

〔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。

- AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬 (株))
 SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業 (株))
 9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業 (株))
 2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業 (株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業 (株)) に、SAは蒸留水に溶解して試験に用いた。

〔培地およびS9混液の組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比10:1の割合で混合した。

(A)	バクト・アガー (Difco)	0.6%
	塩化ナトリウム	0.5%
(B)*	L-ヒスチジン	0.5 mM
	ビオチン	0.5 mM

* WP2用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社の最少寒天培地を用いた。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	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30mlを流して固めてある。

3) S9混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 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
0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml

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

〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 ml、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (代謝活性化試験においてはS9混液0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにアセトン、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変

異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50~5000 μ g/プレートの範囲で試験を実施したところ、WP2の代謝活性化試験において1500 μ g/プレート以上の用量で、弱い抗菌性が認められた。しかし、WP2の直接試験および他の菌種では抗菌性が認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての菌種において5000 μ g/プレートとし、公比2で5用量を設定した。なお、直接試験では1500 μ g/プレート、代謝活性化試験では500 μ g/プレート以上の用量で寒天表面に被験物質由来の沈澱物が認められた。

〔本試験〕

結果をTables 1, 2に示した。2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンについて312.5~5000 μ g/プレートの範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての試験において抗菌性は認められなかった。なお、代謝活性化試験において、5000 μ g/プレートの用量で寒天表面に被験物質由来の沈澱物が認められた。

以上の結果に基づき、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンは、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 and B. N. Ames, *Mutation Research*. 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, and C. Ramel eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

連絡先: 試験責任者 澁谷徹

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257 神奈川県秦野市落合 729-5

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

Correspondence : Shibuya, Tohru

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

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

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

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-heptamethylnonane*

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)											
			Base-pair substitution type									Frameshift type		
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537
Solvent control	-	-	169 (150 $\pm$ 12.5)	125 (134 $\pm$ 5.1)	157 (22.7)	12 (12 $\pm$ 1.0)	11 (17 $\pm$ 1.5)	13 (1.0)	17 (13 $\pm$ 3.5)	10 (13 $\pm$ 3.5)	13 (3.5)	31 (26 $\pm$ 5.0)	26 (21 $\pm$ 5.0)	13 (10 $\pm$ 2.3)
Test substance	312.5	-	133 (134 $\pm$ 5.1)	140 (133 $\pm$ 5.0)	130 (22.7)	16 (12 $\pm$ 1.0)	19 (17 $\pm$ 1.5)	17 (1.0)	16 (16 $\pm$ 0.6)	15 (11 $\pm$ 2.0)	16 (2.0)	24 (23 $\pm$ 1.0)	23 (22 $\pm$ 0.6)	15 (11 $\pm$ 4.0)
	625	-	138 (133 $\pm$ 5.0)	128 (132 $\pm$ 3.5)	132 (17.1)	8 (13 $\pm$ 2.5)	13 (15 $\pm$ 2.5)	15 (2.5)	11 (11 $\pm$ 2.0)	13 (11 $\pm$ 2.0)	9 (2.0)	23 (23 $\pm$ 7.5)	22 (15 $\pm$ 8.5)	10 (8 $\pm$ 3.1)
	1250	-	136 (132 $\pm$ 3.5)	132 (126 $\pm$ 8.5)	129 (8.5)	13 (11 $\pm$ 0.6)	15 (10 $\pm$ 0.6)	10 (0.6)	9 (11 $\pm$ 3.5)	13 (11 $\pm$ 3.5)	11 (3.5)	30 (23 $\pm$ 2.5)	24 (21 $\pm$ 2.5)	6 (8 $\pm$ 1.7)
	2500	-	104 (123 $\pm$ 17.1)	137 (123 $\pm$ 17.1)	128 (17.1)	7 (12 $\pm$ 4.2)	15 (12 $\pm$ 4.2)	13 (4.2)	10 (12 $\pm$ 4.9)	18 (12 $\pm$ 4.9)	9 (4.9)	27 (26 $\pm$ 12.1)	13 (26 $\pm$ 12.1)	9 (6 $\pm$ 3.1)
	5000	-	118 (126 $\pm$ 8.5)	125 (126 $\pm$ 8.5)	135 (8.5)	11 (11 $\pm$ 0.6)	10 (10 $\pm$ 0.6)	11 (0.6)	15 (11 $\pm$ 3.5)	9 (11 $\pm$ 3.5)	9 (3.5)	16 (19 $\pm$ 2.5)	19 (21 $\pm$ 2.5)	7 (8 $\pm$ 1.7)
Solvent control	+	+	163 (153 $\pm$ 11.8)	140 (147 $\pm$ 15.7)	156 (11.8)	16 (12 $\pm$ 3.8)	10 (15 $\pm$ 3.0)	9 (3.8)	13 (15 $\pm$ 0.6)	12 (15 $\pm$ 0.6)	20 (4.4)	33 (23 $\pm$ 4.7)	31 (24 $\pm$ 3.2)	7 (12 $\pm$ 1.0)
Test substance	312.5	+	135 (147 $\pm$ 15.7)	142 (136 $\pm$ 8.4)	165 (15.7)	18 (10 $\pm$ 2.5)	12 (12 $\pm$ 2.5)	15 (3.0)	14 (9 $\pm$ 4.0)	15 (10 $\pm$ 4.0)	15 (4.0)	28 (24 $\pm$ 2.1)	22 (22 $\pm$ 2.1)	12 (7 $\pm$ 2.6)
	625	+	141 (136 $\pm$ 8.4)	140 (132 $\pm$ 9.3)	126 (9.3)	10 (11 $\pm$ 5.5)	12 (11 $\pm$ 5.5)	7 (5.5)	13 (13 $\pm$ 1.7)	10 (13 $\pm$ 1.7)	5 (1.7)	25 (27 $\pm$ 5.0)	26 (22 $\pm$ 5.0)	10 (5 $\pm$ 1.2)
	1250	+	140 (132 $\pm$ 9.3)	135 (137 $\pm$ 4.7)	122 (4.7)	16 (10 $\pm$ 1.7)	11 (8 $\pm$ 1.7)	5 (1.7)	15 (10 $\pm$ 3.2)	12 (10 $\pm$ 3.2)	12 (3.2)	32 (23 $\pm$ 3.1)	27 (26 $\pm$ 3.1)	5 (7 $\pm$ 2.1)
	2500	+	139 (137 $\pm$ 4.7)	132 (124 $\pm$ 7.5)	141 (7.5)	11 (14 $\pm$ 7.0)	8 (7 $\pm$ 7.0)	11 (7.0)	8 (11 $\pm$ 1.5)	14 (11 $\pm$ 1.5)	9 (1.5)	20 (28 $\pm$ 4.5)	24 (23 $\pm$ 4.5)	5 (7 $\pm$ 0.6)
	5000	+	133 (125 $\pm$ 7.5)	124 (125 $\pm$ 7.5)	118 (7.5)	21 (14 $\pm$ 7.0)	7 (7 $\pm$ 7.0)	13 (7.0)	13 (11 $\pm$ 1.5)	11 (11 $\pm$ 1.5)	10 (1.5)	28 (28 $\pm$ 4.5)	32 (23 $\pm$ 4.5)	7 (7 $\pm$ 0.6)
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1		9AA 80
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		534 (537 $\pm$ 36.1)	575 (537 $\pm$ 36.1)	503 (36.1)	109 (102 $\pm$ 7.0)	102 (102 $\pm$ 7.0)	95 (7.0)	137 (136 $\pm$ 5.0)	131 (136 $\pm$ 5.0)	141 (5.0)	650 (638 $\pm$ 15.9)	644 (638 $\pm$ 15.9)	1563 (1762 $\pm$ 194.2)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5		2AA 2
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		1139 (1126 $\pm$ 82.3)	1201 (1126 $\pm$ 82.3)	1038 (82.3)	214 (214 $\pm$ 3.5)	211 (214 $\pm$ 3.5)	218 (3.5)	628 (624 $\pm$ 3.2)	622 (624 $\pm$ 3.2)	623 (3.2)	521 (554 $\pm$ 33.5)	552 (554 $\pm$ 33.5)	223 (216 $\pm$ 6.0)

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Purity was 99.9%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane*

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)											
			Base-pair substitution type									Frameshift type		
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98		
Solvent control	-	-	166 (159 $\pm$)	147 (10.4)	164 (10.4)	12 (15 $\pm$)	21 (5.5)	11 (5.5)	20 (25 $\pm$)	27 (4.4)	28 (4.4)	32 (30 $\pm$)	35 (6.2)	23 (6.2)
Test substance	312.5	-	142 (153 $\pm$)	167 (12.8)	150 (12.8)	17 (15 $\pm$)	21 (6.7)	8 (6.7)	23 (25 $\pm$)	29 (3.2)	24 (3.2)	23 (22 $\pm$)	17 (4.2)	25 (4.2)
	625	-	127 (135 $\pm$)	141 (7.1)	136 (7.1)	16 (13 $\pm$)	13 (2.5)	11 (2.5)	27 (22 $\pm$)	13 (7.6)	25 (7.6)	26 (22 $\pm$)	19 (3.8)	20 (3.8)
	1250	-	127 (137 $\pm$)	138 (9.1)	145 (9.1)	11 (16 $\pm$)	17 (4.2)	19 (4.2)	14 (18 $\pm$)	23 (4.5)	18 (4.5)	32 (24 $\pm$)	20 (6.7)	21 (6.7)
	2500	-	119 (133 $\pm$)	145 (13.1)	134 (13.1)	14 (12 $\pm$)	11 (1.5)	12 (1.5)	10 (7 $\pm$)	5 (2.9)	5 (2.9)	34 (28 $\pm$)	28 (5.5)	23 (5.5)
	5000	-	135 (135 $\pm$)	125 (10.5)	146 (10.5)	12 (11 $\pm$)	11 (1.0)	10 (1.0)	8 (10 $\pm$)	13 (2.6)	9 (2.6)	33 (24 $\pm$)	18 (7.9)	21 (7.9)
Solvent control	+	+	146 (139 $\pm$)	141 (8.7)	129 (8.7)	11 (12 $\pm$)	17 (4.2)	9 (4.2)	25 (27 $\pm$)	32 (4.0)	25 (4.0)	30 (32 $\pm$)	36 (3.5)	30 (3.5)
Test substance	312.5	+	146 (157 $\pm$)	155 (12.7)	171 (12.7)	22 (18 $\pm$)	17 (3.6)	15 (3.6)	16 (20 $\pm$)	19 (4.6)	25 (4.6)	34 (33 $\pm$)	30 (2.6)	35 (2.6)
	625	+	154 (156 $\pm$)	154 (6.9)	166 (6.9)	14 (13 $\pm$)	14 (1.2)	12 (1.2)	33 (31 $\pm$)	24 (7.0)	31 (7.0)	36 (36 $\pm$)	33 (3.5)	40 (3.5)
	1250	+	162 (158 $\pm$)	151 (6.4)	162 (6.4)	9 (11 $\pm$)	13 (2.1)	10 (2.1)	24 (18 $\pm$)	16 (5.3)	14 (5.3)	40 (33 $\pm$)	28 (6.1)	32 (6.1)
	2500	+	178 (157 $\pm$)	152 (18.6)	142 (18.6)	10 (14 $\pm$)	19 (4.6)	13 (4.6)	24 (21 $\pm$)	22 (3.6)	17 (3.6)	32 (36 $\pm$)	38 (3.5)	38 (3.5)
	5000	+	154 (146 $\pm$)	146 (7.5)	139 (7.5)	12 (13 $\pm$)	11 (2.1)	15 (2.1)	31 (26 $\pm$)	26 (4.5)	22 (4.5)	26 (30 $\pm$)	34 (4.0)	31 (4.0)
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		719 (699 $\pm$)	708 (25.1)	671 (25.1)	236 (268 $\pm$)	271 (30.6)	297 (30.6)	121 (129 $\pm$)	126 (9.8)	140 (9.8)	723 (716 $\pm$)	717 (7.5)	708 (7.5)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		703 (721 $\pm$)	767 (39.8)	694 (39.8)	221 (216 $\pm$)	213 (4.4)	214 (4.4)	372 (367 $\pm$)	337 (28.3)	393 (28.3)	311 (310 $\pm$)	335 (25.5)	284 (25.5)

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Purity was 99.9%

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In vitro Chromosomal Aberration Test of 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

1) 細胞増殖抑制試験

直接法および代謝活性化法のいずれの処理濃度群 (0.02 ~ 2.00 mg/ml) においても、50%をこえる増殖抑制作用は観察されなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法、代謝活性化法ともに10 mMに相当する2.26 mg/mlの処理濃度を高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、いずれの濃度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。但し、48時間処理の高濃度群では分裂抑制のため染色体分析が不可能であった。また、代謝活性化法においても、S9 mix存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかった。

3) 結論

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンは、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

緒言

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの、培養細胞に及ぼす細胞遺伝学影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

この試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECDガイドライン: 473に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものである。

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) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS; J.R.Scientific、ロット番号C019407) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (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。

4. 被験物質

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン (CAS No.: 4390-04-9、ロット番号: AUO2、東京化成工業 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は無色透明の液体で、アセトンに約500 mg/mlまで可溶で、水には溶けない。分子式C₁₉H₃₄、分子量226.45、沸点240℃、比重0.78の物質で、純度は99.9%である (東京化成工業 (株) 資料)。本実験では被験物質がアセトンに可溶であることから、溶媒としてアセトンを用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施したエームス試験 (試験計画番号: M-91-182) における溶媒中での安定性試験では、3~460 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体をアセトン (和光純薬工業 (株)、ロット番号: DCK1899) に溶解して原液 (400または452 mg/ml) を調製し、ついで原液をアセトン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、全ての試験において培養液の0.5% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

染色体異常試験

被験物質のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）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、直接法、代謝活性化法ともに、処理した濃度範囲（0.02～2.00 mg/ml）において50%をこえる増殖抑制は観察されなかったが、直接法の2.00 mg/ml処理群では約44%の増殖抑制がみられた（Fig.1）。

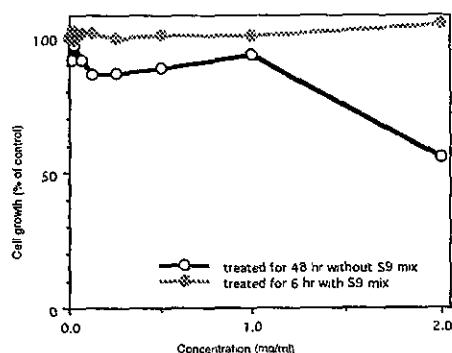


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane in CHL cells

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果と化審法ガイドラインに定める最高濃度である10 mM (2.26 mg/ml) の値を考慮し、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法（24および48時間連続処理）、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）ともに2.26 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。

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0.1μg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、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、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンを加えて24時間および48時間処理した各群において、48時間処理の高濃度群を除き、いずれも染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。た、倍数性細胞についても同様に有意な増加はみられなかった。48時間処理の高濃度群では、分裂抑制のため観察可能な分裂中期細胞が得られなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群においていずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびmix存在下でのCPA処理群では染色体交換（cte）や染色体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画からの逸脱はなかった。

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，1988
- 2) 石館基監修：“＜改訂＞染色体異常試験データ集”，エル・アイ・シー社，1987。

連絡先：試験責任者 田中憲穂

（財）食品薬品安全センター・秦野研究所

〒257 神奈川県秦野市落合 729-5

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

Correspondence : Tanaka, Noriho

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

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

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

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane ** by direct method

Group	Concent-ration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations									Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total			TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	(0.5)	1 (0.5)	0.00		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	1 (0.5)	0.13		
HMN	0.57	24	200	0	1	0	1	0	0	0	2	0	2	(1.0)	2 (1.0)	0.25	-	-
HMN	1.13	24	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3	(1.5)	1 (0.5)	0.13	-	-
HMN	2.26	24	200	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	(1.5)	0 (0.0)	0.25	-	-
MC	0.00005	24	200	15	114	158	5	1	9	20	322	1	139*	(69.5)	137* (68.5)	0.25	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0 (0.0)	0.25		
HMN	0.57	48	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1	(0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-
HMN	1.13	48	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	(0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-
HMN	2.26	48	0														Tox	Tox
MC	0.00005	48	200	15	102	237	6	8	12	120	500	4	152*	(76.0)	151* (75.5)	0.38	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. Tox : toxicity was observed. 1) Acetone was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations were scored as 10. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 99.9%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane ** by metabolic activation method

Group	Concent-ration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations									Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total			TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	1 (0.5)	0.75		
Solvent ¹⁾	0	-	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0 (0.0)	0.50		
HMN	0.57	-	6 - (18)	200	1	2	0	0	0	0	0	3	0	2	(1.0)	1 (0.5)	0.25	-	-
HMN	1.13	-	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0 (0.0)	0.38	-	-
HMN	2.26	-	6 - (18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	0 (0.0)	0.00	-	-
CPA	0.005	-	6 - (18)	200	1	2	0	0	2	0	0	5	0	3	(1.5)	3 (1.5)	0.25	-	-
Solvent ¹⁾	0	+	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	1 (0.5)	0.38		
HMN	0.57	+	6 - (18)	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	(0.5)	1 (0.5)	0.50	-	-
HMN	1.13	+	6 - (18)	200	1	2	0	0	0	0	0	3	0	2	(1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-
HMN	2.26	+	6 - (18)	200	0	2	0	0	0	1	0	3	0	3	(1.5)	3 (1.5)	0.25	-	-
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	16	51	116	2	2	9	0	196	3	116*	(58.0)	113* (56.5)	0.38	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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) Acetone was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 99.9%.

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの ラットを用いた経口投与による急性毒性試験

Acute Oral Toxicity Study of Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate in Rats

要約

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの急性毒性を明らかにするため、雌雄各5匹のSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用い、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの2,000 mg/kg用量を単回経口投与した。投与後14日間の観察期間を通じて、ラットに一般状態の変化や死亡は認められず、体重も順調な増加を示した。また、観察終了時に実施した剖検においても、異常は認められなかった。以上の結果から、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムはラットに対する最小致死量が、2,000 mg/kg以上で、急性毒性の弱い物質と考えられた。

緒言

この試験は、厚生省の既存化学物質安全性点検事業の一環として実施したものであり、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムをラットに経口投与し、本物質の急性毒性を検討したので、その結果を報告する。

方法

1. 被験物質

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは、分子量341.30（無水）の水にやや溶けにくい淡褐色の粉末で、試験には東京化成工業株式会社（東京）から提供されたもの（ロット番号AZ01）を用いた。供試された4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの純度は87.4%（無水成分として）で、残部は結晶水や付着水などの水分であったことから、使用に当たっては純度換算した。

2. 供試動物および飼育条件

動物は、日本チャールス・リバー（株）より導入したSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを、雌雄各5匹用いた。投与時の平均体重（体重の範囲）は、雄144（137～150）g、雌121（114～127）gであった。ラットの飼育は、馴化期間および投与後の観察期間を通じて、温度22±3℃、相対湿度55±10%、換気回数10回以上/時（オールフレッシュエアー方式）、照明12時間（午前6時点灯、午後6時消灯）に設定されたバリアーシステム動物室で、ステンレス製金網ケージに2または3匹ずつ雌雄別に収容して行った。飼料〔日本農産工業（株）、固型飼料ラボMRストック〕と水（1μmカートリッジフィルター濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は自由に摂取させた。ただし、投与前1日午後5時から投与後3時間までは除餌し、水のみを与えた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定のため予備試験を実施した結果、2,000 mg/kg投与によっても死亡はみられず、被験物質は急性毒性の弱い物質であると推測された。従って、用量は2,000 mg/kgの1用量とした。被験物質はメチルセルロース〔和光純薬工業（株）、100cP〕の1.0 w/v%水溶液〔水は局方精製水、共栄製薬（株）〕を媒体にした20 w/v%の懸濁液に調製し、体重1kgあたり10mlを胃ゾンデを用いて強制的にラットの胃内に単回経口投与（投与時刻：午前10時15分～10時20分）した。調整した投与液は分析し、所定濃度に調製されていることを確認した。

4. 観察

観察期間は投与後14日間とし、その間の一般症状の観察と生死の確認は、投与日においては投与後1時間までと投与後約3時間および6時間までにそれぞれ1回ずつ、翌日（投与後1日）以降は午前9時から午後5時までの間に少なくとも1回行った。体重は投与直前（投与0日）、投与後1、3、7および14日に測定し、測定日間の体重増加量を算出した。剖検は、観察期間終了後に動物をエーテル麻酔死させて行った。

結果

1. 死亡率および致死量

2,000 mg/kg投与において、雌雄とも死亡動物は認められず、最小致死量は2,000 mg/kg以上であった。

2. 一般症状および体重

観察期間を通じて、雌雄とも一般症状の変化は認められなかった。また、体重も順調に増加し、被験物質投与の明かな影響は認められなかった。

3. 剖検所見

観察期間終了後の剖検において、雌雄とも臓器の肉眼的な異常は認められなかった。

考察

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムのラットにおける急性経口毒性試験を実施した。その結果、OECDの毒性試験法ガイドラインで規定された限界用量である2,000mg/kgの投与においても死亡は認められず、最小致死量は2,000mg/kg以上であると推定された。また、一般症状、体重増加並びに剖検所見においても、毒性影響を示唆する変化は認められず、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは急性毒性の弱い物質であると考えられた。

連絡先：試験責任者 山本 譲

(財) 畜産生物科学安全研究所

〒 229 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

Tel 0427-62-2775 Fax 0427-62-7979

Correspondence : Yamamoto, Yuzuru

Research Institute for Animal Science in Biochemistry
and Toxicology, Japan

3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa,

229, Japan

Tel 81-427-62-2775 Fax 81-427-62-7979

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムのラットを用いた経口投与による28日間の反復投与毒性試験

28-Day Repeated Dose Oral Toxicity Study of Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate in Rats

要約

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの毒性を明らかにするため、SD系〔Crj:CD(SD)〕ラットに、本物質の0 (溶媒投与の対照、雌雄各12匹)、30 (各6匹)、100 (各6匹)、300 (各6匹) および1,000 mg/kg/日 (各12匹) 用量を28日間にわたって強制経口投与した。また、対照および1,000 mg/kg群の雌雄各6匹については、投与終了後14日間の回復期間を設け、変化の可逆性についても検討した。30、100および300 mg/kg群では、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、尿検査並びに血液学的、血液生化学的および病理学的諸検査において、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム投与の影響と考えられる変化は認められなかった。1,000 mg/kg群においても、単なる内容物の増加による盲腸の軽度な拡張例が雌雄に認められたが、投与期間終了後屠殺動物および回復期間終了後屠殺動物とも、明かな毒性影響と考えられる変化は認められなかった。したがって、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムのラット28日間反復経口投与における無影響量は、1,000 mg/kg/日と推定された。

緒言

この試験は、厚生省の既存化学物質安全性点検事業の一環として実施したものであり、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムをラットに28日間反復経口投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察し、本物質の反復投与毒性を検討したので、その結果を報告する。

方法

1. 被験物質

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは、分子量341.30 (無水) の水にやや溶けにくい淡褐色の粉末で、試験には東京化成工業株式会社 (東京) から提供されたもの (ロット番号AZ01) を用いた。供試された4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの純度は87.4 % (無水物として) で、残部は結晶水や付着水などの水分であったことから、使用に当たっては純度換算した。投与終了後、被験物質を分析し、投与期間中安定であったことを確認した。

2. 供試動物および飼育条件

動物は、日本チャールス・リバー (株) より導入したSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを、雌雄各42匹用いた。各群の動物数は、雌雄それぞれ対照および1,000 mg/kg群は12匹、30、100および300 mg/kg群は6匹とし、このうち対照および1,000 mg/kg群の雌雄各6匹は投与期間終了後14日間の回復試験を行うための回復群に当てた。各群への動物の割り付けは、投与開始日の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。投与開始時の平均体重 (体重範囲) は、雄179 (170~188) g、雌143 (131~156) gであった。動物の飼育は、馴化、投与および回復期間とも、温度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、換気回数10回以上/時 (オールフレッシュエアー方式)、照明12時間 (午前6時点灯、午後6時消灯) に設定したバリアーシステム動物室で、ステンレス製金網ケージに各3匹ずつ雌雄別に収容して行った。飼料〔日本農産工業 (株)、固型飼料ラボMRストック〕と水 (1 μm カートリッジフィルター濾過後紫外線照射した殺菌水道水) は、それぞれ給餌器および自動給水装置により自由摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量は、14日間反復投与による投与量設定試験の結果に基づいて、高用量を毒性試験法ガイドラインにおける上限量の1,000 mg/kg/日とし、以下300、100および30 mg/kg/日用量と、溶媒のみ投与の対照を設定した。被験物質は、メチルセルロース〔和光純薬工業 (株)、100cP〕の1 w/v % 水溶液〔水は共栄製薬 (株)、局方精製水〕を溶媒とし、体重1kg当たりの投与液量が5mlで、純度換算量が所定の投与用量になるような濃度〔30 mg/kg群: 0.686 (純度換算濃度0.6) w/v %; 100 mg/kg群: 2.29 (同2) w/v %; 300 mg/kg群: 6.86 (同6) w/v %; 1,000 mg/kg群: 22.9 (同20) w/v %〕の溶液又は、中および高濃度では懸濁液として調製した。投与は、胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1日1回、28日間にわたって強制的に経口投与した。各個体の投与液量は週1回の測定体重に基づいて算出した。投与液中の被験物質は均一に分散し、また冷所遮光下で少なくとも7日間は安定であることが確認されているので、調製した投与液の使用期間は7日以内とし、使用直前まで各濃度ごとに小分けして冷所遮光 (4°C) 下に保管した。さらに、実際に用いた投与液について濃度分析し、所定の濃度に調製されていることを確認した。