

既存化学物質の人健康影響に関する情報

資料3-3

(平成18年7月21日 三省合同審議会)

CASNo.	官報公 示番号	物質名称	単回	28日	Reproto	簡易生殖	Ames	染色体	小核	評価文書	頁
81-16-3	4-493	2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸	○		○		○	○			1
98-83-9	3-5	1-メチルエチルベンゼン			○		○	○			18
115-77-5	2-248	ペンタエリストール	○		○		○	○			37
583-39-1	5-472	2-メルカプトベンゾイミダゾール	○	○			○	○		○	57
623-26-7	3-1799	1,4-ジシアノベンゼン	○	○			○	○			109
1477-55-0	3-308	1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼン		○		○	○	○			131
1879-09-0	3-540	6-tert-ブチル-2,4-キシレンオール	○		○		○	○			158
118-69-4	3-78	2,6-ジクロロトルエン			○		○	○			182
92-88-6	4-820	4,4'-ビフェニルジオール	○		○		○	○			207
620-92-8	4-90	4,4'-メチレンジフェノール		○			○	○			241

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸のラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid in Rats

要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するために、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸を雌雄ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は2000 mg/kgを高用量とし、以下1000および500 mg/kgとした。対照として、媒体の0.5% CMC投与群を設けた。

一般状態の観察では、2000 mg/kg群の雌雄で投与後1日に軟便が少数例に、肛門周囲の被毛の汚れが約半数例にみられた。死亡発現はなかった。体重は、各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示した。剖検では、各投与群の雌雄とも著変はみられなかった。2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸のLD₅₀値は、雌雄とも2000 mg/kg以上であった。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体液

被験物質の2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は、黄みの白色ないしごくうすい赤色の固体で、分子量：223.26、直射日光下では急速に着色し、水に難溶であるが、炭酸水素ナトリウム溶液に対する溶解状態は澄明ないしわずかに微濁する性質を有する (Lot No. 07021, 製造元：スガイ化学工業(株)、純度：98.7%、規格値：98.0%以上)。投与終了後に残余被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は98.9%であり、使用期間中の安定性が確認された。媒体として、0.5% CMC水溶液を用いた。

投与検体液は、被験物質を0.5% CMC水溶液に用時懸濁して調製した。投与検体液中の被験物質濃度を、試験施設内でHPLC法により測定した。その結果、被験物質濃度は適正範囲内の値を示した。

2. 使用動物および飼育条件

4週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット [Cfj:CD (SD), (SPF)] を日本チャールス・リバー(株)日野飼育センターから購入した。5日間の検疫期間およびその後4日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められない雌雄各20匹を群分けして試験に用いた。群分けは、体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った。

動物は、室温20~24°C、湿度40~70%、明暗各12時間、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検

疫・馴化期間中および絶食期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製5連ケージを用いて個別飼育した。

飼料は、固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻から投与までの約19時間と投与後約6時間まで絶食させ、その後に飼料を与えた。飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約6時間までは絶食させ、その後に飲料水を与えた。飼料および飲料水の分析の結果、いずれも検査成績は試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は、経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として10 ml/kgで算出した。投与回数は1回とした。投与時の週齢は約5週齢、体重範囲は雄が110~121 g、雌が105~112 gであった。

群構成は、以下の如くとした。1群の動物数は、雌雄各5匹とした。

群	試験群	投与量 雄 雌
第1群	0.5% CMC	10 ml/kg 5 5
第2群	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	500 mg/kg 5 5
第3群	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	1000 mg/kg 5 5
第4群	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	2000 mg/kg 5 5

投与量設定の理由：雄ラットを用いた投与量設定のための予備試験(投与段階：0, 20, 200および2000 mg/kg, 1群3匹)の結果、2000 mg/kg投与においても死亡発現はなく、一般状態、体重推移および剖検にも異常はみられなかった。そこで、当試験では2000 mg/kgを高用量とし、以下公比2で1000および500 mg/kg群を設けた。対照として、同一液量の媒体投与群を設けた。

4. 観察および検査項目

観察期間：観察期間は、投与後14日間とした。

一般状態：投与日は投与前および投与後6時間まで、投与翌日からの観察期間中は1日1回、一般状態および死亡の有無を観察した。

体重測定：投与日および投与後1, 3, 7, 10ならびに14日の午前中に体重を測定した。

剖 検：観察期間終了時に、エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計学的方法

LD₅₀値：観察期間中の死亡率から、概略のLD₅₀値を推定した。

体 重：体重は、各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は対照群と被験物質投与各群の間で多重比較検定を用い、危険率5%未満を有意とした。すなわち、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較をDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用したDunnett法を用いて行った。

結果および考察

1. 一般状態および死亡状況

投与日は、投与後6時間までは対照群および各投与群の雌雄とも異常症状は観察されなかった。

投与後1日には、2000 mg/kg群の雌雄で軟便が各1例に、肛門周囲の被毛の汚れが2~3例にみられた。しかしながら、投与後2日以降にはいずれの群の雌雄とも異常症状は観察されなかった。

雌雄とも、高用量の2000 mg/kgでも死亡発現はなかった。2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸のLD₅₀値は、雌雄とも2000 mg/kg以上であった。

2. 体重推移

各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示し、有意差は認められなかった。

3. 剖検所見

各群の雌雄とも、剖検で著変はみられなかった。

以上のように、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は2000 mg/kgの投与によって、雌雄とも死亡発現はなかった。一般状態では、2000 mg/kg群の雌雄で投与後1日に軟便が少数例に、さらに軟便に伴った変化と思われる肛門周囲の被毛の汚れが約半数例に観察されたが、投与後2日には異常はみられず、軟便症状の消失は早いと考えられた。また、体重推移に異常はなく、剖検でも著変はみられなかった。

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸のLD₅₀値は、雌雄とも2000 mg/kg以上であった。

連絡先

試験責任者：和田 浩

試験担当者：小林吉一、藤村高志、吉島賢一、
牧野浩平、山本明義

(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-62 岐阜県羽島市福寿町間島 6-104

Tel 058-392-6222 Fax 058-391-3171

Correspondence

Authors: Hiroshi Wada (Study director)

Yoshikazu Kobayashi, Takashi Fujimura,

Ken-ichi Yoshijima, Kohei Makino and

Akiyoshi Yamamoto

Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory

6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-62

Japan

Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-391-3171

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸のラットを用いる経口投与による 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid by Oral Administration in Rats

要約

既存化学物質の毒性を評価するために、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸のラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物の反復投与による一般毒性学的な影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検討した。投与段階は、0(媒体)、8, 40, 200および1000 mg/kgとした。

I. 反復投与毒性

1. 雄 (P) に及ぼす影響

一般状態の観察では、1000 mg/kg群で投与期間の初期から最終投与日まで少数例～全例で投与後に流涎がみられたが、投与後約10分には消失した。器官重量では、1000 mg/kg群で肝臓絶対重量および相対重量がともに有意な低値を示した。体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、剖検および病理組織学的検査では、各投与群とも被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 雌 (P) に及ぼす影響

一般状態の観察では、1000 mg/kg群で交配開始前中期から最終投与日まで少数例～全例で投与後に流涎がみられたが、投与後約10分には消失した。体重、摂餌量、剖検、器官重量および病理組織学的検査では、各投与群とも被験物質投与の影響は認められなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物 (P) の生殖発生に及ぼす影響

発情回数、交尾率、交尾日数、受胎雌数、妊娠期間、分娩状態、受胎率、黄体数、着床痕数、着床率および出産率には、各投与群とも被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 新生児 (F₁) に及ぼす影響

出産児数、分娩率、哺育0日の新生児数、死産児数、出生率、性比、一般状態、哺育4日の生存児数、哺育4日の生存率、外表観察および体重には、各投与群とも被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のように、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は1000 mg/kgで雌雄 (P) の一般状態(流涎)および雄 (P) の肝

臓重量に影響がみられた。したがって、当試験条件下における一般毒性学的な無影響量は200 mg/kgと推察された。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄の生殖および児動物の発生に関していずれも1000 mg/kgと推察された。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体液

被験物質の2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は、黄みの白色ないしごくうすい赤色の固体で、分子量：223.26、直射日光下では急速に着色し、水に難溶であるが、炭酸水素ナトリウム溶液に対する溶解状態は澄明ないしわずかに微濁する性質を有する (Lot No. 07021, 製造元：スガイ化学工業(株)、純度：98.7%、規格値：98.0%以上)。投与期間終了後に残余被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は98.9%であり、使用期間中の安定性が確認された。媒体として、0.5% CMC水溶液を用いた。

投与検体液は、被験物質を0.5% CMC水溶液に懸濁して調製した。投与開始前および投与期間終了前の2回、試験施設内でHPLC法により各投与検体液中の被験物質濃度を測定した。その結果、被験物質濃度はいずれも適正範囲内の値を示した。0.5% CMC水溶液中の1.6, 20および200 mg/ml濃度の被験物質は、調製後冷蔵・遮光下で7日間、さらに室温・遮光下で4時間の保存条件で安定であることが確認された。そこで、投与検体液の調製は1週間に1回以上とし、1日分毎に分割して冷蔵・遮光下で保存し、用時室温に戻して投与に用いた。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット [Cj:CD (SD), (SPF)] を日本チャールス・リバー(株)日野飼育センターから購入した。5日間の検疫期間およびその後7日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められない雌雄各60匹の動物を群分けして試験に用いた。群分けは、体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように、投与開始日の前日に行った。

動物は、室温20～24°C、湿度40～70%、明暗各12時間、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレ

ス製5連ケージを用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。また、母動物は妊娠18日に床敷(サンフレック、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージに個別に移し、自然分娩および哺育させた。床敷の分析成績は、当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

飼料は、固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を給餌器に入れ、自由に摂取させた。飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飼料および飲料水の分析の結果、いずれも検査成績は当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。投与液量は、雄では投与日に最も近い測定時の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日に最も近い測定時の体重を、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日の体重を、哺育期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。投与開始時の週齢は雌雄とも約10週齢、体重範囲は雄が349~394 g、雌が209~239 gであった。

群構成は、以下の如くとした。1群の動物数は、雌雄各12匹とした。

投与量設定の理由：雄ラットを用いた投与量設定のための2週間経口投与による予備試験(投与段階：0, 30, 100, 300および1000 mg/kg, 1群5匹)の結果、1000 mg/kg群でも死亡発現はなく、一般状態、体重推移および剖検に異常はみられなかった。

そこで、当試験では1000 mg/kgを最高用量として、以下公比5により200, 40 および8 mg/kg群を設定した。対照として、同一液量の媒体投与群を設けた。

群	試験群	投与量 雄 雌
第1群	0.5 % CMC	5ml/kg 12 12
第2群	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	8mg/kg 12 12
第3群	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	40 mg/kg 12 12
第4群	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	200 mg/kg 12 12
第5群	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	1000 mg/kg 12 12

投与期間は、雄では交配前14日間およびその後35日間の合計49日間とし、雌では交配前14日間、交配期間中(最長8日間)、妊娠期間および哺育4日の剖検の前日(41~48日間)までとした。投与は1日1回で連日とした。

4. 観察および検査項目

1) 雄 (P)

(1) 一般状態および死亡の有無：

投与期間中は毎日投与前・後の2回観察した。

(2) 体 重：

1週間に2回および剖検日に測定した。

(3) 摂 餌 量：

交配開始前14日間および交配期間終了後に、1週間に

2回連続2日間量を測定して1日量に換算した。なお、剖検前日の夕刻からは絶食とした。

(4) 血液学検査：

最終投与の翌日に、ベントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から血液を採取し、以下の検査を実施した。

プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびフィブリノーゲン濃度は、3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスターII, 三共(株))を用いて測定した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数および白血球数(WBC)は、EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex E-2000, 東亜医用電子(株))を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

白血球百分率は、EDTA-2K処理した血液をスライドグラスに塗抹し、May-Giemsa染色標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

網状赤血球数は、EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドグラスに塗抹後、Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を数えた。

(5) 血液生化学検査：

血液学検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液から分離して得た血清について、以下の検査を実施した。

GOTおよびGPTはHenry変法、 γ -GTPは γ -G-P-NA基質法、総蛋白(TP)はBiuret法、尿素窒素(BUN)はUrease-GIDH法、クレアチニンはJaffe法、総ビリルビン(T-Bil)はAzobilirubin法、ブドウ糖はGlucose dehydrogenase法、無機リン(IP)はMolybdenum blue法、Caはo-CPC法により、いずれも自動分析装置(AU 500, オリパス光学工業(株))を用いて測定した。

NaおよびKはイオン選択電極法により、Clは電量滴定法により、いずれも全自動電解質分析装置(EA04, (株)A&T)を用いて測定した。

アルブミン量は、総蛋白量および蛋白分画値(自動電気泳動装置AES 600, オリパス光学工業(株))から算出した。

(6) 剖検：

上記の(4)および(5)の項で採血した動物をさらに放血致死させた後に、器官・組織の肉眼的観察を行った。肝臓、腎臓、胸腺、精巣および精巣上体を摘出後に重量を測定し、さらに副腎、脳、心臓ならびに脾臓を摘出した。その後、精巣および精巣上体はブアン液に、その他の器官・組織は10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

(7) 病理組織学的検査:

固定した全例の各器官および組織について、常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および1000 mg/kg群についてはH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

2) 雌 (P)

(1) 一般状態および死亡の有無:

投与期間中は毎日投与前・後の2回観察した。

(2) 性周期:

投与開始日から交尾確認日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察される場合は1回と数えた。

(3) 体重:

交配開始前14日間および交配期間中は毎週2回、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日に、哺育期間中は哺育0および4日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量:

交配開始前14日間は、1週間に2回連続2日間量を測定して1日量に換算した。また、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および19日からの連続2日間量を、哺育期間中は哺育0~4日の累積量を測定し、それぞれ1日量に換算した。

(5) 分娩状態の観察:

自然分娩させ、分娩状態の異常の有無および分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時までに分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

(6) 哺育状態の観察および剖検:

哺育4日まで毎日観察し、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈より放血致死させた後に剖検して、着床痕数および黄体数を数えた。肝臓、腎臓、胸腺および卵巣を摘出後に重量を測定し、副腎、脳、心臓ならびに脾臓とともに10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

(7) 全新生児が死亡した母動物の処置:

全新生児が死亡した母動物[死産児のみの場合(8 mg/kg群の1例)を含む]は、発見後速やかにエーテル麻酔下で腹大動脈より放血致死させた後に剖検し、着床痕数および黄体数を数えた。肝臓、腎臓、胸腺および卵巣を摘出後に重量を測定し、副腎、脳、心臓ならびに脾臓とともに10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

(8) 病理組織学的検査:

固定した全例の各器官および組織について、常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および1000 mg/kg群についてはH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

3) 親動物 (P) の生殖発生に及ぼす影響

被験物質を14日間にわたって投与した約12週齢の同一群内の雌雄を、1対1の組み合わせで同居交配した。交配期間は、14日を限度として交尾を確認するまでの連続同居交配としたが、同居開始後8日までに全例の交尾が確認

された。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行った。陰垢内に精子または陰栓を確認した雌を交尾動物とし、その日を妊娠0日として起算した。

4) 新生児 (F₁)

(1) 出産時に、総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。

(2) 新生児について、一般状態および死亡の有無を生存期間中毎日1回観察した。

(3) 体重:

哺育0(出生日)および4日に測定した。

(4) 剖検:

哺育4日の観察終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後、剖検した。

5. 統計学的方法

測定値の統計学的方法は下記の検定法を用い、有意差検定は対照群と被験物質各投与群との間で行った。いずれの検定の場合も危険率5%未満を有意とし、5%未満($p < 0.05$)と1%未満($p < 0.01$)とに分けて表示した。なお、新生児は一腹の平均を1単位とした。

1) 多重比較検定

体重、摂餌量、発情回数、交尾日数、妊娠期間、着床痕数、黄体数、着床率、総出産児数、死産児数、分娩率、出生率、哺育4日の生存率、新生児数、性比、外表異常の出現率、器官重量(絶対重量および相対重量)、血液学検査成績および血液生化学検査成績について行った。

検定では、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較はDunnett法(例数が等しい場合)またはScheffé法(例数が等しくない場合)により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用したDunnett法またはScheffé法を用いて行った。

2) χ^2 検定

交尾率、受胎率および出産率について行った。

結果

1. 反復投与毒性

1. 雄 (P) に及ぼす影響

1) 一般状態

対照群および200 mg/kg以下の投与群では、異常症状はみられなかった。

1000 mg/kg群では、投与開始7日以降には最終投与日まで1~12例で投与後に流涎がみられた。当症状は投与後2~3分からみられたが、投与後約10分には消失した。その他には、異常症状は観察されなかった。

2) 体重

各投与群とも対照群とほぼ同様の体重推移を示し、いずれの測定日にも有意差は認められなかった。

3) 摂餌量

1000 mg/kg群で投与6日に有意な高値が認められた以外には、対照群との間に有意差は認められなかった。

4) 血液学検査 (Table 1)

各投与群のいずれの測定項目とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

5) 血液化学検査 (Table 2)

1000 mg/kg群では、対照群に比して総ビリルビンが有意な高値を示した。その他の検査項目は各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

6) 剖検所見

対照群および各投与群のいずれの例とも、剖検で著変はみられなかった。

7) 器官重量 (Table 3)

1000 mg/kg群では、対照群に比して肝臓絶対重量および相対重量がともに有意な低値を示した。200 mg/kg以下の投与群では、いずれの器官重量とも対照群との間に有意差は認められなかった。

8) 病理組織学的検査

肝臓：ごく軽度の壊死巣が対照群および1000 mg/kg群の各1例に、ごく軽度～軽度の肉芽腫が対照群および1000 mg/kg群の6～8例に、ごく軽度～軽度の細胞集簇が対照群および1000 mg/kg群の3～5例にみられた。

心臓：ごく軽度～軽度の細胞浸潤が対照群および1000 mg/kg群の1～4例にみられた。

腎臓：ごく軽度の尿管の好塩基性化が対照群および1000 mg/kg群の1～2例に、ごく軽度の細胞浸潤が対照群および1000 mg/kg群の1～2例にみられた。その他の検査部位(胸腺、脾臓、精巣、精巣上体、副腎および脳)では、いずれも著変はみられなかった。

2. 雌 (P) に及ぼす影響

1) 一般状態

対照群および200 mg/kg以下の投与群では、異常症状は観察されなかった。

1000 mg/kg群では、交配開始前の投与7日以降には0～6例で、妊娠期間中には3～12例で、哺育期間中には全例で投与後に流産がみられた。当症状は投与後2～3分からみられたが、投与後約10分には消失した。

2) 体重

交配開始前および交配期間中、妊娠期間中ならびに哺育期間中を通じて、各投与群の体重は対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

3) 摂餌量

交配開始前および交配期間中、妊娠期間中ならびに哺育期間中を通じて、各投与群の摂餌量は対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

4) 剖検所見

対照群および各投与群のいずれの例とも、剖検で著変はみられなかった。

5) 器官重量 (Table 4)

各投与群とも、いずれの器官重量とも対照群との間に有意差は認められなかった。

6) 病理組織学的検査

肝臓：ごく軽度の壊死巣が対照群の2例にみられた。

心臓：ごく軽度の細胞浸潤が1000 mg/kg群の1例にみられた。

腎臓：尿管内にごく軽度のCa沈着が1000 mg/kg群の1例にみられた。

脾臓：ごく軽度～軽度の髓外造血が対照群および1000 mg/kg群の11～12例にみられた。

その他の検査部位(胸腺、卵巣、副腎および脳)では、いずれも著変はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物 (P) の生殖発生に及ぼす影響 (Table 5, 6)

1) 発情回数

検査・馴化期間中の7日間および交配開始前の投与期間中(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

2) 交尾率、受胎雌数および受胎率

各群の動物とも、同居開始後8日までに全例で交尾が確認された。交尾確認までの日数は、各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。交尾率は、対照群および各投与群とも100%であった。受胎雌数は対照群および各投与群とも12例ずつであり、受胎率は対照群および各投与群とも100%であった。一方、8 mg/kg群の1例では死産児のみで新生児は得られなかった。したがって、新生児を分娩した母動物数は対照群、40,200および1000 mg/kg群では12例ずつであったが、8 mg/kg群では11例であった。

3) 妊娠期間および分娩状態

各投与群の妊娠期間は対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。また、いずれの動物とも分娩状態に異常はみられなかった。

4) 黄体数、着床痕数および着床率

黄体数、着床痕数および着床率は各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

5) 出産率

対照群、40,200および1000 mg/kg群の出産率は100%であった。一方、8 mg/kg群の1例では新生児が得られな

Table 1 Hematological examination of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid by oral administration

Group Dose(mg/kg)	Control		2-amino-1-naphthalenesulfonic acid				
	0	8	40	200	1000		
Number of males	12	12	12	12	12	12	
RBC (10 ⁶ /mm ³)	911.3 ± 34.8	886.5 ± 46.3	892.3 ± 32.5	887.0 ± 43.7	873.2 ± 54.6		
Hemoglobin (g/dl)	15.99 ± 0.53	15.59 ± 0.43	15.76 ± 0.57	15.80 ± 0.38	15.61 ± 0.55		
Hematocrit (%)	47.10 ± 1.57	46.15 ± 1.16	46.45 ± 1.47	46.26 ± 0.97	45.92 ± 1.47		
MCV (μm ³)	51.71 ± 1.41	52.14 ± 1.86	52.07 ± 1.53	52.23 ± 1.91	52.70 ± 2.17		
MCH (pg)	17.57 ± 0.55	17.61 ± 0.70	17.67 ± 0.65	17.84 ± 0.59	17.92 ± 0.71		
MCHC (g/dl)	33.95 ± 0.43	33.80 ± 0.49	33.92 ± 0.46	34.16 ± 0.27	33.98 ± 0.53		
Platelet (10 ⁴ /mm ³)	110.15 ± 13.54	110.36 ± 8.57	103.51 ± 16.40	104.82 ± 10.82	103.40 ± 13.24		
Reticulocyte (%)	25.1 ± 5.5	24.8 ± 3.1	25.4 ± 4.9	24.0 ± 5.0	23.4 ± 4.3		
PT (sec.)	15.17 ± 2.66	14.44 ± 1.32	14.20 ± 1.86	15.92 ± 1.81(11)	14.47 ± 1.75		
APTT (sec.)	29.52 ± 2.97	28.26 ± 2.93	28.59 ± 2.78	29.65 ± 2.08(11)	28.74 ± 2.27		
Fibrinogen (mg/dl)	240.0 ± 20.1	247.2 ± 16.4	237.0 ± 20.6	239.1 ± 5.4(11)	239.2 ± 11.1		
WBC (10 ³ /mm ³)	65.8 ± 16.0	64.2 ± 17.9	68.2 ± 22.4	66.0 ± 20.4	67.5 ± 19.0		
Differential leukocyte (%)							
Lymphocyte	91.5 ± 4.4	90.7 ± 3.3	90.8 ± 3.0	92.0 ± 4.3	91.2 ± 4.2		
Neutrophil	7.6 ± 4.4	8.9 ± 3.3	8.4 ± 2.8	7.6 ± 4.1	8.1 ± 3.8		
Eosinophil	0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.5	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.7		
Basophil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
Monocyte	0.4 ± 0.7	0.3 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5		

Each value shows mean ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of males.

Table 2 Blood chemical examination of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid by oral administration

Group Dose(mg/kg)	Control		2-amino-1-naphthalenesulfonic acid				
	0	8	40	200	1000		
Number of males	12	12	12	12	12	12	
GOT (IU/l)	64.14 ± 8.24	73.41 ± 16.26	64.26 ± 4.41	68.51 ± 14.25	71.06 ± 13.28		
GPT (IU/l)	20.95 ± 2.83	22.61 ± 6.48	21.91 ± 3.36	22.03 ± 5.07	28.47 ± 11.30		
γ-GTP (IU/l)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
TP (g/dl)	5.74 ± 0.18	5.72 ± 0.17	5.70 ± 0.22	5.61 ± 0.27	5.53 ± 0.25		
Albumin (g/dl)	2.852 ± 0.123	2.903 ± 0.121	2.900 ± 0.100	2.871 ± 0.138	2.886 ± 0.157		
T-Bil (mg/dl)	0.065 ± 0.015	0.071 ± 0.008	0.074 ± 0.012	0.068 ± 0.014	0.096 ± 0.013**		
BUN (mg/dl)	19.72 ± 2.34	19.72 ± 2.18	18.98 ± 1.83	19.02 ± 2.20	17.87 ± 2.73		
Creatinine (mg/dl)	0.500 ± 0.073	0.474 ± 0.039	0.458 ± 0.044	0.451 ± 0.047	0.449 ± 0.035		
Glucose (mg/dl)	124.62 ± 13.72	123.78 ± 13.68	130.25 ± 18.15	121.46 ± 11.18	119.02 ± 8.68		
Na (mEq/l)	145.80 ± 1.24	145.77 ± 1.31	145.71 ± 1.74	145.85 ± 1.26	145.53 ± 1.32		
K (mEq/l)	4.233 ± 0.272	4.312 ± 0.215	4.209 ± 0.211	4.245 ± 0.168	4.205 ± 0.195		
Cl (mEq/l)	105.24 ± 1.08	105.55 ± 0.82	105.52 ± 1.28	105.75 ± 1.07	105.08 ± 1.01		
Ca (mg/dl)	9.98 ± 0.23	10.03 ± 0.22	10.18 ± 0.28	9.97 ± 0.34	10.17 ± 0.25		
IP (mg/dl)	6.27 ± 0.74	6.34 ± 0.42	6.22 ± 0.73	6.29 ± 0.74	6.87 ± 0.61		

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (**: P<0.01).

かったため出産率は91.7%であったが、対照群との間に有意差は認められなかった。

2. 新生児 (F₁) に及ぼす影響 (Table 6)

1) 総出産児数および分娩率

総出産児数および分娩率は各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

2) 出生率および性比

哺育0日の新生児数、総死産児数、出生率および性比には、各投与群で投与用量に関連した変動はみられず、いずれも対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 新生児の一般状態、哺育4日の生存率および外表異常の観察

新生児の一般状態では、いずれの群とも異常症状は観察されなかった。

哺育期間中に、対照群および各投与群で1~7例の死亡例がみられた。しかしながら、哺育4日の生存児数および哺育4日の生存率には各投与群で投与用量に関連した変動はみられず、いずれも対照群との間に有意差は認められなかった。

新生児の外表異常の観察では、200 mg/kg群の1例で曲尾が、1000 mg/kg群の1例で短尾がみられた。その他には、著変はみられなかった。

Table 3 Absolute and relative organ weights of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid by oral administration

Group	Dose(mg/kg)	2-amino-1-naphthalenesulfonic acid				
		Control	8	40	200	1000
Number of males		12	12	12	12	12
Body weight	(g)	494.7 ± 24.8	480.2 ± 38.2	493.9 ± 26.6	485.6 ± 21.4	478.2 ± 26.4
Thymus	(mg)	356.11 ± 82.33	328.28 ± 72.93	349.02 ± 101.54	290.50 ± 45.01	305.75 ± 91.68
	(mg%)	72.63 ± 19.59	68.02 ± 11.52	70.59 ± 20.10	59.93 ± 9.55	64.47 ± 21.25
Liver	(g)	13.097 ± 1.668	12.369 ± 1.334	13.451 ± 1.885	12.503 ± 1.067	11.477 ± 1.082*
	(g%)	2.641 ± 0.244	2.576 ± 0.183	2.716 ± 0.285	2.573 ± 0.139	2.398 ± 0.141*
Kidneys	(g)	2.953 ± 0.231	3.017 ± 0.222	2.977 ± 0.254	3.029 ± 0.258	3.032 ± 0.169
	(g%)	0.598 ± 0.047	0.628 ± 0.039	0.603 ± 0.034	0.624 ± 0.055	0.635 ± 0.043
Testes	(g)	3.339 ± 0.164	3.399 ± 0.230	3.527 ± 0.263	3.322 ± 0.245	3.379 ± 0.141
	(g%)	0.675 ± 0.038	0.710 ± 0.053	0.715 ± 0.057	0.685 ± 0.056	0.708 ± 0.037
Epididymides	(g)	1.271 ± 0.079	1.325 ± 0.122	1.305 ± 0.114	1.322 ± 0.083	1.279 ± 0.070
	(g%)	0.257 ± 0.012	0.278 ± 0.014	0.265 ± 0.026	0.272 ± 0.021	0.268 ± 0.017

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*: p<0.05).

Table 4 Absolute and relative organ weights of dams (P) on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid by oral administration

Group	Dose(mg/kg)	2-amino-1-naphthalenesulfonic acid				
		Control	8	40	200	1000
Number of dams		12	11	12	12	12
Body weight	(g)	310.6 ± 13.4	309.9 ± 20.0	317.9 ± 20.9	316.6 ± 18.2	315.1 ± 16.8
Thymus	(mg)	221.62 ± 70.45	201.30 ± 70.54	225.48 ± 72.02	233.65 ± 68.54	189.17 ± 54.61
	(mg%)	71.26 ± 22.21	65.35 ± 23.64	70.76 ± 21.91	73.61 ± 20.13	60.04 ± 17.20
Liver	(g)	13.236 ± 1.409	12.549 ± 1.539	13.101 ± 1.908	12.291 ± 1.065	13.042 ± 1.429
	(g%)	4.259 ± 0.377	4.051 ± 0.442	4.105 ± 0.380	3.881 ± 0.259	4.145 ± 0.476
Kidneys	(g)	2.225 ± 0.219	2.000 ± 0.388	2.103 ± 0.326	2.274 ± 0.331	2.202 ± 0.244
	(g%)	0.716 ± 0.063	0.644 ± 0.107	0.688 ± 0.127	0.720 ± 0.102	0.700 ± 0.076
Ovaries	(mg)	104.47 ± 14.06	99.80 ± 14.25	98.69 ± 15.03	108.09 ± 16.09	102.92 ± 17.18
	(mg%)	33.61 ± 4.00	32.27 ± 4.52	31.24 ± 5.76	34.26 ± 5.57	32.62 ± 4.96

Each value shows mean ± S.D.

4) 新生児の体重

各投与群の新生児の体重は、哺育0日および4日とも雌雄ともに対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

5) 新生児の剖検所見

前述の曲尾および短尾以外には、剖検で著変はみられなかった。

考察

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の、ラットを用いた経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。投与段階は1000 mg/kgを最高用量とし、以下200, 40および8 mg/kgとした。

雄(P)動物に対しては、一般状態の観察で1000 mg/kg群では投与期間の初期から少数例～全例で投与後2～3分に流涎がみられたが、約10分後には消失した。当症状は投与の継続により発現例数は増加したものの、持続時間の延長はみられなかった。摂餌量では、1000 mg/kg群で

一過性の高値が認められたが、体重に影響を及ぼす程のものではなく、偶発所見と考えられた。器官重量では1000 mg/kg群で肝臓の絶対重量および相対重量の有意な低値が認められ、血液化学検査では総ビリルビンが有意な高値を示したことから、当器官への影響がうかがわれた。しかしながら、総ビリルビンの変動幅はごくわずかであり、さらにはほぼ同週齢ラットの当社の背景値にみられる程度の数値であった。また、その他の肝機能に関連すると思われる検査値に変動はみられず、病理組織学的検査でも当群に特異的な組織変化はみられなかった。したがって、総ビリルビンの変動は毒性学的な意義の無いものと思われる。剖検では著変はみられず、さらに体重および血液学検査でも各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

雌(P)動物に対しては、一般状態観察では雄の場合と同様に1000 mg/kg群では投与期間の初期から少数例～全例で投与後に流涎がみられたが、約10分後には消失した。体重、摂餌量、剖検および病理組織学的検査では被験物質投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

Table 5 Estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid by oral administration

Group Dose(mg/kg)	2-amino-1-naphthalenesulfonic acid				
	Control 0	8	40	200	1000
Number of females	12	12	12	12	12
Estrous cases before administration (7 days) Mean±S.D.	1.8 ±0.4	1.9±0.3	1.8±0.5	1.9±0.3	1.8±0.4
Estrous cases before mating (14 days) Mean±S.D.	3.3 ±0.5	3.2 ±0.4	3.4±0.5	3.3±0.5	3.3 ±0.5
Number of pairs	12	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	12	12
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Days before copulation after pairing Mean±S.D.	3.0±1.1	2.5 ±1.2	2.8±1.9	1.7±1.0	2.9±1.2
Number of pregnant females	12	12	12	12	12
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females with live pups	12	11	12	12	12

a): (Number of pairs with successful copulation / Number of pairs) × 100.

b): (Number of pregnant animals / Number of pairs with successful copulation) × 100.

Table 6 Observation of pups (F₁) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid by oral administration

Group Dose(mg/kg)	2-amino-1-naphthalenesulfonic acid				
	Control 0	8	40	200	1000
Number of dams	11	12	12	12	12
Gestation length (days) Mean±S.D. per dam	22.17 ±0.39	22.25±0.45	22.25±0.45	22.17 ±0.39	22.17 ±0.39
Number of corpora lutea Total	207	212	211	213	225
Mean±S.D. per dam	17.3 ±2.1	17.7±2.3	17.6±2.1	17.8±2.1	18.8±2.2
Number of implantation scars Total	181	188	196	191	200
Mean±S.D. per dam	15.1 ±3.5	15.7±3.5	16.3±1.6	15.9±2.6	16.7±2.4
Implantation index ^{a)} Mean±S.D. per dam	86.8 ±16.6	88.6 ±16.9	93.4±8.2	89.3 ±9.2	88.8 ±7.7
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	91.7	100.0	100.0	100.0
Number of live pups born Male	91	74	85	87	83
Female	76	81	89	87	97
Total	167	155	174	174	180
Mean±S.D. per dam	13.9 ±3.6	12.9 ±5.1	14.5 ±2.1	14.5 ±2.5	15.0 ±2.1
Sex ratio ^{c)} Mean±S.D. per dam	0.53 ±0.16	0.49 ±0.08(11)	0.49 ±0.15	0.49 ±0.08	0.46 ±0.17
Birth index ^{d)} Mean±S.D. per dam	90.7 ±12.0	84.2 ±27.5	89.2 ±11.4	91.2 ±8.0	90.4 ±7.9
Number of dead pups on day 0 Total	8	21	12	5	7
Mean±S.D. per dam	0.7 ±1.1	1.8 ±4.3	1.0 ±2.3	0.4 ±0.7	0.6 ±0.9
Number of pups born Total	175	176	186	179	187
Mean±S.D. per dam	14.6 ±3.9	14.7 ±3.3	15.5 ±1.9	14.9 ±2.7	15.6 ±2.2
Delivery index ^{e)} Mean±S.D. per dam	94.6 ±11.3	93.5 ±7.9	94.8 ±5.1	93.7 ±7.3	93.6 ±6.2
Live birth index ^{f)} Mean±S.D. per dam	96.0 ±6.4	88.7 ±28.4	94.3 ±12.7	97.4 ±4.0	96.4 ±5.1
Number of live pups on day 4 Male	88	74(11)	85	86	81
Female	73	80(11)	88	84	97
Total	161	154(11)	173	170	178
Mean±S.D. per dam	13.4 ±3.4	14.0 ±3.2(11)	14.4 ±2.1	14.2 ±2.5	14.8 ±2.1
Viability index ^{g)} Mean±S.D. per dam	96.7 ±6.0	99.4 ±2.1(11)	99.4 ±2.0	97.7 ±3.5	98.8 ±2.8
Number of external anomalies Mean±S.D. per dam	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.5 ±1.7	0.5 ±1.7
Kinky tail Mean±S.D. per dam	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.5 ±1.7	0.0 ±0.0
Brachyury Mean±S.D. per dam	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.5 ±1.7

a): (Number of implantation scars / Number of corpora lutea) × 100.

b): (Number of females with live pups / Number of pregnant females) × 100.

c): Number of male pups / Number of total pups.; Mean ± S.D. per dam.

d): (Number of live pups born / Number of implantation scars) × 100

e): (Number of pups born / Number of implantation scars) × 100; Mean ± S.D. per dam.

f): (Number of live pups born / Number of pups born) × 100; Mean ± S.D. per dam.

g): (Number of live pups on day 4 / Number of live pups born) × 100.; Mean ± S.D. per dam.

以上のように、1000 mg/kg群の雌雄で投与後に流涎がみられること、さらに雄では肝臓重量の低値が認められることから、当試験条件下における2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の一般毒性学的な無影響量は200 mg/kgと推察された。

親動物 (P) の生殖発生に対しては、交尾率、受胎率、発情回数および受胎雌数には、各投与群とも被験物質投与の影響はみられなかった。また、各投与群とも妊娠期間、分娩状態、黄体数、着床痕数、着床率および出産率にも影響はみられなかった。

新生児 (F₁) に対しては、各投与群で総出産児数、分娩率、死産児数、哺育0日の新生児数、出生率、性比に投与用量に関連した変動は認められなかった。また、一般状態および剖検で異常はみられず、哺育4日の生存児数および生存率にも投与用量に関連した変動は認められなかった。体重にも影響は認められなかった。外表観察では200 mg/kg群および1000 mg/kg群の各1例で曲尾と短尾がみられたが、発現頻度は低く、被験物質投与との関連性の無い自然発生的変化と考えられた。

したがって、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄の生殖および児動物の発生に関して、いずれも1000 mg/kgと推察された。

以上により、当試験条件下における一般毒性学的な無影響量は200 mg/kgと推察された。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄の生殖および児動物の発生に関していずれも1000 mg/kgと推察された。

連絡先

試験責任者：和田 浩
試験担当者：小林吉一、藤村高志、長瀬孝彦、
岡田雅昭、牧野浩平、山本明義
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
〒501-62 岐阜県羽島市福寿町間島 6-104
Tel 058-392-6222 Fax 058-391-3171

Correspondence

Authors: Hiroshi Wada (Study director)
Yoshikazu Kobayashi, Takashi Fujimura,
Takahiko Nagase, Masaaki Okada,
Kouhei Makino and Akiyoshi Yamamoto
Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory
6-104 Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu 501-62,
Japan.
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-391-3171

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸について、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験は、50~5000 µg/プレートの用量で、本試験は、312.5~5000 µg/プレートの用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、TA1535の代謝活性化法で2500 µg/プレート以上の用量で溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。以上の結果から、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)と判定された。

材料および試験方法

〔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°C以下で凍結保存した。各検定菌は、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(*pKM101*)の有無についての特性確認を行った。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字型試験管に種菌を接種し、37°C、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〕

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸(CAS No. 81-16-3)は、白色粉末である。純度98.7%のもの(ロット番号: 07021, 不純物不明(1.3%), スガイ化学工業(株)製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略)に50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸のDMSO溶液中での安定性試験を、本試験での低濃度(3.125 mg/ml)および秦野研究所で実施される染色体異常試験(H-93-243)の高濃度(220 mg/ml)の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、いずれも初期値(0時間)の平均に対して、101%であった。

また、本試験Iに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、3.125 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、100~102%、50 mg/ml溶液は、97.3~97.8%であった。

以上の結果から、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸はDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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 : フリルフラマイド (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, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20°Cで凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9混液の組成〕

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
ビオチン	0.5 mM

* : WP2 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、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1リットル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	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸一アンモニウム	1.92g
水酸化ナトリウム	0.66g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

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 混液 (1 ml中下記の成分を含む)

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

** : 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した S9 (キッコーマン(株))を用いた。

[試験方法]

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッブアガー2 ml, 被験物質調製液0.1 ml, リン酸緩衝液0.5 ml(代謝活性化試験においてはS9 混液0.5 ml), 検定菌液0.1 mlを混合したのち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DMSO, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量はTable 1, 2に示した。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、肉眼的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。

[判定基準]

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、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、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは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(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]

50~5000 µg/プレートの範囲で公比を約3とし、試験を

実施したところ、すべての検定菌において直接法、代謝活性化法ともにいずれの用量においても抗菌性は認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに5000 µg/プレートとすることとした。

[本試験]

結果をTable 1, 2に示した。2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸について、312.5~5000 µg/プレートの範囲で、公比を2とし、試験を実施した。2回の試験において、TA1535の代謝活性化法の1250あるいは2500 µg/プレート以上の用量において溶媒対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。平均の比活性は5000 µg/プレートにおいて16.4であった。また、2回目の本試験においてのみ、TA1537の直接法および代謝活性化法とTA98の代謝活性化法において、変異コロニー数が陰性対照群の2倍以上となる群が散見された。

以上の結果に基づき、2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸は、用いた試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, and B.N. Ames, *Mutation Research.*, 113, 173, 1983.
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹
 試験担当者: 坂本京子, 原 巧, 堀谷尚古,
 川上久美子, 松本容彦,
 飯田さやか, 中込まどか
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
 Kyoko Sakamoto, Takumi Hara, Naoko
 Horiya, Kumiko Kawakami,
 Yasuhiko Matsuki,
 Sayaka Iida and Madoka Nakagomi
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5.Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2-amino-1-naphthalene sulfonic acid*

With (+) or without (-)	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	Solvent control	120	106	122	7	12	16	19	15	19	17	19	14	4	6	8
		(116± 8.7)			(12± 4.5)			(18± 2.3)			(17± 2.5)			(6± 2.0)		
	312.5	112	109	138	15	13	13	28	23	21	22	12	18	9	7	5
		(120± 15.9)			(14± 1.2)			(24± 3.6)			(17± 5.0)			(7± 2.0)		
	625	98	99	109	9	9	15	18	17	26	22	16	24	5	4	7
		(102± 6.1)			(11± 3.5)			(20± 4.9)			(21± 4.2)			(5± 1.5)		
	1250	124	100	113	13	17	8	19	16	22	34	15	17	3	2	3
	(112± 12.0)			(13± 4.5)			(19± 3.0)			(22± 10.4)			(3± 0.6)			
S9 Mix (+)	2500	97	106	117	6	13	17	16	20	15	10	15	17	7	4	5
		(107± 10.0)			(12± 5.6)			(17± 2.6)			(14± 3.6)			(5± 1.5)		
	5000	99	95	123	7	10	10	16	17	18	20	23	17	7	6	4
		(106± 15.1)			(9± 1.7)			(17± 1.0)			(20± 3.0)			(6± 1.5)		
S9 Mix (+)	Solvent control	117	119	148	13	8	12	21	13	17	21	30	39	7	12	7
		(128± 17.3)			(11± 2.6)			(17± 4.0)			(30± 9.0)			(9± 2.9)		
	312.5	148	139	124	21	19	10	31	24	20	37	40	43	11	12	18
		(137± 12.1)			(17± 5.9)			(25± 5.6)			(40± 3.0)			(14± 3.8)		
	625	128	133	111	15	12	12	32	13	21	33	27	36	15	6	9
		(124± 11.5)			(13± 1.7)			(22± 9.5)			(32± 4.6)			(10± 4.6)		
S9 Mix (+)	1250	149	157	139	20	23	23	24	19	20	34	27	30	14	12	12
		(148± 9.0)			(22± 1.7)			(21± 2.6)			(30± 3.5)			(13± 1.2)		
	2500	168	166	158	39	52	42	16	12	26	43	38	36	11	18	10
		(164± 5.3)			(44± 6.8)			(18± 7.2)			(39± 3.6)			(13± 4.4)		
S9 Mix (+)	5000	204	195	204	63	95	91	27	26	21	54	49	47	12	6	8
		(201± 5.2)			(83± 17.4)			(25± 3.2)			(50± 3.6)			(9± 3.1)		
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	560	525	535	224	208	211	118	92	107	921	798	845	1131	1232	1368
		(540± 18.0)			(214± 8.5)			(106± 13.1)			(855± 62.1)			(1244± 118.9)		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1132	1168	1165	262	221	218	636	744	884	345	422	418	198	234	238
		(1155± 20.0)			(234± 24.6)			(755± 124.3)			(395± 43.3)			(220± 19.3)		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Purity was 98.7 %.

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2-amino-1-naphthalene sulfonic acid*

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>avr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	Solvent control	106	119	110	11	19	11	9	21	21	27	16	17	9	7	5
		(112 \pm 6.7)			(14 \pm 4.6)			(17 \pm 6.9)			(20 \pm 6.1)			(7 \pm 2.0)		
	312.5	96	124	103	12	15	12	20	21	29	21	20	25	8	7	9
		(108 \pm 14.6)			(13 \pm 1.7)			(23 \pm 4.9)			(22 \pm 2.6)			(8 \pm 1.0)		
	625	123	143	118	16	15	18	29	24	20	18	20	19	14	13	8
		(128 \pm 13.2)			(16 \pm 1.5)			(24 \pm 4.5)			(19 \pm 1.0)			(12 \pm 3.2)		
	1250	128	108	107	13	15	18	19	17	26	18	17	19	13	14	16
	(114 \pm 11.8)			(15 \pm 2.5)			(21 \pm 4.7)			(18 \pm 1.0)			(14 \pm 1.5)			
S9 Mix (-)	2500	118	115	119	16	14	10	21	10	16	15	26	26	16	12	19
		(117 \pm 2.1)			(13 \pm 3.1)			(16 \pm 5.5)			(22 \pm 6.4)			(16 \pm 3.5)		
	5000	121	106	118	12	17	19	13	30	21	24	13	23	18	5	15
	(115 \pm 7.9)			(16 \pm 3.6)			(21 \pm 8.5)			(20 \pm 6.1)			(13 \pm 6.8)			
S9 Mix (+)	Solvent control	134	132	130	15	8	20	17	12	19	25	27	44	12	11	8
		(132 \pm 2.0)			(14 \pm 6.0)			(16 \pm 3.6)			(32 \pm 10.4)			(10 \pm 2.1)		
	312.5	124	120	111	16	22	13	28	26	26	34	36	29	21	13	13
		(118 \pm 6.7)			(17 \pm 4.6)			(27 \pm 1.2)			(33 \pm 3.6)			(16 \pm 4.6)		
	625	134	123	129	13	17	13	20	16	26	43	43	32	23	25	21
		(129 \pm 5.5)			(14 \pm 2.3)			(21 \pm 5.0)			(39 \pm 6.4)			(23 \pm 2.0)		
	1250	170	170	172	21	24	25	26	26	26	48	36	44	20	23	24
	(171 \pm 1.2)			(23 \pm 2.1)			(26 \pm 0.0)			(43 \pm 6.1)			(22 \pm 2.1)			
S9 Mix (+)	2500	151	162	183	72	65	69	22	25	27	55	58	54	16	21	10
		(165 \pm 16.3)			(69 \pm 3.5)			(25 \pm 2.5)			(56 \pm 2.1)			(16 \pm 5.5)		
	5000	185	214	249	108	98	111	19	28	25	64	71	60	18	17	15
	(216 \pm 32.0)			(106 \pm 6.8)			(24 \pm 4.6)			(65 \pm 5.6)			(17 \pm 1.5)			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	512	549	521	260	282	248	174	176	160	764	810	844	1610	1762	1800
		(527 \pm 19.3)			(263 \pm 17.2)			(170 \pm 8.7)			(806 \pm 40.1)			(1724 \pm 100.5)		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	923	916	763	281	218	240	1464	1433	1412	466	422	373	241	223	278
		(867 \pm 90.4)			(246 \pm 32.0)			(1436 \pm 26.2)			(420 \pm 46.5)			(247 \pm 28.0)		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide. 9AA: 9-Aminoacridine. 2AA: 2-Aminoantbracene

*: Purity was 98.7 %.

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の 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 2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/AU) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(24および48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち1.6 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。一方、短時間処理(6時間)のS9 mix存在下および非存在下においては、2.2 mg/ml (10 mM)の濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理として、S9 mix非存在下における24時間および48時間処理、短時間処理としてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)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。

CHL/AU細胞を24時間連続処理した高濃度群(1.6 mg/ml)では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群においては、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。また、代謝活性化法では、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下で6時間処理した高濃度群(2.2 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、S9 mix非存在下のその他の処理群では、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。一方、S9 mix存在下の中濃度群(1.1 mg/ml)では、観察した細胞の22.5%に染色体の構造異常が誘発され、陽性の結果が得られた。しかしながら、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸を培養液に添加すると培養液の色が黄色化することから、本実験で誘発された染色体異常に関しては、それ自身によるDNA傷害作用に起因する可能性に加えて、被験物質添加による培養液の酸性化による可能性も示唆された。

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/AU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: JRH BIOSCIENCES)を

10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/AU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

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸(略号: ANS, CAS No.: 81-16-3, ロット番号: 07021, スカイ化学工業(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は、白色粉末で、水およびアセトンに不溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)に可溶、分子式C₁₀H₉NO₃S、分子量223.26、純度98.7%(不純物1.3%)の物質である。被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、水に安定であり、溶媒中(DMSO)での安定性試験では、3.125~220 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒としてDMSO(Sigma Chemical Co.)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液(増殖抑制試験、染色体異常試験ともに220 mg/ml)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1%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお、濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

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/AU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、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%の増殖抑制濃度をさむ2濃度の値より算出したところ、1.6 mg/mlであった。また、短時間処理のS9 mix非存在下では、2.0 mg/mlであった。一方、S9 mix存在下では、2.2 mg/ml (10 mM) の濃度を含み、処理したすべての濃度範囲で60%を越える増殖抑制は認められなかった (Fig. 1)。

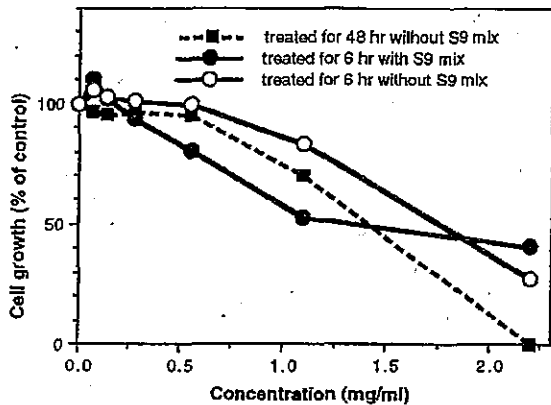


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid

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、連続処理では1.6 mg/ml、短時間処理では2.2 mg/ml (10 mM) とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。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ることが知られている濃度を適用した。

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。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各シャーレにつき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

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(MMS)分科会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、陰性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、フィッシャーのexact probability test法により、陰性対照群と被験物質処理群間および陰性対照群と陽性対照群の有意差検定 ($p < 0.05$) を行った。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

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸を加えて24時間および48時間連続処理した高濃度群 (1.6 mg/ml) では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発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。

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸を加えてS9 mix存在下および非存在化で6時間処理した高濃度群 (2.2 mg/ml) では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかった。S9 mix非存在下のその他の処理群では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。一方、S9 mix存在下の中濃度群 (1.1 mg/ml) では、観察した細胞の22.5%に染色体の構造異常が誘発され、陽性の結果が得られた。

培養液がpH 6.3以下の酸性条件下では、染色体異常が誘発される場合があることが報告³⁾されている。2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸を培養液に添加すると培養液の色が黄色化することから、陽性の結果が得られたS9 mix存在下の中濃度群について、処理直後と処理終了後の培養液のpHを測定したところ、処理直後のpHは5.77で、処理終了後では6.01であった。従って、本実験で誘発された染色体異常に関しては、2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸それ自身によるDNA傷害作用に起因する可能性に加えて、2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸添加による培養液の酸性化による可能性が考えられる。これを明確にするには、さらに詳細な検討が必要であると思われる。

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.
- 2) 石館 基 監修, "<改訂>染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 1987.
- 3) T. Morita, et al., *Mutation Res.*, 268, 297-305, (1992).

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS)**

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid (%)	Judgement ⁴⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾			200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent	0	24	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38		
ANS	0.4	24	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	-	-
ANS	0.8	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-
ANS	1.6	24	7	2	1	4	0	0	0	0	7	0	5* (71.4)	4* (57.1)	0.00 ⁶⁾	Tox	Tox
MC	0.00005	24	200	14	51	83	1	0	6	0	155	0	76* (38.0)	71* (35.5)	0.38	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	2	0	0	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	0 (0.0)	0.25		
ANS	0.4	48	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	0 (0.0)	0.13	-	-
ANS	0.8	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	-	-
ANS	1.6	48	8	4	0	8	0	0	0	10	22	0	6* (75.0)	6* (75.0)	10.00 ⁷⁾	Tox	Tox
MC	0.00005	48	200	18	38	71	2	1	3	30	163	3	79* (39.5)	69* (34.5)	0.63	+	-

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), 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, Tox : toxic. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Nine cells were analysed. 7) Ten cells were analysed. * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 98.7%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid (%)	Judgement ⁴⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾			6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.38		
Solvent	0		6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
ANS	0.6		6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	-	-
ANS	1.1		6-(18)	200	3	1	0	0	1	0	5	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.50	-	-	
ANS	2.2		6-(18)	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 ⁶⁾	Tox	Tox	
CPA	0.005		6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38			
ANS	0.6	+	6-(18)	200	0	0	4	0	0	0	4	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-	
ANS	1.1	+	6-(18)	200	14	26	53	0	0	2	60	155	1	45* (22.5)	40* (20.0)	0.38	+	-
ANS	2.2	+	6-(18)	5	0	2	4	0	0	0	6	0	4* (80.0)	4* (80.0)	0.00 ⁷⁾	Tox	Tox	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	29	99	148	1	5	13	180	475	0	138* (69.0)	135* (67.5)	0.13	+	-

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), 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, Tox : toxic. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Thirty-three cells were analysed. 7) Eight cells were analysed. * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 98.7%.

連絡先

試験責任者 : 田中憲穂
 試験担当者 : 山影康次, 若栗 忍, 中川ゆづき,
 日下部博一, 橋本恵子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 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)
 Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,
 Yuzuki Nakagawa, Hirokazu Kusakabe,
 Keiko Hashimoto
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627