

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): 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 ^a | 373 | 347 | 359 ^b | 815 | 763 | 795 ^c | 385 | 417 | 403 ^d | 763 | 821 | 950 ^e |
| | [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): 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 ^a | 272 | 219 | 260 ^b | 1003 | 965 | 1068 ^c | 285 | 279 | 293 ^a | 112 | 104 | 92 ^b |
| | [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を用いた。

3. 培養条件

4×10^3 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CO₂インキュベーター(5% CO₂)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C₁₀H₆Na₂O₇S₂、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¹⁾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 χ^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²⁾ 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³⁾。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⁴⁾。

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 | | | Polyploid ²⁾ | | Judgement ³⁾ | |
|-----------------------|--|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------------------------------|-------------|-----|-------------------------|----|-------------------------|--|
| | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | oth | total | -g (%) | +g (%) | (%) | SA | NA | | |
| Solvent ¹⁾ | 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 χ^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 | | | Polyploid ²⁾ | | Judgement ³⁾ | |
|-----------------------|--|--------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------------------------------|-------------|-----|-------------------------|----|-------------------------|--|
| | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | oth | total | -g (%) | +g (%) | (%) | SA | NA | | |
| Solvent ¹⁾ | 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 χ^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.

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Tris(2-butoxyethyl) phosphate in Rats

要約

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルの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匹について14日間の回復試験を行った。その結果、以下の成績を得た。

投与期間中および回復試験期間中に、溶媒対照群および被験物質投与群において死亡例は認められなかった。

一般状態の変化として、1000 mg/kg 投与群の雌において、初回投与時に、脱力、うつ伏せ状態、粗大呼吸が数例で認められたが、数時間後には回復した。また、雌雄とも被験物質投与群の全例で、投与直後に被験物質の刺激性に起因したと考えられる一過性の流涎が観察され、1000 mg/kg 投与群の雌では投与第16、17、23および25日に保定時から流涎が認められる例もあった。回復試験群では休薬によりこれらの変化はすみやかに消失した。

体重および摂餌量については、溶媒対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

投与期間終了時の尿検査、血液学検査において、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

投与期間終了時の血液生化学検査では、雌雄において血漿中のコリンエステラーゼ活性が用量依存的に低下する傾向があり、1000 mg/kg 投与群の雌雄で有意差が認められた。しかし、赤血球中のコリンエステラーゼ活性に有意差は認められなかった。その他に、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。一方、回復試験期間終了時の検査では、雌雄ともに血漿中および赤血球中のコリンエステラーゼ活性を含む各検査項目において、溶媒対照群と被験物質投与群との間で差は認められなかった。

投与期間終了時屠殺剖検例の1000 mg/kg 投与群の雌雄および300 mg/kg 投与群の雌において、肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。回復試験期間終了時屠殺剖検例では、1000 mg/kg 投与群の雌の腎臓で絶対重量が有意に低下した。

投与期間終了時屠殺剖検例の病理学検査において、肝臓の小肉芽腫が雌では300 mg/kg 投与群で変化の程度

が有意に増強した。また、300 mg/kg 以上の投与群では、小葉周辺帯の肝細胞の微細空胞化の発生頻度および程度がともに増強する傾向にあり、雌の1000 mg/kg 投与群では、統計学的に有意な差が認められた。一方、回復試験期間終了時の屠殺剖検例では、被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

以上の結果、本試験条件下におけるリン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルの無影響量(NOEL)は、雌雄とも100 mg/kg/day であると考えられる。また、被験物質投与に起因すると考えられる上記の変化は、14日間の休薬によりいずれも回復することが明らかとなった。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製

被験物質として、大八化学工業(株)より提供されたリン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステル〔ロット番号:K70702、無色透明、刺激性を有する液体、比重:1.019、純度:98.2%〕を使用した。

被験物質を20% (w/v) の濃度になるようコーンオイル〔ロット番号:V5P5523、ナカライテスク(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投与検体を調製した。投与検体の調製は3~7日間に1回の頻度で行った。なお、リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステル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) コーンオイル溶液中の被験物質は、室温下で8日間は安定であり、また、投与検体中の被験物質の含量は、所定濃度の96.7~100% 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)、厚木飼育センター生産)を8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 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度50~65%、換気回数約15回/時間、照明時間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(220×270×190 mm)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

本試験における投与量は、本試験開始前に秦野研究所で実施したリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルラットにおける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 系ラットにリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルを 1000 mg/kg, 300 mg/kg および 100 mg/kg の用量で7日間反復投与した結果、死亡例はなく、投与直後に一過性の流涎が観察されたほかには一般状態に変化が認められなかった。また、8日目に行った剖検においても、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。従って、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 300 および 100 mg/kg 投与群を設定した。なお、雌雄とも1群を溶媒対照群としてコーンオイルのみを経口投与した。

群分けは、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。各群の匹数および動物番号を以下に示した。

| 群 (投与液の濃度) | 匹数(動物番号) | |
|-------------------------------|-----------|-----------|
| | 雌 | 雄 |
| 溶媒対照群(コーンオイル) | 10(1~10) | 10(31~40) |
| 被験物質 100 mg/kg 投与群(2%, w/v) | 5(11~15) | 5(41~45) |
| 被験物質 300 mg/kg 投与群(6%, w/v) | 5(16~20) | 5(46~50) |
| 被験物質 1000 mg/kg 投与群(20%, w/v) | 10(21~30) | 10(51~60) |

4. 投与方法

本試験の投与経路は、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、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 5ml/kg とし、各投与時に最も近い時点で測定された体重値を基準にして個別に算出した。なお、雌雄とも溶媒対照群および 1000 mg/kg 投与群の各5匹を投与期間終了後、14日間の回復試験に用いた。

5. 検査項目

1) 一般状態の観察

投与期間および回復試験期間を通じて、死亡例の有無を調べたほか、生存例全例について、一般状態を投与期間中は毎日投与前および投与後の2回(回復試験期間中は1回)観察した。

2) 体重および摂餌量の測定

投与開始週では、投与開始直前と投与第4日、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、生存例全例に

ついて1週に2回の頻度で体重を測定し、投与期間あるいは回復試験期間終了日および剖検日にも体重の測定を行った。また、投与開始週では、投与開始日に、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、生存例全例について1週に1回の頻度で1日当たりの摂餌量の測定を行った。

3) 尿検査

投与期間終了週(投与第23日)に各群とも動物番号の若い方から5匹を選択し、また回復試験期間終了週(回復第9日)には回復試験例全例をいずれも、約24時間代謝ケージ(夏目製作所製)に収容して採尿し、尿量〔天秤で計量(尿重量を比重で除す)〕、色調および混濁(視診)、比重〔重量法、天秤(AE200)〕について検査した。なお、pH、潜血、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣の検査は、代謝ケージに収容して約4時間以内に採取した尿について、試験紙法〔マルティスティックス/クリニテック200(マイルス三共)〕および鏡検(光学顕微鏡)によって実施した。

4) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検に先立ち、全例について、約18ないし24時間絶食させたのち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈より EDTA 2K を抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コルターエレクトロニクス社)により赤血球数(電気抵抗法)、白血球数(電気抵抗法)、血色素量(吸光度法)、平均赤血球容積(電気抵抗法)、および血小板数(電気抵抗法)を測定し、これらを基に平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度およびヘマトクリット値を算出した。また、血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa 染色)および網状赤血球比率(Brecher 法)を求めた。なお、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間については、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血した血液を用いて、CA-3000〔光散乱検出法(東亜医用電子)〕により測定した。

5) 血液生化学検査

前述の血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、それぞれ血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロッシュ社)により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG 法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS 法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH 法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・GIDH 法)、クレアチニン濃度(Jaffé 法)、アルカリフォスファターゼ活性(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、GOT 活性(SSCC 法)、GPT 活性(SSCC 法)、LDH 活性(Wroblews-LaDue 法)、コリンエステラーゼ活性(DTNB 法)、カルシウム濃度(OCPC 法)、無機リ濃度(モリブデン酸直接法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS 法)、 γ -GTP(γ -グタミル-3-カルボキシ-p-ニトロアニリド基質法)、A/G 比(総蛋白濃

度およびアルブミン濃度より算出)を測定した。なお、赤血球のコリンエステラーゼ活性の測定は、血液生化学検査用に採血した血液を使用し、Pitzの方法を参考にし、まず、全血0.25 mlを0.9% NaCl 10 mlで3回洗い、洗浄した赤血球に精製水5 mlを加え溶血させ遠心後、上清についてコリンエステラーゼ活性およびヘモグロビン濃度を測定した。赤血球のコリンエステラーゼ活性は、ヘモグロビンあたりの活性として表示した。また、全自動電解質分析装置 EA05(A&T)により、ナトリウム濃度(イオン電極法)、カリウム濃度(イオン電極法)、塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

6) 病理学検査

上記の採血に引き続き、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、肝臓、腎臓、副腎、卵巣または精巣の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、頸髄、下垂体、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、顎下腺(舌下腺を含む)、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、卵巣または精巣、膀胱、大腿骨骨髓、坐骨神経は、0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン液(pH7.2)で固定した。脳、頸髄、顎下腺(舌下腺を含む)、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、坐骨神経のほか、剖検時に肉眼的変化の認められた一部の例の胃、胸腺、肺、直腸、皮膚をパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、病理組織学検査を実施した。

6. 統計処理法

体重、摂餌量、尿検査(半定量検査を除く)、血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量で得られた実測値をもとにして、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群の構成が溶媒対照群を含め3群以上ある場合は、Bartlettの方法による分散の一樣性の検定(有意水準:5%)を行い、ついで、分散が一樣な場合は、一元配置型の分散分析を行い、有意(有意水準:5%)の時はDunnnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。一方、分散が一樣でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意(有意水準:5%)ならばDunnnett型あるいはScheffé型の方法で多重比較を行った。また、試験群が溶媒対照群を含め2群となる場合には、溶媒対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は、等分散であればStudentのt検定、不等分散であればAspin-Welch検定を行った。病理組織検査所見中、溶媒対照群および被験物質投与群の双方に共通してみられ、被験物質投与群で頻度、程度が増強している所見については、Mann-Whitney U test および Fisher exact test を行った。

結果

1. 一般状態

一般状態の変化として、1000 mg/kg 投与群の雌において初回投与30分後に2例で全身または両後肢の脱力が認められ、うつ伏せ状態となりこのうちの1例で軟便の排泄も認められ、さらに30分後にはうずくまり、呼吸も荒くなった。この2例の症状は投与後2~3時間には回復した。また、他の1例においても投与後3時間に両後肢の脱力が認められたが、30分後に回復した。さらに、被験物質投与群の全例で、投与直後に一過性の流涎が観察され、その多くは投与第2日以降に発現し、投与を重ねるに従って流涎のみられる例数が増加する傾向にあった。特に1000 mg/kg 投与群では雌雄ともに全例で、投与第2日からほぼ毎日一過性の流涎が認められるようになり、投与第16、17、23および25日には投与時に保定だけで流涎が観察された例も雌で認められた。また、投与期間中頸部または頬の皮膚に痂皮形成が雌の溶媒対照群および1000 mg/kg 投与群で各1例、雄の溶媒対照群および100 mg/kg 投与群で各1例、300 mg/kg 投与群で2例認められた。投与期間中に痂皮の一部が脱落して潰瘍を形成する例も認められたが、その後、潰瘍あるいは痂皮は次第に縮小し、投与期間終了時の屠殺剖検では、1000 mg/kg 投与群の雌および300 mg/kg 投与群の雄の各1例に痂皮が認められたのみであった。その他に、被験物質投与群において投与直後に摂食行動が多く例で認められたが、用量に依存した変化ではなかった。

2. 体重(Fig. 1)

雌雄共に、投与期間および回復試験期間を通して、溶媒対照群と被験物質投与群との間で平均体重に有意差は認められなかった。

3. 摂餌量(Fig. 2)

雌雄共に、投与期間および回復試験期間を通して、溶媒対照群と被験物質投与群との間で平均摂餌量に有意差は認められなかった。

4. 尿検査(Table 1~4)

投与期間終了週の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌雄において、尿量の増加傾向が認められた。また、300 mg/kg 投与群の雄の1例において、ビリルビンが陽性であった。その他、一部で蛋白質、ケトン体が陽性または疑陽性となる例があり、尿沈渣中に上皮細胞または結晶が観察される例もあったが、いずれも、その出現例数あるいは程度に用量依存性は認められなかった。なお、その他の検査項目については、溶媒対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。また、回復試験期間終了週の検査では、いずれの検査項目にも溶媒対照群と1000 mg/kg 投与群との間で差は認められなかった。

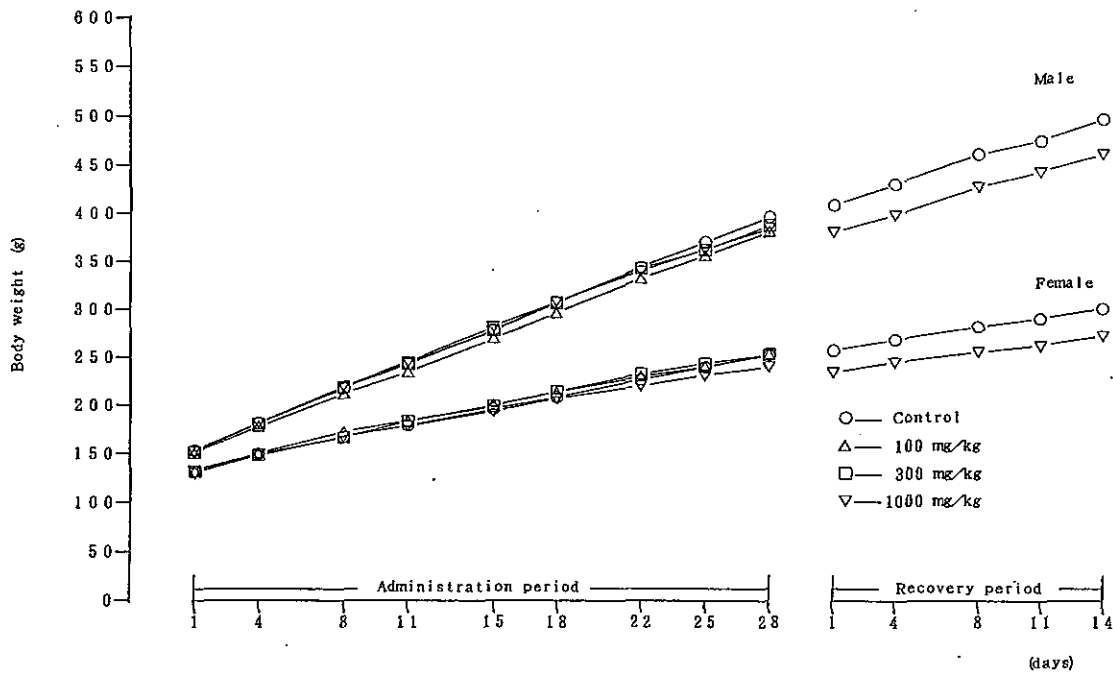


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

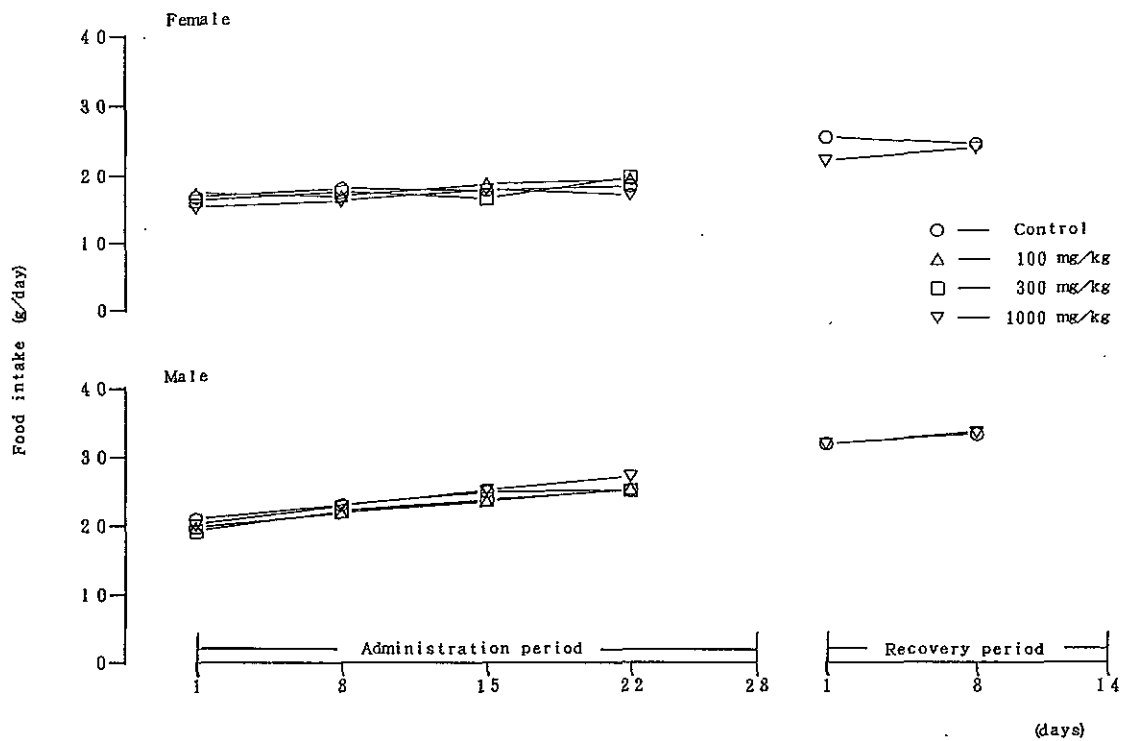


Fig. 2 Food intake of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

5. 血液学検査 (Table 5, 6)

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌および 300 mg/kg 投与群の雄において、白血球数の有意な減少が認められ、300 mg/kg 投与群の雌および 1000 mg/kg 投与群の雄でも白血球数の減少傾向が認められた。その他の検査項目では、雌において100および 300 mg/kg 投与群の平均赤血球血色素濃度と 1000

mg/kg 投与群の血小板数が有意に増加した。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雄において白血球数の有意な減少が認められた。

6. 血液生化学検査 (Table 7~9)

投与期間終了時の検査では、雌雄において血漿中のコリンエステラーゼ活性が用量依存的に低下する傾向にあ