

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

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

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

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

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

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

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

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

要約

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

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

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

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535

Escherichia coli WP2 *uvrA*

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学の B.N. Ames 博士から分与を受けた。

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

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で約10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

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

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

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2および2AAはDMSOに溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは超純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9 mixの組成〕

1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco) 0.6%

塩化ナトリウム 0.5%

(B)* L-ヒスチジン 0.5 mM

D-ビオチン 0.5 mM

*: WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物 0.2 g

クエン酸・1水和物 2 g

リン酸水素二カリウム 10 g

リン酸一アンモニウム 1.92 g

水酸化ナトリウム 0.66 g

グルコース	20 g
バクトアガー(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

3) S9 mix

1 mL中下記の成分を含む

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

** :7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製されたS9(キッコーマン(株))を用いた。

〔試験方法〕

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

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix 添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37℃で20分間ブレインキューベーションしたのち、トップアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験および再現性試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムに

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

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

〔本試験〕

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

〔再現性試験〕

TA1535のS9 mix無添加試験では、本試験1の313 μ g/プレートで溶媒対照値の2倍となる変異コロニー数の増加が認められたため、再現性および用量依存性を確認するために、313 μ g/プレートを含む100~500 μ g/プレートの範囲で等差で5用量を設定して再現性試験を実施した(Table 3)。その結果、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

文献

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

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

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μ g/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)									
		Base - pair substitution type						Frameshift type			
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
S9 mix (-)	0	106 92 107 (102 $\pm$ 8.4)	8 7 10 (8 $\pm$ 1.5)	24 33 28 (28 $\pm$ 4.5)	39 26 24 (30 $\pm$ 8.1)	7 7 6 (7 $\pm$ 0.6)					
	313	103 108 105 (105 $\pm$ 2.5)	18 14 16 (16 $\pm$ 2.0)	28 16 13 (19 $\pm$ 7.9)	27 27 21 (25 $\pm$ 3.5)	4 2 5 (4 $\pm$ 1.5)					
	625	97 89 103 (96 $\pm$ 7.0)	10 6 11 (9 $\pm$ 2.6)	21 20 16 (19 $\pm$ 2.6)	30 22 20 (24 $\pm$ 5.3)	7 2 6 (5 $\pm$ 2.6)					
	1250	112 89 100 (100 $\pm$ 11.5)	14 10 5 (10 $\pm$ 4.5)	11 18 16 (15 $\pm$ 3.6)	29 30 21 (27 $\pm$ 4.9)	9 9 10 (9 $\pm$ 0.6)					
	2500	111 102 85 (99 $\pm$ 13.2)	8 11 11 (10 $\pm$ 1.7)	13 21 12 (15 $\pm$ 4.9)	35 26 38 (33 $\pm$ 6.2)	5 3 4 (4 $\pm$ 1.0)					
	5000	81 100 92 (91 $\pm$ 9.5)	4 7 4 (5 $\pm$ 1.7)	19 18 18 (18 $\pm$ 0.6)	33 26 22 (27 $\pm$ 5.6)	6 10 3 (6 $\pm$ 3.5)					
S9 mix (+)	0	135 140 122 (132 $\pm$ 9.3)	14 20 14 (16 $\pm$ 3.5)	30 27 25 (27 $\pm$ 2.5)	38 42 45 (42 $\pm$ 3.5)	5 10 9 (8 $\pm$ 2.6)					
	313	141 117 100 (119 $\pm$ 20.6)	8 13 11 (11 $\pm$ 2.5)	19 37 32 (29 $\pm$ 9.3)	30 31 30 (30 $\pm$ 0.6)	6 6 8 (7 $\pm$ 1.2)					
	625	105 114 115 (111 $\pm$ 5.5)	15 14 18 (16 $\pm$ 2.1)	37 27 35 (33 $\pm$ 5.3)	30 34 32 (32 $\pm$ 2.0)	5 6 7 (6 $\pm$ 1.0)					
	1250	119 124 88 (110 $\pm$ 19.5)	7 11 12 (10 $\pm$ 2.6)	32 28 19 (26 $\pm$ 6.7)	34 38 29 (34 $\pm$ 4.5)	4 3 5 (4 $\pm$ 1.0)					
	2500	110 115 102 (109 $\pm$ 6.6)	9 13 14 (12 $\pm$ 2.6)	24 34 30 (29 $\pm$ 5.0)	21 42 27 (30 $\pm$ 10.8)	6 3 7 (5 $\pm$ 2.1)					
	5000	98 113 94 (102 $\pm$ 10.0)	17 9 10 (12 $\pm$ 4.4)	34 28 25 (29 $\pm$ 4.6)	33 36 45 (38 $\pm$ 6.2)	8 9 5 (7 $\pm$ 2.1)					
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA					
	Dose (μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	519 507 546 (524 $\pm$ 20.0)	202 240 217 (220 $\pm$ 19.1)	123 107 115 (115 $\pm$ 8.0)	662 379 350 (464 $\pm$ 172.4)	1161 1115 1192 (1156 $\pm$ 38.7)					
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA					
	Dose (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2					
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	563 479 568 (537 $\pm$ 50.0)	261 186 155 (201 $\pm$ 54.5)	370 340 361 (357 $\pm$ 15.4)	312 322 319 (318 $\pm$ 5.1)	251 229 277 (252 $\pm$ 24.0)					

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

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

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

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)									
		Base - pair substitution type						Frameshift type			
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
S9 mix (-)	0	85 75 80 (80 $\pm$ 5.0)	15 9 9 (11 $\pm$ 3.5)	17 20 20 (19 $\pm$ 1.7)	25 19 23 (22 $\pm$ 3.1)	6 9 6 (7 $\pm$ 1.7)					
	313	68 100 80 (83 $\pm$ 16.2)	18 8 17 (14 $\pm$ 5.5)	19 28 30 (26 $\pm$ 5.9)	35 24 19 (26 $\pm$ 8.2)	5 7 10 (7 $\pm$ 2.5)					
	625	94 93 92 (93 $\pm$ 1.0)	7 7 6 (7 $\pm$ 0.6)	20 19 26 (22 $\pm$ 3.8)	34 24 16 (25 $\pm$ 9.0)	5 6 7 (6 $\pm$ 1.0)					
	1250	89 82 78 (83 $\pm$ 5.6)	10 19 9 (13 $\pm$ 5.5)	30 24 20 (25 $\pm$ 5.0)	26 21 16 (21 $\pm$ 5.0)	7 3 7 (6 $\pm$ 2.3)					
	2500	58 89 84 (77 $\pm$ 16.6)	12 18 11 (14 $\pm$ 3.8)	19 18 18 (18 $\pm$ 0.6)	25 14 24 (21 $\pm$ 6.1)	7 7 7 (7 $\pm$ 0.0)					
	5000	88 87 92 (89 $\pm$ 2.6)	6 6 15 (9 $\pm$ 5.2)	21 31 23 (25 $\pm$ 5.3)	23 15 26 (21 $\pm$ 5.7)	5 7 7 (6 $\pm$ 1.2)					
S9 mix (+)	0	117 127 107 (117 $\pm$ 10.0)	19 9 15 (14 $\pm$ 5.0)	29 23 32 (28 $\pm$ 4.6)	43 30 30 (34 $\pm$ 7.5)	9 7 13 (10 $\pm$ 3.1)					
	313	118 111 89 (106 $\pm$ 15.1)	15 12 13 (13 $\pm$ 1.5)	27 24 25 (25 $\pm$ 1.5)	30 28 30 (29 $\pm$ 1.2)	7 8 11 (9 $\pm$ 2.1)					
	625	123 116 128 (122 $\pm$ 6.0)	13 8 13 (11 $\pm$ 2.9)	20 20 22 (21 $\pm$ 1.2)	28 25 39 (31 $\pm$ 7.4)	7 7 12 (9 $\pm$ 2.9)					
	1250	113 98 85 (99 $\pm$ 14.0)	10 9 8 (9 $\pm$ 1.0)	17 26 10 (18 $\pm$ 8.0)	35 30 32 (32 $\pm$ 2.5)	7 10 5 (7 $\pm$ 2.5)					
	2500	114 99 97 (103 $\pm$ 9.3)	15 13 12 (13 $\pm$ 1.5)	25 26 23 (25 $\pm$ 1.5)	15 24 33 (24 $\pm$ 9.0)	7 11 9 (9 $\pm$ 2.0)					
	5000	119 94 82 (98 $\pm$ 18.9)	12 11 21 (15 $\pm$ 5.5)	19 20 19 (19 $\pm$ 0.6)	23 22 33 (26 $\pm$ 6.1)	13 11 6 (10 $\pm$ 3.6)					
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA					
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	476 432 405 (438 $\pm$ 35.8)	385 366 416 (389 $\pm$ 25.2)	75 78 82 (78 $\pm$ 3.5)	391 352 375 (373 $\pm$ 19.6)	1139 1101 938 (1059 $\pm$ 106.8)					
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA					
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2					
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	349 450 420 (406 $\pm$ 51.9)	221 224 232 (226 $\pm$ 5.7)	238 210 296 (248 $\pm$ 43.9)	195 267 277 (246 $\pm$ 44.7)	181 201 140 (174 $\pm$ 31.1)					

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

Table 3. Confirmation of mutagenicity of potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)					
		Base - pair substitution type					
			TA1535				
S9 mix (-)	0		16 22 18 (19 $\pm$ 3.1)				
	100		19 19 13 (17 $\pm$ 3.5)				
	200		15 8 14 (12 $\pm$ 3.8)				
	300		20 15 19 (18 $\pm$ 2.6)				
	400		18 12 9 (13 $\pm$ 4.6)				
	500		16 10 23 (16 $\pm$ 6.5)				
Positive control S9 mix (-)	Chemical		SA				
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.5				
	Number of colonies/plate		499 491 505 (498 $\pm$ 7.0)				

SA: Sodium azide

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

連絡先

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

Correspondence

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

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of

Potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

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

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

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

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

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内に試験に用いた。

2. 培養液の調製

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

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37℃のCO₂インキュ

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

4. 被験物質

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

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(ロット番号:K6G92, (株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に懸濁して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10 vol%になるように加えた。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

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

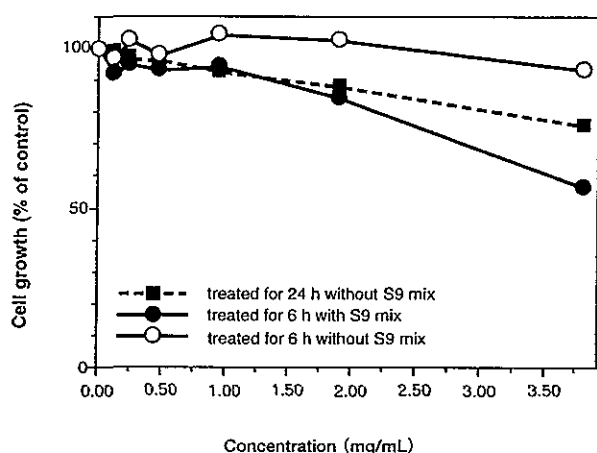


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate

ることが知られている濃度を適用した。

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

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 $\mu\text{g/mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

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

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)¹¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また、構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²¹⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³¹⁾($p < 0.01$)を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

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

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

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

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp: 218-223.

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

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells				Concurrent		Mitotic index ⁷ (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²	total	Others ³	with aberrations		Polyploid ⁴ (%)	Trend test ⁵		cytotoxicity ⁶ (%)
												TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment			200	2	3	0	0	0	0	5	1	5 (2.5)	3 (1.5)	0.76 [*]			—
Solvent ¹	0	24	200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0
PHNS	0.95	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00			104.0
PHNS	1.9	24	200	1	4	1	1	1	0	8	0	8 (4.0)	7 (3.5)	0.25	-	-	91.5
PHNS	3.8	24	200	2	1	1	0	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.13			109.0
MC	0.00005	24	200	7	40	54	0	1	0	102	2	72* (36.0)	67* (33.5)	0.00			—
Solvent ¹	0	48	200	0	2	0	0	0	10	12	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.88			100.0
PHNS	0.95	48	200	0	0	1	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.63			102.5
PHNS	1.9	48	200	1	1	0	1	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.63	-	-	94.5
PHNS	3.8	48	200	2	0	1	0	1	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.88			112.0
MC	0.00005	48	200	4	35	68	5	1	0	113	5	80* (40.0)	76* (38.0)	1.13			—

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C.

1) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. 7) Number of metaphase per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. 8) Seven hundreds and eighty-eight cells were analysed. *:Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact test. **:Purity was 89.2 wt%. Water (about 5%), inorganic salts (about 2%) and slight amount of isomers were contained as impurities.

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

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells				Concurrent		Mitotic index ⁷ (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²	total	Others ³	with aberrations		Polyploid ⁴ (%)	Trend test ⁵		cytotoxicity ⁶ (%)
													TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			—
Solvent ¹	0	-	6-(18)	200	1	0	0	2	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00			100.0
PHNS	0.95	-	6-(18)	200	0	3	0	2	0	0	5	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00			105.0
PHNS	1.9	-	6-(18)	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13	-	-	106.0
PHNS	3.8	-	6-(18)	200	2	2	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.25			116.0
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			—
Solvent ¹	0	+	6-(18)	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25			100.0
PHNS	0.95	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			96.0
PHNS	1.9	+	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-	89.0
PHNS	3.8	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			67.5
CPA	0.005	+	6-(18)	200	13	14	7	2	0	0	36	0	31* (15.5)	20* (10.0)	0.13			—

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide.

1) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. 7) Number of metaphase per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. *:Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact test. **:Purity was 89.2 wt%. Water (about 5%), inorganic salts (about 2%) and slight amount of isomers were contained as impurities.

連絡先

試験責任者：田中憲穂

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

（財）食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

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

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)

Hirokazu Kusakabe, Kiyoshi Sasaki,

Shinobu Wakuri, Yuzuki Nakagawa,

Mika Watanabe, Keiko Hashimoto

Hatano Research Institute, Food and Drug

Safety Center

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

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

