

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

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

Parameter, Mean ± S.D.

\*, Significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.05

\*\*, Significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.01

Table 6 Biochemical findings in rats treated with sodium 3-nitrobenzenesulfonate in 28 day repeat dose oral toxicity test

Test period		Sex	Group	N	Total protein (mg/dL)	Albu- min (g/dL)	A/G	Creati- nine		Glucose (mg/dL)	Total choles- terol (mg/dL)	Triglyce- ride (mg/dL)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	LDH (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)	Met- hemo- globin (%)
Administration																							
Male	0	5	5.3	3.1	1.42	11	0.6	121	41	55	3.0	9.1	144.3	4.82	106.4	382	143	22	64	0	1.6		
			±0.3	±0.1	±0.10	±2	±0.1	±5	±9	±9	±1.7	±0.8	±0.9	±1.98	±1.6	±179	±29	±6	±12	±0	±0.3		
	100	5	4.9	2.8	1.35	12	0.5	117	35	51	7.2	8.6	145.4	3.78	108.9*	359	184	21	71	1			
			±0.1	±0.2	±0.17	±1	±0.1	±11	±4	±11	±0.4	±0.3	±0.6	±0.09	±0.6	±46	±91	±3	±15	±2			
Female	300	5	5.0	2.8	1.32	11	0.6	125	36	62	7.4	8.9	146.3**	3.57**	109.0*	353	108	23	60	1			
			±0.4	±0.3	±0.13	±2	±0.1	±14	±4	±10	±0.6	±0.5	±1.0	±0.11	±1.7	±63	±36	±3	±3	±1			
	1000	5	5.2	2.9	1.30	10	0.6	122	39	63	7.0	9.0	144.4	3.73	106.9	362	101	23	61	1	1.4		
			±0.3	±0.2	±0.13	±2	±0.1	±4	±6	±16	±0.2	±0.4	±1.1	±0.12	±1.7	±66	±10	±2	±3	±1	±0.2		
Recovery	0	5	4.7	2.9	1.60	16	0.6	95	50	33	6.2	8.0	145.2	3.52	112.3	200	93	19	61	0	1.8		
			±0.2	±0.1	±0.14	±6	±0.1	±10	±11	±10	±0.4	±0.2	±0.5	±0.15	±1.2	±54	±19	±3	±8	±0	±0.2		
	100	5	5.2	3.1	1.54	14	0.5	115	51	35	6.3	8.5	143.8**	3.71	109.5**	209	115	20	60	0			
			±0.2	0.2	±0.21	±3	±0.0	±12	±12	±12	±0.7	±0.2	±0.6	±0.09	±0.9	±4	±16	±3	±4	±0			
Male	300	5	5.0	3.0	1.54	13	0.5	111	51	35	6.1	8.4	143.8*	3.62	110.1*	219	103	17	58	0			
			±0.3	±0.2	±0.09	±3	±0.1	±12	±13	±12	±0.8	±0.4	±0.7	±0.18	±1.5	±19	±15	±2	±7	±0			
	1000	5	5.0	3.0	1.48	14	0.6	108	54	37	6.3	8.4	145.3	3.35	110.9	229	146	20	64	0	1.4*		
			±0.4	±0.3	±0.07	±2	±0.0	±12	±9	±10	±0.4	±0.5	±0.9	±0.22	±1.3	±54	±53	±3	±6	±1	±0.2		
Female	0	5	5.6	3.1	1.28	15	0.6	114	45	49	6.4	9.0	142.6	3.98	106.1	300	131	26	69	0			
			±0.2	±0.2	±0.15	±2	±0.0	±5	±9	±12	±0.5	±0.2	±0.9	±0.11	±0.8	±62	±13	±5	±6	±0			
	1000	5	5.2*	3.0	1.40	18	0.6	115	39	46	6.3	8.7	144.2*	3.80	107.9	291	126	26	71	0			
			±0.2	0.1	±0.14	±3	±0.0	±10	±8	±11	±0.5	±0.3	±1.2	±0.30	±1.6	±59	±17	±4	±12	±0			
Recovery	0	5	5.4	3.4	1.67	19	0.7	113	55	38	6.0	8.6	144.0	3.44	110.4	165	104	20	58	0			
			±0.4	0.3	±0.19	±2	±0.1	±13	±9	±6	±0.6	±0.2	±1.0	±0.14	±1.0	±36	±24	±3	±3	±0			
	1000	5	5.4	3.3	1.58	18	0.7	120	55	49	6.2	8.9	144.6	3.53	110.9	162	165	17	58	0			
			±0.3	±0.2	±0.07	±2	±0.0	±20	±14	±11	±0.7	±0.2	±0.5	±0.37	±0.7	32	±70	±2	±6	±0			

Parameter, Mean±S.D.

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

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

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

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

Parameter, Mean±S.D.

# 3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Sodium 3-nitrobenzenesulfonate on Bacteria

### 要約

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

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

156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000  $\mu\text{g}$ /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倍以上の復帰突然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、復帰突然変異コロニー数の増加は認められず、また、菌の生育阻害も認められなかった。

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

### 方法

#### 1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, 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 $1 \times 10^9$ 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

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

#### 2. 被験物質

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

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

#### 3. 被験物質供試液の調製

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

#### 4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

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

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

#### 5. 培地

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

##### 2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

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

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

6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームテスト用凍結S9 mix(キッカーマン(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, 3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発性は陰性

と判定した。

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

文献

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

連絡先

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

Correspondence

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

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

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

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b):  $\text{NaN}_3$ ; 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 3-nitrobenzenesulfonate on bacteria (Dose range finding test) [activation method: +S9]

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

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

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

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

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; 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 3-nitrobenzenesulfonate on bacteria [activation method: +S9]

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

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

# 3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of Sodium 3-nitrobenzenesulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

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

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

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

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

### 方法

#### 1. 試験細胞株

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)〔国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部(元: 国立衛生試験所 変異原性部)から昭和60年1月13日入手〕を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(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を用いた。

#### 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。

#### 5. 被験物質

3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(ロット番号K0116, 小西化学工業(株)提供)は、淡黄色の粉末で、水に対しては20%(20°C)溶け、DMSOに易溶、アセトンに対して難溶であり、分子式C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NNaO<sub>5</sub>S, 分子量225.15, 純度98.8%(不純物として、芒硝0.63%, 食塩0.04%, 水分0.86%; 3,3'-ジニトロジフェニルスルホン0.04%を含む)の物質である。

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

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



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

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

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

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

8. 実験群の設定

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

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

9. 染色体標本の作製

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

10. 染色体の観察

各シャーレ当たり100個、すなわち、1濃度当たり2枚のシャーレの200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)による分類法<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。3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを加えて24時間および48時間処理したいずれの濃度群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理法による結果をTable 2に示した。S9 mix非存在および存在下で6時間処理したいずれの濃度群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

したがって、本実験条件下では、3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムのCHL細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。本試験結果は、CHL細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性とする生物学的判定基準<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、類縁化合物である2-ニトロベンゼンスルホン酸、3-ニトロベンゼンスルホン酸および4-ニトロベンゼンスルホン酸の変異原性については、いずれも *Salmonella typhimurium* TA98, TA100を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>3)</sup>と報告されている。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 1988. pp. 16-37.
- 2) 石館 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) 河合昭宏, 後藤純雄, 松本由美子, 松下秀鶴, 産業医学, 29, 34(1987).

連絡先

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

Correspondence

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

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

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

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

1)JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample  $\chi^2$  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 3-nitrobenzenesulfonate with and without S9 mix

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

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

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

# 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。