

4. 観察および検査項目

1) 一般状態観察

投与および回復期間中毎日、生死および外観、行動等を観察した。

2) 体重および摂餌量測定

体重は、個体ごとに投与開始日（投与開始直前）およびその後は毎週1回測定した。摂餌量は、ケージごとに毎週1回、24時間の消費量を測定し、1匹あたりの平均摂餌量を算出した。

3) 尿検査

投与開始25日（雄）又は27日（雌）、並びに投与終了後14日（雄）又は13日（雌）に腰背部を圧迫刺激して強制排尿させ、pH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲン〔以上、マイルス・三共（株）、マルティスティックス*〕、並びに外観を検査した。

4) 血液学的検査

供試血液の採取は、投与期間および回復期間終了翌日における屠殺剖検時に行った。動物は採血前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採血は、エーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行った。採取した血液は3分割し、その一部はEDTA-2Kで凝固阻止処理し、多項目自動血球計数装置〔東亜医用電子（株）、E-4000〕により、赤血球数（電気抵抗検出方式）、血色素量（オキシヘモグロビン法）、ヘマトクリット値（パルス検出方式）、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度（以上、計算値）、白血球数および血小板数（以上、電気抵抗検出方式）を、また塗抹標本を作製して、網状赤血球数（Brilliant cresyl blue染色）および白血球百分率（May-Giemsa染色）を測定した。さらに一部の血液を3.8%クエン酸ナトリウム処理して血漿を得、血液凝固自動測定装置（アメルング社、KC-10A）により、プロトロンビン時間（Quick-一段法）および活性化部分トロンボプラスチン時間（エラジン酸活性化法）を測定した。

5) 血液生化学的検査

採取した血液の一部から血清を分離し、生化学自動分析装置〔日本電子（株）、JCA-VX-1000型クリナライザー〕により、総タンパク（Biuret法）、アルブミン（BCG法）、A/G比（計算値）、血糖、トリグリセリド、総コレステロール（以上、酵素法）、総ビリルビン（Jendrassik法）、尿素窒素（Urease-UV法）、クレアチニン（Jaffe法）、GOT、GPT、 γ -GTP（以上、SSCC法）、アルカリフォスファターゼ（GSCC法）、カルシウム（OCPC法）および無機リン（酵素法）を、また電解質自動分析装置〔東亜電波工業（株）、NAKL-1〕により、ナトリウム、カリウムおよび塩素を測定した。

6) 病理学的検査

(1) 剖検

採血後に放血屠殺し、剖検を行った。

(2) 臓器重量測定

脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣又は卵巣を秤量（絶対重量）し、屠殺日の体重をもとに対体重比（相対重量）を算出した。腎臓、副腎、精巣および卵巣は、左右を一括して秤量した。

(3) 病理組織学的検査

対照群および1,000 mg/kg群の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および盲腸について、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色を施して鏡検した。

5. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との間の有意差（危険率5%以下）を次の方法で検定した。すなわち、3群以上の場合、定量的所見についてはBartlettの分散検定を行い、分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行った。分散が一樣でない場合、白血球百分率および尿所見はKruskal-Wallisの順位検定を行った。それらの結果有意差を認めた場合、Dunnett法により対照群に対する各群の比較検定を行った。また、剖検および病理組織学的所見については χ^2 検定を用いた。一方、2群の場合、定量的所見についてはF検定を行い、その結果分散が一樣な場合はStudentのt検定を、一樣でない場合はAspin-Welchのt検定を行った。また、白血球百分率および尿所見についてはMann-WhitneyのU検定を、剖検および病理組織学的所見についてはFisherの直接確率法を用いた。摂餌量については、ケージごとの量を測定するので各群における測定値の数が少なく、有意差検定は実施しなかった。

結果

1. 一般状態および死亡

対照群並びに30、100、300および1,000 mg/kg群の雌雄とも、観察期間を通じて一般状態の変化や死亡は認められなかった。

2. 体重（Figure 1）

投与および回復期間を通じて、被験物質投与各群の体重は、対照群と比べて統計学的に有意な差は認められなかった。雌の回復期間終了後屠殺動物において、1,000 mg/kg群の体重は投与終了時から対照群をやや下回っていたが、回復期間中両群の体重はほぼ平行して推移し、変動は認められなかった。

3. 摂餌量

投与および回復期間を通じて、被験物質投与各群の摂餌量は対照群と比べて差は認められなかった。

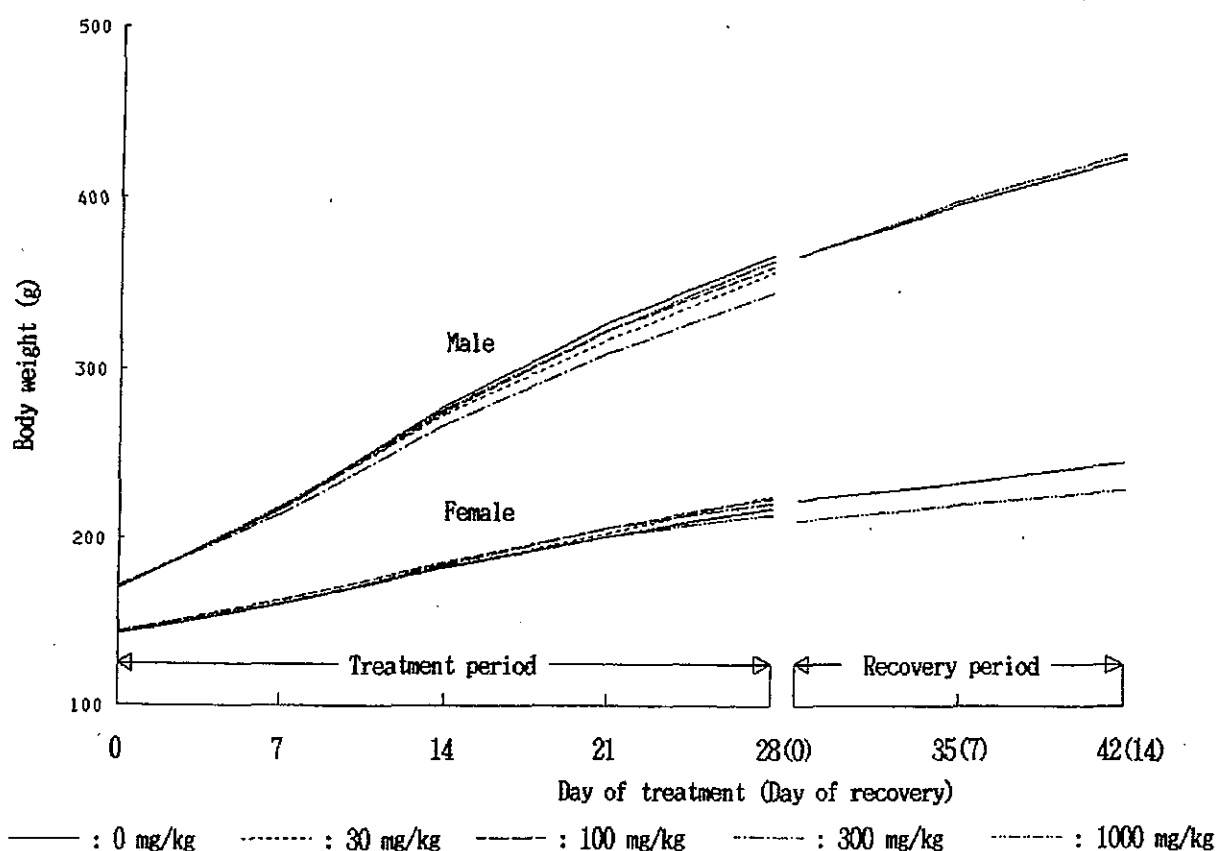


Fig.1 Body weight changes in rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days.

4. 尿所見

投与期間および回復期間終了前のいずれの検査においても、各検査項目に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が考えられる変化は認められなかった。投与期間終了前の1,000 mg/kg群の雄のpHは、やや酸性に傾く傾向が認められたが、統計学的に有意な変化ではなかった。投与期間終了前の検査において、ビリルビンおよびウロビリノーゲン検査用試薬は100 mg/kg以上の用量群の被験尿に対し、本来の呈色反応（ビリルビン：淡褐色；ウロビリノーゲン：桃色）とは異なる色調（ビリルビン：赤紫色；ウロビリノーゲン：橙黄色）に発色し、判定が困難であった。この発色は、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水溶液（100 ppm）に対しても発現することが確認された。

28日間反復投与毒性試験

5. 血液学的所見 (Table 1, 2)

投与期間および回復期間終了後屠殺動物を通じて、被験物質投与各群の雌雄とも、各検査項目に対照群と比べて統計学的に有意な変化は認められなかった。

Table 1 Hematological findings in male rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days

Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC (10 ³ /μ l)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (‰)	PT (sec)	APTT (sec)	
After treatment	0	6	782 ±27	15.2 ±0.3	44.2 ±0.8	57 ±2	19.4 ±0.7	34.4 ±0.6	60 ±5	14.2 ±0.4	20.3 ±1.8	
	30	6	762 ±35	14.9 ±0.6	43.1 ±1.5	57 ±1	19.6 ±0.5	34.6 ±0.4	64 ±8	14.8 ±1.8	21.0 ±3.5	
	100	6	784 ±27	15.1 ±0.5	43.9 ±1.4	56 ±1	19.2 ±0.5	34.3 ±0.4	67 ±8	14.3 ±1.4	20.1 ±4.6	
	300	6	749 ±23	14.5 ±0.6	42.5 ±1.4	57 ±1	19.4 ±0.5	34.0 ±0.5	72 ±12	14.5 ±0.9	19.8 ±1.8	
	1000	6	755 ±36	14.8 ±0.4	43.2 ±1.3	57 ±2	19.7 ±0.6	34.3 ±0.5	64 ±11	14.1 ±0.4	19.2 ±1.0	
After recovery	0	6	818 ±56	14.9 ±0.5	44.0 ±2.1	54 ±1	18.3 ±0.7	33.8 ±0.6	57 ±4	14.5 ±0.9	21.6 ±2.5	
	1000	6	797 ±37	14.6 ±0.6	43.1 ±1.6	54 ±2	18.3 ±0.5	33.8 ±0.3	57 ±6	14.7 ±1.5	21.3 ±2.5	
			WBC	Differential leukocyte counts (%)						Plat.		
			(10 ³ /μ l)	Neutro.						Lymph. Mono. Other		(10 ³ /μ l)
				Baso.	Eosin.	Stab.	Seg.					
After treatment	0	6	85 ±15	0 ±0	1 ±1	0 ±0	7 ±3	91 ±4	1 ±1	0 ±0	157 ±16	
	30	6	66 ±12	0 ±0	1 ±1	0 ±0	12 ±4	88 ±5	0 ±1	0 ±0	157 ±11	
	100	6	65 ±8	0 ±0	1 ±1	0 ±0	10 ±3	88 ±4	1 ±1	0 ±0	167 ±18	
	300	6	63 ±19	0 ±0	1 ±1	0 ±0	21 ±12	78 ±12	1 ±1	0 ±0	172 ±9	
	1000	6	85 ±16	0 ±0	1 ±1	0 ±0	13 ±10	86 ±11	1 ±1	0 ±0	155 ±11	
After recovery	0	6	82 ±18	0 ±0	0 ±1	0 ±0	13 ±5	86 ±4	1 ±1	0 ±0	157 ±24	
	1000	6	83 ±30	0 ±0	1 ±1	0 ±0	13 ±4	86 ±3	1 ±1	0 ±0	156 ±7	

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D..

Abbreviations : RBC, Red blood cell ; Hb, Hemoglobin ; Ht, Hematocrit ; MCV, Mean corpuscular volume ; MCH, Mean corpuscular hemoglobin ; MCHC, Mean corpuscular hemoglobin concentration ; Ret., Reticulocyte ; PT, Prothrombin time ; APTT, Activated partial thromboplastin time ; WBC, White blood cell ; Baso., Basophil ; Eosin., Eosinophil ; Neutro., Neutrophil ; Stab., Stab form ; Seg., Segmented ; Lymph., Lymphocyte ; Mono., Monocyte ; Plat., Platelet

Table 2. Hematological findings in female rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days.

Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. ($\%_{100}$)	PT (sec)	APTT (sec)
After treatment	0	6	777 ± 29	15.1 ± 0.6	42.7 ± 1.5	55 ± 1	19.4 ± 0.4	35.3 ± 0.5	33 ± 7	12.9 ± 0.4	17.9 ± 0.6
	30	6	770 ± 45	14.7 ± 0.4	42.2 ± 1.2	55 ± 2	19.1 ± 0.9	34.8 ± 0.6	44 ± 6	13.6 ± 0.3	18.2 ± 1.1
	100	6	779 ± 35	14.9 ± 0.6	42.6 ± 1.3	55 ± 1	19.1 ± 0.3	34.9 ± 0.7	41 ± 10	13.3 ± 0.5	17.5 ± 1.3
	300	6	752 ± 43	14.5 ± 0.5	41.8 ± 1.5	55 ± 1	19.4 ± 0.5	34.8 ± 0.4	38 ± 6	13.2 ± 0.4	18.5 ± 0.9
	1000	6	785 ± 48	14.8 ± 0.6	42.7 ± 1.8	54 ± 2	18.9 ± 0.7	34.8 ± 0.3	33 ± 11	12.9 ± 0.5	18.9 ± 1.8
After recovery	0	6	813 ± 21	15.2 ± 0.4	44.4 ± 0.7	55 ± 1	18.8 ± 0.5	34.3 ± 0.5	43 ± 7	13.9 ± 0.8	19.0 ± 1.0
	1000	6	814 ± 35	15.2 ± 0.5	44.0 ± 1.6	54 ± 1	18.7 ± 0.4	34.6 ± 0.3	49 ± 9	14.0 ± 0.5	18.1 ± 0.5
			WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	Differential leukocyte counts (%)							Plat. ($10^4/\mu\text{l}$)
				Baso.	Eosin.	Neutro. Stab.	Seg.	Lymph.	Mono.	Other	
After treatment	0	6	48 ± 19	0 ± 0	2 ± 1	0 ± 0	8 ± 4	89 ± 5	1 ± 1	0 ± 0	156 ± 14
	30	6	53 ± 8	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	9 ± 5	90 ± 5	0 ± 1	0 ± 0	141 ± 32
	100	6	47 ± 12	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	11 ± 4	87 ± 5	1 ± 1	0 ± 0	151 ± 11
	300	6	46 ± 11	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	13 ± 5	87 ± 5	1 ± 1	0 ± 0	144 ± 12
	1000	6	42 ± 15	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	8 ± 3	91 ± 3	0 ± 1	0 ± 0	163 ± 23
After recovery	0	6	51 ± 25	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	9 ± 4	90 ± 3	1 ± 0	0 ± 0	145 ± 12
	1000	6	47 ± 11	0 ± 0	2 ± 2	0 ± 0	9 ± 6	89 ± 7	0 ± 1	0 ± 0	147 ± 14

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

Abbreviations : RBC, Red blood cell ; Hb, Hemoglobin ; Ht, Hematocrit ; MCV, Mean corpuscular volume ; MCH, Mean corpuscular hemoglobin ; MCHC, Mean corpuscular hemoglobin concentration ; Ret., Reticulocyte ; PT, Prothrombin time ; APTT, Activated partial thromboplastin time ; WBC, White blood cell ; Baso., Basophil ; Eosin., Eosinophil ; Neutro., Neutrophil ; Stab., Stab form ; Seg., Segmented ; Lymph., Lymphocyte ; Mono., Monocyte ; Plat., Platelet

6. 血液生化学的所見 (Table 3,4)

投与期間終了後屠殺動物において、雌雄とも1,000 mg/kg群の総ビリルビン量のみが対照群と比べ高値を示し、統計学的有意差が認められた。ビリルビン検査用試薬で被験物質水溶液 (0.1~1000ppm) を検査した結果、被験物質の濃度に依存して試薬が反応することが確認された。

回復期間終了後屠殺動物では、投与期間終了後屠殺動物で認められたビリルビンの変化は認められなかった。しかし、これとは別に、1,000 mg/kg群において、いずれも軽度なアルブミン量の減少およびそれに伴うA/G比の低下が雄に、無機リン量の減少が雌に認められた。

Table 3. Biochemical findings in male rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days.

Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G	T-Chol. (mg/dl)	T.G. (mg/dl)
After treatment	0	6	62 ±5	34 ±6	379 ±50	0.25 ±0.19	6.09 ±0.23	2.84 ±0.16	0.88 ±0.07	85 ±10	107 ±33
	30	6	66 ±6	34 ±6	441 ±80	0.33 ±0.18	5.97 ±0.24	2.81 ±0.18	0.89 ±0.05	88 ±10	112 ±31
	100	6	64 ±6	36 ±5	471 ±135	0.42 ±0.36	5.96 ±0.20	2.83 ±0.11	0.90 ±0.05	92 ±16	91 ±27
	300	6	68 ±5	36 ±6	372 ±117	0.32 ±0.27	6.00 ±0.29	2.84 ±0.12	0.91 ±0.10	94 ±12	87 ±20
	1000	6	65 ±5	35 ±5	399 ±98	0.36 ±0.45	6.14 ±0.17	2.89 ±0.09	0.89 ±0.05	84 ±19	108 ±26
After recovery	0	6	66 ±6	40 ±4	316 ±64	0.26 ±0.16	6.31 ±0.32	2.94 ±0.10	0.88 ±0.08	84 ±8	129 ±44
	1000	6	61 ±4	32 ±8	348 ±64	0.15 ±0.11	6.26 ±0.24	2.74* ±0.13	0.78* ±0.05	88 ±16	113 ±55
			Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
After treatment	0	6	141 ±14	0.41 ±0.05	15.9 ±1.6	0.45 ±0.05	10.2 ±0.2	7.3 ±0.3	141 ±1	4.29 ±0.22	100 ±1
	30	6	136 ±6	0.42 ±0.05	15.7 ±1.8	0.48 ±0.05	10.2 ±0.3	7.5 ±0.6	141 ±1	4.50 ±0.22	101 ±1
	100	6	129 ±8	0.40 ±0.02	14.6 ±1.5	0.44 ±0.04	10.3 ±0.3	7.4 ±0.3	141 ±1	4.35 ±0.12	100 ±2
	300	6	132 ±15	0.41 ±0.05	16.0 ±1.1	0.46 ±0.04	10.2 ±0.4	7.1 ±0.5	141 ±1	4.41 ±0.22	101 ±1
	1000	6	133 ±15	0.56*** ±0.07	16.8 ±1.9	0.48 ±0.05	10.4 ±0.3	7.2 ±0.5	141 ±1	4.34 ±0.31	100 ±1
After recovery	0	6	164 ±24	0.43 ±0.06	16.4 ±1.1	0.54 ±0.05	10.3 ±0.4	7.3 ±0.5	140 ±1	4.28 ±0.24	100 ±2
	1000	6	146 ±16	0.48 ±0.04	17.2 ±0.9	0.52 ±0.04	10.2 ±0.3	7.3 ±0.3	140 ±1	4.52 ±0.18	100 ±0

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D..

*:Significantly different from control at 5% level of probability

**:Significantly different from control at 1% level of probability

Abbreviations : GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase ; GPT, Glutamic pyruvic transaminase ; ALP, Alkaline phosphatase ;

γ -GTP, Gamma glutamyl transpeptidase ; T.P., Total protein ; Alb., Albumin ; A/G, Albumin-globulin ratio ; T-Chol., Total cholesterol ; T.G., Triglyceride ; Glu., Glucose ; T-Bil., Total bilirubin ;

BUN, Blood urea nitrogen ; Crea., Creatinine ; Ca, Calcium ; P, Inorganic phosphorus ; Na, Sodium ;

K, Potassium ; Cl, Chloride

Table 4. Biochemical findings in female rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days

Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G	T-Cho. (mg/dl)	T.G. (mg/dl)
After treatment	0	6	73 ± 6	29 ± 6	226 ± 51	0.66 ± 0.45	6.29 ± 0.35	3.28 ± 0.21	1.10 ± 0.10	91 ± 12	51 ± 36
	30	6	70 ± 10	27 ± 4	241 ± 41	0.69 ± 0.43	6.40 ± 0.30	3.27 ± 0.26	1.04 ± 0.09	85 ± 7	66 ± 42
	100	6	66 ± 11	27 ± 3	290 ± 63	0.36 ± 0.17	6.56 ± 0.15	3.36 ± 0.18	1.05 ± 0.11	95 ± 17	74 ± 49
	300	6	62 ± 6	27 ± 7	236 ± 49	0.54 ± 0.28	6.35 ± 0.33	3.21 ± 0.22	1.03 ± 0.05	93 ± 23	83 ± 15
	1000	6	66 ± 5	26 ± 5	237 ± 72	0.42 ± 0.21	6.43 ± 0.14	3.22 ± 0.17	1.01 ± 0.08	89 ± 17	93 ± 53
After recovery	0	6	70 ± 11	28 ± 3	220 ± 55	0.37 ± 0.36	6.48 ± 0.43	3.31 ± 0.21	1.05 ± 0.11	95 ± 19	77 ± 25
	1000	6	62 ± 8	28 ± 5	196 ± 47	0.51 ± 0.23	6.61 ± 0.40	3.46 ± 0.23	1.10 ± 0.05	106 ± 24	121 ± 59
			Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
After treatment	0	6	114 ± 8	0.35 ± 0.08	19.9 ± 3.0	0.51 ± 0.04	10.1 ± 0.4	6.4 ± 0.7	140 ± 1	4.31 ± 0.33	102 ± 1
	30	6	125 ± 10	0.38 ± 0.07	17.7 ± 1.5	0.54 ± 0.04	10.4 ± 0.2	6.4 ± 0.8	140 ± 1	4.15 ± 0.11	102 ± 1
	100	6	118 ± 13	0.41 ± 0.08	20.1 ± 2.5	0.56 ± 0.04	10.4 ± 0.3	6.4 ± 0.6	141 ± 1	4.21 ± 0.15	101 ± 2
	300	6	120 ± 11	0.41 ± 0.06	19.4 ± 2.6	0.52 ± 0.04	10.5 ± 0.2	6.5 ± 0.5	140 ± 0	4.03 ± 0.27	102 ± 1
	1000	6	123 ± 16	0.56 ** ± 0.06	18.7 ± 2.1	0.52 ± 0.04	10.3 ± 0.4	6.2 ± 0.8	140 ± 1	4.12 ± 0.22	102 ± 1
After recovery	0	6	136 ± 21	0.46 ± 0.06	18.9 ± 2.7	0.64 ± 0.05	10.4 ± 0.3	6.5 ± 0.8	140 ± 2	4.15 ± 0.12	101 ± 1
	1000	6	130 ± 12	0.48 ± 0.05	19.1 ± 2.2	0.61 ± 0.05	10.3 ± 0.2	5.7 * ± 0.3	140 ± 1	4.36 ± 0.22	101 ± 1

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

*:Significantly different from control at 5% level of probability

**:Significantly different from control at 1% level of probability

Abbreviations : GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase ; GPT, Glutamic pyruvic transaminase ; ALP, Alkaline phosphatase ;

 γ -GTP, Gamma glutamyl transpeptidase ; T.P., Total protein ; Alb., Albumin ; A/G, Albumin-globulin ratio ; T-Cho., Total cholesterol ; T.G., Triglyceride ; Glu., Glucose ; T-Bil., Total bilirubin ;

BUN, Blood urea nitrogen ; Crea., Creatinine ; Ca, Calcium ; P, Inorganic phosphorus ; Na, Sodium ;

K, Potassium ; Cl, Chloride

7. 病理学的所見

1) 剖検所見

投与期間終了後屠殺動物において、30、100および300 mg/kg群では、被験物質投与の影響がうかがわれる異常は認められなかった。1,000 mg/kg群では、盲腸の軽度な拡張が各6匹中雄の2匹と雌の4匹に認められた。回復期間終了後屠殺動物においては、異常は認められなかった。

2) 臓器重量 (Table 5,6)

投与期間終了後屠殺動物において、被験物質投与各群の測定した各臓器の重量は、絶対および相対重量のいずれにおいても、対照群に比べて統計学的に有意な変化は認められなかった。回復期間終了後屠殺動物においては、雌において1,000 mg/kg群の体重が対照群をやや下回ったため、副腎は絶対重量のみの減少、脳は相対重量のみの増加を示したが、絶対および相対重量に共通して一定の変化傾向を示す臓器は認められなかった。

Table 5. Absolute and relative organ weights in male rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days.

	Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	
Absolute	After treatment	0	6	345 ±24	1.99 ±0.05	10.26 ±0.30	2.59 ±0.33	57.5 ±8.4	2.92 ±0.18	
		30	6	335 ±18	1.99 ±0.08	9.68 ±0.74	2.46 ±0.07	57.2 ±9.9	3.19 ±0.10	
		100	6	342 ±24	1.99 ±0.05	9.70 ±1.35	2.54 ±0.24	51.5 ±4.2	3.08 ±0.15	
		300	6	322 ±20	1.99 ±0.12	9.42 ±0.74	2.41 ±0.28	55.2 ±6.8	2.90 ±0.21	
		1000	6	340 ±24	2.01 ±0.09	10.07 ±1.19	2.59 ±0.30	61.3 ±10.6	3.11 ±0.30	
	After recovery	0	6	400 ±27	2.05 ±0.05	11.70 ±1.17	2.68 ±0.26	57.1 ±7.8	3.21 ±0.35	
		1000	6	403 ±19	2.06 ±0.07	11.41 ±0.96	2.85 ±0.16	52.7 ±5.9	3.16 ±0.14	
	Relative ^a	After treatment	0	6	345 ±24	0.58 ±0.04	2.97 ±0.17	0.75 ±0.08	16.67 ±2.05	0.85 ±0.06
			30	6	335 ±18	0.60 ±0.03	2.89 ±0.08	0.74 ±0.05	17.19 ±3.32	0.96 ±0.07
			100	6	342 ±24	0.58 ±0.03	2.83 ±0.21	0.74 ±0.03	15.13 ±1.80	0.91 ±0.06
300			6	322 ±20	0.62 ±0.02	2.93 ±0.16	0.75 ±0.06	17.15 ±1.78	0.91 ±0.09	
1000			6	340 ±24	0.59 ±0.03	2.96 ±0.17	0.76 ±0.05	17.96 ±2.58	0.92 ±0.07	
After recovery		0	6	400 ±27	0.52 ±0.04	2.92 ±0.13	0.67 ±0.04	14.26 ±1.55	0.80 ±0.06	
		1000	6	403 ±19	0.51 ±0.02	2.83 ±0.17	0.71 ±0.06	13.12 ±1.74	0.79 ±0.03	

Each value is expressed as mean ± S.D..

a : Relative organ weight per 100g body weight

Table 6. Absolute and relative organ weights in female rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days

Stage		Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)	Ovaries (mg)	
Absolute	After treatment	0	6	194 ±14	1.86 ±0.05	5.30 ±0.59	1.55 ±0.09	59.3 ±6.9	76.8 ±13.3	
		30	6	202 ±19	1.83 ±0.06	5.93 ±0.62	1.59 ±0.13	60.2 ±7.6	84.4 ±5.2	
		100	6	204 ±13	1.84 ±0.03	5.79 ±0.64	1.54 ±0.09	57.8 ±4.0	76.8 ±16.4	
		300	6	202 ±15	1.78 ±0.06	6.01 ±0.66	1.55 ±0.23	55.6 ±6.3	76.2 ±9.2	
		1000	6	200 ±7	1.81 ±0.06	5.70 ±0.69	1.61 ±0.12	57.0 ±9.8	81.8 ±7.2	
	After recovery	0	6	222 ±17	1.83 ±0.03	6.11 ±0.75	1.53 ±0.14	67.6 ±8.8	88.9 ±11.3	
		1000	6	209 ±10	1.85 ±0.04	5.71 ±0.47	1.49 ±0.09	57.6* ±6.0	76.7 ±9.4	
	Relative*	After treatment	0	6	194 ±14	0.96 ±0.04	2.73 ±0.17	0.80 ±0.04	30.71 ±4.33	39.4 ±5.3
			30	6	202 ±19	0.91 ±0.08	2.94 ±0.12	0.79 ±0.05	29.83 ±2.46	42.0 ±3.2
			100	6	204 ±13	0.91 ±0.06	2.85 ±0.21	0.76 ±0.05	28.48 ±2.12	37.9 ±8.3
300			6	202 ±15	0.88 ±0.07	2.97 ±0.17	0.76 ±0.08	27.59 ±3.71	37.7 ±4.3	
1000			6	200 ±7	0.91 ±0.05	2.85 ±0.28	0.80 ±0.05	28.46 ±4.53	41.0 ±4.4	
After recovery	0	6	222 ±17	0.83 ±0.04	2.75 ±0.22	0.69 ±0.04	30.56 ±4.28	40.1 ±3.8		
	1000	6	209 ±10	0.89* ±0.04	2.73 ±0.11	0.71 ±0.04	27.67 ±3.76	36.7 ±3.4		

Each value is expressed as mean ± S.D.

*: Significantly different from control at 5% level of probability

a: Relative organ weight per 100g body weight

3) 病理組織学的所見 (Table 7)

対照群および1,000 mg/kg群の雌雄について、心臓、肝臓、脾臓、腎臓および副腎を検査した。また、剖検で盲腸の拡張が認められたので盲腸についても検査した。その結果、観察した各臓器に、被験物質投与の影響が考えられる変化は認められなかった。肉眼的に拡張していた盲腸は、粘膜や筋層の進展はみられたが病的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を用いた経口投与による28日間の反復投与毒性試験を、0 (対照)、30、100、300および1,000 mg/kg群の5群で行った。また、対照群および1,000 mg/kg群については、投与期間終了後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。

投与期間終了後屠殺動物において、30、100および300 mg/kg群では、雌雄とも被験物質投与の毒性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、病理組織学的変化を伴わない単純な盲腸の拡張例が雌雄に認められたのみで、その他特に変化は認められなかった。

Table 7. Incidence of histopathological findings in rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days (after treatment).

Sex	Organ : Findings	Dose (mg/kg) No. of animals	0 6	30 6	100 6	300 6	1000 6
Male	Liver : Microgranuloma	+	0	—	—	—	1
	Kidney : Focal tubular dilatation with fibrosis	+	0	—	—	—	1
	Eosinophilic bodies in proximal tubule	+	0	—	—	—	2
	Hyaline droplets in proximal tubular epithelium	+	1	—	—	—	0
Female	Liver : Microgranuloma	+	2	—	—	—	2
	Kidney : Focal tubular dilatation with hyaline casts	+	2	—	—	—	0
	Interstitial cell infiltration	+	0	—	—	—	1

— : Not examined; + : Slight

No abnormalities detected in heart, spleen, adrenal and cecum from rats of control and 1000 mg/kg groups.

明らかな病理組織学的変化を伴わない盲腸の拡張は、抗菌性物質や高分子化合物のラットやウサギなどの盲腸の大きな動物種への投与時にしばしば認められ、腸内細菌叢の乱れによる変化と考えられている。

被験物質投与による盲腸拡張の発現機序については不明であるが、いずれにしても単なる盲腸内容物の増加による軽度な変化であり、下痢等の一般状態の変化や成長に対する影響は認められていないことから、生物学的にも毒性学的にも特に問題となるような変化ではないと判断される。

なお、尿中ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査において、100 mg/kg以上の用量群の雌雄の尿に対し判定基準にない色調の呈色反応が現れ、判定が困難であった。また、血液生化学的検査において、関連する変化を伴わないビリルビン量のみの高値が1,000 mg/kg群の雌雄に認められた。

ビリルビンについては、尿および血清用検査試薬ともジアゾ試薬を用いており、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジルスルホン酸モノナトリウムはナフトール誘導体であることから、このジアゾ試薬と容易に反応することは当然考えられる。また、Ehrlich反応を応用した尿中のウロビリノーゲンの定性的検査についても、Ehrlich試薬は古くからアミノ基や活性メチレンの発色試薬として用いられており、ナフチルアミン誘導体である被験物質に対しても反応することは十分予想される。これらのことは、被験物質水溶液に対して、これらの試薬が反応したことにより確認された。

したがって、尿試験におけるビリルビンやウロビリノーゲン検査試薬による発色や血清ビリルビンの高値は、尿中あるいは血中の被験物質およびその代謝物と試薬との反応生成体によるものと考えられ、被験物質の毒性影響を示唆する変化ではないと判断された。

一方、回復期間終了後屠殺動物では、投与期間終了後屠殺動物で認められた盲腸の拡張は認められず、回復していた。

これとは別に、回復期間終了後屠殺動物の1,000 mg/kg群において、いずれも血清アルブミン量の減少およびそれに伴うA/G比の低下が雄に、無機リン量の減少が雌に認められたが、いずれも軽度、かつ、当研究所におけるバックグランドデータからみて生理的範囲内の変動であり、他に関連する変化も認められないことから、被験物質投与に関連付けるのは困難であった。さらに、1,000 mg/kg群の雌における脳の相対重量増加と副腎の絶対重量減少についても、絶対および相対重量に共通して一定の変化傾向を示すものではなく、体重が対照群をやや下回ったことに伴う二次的な変化と判断される。

このように、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジルスルホン酸モノナトリウムはラットへの28日間反復投与において、1,000 mg/kg群においても特に問題となるような毒性影響は認められなかった。したがって、無影響量 (NOEL) は1,000 mg/kg/dayと推定された。

連絡先：試験責任者 伊藤義彦

(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 : Ito, Yoshihiko

Research Institute for Animal Science in Biochemistry
and Toxicology, Japan3-7-11 Hashimoto-dai, 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細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate on Bacteria

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変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50~5000 µg/プレート の用量で、本試験は 312.5~5000 µg/プレート の用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、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、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

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、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について、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異²⁾ を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「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 化学品試験法ガイドライン：471、472 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。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA1537

Salmonella typhimurium TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537 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。

Escherichia 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。試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス（Difco）を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、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〕

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（CAS No. 5460-09-3、Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate）は、分子量341.3の淡褐色粉末である。純度87.4%のもの（ロット番号：AZ01、東京化成工業（株））を（社）日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

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は、ジメチルスルホキシド（ロット番号：DSL5887、和光純薬工業（株））を用いて50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度換算は行わなかった。

試験の開始に先立って、秦野研究所において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塩のDMSO溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度（50 mg/ml）および最低濃度（3 mg/ml）の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後3時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均（0時間）に対して、96.1および101%であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準（初回の測定平均値の90%以上）を満たしていた。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、98.4~101%、3.125 mg/ml 溶液は、103~108%であった。これらの値も当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の85%以上）を満たしていた。

復帰変異試験

以上の結果から、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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。

- 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)*	レーヒスチジン	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90mm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 (キッコーマン(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2ml、被験物質調製液0.1ml、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DMSO、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、すべての検定菌の直接試験および代謝活性化試験において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を、すべての検定菌で、直接試験および代謝活性化試験ともに5000 μ g/プレートとし、公比2で5用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果をTables 1, 2に示した。4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムについて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、すべての検定菌において抗菌性は認められなかった。

用量設定試験において、WP2の最低用量、50 μ g/プレートで陰性対照の2倍以上の変異コロニーが認められたが、本試験では2回とも、WP2において変異コロニー数の増加は認められなかった。以上から、WP2の用量設定試験における変異コロニー数の増加は偶発的なものと考えられた。

以上の結果に基づき、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムは、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 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.