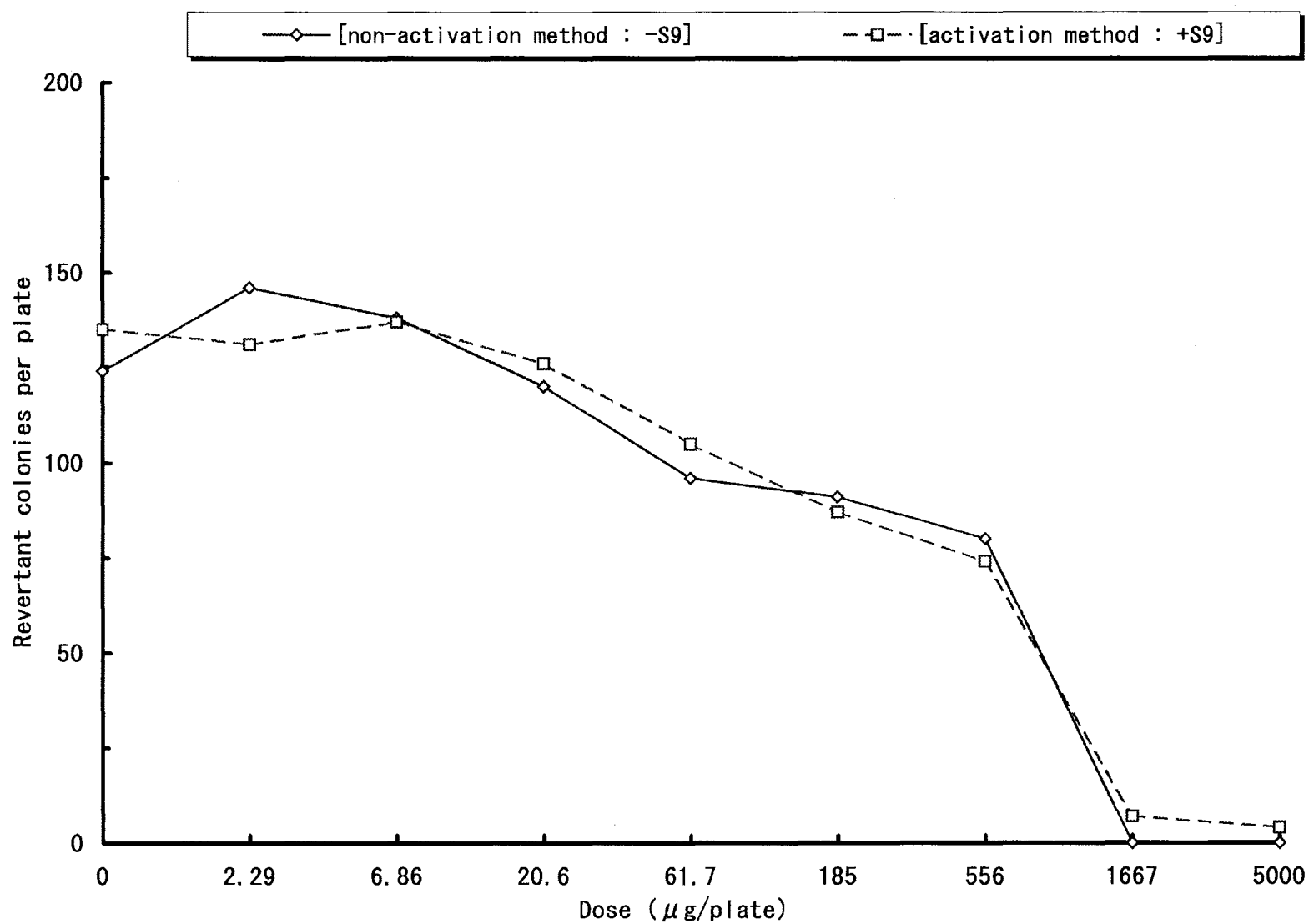


Figure 1. Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA100

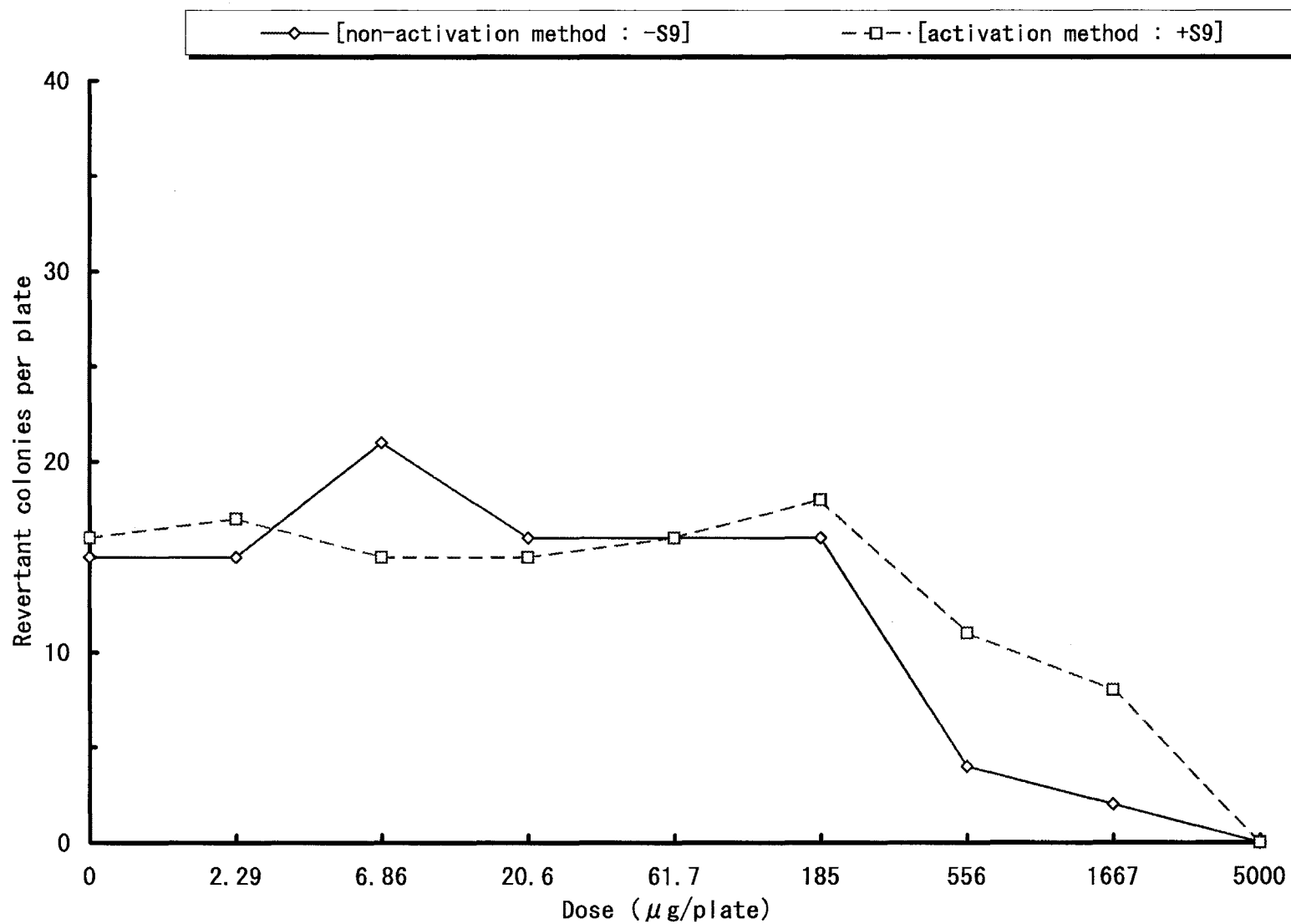


Figure 2. Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1535

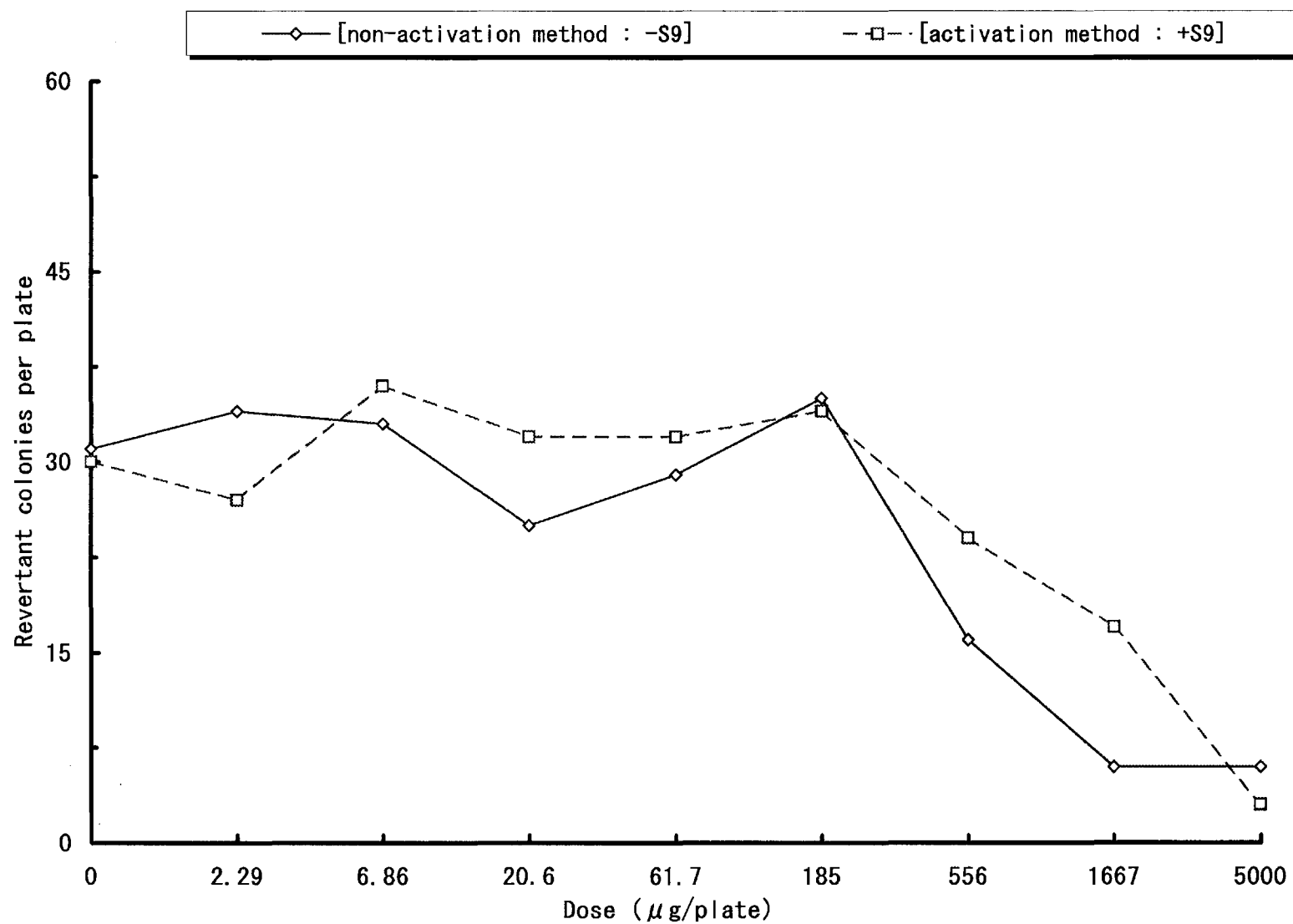


Figure 3. Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain WP2uvrA

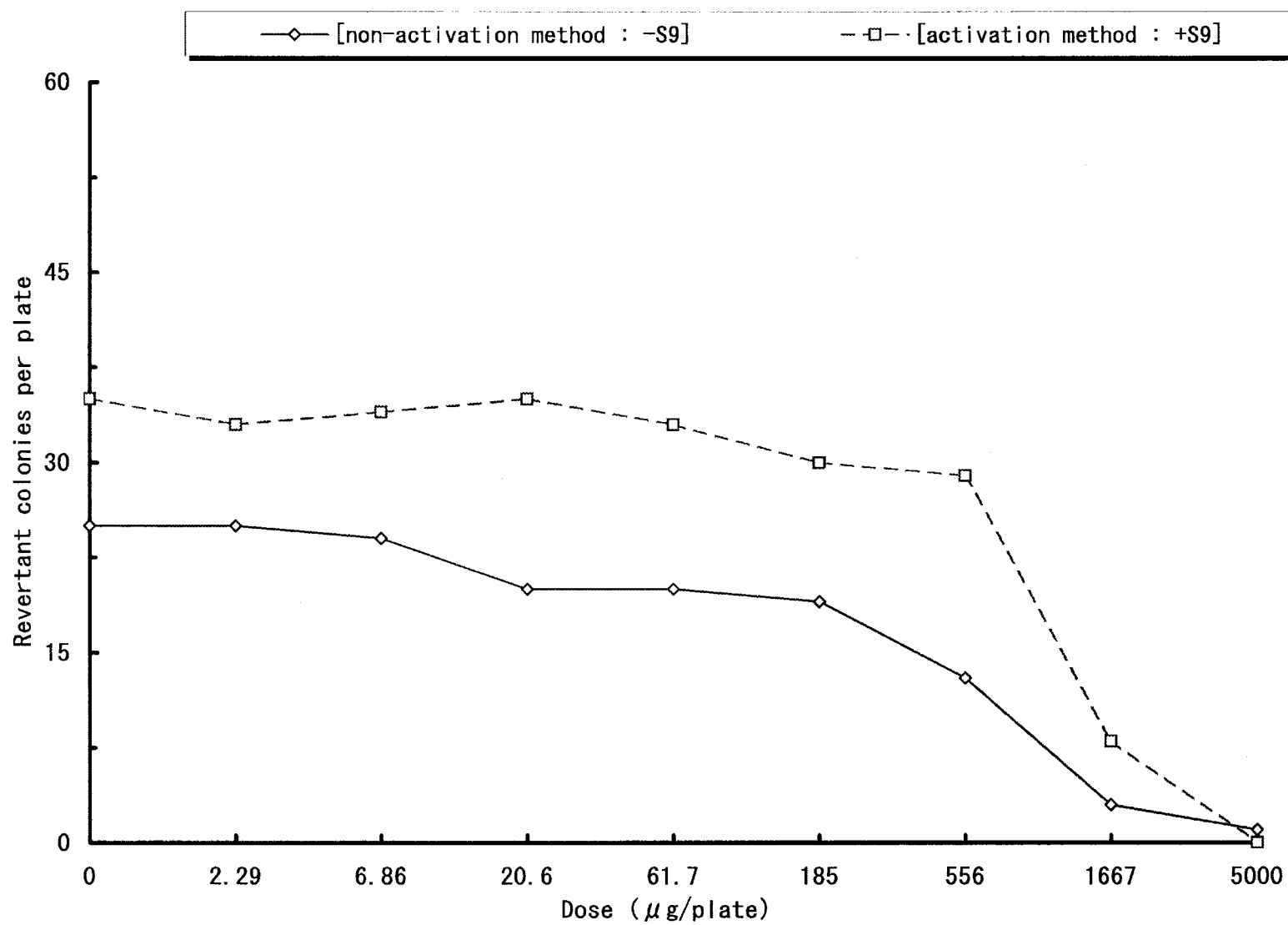


Figure 4. Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA98

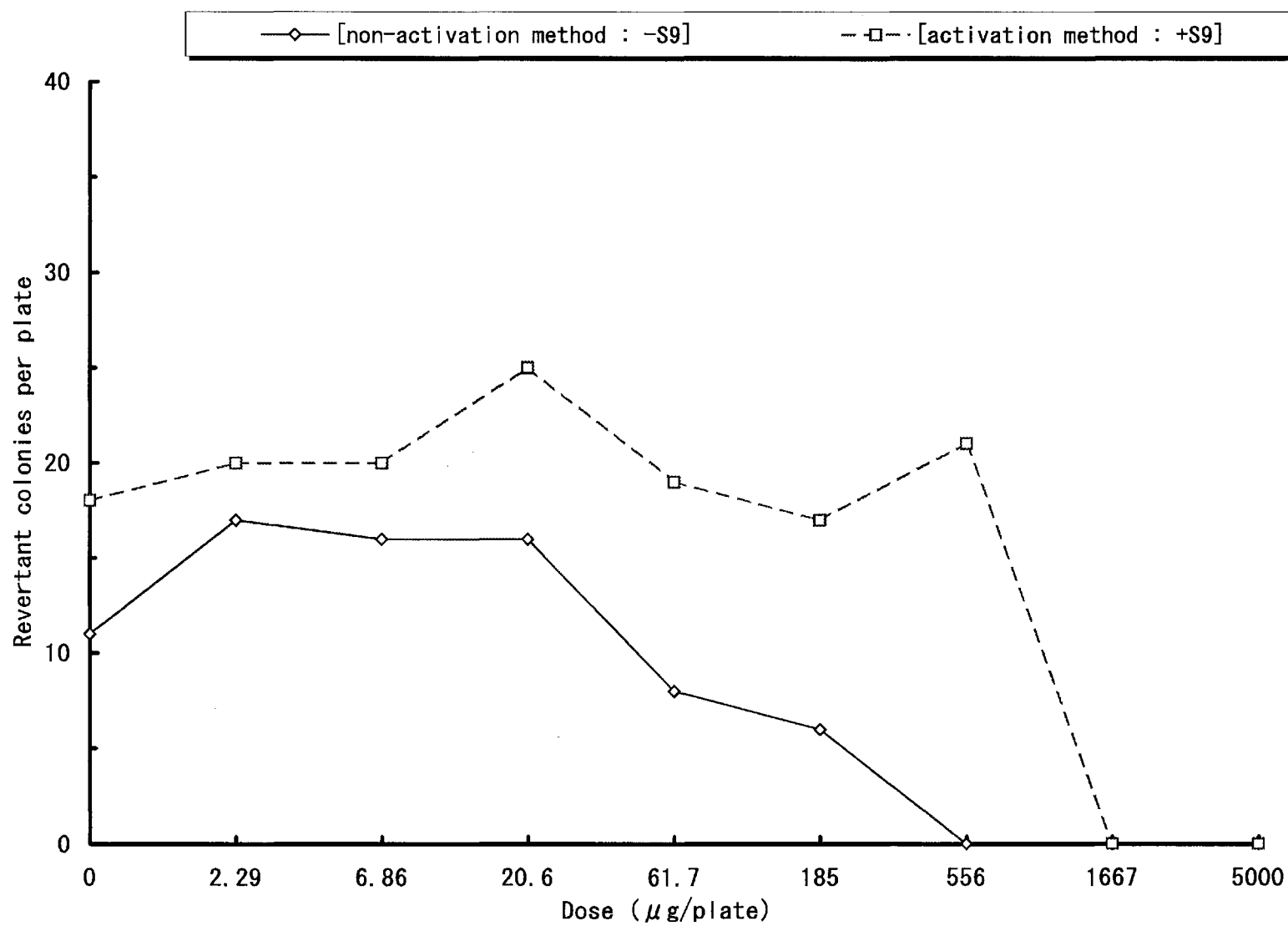


Figure 5. Dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1537

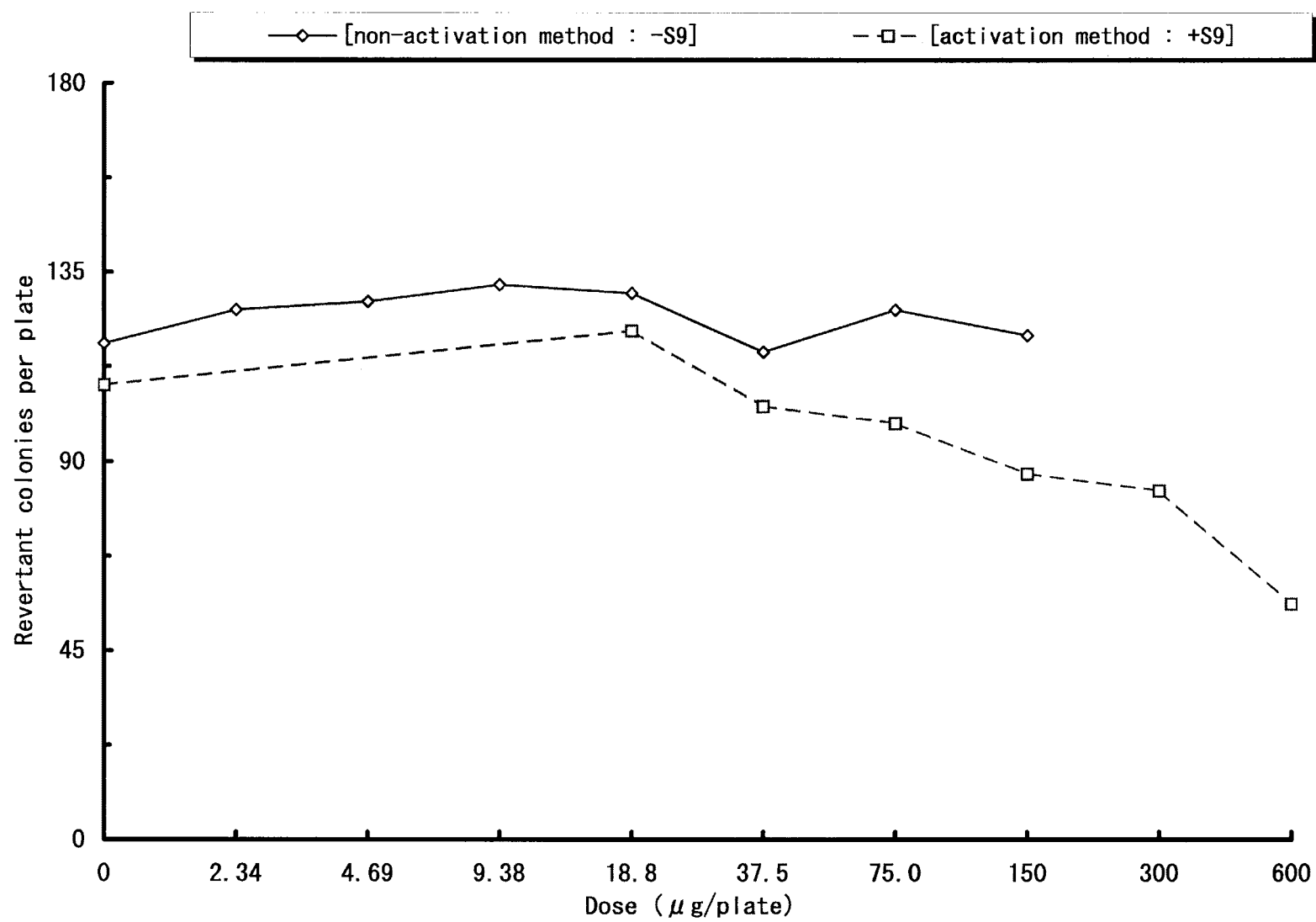


Figure 6. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA100

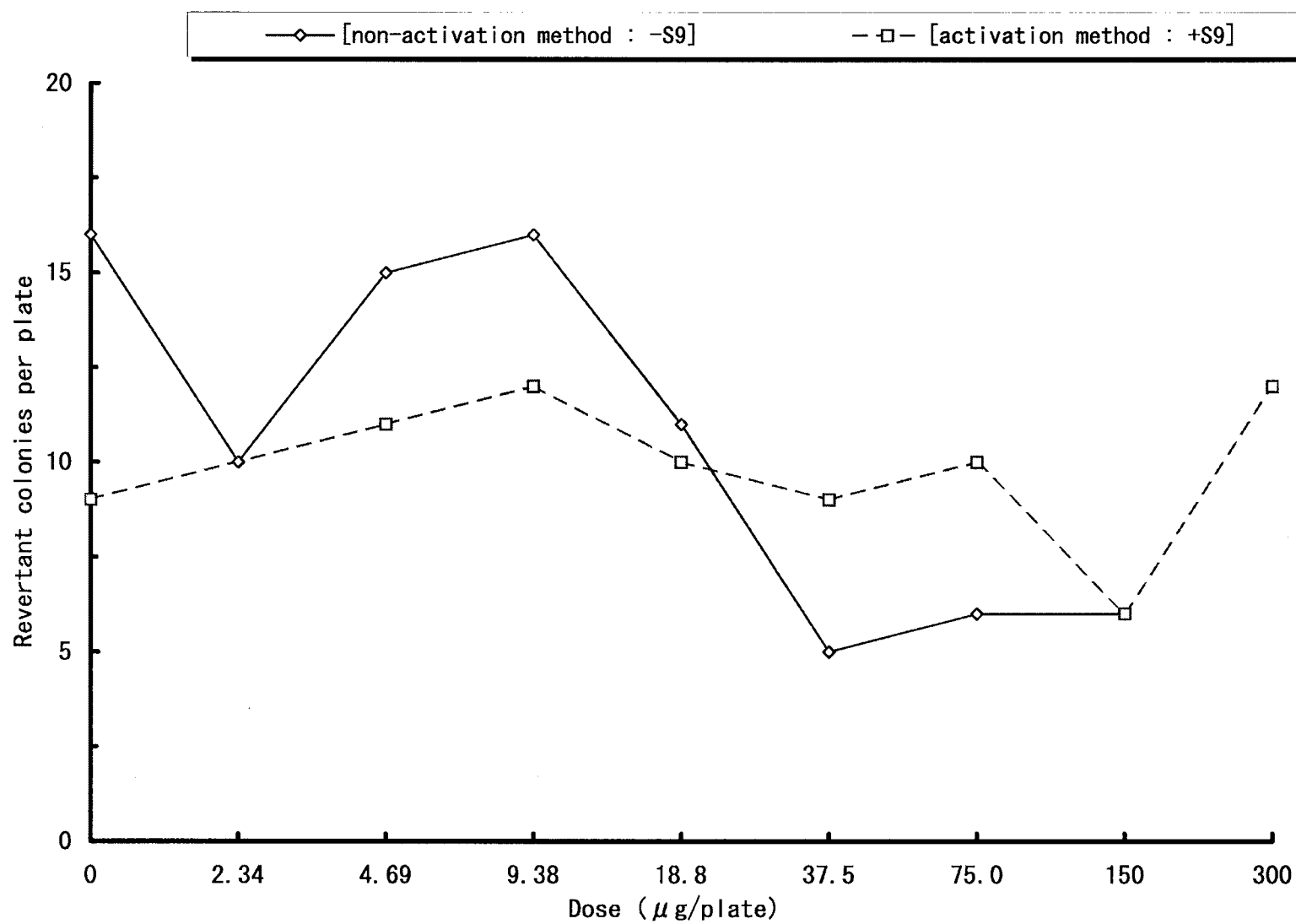


Figure 7. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1535

80-1

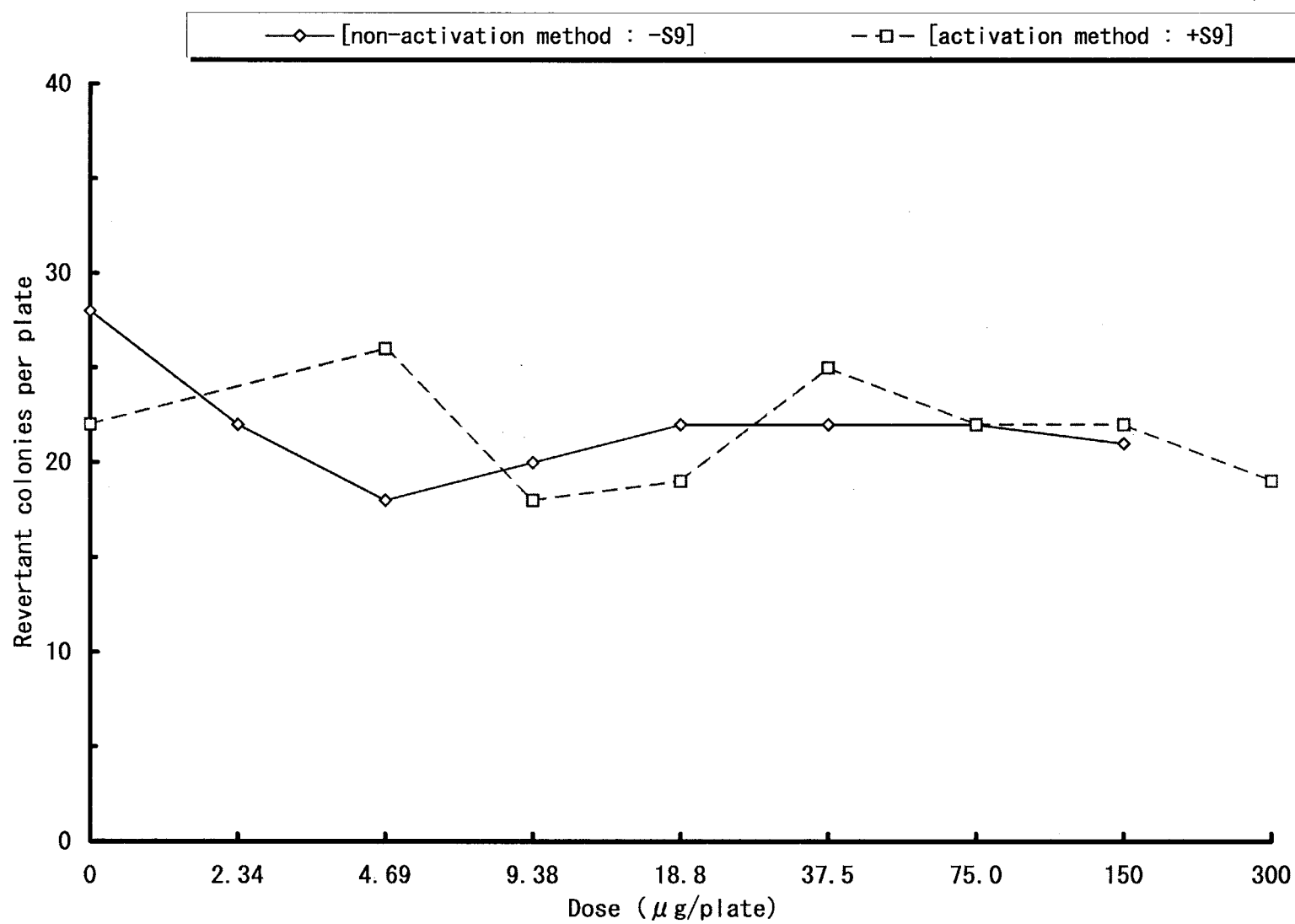


Figure 8. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain WP2uvrA

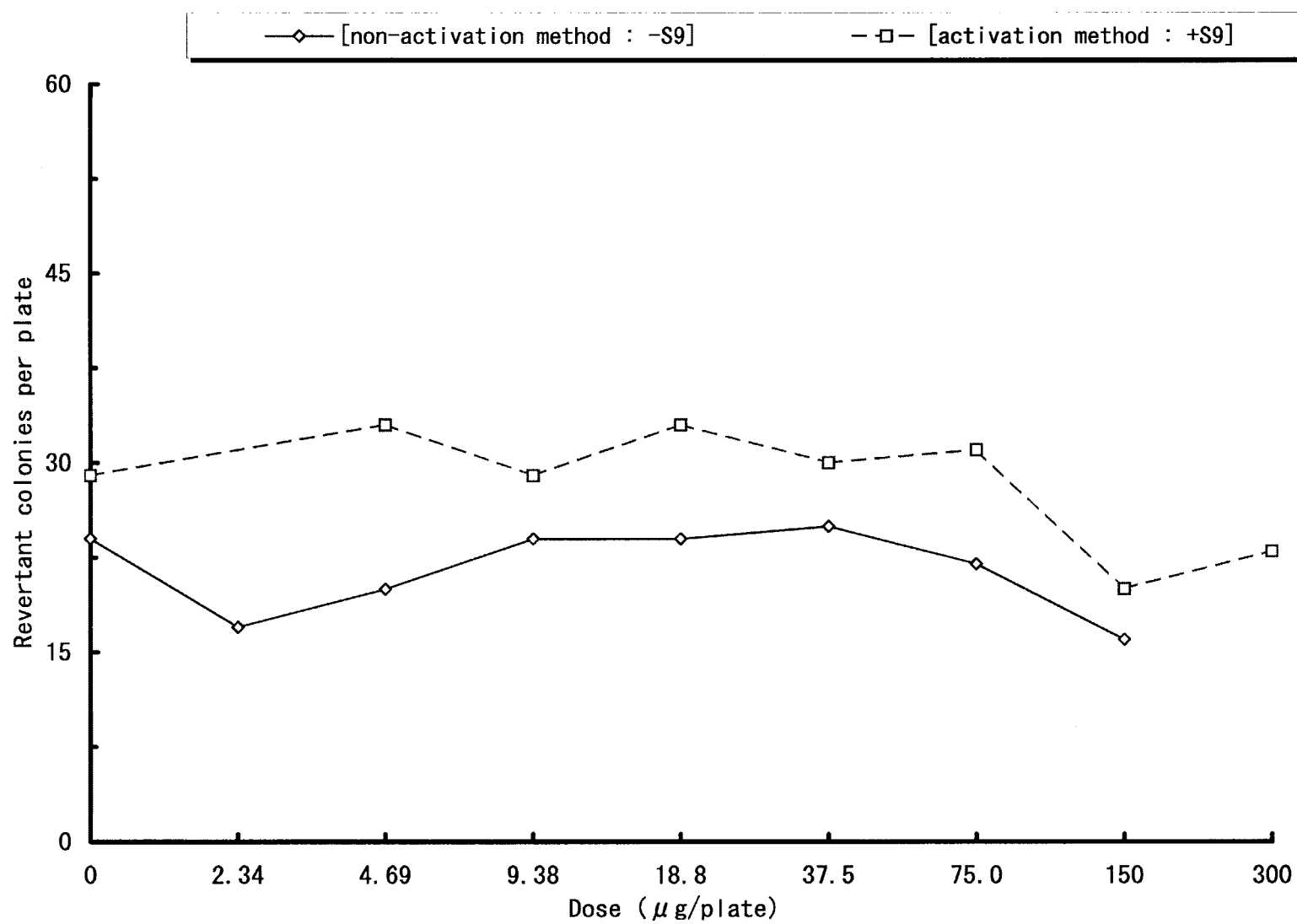


Figure 9. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA98

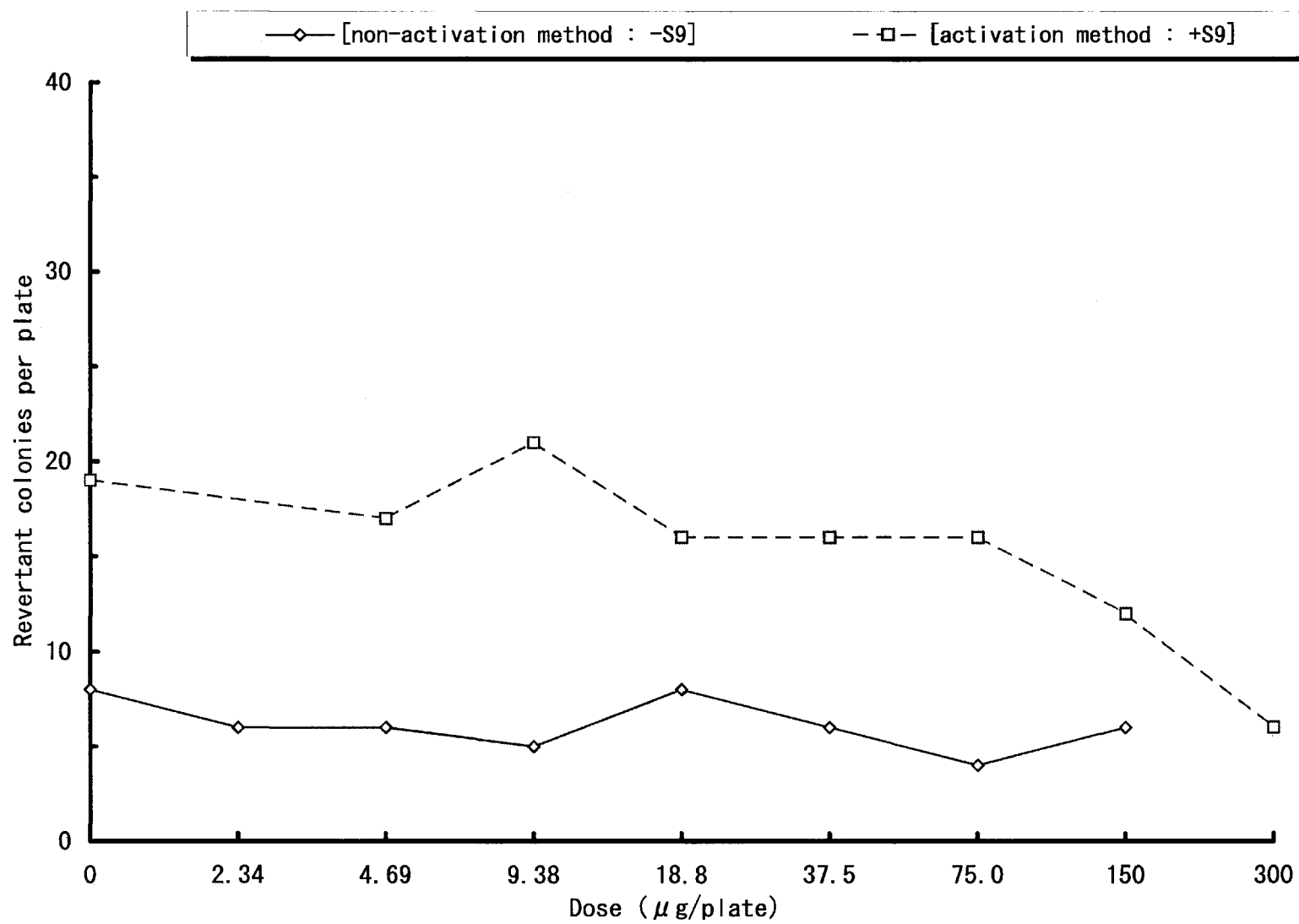


Figure 10. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1537

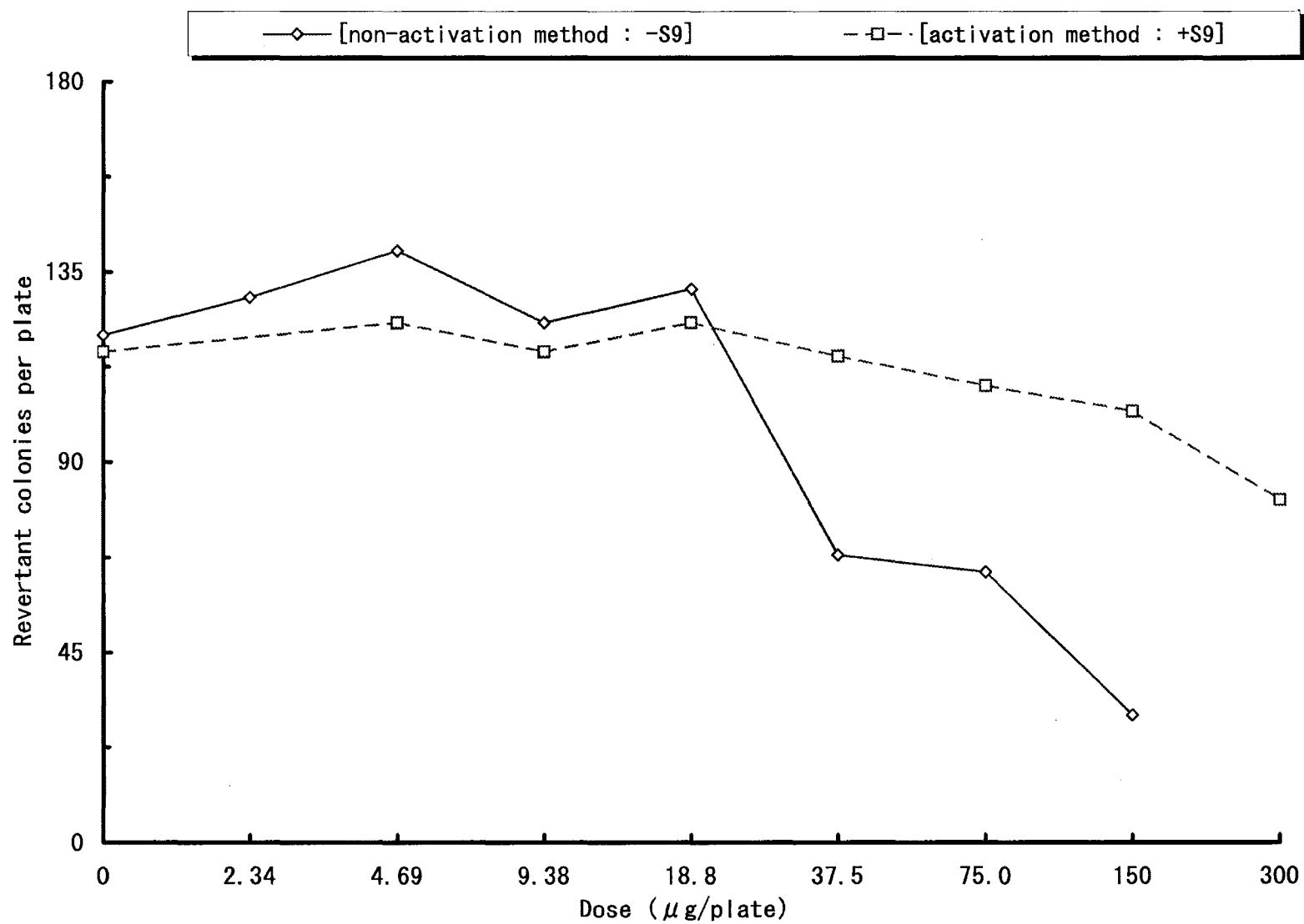


Figure 11. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA100 (additional study)

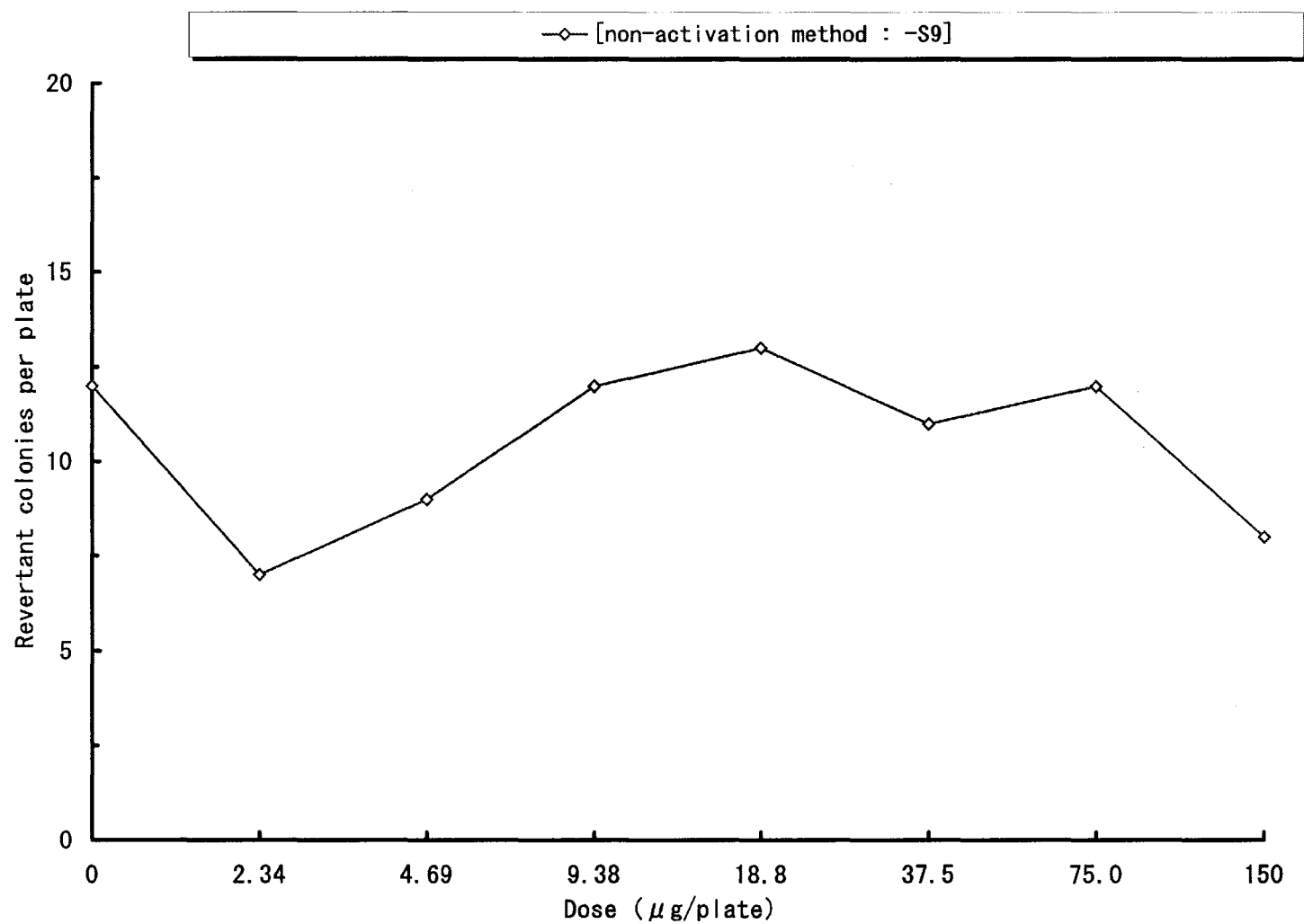


Figure 12. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1535 (additional study)

Exp. No. 6252 (115-160)

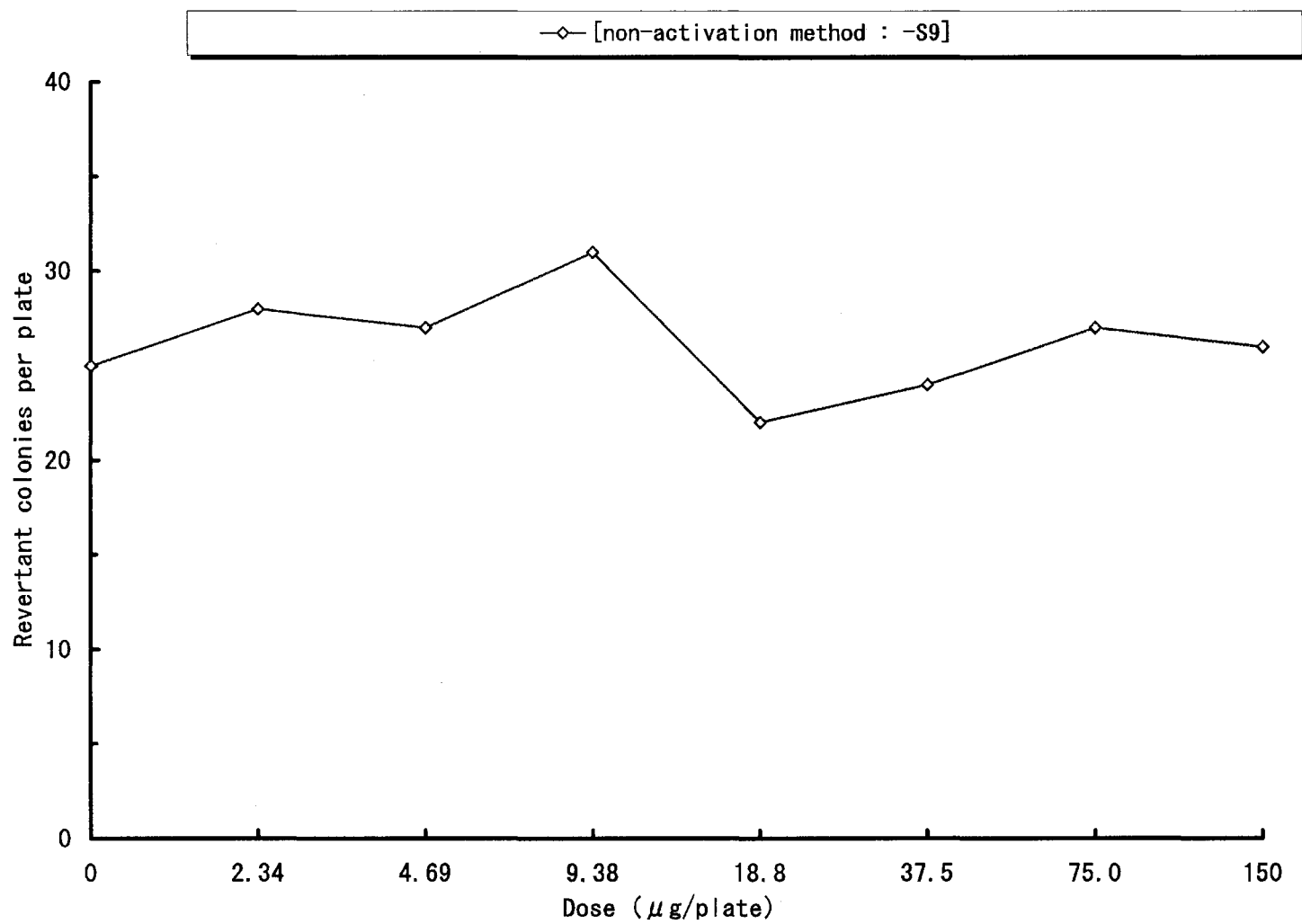


Figure 13. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain WP2uvrA (additional study)

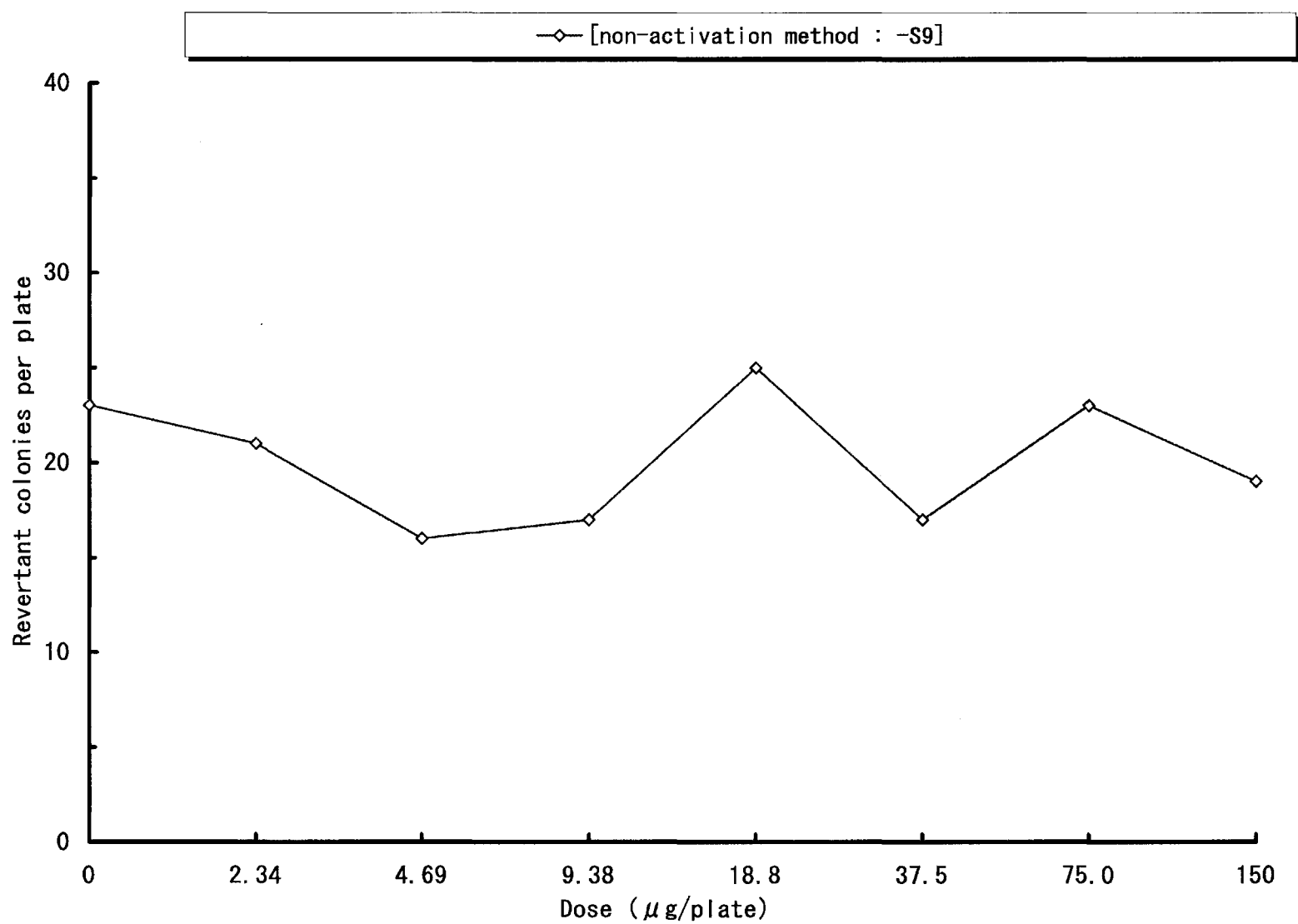


Figure 14. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA98 (additional study)

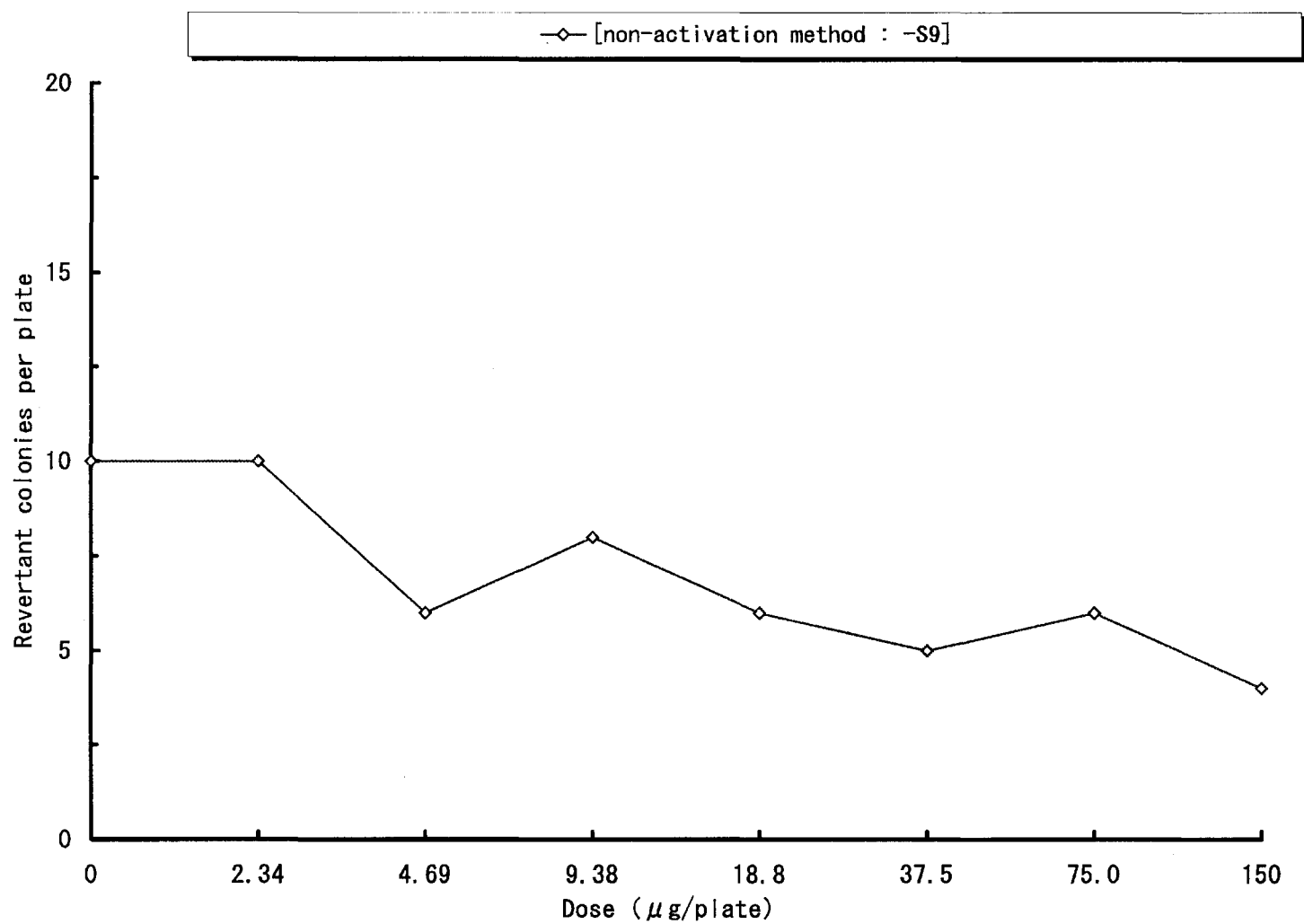


Figure 15. Bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- in strain TA1537 (additional study)

Table 1. Summary data of dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	123 [124	128 $\pm$	122 3]	14 [15	16 $\pm$	14 1]	31 [31	31 $\pm$	30 1]	21 [25	24 $\pm$	29 4]	12 [11	11 $\pm$	11 1]
	2.29	150 [146	149 $\pm$	139 6]	12 [15	17 $\pm$	16 3]	36 [34	38 $\pm$	29 5]	26 [25	23 $\pm$	25 2]	14 [17	21 $\pm$	16 4]
	6.86	141 [138	145 $\pm$	129 8]	18 [21	24 $\pm$	22 3]	36 [33	28 $\pm$	36 5]	25 [24	27 $\pm$	20 4]	14 [16	18 $\pm$	15 2]
	20.6	116 [120	113 $\pm$	132 10]	19 [16	13 $\pm$	16 3]	28 [25	22 $\pm$	26 3]	20 [20	18 $\pm$	23 3]	14 [16	18 $\pm$	16 2]
	61.7	77 * [96	106 * $\pm$	106 * 17]	12 * [16	18 * $\pm$	18 * 3]	29 * [29	27 * $\pm$	31 * 2]	21 * [20	16 * $\pm$	24 * 4]	6 * [8	8 * $\pm$	10 * 2]
	185 +	76 * [91	96 * $\pm$	101 * 13]	15 * [16	16 * $\pm$	18 * 2]	30 * [35	37 * $\pm$	37 * 4]	18 * [19	18 * $\pm$	22 * 2]	8 * [6	6 * $\pm$	5 * 2]
	556 +	84 * [80	69 * $\pm$	86 * 9]	4 [4	3 $\pm$	6 2]	16 * [16	16 * $\pm$	17 * 1]	9 * [13	12 * $\pm$	18 * 5]	0 * [0	0 * $\pm$	0 * 0]
	1667 +	0 * [0	0 * $\pm$	0 * 0]	2 [2	3 $\pm$	1 1]	7 * [6	6 * $\pm$	5 * 1]	1 * [3	4 * $\pm$	4 * 2]	0 * [0	0 * $\pm$	0 * 0]
	5000 +	0 * [0	0 * $\pm$	0 * 0]	0 [0	0 $\pm$	0 0]	7 * [6	7 * $\pm$	4 * 2]	0 * [1	0 * $\pm$	2 * 1]	0 * [0	0 * $\pm$	0 * 0]
Positive control		641 [614	562 $\pm$	639 ^{a)} 45]	580 [557	541 $\pm$	551 ^{b)} 20]	181 [178	185 $\pm$	168 ^{a)} 9]	607 [655	650 $\pm$	708 ^{c)} 51]	387 [342	348 $\pm$	292 ^{d)} 48]

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate

c): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 2. Summary data of dose-finding study with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	135 [135	136 $\pm$	135 1]	18 [16	13 $\pm$	16 3]	30 [30	26 $\pm$	33 4]	34 [35	36 $\pm$	36 1]	18 [18	17 $\pm$	19 1]
	2.29	139 [131	132 $\pm$	123 8]	19 [17	17 $\pm$	14 3]	23 [27	27 $\pm$	30 4]	35 [33	28 $\pm$	37 5]	18 [20	21 $\pm$	22 2]
	6.86	149 [137	126 $\pm$	136 12]	20 [15	13 $\pm$	13 4]	36 [36	32 $\pm$	41 5]	33 [34	35 $\pm$	33 1]	23 [20	19 $\pm$	19 2]
	20.6	129 [126	120 $\pm$	128 5]	15 [15	13 $\pm$	16 2]	36 [32	25 $\pm$	35 6]	32 [35	36 $\pm$	38 3]	23 [25	30 $\pm$	23 4]
	61.7	98 [105	108 $\pm$	110 6]	17 [16	11 $\pm$	20 5]	34 [32	31 $\pm$	30 2]	34 [33	37 $\pm$	29 4]	17 [19	20 $\pm$	21 2]
	185	95 [87	90 $\pm$	76 10]	18 * [18	17 * $\pm$	20 * 2]	34 * [34	38 * $\pm$	31 * 4]	27 * [30	32 * $\pm$	31 * 3]	16 * [17	16 * $\pm$	20 * 2]
	556 +	75 * [74	70 * $\pm$	78 * 4]	8 * [11	12 * $\pm$	13 * 3]	26 * [24	21 * $\pm$	24 * 3]	23 * [29	32 * $\pm$	31 * 5]	18 * [21	28 * $\pm$	17 * 6]
	1667 +	8 * [7	7 * $\pm$	6 * 1]	6 * [8	12 * $\pm$	6 * 3]	20 * [17	19 * $\pm$	12 * 4]	8 * [8	8 * $\pm$	7 * 1]	0 * [0	0 * $\pm$	0 * 0]
	5000 +	5 * [4	3 * $\pm$	5 * 1]	0 [0	0 $\pm$	0 0]	5 * [3	3 * $\pm$	2 * 2]	0 * [0	0 * $\pm$	1 * 1]	0 * [0	1 * $\pm$	0 * 1]
Positive control		1052 [1058	1083 $\pm$	1038 ^{a)} 23]	282 [285	301 $\pm$	271 ^{b)} 15]	832 [838	862 $\pm$	820 ^{c)} 22]	415 [437	491 $\pm$	406 ^{d)} 47]	157 [158	164 $\pm$	153 ^{b)} 6]

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 3. Results of the bacterial reversion assay of Benzothiazole,2-(morpholinodithio)-
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	114 [118	119 $\pm$	120 3]	15 [16	16 $\pm$	16 1]	28 [28	25 $\pm$	30 3]	24 [24	20 $\pm$	27 4]	8 [8	11 $\pm$	6 3]
	2.34	130 [126	118 $\pm$	129 7]	8 [10	8 $\pm$	13 3]	19 [22	24 $\pm$	24 3]	15 [17	23 $\pm$	14 5]	9 [6	5 $\pm$	5 2]
	4.69	116 [128	134 $\pm$	133 10]	14 [15	16 $\pm$	14 1]	15 [18	22 $\pm$	17 4]	23 [20	22 $\pm$	15 4]	4 [6	8 $\pm$	7 2]
	9.38	122 [132	143 $\pm$	130 11]	14 [16	18 $\pm$	15 2]	17 [20	18 $\pm$	26 5]	24 [24	24 $\pm$	24 0]	5 [5	4 $\pm$	7 2]
	18.8	128 [130	138 $\pm$	123 8]	9 [11	12 $\pm$	11 2]	20 [22	27 $\pm$	20 4]	28 [24	22 $\pm$	22 3]	7 [8	10 $\pm$	8 2]
	37.5	122 * [116	111 * $\pm$	116 * 6]	7 * [5	4 * $\pm$	4 * 2]	23 * [22	21 * $\pm$	22 * 1]	27 * [25	23 * $\pm$	25 * 2]	6 * [6	8 * $\pm$	3 * 3]
	75.0	127 * [126	122 * $\pm$	129 * 4]	4 * [6	6 * $\pm$	7 * 2]	22 * [22	26 * $\pm$	17 * 5]	24 * [22	28 * $\pm$	15 * 7]	3 * [4	6 * $\pm$	4 * 2]
	150	118 * [120	124 * $\pm$	117 * 4]	6 * [6	5 * $\pm$	6 * 1]	22 * [21	23 * $\pm$	17 * 3]	18 * [16	12 * $\pm$	17 * 3]	11 * [6	4 * $\pm$	3 * 4]
Positive control		642 [633	646 $\pm$	612 ^{a)} 19]	494 [535	542 $\pm$	569 ^{b)} 38]	163 [163	158 $\pm$	169 ^{a)} 6]	660 [591	503 $\pm$	609 ^{c)} 80]	217 [206	202 $\pm$	200 ^{d)} 9]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/platec): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 4. Results of the bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	103 [108	109 $\pm$	113 5]	9 [9	8 $\pm$	9 1]	21 [22	19 $\pm$	27 4]	36 [29	28 $\pm$	22 7]	19 [19	19 $\pm$	19 0]
	4.69				12 [11	8 $\pm$	12 2]	35 [26	21 $\pm$	21 8]	29 [33	39 $\pm$	32 5]	17 [17	22 $\pm$	12 5]
	9.38				11 [12	13 $\pm$	11 1]	17 [18	17 $\pm$	20 2]	28 [29	21 $\pm$	38 9]	20 [21	22 $\pm$	20 1]
	18.8	122 [121	118 $\pm$	122 2]	9 [10	12 $\pm$	9 2]	17 [19	15 $\pm$	24 5]	32 [33	31 $\pm$	35 2]	20 [16	14 $\pm$	15 3]
	37.5	102 [103	111 $\pm$	96 8]	8 [9	11 $\pm$	8 2]	24 [25	23 $\pm$	29 3]	28 [30	31 $\pm$	30 2]	12 [16	14 $\pm$	21 5]
	75.0	93 * [99	100 * $\pm$	104 * 6]	12 * [10	9 * $\pm$	8 * 2]	21 * [22	26 * $\pm$	20 * 3]	32 * [31	31 * $\pm$	31 * 1]	12 * [16	20 * $\pm$	16 * 4]
	150	89 * [87	90 * $\pm$	82 * 4]	6 * [6	6 * $\pm$	5 * 1]	19 * [22	18 * $\pm$	28 * 6]	24 * [20	19 * $\pm$	16 * 4]	11 * [12	13 * $\pm$	12 * 1]
	300	82 * [83	82 * $\pm$	85 * 2]	11 * [12	13 * $\pm$	11 * 1]	21 * [19	15 * $\pm$	21 * 3]	24 * [23	22 * $\pm$	23 * 1]	6 * [6	4 * $\pm$	7 * 2]
	600	58 * [56	49 * $\pm$	62 * 7]												
Positive control		1043 [981	946 $\pm$	953 ^{a)} 54]	403 [365	343 $\pm$	349 ^{b)} 33]	733 [703	669 $\pm$	706 ^{c)} 32]	505 [457	407 $\pm$	459 ^{d)} 49]	180 [169	158 $\pm$	169 ^{b)} 11]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate
 * : Growth inhibition was observed

Table 5. Results of the bacterial reversion assay of Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
(additional study) [non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
T-5 Test substance	0	126 [120	120 $\pm$	114 6]	12 [12	13 $\pm$	10 2]	25 [25	27 $\pm$	24 2]	27 [23	22 $\pm$	20 4]	11 [10	11 $\pm$	8 2]
	2.34	131 [129	122 $\pm$	135 7]	8 [7	6 $\pm$	8 1]	24 [28	29 $\pm$	31 4]	21 [21	23 $\pm$	19 2]	13 [10	9 $\pm$	9 2]
	4.69	137 [140	137 $\pm$	145 5]	8 [9	11 $\pm$	9 2]	20 [27	27 $\pm$	33 7]	14 [16	19 $\pm$	16 3]	8 [6	4 $\pm$	7 2]
	9.38	116 [123	130 $\pm$	123 7]	11 [12	15 $\pm$	11 2]	31 [31	28 $\pm$	34 3]	20 [17	16 $\pm$	15 3]	11 [8	6 $\pm$	7 3]
	18.8	125 [131	133 $\pm$	135 5]	16 [13	9 $\pm$	15 4]	20 [22	23 $\pm$	24 2]	27 [25	21 $\pm$	27 3]	8 [6	6 $\pm$	5 2]
	37.5	126 * [68	53 * $\pm$	26 * 52]	16 * [11	9 * $\pm$	9 * 4]	22 * [24	29 * $\pm$	21 * 4]	19 * [17	14 * $\pm$	17 * 3]	6 * [5	3 * $\pm$	7 * 2]
	75.0	130 * [64	54 * $\pm$	8 * 62]	13 * [12	11 * $\pm$	11 * 1]	28 * [27	25 * $\pm$	28 * 2]	22 * [23	19 * $\pm$	28 * 5]	6 * [6	3 * $\pm$	8 * 3]
	150	25 * [30	25 * $\pm$	41 * 9]	8 * [8	9 * $\pm$	6 * 2]	30 * [26	25 * $\pm$	23 * 4]	15 * [19	21 * $\pm$	21 * 3]	6 * [4	3 * $\pm$	3 * 2]
Positive control		600 [577	620 $\pm$	510 ^{a)} 59]	552 [531	544 $\pm$	498 ^{b)} 29]	183 [159	145 $\pm$	150 ^{a)} 21]	749 [728	689 $\pm$	745 ^{c)} 34]	171 [197	179 $\pm$	241 ^{d)} 38]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/platec): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 6. Results of the bacterial reversion assay of Benzothiazole,2-(morpholinodithio)-
(additional study) [activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]		
		TA100		
Test substance	0	118 [116	98 $\pm$	131 17]
	4.69	119 [123	114 $\pm$	135 11]
	9.38	116 [116	115 $\pm$	118 2]
	18.8	112 [123	126 $\pm$	130 9]
	37.5	115 [115	124 $\pm$	106 9]
	75.0	112 * [108	93 * $\pm$	119 * 13]
	150	93 * [102	109 * $\pm$	104 * 8]
	300	78 * [81	86 * $\pm$	78 * 5]
Positive control		819	791	1065 ^{a)}
		[892	$\pm$	151]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed