

最 終 報 告 書

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : 6253 (115-161)

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.....	6
13. 被験物質.....	10
14. 試験材料および方法.....	12
15. 試験結果.....	22
16. 考察および結論.....	26
17. 参考文献.....	27

Figures	F-1~5
Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [short-term treatment] F-1
Figure 2	Incidence of structural aberrations induced by Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [short-term treatment : -S9] F-2
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [short-term treatment : +S9] F-3
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- (confirmative examination) [short-term treatment : -S9] F-4

Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- (confirmative examination) [short-term treatment : +S9]	F-5
Tables		T-1~5
Table 1	Results of growth inhibition test on Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [short-term treatment : +S9]	T-3
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- (confirmative examination) [short-term treatment : -S9]	T-4
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- (confirmative examination) [short-term treatment : +S9]	T-5

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において, Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-は染色体異常を誘起するものと判断した.

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため, チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った.

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に, 試験用量を設定した. 染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理で 14.0, 23.3 および 38.9 $\mu\text{g/mL}$ ならびに同+S9 処理で 38.9, 64.8 および 108 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した.

その結果, Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理群の場合, 短時間処理法の-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても用量相関性を伴い, 統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な染色体構造異常の誘発が認められたが, 強い細胞毒性作用が認められた用量であることと出現頻度が低いことから確認試験を実施した.

確認試験では短時間処理法-S9 処理で 20.0, 30.0 および 40.0 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量ならびに同+S9 処理で 80.0, 90.0, 100, 110 および 120 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量について顕微鏡観察を実施した.

その結果, 短時間処理法の-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても用量相関性を伴い, 統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な染色体構造異常の誘発が認められた. しかしながら, -S9 処理群でみられた陽性反応は全て極めて強い細胞毒性を示す濃度での反応であり, 相対細胞増殖率 14.8%で陰性を示すため, 明確な陽性反応ではないことから疑陽性と判断した. 一方, +S9 処理群では 30~50%の相対細胞増殖率で陽性であることから陽性反応と判断した.

また, 短時間処理法-S9 処理の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では, 染色体構造異常の出現頻度が上昇しており, 陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加を示した.

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

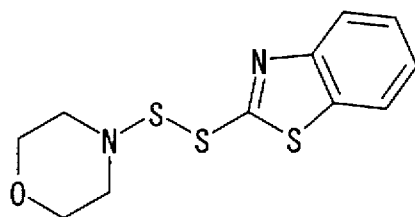
13.9. 化学名

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存した後，残りは被験物質提供元へ返却した。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株 (CHL/TU 細胞) を選択した。

CHL/TU 細胞は昭和 59 年 11 月 15 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、一部については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) を容量比で 10%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結した細胞を融解した後、3~5 日ごとに継代したものを使用した。

なお、プレ試験で継代数 2 の細胞を、細胞増殖抑制試験で継代数 7 の細胞を、染色体異常試験で継代数 8 の細胞を、染色体異常試験 (確認試験) では継代数 16 の細胞を用いた。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : 旭テクノグラス株式会社 ; Lot No. 99560008 【確認試験以外】、809012 【確認試験】) に非働化 (56°C, 30 分) 済み仔牛血清 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 353445) を最終濃度で 10%になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所 (4°C) に保存した。

14.3. 培養条件

CO₂ インキュベーター (三洋電機メディカシステム株式会社) を用い、CO₂ 濃度 5%, 37°C の条件で細胞を培養した。

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. CAM-461) を試験に使用した。

14.4.1. S9 の調製方法

調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法等を以下に示した。

ロット番号	RAA-461
調製日	平成 14 年 3 月 28 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	184~212 g
臓器	肝臓
誘導物質投与量 および投与回数	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF) 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)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	25.76 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した。

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

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ことから、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)

に懸濁させ調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に順次希釈した後、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（短時間処理法-S9 処理）

注射用水（日本薬局方注射用水：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K1D78）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 339AJH）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K1D74）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。

試験用量は 0.1 µg/mL とした。

14.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K1D78）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 1013）を生理食塩液（Lot No. K1D74）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。

試験用量は 12.5 µg/mL とした。

14.7. プレ試験（有糸分裂指数計数）

14.7.1. 試験用量

被験物質の細胞毒性および細胞分裂に及ぼす影響に関する情報を得るため、ガイドライン上の限界用量 2844 µg/mL（10 mM 相当）を最高用量として、853, 256, 76.8 および 23.0 µg/mL（公比 10/3）で試験を実施した。

14.7.2. 使用プレート数および識別

1 用量当たり 1 ウェルを用いた。

試験系および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法+S9 処理

6 ウェルマルチプレートに各ウェルに乾熱滅菌済みのカバーグラス (24 × 24 mm) を入れ, その上に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 2 mL (1.6×10^4 細胞) を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 培養液 333 μ L を除き, 333 μ L の S9 mix を添加した後, 溶媒あるいは被験物質液 20 μ L を加えた. 6 時間各物質に暴露させた後, 各ウェルの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Sigma Chemical Company ; Lot No. 121K2349) を用いて細胞を洗浄した. 新鮮な培養液 2 mL を加え, さらに 18 時間培養を続けた後に標本を作製した.

14.7.4. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 2 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 溶媒あるいは被験物質液 20 μ L を加え, 24 時間各物質に暴露させた. 以下の操作は 14.7.3. に記載した方法に準じた.

14.7.5. 析出等および細胞増殖抑制制度の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した. また, 被験物質処理 6 時間後および試験終了時に倒立位相差顕微鏡下で細胞増殖抑制制度を観察した. 増殖抑制制度は下表に従って判定した.

細胞増殖抑制制度	判 定
0~10%未満	N (Normal)
10~40%未満	+
40~60%未満	++
60~90%未満	+++
90~死滅	L (Lethal)

14.7.6. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に、最終濃度 0.2 µg/mL となるようコルセミド溶液 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1102967) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を全量除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 2 mL 加え、室温で 5 分間低張処理を行った。4°C に冷却した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) を静かに 16 滴加え、2 分程静置した。全ての溶液を除いた後、新しい固定液を 2 mL 加え、さらに 2 分間細胞を固定した。固定後、液を全量除いた後、カバーガラスを乾燥させ 0.1% クリスタルバイオレット液で 5 分間染色した。標本を水洗し、乾燥させた後、封入剤 (パーマウント) を用いてスライドガラスに封入した。

14.7.7. 分裂細胞数の計数

各標本当たり、すなわち 1 用量当たり 500 個の細胞を顕微鏡下で観察し、有糸分裂細胞の出現数を計数し、有糸分裂指数 (MI : Mitotic Index) を算出した。ただし、細胞毒性作用が非常に強く発現した場合は、観察対象から除いた。

14.8. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.8.1. 試験用量

プレ試験結果を基に、各試験系それぞれ 10 用量 (公比 2 : 下表参照) を細胞増殖抑制試験の用量に設定した。

試験系	用量数	試験用量 (µg/mL)
短時間処理法-S9 処理	10	0.977 ~ 500
短時間処理法+S9 処理	10	3.91 ~ 2000

14.8.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

試験系および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト株式会社）の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 400 μ L を除いた後、溶媒あるいは被験物質液 6 μ L を加えた。6 時間被験物質に暴露させた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Sigma Chemical Company；Lot No. 121K2349）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 μ L を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に相対細胞増殖率（陰性対照に対する比）を求めた。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 500 μ L を除き、S9 mix を 100 μ L 添加した後、溶媒あるいは被験物質液を 6 μ L 加えた。

以下の操作は 14.8.3. に記載の方法に準じた。

14.8.5. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.6. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウェルから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を 1 回洗浄した。10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. TCP8214）を加えて約 10 分間細胞を固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 107D2074）水溶液で 10 分間染色した。各ウェルを水洗した後、乾燥させた。各ウェルに色素溶出液（30%エタノール、1%酢酸水溶液）を 4.0 mL 加え、5 分間放置した後、分光光度計（105-50 型：株式会社日立製作所）を用いて 580 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（＝相対細胞増殖率）を各用量群について求め、さらにプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には 0.977～250 μ g/mL の 9 点（-S9 処理）および 15.6～250 μ g/mL の 5 点（+S9 処理）を用いた。

なお、相対細胞増殖率の平均値は各ウェルの四捨五入した値から求めた。

14.9. 染色体異常試験 (本試験)

14.9.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に、各試験系それぞれ 6~7 用量 (公比 5/3 : 下表参照) を本試験の用量に設定した。

試験系	試験用量 (μg/mL)						
短時間処理法-S9 処理	5.04	8.40	<u>14.0</u>	<u>23.3</u>	<u>38.9</u>	64.8	108
短時間処理法+S9 処理		23.3	<u>38.9</u>	<u>64.8</u>	<u>108</u>	180	300

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

14.9.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

試験系および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.9.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ : 住友ベークライト株式会社) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、溶媒、被験物質処理群では培養液 2.0 mL を除いた後、溶媒、被験物質液 30 μL を加えた。ただし、陽性対照処理群では培養液 2.3 mL を除いた後、陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。6 時間各物質に暴露させた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Sigma Chemical Company ; Lot No. 22K2420) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.9.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、溶媒、被験物質処理群では培養液 2.5 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後、溶媒、被験物質液 30 μL を加えた。ただし、陽性対照処理群では培養液 2.8 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後、陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。

以下の操作は 14.9.3. に記載の方法に準じた。

14.9.5. 析出等の観察

14.8.5.に準じた。

14.9.6. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に最終濃度で0.2 µg/mLとなるようコルセミド溶液 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1121841) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1121250) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、4°C に冷却した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 3 回交換した後、新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 1~2 滴ずつ滴下した。スライド標本を十分乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 : Merck KGaA ; Lot No. TP551574 147) を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. 040428561) で 12 分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

1 プレート当たり 2~3 枚の染色体標本作製した。

14.9.7. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスター C-100LU: キッコーマン株式会社) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

14.9.8. 染色体の観察

染色体異常の観察可能な上位 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

全ての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 (× 600) で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として 1

用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.10. 染色体異常試験（確認試験）

短時間処理法のいずれの処理においても用量相関性を伴った染色体構造異常の有意な誘発が認められたが、強い細胞毒性作用が認められた用量であることと出現頻度が低いことから確認試験を実施した。

14.10.1. 試験用量

染色体異常試験（本試験）結果を基に、各試験系それぞれ 7 用量（公差 10 µg/mL：下表参照）を確認試験の用量に設定した。

試験系	試験用量 (µg/mL)						
短時間処理法-S9 処理	10.0	<u>20.0</u>	<u>30.0</u>	<u>40.0</u>	50.0	60.0	70.0
短時間処理法+S9 処理	70.0	<u>80.0[#]</u>	<u>90.0</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>	130

#：追加顕微鏡観察

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

短時間処理法+S9 処理において、細胞毒性作用の影響が少ない低用量領域における染色体構造異常出現頻度を確認するため、80.0 µg/mL の用量について追加顕微鏡観察を実施した。

14.10.2. 使用プレート数および識別方法

14.9.2.に準じた。

14.10.3. 短時間処理法-S9 処理

14.9.3.に準じた。

14.10.4. 短時間処理法+S9 処理

14.9.4.に準じた。

14.10.5. 析出等の観察

14.8.5.に準じた。

14.10.6. 標本の作製

14.9.6.に準じた。

14.10.7. 細胞増殖抑制度の測定

14.9.7.に準じた.

14.10.8. 染色体の観察

14.9.8.に準じた. ただし, 短時間処理法+S9 処理の 80.0 $\mu\text{g/mL}$ の用量を除いて, 全ての標本をコード化した後, マスキング法で観察した. 染色体異常の観察可能な上位 3~5 用量について顕微鏡観察を実施した.

14.11. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った.

異常細胞の出現頻度を, Fisher の直接確率計算法 (有意水準 0.05) を用いて検定した. また用量依存性については, Cochran Armitage の傾向検定 (有意水準 0.05) を用いて検定した.

陰性対照群と比較し被験物質処理群において有意差が認められ, かつ, 試験用量に依存性が認められるか, あるいは再現性が確認された場合, 陽性と判定した. ただし, 最終的な判定は試験条件下での生物的な妥当性も考慮して行った.

14.12. D_{20} 値ならびに TR 値の算出法

D_{20} 値は分裂中期像の 20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり, 最小二乗法により算出した. TR 値は一定濃度 (mg/mL) 当たりの交換型異常 (cte) 出現数を示す比較値であり, 染色分体交換の出現頻度 (%) を被験物質濃度 (mg/mL 換算) で割ることにより算出した.

15. 試験結果

15.1. プレ試験 (有糸分裂指数計測)

15.1.1. プレ試験の結果

短時間処理法 (+S9 処理) および連続処理法 (24 時間処理) の 23.0, 76.8, 256, 853 および 2844 $\mu\text{g/mL}$ 【10 mM】の 5 用量 (公比 10/3) についてプレ試験を実施した結果, Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理において, 連続処理法 (24 時間処理) における処理開始後 6 時間目および短時間処理法 (+S9 処理) の 256 $\mu\text{g/mL}$ の用量で細胞増殖が 60~90%未満抑制されていた. また, 短時間処理法 (+S9 処理) の 2844 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM) では細胞が死滅していた. 有糸分裂細胞数の減少が短時間処理法 (+S9 処理) の 76.8 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められた. しかしながら, 連続処理法 (24 時間処理) では最低用量である 23.0 $\mu\text{g/mL}$ において細胞が死滅していたため, 有糸分裂細胞を計数できなかった.

15.1.2. 析出の観察

処理開始時, 短時間処理法 (+S9 処理) および連続処理法 (24 時間処理) の 256 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末状の, 853 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色膜状の, 2844 $\mu\text{g/mL}$ の用量で白色塊状の析出物が認められた. 暴露終了時, 短時間処理法 (+S9 処理) の 256 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末状の, 2844 $\mu\text{g/mL}$ の用量で白色塊状の析出物が認められ, 連続処理法 (24 時間処理) の 256 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末状の, 2844 $\mu\text{g/mL}$ の用量で白色膜状の析出物が認められた. なお, 本被験物質調製液は, 256 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で懸濁状態であったため, 処理開始時および暴露終了時の培養液中に懸濁物の残存が認められた.

15.2. 細胞増殖抑制試験

15.2.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した.

50%細胞増殖抑制濃度は, 短時間処理法-S9 処理で 11.2 $\mu\text{g/mL}$, 同+S9 処理で 57.4 $\mu\text{g/mL}$ であった.

15.2.2. 析出等の観察

処理開始時, 短時間処理法-S9 処理の 125 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末

状の、500 µg/mL の用量で白色膜状の析出物が認められ、同+S9 処理の 250 µg/mL 以上の用量で白色粉末状の、2000 µg/mL の用量で白色膜状の析出物が認められた。暴露終了時、短時間処理法-S9 処理の 125 µg/mL 以上の用量で白色粉末状の、500 µg/mL の用量で白色膜状の析出物が認められ、同+S9 処理の 250 µg/mL 以上の用量で白色粉末状の、500 µg/mL 以上の用量で白色塊状の析出物が認められた。なお、本被験物質調製液は、125 µg/mL 以上の用量で懸濁状態であったため、短時間処理法-S9 処理の 125 µg/mL 以上および同+S9 処理の 250 µg/mL 以上の用量で処理開始時および暴露終了時の培養液中に懸濁物の残存が認められた。

15.3. 染色体異常試験

15.3.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 2, Table 2 および Appendix 1 に示した。

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理群での染色体構造異常出現頻度は 14.0 µg/mL で 2.0%, 23.3 µg/mL で 3.0% ($p \leq 0.05$), 38.9 µg/mL で 6.5% ($p \leq 0.05$) を示し、試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められたが、極めて強い細胞毒性を示す濃度での反応であった。倍数性細胞の出現頻度は陰性対照と比較し僅かに高値を示した。また、試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 38.9 µg/mL での相対細胞増殖率は 5.5%であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 45.0% ($p \leq 0.05$) であった。

15.3.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 2 に示した。

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理群での染色体構造異常出現頻度は 38.9 µg/mL で 0.0%, 64.8 µg/mL で 0.5%, 108 µg/mL で 5.5% ($p \leq 0.05$) を示し、試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められた。倍数性細胞の出現頻度は試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められ、108 µg/mL においては 3.0%を示したが、そこでの相対細胞増殖率が 9.0%と極めて強い細胞毒性を示したので生物学的に有意な増加でないと判断した。なお、その倍数性細胞の約半数は核内倍加であった。また、試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 108 µg/mL での相対細胞増殖率は 9.0%であった。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 32.5% ($p \leq 0.05$) であった。

15.3.3. 被験物質の析出等

処理開始および暴露終了時、短時間処理法-S9 処理の 108 $\mu\text{g/mL}$ の用量で白色粉末状の析出物が認められ、同+S9 処理の 180 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。なお、本被験物質調製液は、180 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で懸濁状態であったため、処理開始および暴露終了時の培養液中に懸濁物の残存が認められた。

15.4. 染色体異常試験 (確認試験)

15.4.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 3 に示した。

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理群での染色体構造異常出現頻度は 20.0 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 30.0 $\mu\text{g/mL}$ で 2.5%, 40.0 $\mu\text{g/mL}$ で 6.5% ($p \leq 0.05$) を示し、試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められたが、極めて強い細胞毒性を示す濃度での反応であった。倍数性細胞の出現頻度は陰性対照と比較し僅かに高値を示した。また、試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 40.0 $\mu\text{g/mL}$ での相対細胞増殖率は 8.7%であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 58.0% ($p \leq 0.05$) であった。

15.4.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 4 に示した。

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理群での染色体構造異常出現頻度は 80.0 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0% ($p \leq 0.05$), 90.0 $\mu\text{g/mL}$ で 8.5% ($p \leq 0.05$), 100 $\mu\text{g/mL}$ で 5.0% ($p \leq 0.05$), 110 $\mu\text{g/mL}$ で 7.0% ($p \leq 0.05$), 120 $\mu\text{g/mL}$ で 9.0% ($p \leq 0.05$) を示し、試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められた。倍数性細胞の出現頻度は試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められ、110 $\mu\text{g/mL}$ においては 3.0% ($p \leq 0.05$) を示したが、そこでの相対細胞増殖率が 21.2%と強い細胞毒性を示していたことから生物学的に有意な増加でないと判断した。なお、その倍数性細胞の約半数は核内倍加であった。また、試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 120 $\mu\text{g/mL}$ での相対細胞増殖率は 8.8%であった。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 28.0% ($p \leq 0.05$) であった。

15.4.3. 被験物質の析出等

処理開始時、短時間処理法-S9 処理の 60.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末状の析出物が認められ、同+S9 処理の 70.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。暴露終了時、短時間処理法-S9 処理の 70.0 $\mu\text{g/mL}$ の用量で白色粉末状の析出物が認められ、同+S9 処理の 70.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。

15.5. D_{20} 値ならびに TR 値算出結果

本染色体異常試験結果から算出した D_{20} 値 (mg/mL) ならびに TR 値 (mg 当たり) は次の通りであった。

試験	試験系	異常の種類	D_{20} 値	TR 値
本試験	短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.423	46.3
確認試験	短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.306	66.7

16. 考察および結論

Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-の変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に、短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理とも細胞の増殖が著しく抑制される濃度まで検討した。

染色体異常試験の結果、Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-処理では短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても、試験用量に依存した有意 ($p \leq 0.05$) な染色体構造異常の誘発が認められたが、強い細胞毒性作用が認められた用量であることと出現頻度が低いことから確認試験を実施した。その結果、短時間処理法の-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても用量相関性を伴い、統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な染色体構造異常 (特に染色分体交換) の誘発が認められた。しかしながら、-S9 処理群でみられた陽性反応は全て極めて強い細胞毒性を示す濃度での反応であり、相対細胞増殖率 14.8%で陰性を示すため、明確な陽性反応ではないことから疑陽性と判断した。一方、+S9 処理群では 30~50%の相対細胞増殖率で陽性であることから陽性反応と判断した。変異原性の強さに関する相対的比較値である D_{20} 値の最小値は 0.306 (mg/mL) および TR 値の最大値は 66.7 (mg 当たり) とそれぞれ算出された。

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があった¹⁾。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、短時間処理法の陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データ (Appendix 5) 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)-のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。

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.

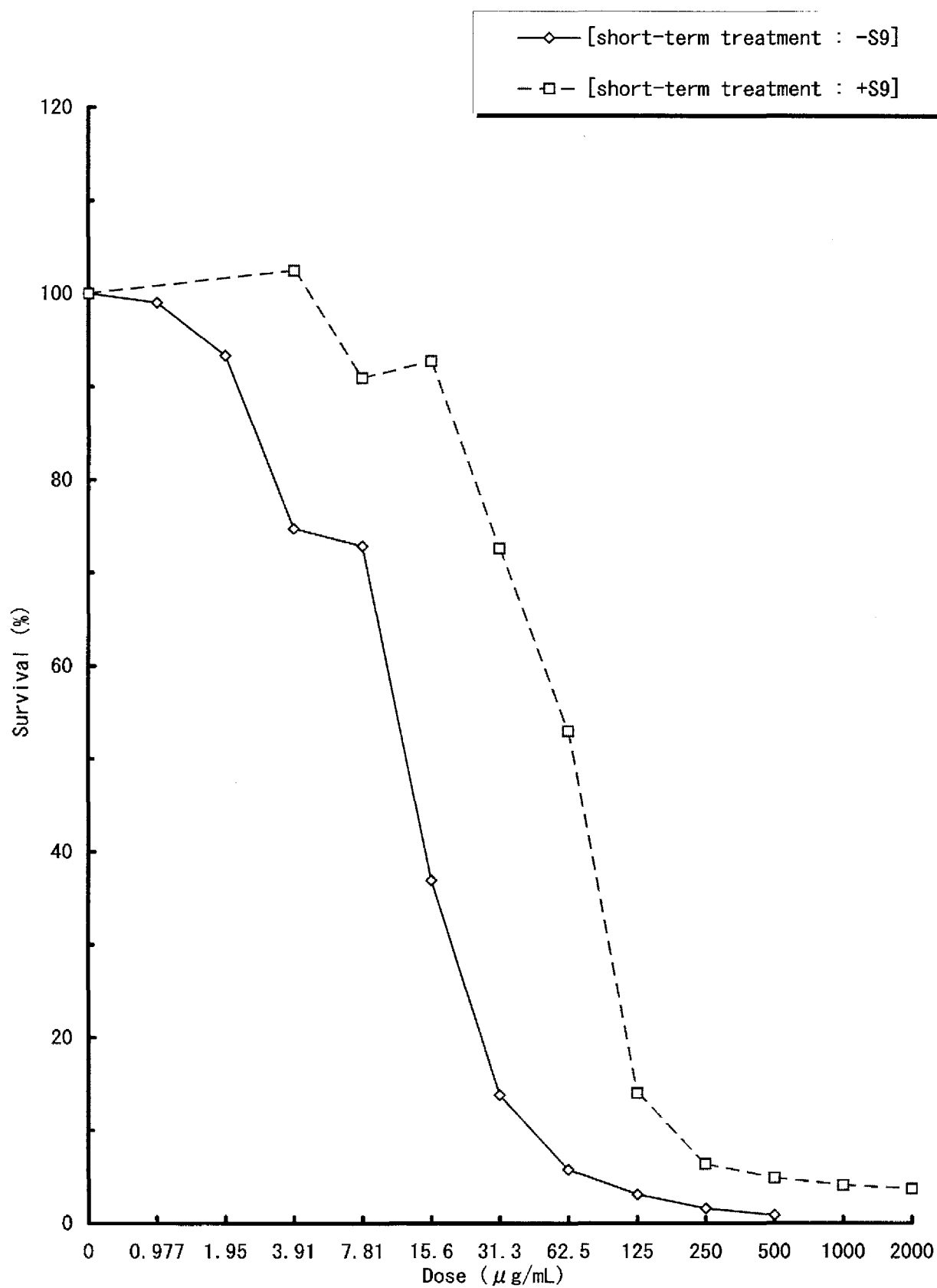


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [short-term treatment]

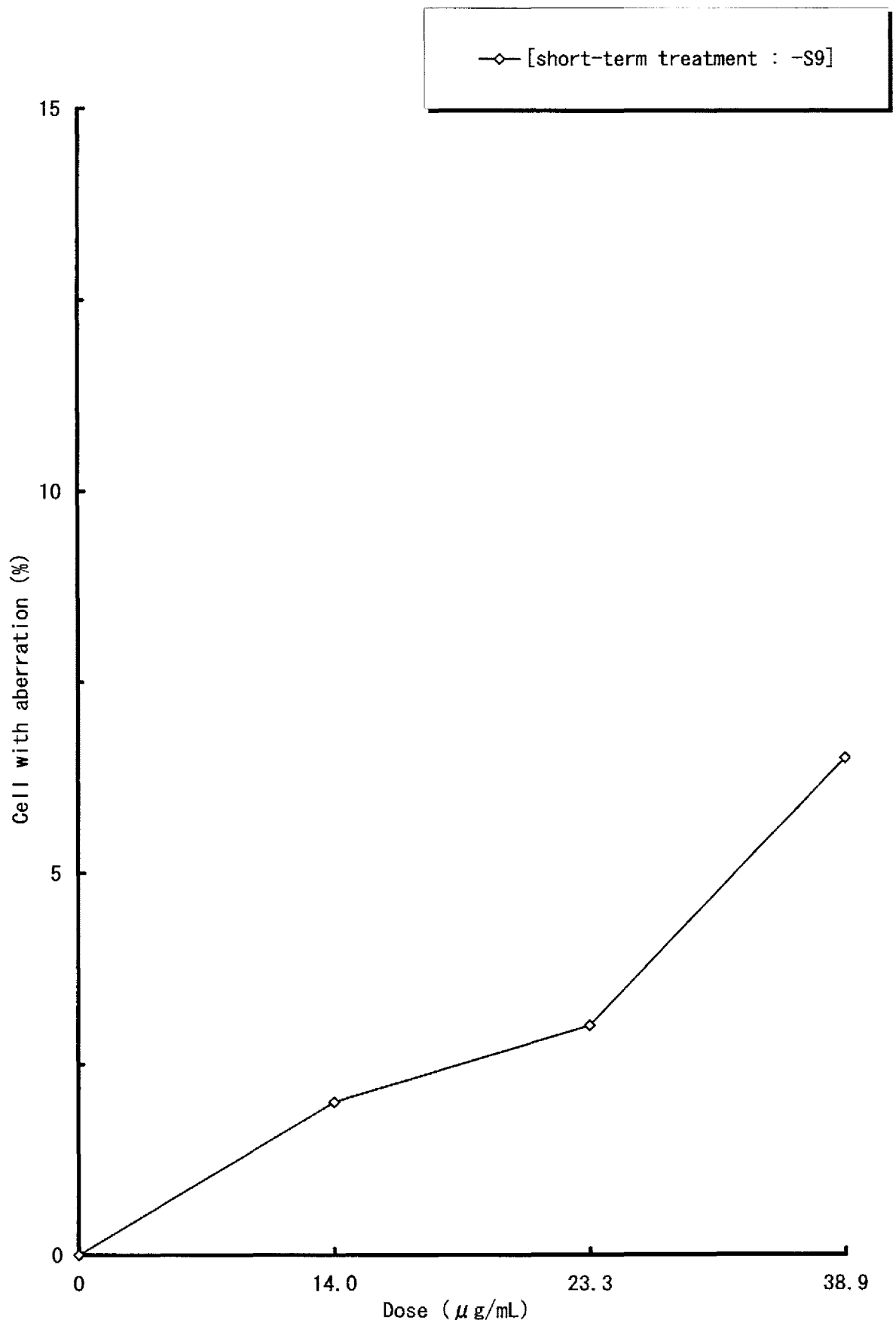


Figure 2. Incidence of structural aberrations induced by
Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-[short-term treatment:-S9]

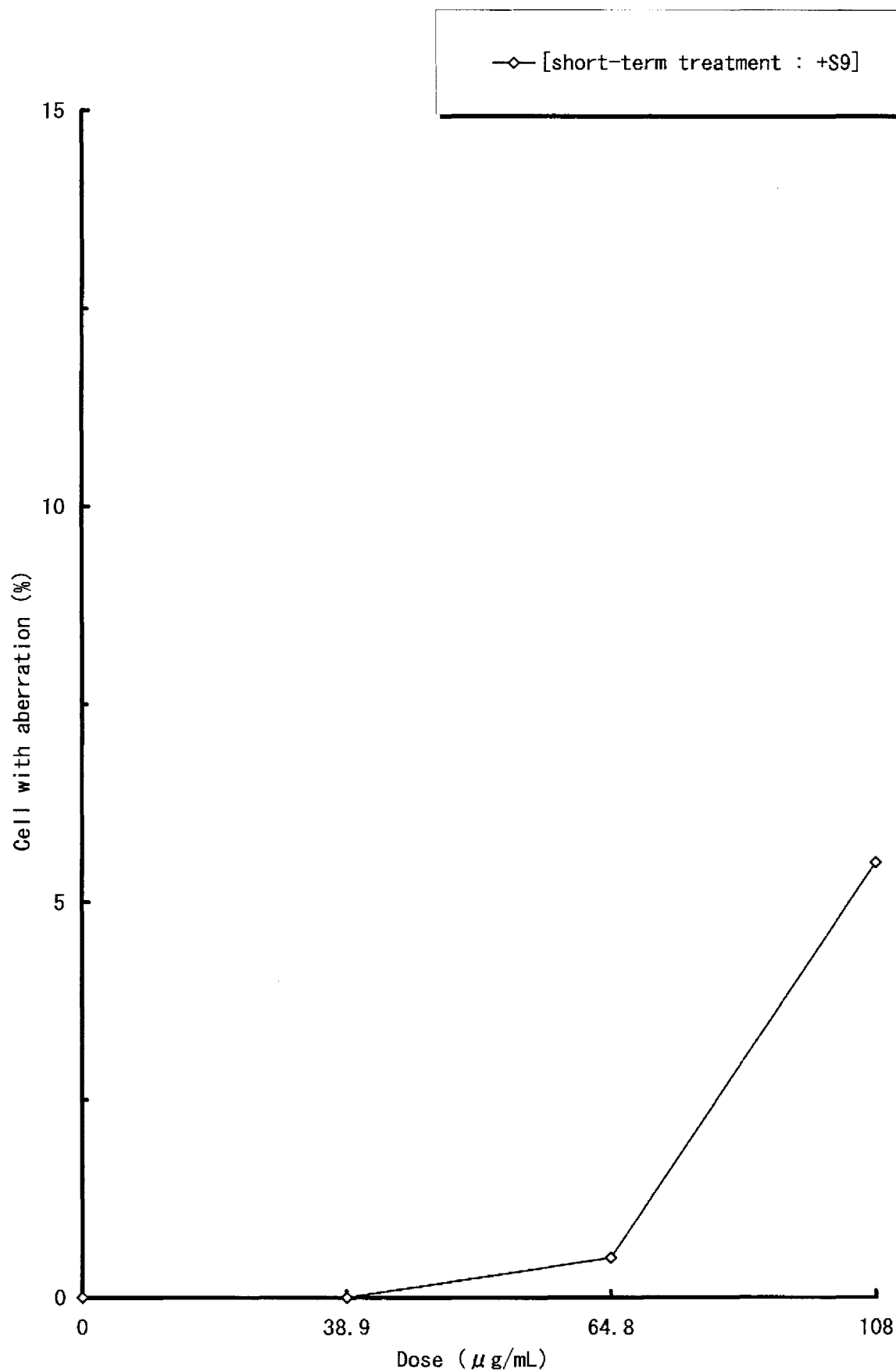


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by
Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- [short-term treatment: +S9]
F-3

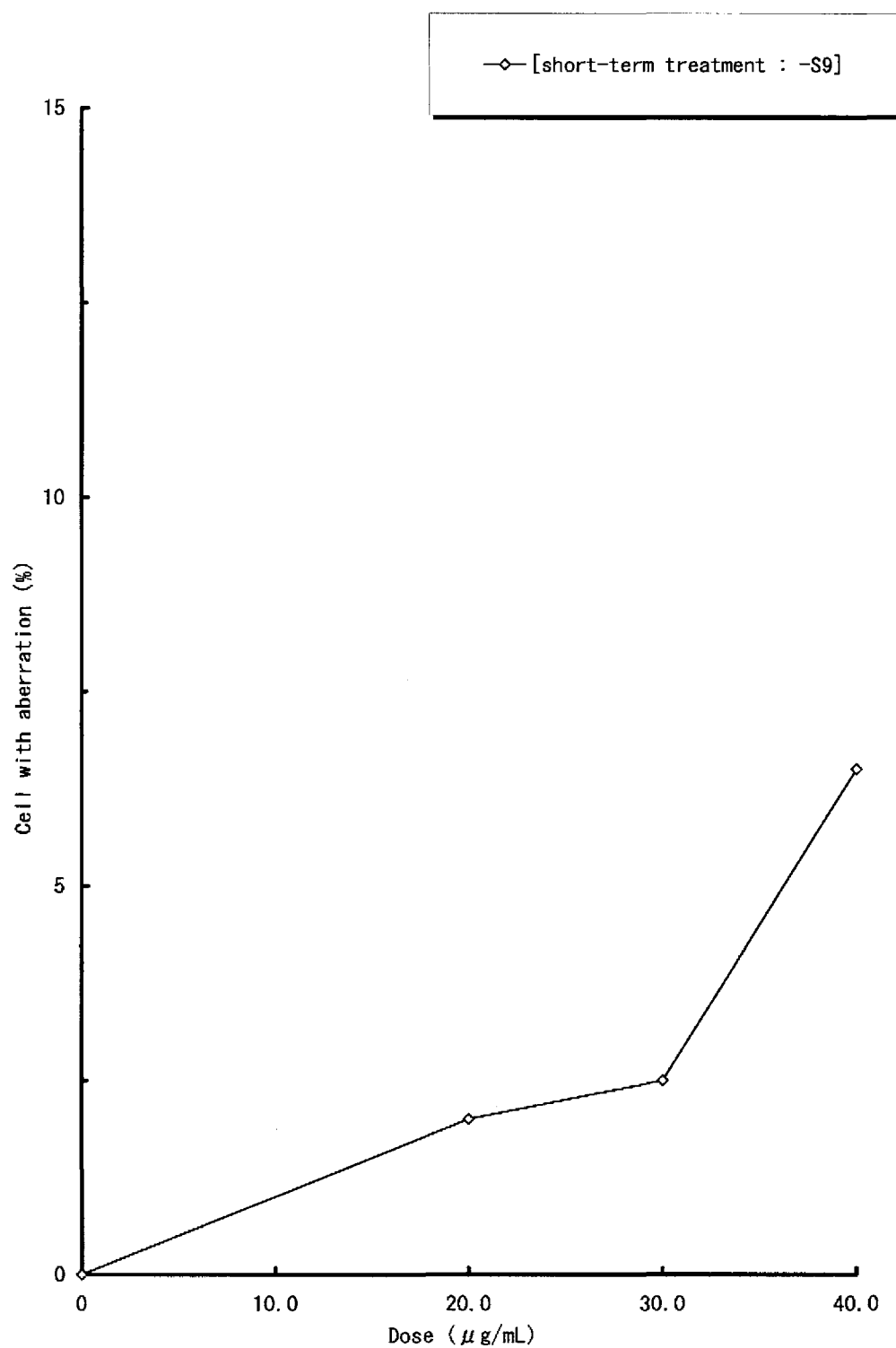


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- (confirmative examination) [short-term treatment: -S9]

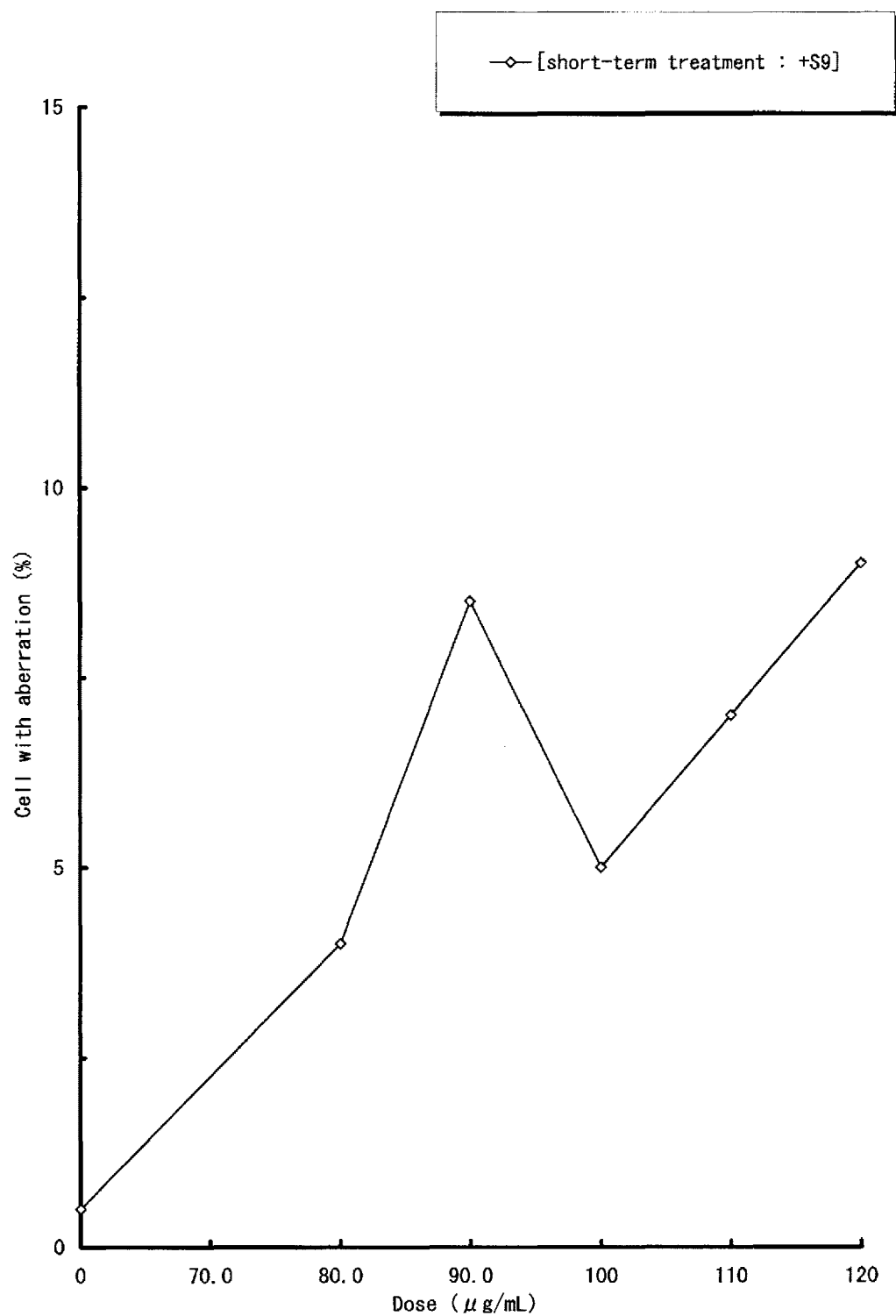


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- (confirmative examination) [short-term treatment: +S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
[short-term treatment]

Exp. No. 6253 (115-161)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Relative cell growth (%)	[Mean]	Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Relative cell growth (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	0.977	99.1 98.9	[99.0]	Test substance	3.91	101.1 103.7	[102.4]
	1.95	93.4 93.1	[93.3]		7.81	92.6 89.3	[91.0]
	3.91	62.3 87.0	[74.7]		15.6	89.7 95.7	[92.7]
	7.81	71.7 74.0	[72.9]		31.3	73.9 71.2	[72.6]
	15.6	34.1 39.7	[36.9]		62.5	44.1 61.9	[53.0]
	31.3	15.4 12.1	[13.8]		125	14.2 13.7	[14.0]
	62.5	6.0 5.5	[5.8]		250 d)	4.7 8.0	[6.4]
	125 d)	3.5 2.7	[3.1]		500 d)	5.1 4.7	[4.9]
	250 d)	1.3 1.8	[1.6]		1000 d)	3.3 4.9	[4.1]
	500 d)	0.9 0.9	[0.9]		2000 d)	4.1 3.2	[3.7]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— 11.2 ($\mu\text{g/mL}$)[short-term treatment : +S9] ——— 57.4 ($\mu\text{g/mL}$)

a): Negative control

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzothiazole,2-(morpholinodithio)-
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 6253 (115-161)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	6	100.0	200	3	0	0	0	0	0	0 (0.0)	# 200	1 (0.5)
Test substance	14.0	6	67.5	200	3	2	4	0	0	0	4 (2.0)	200	3 (1.5)
	23.3	6	26.3	200	0	1	6	0	0	0	6 (3.0)	* 200	4 (2.0)
	38.9	6	5.5	200	0	1	13	0	0	0	13 (6.5)	* 200	1 (0.5)
	64.8	6	0.3	Toxic									
	108 d)	6	0.1	Toxic									
MMC b)	0.1	6	86.1	200	7	20	84	0	0	0	90 (45.0)	* 200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

#: $p \leq 0.05$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

*: $p \leq 0.05$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 6253 (115-161)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	#	200	1 (0.5)	#
Test substance	38.9	6	86.1	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)		200	1 (0.5)	
	64.8	6	76.8	200	1	0	1	0	0	0	1 (0.5)		200	2 (1.0)	
	108	6	9.0	200	1	1	10	0	0	0	11 (5.5)	*	200	6 (3.0)	
	180 d)	6	0.1	Toxic											
	300 d)	6	0.1	Toxic											
CP b)	12.5	6	98.4	200	6	11	58	0	0	0	65 (32.5)	*	200	0 (0.0)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

#: $p \leq 0.05$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

*: $p \leq 0.05$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
(confirmative examination)[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 6253 (115-161)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	#	200	0 (0.0)	#
Test substance	20.0	6	71.6	200	0	2	3	0	0	0	4 (2.0)		200	1 (0.5)	
	30.0	6	14.8	200	1	2	3	0	0	0	5 (2.5)		200	4 (2.0)	
	40.0	6	8.7	200	1	1	12	0	0	0	13 (6.5)	*	200	5 (2.5)	
	50.0	6	3.0	Toxic											
	60.0	6	0.4	Toxic											
	70.0 d)	6	0.1	Toxic											
MMC b)	0.1	6	77.0	200	8	41	99	0	0	0	116 (58.0)	*	200	0 (0.0)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

#: $p \leq 0.05$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

*: $p \leq 0.05$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
(confirmative examination) [short-term treatment : +S9]

Exp. No. 6253 (115-161)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	#	200	0 (0.0)	#
Test substance	80.0 d)	6	45.5	200	0	1	8	0	0	0	8 (4.0)	*	200	1 (0.5)	
	90.0 d)	6	39.2	200	3	6	12	0	0	0	17 (8.5)	*	200	4 (2.0)	
	100 d)	6	31.5	200	1	3	8	0	0	0	10 (5.0)	*	200	3 (1.5)	
	110 d)	6	21.2	200	1	2	12	1	0	0	14 (7.0)	*	200	6 (3.0)	*
	120 d)	6	8.8	200	2	5	13	0	0	0	18 (9.0)	*	200	5 (2.5)	
	130 d)	6	1.6	Toxic											
CP b)	12.5	6	101.3	200	4	12	50	0	0	0	56 (28.0)	*	200	0 (0.0)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

#: $p \leq 0.05$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

*: $p \leq 0.05$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period