

# 2-ナフトール-3,6-ジ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 2-naphthol-3,6-disulfonate on Bacteria

### 要約

2-ナフトール-3,6-ジ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  $\mu\text{g}$ /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、2-ナフトール-3,6-ジ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, TA1537<sup>1)</sup> および *E. coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> 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  $\mu\text{L}$  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 $1 \times 10^8$ 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

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウム(ロット番号D-1101, スガイ化学工業(株)提供)は、緑がかった灰色の粉末で、水に可溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メタノールに不溶であり、分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$ 、分子量348.26、純度96.4% (不純物として、水約3%、無機分0.1%以下、微量の異性体を含む)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 L-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ヶ月以内のエームステスト用凍結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  $\mu\text{g}$ /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  $\mu\text{g}$ /プレートとし, 以下公比2で2500, 1250, 625, 313および156  $\mu\text{g}$ /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, 2-ナフトール-3,6-ジ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, 2-ナフトールの変異原性については, *S. typhimurium*を用いた復帰突然変異試験で陰性, DNA修復試験では, *Bacillus subtilis*を用いた場合は陰性, *E. coli*を用いた場合は陽性であり, がん原性については陰性と報告されている<sup>3)</sup>。また, シリアンハムスター由来のBHK21cl13細胞を用いたトランスフォーメーション試験では陰性と報告されている<sup>4)</sup>。

#### 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) W. Suter, I. Jaeger, *Mutat. Res.*, **97**, 1 (1982).
- 4) 賀田恒夫, 石館基監修, "環境変異原データ集1," サイエンティスト社, 東京, 1980, p. 289.

#### 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 2-naphthol-3,6-disulfonate 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	125	131	123	8	11	12	11	12	19	10	18	12	11	8	4	[126 $\pm$ 4]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 14 $\pm$ 4]	[ 13 $\pm$ 4]	[ 8 $\pm$ 4]
156	153	151	155	6	10	7	11	14	16	11	28	19	9	7	4	[153 $\pm$ 2]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 14 $\pm$ 3]	[ 19 $\pm$ 9]	[ 7 $\pm$ 3]
313	133	127	122	9	6	8	8	12	12	20	25	24	4	4	7	[127 $\pm$ 6]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 11 $\pm$ 2]	[ 23 $\pm$ 3]	[ 5 $\pm$ 2]
625	137	136	117	9	6	10	10	14	19	23	17	18	3	8	4	[130 $\pm$ 11]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 14 $\pm$ 5]	[ 19 $\pm$ 3]	[ 5 $\pm$ 3]
1250	121	138	122	11	9	10	14	16	16	25	15	20	4	9	5	[127 $\pm$ 10]	[ 10 $\pm$ 1]	[ 15 $\pm$ 1]	[ 20 $\pm$ 5]	[ 6 $\pm$ 3]
2500	159	125	131	8	6	9	19	14	12	25	12	24	4	9	10	[138 $\pm$ 18]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 15 $\pm$ 4]	[ 20 $\pm$ 7]	[ 8 $\pm$ 3]
5000	139	170	153	6	8	9	16	7	21	10	24	13	4	7	3	[154 $\pm$ 16]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 15 $\pm$ 7]	[ 16 $\pm$ 7]	[ 5 $\pm$ 2]
Positive control	951	904	894**	265	289	292**	847	819	926**	399	402	428**	586	482	585**	[916 $\pm$ 30]	[282 $\pm$ 15]	[864 $\pm$ 55]	[410 $\pm$ 16]	[551 $\pm$ 60]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; 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 2-naphthol-3,6-disulfonate 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	121	140	139	8	8	9	13	12	20	33	47	36	11	16	14	[133 $\pm$ 11]	[ 8 $\pm$ 1]	[ 15 $\pm$ 4]	[ 39 $\pm$ 7]	[ 14 $\pm$ 3]
156	130	164	145	7	7	12	12	14	12	43	30	24	15	14	10	[146 $\pm$ 17]	[ 9 $\pm$ 3]	[ 13 $\pm$ 1]	[ 32 $\pm$ 10]	[ 13 $\pm$ 3]
313	142	135	117	17	11	14	15	22	15	31	34	47	9	12	15	[131 $\pm$ 13]	[ 14 $\pm$ 3]	[ 17 $\pm$ 4]	[ 37 $\pm$ 9]	[ 12 $\pm$ 3]
625	119	165	148	12	8	12	15	14	12	36	21	32	13	13	10	[144 $\pm$ 23]	[ 11 $\pm$ 2]	[ 14 $\pm$ 2]	[ 30 $\pm$ 8]	[ 12 $\pm$ 2]
1250	131	167	146	9	7	11	22	18	14	42	31	23	6	7	15	[148 $\pm$ 18]	[ 9 $\pm$ 2]	[ 18 $\pm$ 4]	[ 32 $\pm$ 10]	[ 9 $\pm$ 5]
2500	134	170	154	10	7	13	15	17	16	42	33	30	10	12	15	[153 $\pm$ 18]	[ 10 $\pm$ 3]	[ 16 $\pm$ 1]	[ 35 $\pm$ 6]	[ 12 $\pm$ 3]
5000	140	157	171	9	11	11	15	20	7	30	35	48	10	7	12	[156 $\pm$ 16]	[ 10 $\pm$ 1]	[ 14 $\pm$ 7]	[ 38 $\pm$ 9]	[ 10 $\pm$ 3]
Positive control	361	324	349**	129	137	149**	981	954	972**	244	266	249**	98	102	100**	[345 $\pm$ 19]	[138 $\pm$ 10]	[969 $\pm$ 14]	[253 $\pm$ 12]	[100 $\pm$ 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  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Results of reverse mutation test of sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate 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	152	154	155	9	15	18	20	11	17	20	16	16	6	7	4
	[154 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 5]			[ 16 $\pm$ 5]			[ 17 $\pm$ 2]			[ 6 $\pm$ 2]		
156	163	166	153	13	9	7	11	14	17	21	10	23	9	5	5
	[161 $\pm$ 7]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 14 $\pm$ 3]			[ 18 $\pm$ 7]			[ 6 $\pm$ 2]		
313	137	153	168	14	13	11	12	15	14	19	24	13	3	4	5
	[153 $\pm$ 16]			[ 13 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 6]			[ 4 $\pm$ 1]		
625	142	147	146	14	10	13	11	17	14	12	15	28	5	4	4
	[145 $\pm$ 3]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 3]			[ 18 $\pm$ 9]			[ 4 $\pm$ 1]		
1250	149	134	153	11	8	12	14	10	17	13	21	20	6	5	3
	[145 $\pm$ 10]			[ 10 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 4]			[ 18 $\pm$ 4]			[ 5 $\pm$ 2]		
2500	122	126	137	18	9	12	13	9	15	12	16	19	4	6	3
	[128 $\pm$ 8]			[ 13 $\pm$ 5]			[ 12 $\pm$ 3]			[ 16 $\pm$ 4]			[ 4 $\pm$ 2]		
5000	129	146	134	13	7	11	10	13	8	22	12	13	3	4	3
	[136 $\pm$ 9]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 16 $\pm$ 6]			[ 3 $\pm$ 1]		
Positive control	759	827	721 <sup>a</sup>	373	347	359 <sup>b</sup>	815	763	795 <sup>c</sup>	385	417	403 <sup>d</sup>	763	821	950 <sup>e</sup>
	[769 $\pm$ 54]			[360 $\pm$ 13]			[791 $\pm$ 26]			[402 $\pm$ 16]			[845 $\pm$ 96]		

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; 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 2-naphthol-3,6-disulfonate 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	156	156	140	10	10	17	16	15	14	30	30	34	13	8	12
	[151 $\pm$ 9]			[ 12 $\pm$ 4]			[ 15 $\pm$ 1]			[ 31 $\pm$ 2]			[ 11 $\pm$ 3]		
156	150	141	158	15	14	10	18	13	16	38	25	30	8	16	13
	[150 $\pm$ 9]			[ 13 $\pm$ 3]			[ 16 $\pm$ 3]			[ 31 $\pm$ 7]			[ 12 $\pm$ 4]		
313	153	151	153	12	13	15	17	22	18	19	29	36	15	15	8
	[152 $\pm$ 1]			[ 13 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 28 $\pm$ 9]			[ 13 $\pm$ 4]		
625	173	158	160	14	13	10	16	18	20	33	22	27	11	6	6
	[164 $\pm$ 8]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 18 $\pm$ 2]			[ 27 $\pm$ 6]			[ 8 $\pm$ 3]		
1250	176	153	167	11	12	11	13	19	17	37	28	29	9	16	5
	[165 $\pm$ 12]			[ 11 $\pm$ 1]			[ 16 $\pm$ 3]			[ 31 $\pm$ 5]			[ 10 $\pm$ 6]		
2500	181	179	188	9	15	10	20	13	17	35	34	37	11	14	10
	[183 $\pm$ 5]			[ 11 $\pm$ 3]			[ 17 $\pm$ 4]			[ 35 $\pm$ 2]			[ 12 $\pm$ 2]		
5000	178	160	185	14	12	8	21	23	23	24	18	20	9	8	9
	[174 $\pm$ 13]			[ 11 $\pm$ 3]			[ 22 $\pm$ 1]			[ 21 $\pm$ 3]			[ 9 $\pm$ 1]		
Positive control	503	479	483 <sup>a</sup>	272	219	260 <sup>b</sup>	1003	965	1068 <sup>c</sup>	285	279	293 <sup>a</sup>	112	104	92 <sup>b</sup>
	[488 $\pm$ 13]			[250 $\pm$ 28]			[1012 $\pm$ 52]			[286 $\pm$ 7]			[103 $\pm$ 10]		

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

# 2-ナフトール-3,6-ジ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 2-naphthol-3,6-disulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

2-ナフトール-3,6-ジ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、2-ナフトール-3,6-ジ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(株))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用了。

#### 3. 培養条件

$4 \times 10^3$ 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CO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)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。

#### 5. 被験物質

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウム(ロット番号D-11001, スガイ化学工業(株)提供)は、緑がかった灰色の粉末で、水に可溶、DMSO、メタノールに不溶であり、分子式C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>、分子量348.26、純度96.4% (不純物として、水約3%、無機分0.1%以下、微量の異性体を含む)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(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、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™, オリンパス光学工業(株))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(Appendix 1, 2)、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 Cell growth inhibition test of CHL cells continuously treated with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate without S9 mix

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Average cell growth rate (%)	
	24-hour treatment	48-hour treatment
0 (Solvent)	100	100
78	102.5	87.0
156	101.0	92.5
313	97.5	84.0
625	98.5	84.5
1250	94.0	84.5
2500	92.0	77.5
5000	82.0	60.0

Appendix 2 Cell growth inhibition test of CHL cells treated with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate 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	102.0	95.5
156	95.5	103.5
313	95.0	104.0
625	91.5	97.0
1250	94.0	97.5
2500	89.5	93.0
5000	88.5	90.0

#### 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1250、2500および5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (公比2)の3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シャーレ、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<sup>1)</sup>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 $\chi^2$ 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。2-ナフトール-3,6-ジ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、2-ナフトール-3,6-ジ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<sup>2)</sup> からみても明らかに陰性を示すものであった。

なお、2-ナフトールの変異原性については、*Salmonella typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で陰性、DNA修復試験では、*Bacillus subtilis* を用いた場合は陰性、*Escherichia coli* を用いた場合は陽性であり、がん原性については陰性と報告されている<sup>3)</sup>。また、シリアンハムスター由来のBHK21cl13細胞を用いたトランスフォーメーション試験では陰性と報告されている<sup>4)</sup>。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 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, 東京, 1987, p. 19.
- 3) W. Stuter, I. Jaeger, *Mutat. Res.*, **97**, 1(1982).
- 4) 賀田恒夫, 石館 基 監修, “環境変異原データ集1,” サイエンティスト社, 東京, 1980, p. 289.

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 2-naphthol-3,6-disulfonate without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations			Judgement <sup>3)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)	Polyploid <sup>2)</sup> (%)	SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0	-	-
SNDS	1250	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0)	1(0.5)	0	-	-
	2500	24	200	0	2	0	0	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
	5000	24	200	1	2	0	0	0	0	3	2(1.0)	3(1.5)	0	-	-
MNNG	2.5	24	200	11	37	196	5	0	0	249	196(98.0)	197(98.5)**	0	+	-
Solvent	0	48	200	1	0	0	0	1	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
SNDS	1250	48	200	1	0	1	0	2	0	4	3(1.5)	4(2.0)	0	-	-
	2500	48	200	0	1	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
	5000	48	200	0	0	1	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
MNNG	2.5	48	200	18	41	178	22	8	0	267	183(91.5)	186(93.0)**	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, SNDS: Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate, 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  $\chi^2$  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 2-naphthol-3,6-disulfonate with and without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations			Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)	Polyploid <sup>2)</sup> (%)	SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	1	0	1	0	1	0	3	2(1.0)	3(1.5)	0	-	-
SNDS	1250	-	6-(18)	200	1	0	0	0	1	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
	2500	-	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
	5000	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0	-	-
BP	10	-	6-(18)	200	3	0	1	0	1	0	5	2(1.0)	5(2.5)	0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
SNDS	1250	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0.5	-	-
	2500	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0	-	-
	5000	+	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
BP	10	+	6-(18)	200	13	9	111	5	0	0	138	114(57.0)	121(60.5)**	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, SNDS: Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate, BP: benzo[a]pyrene

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample  $\chi^2$  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.