

4-アミノ-1-ナフタレ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 4-amino-1-naphthalenesulfonate in Rats

要約

4-アミノ-1-ナフタレ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)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匹で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ず、一般状態、体重、摂餌量および尿検査、血液学検査、病理学検査の結果にも被験物質投与に起因したと考えられる変化はみられなかった。

一方、投与期間終了時における血液生化学検査では、雌雄の1000 mg/kg投与群のGPT活性に高値が認められ、被験物質投与に起因した所見である可能性が高いと判断された。

以上の結果から、本試験条件下における4-アミノ-1-ナフタレ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。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製

被験物質として、スガイ化学工業(株)より提供された4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム〔ロット番号:6622、分子量:245.24、淡紫色粉末、純度:76.1%(w/w)〕を用い、入手後、室温遮光条件下にて保管した。

被験物質を20%(w/v)の濃度になるよう日局注射用水〔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)濃度となるように段階希釈して調製した後、褐色瓶に分注し、冷暗所に保管した。投与検体は、前日に冷暗所から取り出し、室温にもどしてから使用した。投与検体の調製は4あるいは6日間に1回の頻度で行った。なお、調製検体の安定性試験および含量試験を実施した結果、0.2および20.0%(w/v)溶液中の被験物質は、冷暗所での6日間と、それに続く室温24時間は安定であり、また、投与検体中の被験物質の含量は、所定濃度の102~105%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;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24.0~25.5℃、湿度44~64%、換気回数約15回/時間、照明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4-アミノ-1-ナフタレ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4-アミノ-1-ナフタレ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、死亡例はなく一般状態にも変化は認められなかった。また、剖検においても、被験物質投与に起因すると思われる異常所見は認められなかった。以上の結果から、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局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、投与液量は、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匹を選択し、また回復試験期間終了週(回復第9日)には回復試験全例を、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、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約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。また、血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)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には、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血した血液を用いて、光散乱検出法(CA-3000, 東亜医用電子機)により測定した。

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。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、投与期間終了時の剖検動物のうち1000 mg/kg投与群および溶媒対照群の脳、脊髄、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、坐骨神経について、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。

6. 統計処理法

体重、摂餌量、尿検査(尿量、比重)および定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量の値について、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様性の検定(有意水準:5%)を行い、ついで、分散が一様な場合は、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、分散が一様でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意(有意水準:5%)ならばDunnett型あるいはScheffé型の方法で多重比較を行った。また、試験群が溶媒対照群を含め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

一般状態の変化として、投与期間中の溶媒対照群において、雄の1例に頸部の皮膚に痂皮、潰瘍および脱毛が、回復試験期間中でも痂皮、脱毛がみられ、他の雄の1例では、投与期間および回復試験期間を通じて、両前肢に脱毛が認められた。さらに、雌の1例では、投与期間中、頸部の皮膚に痂皮が、回復試験期間中では痂皮、潰瘍、脱毛がみられた。また、投与期間中、1000 mg/kg投与群では、雄の2例に頸部の皮膚に痂皮がみられ、そのうちの1例には潰瘍もみられた。さらに、同群の雌の1例では、投与第19日に投与後の一過性の流涎が認められた。

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と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、雄の平均摂餌量では、溶媒対照群と比較して1000 mg/kg投与群の投与第8日の値が有意に増加したが、雌ではいずれの被験物質投与群においても有意差は認められなかった。

4. 尿検査 (Table 1,2)

投与期間終了週の尿検査では、雄の1000 mg/kg投与群で3例、雌の300 mg/kg投与群で2例が尿中ビリルビン陽性であった。その他いくつかの項目で、投与期間終了週および回復試験期間終了週の検査において変化が散見されたが、いずれの検査項目においても、その出現例数あるいは程度に用量依存的な変化は認められず、溶媒対照群と被験物質投与群との間に被験物質投与に起因したと考えられる明らかな差は認められなかった。

5. 血液学検査 (Table 3)

投与期間終了時の血液学検査では、雌雄において、いずれの検査項目にも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。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雄で血色素量およびヘマトクリット値が有意に減少し、活性部分トロンボプラスチン時間が有意に短縮した。また、雌では白血球数が有意に減少した。

6. 血液生化学検査 (Table 4)

投与期間終了時の血液生化学検査では、溶媒対照群と被験物質投与群の間に、雄では100 mg/kg投与群のカルシウム濃度、300 mg/kg投与群の総蛋白濃度が有意に低下し、雌では300 mg/kg投与群の無機リン濃度が有意に上昇したが、いずれも用量依存性のある変化ではなかった。また、雄の1000 mg/kg投与群のGPT活性に有意な上昇がみられ、雌の1000 mg/kg投与群ではクレアチニ

ン濃度およびカルシウム濃度の有意な上昇および、GPT活性の上昇もみられた。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群において、雄でナトリウム濃度およびGPT活性が有意に上昇し、カリウム濃度が有意に減少した。また、雌ではナトリウム濃度が有意に上昇した。

7. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 5)

投与期間終了時剖検例の器官重量では、雌雄において溶媒対照群と被験物質投与群の間で絶対重量、相対重量ともに有意差は認められなかった。

回復試験期間終了時剖検例の1000 mg/kg投与群における各器官の絶対重量は、雌の肝臓に有意な減少がみられた。また、相対重量は、雄の精巣および雌の肝臓で有意に減少し、雌の腎臓で有意に増加した。

2) 剖検所見

投与期間終了時および回復試験期間終了時剖検例の剖検所見では、肺、腎臓、肝臓、副腎、下顎リンパ節および皮膚において変化が散見されたが、雌雄とも被験物質投与に起因すると思われる明らかな変化はなかった。

3) 病理組織学所見

投与期間終了時剖検例の肝臓では、雌雄の溶媒対照群および1000 mg/kg投与群に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、両群間に頻度および程度の明らかな差はなかった。また、肉眼的に陥凹部がみられた300 mg/kg投与群の雄1例では組織学的に巣状壊死が認められ、淡色領域がみられた同群の雌1例では、門脈周囲性の脂肪化のほかに異常はみられなかった。脾臓では、雌雄の溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の全例に髄外造血がみられ、雌の両群の全例に褐色色素沈着が認められたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

腎臓では雄の溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の各4例、雌の両群の各3例の皮質に好塩基性尿細管がみられ、雌の両群の各2例の皮髄境界部に鉍質沈着が認められたが、両群間に頻度および程度の明らかな差はなかった。また、溶媒対照群の雄1例に嚢胞がみられ、1000 mg/kg投与群の雄1例に腎盂の拡張がみられた。さらに、肉眼的に皮質に嚢胞がみられた100 mg/kg投与群の雄1例は、組織学的にも嚢胞が確認されたほか、皮質に好塩基性尿細管がみられた。

その他、脳、脊髄、心臓、副腎および坐骨神経に異常はなく、その他の肉眼的に異常がみられた器官にも被験物質投与に起因すると考えられる病理組織学的変化はなかった。なお、いずれの病理組織学所見にも統計学的に有意差は認められなかった。

回復試験期間終了時剖検例では、肉眼的に異常がみられた器官に、被験物質投与に起因すると考えられる変化はなかった。

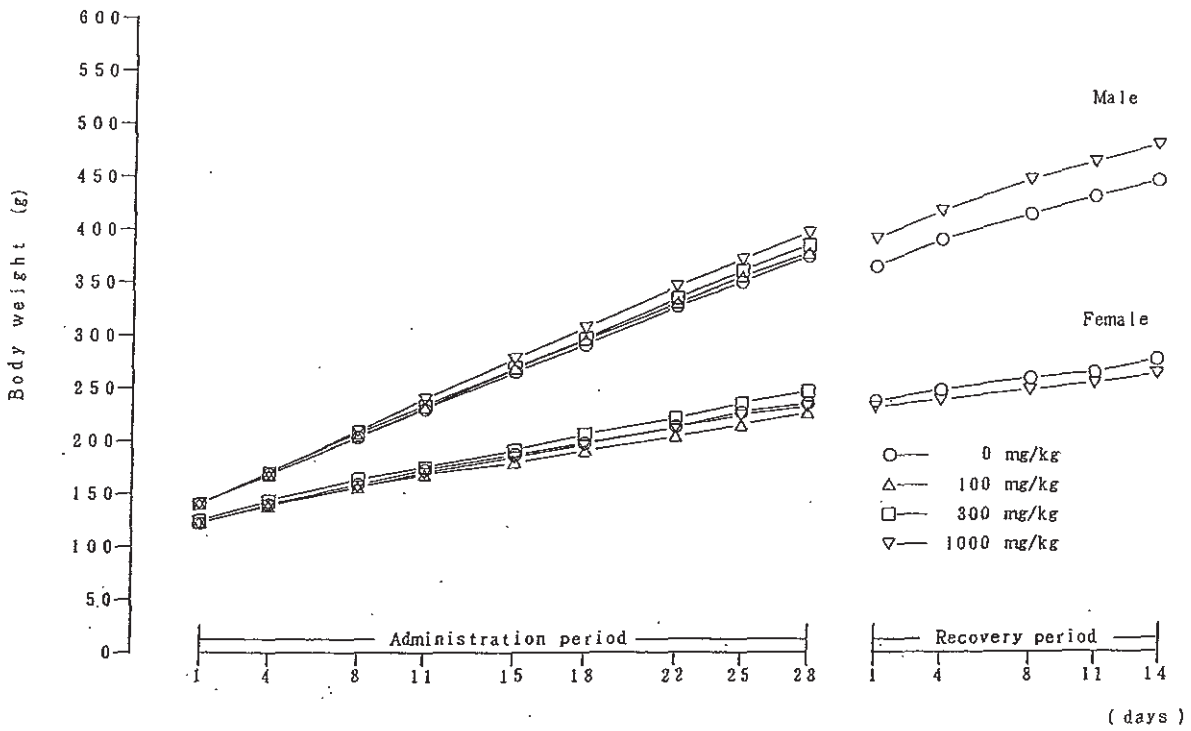


Fig. 1 Body weight changes of rats treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

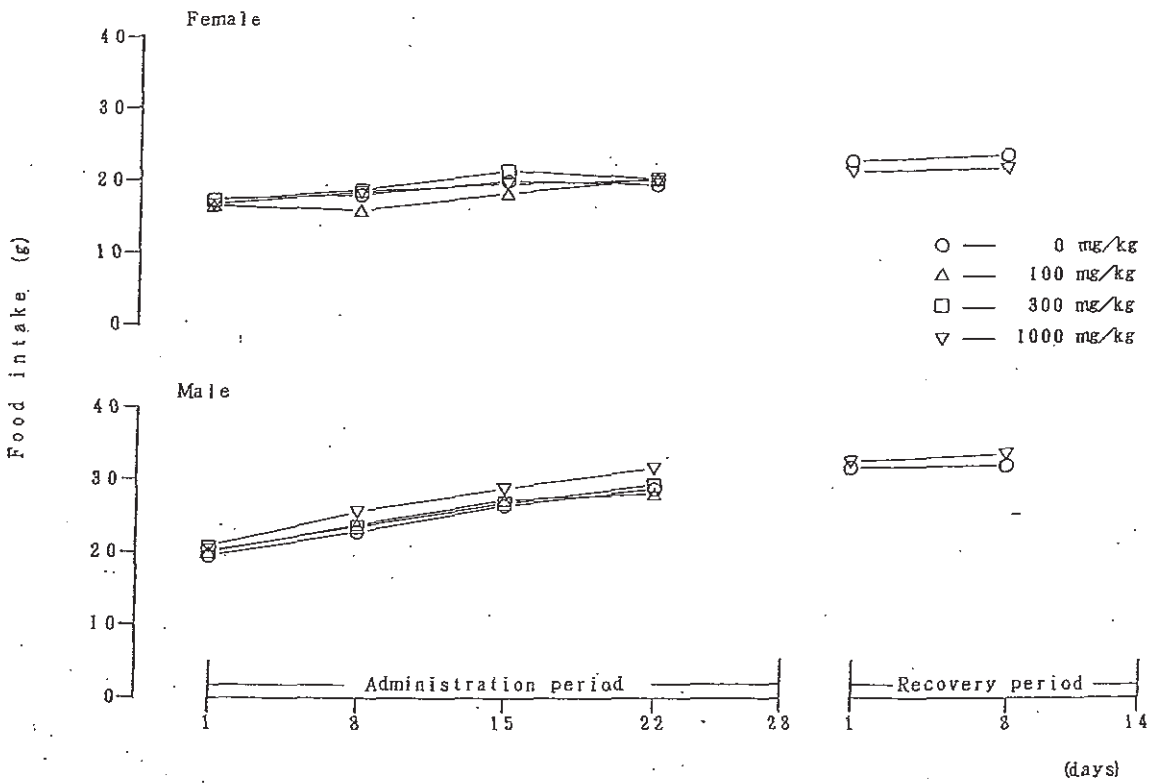


Fig. 2 Food intake of rats treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

考察

4-アミノ-1-ナフトレ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)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1000 mg/kg投与群の雌1例において、投与第19日に投与後、一過性の流涎が認められたが、それ以降にはみられなかったため被験物質の刺激性に基づく反応ではないと判断した。また、投与期間中の平均摂餌量では、1000 mg/kg投与群の雄で投与第8日の値が有意に増加したが、持続的な変化ではなく、いずれも偶発的なものと考えられた。

さらに、投与期間終了週の尿検査では、尿中ビリルビンが1000 mg/kg投与群の雄3例で、300 mg/kg投与群の雌2例で陽性となったが、用量依存的な変化ではなく、それに伴う血液生化学および病理学的変化もみられなかった。また、尿中ビリルビン測定の際、溶媒対照群を除く被験物質投与群で、ビリルビンの試験紙反応部分が通常とは異なる色調を示した。確認のため高用量群および低用量群の投与検体を試験紙に浸したところ、前述した色調と同様の変化が認められ、これを本試験で使用した尿分析機器でビリルビンを測定した結果、低用量群で10本中8本、高用量群で10本中10本が陽性であった。一方、本試験で使用した尿試験紙は、ビリルビン検出反応として2,4-ジクロルアニリンと亜硝酸ナトリウムで形成されるジアゾニウム塩に、ビリルビンが作用してアゾ色素を形成する反応を利用しており、被験物質が試験紙のジアゾニウム塩と反応して、アゾ色素を形成する可能性が高いことが考えられる。以上のことから、ビリルビンの陽性反応については、試験紙と尿中の被験物質あるいはその代謝物の反応による可能性が高く、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

回復試験期間終了時の血液学検査では1000 mg/kg投与群の雌において、白血球数の有意な減少が認められたが、白血球の百分比には変化がみられず、それに伴う病理学的変化も認められなかった。また、投与期間および回復試験期間終了時の血液生化学検査では、1000 mg/kg投与群の雌雄にGPT活性の上昇がみられ、雄では有意差も認められた。これらの成績を当研究所において過去2年間に「既存化学物質の安全性点検事業」として行った、3試験の28日間反復経口投与毒性試験における雌雄の溶媒対照群の血中GPT活性と比較した結果、雌雄とも投与期間終了時のGPT活性は高値であり、被験物質投与に起因した所見である可能性が高いと判断された。その他、血液学検査、血液生化学検査および器官重量においても有意差が散見されたが、いずれも被験物質投与との関連が明らかではなかった。

以上の結果から、本試験条件下における4-アミノ-1-ナフトレ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。

連絡先

試験責任者：大原直樹

試験担当者：松岡千明，森村智美，加藤博康，
関 剛幸，小島幸一，吉村慎介，
畔上二郎，稲田浩子，三枝克彦，
安生孝子

(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)

Chiaki Matsuoka, Tomomi Morimura,
Hiroyasu Katoh, Takayuki Seki,
Kohichi Kojima, Shinsuke Yoshimura,
Jiro Azegami, Hiroko Inada,
Katsuhiko Saegusa, Takako Anjo

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 Urinalysis in rats treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period		N	Volume (mL/24hr)	Specific gravity	Color ^a		Turbidity		pH					Protein ^d	Glucose ^e	Ketone ^e	Bilirubin ^e	Occult blood ^e	Urobilinogen ^f															
Sex	Group (mg/kg)				ly	y	-	+	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	-	±	++	±	+										
Administration																																		
Male	0	5	20.6 ± 5.7 ^a	1.063 ± 0.012 ^a	5	0	3	2	0	0	0	2	2	0	1	0	0	2	3	0	5	3	1	1	5	0	4	0	1	0	5	0		
	100	5	28.8 ± 9.2	1.051 ± 0.011	5	0	4	1	0	0	0	1	2	0	2	0	1	3	1	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0		
	300	5	20.3 ± 4.2	1.061 ± 0.007	5	0	3	2	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	2	3	0	5	3	2	0	5	0	4	0	0	1	5	0	
	1000	5	16.1 ± 3.9	1.064 ± 0.010	4	1	4	1	0	0	0	0	3	1	0	1	0	0	0	5	0	5	4	1	0	2	3	5	0	0	0	5	0	
Female	0	5	10.5 ± 2.2	1.061 ± 0.008	4	1	3	2	0	2	1	0	0	0	1	1	4	0	1	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	4	1	5	0
	100	5	11.6 ± 3.6	1.053 ± 0.009	5	0	5	0	0	0	0	1	3	1	0	0	5	0	0	5	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	
	300	5	21.3 ± 15.2	1.041 ± 0.024	3	2	5	0	1	0	0	2	2	0	0	0	3	1	1	0	5	5	0	0	3	2	5	0	0	0	5	0	5	0
	1000	5	12.4 ± 3.2	1.048 ± 0.013	5	0	3	2	0	0	0	1	4	0	0	0	4	1	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0
Recovery																																		
Male	0	5	30.1 ± 11.1	1.053 ± 0.015	5	0	4	1	0	0	1	0	2	2	0	0	0	2	3	0	5	2	3	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0
	1000	5	21.6 ± 6.0	1.060 ± 0.010	3	2	5	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	4	1	5	1	3	1	5	0	5	0	0	0	4	1	5	0
Female	0	5	15.9 ± 4.2	1.054 ± 0.009	4	1	5	0	0	0	0	1	3	1	0	0	4	1	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0
	1000	5	14.6 ± 3.0	1.046 ± 0.005	5	0	3	2	0	0	0	0	3	1	1	0	5	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5

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 2 Urinalysis (sediment) in rats treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

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

a) -, Not observed; ±, 1-9 per 3 visual fields; +, 10-99 per 3 visual fields b) -, Not observed; ±, A few; +, Abundant

Table 3 Hematological findings in rats treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period			Differential count of WBC (%)														Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	PT (sec)	APTT (sec)
Sex	Group (mg/kg)	N	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)	Reticulo- cyte (%)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Neutro.		Eos.	Baso.	Mono.	Lymph.			
											Band	Seg.							
Administration																			
Male	0	5	678 ± 28	14.7 ± 0.6	42.9 ± 2.2	63.3 ± 1.9	21.7 ± 0.8	34.4 ± 0.8	2.5 ± 0.6	119 ± 31	0 ± 0	6 ± 4	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 2	91 ± 5	109.0 ± 9.1	21.1 ± 4.2	27.0 ± 2.4
	100	5	653 ± 27	14.6 ± 0.3	42.1 ± 0.6	64.5 ± 2.3	22.5 ± 1.2	34.8 ± 0.7	2.5 ± 0.3	130 ± 28	0 ± 0	5 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 1	92 ± 2	106.4 ± 5.2	21.0 ± 2.2	28.3 ± 3.3
	300	5	651 ± 18	14.1 ± 0.5	41.4 ± 1.8	63.5 ± 1.9	21.7 ± 0.7	34.1 ± 0.6	2.6 ± 0.4	115 ± 20	0 ± 0	7 ± 2	1 ± 1	0 ± 0	3 ± 2	90 ± 4	112.9 ± 8.8	18.4 ± 4.2	24.6 ± 5.1
	1000	5	643 ± 4	14.4 ± 0.2	41.9 ± 0.7	65.1 ± 1.2	22.4 ± 0.4	34.4 ± 0.5	3.0 ± 0.4	120 ± 23	0 ± 0	8 ± 4	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 1	90 ± 5	110.5 ± 4.8	20.8 ± 2.0	27.5 ± 1.8
Female	0	5	646 ± 30	14.1 ± 0.6	40.4 ± 1.3	62.6 ± 1.8	21.9 ± 0.9	35.0 ± 0.5	2.3 ± 0.4	44 ± 20	0 ± 0	11 ± 8	1 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	87 ± 10	95.6 ± 3.9	15.0 ± 1.5	23.3 ± 3.1
	100	5	671 ± 23	14.3 ± 0.6	41.1 ± 1.5	61.3 ± 1.3	21.3 ± 0.5	34.8 ± 0.4	1.9 ± 0.6	61 ± 18	0 ± 0	6 ± 4	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	92 ± 4	105.1 ± 6.2	14.9 ± 0.7	23.5 ± 1.2
	300	5	646 ± 24	14.0 ± 0.6	40.6 ± 1.3	62.8 ± 0.6	21.7 ± 0.4	34.5 ± 0.5	1.5 ± 0.4	58 ± 10	0 ± 0	6 ± 4	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	92 ± 4	99.9 ± 6.9	15.5 ± 1.7	23.5 ± 2.7
	1000	5	653 ± 33	14.1 ± 1.0	41.3 ± 3.2	63.1 ± 2.0	21.7 ± 0.6	34.3 ± 0.3	1.8 ± 0.4	60 ± 12	0 ± 0	10 ± 3	1 ± 2	0 ± 0	3 ± 2	85 ± 5	99.0 ± 11.4	14.8 ± 1.5	23.7 ± 1.3
Recovery																			
Male	0	5	750 ± 20	15.6 ± 0.3	45.2 ± 1.3	60.3 ± 0.8	20.7 ± 0.4	34.4 ± 0.5	2.2 ± 0.3	155 ± 44	0 ± 0	8 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 1	89 ± 5	108.3 ± 9.4	24.9 ± 2.7	32.3 ± 1.8
	1000	5	723 ± 17	15.0* ± 0.4	43.2* ± 0.8	59.8 ± 1.1	20.7 ± 0.5	34.6 ± 0.3	2.0 ± 0.4	130 ± 38	0 ± 0	9 ± 2	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	90 ± 1	107.3 ± 7.1	22.4 ± 3.1	29.2* ± 1.2
Female	0	5	680 ± 36	14.1 ± 0.6	41.0 ± 1.8	60.3 ± 0.7	20.8 ± 0.3	34.4 ± 0.2	1.9 ± 0.5	75 ± 24	0 ± 0	10 ± 9	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	88 ± 10	99.3 ± 13.8	14.8 ± 0.8	24.0 ± 1.1
	1000	5	681 ± 8	14.0 ± 0.2	40.4 ± 0.8	59.3 ± 1.3	20.6 ± 0.5	34.7 ± 0.3	1.7 ± 0.6	37* ± 11	0 ± 0	8 ± 4	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	90 ± 5	91.9 ± 8.8	15.6 ± 1.0	25.6 ± 1.7

Parameter, Mean \pm S.D.*, Significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$

Table 4 Biochemical findings in rats treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period			Total protein	Albu- min	A/G	BUN	Creati- nine	Glucose	Total choles- terol	Triglyce- ride	Inorg. phos.	Ca	Na	K	Cl	ALP	LDH	GPT	GOT	γ-GTP	
Sex	Group	N	(mg /dL)	(g/dL)		(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mEq /L)	(mEq /L)	(mEq /L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	
	(mg /kg)		(g/dL)	(g/dL)		(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mEq /L)	(mEq /L)	(mEq /L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	
Administration																					
	0	5	5.4 ±0.2	3.0 ±0.1	1.24 ±0.08	15 ±2	0.6 ±0.1	122 ±16	43 ±6	68 ±11	8.2 ±0.6	9.0 ±0.3	144.0 ±0.4	3.95 ±0.16	105.5 ±0.4	296 ±60	158 ±56	23 ±3	61 ±5	0 ±0	
Male	100	5	5.1 ±0.2	2.8 ±0.2	1.20 ±0.17	14 ±2	0.6 ±0.1	111 ±14	36 ±2	55 ±8	7.7 ±0.6	8.7* ±0.2	143.7 ±1.0	3.88 ±0.17	106.8 ±1.0	311 ±53	114 ±9	20 ±2	55 ±4	0 ±0	
	300	5	5.1* ±0.1	2.8 ±0.1	1.24 ±0.07	12 ±2	0.6 ±0.1	118 ±7	41 ±5	54 ±18	7.9 ±0.3	8.8 ±0.1	144.1 ±1.1	3.84 ±0.23	106.9 ±1.2	350 ±26	112 ±22	24 ±3	58 ±6	1 ±1	
	1000	5	5.3 ±0.1	2.9 ±0.2	1.23 ±0.16	14 ±1	0.6 ±0.0	121 ±7	44 ±6	70 ±16	7.6 ±0.5	9.2 ±0.1	143.9 ±0.8	3.71 ±0.17	106.2 ±1.2	353 ±44	167 ±33	29* ±3	68 ±7	0 ±0	
	0	5	5.3 ±0.3	3.4 ±0.1	1.78 ±0.10	19 ±1	0.6 ±0.0	110 ±16	53 ±16	53 ±20	5.5 ±0.5	8.6 ±0.2	143.2 ±1.1	3.84 ±0.24	110.2 ±1.1	238 ±51	125 ±27	20 ±4	65 ±6	0 ±0	
Female	100	5	5.3 ±0.3	3.2 ±0.3	1.58 ±0.27	18 ±2	0.6 ±0.0	113 ±9	50 ±11	48 ±11	5.8 ±0.5	8.7 ±0.2	143.8 ±0.4	3.73 ±0.11	110.7 ±0.8	177 ±38	114 ±27	18 ±3	59 ±7	1 ±1	
	300	5	5.1 ±0.2	3.2 ±0.1	1.67 ±0.09	18 ±3	0.6 ±0.0	117 ±10	42 ±7	42 ±4	6.6** ±0.5	8.8 ±0.2	143.8 ±1.6	3.69 ±0.17	110.7 ±2.3	246 ±21	110 ±16	20 ±4	62 ±6	0 ±0	
	1000	5	5.6 ±0.4	3.5 ±0.2	1.66 ±0.19	18 ±2	0.7* ±0.1	114 ±10	56 ±23	47 ±21	6.0 ±0.3	9.1** ±0.2	143.9 ±0.8	3.60 ±0.07	110.8 ±1.1	185 ±52	148 ±41	24 ±6	59 ±4	0 ±1	
Recovery																					
	0	5	5.5 ±0.3	3.1 ±0.3	1.26 ±0.11	15 ±4	0.6 ±0.1	129 ±11	41 ±9	58 ±13	6.8 ±0.1	9.0 ±0.1	142.1 ±0.4	4.05 ±0.13	105.0 ±0.8	274 ±57	110 ±27	23 ±1	56 ±3	0 ±0	
Male	1000	5	5.4 ±0.1	2.9 ±0.2	1.18 ±0.15	14 ±2	0.6 ±0.1	135 ±9	37 ±7	53 ±6	6.5 ±0.5	9.0 ±0.1	142.9* ±0.5	3.80** ±0.09	105.1 ±1.0	251 ±32	116 ±32	26* ±2	59 ±6	0 ±0	
	0	5	5.5 ±0.3	3.3 ±0.3	1.50 ±0.22	18 ±2	0.7 ±0.1	135 ±21	43 ±7	40 ±9	5.3 ±0.1	9.0 ±0.3	142.5 ±0.5	3.53 ±0.46	109.1 ±1.0	177 ±31	108 ±22	20 ±1	60 ±9	0 ±1	
Female	1000	5	5.3 ±0.3	3.2 ±0.2	1.50 ±0.24	18 ±1	0.7 ±0.0	118 ±17	45 ±9	36 ±4	5.6 ±0.5	9.0 ±0.2	143.6* ±0.8	3.66 ±0.21	109.9 ±1.2	178 ±45	129 ±47	21 ±5	57 ±7	0 ±0	

Parameter, Mean±S.D.

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

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

Table 5 Absolute and relative organ weights in rats treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate in twenty-eight-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													
Male	0	5	354.6 ± 11.9	1978.8 ± 67.6	12366.5 ± 507.7	2616.0 ± 170.0	45.9 ± 6.3	2873.0 ± 219.1	5.590 ± 0.360	34.875 ± 0.691	7.381 ± 0.475	0.130 ± 0.016	8.116 ± 0.752
	100	5	340.9 ± 23.1	1910.9 ± 88.9	11264.3 ± 1322.6	2522.0 ± 204.9	50.8 ± 8.0	3001.9 ± 159.1	5.628 ± 0.487	32.963 ± 2.071	7.417 ± 0.650	0.149 ± 0.020	8.840 ± 0.766
	300	5	349.3 ± 23.2	2020.0 ± 59.8	11169.4 ± 923.4	2645.1 ± 148.0	47.1 ± 6.5	2856.3 ± 88.6	5.800 ± 0.352	31.962 ± 1.342	7.584 ± 0.374	0.135 ± 0.014	8.195 ± 0.370
	1000	5	370.3 ± 36.1	2005.2 ± 88.4	12196.1 ± 1774.8	2679.8 ± 152.4	47.4 ± 4.9	2885.5 ± 169.5	5.453 ± 0.520	32.810 ± 2.108	7.269 ± 0.452	0.129 ± 0.021	7.875 ± 1.125
Female	0	5	217.4 ± 11.5	1807.5 ± 86.7	6707.0 ± 576.3	1693.1 ± 82.9	58.2 ± 9.0	84.3 ± 8.4	8.324 ± 0.440	30.835 ± 1.852	7.795 ± 0.369	0.267 ± 0.036	0.389 ± 0.044
	100	5	204.7 ± 14.7	1763.7 ± 63.7	6316.1 ± 536.4	1615.2 ± 136.7	59.5 ± 4.2	87.1 ± 16.2	8.653 ± 0.709	30.842 ± 0.749	7.889 ± 0.257	0.291 ± 0.023	0.426 ± 0.078
	300	5	222.9 ± 17.9	1788.2 ± 56.1	6618.0 ± 658.5	1794.9 ± 168.6	61.6 ± 2.4	88.8 ± 9.6	8.054 ± 0.545	29.662 ± 1.102	8.056 ± 0.472	0.277 ± 0.021	0.400 ± 0.046
	1000	5	216.5 ± 14.0	1799.5 ± 36.8	6554.2 ± 560.9	1719.8 ± 158.2	61.2 ± 7.3	95.0 ± 9.9	8.339 ± 0.558	30.279 ± 1.776	7.938 ± 0.428	0.282 ± 0.021	0.440 ± 0.047
Recovery													
Male	0	5	413.0 ± 21.8	2027.8 ± 102.0	12915.1 ± 1101.1	2943.6 ± 285.7	49.8 ± 4.0	3461.8 ± 270.4	4.914 ± 0.205	31.228 ± 1.158	7.116 ± 0.368	0.121 ± 0.014	8.384 ± 0.524
	1000	5	442.9 ± 19.5	2029.8 ± 48.9	13785.1 ± 945.1	3099.1 ± 230.6	56.0 ± 5.6	3258.7 ± 107.7	4.593 ± 0.284	31.137 ± 1.898	6.991 ± 0.235	0.127 ± 0.014	7.375* ± 0.512
Female	0	5	254.1 ± 13.6	1800.7 ± 64.0	7519.0 ± 589.7	1719.5 ± 62.1	68.4 ± 8.5	97.8 ± 13.5	7.104 ± 0.442	29.574 ± 1.144	6.778 ± 0.311	0.269 ± 0.022	0.385 ± 0.045
	1000	5	242.0 ± 10.2	1791.0 ± 95.1	6459.7* ± 170.2	1797.0 ± 72.7	61.4 ± 5.8	86.9 ± 14.0	7.410 ± 0.484	26.712** ± 0.706	7.430** ± 0.260	0.254 ± 0.023	0.360 ± 0.066

Parameter, Mean±S.D.

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

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

4-アミノ-1-ナフタレ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 4-amino-1-naphthalenesulfonate on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全点検に係わる毒性調査事業の一環として、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下および共存下の各菌株について 5000 ~ 313 μg /プレート (公比2) の5濃度を設定した。

本試験を2回実施した結果、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの変異原性は陰性と結論した。

方法

〔使用菌株〕

カリフォルニア大学B.N. Ames教授より1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および東京大学医科学研究所 松島教授より1985年10月14日に入手した *Escherichia 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ものを使用した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その20 μL をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath社) 25 g を1 Lの精製水に溶解して作製した液体完全培地10 mLに接種し、37℃で8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

〔被験物質〕

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム (ロット番号: 6622, スガイ化学工業(株)提供) は、分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NNaO}_3\text{S}$, 分子量245.24 (無水), 純度: 76.1% (不純物(概略値)として α -ナフチルアミン約50 ppm, β -ナフチルアミン10~20 ppm, 1-アミノナフタレン-5-スルホン酸約0.1%, 2-アミノナフタレン-6-スルホン酸約0.1~0.2%を含む) の粉末であり、通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前およ

び実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムは注射用水 (DW, (株)大塚製薬工場) を用いて最高濃度 (50 mg/mL) の溶液を調製した後、同溶媒で所定濃度に段階希釈したものをを用いた。

〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものをを用いた。

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))

NaN_3 : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

ENNG: *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (Sigma Chemical Co.)

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

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

NaN_3 は DW に、その他はジメチルスルホキシド (関東化学(株)) に溶解したものを使用した。

〔培地およびS9 mixの組成〕

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて D-ビオチン、L-ヒスチジンおよび L-トリプトファン の0.5 mM 混合水溶液を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水100 mL に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar, Difco社) 0.6 g, 塩化ナトリウム0.5 g の割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を1/10量加えて混和し、約45℃に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業(株)) を購入し、使用した。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無水塩	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20 g
寒天 (OXOID Agar No.1)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めてある。

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで

水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

*:購入したS9(キッコーマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

[試験方法]

試験はブレインキューベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mLを分注し、S9 mix 0.5 mLと菌懸濁液0.1 mLを加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪し、ブレインキューベーションを行った。S9 mixを共存させない場合には、S9 mixの代わりに0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mLを加えた。ブレインキューベーション後、トップアガー2 mLを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養し、復帰変異コロニー数を計測した。同時に実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた。予備試験では各濃度につき1枚のプレートを使用し、本試験では各濃度につき3枚のプレートを使用した。本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

[試験結果の判定基準]

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

結果および考察

[予備試験]

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/プレートの濃度で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000, 2500, 1250, 625, 313 μ g/プレートの5濃度を設定した。

[本試験]

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともに、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照

値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。

以上の結果から、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの変異原性は陰性と結論した。

文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).

連絡先

試験責任者: 宮川 誠
試験担当者: 榎本佳明, 清水優子
(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Makoto Miyagawa (Study director)
Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255, Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate on bacteria

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	151 134 (145) 149 (± 9)	10 6 (13) 22 (± 8)	52 48 (48) 43 (± 5)	13 19 (18) 21 (± 4)	7 13 (10) 9 (± 3)
	313	149 165 (148) 131 (± 17)	17 15 (14) 10 (± 4)	46 47 (46) 46 (± 1)	16 26 (20) 19 (± 5)	11 9 (9) 7 (± 2)
	625	130 139 (142) 158 (± 14)	10 13 (12) 13 (± 2)	36 58 (45) 40 (± 12)	16 19 (17) 16 (± 2)	5 11 (10) 13 (± 4)
	1250	154 136 (142) 137 (± 10)	18 11 (14) 12 (± 4)	34 50 (46) 53 (± 10)	12 13 (15) 19 (± 4)	13 9 (10) 8 (± 3)
	2500	135 146 (142) 144 (± 6)	8 11 (9) 9 (± 2)	46 45 (45) 43 (± 2)	15 14 (14) 13 (± 1)	6 8 (9) 12 (± 3)
	5000	134 138 (134) 131 (± 4)	12 6 (12) 17 (± 6)	40 42 (43) 47 (± 4)	14 18 (16) 17 (± 2)	7 9 (8) 8 (± 1)
S9 mix (+)	0	156 149 (153) 154 (± 4)	16 19 (17) 17 (± 2)	47 37 (42) 42 (± 5)	30 23 (25) 21 (± 5)	11 8 (10) 11 (± 2)
	313	157 153 (159) 167 (± 7)	20 15 (15) 11 (± 5)	53 43 (50) 54 (± 6)	22 27 (24) 22 (± 3)	8 8 (10) 13 (± 3)
	625	169 181 (180) 190 (± 11)	16 11 (13) 13 (± 3)	45 53 (46) 41 (± 6)	32 23 (26) 23 (± 5)	8 8 (9) 11 (± 2)
	1250	192 164 (178) 177 (± 14)	13 10 (14) 19 (± 5)	54 38 (50) 57 (± 10)	27 27 (24) 17 (± 6)	10 18 (11) 5 (± 7)
	2500	155 180 (183) 215 (± 30)	16 16 (17) 19 (± 2)	51 43 (47) 48 (± 4)	19 23 (22) 24 (± 3)	11 9 (10) 11 (± 1)
	5000	202 156 (182) 189 (± 24)	13 10 (13) 17 (± 4)	45 42 (46) 50 (± 4)	26 25 (27) 30 (± 3)	11 9 (9) 8 (± 2)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN_3	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of revertants	799 740 (750) 712 (± 44)	405 382 (421) 477 (± 50)	648 541 (578) 545 (± 61)	748 687 (704) 678 (± 38)	529 354 (431) 410 (± 89)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1172 1253 (1190) 1146 (± 56)	422 412 (423) 436 (± 12)	1717 1747 (1721) 1700 (± 24)	475 433 (424) 365 (± 56)	179 137 (167) 186 (± 27)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN_3 :sodium azide

ENNG:N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)
(\pm S.D.)

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate on bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	127 160 (141) 135 (± 17)	15 14 (16) 19 (± 3)	42 32 (38) 39 (± 5)	22 16 (19) 18 (± 3)	8 10 (11) 14 (± 3)
	313	143 140 (148) 160 (± 11)	12 16 (16) 20 (± 4)	30 25 (30) 34 (± 5)	19 14 (16) 16 (± 3)	14 13 (13) 11 (± 2)
	625	140 147 (138) 127 (± 10)	15 20 (15) 9 (± 6)	25 24 (28) 34 (± 6)	16 22 (17) 12 (± 5)	11 7 (10) 12 (± 3)
	1250	159 135 (147) 146 (± 12)	11 10 (13) 17 (± 4)	33 37 (32) 26 (± 6)	17 19 (20) 24 (± 4)	25 16 (19) 16 (± 5)
	2500	143 148 (148) 154 (± 6)	16 15 (16) 17 (± 1)	40 36 (33) 23 (± 9)	12 14 (16) 22 (± 5)	14 10 (12) 13 (± 2)
	5000	136 129 (137) 147 (± 9)	16 11 (14) 14 (± 3)	27 38 (33) 34 (± 6)	10 26 (20) 23 (± 9)	9 11 (12) 15 (± 3)
S9 mix (+)	0	172 167 (166) 158 (± 7)	12 19 (16) 17 (± 4)	29 40 (33) 30 (± 6)	26 23 (24) 24 (± 2)	20 16 (18) 17 (± 2)
	313	183 163 (178) 189 (± 14)	19 14 (18) 22 (± 4)	35 30 (35) 40 (± 5)	23 34 (25) 18 (± 8)	20 9 (15) 17 (± 6)
	625	181 157 (169) 170 (± 12)	26 26 (27) 28 (± 1)	38 29 (33) 33 (± 5)	32 30 (34) 40 (± 5)	12 24 (20) 23 (± 7)
	1250	204 193 (189) 171 (± 17)	16 19 (17) 15 (± 2)	29 25 (25) 22 (± 4)	29 30 (27) 21 (± 5)	12 13 (12) 11 (± 1)
	2500	220 184 (198) 191 (± 19)	23 15 (21) 25 (± 5)	30 39 (36) 40 (± 6)	21 30 (25) 23 (± 5)	9 10 (10) 11 (± 1)
	5000	210 193 (205) 213 (± 11)	19 13 (16) 16 (± 3)	50 30 (40) 41 (± 10)	28 27 (31) 38 (± 6)	18 22 (20) 21 (± 2)
Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	633 593 (597) 565 (± 34)	432 442 (436) 433 (± 6)	514 537 (520) 509 (± 15)	723 596 (668) 686 (± 65)	370 439 (425) 467 (± 50)
Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	1149 1116 (1145) 1169 (± 27)	412 404 (406) 403 (± 5)	1499 1743 (1604) 1569 (± 126)	354 378 (368) 372 (± 12)	200 213 (211) 220 (± 10)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, NaN₃: sodium azide
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
(\pm S.D.)

4-アミノ-1-ナフタレ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 4-amino-1-naphthalenesulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナト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。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、それぞれ公比2で3用量を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、48時間処理の5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、染色体構造異常細胞の出現頻度は6.5%であった。このため、48時間処理について、同濃度で確認試験を実施した。その結果、構造異常細胞の出現頻度は5%未満となり、再現性は認められなかった。なお、連続処理法のいずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下の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、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1996年11月, 入手時:継代14代, 凍結時:17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5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(CS:GIBCO BRL, ロット番号:35K7844)を10%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, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mixの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

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム(ロット番号:6622, スガイ化学工業(株)提供)は、分子式C₁₀H₈NNaO₃S, 分子量245.24(無水), 純度:76.1%(不純物(概略値)として α -ナフチルアミン約50 ppm, β -ナフチルアミン10~20 ppm, 1-アミノナフタレン-5-スルホン酸約0.1%, 2-アミノナフタレン-6-スルホン酸約0.1~0.2%を含む)の粉末である。通常取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒は局方生理食塩液(生食, (株)大塚製薬工場, ロット番号:K6F82)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、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(v/v)%になるように加えた。なお、被験物質秤量の際は、純度換算を実施した。

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(Monocellator™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を測定し、被験物質処理群の陰性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、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで50%の細胞増殖を抑制しなかった(Fig.1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、染色体異常試験は連続処理法および短時間処理法のいずれの処理条件においても5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、それぞれ公比2で3用量を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(MMC, 協和発酵工業(株), ロット番号:119AFG)を0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(BP, 東京化成工業(株), ロット番号:AX01)を20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。

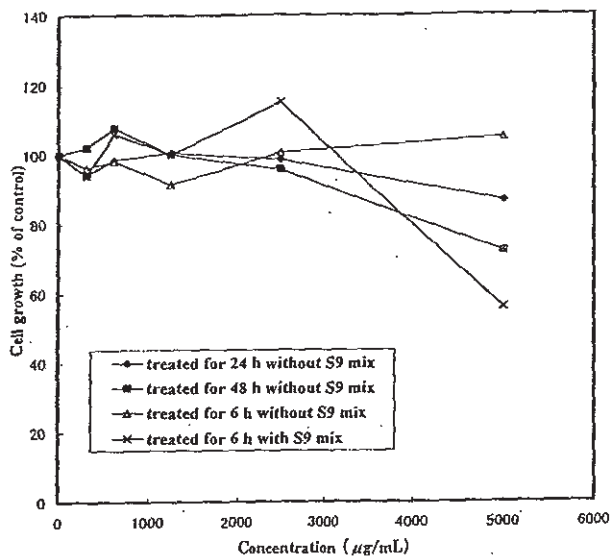


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate

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。染色体標本の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2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(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分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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。構造異常は、ギャップを持つ細胞を含めた場合(+gap)と含めない場合(-gap)とに区別して集計した。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。

結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1, 3に示した。4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸ナトリウムを加えて24時間および48時間連続処理した結果、48時間処

理の5000 µg/mLで、染色体構造異常細胞の出現頻度は6.5%であった。このため、48時間処理について、同濃度で確認試験を実施した。その結果、構造異常細胞の出現頻度は5%未満となり、再現性は認められず構造異常誘発作用は認められないと判断した。なお、連続処理法のいずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞は、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸ナトリウムを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、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出現頻度は5%未満であった。一方、陽性対照物質のBPで処理した細胞は、S9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

従って、上記の試験条件下で、4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸ナトリウムは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

なお、類似化合物である1-アミノナフトレン(CAS No.:134-32-7)の短時間処理法のS9 mix存在下および2-アミノ-5-ヒドロキシ-7-ナフトレンスルホン酸(CAS No.:87-02-5)の短時間処理法のS9 mix存在下の染色体異常試験は陽性と報告されている^{2,3)}。さらに、ナフトレン(CAS No.:91-20-3)の短時間処理法のS9 mix存在下の染色体異常試験は、構造異常誘発作用は陽性、倍数性細胞誘発作用は疑陽性と報告されている²⁾。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 1988.
- 2) 石館 基 監修, "改訂増補)染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 1987.
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課 監修, "労働安全衛生法, 有害物質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)日本化学物質安全・情報センター, 1996.

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate 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	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0		
SN	1250	24	200	0	4	1	1	0	0	6	6 (3.0)	6 (3.0)	0.0	-	-
	2500	24	200	1	3	0	0	0	0	4	3 (1.5)	4 (2.0)	0.0	-	-
	5000	24	200	0	3	0	0	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
MMC	0.03	24	200	5	37	17	1	1	0	61	55 (27.5)	58 (29.0)	0.0	+	-
Solvent	0	48	200	0	1	1	1	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0		
SN	1250	48	200	0	1	0	1	1	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
	2500	48	200	0	5	0	1	0	0	6	6 (3.0)	6 (3.0)	0.0	-	-
	5000	48	200	3	10	0	0	0	0	13	10 (5.0)	13 (6.5)	0.5	±	-
MMC	0.03	48	200	3	40	26	6	0	0	75	65 (32.5)	67 (33.5)	0.0	+	-

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SN: sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate, MMC: mitomycin C (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate 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	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0		
SN	1250	-	6-(18)	200	0	2	0	1	1	0	4	4 (2.0)	4 (2.0)	0.0	-	-
	2500	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.0	-	-
	5000	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.5		
SN	1250	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	2500	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.5	-	-
	5000	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
BP	20	+	6-(18)	200	0	55	159	3	1	0	218	164 (82.0)	164 (82.0)	0.0	+	-

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SN: sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987).

Table 3 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate without S9 mix [confirmation test]

Group	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	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	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA	
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.5	-	-
SN	1250	48	200	1	0	1	1	0	0	3	2	2 (1.0)	3 (1.5)	0.5	-	-
	2500	48	200	2	2	0	1	0	0	5	3	3 (1.5)	5 (2.5)	0.0	-	-
	5000	48	200	1	6	0	0	0	0	7	6	6 (3.0)	7 (3.5)	0.0	-	-
MMC	0.03	48	200	1	45	48	2	0	0	96	77	77 (38.5)	78 (39.0)	0.0	+	-

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SN: sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate, MMC: mitomycin C (Positive control)
 1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987).

連絡先

試験責任者: 太田絵律奈

試験担当者: 中川宗洋, 石毛裕子,

穴澤由美子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Erina Ohta (Study director)

Munehiro Nakagawa, Yuko Ishige,

Yumiko Anazawa

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,

Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

無断転載・複製(コピー)を禁ず