

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナト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 Sodium 3-nitrobenzenesulfonate in Rats

要約

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用いて実施した。投与量は、雌雄とも0(溶媒対照群)、100、300および1000 mg/kgとした。雌雄とも溶媒対照群および1000 mg/kg投与群では1群10匹、100および300 mg/kg投与群では1群5匹を使用し、このうち溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の雌雄各5匹について14日間の回復試験を行った結果、以下の成績を得た。

投与期間中および回復試験期間中に、いずれの投与群においても死亡例は認められなかった。

一般状態の変化として、1000 mg/kg投与群の雄で7例、雌で全例の投与直後に一過性の流涎がみられたが、翌日の投与前症状観察までには回復した。資料調査(データベース:Material Safety Data Sheets-OHS/1996Q1およびRTECS-1996/Q3)により、この流涎は被験物質の刺激性によるものと判断した。

体重および摂餌量については、溶媒対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。また、尿検査、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査においても被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

以上の結果から、3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの1000 mg/kg投与群で、被験物質投与による影響は、流涎のみであった。したがって、3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)における無影響量は、雌雄とも300 mg/kgであると判断した。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製

被験物質として、小西化学工業(株)より提供された3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム〔ロット番号:K0116, 性状:白色粉末, 純度:98.8 wt%〕を用い、入手後、室温にて保管した。

被験物質を20%(w/v)の濃度になるよう日本薬局方注射用水〔製造番号:9510AH, 光製薬(株)〕に溶解し、さらに、この20%溶液を6および2%(w/v)の濃度に段階希釈した後、プラスチック容器に分注し、投与時まで冷暗所で保管した。調製された検体は調製後8日以内に使用した。なお、調製検体の安定性試験および含量試験を实

施した結果、0.2および20%(w/v)日本薬局方注射用水溶液の被験物質は、冷暗所で10日間は安定であり、また、初回に調製した投与検体中の被験物質の平均含量は、所定濃度の103~105%であることが確認された。

2. 動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄のSprague-Dawley系ラット〔Crj:CD(SD);SPF;日本チャールス・リバー(株)〕を6日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各30匹を試験に供した。動物は、全飼育期間を通じて、温度24.0~24.7℃、湿度50~65%、換気回数約15回/時間、照明時間12時間(7~19時点灯)に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

3. 群および群分け

投与量は、本試験開始前に予備試験として秦野研究所で実施した3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムのラットにおける7日間反復経口投与毒性試験の成績を参考にして決定した。即ち、雄のSprague-Dawley系ラットに3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを100、300および1000 mg/kgの用量で7日間反復投与した結果、死亡例はなく、投与直後に一過性の流涎が観察されたほかには一般状態に変化が認められなかった。また、投与第7日の翌日に行った剖検においても、被験物質投与に起因すると考えられる異常所見は認められなかった。従って、本試験では、化審法ガイドライン「[ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験]」に従って、雌雄とも最高投与用量を1000 mg/kgとし、以下公比約3で除し、中および低用量には300および100 mg/kg投与群を設定した。なお、雌雄とも溶媒対照群には日本薬局方注射用水のみを経口投与した。

群分けは、検疫期間中に異常のない動物の中から、投与開始前日の体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法により行った。動物数は、溶媒対照群および1000 mg/kg投与群では、雌雄各群10匹とし、100および300 mg/kg投与群では、各5匹の動物を用いた。また、溶媒対照群および1000 mg/kg投与群では、各群5匹を投与期間終了後、14日間の回復試験に用いた。

4. 投与方法

投与経路は、化審法ガイドライン「[ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験]」に従い経口投与とした。

投与は、1日1回、28日間、毎日9時～12時の間に、ラット用胃管を用いて強制的に行い、投与量は、雌雄とも5 mL/kgとして、各投与時に最も近い時点で測定された体重に基づいて個別に算出した。

5. 検査項目

1) 一般状態の観察

投与期間および回復試験期間を通じて、毎日、死亡例の有無を調べた。また、全例について、一般状態を投与期間中は毎日、投与前および投与後の1日2回(回復試験期間中は1回)観察した。

2) 体重および摂餌量の測定

投与開始週では、投与開始直前と投与第4日、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、全例について1週に2回の頻度で体重を測定し、投与期間あるいは回復試験期間終了日および剖検日にも体重の測定を行った。また、投与開始週では、投与開始日に、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、全例について1週に1回の頻度で1日当たりの摂餌量の測定を行った。

3) 尿検査

投与期間終了週(投与第23日)に各群とも動物番号の若い方から5匹を選出し、また、回復試験期間終了週(回復第10日)には回復試験を行った動物全例を、いずれも約24時間代謝ケージに収容して採尿し、尿量〔天秤で計量(尿重量を比重で除す)〕、色調および混濁(視診)、比重〔重量法(単位体積あたりの重量を測定)、使用天秤(AE200, メトラー)〕について検査した。なお、pH、潜血、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣の検査は、代謝ケージに収容して4時間以内に採取した尿について、試験紙法(マルティスティックス/クリニテック200, バイエル三共)および鏡検(光学顕微鏡)によって実施した。

4) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検に先立ち、全例について、18ないし24時間絶食させたのち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter(Model S-PLUS IV, コールターエレクトロニクス)により赤血球数(電気抵抗法)、白血球数(電気抵抗法)、血色素量(吸光度法)、平均赤血球容積(電気抵抗法)、および血小板数(電気抵抗法)を測定し、これらを基に平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度およびヘマトクリット値を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-giemsa染色)、網状赤血球比率(Brecher法)およびハイイツ小体比率(メチルバイオレット染色による超生体染色)を求めた。なお、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定は、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液を用いて、光散乱検出法(CA-3000, 東亜医用電子㈱)により実施した。また、解剖時に摘出された大腿骨髄の塗抹標本を作成し

て、Wright-Giemsa染色を施し、骨髄像を光学顕微鏡で検査した。

5) 血液生化学検査

前述の血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、それぞれ血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシュ)により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD-DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ-G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼGLDH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(パラニトロフェニルリン酸基質法)、GOT活性(SSCC法)、GPT活性(SSCC法)、LDH活性(Wröblewski-La Due法)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、トリグリセライド濃度(GPO-DAOS法)、 γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、A/G比(総蛋白濃度およびアルブミン濃度より算出)を測定した。なお、メトヘモグロビンの測定は、投与期間終了剖検時の溶媒対照群および高用量群のみ、可視紫外分光光度計(UVIDEC-610C型, 日本分光㈱)により、松原らの方法¹⁾で測定した。また、全自動電解質分析装置(EA05, A&T)により、ナトリウム濃度(イオン電極法)、カリウム濃度(イオン電極法)、塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

6) 病理学検査

前述の採血に引き続き、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣または卵巣の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、脊髄、下垂体、眼球、ハーダー腺、甲状腺(上皮小体を含む)、顎下腺(舌下腺を含む)、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、精巣または卵巣、精囊腺、膀胱、前立腺、骨髄(大腿骨)、坐骨神経、骨格筋(下腿部)および病変部については、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン液(pH 7.2)で固定した。病理組織学検査は、投与期間終了時剖検動物のうち1000 mg/kg投与群および溶媒対照群の脳、脊髄、心臓、大腿骨骨髄、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、坐骨神経、胃および卵巣について、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して実施した。また、投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検時に、肉眼的に異常が認められた動物の病変部についても実施した。

1000 mg/kg投与群の回復期間終了時剖検動物の雄1例では投与期間終了週に行った尿検査において、強い潜血反応が認められたため、この動物の腎臓および膀胱の病理組織学検査を実施した。

6. 統計処理法

体重、摂餌量、尿検査(尿量、比重)、血液学検査、血

液生化学検査ならびに器官重量で得られた値をもとにして、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群の構成が溶媒対照群を含め3群以上ある場合は、Bartlettの方法による分散の一樣性の検定(有意水準:5%)を行い、ついで、分散が一樣な場合は、一元配置型の分散分析を行い、有意(有意水準:5%)の時はDunnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。一方、分散が一樣でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意(有意水準:5%)ならばDunnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。また試験群が溶媒対照を含め2群となる場合には、溶媒対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は、等分散であればStudentのt検定、不等分散であればAspin-Welchのt検定を行った。さらに、病理組織所見については、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定により、また、陽性グレードの合計値は、Fisherの直接確率の片側検定により、溶媒対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。

結果

1. 一般状態(Table 1)

一般状態の変化として、投与期間中には、1000 mg/kg投与群の雄7例、雌全例で、投与直後に流涎がみられたが、翌日の投与前症状観察時には回復していた。一方、皮膚に痂皮または脱毛が溶媒対照群の雄4例、雌1例、300 mg/kg投与群の雄1例ならびに1000 mg/kg投与群の雌雄各2例で、眼球突出が溶媒対照群の雌1例でみられたが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。

回復試験期間中には、投与期間中に痂皮や脱毛が認められた動物と同じ例で、痂皮または脱毛が、溶媒対照群の雄1例、1000 mg/kg投与群の雄2例にみられたが、いずれも、この系統のラットでは頻繁にみられ、被験物質に起因した変化ではないと判断した。

2. 体重(Fig. 1)

投与期間および回復試験期間を通じて、雌雄ともに溶媒対照群と被験物質投与群の間で平均体重に有意差は認められなかった。

3. 摂餌量(Fig. 2)

投与期間および回復試験期間を通じて、雌雄共に溶媒対照群と被験物質投与群の平均摂餌量には有意差が認められなかった。

4. 尿検査(Table 2, 3)

投与期間終了週の検査では、1000 mg/kg投与群の雄1例で、潜血反応が強い陽性を示した。この1例は、回復試験期間終了週の検査では潜血反応が消失した。また、この例については、腎臓および膀胱の病理組織学検査を行ったが、腎臓の皮質に好塩基性尿管がみられたのみであった。膀胱には病理学検査で変化は認められなかつ

た。

その他、蛋白、ビリルビン、ケトン体およびウロビリノーゲンが陽性または疑陽性となる例があり、尿沈渣中に上皮細胞、白血球または結晶が観察される例もあったが、いずれも、その出現頻度あるいは程度に用量依存性は認められなかった。なお、その他の検査項目については、溶媒対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

回復試験期間終了週の検査では、1000 mg/kg投与群の雄1例で潜血が陽性を示した。また、溶媒対照群の雄1例、1000 mg/kg投与群の雄4例でケトン体が陽性または疑陽性を示した。その他の検査項目については、溶媒対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

5. 血液学検査(Table 4, 5)

投与期間終了時の血液学検査では、100 mg/kg投与群の雄で、ヘマトクリット値および白血球数の有意な減少が、300 mg/kg投与群の雄で、ヘマトクリット値、白血球数および血小板数の有意な減少が、1000 mg/kg投与群の雄で、ヘマトクリット値の有意な減少が認められた。回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雌で白血球数の有意な増加と活性部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮が認められた。

投与期間終了時の骨髓像検査では、100 mg/kg投与群の雄で骨髓芽球および赤芽球系細胞の有意な増加ならびに、好中性骨髓球、好中球、好塩基球、顆粒系細胞およびM/E比の有意な減少が、100 mg/kg投与群の雌で好中性骨髓球の有意な減少が、300 mg/kg投与群の雄で好中性骨髓球および好中球の有意な減少が、300 mg/kg投与群の雌で好中性骨髓球の有意な減少ならびに、前赤芽球の有意な増加が、1000 mg/kg投与群の雄で好中性骨髓球、好中球、好塩基球、顆粒系細胞およびM/E比の有意な減少がみられた。

回復試験期間終了時の骨髓像検査では、1000 mg/kg投与群の雌で前骨髓芽球の有意な増加および好酸球の有意な減少がみられた。

投与期間終了時の血液学検査では、ハイツツ小体の変化はみられなかったため、回復試験期間終了時の検査は行わなかった。その他の検査項目については、溶媒対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

6. 血液生化学検査(Table 6)

投与期間終了時の血液生化学検査では、100 mg/kg投与群の雄で塩素濃度の有意な上昇が、300 mg/kg投与群の雄でナトリウム濃度および塩素濃度の有意な上昇ならびにカリウム濃度の有意な低下がみられた。100ならびに300 mg/kg投与群の雌では、ナトリウム濃度および塩素濃度の有意な低下がみられたが、1000 mg/kg投与群の雌雄とも、血液生化学検査項目には被験物質投与の影響は認められなかった。メトヘモグロビン濃度は、溶媒対照群で1.6~1.8%であったが、1000 mg/kg投与群では雌雄とも1.4%であり、雌では統計学的に有意差があ

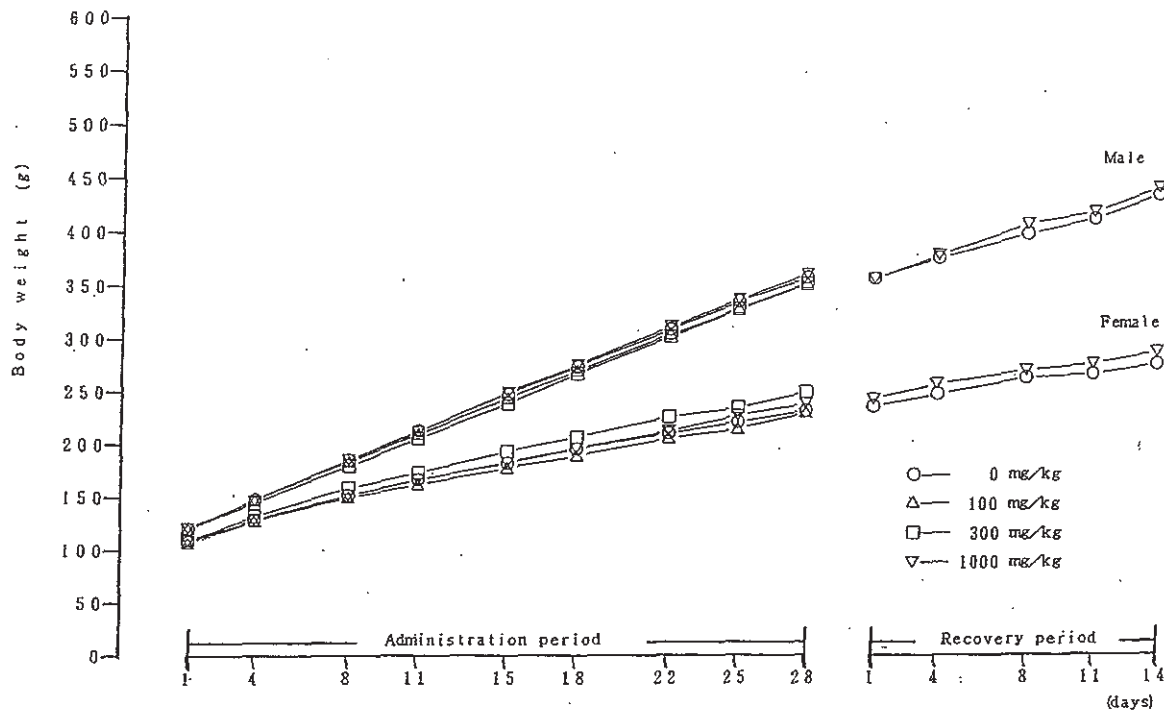


Fig. 1 Body weight changes of rats treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate in 28 day repeat dose oral toxicity test

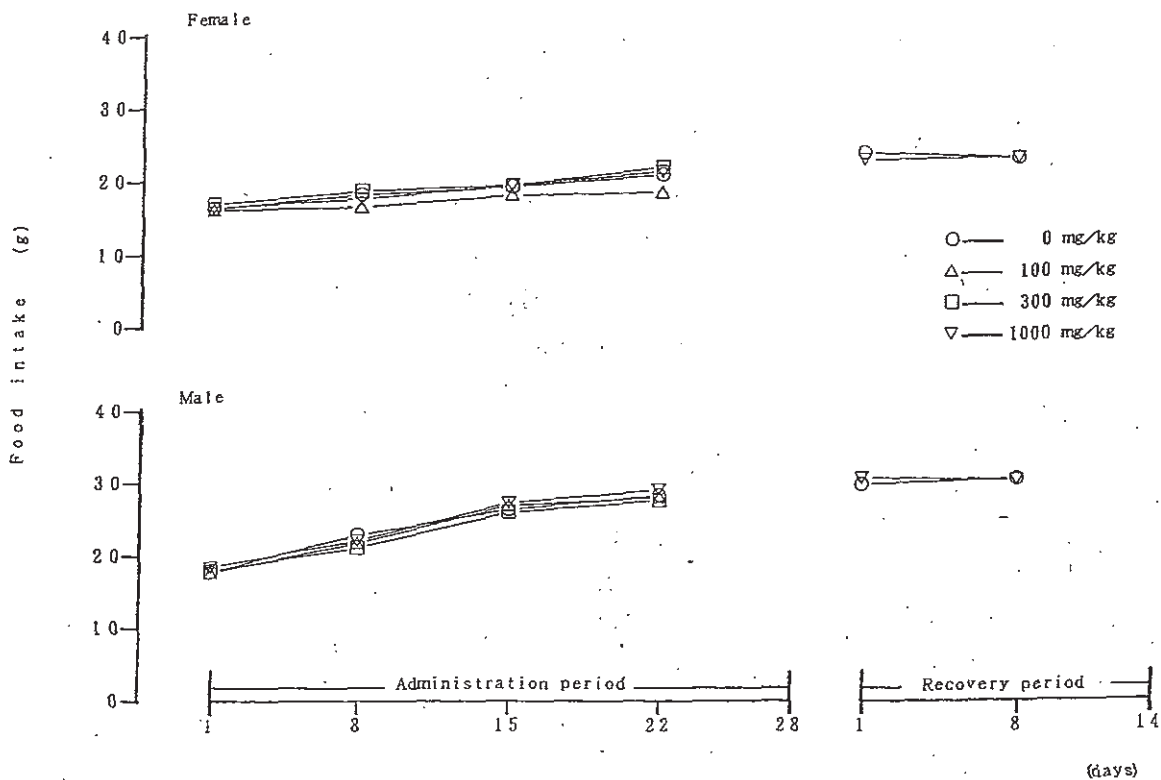


Fig. 2 Food intake of rats treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate in 28 day repeat dose oral toxicity test

った。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雄で総蛋白濃度の有意な低下およびナトリウム濃度の上昇がみられた。

その他の検査項目では、溶媒対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。

7. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 7)

投与期間終了時剖検例では、溶媒対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 剖検所見

投与期間終了時剖検では、下顎リンパ節の腫大が溶媒対照群の雄1例で、肺では暗赤色点または褐色点が溶媒対照群の雌2例、300および1000 mg/kg投与群の雄各1例で、胸壁との癒着が300 mg/kg投与群の雌1例で、腎臓では腎盂の拡張が100および1000 mg/kg投与群の雄各1例で、陥凹部が100 mg/kg投与群の雄1例で、腫大が1000 mg/kg投与群の雄1例で、肝臓では淡色領域が1000 mg/kg投与群の雌雄各1例で観察された。また、眼球の赤色点が溶媒対照群の雄1例で、皮膚の脱毛または貧毛が溶媒対照群の雄1例で、痂皮が溶媒対照群の雌2例および雄1例で、胃の境界線の肥厚が1000 mg/kg投与群の雌1例でそれぞれみられたが、いずれの所見も同系統のラットに散見される所見であることから、被験物質投与に起因する変化ではないと判断した。

回復試験期間終了時の剖検では、肺の褐色点が1000 mg/kg投与群の雄1例で、胸壁との癒着が溶媒対照群の雌1例で、腎臓では尿細管像の明瞭化が1000 mg/kg投与群の雄1例で、嚢胞が溶媒対照群の雄1例で、肝臓の小葉像明瞭化が1000 mg/kg投与群の雌1例で、皮膚の脱毛が1000 mg/kg投与群の雄1例で、痂皮が1000 mg/kg投与群の雄2例で、副腎の白色点散在が1000 mg/kg投与群の雌1例で、子宮腔の拡張が溶媒対照群の雌2例で観察されたが、いずれの所見も同系統のラットに散見されることから、被験物質投与に起因すると考えられる明らかな変化ではないと判断した。

3) 病理組織学所見

投与期間終了時剖検例のうち、溶媒対照群と1000 mg/kg投与群の病理組織学検査では、肝臓で門脈周囲性の脂肪化が両群の雌雄全例で、脾臓では髓外造血が両群の雌雄全例で、褐色色素沈着が両群の雌の全例で、腎臓では皮質に好塩基性尿細管が両群の雄全例および雌各3例で、eosinophilic bodyが溶媒対照群の雄1例、1000 mg/kg投与群の雌2例で、嚢胞が1000 mg/kg投与群の雄1例で、腎盂の拡張が1000 mg/kg投与群の雄1例で、皮髓境界部鉍質沈着が溶媒対照群の雌1例でみられた。胃では、漿膜および筋層に好酸球および大食細胞のごく軽度の浸潤が1000 mg/kg投与群の雄1例でみられたが、1000 mg/kg投与群の他の雄には異常がなく、1000 mg/kg投与群の雌にも異常は認められなかった。その

他、脳、脊髄、心臓、副腎、坐骨神経および大腿骨骨髓には異常はなく、いずれの病理組織学所見にも統計学的有意差は認められなかった。

投与期間終了時剖検例において肉眼的に異常がみられた動物のうち、下顎リンパ節の腫大がみられた溶媒対照群の雄1例では病理組織学検査の結果、下顎リンパ節における形質細胞の過形成が認められ、肉眼的に肺の暗赤色または褐色点が認められた動物のうち溶媒対照群の雌1例ならびに300および1000 mg/kg投与群の雄それぞれ1例では肺の出血が、肺と胸壁の癒着がみられた300 mg/kg投与群の雌では胸膜の線維化および炎症が認められた。腎盂の拡張がみられた100 mg/kg投与群の雄1例および1000 mg/kg投与群の雄1例(前述)では、いずれも組織学的にも腎盂の拡張が確認され、好塩基性尿細管も認められたがその他に異常はなかった。また肉眼的に腎臓に陥凹部がみられた100 mg/kg投与群の雄1例、腎臓の腫大がみられた1000 mg/kg投与群の雄1例の腎臓には、いずれも皮質の好塩基性尿細管が認められたがその他に異常はなかった。また、肝臓に淡色領域がみられた1000 mg/kg投与群の雌雄各1例では、門脈周囲性脂肪化が認められたのみであった。眼球の赤色点がみられた溶媒対照群の雄1例では角膜血管新生が認められ、皮膚では肉眼的に痂皮がみられた溶媒対照群の雌1例、雄2例で、潰瘍ならびに痂皮および炎症が認められた。

回復試験期間終了時剖検例のうち肉眼的に異常がみられた動物では、肺の褐色点が認められた1000 mg/kg投与群の雄1例では肺の出血が、肺と胸壁の癒着がみられた溶媒対照群の雌1例では胸膜の線維化が認められた。腎臓の尿細管像の明瞭化がみられた1000 mg/kg投与群の雄1例ではeosinophilic bodyが認められた。腎臓の嚢胞がみられた溶媒対照群の雄1例では、組織学的にも腎臓の嚢胞が確認されたほか、皮質の好塩基性尿細管とeosinophilic bodyが認められた。肝臓で小葉像が明瞭にみられた1000 mg/kg投与群の雌1例では門脈周囲性脂肪化が、副腎で白色点の散在がみられた1000 mg/kg投与群の雌1例では限局性の球状帯の脂肪滴の増加がみられた。子宮腔の拡張がみられた溶媒対照群の雌1例では病理組織学検査において子宮腔の拡張であることが確認された。また、肉眼的に痂皮がみられた1000 mg/kg投与群の雄2例では、いずれも潰瘍ならびに炎症が認められた。

考察

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの100、300および1000 mg/kgを、雌雄のSprague-Dawley系〔Crj:CD(SD)〕ラットに1日1回、28日間にわたって反復経口投与した。その結果、一般状態の変化としては、1000 mg/kg投与群の雌雄の多数例で、投与直後に一過性の流涎がみられたが、翌日の投与前症状観察時には回復していた。被験物質には眼および皮膚に対する弱い刺激性が存在することが報告されているため〔資料調査(データベース:Material Safety Data Sheets-OHS/

1996Q1およびRTECS-1996/Q3)による], 本試験でみられた流涎は, 被験物質の刺激性による反応であると推測される。

尿検査では, 投与期間終了週の検査で, 1000 mg/kg 投与群の雄1例で, 強い潜血反応陽性が認められた。同例の腎臓皮質には好塩基性尿細管がみられたが, 変化の程度はごく軽微であり, 病理組織学検査を行ったほとんどの雄にも認められる所見であることから, 被験物質による影響ではないと判断した。この他, 本例の膀胱には異常がみられなかったため, この潜血の原因を明確にすることはできなかった。また, 回復試験期間終了週の検査では, 1000 mg/kg 投与群の雄4例で, ケトン体が陽性または疑陽性を示したが, 投与期間終了週の検査では認められず, 偶発的なものと判断した。

被験物質の構造類似化合物であるニトロベンゼン, 貧血, およびメトヘモグロビン血症を起こすことが知られているため²⁾, メトヘモグロビンの測定およびハインツ小体の観察を実施したが, 1000 mg/kg 投与群の雌においてメトヘモグロビン濃度の低下が認められたのみであった。この変化は, その方向性から毒性学的意義は少ないものと判断した。その他, 血液学検査および血液生化学検査では, いくつかの項目で有意差が認められた。さらに, 雄のヘマトクリット値の低値は被験物質投与群の全てに溶媒対照群と比較して有意差が認められたが, 他の血液学検査項目には影響が認められないことから毒性学的意義は少ないと判断した。また, 骨髓像検査のM/E比で, 顆粒球系細胞の減少を疑わせる変化がみられ, 被験物質投与群において溶媒対照群と比較し, 有意な変化が認められたが, 病理組織学的には骨髓あるいは脾臓に造血障害を示唆する変化は認められないことから, 被験物質は本試験条件下では, 血液あるいは造血組織に影響を及ぼさないと判断した。

以上の結果から, 本試験条件下における3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの無影響量は雌雄とも300 mg/kgであると判断した。

文献

- 1) 松原高賢, “臨床検査マニュアル,” 北村元任他編, 文光堂, 東京, 1988, pp. 321-324.
- 2) 下武男, 小野寺博志, 松島裕子ら, 衛生試験所報告, 112, 71(1994).

連絡先

試験責任者: 大原直樹

試験担当者: 原田知子, 今野和則,
加藤博康, 小島幸一,
稲田浩子, 安生孝子,
畔上二郎, 関 剛幸,
吉村慎介, 三枝克彦

(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: Naoki Ohara (Study Director)

Tomoko Harada, Kazunori Konno,
Hiroyasu Katoh, Kohichi Kojima,
Hiroko Inada, Takako Anjo,
Jiro Azegami, Takayuki Seki,

Sinsuke Yoshimura, Katsuhiko Saegusa

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

Table 1 Summary of clinical findings in rats treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate in 28 day repeat dose oral toxicity test

Clinical signs	Group (mg/kg)	Sex	Number of animals*	Number of animals with clinical signs						
				— Days of administration period —				— Days of recovery period —		— Total —
				1-7	8-14	15-21	22-29	1-7	8-15	
Transient salivation immediately after administration	0	Male	10 (5)	0	0	0	0	0	0	0
	100		5 (0)	0	0	0	0			0
	300		5 (0)	0	0	0	0			0
	1000		10 (5)	7	4	5	4	0	0	7
	0	Female	10 (5)	0	0	0	0	0	0	0
	100		5 (0)	0	0	0	0			0
	300		5 (0)	0	0	0	0			0
	1000		10 (5)	6	5	6	3	0	0	10
Crust/Loss of fur	0	Male	10 (5)	0	2	2	4	1	0	4
	100		5 (0)	0	0	0	0			0
	300		5 (0)	0	1	0	0			1
	1000		10 (5)	0	1	2	2	2	2	2
	0	Female	10 (5)	0	0	0	1	0	0	1
	100		5 (0)	0	0	0	0			0
	300		5 (0)	0	0	0	0			0
	1000		10 (5)	0	2	2	0	0	0	2
Exophthalmos	0	Female	10 (5)	1	1	1	1	0	0	1
	100		5 (0)	0	0	0	0			0
	300		5 (0)	0	0	0	0			0
	1000		10 (5)	0	0	0	0	0	0	0

*, Parenthesis indicate number of animals in recovery period

Table 2 Urinalysis in rats treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate in 28 day repeat dose oral toxicity test

Test period			Specific gravity	Color ^a		Turbidity ^a		pH					Protein ^a		Glucose ^a		Ketone ^a		Bilirubin ^a		Occult blood ^a		Urobilinogen ^a								
Sex	Group (mg/kg)	N		Volume (mL/24hr)	ly	y	-	+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	±	+	-	±	+	++	±	+			
					ly	y	-	+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	±	+	-	±	+	-	±	+	++	±	+
Administration																															
Male	0	5	19.2±4.4 ^a	1.054±0.007 ^a	5	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	1	1	2	2	0	5	5	0	0	5	0	0	0	5	0	
	100	5	18.4±2.6	1.053±0.004	5	0	0	5	0	0	0	0	0	2	2	1	0	3	2	0	5	5	0	0	5	0	0	0	5	0	
	300	5	16.6±2.6	1.053±0.009	5	0	0	5	0	0	2	1	2	0	0	0	0	4	1	5	4	1	0	5	0	0	0	0	4	1	
	1000	5	19.3±8.4	1.052±0.022	3	2	3	2	0	1	2	1	1	0	0	0	1	4	0	5	5	0	0	5	0	4	0	0	1	5	0
Female	0	5	12.0±5.8	1.041±0.008	5	0	3	2	1	0	0	1	3	0	0	4	0	0	1	5	5	0	0	4	1	5	0	0	0	4	1
	100	5	11.1±2.5	1.056±0.008	3	2	3	2	1	0	2	1	0	0	1	5	0	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	300	5	13.9±5.2	1.051±0.022	3	2	4	1	0	0	3	0	1	1	0	4	1	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	4	1
	1000	5	16.8±6.8	1.044±0.015	4	1	5	0	0	1	3	1	0	0	0	3	1	1	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0
Recovery																															
Male	0	5	20.2±7.9 ^a	1.060±0.016 ^a	4	1	3	2	0	0	0	4	0	1	0	0	1	4	0	5	4	1	0	5	0	5	0	0	0	4	1
	1000	5	28.6±11.4	1.050±0.014	4	1	4	1	0	0	2	2	1	0	0	0	1	4	0	5	1	1	3	5	0	4	0	1	0	5	0
Female	0	5	18.6±11.4	1.052±0.017	3	2	2	3	0	0	0	2	1	2	0	5	0	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	1000	5	19.1±5.8	1.045±0.010	5	0	3	2	0	0	0	2	2	0	1	5	0	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0

a) Mean±S.D. b) ly, Light yellow; y, Yellow c) -, Negative; ±, Trace; +, Slight; ++, Moderate
d) -, Negative; ±, Trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL e) -, Negative f) ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 3 Urinalysis (sediment) in rats treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate in 28 day repeat dose oral toxicity test

Test period			Red blood cell ^a		Crystal ^a		Cast ^a	White blood cell ^a		Epithelial cell ^a		
Sex	Group (mg/kg)	N	-	±	-	±	-	±	-	±		
			Administration									
Male	0	5	5		0	5	0	5	5	0	5	0
	100	5	5		0	5	0	5	5	0	5	0
	300	5	5		0	4	1	5	5	0	4	1
	1000	5	5		0	5	0	5	5	0	5	0
Female	0	5	5		2	3	0	5	5	0	0	5
	100	5	5		2	3	0	5	4	1	2	3
	300	5	5		0	4	1	5	5	0	4	1
	1000	5	5		0	5	0	5	5	0	5	0
Recovery												
Male	0	5	5		0	4	1	5	5	0	2	3
	1000	5	5		1	3	1	5	5	0	2	3
Female	0	5	5		1	4	0	5	5	0	3	2
	1000	5	5		1	3	1	5	5	0	2	3

a) -, Not observed; ±, 1-9 per 3 visual fields b) -, Not observed; ±, A few; +, Abundant

Table 5 Myelogram findings in rats treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate in 28 day repeat dose oral toxicity test

Cell types	Administration								Recovery			
	Male (N=5)				Female (N=5)				Male (N=5)		Female (N=5)	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Myeloblast	0.7 ± 0.5	1.9 ± 0.9*	1.7 ± 0.6	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.5	2.0 ± 0.6	2.8 ± 0.8	1.2 ± 1.0	2.4 ± 0.8	2.2 ± 0.5	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.5
Promyelocyte	1.8 ± 0.6	2.0 ± 0.6	2.3 ± 1.0	2.0 ± 0.6	1.5 ± 0.5	1.8 ± 0.7	2.7 ± 0.8	1.5 ± 0.9	3.3 ± 0.9	2.9 ± 1.2	2.0 ± 0.6	3.0 ± 0.7*
Neutrophilic myelocyte	6.2 ± 1.1	3.6 ± 0.7**	3.7 ± 1.3*	3.8 ± 1.5*	5.4 ± 1.2	3.6 ± 0.9*	2.9 ± 0.7**	4.2 ± 0.8	5.2 ± 1.2	4.7 ± 1.0	4.8 ± 1.0	3.8 ± 0.8
Neutrophilic metamyelocyte	12.4 ± 2.1	12.8 ± 3.0	14.1 ± 0.7	13.7 ± 1.8	13.7 ± 2.6	14.8 ± 3.1	11.0 ± 1.1	13.2 ± 1.4	11.9 ± 1.4	13.5 ± 2.6	13.0 ± 1.7	12.6 ± 1.2
Neutrophil	25.9 ± 3.7	17.6 ± 2.5**	19.1 ± 2.2**	17.6 ± 3.4**	22.2 ± 4.8	20.1 ± 3.2	16.9 ± 3.0	18.8 ± 5.3	21.7 ± 2.7	22.5 ± 3.4	22.5 ± 5.5	21.6 ± 3.1
Eosinophilic myelocyte	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.6	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.5	0.9 ± 0.6	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.2
Eosinophilic metamyelocyte	1.9 ± 1.5	1.7 ± 0.8	2.7 ± 1.1	2.0 ± 0.1	2.9 ± 1.1	2.7 ± 0.8	3.0 ± 1.3	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.7	1.8 ± 1.0	3.0 ± 0.5	3.0 ± 0.8
Eosinophil	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.5	0.7 ± 0.5	1.6 ± 0.5	0.8 ± 0.7	0.7 ± 0.7	0.9 ± 0.5	1.1 ± 0.7	1.3 ± 0.4	0.7 ± 0.2**
Basophil, all types	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.2*	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.2*	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2
Total granulocytic cell	50.8 ± 3.7	40.8 ± 3.6**	45.2 ± 3.3	41.9 ± 3.3**	49.0 ± 9.4	47.8 ± 4.1	41.2 ± 3.4	43.2 ± 6.5	48.4 ± 2.7	49.6 ± 3.9	49.7 ± 7.7	47.7 ± 4.0
Proerythroblast	0.4 ± 0.4	0.7 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.3**	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2
Basophilic erythroblast	5.0 ± 1.3	8.5 ± 2.5	6.3 ± 2.4	5.6 ± 1.7	4.6 ± 0.8	4.8 ± 1.6	7.2 ± 2.6	5.0 ± 3.6	9.0 ± 1.6	8.3 ± 1.4	4.4 ± 1.5	5.9 ± 2.3
Polychromatic erythroblast	12.6 ± 1.2	14.1 ± 2.9	12.8 ± 2.0	14.8 ± 0.7	13.0 ± 2.5	12.0 ± 2.6	13.2 ± 2.1	12.0 ± 1.6	12.2 ± 2.2	11.4 ± 1.7	11.0 ± 1.6	11.1 ± 2.7
Normoblast	9.5 ± 2.2	9.0 ± 2.4	9.1 ± 1.6	10.4 ± 3.6	6.6 ± 1.4	6.6 ± 1.0	8.5 ± 2.7	8.7 ± 2.5	7.8 ± 1.2	7.5 ± 1.7	8.7 ± 2.4	8.0 ± 2.5
Total erythrocytic cell	27.4 ± 2.8	32.5 ± 2.7*	28.3 ± 3.8	31.1 ± 2.4	24.4 ± 4.0	23.8 ± 4.0	29.7 ± 6.2	25.7 ± 4.8	29.3 ± 3.0	27.6 ± 3.9	24.3 ± 3.6	25.4 ± 3.0
Monocyte	1.1 ± 0.6	1.1 ± 0.3	1.7 ± 0.5	0.9 ± 0.4	1.7 ± 0.8	1.5 ± 0.5	1.9 ± 1.4	1.3 ± 1.0	1.8 ± 1.1	1.1 ± 0.4	1.9 ± 0.7	1.2 ± 1.4
Lymphocyte	20.3 ± 3.0	24.7 ± 2.4	24.1 ± 4.1	25.2 ± 3.2	23.7 ± 6.7	25.7 ± 5.1	26.2 ± 3.7	29.3 ± 9.6	19.6 ± 2.4	20.2 ± 3.2	23.4 ± 4.6	24.9 ± 5.3
Reticulum cell	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.5	0.5 ± 0.6	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.5	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.2
Plasma cell	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1
Megakaryocyte	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.2
Mast cell	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0
Myeloid/Erythroid	1.9 ± 0.3	1.3 ± 0.2**	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.2*	2.1 ± 0.7	2.1 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.4	2.1 ± 0.6	1.9 ± 0.3

Parameter, Mean ± S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, p < 0.05

**, Significantly different from 0 mg/kg, p < 0.01

Table 7 Absolute and relative organ weights in rats treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate in 28 day repeat dose oral toxicity test

Test period			Absolute					Relative					
Sex	Group	N	Body weight	Brain	Liver	Kidneys	Adrenal glands	Ovaries/ Testes	Brain	Liver	Kidneys	Adrenal glands	Ovaries/ Testes
	(mg/kg)		(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
Administration													
	0	5	329.5 ± 17.9	1890.5 ±46.6	11335.0 ± 688.1	2554.0 ± 135.6	49.9 ± 3.7	2787.2 ±160.0	5.753 ±0.405	34.442 ± 2.241	7.776 ±0.705	0.152 ±0.014	8.460 ±0.303
Male	100	5	318.8 ± 10.4	1901.7 ±74.8	10732.1 ±1183.8	2385.9 ± 220.9	51.8 ± 9.3	2801.4 ±239.9	5.974 ±0.380	33.604 ± 2.684	7.477 ±0.522	0.163 ±0.030	8.777 ±0.504
	300	5	317.5 ± 16.9	1886.7 ±47.1	10676.1 ± 716.5	2385.1 ± 72.5	48.8 ± 6.9	2727.6 ± 72.1	5.956 ±0.344	33.616 ± 0.932	7.525 ±0.352	0.154 ±0.017	8.603 ±0.322
	1000	5	336.1 ± 7.0	1857.6 ±37.4	11401.4 ± 200.7	2696.8 ± 122.3	46.1 ± 4.0	2893.6 ±138.0	5.529 ±0.172	33.929 ± 0.448	8.029 ±0.441	0.137 ±0.011	8.618 ±0.577
	0	5	211.4 ± 19.2	1773.1 ±14.6	6541.9 ± 657.1	1682.8 ± 155.9	63.3 ± 4.1	98.4 ± 12.4	8.440 ±0.713	30.963 ± 1.764	7.970 ±0.465	0.301 ±0.032	0.466 ±0.055
Female	100	5	209.3 ± 16.4	1750.6 ±93.4	7133.2 ±1143.8	1653.8 ± 96.4	65.6 ±10.5	80.4 ± 7.4	8.385 ±0.473	34.122 ± 5.384	7.933 ±0.698	0.314 ±0.050	0.386 ±0.049
	300	5	227.8 ± 11.2	1780.8 ±44.7	7195.0 ± 447.8	1793.9 ± 91.4	68.5 ± 5.2	91.8 ± 17.9	7.839 ±0.561	31.684 ± 3.156	7.880 ±0.308	0.302 ±0.033	0.405 ±0.091
	1000	5	214.0 ± 6.3	1792.0 ±39.2	6481.1 ± 775.0	1736.8 ± 110.4	60.4 ± 7.0	77.8 ± 14.5	8.379 ±0.214	30.250 ± 2.997	8.113 ±0.329	0.282 ±0.026	0.363 ±0.062
Recovery													
	0	5	400.1 ± 16.1	1960.7 ±25.6	12004.0 ± 475.0	2687.9 ± 206.5	57.0 ± 9.2	3177.5 ±168.0	4.907 ±0.190	30.026 ± 1.282	6.723 ±0.511	0.142 ±0.017	7.948 ±0.450
Male	1000	5	402.1 ± 24.1	1978.1 ±63.9	12315.8 ± 802.9	2759.5 ± 59.2	50.1 ± 4.9	3131.1 ±287.4	4.934 ±0.331	30.625 ± 0.382	6.881 ±0.394	0.125 ±0.013	7.780 ±0.343
	0	5	254.3 ± 24.1	1806.4 ±24.4	7095.5 ± 653.6	1849.0 ± 140.7	73.4 ± 3.1	93.7 ± 20.2	7.159 ±0.736	27.928 ± 1.164	7.290 ±0.428	0.291 ±0.030	0.368 ±0.063
Female	1000	5	261.2 ± 38.7	1831.5 ±41.4	7499.2 ±1443.0	1944.8 ± 219.1	66.4 ±10.5	84.7 ± 5.5	7.136 ±1.062	28.596 ± 1.702	7.501 ±0.733	0.255 ±0.026	0.328 ±0.035

Parameter, Mean±S.D.

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Sodium 3-nitrobenzenesulfonate on Bacteria

要約

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 μg /プレート濃度を設定して行った濃度設定試験では、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において生育阻害は認められず、いずれの濃度においても溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、本試験は、濃度設定試験と同じ濃度を用いて同様に行った。

試験の結果、濃度設定試験と同様、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められず、また、菌の生育阻害も認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムは、細菌に対し遺伝子突然変異を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および *E. coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その30 μL をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液は、濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

2. 被験物質

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(ロット番号 K0116, 小西化学工業(株)提供)は、淡黄色の粉末で、水に対しては20% (20℃) 溶解、ジメチルスルホキシド(DMSO)に易溶、アセトンに対しては難溶であり、分子式 $\text{C}_6\text{H}_4\text{NNaO}_3\text{S}$, 分子量225.15, 純度98.8% (不純物として、芒硝0.63%, 食塩0.04%, 水分0.86%, 3,3'-ジニトロジフェニルスルホン0.04%を含む)の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

3. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(株)大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

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))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9-AA : 9-アミノアクリジン(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO (株)同仁化学研究所)に、SA および 9-AA は蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解した。

5. 培地

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))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6%寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S.*

*typhimurium*用には0.5 mM D-ピオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液, *E. coli*用には0.5 mM レトリプトファン水溶液を1/10容加え, トップアガーとした。

6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームテスト用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し, 使用した。S9は, 誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

7. 試験方法

試験は, プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒, 被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL, 次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL, 代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え, 続いて試験菌液0.1 mLを分注し, 37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後, 45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは, 各濃度とも3枚を使用した。

8. 結果の判定

結果の判定は, 各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に, 以下の3基準を全て満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する(濃度依存性)。
- 3) 濃度設定試験および本試験の結果から, 復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

結果および考察

156~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定(公比2)して行った濃度設定試験(Table 1, 2)では, 直接法および代謝活性化法ともに, いずれの指標菌株においても溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められず, また, いずれの菌株においても被験物質による生育阻害は認められなかった。したがって, 本試験における被験物質の処理濃度は, 最高濃度を5000 μg /プレートとし, 以下公比2で2500, 1250, 625, 313および156 μg /プレートとした。

本試験の結果(Table 3, 4)は, 濃度設定試験と同様, 直接法および代謝活性化法のいずれの場合も, 供試した全ての菌株における復帰変異コロニー数は, 溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。また, いずれの菌株においても生育阻害は認められなかった。

以上の成績から, 本実験条件下では, 3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発性は陰性

と判定した。

なお, 類縁化合物である2-ニトロベンゼンスルホン酸, 3-ニトロベンゼンスルホン酸, 4-ニトロベンゼンスルホン酸の変異原性については, いずれも *S. typhimurium* TA98, TA100を用いた復帰突然変異試験で陰性³⁾と報告されている。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 3) 河合昭宏, 後藤純雄, 松本由美子, 松下秀鶴, 産業医学, 29, 34(1987).

連絡先

試験責任者: 野田 篤
 試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美
 (財)畜産生物科学安全研究所
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)
 Naomi Kon
 Research Institute for Animal Science in
 Biochemistry and Toxicology
 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi,
 kanagawa, 229-1132, Japan
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Results of reverse mutation test of sodium 3-nitrobenzenesulfonate on bacteria (Dose range finding test) [direct method: -S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	139	128	151	9	14	13	27	23	14	28	28	20	5	7	7
	[139 \pm 12]			[12 \pm 3]			[21 \pm 7]			[25 \pm 5]			[6 \pm 1]		
156	150	114	138	11	13	10	14	22	21	29	20	17	9	4	6
	[134 \pm 18]			[11 \pm 2]			[19 \pm 4]			[22 \pm 6]			[6 \pm 3]		
313	133	140	156	15	23	10	19	10	15	31	17	15	5	5	7
	[143 \pm 12]			[16 \pm 7]			[15 \pm 5]			[21 \pm 9]			[6 \pm 1]		
625	127	147	158	12	16	8	16	16	25	19	16	7	5	5	5
	[144 \pm 16]			[12 \pm 4]			[19 \pm 5]			[14 \pm 6]			[5 \pm 0]		
1250	143	131	134	12	8	13	17	12	22	19	11	14	6	5	9
	[136 \pm 6]			[11 \pm 3]			[17 \pm 5]			[15 \pm 4]			[7 \pm 2]		
2500	123	128	139	13	9	13	13	16	22	21	10	7	4	8	9
	[130 \pm 8]			[12 \pm 2]			[17 \pm 5]			[13 \pm 7]			[7 \pm 3]		
5000	115	141	131	12	12	14	21	15	13	22	19	13	6	7	8
	[129 \pm 13]			[13 \pm 1]			[16 \pm 4]			[18 \pm 5]			[7 \pm 1]		
Positive control	735	722	721**	357	371	339**	768	814	737**	356	383	361**	534	673	704**
	[726 \pm 8]			[356 \pm 16]			[773 \pm 39]			[367 \pm 14]			[637 \pm 91]		

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 c): AF-2, 0.04 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of reverse mutation test of sodium 3-nitrobenzenesulfonate on bacteria (Dose range finding test) [activation method: +S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	136	125	142	11	7	10	27	27	26	42	27	41	14	12	12
	[134 \pm 9]			[9 \pm 2]			[27 \pm 1]			[37 \pm 8]			[13 \pm 1]		
156	141	134	136	14	14	4	25	18	14	39	26	43	18	17	16
	[137 \pm 4]			[11 \pm 6]			[19 \pm 6]			[36 \pm 9]			[17 \pm 1]		
313	133	110	140	8	6	14	17	16	23	37	40	40	16	8	10
	[128 \pm 16]			[9 \pm 4]			[19 \pm 4]			[39 \pm 2]			[11 \pm 4]		
625	141	141	113	10	9	15	27	18	14	38	46	32	17	16	15
	[132 \pm 16]			[11 \pm 3]			[20 \pm 7]			[39 \pm 7]			[16 \pm 1]		
1250	144	130	118	10	12	18	24	26	21	40	35	28	17	8	13
	[131 \pm 13]			[13 \pm 4]			[24 \pm 3]			[34 \pm 6]			[13 \pm 5]		
2500	125	114	114	14	13	15	17	15	25	44	28	38	11	10	5
	[118 \pm 6]			[14 \pm 1]			[19 \pm 5]			[37 \pm 8]			[9 \pm 3]		
5000	123	114	126	18	11	8	26	28	21	33	44	26	11	17	9
	[121 \pm 6]			[12 \pm 5]			[25 \pm 4]			[34 \pm 9]			[12 \pm 4]		
Positive control	316	358	338**	148	160	157**	858	733	930**	334	325	333**	69	73	103**
	[337 \pm 21]			[155 \pm 6]			[840 \pm 100]			[331 \pm 5]			[82 \pm 19]		

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Results of reverse mutation test of sodium 3-nitrobenzenesulfonate on bacteria [direct method: -S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	137	121	140	9	9	8	16	14	14	27	22	14	9	8	9
	[133 \pm 10]			[9 \pm 1]			[15 \pm 1]			[21 \pm 7]			[9 \pm 1]		
156	154	131	162	8	13	13	14	18	10	16	20	17	9	15	11
	[149 \pm 16]			[11 \pm 3]			[14 \pm 4]			[18 \pm 2]			[12 \pm 3]		
313	123	148	132	8	6	12	13	17	13	19	23	26	10	8	9
	[134 \pm 13]			[9 \pm 3]			[14 \pm 2]			[23 \pm 4]			[9 \pm 1]		
625	154	147	150	9	8	12	15	18	13	14	22	15	12	7	10
	[150 \pm 4]			[10 \pm 2]			[15 \pm 3]			[17 \pm 4]			[10 \pm 3]		
1250	159	147	131	9	11	12	13	13	9	19	23	25	11	5	8
	[146 \pm 14]			[11 \pm 2]			[12 \pm 2]			[22 \pm 3]			[8 \pm 3]		
2500	156	139	132	16	12	7	14	10	10	21	20	16	8	11	10
	[142 \pm 12]			[12 \pm 5]			[11 \pm 2]			[19 \pm 3]			[10 \pm 2]		
5000	143	158	158	6	9	11	16	15	11	16	22	21	4	7	11
	[153 \pm 9]			[9 \pm 3]			[14 \pm 3]			[20 \pm 3]			[7 \pm 4]		
Positive control	976	934	1045 ^a	428	452	410 ^b	905	866	926 ^c	372	358	379 ^d	549	758	692 ^e
	[985 \pm 56]			[430 \pm 21]			[899 \pm 30]			[370 \pm 11]			[666 \pm 107]		

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 c): AF-2, 0.04 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of reverse mutation test of sodium 3-nitrobenzenesulfonate on bacteria [activation method: +S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	131	131	134	17	19	14	23	15	15	32	34	38	14	17	27
	[132 \pm 2]			[17 \pm 3]			[18 \pm 5]			[35 \pm 3]			[19 \pm 7]		
156	161	163	141	16	20	15	20	16	14	40	37	38	25	22	23
	[155 \pm 12]			[17 \pm 3]			[17 \pm 3]			[38 \pm 2]			[23 \pm 2]		
313	156	139	149	18	14	14	16	14	13	44	40	28	18	19	16
	[148 \pm 9]			[15 \pm 2]			[14 \pm 2]			[37 \pm 8]			[18 \pm 2]		
625	165	155	160	10	15	19	13	10	14	30	42	29	18	15	13
	[160 \pm 5]			[15 \pm 5]			[12 \pm 2]			[34 \pm 7]			[15 \pm 3]		
1250	157	155	173	10	15	23	18	20	12	28	31	38	16	15	17
	[162 \pm 10]			[16 \pm 7]			[17 \pm 4]			[32 \pm 5]			[16 \pm 1]		
2500	139	179	155	25	16	21	22	9	12	43	37	43	14	24	18
	[158 \pm 20]			[21 \pm 5]			[14 \pm 7]			[41 \pm 3]			[19 \pm 5]		
5000	168	165	185	16	16	12	19	11	16	43	31	37	17	9	20
	[173 \pm 11]			[15 \pm 2]			[15 \pm 4]			[37 \pm 6]			[15 \pm 6]		
Positive control	423	451	427 ^a	236	251	267 ^b	899	908	969 ^c	205	262	283 ^d	95	94	98 ^e
	[434 \pm 15]			[251 \pm 16]			[925 \pm 38]			[250 \pm 40]			[96 \pm 2]		

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの 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 Sodium 3-nitrobenzenesulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)を用いて *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として細胞増殖抑制試験を行ったところ、連続処理法24時間および48時間処理、並びに短時間処理法S9 mix非存在および存在下のいずれの場合においても、50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。したがって、染色体異常試験における濃度は、連続処理法および短時間処理法ともに625, 1250, 2500 および5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

試験の結果、連続処理法および短時間処理法のいずれの方法においても、染色体異常を有する細胞の明らかな増加は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下において、3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムは、CHL細胞に対し染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)〔国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部(元: 国立衛生試験所 変異原性部)から昭和60年1月13日入手〕を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業㈱)を添加し、液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し、解凍後の継代数が3回までのものを使用した。

2. 培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を10%の割合で添加したものをを用いた。

3. 培養条件

4×10^3 個/mLの細胞を含む培養液5 mLをシャーレ(径6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

連続処理法では、培養開始3日後に被験物質供試液を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、培養開始3日後にS9 mix非存在および存在下

で6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。

4. S9 mix

製造後6ヶ月以内の染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコーマン㈱)を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

5. 被験物質

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(ロット番号K0116, 小西化学工業㈱提供)は、淡黄色の粉末で、水に対しては20%(20°C)溶け、DMSOに易溶、アセトンに対して難溶であり、分子式C₆H₄NNaO₅S, 分子量225.15, 純度98.8%(不純物として、芒硝0.63%, 食塩0.04%, 水分0.86%; 3,3'-ジニトロジフェニルスルホン0.04%を含む)の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質供試液の調製

溶媒に生理食塩液(㈱大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、そのシャーレ内への添加量は培養液量の10%(v/v)とした。

7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。0.1%クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業㈱)を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を100%とした時の各濃度群の細胞増殖率を求めた。

その結果、連続処理法および短時間処理法ともに処理した全ての濃度で50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった(Appendix 1, 2)。

Appendix 1 Cell growth inhibition test of CHL cells continuously treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate without S9 mix

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Average cell growth rate (%)	
	24-hour treatment	48-hour treatment
0(Solvent)	100	100
78	99.0	95.0
156	90.0	95.5
313	84.0	90.0
625	79.5	88.0
1250	74.0	84.5
2500	69.5	72.0
5000	62.5	67.0

Appendix 2 Cell growth inhibition test of CHL cells treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate with and without S9 mix

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Average cell growth rate (%)	
	without S9 mix	with S9 mix
0(Solvent)	100	100
78	92.5	90.5
156	95.0	93.0
313	93.5	93.5
625	97.0	90.5
1250	85.0	93.0
2500	82.5	93.0
5000	75.0	86.5

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果を基に、染色体異常試験では、連続処理法、短時間処理法ともに625, 1250, 2500および5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (公比2)の4濃度を設定した。対照として、溶媒対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として、連続処理法では *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG, Sigma Chemical Co.)を2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法では3,4-benzo [a] pyrene(B. [a] P, Sigma Chemical Co.)を10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で用いた。陽性対照物質の溶媒には、いずれもDMSO(和光純薬工業(株))を使用した。

9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド(Gibco Laboratories)を最終濃度として0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.4%ギムザ液で約15分間染色した。スライド標本は、各シャーレにつき3枚作製した。

10. 染色体の観察

各シャーレ当たり100個、すなわち、1濃度当たり2枚のシャーレの200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)による分類法¹⁾に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

11. 記録と判定

観察した細胞数、構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し、構造異常を有する細胞については、ギャップのみを有する細胞を含めた場合(+g)と含めない場合(-g)とに区別して記録した。

ギャップを含めた染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について、多試料 χ^2 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は、フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各濃度群との間の有意差検定(有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた)を行った。

その結果、溶媒対照群と比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2濃度以上で有意に増加し、かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

結果および考察

連続処理法による結果をTable 1に示した。3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを加えて24時間および48時間処理したいずれの濃度群においても、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。

短時間処理法による結果をTable 2に示した。S9 mix非存在および存在下で6時間処理したいずれの濃度群においても、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。

したがって、本実験条件下では、3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムのCHL細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。本試験結果は、CHL細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性とする生物学的判定基準²⁾からみても明らかに陰性を示すものであった。

なお、類縁化合物である2-ニトロベンゼンスルホン酸、3-ニトロベンゼンスルホン酸および4-ニトロベンゼンスルホン酸の変異原性については、いずれも *Salmonella typhimurium* TA98, TA100を用いた復帰突然変異試験で陰性³⁾と報告されている。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 1988. pp. 16-37.
- 2) 石舘 基 監修, “改訂増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 19.
- 3) 河合昭宏, 後藤純雄, 松本由美子, 松下秀鶴, 産業医学, 29, 34(1987).

連絡先

試験責任者: 野田 篤
試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美
(財)畜産生物科学安全研究所
〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)
Naomi Kon
Research Institute for Animal Science in
Biochemistry and Toxicology
3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi,
kanagawa, 229-1132, Japan
Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	24	200	1	0	0	0	1	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
SNBS	625	24	200	1	0	0	0	1	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
	1250	24	200	1	0	1	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
	2500	24	200	1	0	1	0	1	0	3	2 (1.0)	3 (1.5)	0	-	-
	5000	24	200	1	1	2	0	0	0	4	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-
MNNG	2.5	24	200	4	27	186	2	3	0	222	188 (94.0)	189 (94.5)**	0.5	+	-
Solvent	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0	-	-
SNBS	625	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0 (0)	1 (0.5)	0	-	-
	1250	48	200	3	0	0	0	0	0	3	0 (0)	3 (1.5)	0	-	-
	2500	48	200	1	0	1	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
	5000	48	200	0	0	2	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-
MNNG	2.5	48	200	13	55	172	27	21	0	288	185 (92.5)	187 (93.5)**	0.5	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SNBS: Sodium *m*-nitrobenzenesulfonate, MNNG: *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample χ^2 test was done at $p < 0.05$, and then Fisher's exact test was done at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

** : Significantly different from solvent group data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate with and without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	1	0	0	0	1	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
SNBS	625	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0 (0)	1 (0.5)	0	-	-
	1250	-	6-(18)	200	2	0	1	0	1	0	4	2 (1.0)	4 (2.0)	0	-	-
	2500	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0	-	-
	5000	-	6-(18)	200	0	0	3	0	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0	-	-
BP	10	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.5	-	-
SNBS	625	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	1.0	-	-
	1250	+	6-(18)	200	0	0	1	0	2	0	3	2 (1.0)	2 (1.0)	0.5	-	-
	2500	+	6-(18)	200	1	0	0	0	1	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
	5000	+	6-(18)	200	0	0	2	0	1	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0	-	-
BP	10	+	6-(18)	200	8	31	148	7	3	0	197	151 (75.5)	153 (76.5)**	0	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SNBS: Sodium *m*-nitrobenzenesulfonate, BP: benzo[*a*]pyrene

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample χ^2 test was done at $p < 0.05$, and then Fisher's exact test was done at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

** : Significantly different from solvent group data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test.