

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in Rats

要約

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの0(1%カルメロースナトリウム水溶液), 100, 300および1000 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD(SD)ラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し, さらに0および1000 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。その結果, 以下の成績を得た。

一般状態, 体重, 摂餌量, 尿検査, 剖検および病理組織学検査では, 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与に関連した変化は認められなかった。血液学検査では, ヘマトクリット値, ヘモグロビン量および赤血球数の高値あるいは高値傾向ならびに網赤血球率の低値が雌の1000 mg/kg群で認められた。血液生化学検査では, 総コレステロールの低値が雌の300および1000 mg/kg群で認められた。器官重量では, 脾臓の絶対重量および相対重量の低値が雌の1000 mg/kg群で認められた。

以上のことから, 本試験における7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの無影響量(NOEL)は雄で300 mg/kg/day, 雌で100 mg/kg/dayであると考えられた。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム(純度:89.2%, Lot No.:5501, スガイ化学工業(株), 和歌山)は灰色がかかった白色固体である。入手後の被験物質は密封容器に入れ, 冷暗所に保存し, 残余被験物質を製造業者が分析し, 投与期間中の安定性を確認した。溶媒は1%カルメロースナトリウム水溶液(日本薬局方カルメロースナトリウム, 丸石製薬(株), および日本薬局方精製水, ヤクハン製薬(株))を用い, これに被験物質を所定の濃度となるように懸濁した。被験物質の調製は用時調製とした。また, これらの調製液について濃度を分析し, 設定値の±10%以内であることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を7日間の検疫・馴化を行った後, 雌雄各42匹を選択して5週齢で試験に供した。投与日の体重範囲は雄が149~168

g, 雌が126~149 gであった。動物は, 温度22~24 °C, 湿度41~56%, 換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8:00から20:00まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で, プラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内, 群分け後は個別で飼育した。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて, 飲料水は札幌市水道水を自動給水装置あるいは給水器を用いて, 自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では1群あたり雌雄各5例のラットに100, 300および1000 mg/kgの7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを14日間反復経口投与した結果, 雄の1000 mg/kg群で体重, 摂餌量および腎臓の絶対重量の高値傾向, 雌の300および1000 mg/kg群でアルカリフォスファターゼ活性の高値傾向がみられた。

以上のことから, 高用量群には1000 mg/kgを設定し, 以下公比約3で除して, 中用量群には300 mg/kgを, 低用量群には100 mg/kgを, さらに, 媒体のみを投与する対照群も加え, 雌雄各4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも7匹とし, 対照群および1000 mg/kg群には2群を割り付け, 投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

各個体の投与量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて, 1日1回連続28日間, 強制的に胃内に投与した。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

投与期間中および回復期間中に, 全例について1日1回以上の頻度で観察した。

2) 体重測定および摂餌量測定

体重は全例について, 投与1日(投与前), 投与2, 5, 7, 10, 14, 21および28日(投与終了日), 回復1日, 2, 5, 7および14日ならびに剖検日に測定し, 投与1日から28日, 回復1日から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

3) 尿検査

投与4週および回復2週に全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い, 同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH, 蛋白, 糖,

ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンおよび潜血反応(以上、マルティスティックス、バイエル・三共)、色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿について尿量(容量)、比重(屈折計、アタゴ)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、カルシウム(OCPC法)ならびに無機リン(Fiske-SubbaRow法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)を測定した。

4) 血液学検査

生存例全例について約16時間絶食した後、エーテル麻酔下で大腿静脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて、赤血球数、平均赤血球容積、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)(以上、コールターカウンターT660型、コールター)、ヘマトクリット値(赤血球数、平均赤血球容積より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、ヘモグロビン量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値、ヘモグロビン量より算出)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定し、大腿静脈から採取した無処理血液を用いて凝固時間(流体粘度変化による空気圧測定法、マイクロコアグロメーター、グライナー)を測定した。さらに、腹部大動脈より採取した血液をクエン酸ナトリウムで処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて、プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A、バクスター)を測定した。

5) 血液生化学検査

生存例全例について約16時間絶食した後、エーテル麻酔下で、腹部大動脈より採取した血液を3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGOT(IFCC法)、GPT(IFCC法)、アルカリフォスファターゼ(Bessey-Lawry法)、乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)、 γ -GTP(包接L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、グルコース(ヘキソキナーゼ法)、総コレステロール(酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿素窒素(ウレアゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(Jaffé法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(Fiske-SubbaRow法)、総蛋白(ビウレット法)およびアルブミン(BCG法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、A/G比(総蛋白、アルブミンより算出)ならびに蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法、全自動電気泳動装置CTE-150、常光)を測定した。

6) 剖検および器官重量測定

生存例については投与28日および回復14日の翌日に、衰弱のため屠殺した例については屠殺時に、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また、脳、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体含む)、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定するとともに、絶対重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

7) 病理組織学検査

全例について肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳(大脳・小脳)、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、脾臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨(骨髄を含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(外側広筋)、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃(前胃・腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精囊(凝固腺を含む)、前立腺、卵巣、子宮、陰および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液で、精巣および精巣上体をブアン液で、眼球およびハーダー腺をアピッドソン液で固定した。これらの摘出器官・組織を常法にしたがってパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を複製し、鏡検した。

5. 統計解析

体重、体重増加量および体重増加率、摂餌量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液生化学検査、器官の絶対重量および相対重量の結果についてBartlettの検定法を行い、等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法により解析し、不等分散の場合はKruskal-Wallisの検定法で解析した。Kruskal-Wallis法の解析の結果、有意差が認められた場合には、Mann-WhitneyのU検定法で解析した。

尿比重および尿検査の定性的項目の結果については、Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差が認められた場合は、Mann-WhitneyのU検定法を用いて解析した。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては、いずれも有意水準を5%とした。

結果

1. 一般状態

投与期間には、雌雄ともに異常は認められなかった。

回復期間には、雄の対照群の1例で回復13日に衰弱が認められたため、屠殺し、剖検を行ったところ、鼻部に骨折が認められ、採尿に使用した代謝ケージ内での事故による可能性が考えられた。雌では異常は認められなかった。

2. 体重

雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

3. 摂餌量

投与期間には、雄では対照群との間に差は認められなかった。雌では、1000 mg/kg群で投与2日に摂餌量の高値が認められたが、一過性の変化であり、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与との関連はないものと考えられた。

回復期間には、雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

4. 尿検査

投与期間最終週には、雄の300, 1000 mg/kg群ならびに雌の1000 mg/kg群でカリウム排泄量の高値が認められた。また、雄の1000 mg/kg群でナトリウム排泄量の低値が認められた。

回復期間最終週には、雌の1000 mg/kg群でカルシウム排泄量の高値および飲水量の高値が認められた。しかし、投与期間終了時に同様な変化が認められていないこと、回復期間終了時の血液生化学検査および病理組織学検査で特記すべき変化は認められなかったことから、偶発的な変化と考えられた。

5. 血液学検査 (Table 1, 2)

投与期間終了時には、雄では、対照群との間に差は認められなかった。雌では、1000 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量の高値、赤血球数の高値傾向ならびに網赤血球率の低値が認められた。

回復期間終了時には、雄では対照群との間に差は認められなかった。雌では、1000 mg/kg群に分葉核好中球率の高値が認められた。しかし、変動幅が小さく、炎症性変化などが認められなかったことから、偶発的な変化と考えられた。

6. 血液生化学検査 (Table 3, 4)

投与期間終了時には、雌の300および1000 mg/kg群で総コレステロールの低値が認められた。

回復期間終了時には、雄の1000 mg/kg群で総コレステロールの低値が認められたが、投与期間終了時にこの変化は認められず、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与との関連は明らかではなかった。雌では、対照群との間に差は認められなかった。

7. 器官重量 (Table 5, 6)

投与期間終了時には雄の1000 mg/kg群で脾臓の絶対重量および相対重量の低値が認められた。雌では、100 mg/kg群で胸腺の相対重量の低値が認められたが、300および1000 mg/kg群では認められなかった。

回復期間終了時には雄の1000 mg/kg群で脾臓の絶対重量および相対重量の低値が認められた。また、腎臓の相対重量の高値も認められたが、投与期間終了時にこの変化は認められず、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの影響とは考えなかった。雌では対照群との間に差は認められなかった。

8. 剖検

投与期間終了時および回復期間終了時には、雌雄ともに7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与と関連する所見は認められなかった。

9. 病理組織学検査

雌雄ともに7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与と関連する所見は認められなかった。

考察

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの0(1%カルメロースナトリウム水溶液)、100, 300および1000 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD(SD)ラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し、さらに0および1000 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。

一般状態、体重、摂餌量、剖検および病理組織学検査では、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与による変化は認められなかった。

尿検査では、投与4週にカリウム排泄量の高値が雄の300および1000 mg/kg群ならびに雌の1000 mg/kg群で認められた。カリウム排泄量の高値は経口投与された7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム中のカリウムが尿中に排泄されたことに起因した変化であると推察され、毒性的な変化とは考えられなかった。また、血中カリウム濃度に変化は認められなかったことから、カリウムの排泄は速やかであったと考えられた。雄の1000 mg/kg群では投与4週にナトリウム排泄量の低値も認められ、カリウム排泄量の増加に対するナトリウムの再吸収亢進の可能性も考えられた。しかし、カリウム排泄量の高値がみられた雄の300 mg/kg群および雌の1000 mg/kg群ではそのような傾向がみられず、ナトリウム排泄量の変化は生理的な変動範囲内であり、その他の腎機能パラメータあるいは腎臓の病理組織学検査では7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与によると考えられる変化は認められなかったことから毒性的な変化とは考えられなかった。

血液学検査では、投与期間終了時に雌の1000 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球の高値あるいは高値傾向ならびに網赤血球率の低値が認められ、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与の影響と考えられた。しかし、造血器系の病理組織学検査では異常は認められず、その機序は明らかにならなかった。血液生化学検査では、投与期間終了時に雌の300および1000 mg/kg群で総コレステロールの低値が認められ、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与の影響と考えられた。しかし、肝臓等の病理組織学検査では異常は認められず、その機序は明らかにならなかった。なお、回復期間終了時の血液学検査および血液生化学検査ではこれらの変化は認められず、いずれも可逆的な変化と考えられた。

器官重量では、雄の1000 mg/kg群で投与期間終了時

および回復期間終了時に脾臓の絶対重量および相対重量の低値が認められたが、その機序は明らかにならなかった。

以上のことから、本試験における7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの無影響量(NOEL)は、雄で300 mg/kg/day、雌で100 mg/kg/dayであると考えられた。

連絡先

試験責任者：吉村浩幸
試験担当者：茂野 均, 長谷淳一, 古川正敏,
河村公太郎, 武田みよ子
（株）化合物安全性研究所
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)
Hitoshi Shigeno, Junichi Nagaya,
Masatoshi Furukawa, Kotaro
Kawamura, Miyoko Takeda
Safety Research Institute for Chemical
Compounds Co., Ltd.
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,
004-0839, Japan
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Hematological findings in male rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	End of administration period				End of recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	6	7
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.147 \pm 0.460	8.225 \pm 0.357 (6) ^a	8.157 \pm 0.538	8.219 \pm 0.233	8.743 \pm 0.296	8.611 \pm 0.351
Hematocrit(%)	49.74 \pm 2.15	49.43 \pm 1.37 (6)	49.60 \pm 3.24	49.36 \pm 1.71	50.67 \pm 2.51	50.13 \pm 1.57
Hemoglobin(g/dL)	15.81 \pm 0.61	15.60 \pm 0.23 (6)	15.71 \pm 0.77	15.67 \pm 0.66	16.08 \pm 0.57	15.91 \pm 0.52
MCV(fL)	61.10 \pm 1.37	60.15 \pm 1.68 (6)	60.83 \pm 1.17	60.07 \pm 0.85	57.98 \pm 1.97	58.24 \pm 0.87
MCH(pg)	19.44 \pm 0.73	19.00 \pm 0.83 (6)	19.30 \pm 0.57	19.04 \pm 0.41	18.40 \pm 0.32	18.50 \pm 0.29
MCHC(%)	31.80 \pm 1.05	31.60 \pm 0.77 (6)	31.71 \pm 0.61	31.74 \pm 0.40	31.75 \pm 0.81	31.77 \pm 0.36
WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.43 \pm 3.41	13.02 \pm 2.90 (6)	13.11 \pm 2.56	13.30 \pm 2.41	11.42 \pm 3.20	13.71 \pm 5.22
Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1029.1 \pm 145.3	1152.8 \pm 88.3 (6)	1145.0 \pm 154.9	1051.6 \pm 325.1	1102.0 \pm 113.4	1082.3 \pm 138.4
Reticulocyte(%)	13.9 \pm 2.7	13.7 \pm 4.8 (6)	14.1 \pm 1.6	14.6 \pm 3.8	12.5 \pm 2.8	12.7 \pm 2.4
CT(sec)	206.4 \pm 30.0	184.0 \pm 77.5	226.7 \pm 78.2	242.9 \pm 56.8	286.2 \pm 115.4	234.0 \pm 60.2
PT(sec)	13.51 \pm 2.09	13.56 \pm 1.51	14.07 \pm 2.26	15.39 \pm 1.67	14.17 \pm 1.45	14.36 \pm 1.85
APTT(sec)	27.13 \pm 2.43	26.71 \pm 3.17	28.69 \pm 2.60	28.90 \pm 3.37	28.50 \pm 2.21	29.84 \pm 3.67
Differential leukocyte counts(%)						
Neutrophil						
Stab form	1.3 \pm 0.8	1.0 \pm 0.9 (6)	1.0 \pm 0.8	0.7 \pm 0.5	1.0 \pm 1.1	0.9 \pm 0.7
Segmented	8.0 \pm 7.2	12.3 \pm 4.3 (6)	8.1 \pm 2.6	11.7 \pm 5.1	9.8 \pm 2.6	9.6 \pm 7.1
Eosinophil	0.4 \pm 0.5	0.5 \pm 0.8 (6)	0.3 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.7 \pm 0.8
Basophil	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0 (6)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocyte	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0 (6)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Lymphocyte	90.3 \pm 7.6	86.2 \pm 5.2 (6)	90.6 \pm 2.9	87.0 \pm 5.2	88.8 \pm 3.1	88.9 \pm 7.9

Values are expressed as Mean \pm S.D.

a) Values in parentheses are number of animals examined.

Table 2 Hematological findings in female rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	End of administration period				End of recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.899 \pm 0.255	7.936 \pm 0.365	8.000 \pm 0.492	8.370 \pm 0.286	8.327 \pm 0.198	8.221 \pm 0.310
Hematocrit(%)	47.11 \pm 1.40	47.13 \pm 1.03	46.84 \pm 2.19	50.07 \pm 2.16*	49.13 \pm 1.62	48.37 \pm 1.46
Hemoglobin(g/dL)	15.36 \pm 0.24	15.57 \pm 0.53	15.34 \pm 0.72	16.44 \pm 0.62**	15.76 \pm 0.49	15.43 \pm 0.56
MCV(fL)	59.66 \pm 1.43	59.46 \pm 1.66	58.61 \pm 1.21	59.81 \pm 1.15	59.00 \pm 1.45	58.86 \pm 1.43
MCH(pg)	19.47 \pm 0.62	19.66 \pm 1.00	19.20 \pm 0.81	19.64 \pm 0.40	18.93 \pm 0.57	18.77 \pm 0.34
MCHC(%)	32.63 \pm 0.94	33.04 \pm 1.09	32.77 \pm 0.84	32.89 \pm 0.41	32.09 \pm 0.71	31.89 \pm 0.53
WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7.84 \pm 1.04	7.69 \pm 1.77	7.66 \pm 0.85	8.70 \pm 2.55	8.06 \pm 3.21	7.86 \pm 1.50
Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1149.7 \pm 38.1	1157.3 \pm 71.5	1116.4 \pm 74.3	1173.0 \pm 93.8	1121.9 \pm 109.1	1119.0 \pm 107.8
Reticulocyte(%)	13.4 \pm 2.8	13.4 \pm 2.4	13.3 \pm 2.3	9.7 \pm 1.7*	12.7 \pm 3.9	13.4 \pm 3.5
CT(sec)	186.1 \pm 80.2	156.1 \pm 12.5	164.0 \pm 47.9	195.7 \pm 52.3	220.7 \pm 74.6	212.6 \pm 68.4
PT(sec)	11.68 \pm 0.55 (6) ^a	11.93 \pm 0.39	11.73 \pm 0.52 (6)	11.93 \pm 0.46	12.21 \pm 0.55	12.14 \pm 0.33
APTT(sec)	19.85 \pm 1.00 (6)	21.07 \pm 2.57	19.92 \pm 1.18 (6)	20.87 \pm 2.38	21.89 \pm 1.67	22.81 \pm 1.30
Differential leukocyte counts(%)						
Neutrophil						
Stab form	0.7 \pm 0.8	0.7 \pm 0.8	1.0 \pm 0.8	1.1 \pm 1.2	0.9 \pm 0.9	0.9 \pm 0.4
Segmented	13.7 \pm 4.4	11.4 \pm 2.2	12.6 \pm 6.1	8.3 \pm 3.2	8.6 \pm 2.5	12.6 \pm 3.9*
Eosinophil	0.6 \pm 0.8	0.4 \pm 0.5	0.9 \pm 0.9	0.7 \pm 0.8	0.9 \pm 0.9	0.9 \pm 0.7
Basophil	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocyte	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Lymphocyte	85.0 \pm 5.2	87.4 \pm 2.4	85.6 \pm 6.5	89.9 \pm 2.9	89.7 \pm 2.1	85.7 \pm 4.5

Values are expressed as Mean \pm S.D.Significantly different from 0 mg/kg group (* p <0.05, ** p <0.01)

a) Values in parentheses are number of animals examined.

Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	6	7
Total protein (g/dL)	5.57 ± 0.11	5.66 ± 0.21	5.71 ± 0.24	5.67 ± 0.19	5.80 ± 0.22	5.89 ± 0.21
Albumin (g/dL)	2.23 ± 0.08	2.33 ± 0.10	2.29 ± 0.12	2.27 ± 0.10	2.25 ± 0.10	2.24 ± 0.15
A/G	0.670 ± 0.037	0.703 ± 0.041	0.670 ± 0.040	0.671 ± 0.047	0.638 ± 0.064	0.620 ± 0.068
Protein fraction (%)						
Albumin	53.97 ± 1.43	54.13 ± 1.69	52.07 ± 1.94	53.00 ± 2.84	51.92 ± 2.44	49.46 ± 3.28
α_1 -globulin	23.31 ± 1.65	23.76 ± 1.99	24.99 ± 0.52	24.00 ± 2.22	24.10 ± 3.23	25.79 ± 1.30
α_2 -globulin	5.87 ± 1.00	5.43 ± 0.70	5.41 ± 1.27	5.26 ± 0.89	8.37 ± 3.04	7.13 ± 2.35
β -globulin	15.71 ± 0.81	15.66 ± 1.00	16.57 ± 1.09	16.54 ± 1.37	14.32 ± 3.67	16.13 ± 3.90
γ -globulin	1.13 ± 0.51	1.03 ± 0.36	0.96 ± 0.35	1.20 ± 0.63	1.30 ± 0.52	1.50 ± 0.46
GOT (IU/L)	100.3 ± 7.4	101.9 ± 11.6	102.9 ± 10.9	96.1 ± 14.1	114.8 ± 22.9	109.3 ± 28.4
GPT (IU/L)	27.1 ± 2.9	26.6 ± 3.2	27.7 ± 4.1	25.1 ± 1.5	25.2 ± 3.5	25.7 ± 3.6
ALP (IU/L)	452.1 ± 71.8	503.4 ± 95.4	468.7 ± 83.1	442.9 ± 92.1	359.7 ± 25.9	318.4 ± 49.9
LDH (IU/L)	1870.9 ± 485.5	2072.0 ± 422.5	2126.7 ± 320.0	1838.3 ± 682.9	2378.3 ± 1060.8	2286.6 ± 1059.1
γ -GTP (IU/L)	0.59 ± 0.24	0.70 ± 0.63	0.84 ± 0.33	1.01 ± 1.03	0.63 ± 0.42	0.77 ± 0.27
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	142.0 ± 14.6	138.4 ± 18.4	149.0 ± 10.0	146.3 ± 13.9	139.3 ± 6.4	154.0 ± 26.6
Total cholesterol (mg/dL)	54.9 ± 6.5	49.6 ± 5.0	59.0 ± 13.4	47.4 ± 7.8	57.0 ± 5.5	50.6 ± 15.5*
Triglyceride (mg/dL)	46.4 ± 16.0	37.4 ± 10.1	48.9 ± 9.2	35.4 ± 19.2	44.5 ± 19.3	38.6 ± 8.4
Urea nitrogen (mg/dL)	15.50 ± 1.48	14.37 ± 1.63	15.43 ± 0.54	14.77 ± 1.93	17.73 ± 0.64	17.81 ± 1.81
Creatinine (mg/dL)	0.46 ± 0.05	0.46 ± 0.08	0.44 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.05
Sodium (mEq/L)	145.64 ± 0.63	145.00 ± 0.65	145.29 ± 1.19	144.57 ± 1.24	145.42 ± 1.43	144.43 ± 0.98
Potassium (mEq/L)	4.681 ± 0.145	5.023 ± 0.333	4.900 ± 0.280	4.897 ± 0.464	4.852 ± 0.265	4.817 ± 0.219
Chlorine (mEq/L)	107.3 ± 1.4	108.0 ± 2.0	106.7 ± 1.4	109.3 ± 1.1	108.0 ± 1.1	107.3 ± 1.5
Calcium (mg/dL)	9.87 ± 0.21	10.01 ± 0.29	10.04 ± 0.26	9.97 ± 0.24	9.73 ± 0.20	9.63 ± 0.26
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.16 ± 0.43	8.60 ± 0.51	8.73 ± 0.47	8.29 ± 0.65	7.78 ± 0.47	7.80 ± 0.42

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$)

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.81 ± 0.22	5.80 ± 0.27	5.77 ± 0.21	5.69 ± 0.25	6.19 ± 0.28	6.11 ± 0.31
Albumin (g/dL)	2.51 ± 0.16	2.50 ± 0.13	2.56 ± 0.14	2.41 ± 0.12	2.64 ± 0.14	2.59 ± 0.18
A/G	0.764 ± 0.050	0.760 ± 0.045	0.796 ± 0.062	0.739 ± 0.037	0.746 ± 0.036	0.731 ± 0.021
Protein fraction (%)						
Albumin	58.79 ± 2.68	58.79 ± 1.54	59.34 ± 1.82	57.64 ± 1.04	59.84 ± 1.80	58.63 ± 0.74
α_1 -globulin	19.49 ± 1.38	19.94 ± 1.90	18.69 ± 1.31	20.80 ± 1.10	19.24 ± 1.44	19.81 ± 1.32
α_2 -globulin	5.27 ± 1.83	4.66 ± 1.24	5.07 ± 1.68	4.50 ± 0.91	7.43 ± 1.65	7.91 ± 1.51
β -globulin	14.69 ± 2.10	15.04 ± 0.97	15.23 ± 1.33	15.50 ± 1.13	11.23 ± 2.44	11.66 ± 2.54
γ -globulin	1.77 ± 0.51	1.57 ± 0.33	1.67 ± 0.58	1.56 ± 0.27	2.26 ± 0.78	1.99 ± 0.82
GOT (IU/L)	119.9 ± 19.8	111.9 ± 16.9	108.4 ± 17.5	114.4 ± 17.5	131.1 ± 25.4	129.6 ± 28.0
GPT (IU/L)	24.0 ± 4.7	23.4 ± 4.5	22.7 ± 3.1	23.7 ± 5.7	25.3 ± 9.4	25.0 ± 8.9
ALP (IU/L)	236.3 ± 52.8	259.9 ± 72.6	286.1 ± 56.8	258.4 ± 56.8	178.0 ± 53.0	178.6 ± 21.3
LDH (IU/L)	2613.4 ± 721.6	2174.6 ± 412.3	2208.4 ± 655.8	2452.9 ± 606.1	3006.6 ± 1051.9	2908.9 ± 923.6
γ -GTP (IU/L)	1.00 ± 0.40	1.26 ± 0.29	1.11 ± 0.47	1.24 ± 0.43	1.00 ± 0.59	0.89 ± 0.35
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	123.9 ± 20.3	115.7 ± 15.1	121.9 ± 13.9	111.4 ± 6.7	141.9 ± 14.2	132.0 ± 18.0
Total cholesterol (mg/dL)	67.0 ± 9.9	60.4 ± 11.8	51.9 ± 6.6*	49.6 ± 10.2**	59.7 ± 10.1	61.4 ± 10.3
Triglyceride (mg/dL)	20.3 ± 15.1	11.3 ± 4.2	13.1 ± 2.5	16.3 ± 11.1	13.9 ± 4.8	16.4 ± 7.8
Urea nitrogen (mg/dL)	18.00 ± 1.61	18.49 ± 2.13	16.50 ± 1.19	16.86 ± 2.54	19.23 ± 2.30	20.93 ± 2.23
Creatinine (mg/dL)	0.50 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.46 ± 0.05	0.46 ± 0.05	0.51 ± 0.04	0.57 ± 0.10
Sodium (mEq/L)	143.57 ± 1.06	144.14 ± 0.63	143.14 ± 1.21	142.71 ± 1.32	143.43 ± 0.89	143.50 ± 0.82
Potassium (mEq/L)	4.710 ± 0.183	4.447 ± 0.306	4.743 ± 0.375	4.836 ± 0.286	4.489 ± 0.343	4.651 ± 0.184
Chlorine (mEq/L)	109.4 ± 1.0	109.4 ± 1.3	107.9 ± 2.2	107.7 ± 1.5	108.6 ± 2.1	107.7 ± 1.8
Calcium (mg/dL)	9.80 ± 0.28	9.63 ± 0.31	9.64 ± 0.46	9.79 ± 0.32	9.70 ± 0.28	9.86 ± 0.28
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.44 ± 1.11	7.67 ± 0.84	7.87 ± 1.44	8.16 ± 0.74	6.46 ± 0.63	7.00 ± 0.65

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	6	7
Body weight (g)	338.7 ± 21.0	333.9 ± 16.0	348.9 ± 12.7	335.3 ± 9.6	406.8 ± 11.2	389.9 ± 34.7
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.026 ± 0.058	2.070 ± 0.109	2.024 ± 0.115	2.010 ± 0.058	2.058 ± 0.049	2.113 ± 0.087
Liver (g)	10.314 ± 0.815	10.269 ± 1.304	10.967 ± 0.496	10.167 ± 0.685	11.352 ± 0.616	11.343 ± 1.338
Heart (g)	1.200 ± 0.042	1.214 ± 0.066	1.240 ± 0.046	1.207 ± 0.105	1.390 ± 0.115	1.370 ± 0.111
Lung (g)	1.313 ± 0.096	1.271 ± 0.084	1.376 ± 0.090	1.310 ± 0.081	1.330 ± 0.038	1.376 ± 0.165
Spleen (g)	0.727 ± 0.085	0.703 ± 0.079	0.716 ± 0.058	0.627 ± 0.033*	0.770 ± 0.075	0.631 ± 0.126*
Kidney (g)						
Right	1.287 ± 0.081	1.250 ± 0.091	1.330 ± 0.035	1.306 ± 0.065	1.415 ± 0.079	1.460 ± 0.122
Left	1.274 ± 0.081	1.236 ± 0.093	1.316 ± 0.076	1.297 ± 0.074	1.418 ± 0.061	1.440 ± 0.124
Total	2.561 ± 0.156	2.486 ± 0.184	2.646 ± 0.108	2.603 ± 0.135	2.833 ± 0.124	2.900 ± 0.238
Pituitary gland (mg)	10.97 ± 0.73	11.47 ± 1.34	11.80 ± 1.49	10.81 ± 1.28	12.10 ± 1.12	11.66 ± 1.45
Thymus (mg)	617.7 ± 97.2	591.3 ± 95.5	643.0 ± 135.3	606.1 ± 99.2	492.5 ± 68.9	518.1 ± 147.6
Thyroid (mg)						
Right	10.06 ± 1.26	10.21 ± 1.40	11.06 ± 1.81	11.34 ± 4.50	11.67 ± 1.76	10.73 ± 1.33
Left	9.23 ± 1.81	8.04 ± 1.45	9.84 ± 1.38	9.97 ± 2.99	10.12 ± 1.88	10.59 ± 1.78
Adrenal (mg)						
Right	26.6 ± 4.4	25.3 ± 5.4	28.0 ± 2.6	26.1 ± 3.2	28.7 ± 3.6	29.0 ± 5.6
Left	27.3 ± 3.5	27.4 ± 6.3	29.1 ± 2.3	28.1 ± 3.0	31.0 ± 5.3	30.1 ± 7.0
Testis (g)						
Right	1.644 ± 0.116	1.556 ± 0.107	1.531 ± 0.097	1.526 ± 0.151	1.510 ± 0.135	1.519 ± 0.162
Left	1.597 ± 0.088	1.540 ± 0.074	1.537 ± 0.108	1.503 ± 0.150	1.485 ± 0.154	1.534 ± 0.157
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.601 ± 0.053	0.621 ± 0.036	0.579 ± 0.028	0.600 ± 0.025	0.505 ± 0.024	0.544 ± 0.040
Liver (g%)	3.043 ± 0.086	3.067 ± 0.262	3.147 ± 0.208	3.031 ± 0.141	2.792 ± 0.147	2.910 ± 0.195
Heart (g%)	0.356 ± 0.019	0.364 ± 0.028	0.354 ± 0.011	0.360 ± 0.032	0.343 ± 0.030	0.353 ± 0.027
Lung (g%)	0.389 ± 0.023	0.381 ± 0.025	0.394 ± 0.020	0.391 ± 0.025	0.328 ± 0.015	0.351 ± 0.022
Spleen (g%)	0.214 ± 0.027	0.211 ± 0.027	0.207 ± 0.013	0.190 ± 0.008*	0.190 ± 0.019	0.163 ± 0.022*
Kidney (g%)						
Right	0.381 ± 0.029	0.376 ± 0.023	0.380 ± 0.013	0.389 ± 0.025	0.348 ± 0.023	0.376 ± 0.011*
Left	0.377 ± 0.030	0.370 ± 0.026	0.376 ± 0.020	0.386 ± 0.024	0.348 ± 0.021	0.370 ± 0.016
Total	0.759 ± 0.061	0.746 ± 0.049	0.759 ± 0.027	0.777 ± 0.042	0.697 ± 0.040	0.746 ± 0.021*
Pituitary gland (mg%)	3.244 ± 0.191	3.434 ± 0.340	3.380 ± 0.395	3.226 ± 0.366	2.973 ± 0.250	2.996 ± 0.327
Thymus (mg%)	182.231 ± 26.115	177.756 ± 32.395	183.826 ± 36.071	181.039 ± 30.826	121.198 ± 18.100	131.357 ± 29.798
Thyroid (mg%)						
Right	2.981 ± 0.463	3.074 ± 0.512	3.164 ± 0.453	3.390 ± 1.355	2.863 ± 0.398	2.759 ± 0.311
Left	2.724 ± 0.479	2.423 ± 0.509	2.830 ± 0.457	2.983 ± 0.918	2.480 ± 0.408	2.749 ± 0.630
Adrenal (mg%)						
Right	7.853 ± 1.260	7.569 ± 1.583	8.034 ± 0.798	7.824 ± 1.174	7.033 ± 0.737	7.489 ± 1.577
Left	8.063 ± 0.944	8.196 ± 1.793	8.351 ± 0.560	8.411 ± 1.045	7.597 ± 1.123	7.781 ± 1.873
Testis (g%)						
Right	0.487 ± 0.038	0.466 ± 0.028	0.439 ± 0.037	0.456 ± 0.051	0.372 ± 0.038	0.390 ± 0.037
Left	0.471 ± 0.034	0.463 ± 0.021	0.441 ± 0.038	0.449 ± 0.049	0.365 ± 0.042	0.396 ± 0.051

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (*p < 0.05)

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	209.3 ± 16.2	208.3 ± 6.8	204.7 ± 17.7	210.9 ± 16.8	239.0 ± 20.3	246.4 ± 21.7
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.910 ± 0.083	1.879 ± 0.073	1.840 ± 0.079	1.907 ± 0.066	1.956 ± 0.102	1.964 ± 0.057
Liver (g)	6.060 ± 0.663	6.170 ± 0.509	5.943 ± 0.502	5.790 ± 0.525	6.611 ± 0.694	6.391 ± 0.359
Heart (g)	0.809 ± 0.097	0.820 ± 0.054	0.804 ± 0.048	0.800 ± 0.061	0.896 ± 0.077	0.899 ± 0.070
Lung (g)	0.997 ± 0.059	0.999 ± 0.042	0.934 ± 0.050	0.981 ± 0.079	1.067 ± 0.098	1.051 ± 0.058
Spleen (g)	0.460 ± 0.055	0.440 ± 0.057	0.446 ± 0.087	0.453 ± 0.077	0.481 ± 0.095	0.496 ± 0.095
Kidney (g)						
Right	0.806 ± 0.080	0.859 ± 0.147	0.821 ± 0.071	0.847 ± 0.044	0.907 ± 0.081	0.909 ± 0.162
Left	0.783 ± 0.104	0.831 ± 0.128	0.823 ± 0.064	0.820 ± 0.056	0.887 ± 0.084	0.891 ± 0.128
Total	1.589 ± 0.182	1.690 ± 0.273	1.644 ± 0.129	1.667 ± 0.096	1.794 ± 0.165	1.800 ± 0.286
Pituitary gland (mg)	11.60 ± 2.41	13.03 ± 1.37	12.30 ± 1.52	11.77 ± 1.50	13.87 ± 2.25	14.23 ± 2.25
Thymus (mg)	542.1 ± 122.5	422.1 ± 41.9	505.6 ± 107.8	496.9 ± 82.6	458.7 ± 96.6	403.7 ± 89.5
Thyroid (mg)						
Right	8.49 ± 2.05	8.56 ± 1.24	8.21 ± 1.39	7.99 ± 2.18	8.76 ± 2.42	8.66 ± 1.34
Left	7.40 ± 1.81	7.29 ± 1.17	7.99 ± 1.14	7.57 ± 1.69	8.33 ± 1.71	9.26 ± 1.13
Adrenal (mg)						
Right	32.1 ± 7.0	32.3 ± 4.2	30.1 ± 3.6	31.6 ± 5.0	35.1 ± 4.5	32.0 ± 2.6
Left	32.0 ± 6.7	33.7 ± 3.5	31.1 ± 3.8	32.4 ± 4.6	36.3 ± 4.0	34.1 ± 3.6
Ovary (mg)						
Right	40.4 ± 10.4	47.1 ± 5.1	44.0 ± 8.9	42.6 ± 6.1	46.3 ± 7.4	49.4 ± 6.3
Left	44.9 ± 8.7	48.9 ± 6.8	42.3 ± 8.5	49.3 ± 5.6	48.7 ± 9.9	45.9 ± 7.3
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.917 ± 0.074	0.901 ± 0.054	0.906 ± 0.081	0.911 ± 0.091	0.821 ± 0.048	0.803 ± 0.079
Liver (g%)	2.894 ± 0.165	2.957 ± 0.185	2.909 ± 0.200	2.746 ± 0.071	2.770 ± 0.231	2.603 ± 0.145
Heart (g%)	0.387 ± 0.036	0.394 ± 0.024	0.394 ± 0.031	0.380 ± 0.015	0.373 ± 0.025	0.366 ± 0.031
Lung (g%)	0.479 ± 0.018	0.479 ± 0.026	0.459 ± 0.027	0.464 ± 0.033	0.449 ± 0.036	0.427 ± 0.029
Spleen (g%)	0.220 ± 0.024	0.211 ± 0.029	0.216 ± 0.024	0.219 ± 0.035	0.200 ± 0.027	0.200 ± 0.026
Kidney (g%)						
Right	0.386 ± 0.023	0.413 ± 0.065	0.403 ± 0.027	0.404 ± 0.036	0.380 ± 0.028	0.369 ± 0.051
Left	0.373 ± 0.026	0.400 ± 0.054	0.404 ± 0.038	0.391 ± 0.027	0.373 ± 0.029	0.361 ± 0.036
Total	0.759 ± 0.049	0.809 ± 0.117	0.806 ± 0.061	0.794 ± 0.061	0.751 ± 0.057	0.730 ± 0.086
Pituitary gland (mg%)	5.509 ± 0.739	6.256 ± 0.666	6.030 ± 0.743	5.591 ± 0.667	5.796 ± 0.731	5.776 ± 0.795
Thymus (mg%)	259.450 ± 59.066	202.826 ± 20.734*	245.343 ± 36.397	234.583 ± 26.638	190.996 ± 33.102	164.603 ± 35.298
Thyroid (mg%)						
Right	4.026 ± 0.715	4.117 ± 0.651	4.039 ± 0.816	3.784 ± 0.954	3.666 ± 0.959	3.526 ± 0.540
Left	3.529 ± 0.819	3.497 ± 0.530	3.906 ± 0.485	3.577 ± 0.668	3.484 ± 0.704	3.769 ± 0.469
Adrenal (mg%)						
Right	15.346 ± 3.047	15.521 ± 2.148	14.877 ± 2.752	14.986 ± 2.234	14.790 ± 2.197	13.057 ± 1.457
Left	15.306 ± 3.110	16.216 ± 1.902	15.331 ± 2.592	15.361 ± 1.570	15.270 ± 2.042	13.917 ± 1.745
Ovary (mg%)						
Right	19.229 ± 4.269	22.633 ± 2.364	21.570 ± 4.482	20.331 ± 3.566	19.534 ± 3.683	20.031 ± 1.350
Left	21.540 ± 4.542	23.420 ± 2.818	20.763 ± 4.351	23.393 ± 2.214	20.320 ± 3.441	18.580 ± 2.216

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (**p* < 0.05)

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of Potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate on Bacteria

要約

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験ではS9 mix無添加試験および添加試験とも313~5000 μg /プレートの範囲で実施した。また、TA1535のS9 mix無添加試験では、2回の本試験の結果が異なったため、100~500 μg /プレートの範囲で再現性試験を実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の再現性および用量依存性のある増加は認められなかった。以上の結果から、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムは、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。

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、カリフォルニア大学の B.N. Ames 博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを、各菌株の特性確認は、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pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

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字型試験管に凍結した種菌を一定量接種し、37℃で約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〕

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムは、分子量380.47の淡灰白色粉末である。用いた被験物質は、ロット番号5501、純度89.2 wt%(不純物;水:約5%,無機塩:約2%および微量の異性体)であり、スガイ化学工業(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムは、局方注射用水(ロット番号:K6I94、(株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

〔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 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))
SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))
9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)
2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2および2AAはDMSO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は超純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9 mix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%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

*: WP2 *uvrA* 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、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。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
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	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
バクトアガー(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

3) S9 mix

1 mL中下記の成分を含む

S9**	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol

** :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されたS9(キッコマン株)を用いた。

〔試験方法〕

ブレインキューベーション法³¹により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間ブレインキューベーションしたのち、トップアガー2 mLを加えて混和し、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使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。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、溶媒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、本試験および再現性試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

〔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S9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、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、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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もの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムに

ついて50.0~5000 μ g/プレートの範囲で公比を約3として、試験を実施した。その結果、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験および添加試験とも5000 μ g/プレートとした。

〔本試験〕

S9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313~5000 μ g/プレートの範囲で公比を2として2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、TA1535のS9 mix無添加試験においては、本試験Iの313 μ g/プレートで、溶媒対照値の2倍となる変異コロニー数の増加を示した。その他の検定菌においては、2回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

〔再現性試験〕

TA1535のS9 mix無添加試験では、本試験Iの313 μ g/プレートで溶媒対照値の2倍となる変異コロニー数の増加が認められたため、再現性および用量依存性を確認するために、313 μ g/プレートを含む100~500 μ g/プレートの範囲で等差で5用量を設定して再現性試験を実施した(Table 3)。その結果、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムは、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。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York 1981, pp. 351-360.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1980, pp. 273-285.

Table 1. Mutagenicity of potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate on bacteria (I)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	106	92	107	8	7	10	24	33	28	39	26	24	7	7	6
		(102 \pm 8.4)			(8 \pm 1.5)			(28 \pm 4.5)			(30 \pm 8.1)			(7 \pm 0.6)		
	313	103	108	105	18	14	16	28	16	13	27	27	21	4	2	5
		(105 \pm 2.5)			(16 \pm 2.0)			(19 \pm 7.9)			(25 \pm 3.5)			(4 \pm 1.5)		
	625	97	89	103	10	6	11	21	20	16	30	22	20	7	2	6
		(96 \pm 7.0)			(9 \pm 2.6)			(19 \pm 2.6)			(24 \pm 5.3)			(5 \pm 2.6)		
	1250	112	89	100	14	10	5	11	18	16	29	30	21	9	9	10
	(100 \pm 11.5)			(10 \pm 4.5)			(15 \pm 3.6)			(27 \pm 4.9)			(9 \pm 0.6)			
S9 mix (+)	2500	111	102	85	8	11	11	13	21	12	35	26	38	5	3	4
		(99 \pm 13.2)			(10 \pm 1.7)			(15 \pm 4.9)			(33 \pm 6.2)			(4 \pm 1.0)		
	5000	81	100	92	4	7	4	19	18	18	33	26	22	6	10	3
		(91 \pm 9.5)			(5 \pm 1.7)			(18 \pm 0.6)			(27 \pm 5.6)			(6 \pm 3.5)		
S9 mix (+)	0	135	140	122	14	20	14	30	27	25	38	42	45	5	10	9
		(132 \pm 9.3)			(16 \pm 3.5)			(27 \pm 2.5)			(42 \pm 3.5)			(8 \pm 2.6)		
	313	141	117	100	8	13	11	19	37	32	30	31	30	6	6	8
		(119 \pm 20.6)			(11 \pm 2.5)			(29 \pm 9.3)			(30 \pm 0.6)			(7 \pm 1.2)		
	625	105	114	115	15	14	18	37	27	35	30	34	32	5	6	7
		(111 \pm 5.5)			(16 \pm 2.1)			(33 \pm 5.3)			(32 \pm 2.0)			(6 \pm 1.0)		
	1250	119	124	88	7	11	12	32	28	19	34	38	29	4	3	5
	(110 \pm 19.5)			(10 \pm 2.6)			(26 \pm 6.7)			(34 \pm 4.5)			(4 \pm 1.0)			
S9 mix (+)	2500	110	115	102	9	13	14	24	34	30	21	42	27	6	3	7
		(109 \pm 6.6)			(12 \pm 2.6)			(29 \pm 5.0)			(30 \pm 10.8)			(5 \pm 2.1)		
	5000	98	113	94	17	9	10	34	28	25	33	36	45	8	9	5
		(102 \pm 10.0)			(12 \pm 4.4)			(29 \pm 4.6)			(38 \pm 6.2)			(7 \pm 2.1)		
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	519	507	546	202	240	217	123	107	115	662	379	350	1161	1115	1192
		(524 \pm 20.0)			(220 \pm 19.1)			(115 \pm 8.0)			(464 \pm 172.4)			(1156 \pm 38.7)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	563	479	568	261	186	155	370	340	361	312	322	319	251	229	277
		(537 \pm 50.0)			(201 \pm 54.5)			(357 \pm 15.4)			(318 \pm 5.1)			(252 \pm 24.0)		

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 89.2 wt% and about 5% water, about 2% inorganic salts and slight amounts of isomers were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate on bacteria (II)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98		TA1537				
S9 mix (-)	0	85	75	80	15	9	9	17	20	20	25	19	23	6	9	6	
		(80 \pm 5.0)			(11 \pm 3.5)			(19 \pm 1.7)			(22 \pm 3.1)		(7 \pm 1.7)				
	313	68	100	80	18	8	17	19	28	30	35	24	19	5	7	10	
		(83 \pm 16.2)			(14 \pm 5.5)			(26 \pm 5.9)			(26 \pm 8.2)		(7 \pm 2.5)				
	625	94	93	92	7	7	6	20	19	26	34	24	16	5	6	7	
		(93 \pm 1.0)			(7 \pm 0.6)			(22 \pm 3.8)			(25 \pm 9.0)		(6 \pm 1.0)				
	1250	89	82	78	10	19	9	30	24	20	26	21	16	7	3	7	
		(83 \pm 5.6)			(13 \pm 5.5)			(25 \pm 5.0)			(21 \pm 5.0)		(6 \pm 2.3)				
2500	58	89	84	12	18	11	19	18	18	25	14	24	7	7	7		
	(77 \pm 16.6)			(14 \pm 3.8)			(18 \pm 0.6)			(21 \pm 6.1)		(7 \pm 0.0)					
5000	88	87	92	6	6	15	21	31	23	23	15	26	5	7	7		
	(89 \pm 2.6)			(9 \pm 5.2)			(25 \pm 5.3)			(21 \pm 5.7)		(6 \pm 1.2)					
S9 mix (+)	0	117	127	107	19	9	15	29	23	32	43	30	30	9	7	13	
		(117 \pm 10.0)			(14 \pm 5.0)			(28 \pm 4.6)			(34 \pm 7.5)		(10 \pm 3.1)				
	313	118	111	89	15	12	13	27	24	25	30	28	30	7	8	11	
		(106 \pm 15.1)			(13 \pm 1.5)			(25 \pm 1.5)			(29 \pm 1.2)		(9 \pm 2.1)				
	625	123	116	128	13	8	13	20	20	22	28	25	39	7	7	12	
		(122 \pm 6.0)			(11 \pm 2.9)			(21 \pm 1.2)			(31 \pm 7.4)		(9 \pm 2.9)				
	1250	113	98	85	10	9	8	17	26	10	35	30	32	7	10	5	
		(99 \pm 14.0)			(9 \pm 1.0)			(18 \pm 8.0)			(32 \pm 2.5)		(7 \pm 2.5)				
2500	114	99	97	15	13	12	25	26	23	15	24	33	7	11	9		
	(103 \pm 9.3)			(13 \pm 1.5)			(25 \pm 1.5)			(24 \pm 9.0)		(9 \pm 2.0)					
5000	119	94	82	12	11	21	19	20	19	23	22	33	13	11	6		
	(98 \pm 18.9)			(15 \pm 5.5)			(19 \pm 0.6)			(26 \pm 6.1)		(10 \pm 3.6)					
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2		9AA				
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1		80				
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	476	432	405	385	366	416	75	78	82	391	352	375	1139	1101	938	
		(438 \pm 35.8)			(389 \pm 25.2)			(78 \pm 3.5)			(373 \pm 19.6)		(1059 \pm 106.8)				
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		2AA				
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5		2				
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	349	450	420	221	224	232	238	210	296	195	267	277	181	201	140	
		(406 \pm 51.9)			(226 \pm 5.7)			(248 \pm 43.9)			(246 \pm 44.7)		(174 \pm 31.1)				

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 89.2 wt% and about 5% water, about 2% inorganic salts and slight amounts of isomers were contained as impurities.

Table 3. Confirmation of mutagenicity of potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate 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					
			TA1535				
S9 mix (-)	0		16 22 18 (19 \pm 3.1)				
	100		19 19 13 (17 \pm 3.5)				
	200		15 8 14 (12 \pm 3.8)				
	300		20 15 19 (18 \pm 2.6)				
	400		18 12 9 (13 \pm 4.6)				
	500		16 10 23 (16 \pm 6.5)				
Positive control	Chemical		SA				
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.5				
S9 mix(-)	Number of colonies/plate		499 491 505 (498 \pm 7.0)				

SA: Sodium azide

Purity was 89.2 wt% and about 5% water, about 2% inorganic salts and slight amounts of isomers were contained as impurities.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 川上久美子,
堀谷尚古
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kumiko Kawakami,
Naoko Horiya
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,
Japan
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの 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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of Potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)、短時間処理(6時間)ともに3.8 mg/mL(10 mmol/L)の濃度においても50%を越える細胞増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において3.8 mg/mLを最高処理濃度とし、連続処理およびS9 mixの非存在下での短時間処理では公比2で3濃度を、S9 mixの存在下では公比2で4濃度を設定した。連続処理では、24時間および48時間処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、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。染色体分析が可能な最高処理濃度は、3.8 mg/mL(10 mmol/L)であったことから、この濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、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。

以上の結果より、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

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細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS:Filtron)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU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°CのCO₂インキュ

ベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム(ロット番号:5501, スガイ化学工業(株))は、淡灰白色粉末で、水に対して50 mg/mL以上で溶解し、DMSOおよびアセトンでは50 mg/mLで不溶の水溶性で、分子量380.47、純度89.2 wt%(不純物として水分約5%、無機塩約2%および微量の異性体を含む)の物質である。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(ロット番号:K6G92, (株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に懸濁して原液を調製し、ついで原液を溶媒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 vol%になるように加えた。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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。被験物質のCHL/IU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、被験物質処理群の溶媒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、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

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、連続処理、短時間処理ともに3.8 mg/mL(10 mmol/L)とし、連続処理およびS9 mixの非存在下での短時間処理では公比2で3濃度(0.95, 1.9, 3.8 mg/mL)、S9 mixの存在下での短時間処理においては公比2で4濃度(0.48, 0.95, 1.9, 3.8 mg/mL)を設定した。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発す

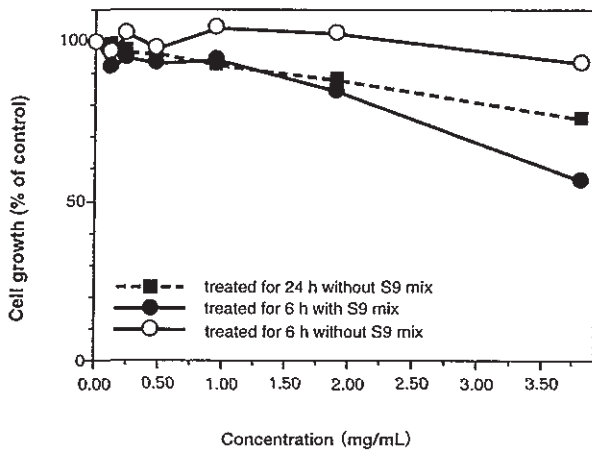


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate

ることが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

8. 染色体標本作製法

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た。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2), すべての系列において、最高処理濃度で観察可能だったことから、染色体分析では、最高処理濃度(3.8 mg/mL)を含む3処理濃度を観察対象とした。

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、4名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。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、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した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒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、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²⁾により、有意差検定を実施した(p<0.01)。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾(p<0.01)を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、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。

従って、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

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, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp: 218-223.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with potassium 7-hydroxy-1, 3-naphthalenedisulfonate (PHNS)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³	No. of cells			Trend test ⁵	Concurrent cytotoxicity ⁶ (%)	Mitotic index ⁷ (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid ⁴ TA (%)	(%)			
Non-treatment			200	2	3	0	0	0	0	0	5	1	5 (2.5)	3 (1.5)	0.76**	—	—
Solvent ¹	0	24	200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	100.0	—	
PHNS	0.95	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00	104.0	—	
PHNS	1.9	24	200	1	4	1	1	1	0	8	0	8 (4.0)	7 (3.5)	0.25	—	—	
PHNS	3.8	24	200	2	1	1	0	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.13	109.0	4.6	
MC	0.00005	24	200	7	40	54	0	1	0	102	2	72*(36.0)	67*(33.5)	0.00	—	—	
Solvent ¹	0	48	200	0	2	0	0	0	10	12	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.88	100.0	—	
PHNS	0.95	48	200	0	0	1	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.63	102.5	—	
PHNS	1.9	48	200	1	1	0	1	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.63	—	—	
PHNS	3.8	48	200	2	0	1	0	1	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.88	112.0	3.1	
MC	0.00005	48	200	4	35	68	5	1	0	113	5	80*(40.0)	76*(38.0)	1.13	—	—	

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), 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) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine 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) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7) Number of metaphase per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. 8) Seven hundreds and eighty-eight cells were analysed. *:Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact test. **:Purity was 89.2 wt%. Water (about 5%), inorganic salts (about 2%) and slight amount of isomers were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with potassium 7-hydroxy-1, 3-naphthalenedisulfonate (PHNS)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³	No. of cells			Trend test ⁵	Concurrent cytotoxicity ⁶ (%)	Mitotic index ⁷ (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid ⁴ TA (%)	(%)			
Non-treatment				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	—	—	
Solvent ¹	0	-	6-(18)	200	1	0	0	2	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00	100.0	—	
PHNS	0.95	-	6-(18)	200	0	3	0	2	0	0	5	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00	105.0	—	
PHNS	1.9	-	6-(18)	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13	—	—	
PHNS	3.8	-	6-(18)	200	2	2	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.25	116.0	4.2	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	—	—	
Solvent ¹	0	+	6-(18)	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	100.0	—	
PHNS	0.95	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	96.0	—	
PHNS	1.9	+	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	—	—	
PHNS	3.8	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	67.5	6.1	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	13	14	7	2	0	0	36	0	31*(15.5)	20*(10.0)	0.13	—	—	

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), 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) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine 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) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7) Number of metaphase per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. *:Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact test. **:Purity was 89.2 wt%. Water (about 5%), inorganic salts (about 2%) and slight amount of isomers were contained as impurities.

連絡先

試験責任者：田中憲穂

試験担当者：日下部博一，佐々木澄志，若栗 忍，
中川ゆづき，渡辺美香，橋本恵子

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)

Hirokazu Kusakabe, Kiyoshi Sasaki,

Shinobu Wakuri, Yuzuki Nakagawa,

Mika Watanabe, Keiko Hashimoto

Hatano Research Institute, Food and Drug

Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

