

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸について、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、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、TA1535の代謝活性化法で2500 µg/プレート以上の用量で溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。以上の結果から、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)と判定された。

材料および試験方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

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

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

検定菌は、-80°C以下で凍結保存した。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 (*pKM101*) の有無についての特性確認を行った。試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37°C、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〕

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) は、白色粉末である。純度98.7%のもの(ロット番号: 07021, 不純物不明 (1.3%), スガイ化学工業(株)製造)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管した。

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略)に50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸のDMSO溶液中での安定性試験を、本試験での低濃度 (3.125 mg/ml) および秦野研究所で実施される染色体異常試験 (H-93-243) の高濃度 (220 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4時間における各3サンプルの平均含量は、いずれも初期値(0時間)の平均に対して、101%であった。

また、本試験Iに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、3.125 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、100~102%、50 mg/ml溶液は、97.3~97.8%であった。

以上の結果から、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は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。

AF2 : 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))
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem.Co.)
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20°Cで凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

〔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)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1リットル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
リン酸一アンモニウム	1.92g
水酸化ナトリウム	0.66g
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30 ml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 mmol
塩化カリウム	33 mmol
グルコース-6-リン酸	5 mmol
NADH	4 mmol
NADPH	4 mmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 mmol

** : 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〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッパアガー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Table 1, 2に示した。培養は37°Cで48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて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 µg/プレートの範囲で公比を約3とし、試験を

実施したところ、すべての検定菌において直接法、代謝活性化法ともにいずれの用量においても抗菌性は認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに5000 µg/プレートとすることとした。

〔本試験〕

結果をTable 1, 2に示した。2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸について、312.5~5000 µg/プレートの範囲で、公比を2とし、試験を実施した。2回の試験において、TA1535の代謝活性化法の1250あるいは2500 µg/プレート以上の用量において溶媒対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。平均の比活性は5000 µg/プレートにおいて16.4であった。また、2回目の本試験においてのみ、TA1537の直接法および代謝活性化法とTA98の代謝活性化法において、変異コロニー数が陰性対照群の2倍以上となる群が散見された。

以上の結果に基づき、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸は、用いた試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, and B.N. Ames, *Mutation Research.*, 113, 173, 1983.
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
 試験担当者：坂本京子, 原 巧, 堀谷尚古,
 川上久美子, 松本容彦,
 飯田さやか, 中込まどか
 (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

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
 Kyoko Sakamoto, Takumi Hara, Naoko
 Horiya, Kumiko Kawakami,
 Yasuhiko Matsuki,
 Sayaka Iida and Madoka Nakagomi
 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

Table1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2-amino-1-naphthalene sulfonic acid*

With (+) or without (-)	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	Solvent control	120	106	122	7	12	16	19	15	19	17	19	14	4	6	8
		(116± 8.7)			(12± 4.5)			(18± 2.3)			(17± 2.5)			(6± 2.0)		
	312.5	112	109	138	15	13	13	28	23	21	22	12	18	9	7	5
		(120± 15.9)			(14± 1.2)			(24± 3.6)			(17± 5.0)			(7± 2.0)		
	625	98	99	109	9	9	15	18	17	26	22	16	24	5	4	7
		(102± 6.1)			(11± 3.5)			(20± 4.9)			(21± 4.2)			(5± 1.5)		
	1250	124	100	113	13	17	8	19	16	22	34	15	17	3	2	3
	(112± 12.0)			(13± 4.5)			(19± 3.0)			(22± 10.4)			(3± 0.6)			
S9 Mix (+)	2500	97	106	117	6	13	17	16	20	15	10	15	17	7	4	5
		(107± 10.0)			(12± 5.6)			(17± 2.6)			(14± 3.6)			(5± 1.5)		
	5000	99	95	123	7	10	10	16	17	18	20	23	17	7	6	4
	(106± 15.1)			(9± 1.7)			(17± 1.0)			(20± 3.0)			(6± 1.5)			
S9 Mix (+)	Solvent control	117	119	148	13	8	12	21	13	17	21	30	39	7	12	7
		(128± 17.3)			(11± 2.6)			(17± 4.0)			(30± 9.0)			(9± 2.9)		
	312.5	148	139	124	21	19	10	31	24	20	37	40	43	11	12	18
		(137± 12.1)			(17± 5.9)			(25± 5.6)			(40± 3.0)			(14± 3.8)		
	625	128	133	111	15	12	12	32	13	21	33	27	36	15	6	9
		(124± 11.5)			(13± 1.7)			(22± 9.5)			(32± 4.6)			(10± 4.6)		
	1250	149	157	139	20	23	23	24	19	20	34	27	30	14	12	12
	(148± 9.0)			(22± 1.7)			(21± 2.6)			(30± 3.5)			(13± 1.2)			
S9 Mix (+)	2500	168	166	158	39	52	42	16	12	26	43	38	36	11	18	10
		(164± 5.3)			(44± 6.8)			(18± 7.2)			(39± 3.6)			(13± 4.4)		
	5000	204	195	204	63	95	91	27	26	21	54	49	47	12	6	8
	(201± 5.2)			(83± 17.4)			(25± 3.2)			(50± 3.6)			(9± 3.1)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	560	525	535	224	208	211	118	92	107	921	798	845	1131	1232	1368
		(540± 18.0)			(214± 8.5)			(106± 13.1)			(855± 62.1)			(1244± 118.9)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1132	1168	1165	262	221	218	636	744	884	345	422	418	198	234	228
		(1155± 20.0)			(234± 24.6)			(755± 124.3)			(395± 43.3)			(220± 19.3)		

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

*: Purity was 98.7 %.

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2-amino-1-naphthalene sulfonic acid*

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate . Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	Solvent control	106	119	110	11	19	11	9	21	21	27	16	17	9	7	5	
		(112 \pm 6.7)			(14 \pm 4.6)			(17 \pm 6.9)			(20 \pm 6.1)			(7 \pm 2.0)			
	312.5	96	124	103	12	15	12	20	21	29	21	20	25	8	7	9	
		(108 \pm 14.6)			(13 \pm 1.7)			(23 \pm 4.9)			(22 \pm 2.6)			(8 \pm 1.0)			
	625	123	143	118	16	15	18	29	24	20	18	20	19	14	13	8	
		(128 \pm 13.2)			(16 \pm 1.5)			(24 \pm 4.5)			(19 \pm 1.0)			(12 \pm 3.2)			
	1250	128	108	107	13	15	18	19	17	26	18	17	19	13	14	16	
		(114 \pm 11.8)			(15 \pm 2.5)			(21 \pm 4.7)			(18 \pm 1.0)			(14 \pm 1.5)			
2500	118	115	119	16	14	10	21	10	16	15	26	26	16	12	19		
	(117 \pm 2.1)			(13 \pm 3.1)			(16 \pm 5.5)			(22 \pm 6.4)			(16 \pm 3.5)				
5000	121	106	118	12	17	19	13	30	21	24	13	23	18	5	15		
	(115 \pm 7.9)			(16 \pm 3.6)			(21 \pm 8.5)			(20 \pm 6.1)			(13 \pm 6.8)				
S9 Mix (+)	Solvent control	134	132	130	15	8	20	17	12	19	25	27	44	12	11	8	
		(132 \pm 2.0)			(14 \pm 6.0)			(16 \pm 3.6)			(32 \pm 10.4)			(10 \pm 2.1)			
	312.5	124	120	111	16	22	13	28	26	26	34	36	29	21	13	13	
		(118 \pm 6.7)			(17 \pm 4.6)			(27 \pm 1.2)			(33 \pm 3.6)			(16 \pm 4.6)			
	625	134	123	129	13	17	13	20	16	26	43	43	32	23	25	21	
		(129 \pm 5.5)			(14 \pm 2.3)			(21 \pm 5.0)			(39 \pm 6.4)			(23 \pm 2.0)			
	1250	170	170	172	21	24	25	26	26	26	48	36	44	20	23	24	
		(171 \pm 1.2)			(23 \pm 2.1)			(26 \pm 0.0)			(43 \pm 6.1)			(22 \pm 2.1)			
2500	151	162	183	72	65	69	22	25	27	55	58	54	16	21	10		
	(165 \pm 16.3)			(69 \pm 3.5)			(25 \pm 2.5)			(56 \pm 2.1)			(16 \pm 5.5)				
5000	185	214	249	108	98	111	19	28	25	64	71	60	18	17	15		
	(216 \pm 32.0)			(106 \pm 6.8)			(24 \pm 4.6)			(65 \pm 5.6)			(17 \pm 1.5)				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	512	549	521	260	282	248	174	176	160	764	810	844	1610	1762	1800	
		(527 \pm 19.3)			(263 \pm 17.2)			(170 \pm 8.7)			(806 \pm 40.1)			(1724 \pm 100.5)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	923	916	763	281	218	240	1464	1433	1412	466	422	373	241	223	278	
		(867 \pm 90.4)			(246 \pm 32.0)			(1436 \pm 26.2)			(420 \pm 46.5)			(247 \pm 28.0)			

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

*: Purity was 98.7 %.

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の 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-Amino-1-naphthalenesulfonic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

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、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的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/IU) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(24および48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち1.6 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。一方、短時間処理(6時間)のS9 mix存在下および非存在下においては、2.2 mg/ml (10 mM)の濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理として、S9 mix非存在下における24時間および48時間処理、短時間処理としてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した高濃度群(1.6 mg/ml)では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群においては、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。また、代謝活性化法では、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下で6時間処理した高濃度群(2.2 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、S9 mix非存在下のその他の処理群では、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。一方、S9 mix存在下の中濃度群(1.1 mg/ml)では、観察した細胞の22.5%に染色体の構造異常が誘発され、陽性の結果が得られた。しかしながら、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸を培養液に添加すると培養液の色が黄色化することから、本実験で誘発された染色体異常に関しては、それ自身によるDNA傷害作用に起因する可能性に加えて、被験物質添加による培養液の酸性化による可能性も示唆された。

方法

1. 使用した細胞

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

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: JRH BIOSCIENCES)を

10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸(略号: ANS, CAS No.: 81-16-3, ロット番号: 07021, スガイ化学工業(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は、白色粉末で、水およびアセトンに不溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)に可溶、分子式C₁₀N₉NO₃S, 分子量223.26, 純度98.7%(不純物1.3%)の物質である。被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、水に安定であり、溶媒中(DMSO)での安定性試験では、3.125~220 mg/mlの濃度範囲で4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。溶媒としてDMSO(Sigma Chemical Co.)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液(増殖抑制試験、染色体異常試験ともに220 mg/ml)を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の1%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお、濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

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。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%の増殖抑制濃度をはさむ2濃度の値より算出したところ、1.6 mg/mlであった。また、短時間処理のS9 mix非存在下では、2.0 mg/mlであった。一方、S9 mix存在下では、2.2 mg/ml (10 mM) の濃度を含み、処理したすべての濃度範囲で60%を越える増殖抑制は認められなかった (Fig. 1)。

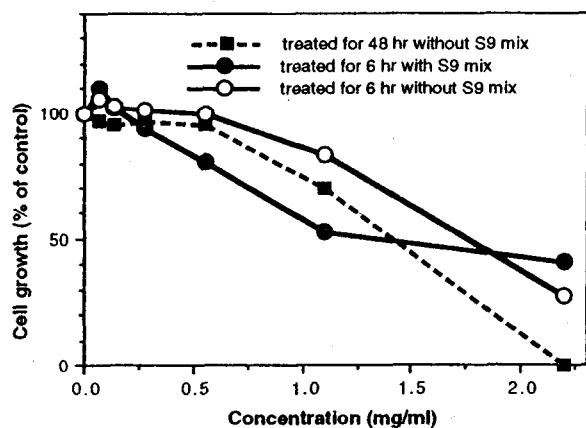


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では1.6 mg/ml、短時間処理では2.2 mg/ml (10 mM) 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。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC (MC, 協和醗酵工業(株)) およびシクロホスファミド (CPA, Sigma Chemical Co.) は、注射用水((株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/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枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験 (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、陰性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、陰性対照群と被験物質処理群および陰性対照群と陽性対照群の有意差検定 ($p < 0.05$) を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、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

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸を加えて24時間および48時間連続処理した高濃度群 (1.6 mg/ml) では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸を加えてS9 mix存在下および非存在化で6時間処理した高濃度群 (2.2 mg/ml) では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかった。S9 mix非存在下のその他の処理群では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。一方、S9 mix存在下の中濃度群 (1.1 mg/ml) では、観察した細胞の22.5%に染色体の構造異常が誘発され、陽性の結果が得られた。

培養液がpH 6.3以下の酸性条件下では、染色体異常が誘発される場合があることが報告³⁾されている。2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸を培養液に添加すると培養液の色が黄色化することから、陽性の結果が得られたS9 mix存在下の中濃度群について、処理直後と処理終了後の培養液のpHを測定したところ、処理直後のpHは5.77で、処理終了後では6.01であった。従って、本実験で誘発された染色体異常に関しては、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸それ自身によるDNA傷害作用に起因する可能性に加えて、2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸添加による培養液の酸性化による可能性が考えられる。これを明確にするには、さらに詳細な検討が必要であると思われる。

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.
- 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.
- 3) T. Morita, et al., *Mutation Res.*, 268, 297-305, (1992).

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS)**

Group	Concentration (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 ¹⁾			200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent	0	24	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38		
ANS	0.4	24	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	--	--
ANS	0.8	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	--	--
ANS	1.6	24	7	2	1	4	0	0	0	0	7	0	5* (71.4)	4* (57.1)	0.00 ⁶⁾	Tox	Tox
MC	0.00005	24	200	14	51	83	1	0	6	0	155	0	76* (38.0)	71* (35.5)	0.38	+	--
Solvent ¹⁾	0	48	200	2	0	0	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	0 (0.0)	0.25		
ANS	0.4	48	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	0 (0.0)	0.13	--	--
ANS	0.8	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	--	--
ANS	1.6	48	8	4	0	8	0	0	0	10	22	0	6± (75.0)	6* (75.0)	10.00* ⁷⁾	Tox	Tox
MC	0.00005	48	200	18	38	71	2	1	3	30	163	3	79* (39.5)	69* (34.5)	0.63	+	--

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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 : toxic. 1) Dimethyl sulfoxide 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 analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Nine cells were analysed. 7) Ten cells were analysed. * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 98.7%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-amino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 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 ¹⁾				200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.38		
Solvent	0	--	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
ANS	0.6	--	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	--	--
ANS	1.1	--	6-(18)	200	3	1	0	0	1	0	0	5	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.50	--	--
ANS	2.2	--	6-(18)	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 ⁶⁾	Tox	Tox
CPA	0.005	--	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	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		
ANS	0.6	+	6-(18)	200	0	0	4	0	0	0	0	4	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	--	--
ANS	1.1	+	6-(18)	200	14	26	53	0	0	2	60	155	1	45* (22.5)	40* (20.0)	0.38	+	--
ANS	2.2	+	6-(18)	5	0	2	4	0	0	0	6	0	4* (80.0)	4* (80.0)	0.00 ⁷⁾	Tox	Tox	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	29	99	148	1	5	13	180	475	0	138* (69.0)	135* (67.5)	0.13	+	--

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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, Tox : toxic. 1) Dimethyl sulfoxide 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 analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Thirty-three cells were analysed. 7) Eight cells were analysed. * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 98.7%.

連絡先

試験責任者 : 田中憲徳
 試験担当者 : 山影康次, 若栗 忍, 中川ゆづき,
 日下部博一, 橋本恵子
 (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

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,
 Yuzuki Nakagawa, Hirokazu Kusakabe,
 Keiko Hashimoto
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

1-メチルエチニルベンゼンのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 1-Methylethenylbenzene by Oral Administration in Rats

要約

1-メチルエチニルベンゼンを40, 200および1000 mg/kg/dayの用量でSD系ラット(Crj:CD)の雌雄に交配前14日から交配を経て雄は計43日間、雌は妊娠・分娩を経て哺育3日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

1000 mg/kg群において、雄で体重増加抑制および摂餌量減少が認められ、1例が膀胱結石による尿閉で死亡した。雌でも妊娠後期に体重増加抑制の傾向が認められた。病理検査では、腎臓の腫大が雌雄で、尿管上皮の硝子滴の増加と好塩基性変化が雄で、尿管上皮の空胞化とリンパ球浸潤が雌で、膀胱の結石形成と粘膜上皮の増生が雄で、肝臓の腫大と肝細胞の好酸性変化が雌雄で、副腎束状帯の脂肪滴の増加が雌雄で、胸腺の萎縮が雌で認められた。雄の血液生化学検査では、GPT, 尿素窒素, カリウムの上昇およびトリグリセライドの低下が認められた。

200 mg/kg群においても、雌雄で肝臓および腎臓、雌で胸腺に同様な組織変化が、雄でGPTの上昇が認められた。雄の血液学検査では被験物質の影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

親動物の検査において、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率および分娩には被験物質に起因する変化は認められなかった。哺育期間の観察では、1000 mg/kg群で母動物2例の全新生児が死亡した。

新生児の検査において、1000 mg/kg群で体重がやや小さく、また2腹の全新生児死亡のため4日生存率が若干低下した。出産児数、出生児数、性比、出生率、外表、一般状態、出生後の体重増加量および剖検においては被験物質の影響は認められなかった。

以上の結果より、1-メチルエチニルベンゼンの反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも40 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、親動物に対して雄が1000 mg/kg/day、雌が200 mg/kg/day、児動物に対しては200 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

1-メチルエチニルベンゼン(三井石油化学工業, Lot No. 33041, 純度99.6%)は、芳香族炭化水素, エタノール, アセトンに可溶で、水には不溶の芳香を有する無色の液体である。被験物質は室温・遮光下で保管し、試験期間中安定であることが製造者により確認された。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手した雌雄のSD系ラット(Crj:CD)を6日間検疫・馴化後、試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により、1群につき雌雄各10匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも8週齢、体重範囲は雄が309~337 g、雌が181~225 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度20~25°C、湿度40~70%R.H.、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー)を敷いたポリカーボネート製ケージに、1ケージあたり投与開始後は1匹、交配期間中は雌雄各1匹、哺育期間は1腹で収容し、飼育した。

動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業)および5 μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由摂取させた。

3. 投与量および投与方法

SD系ラットを用いて10日間の反復投与試験(用量:0, 100, 300, 1000 mg/kg)を行った結果、1000 mg/kg群の雄で体重増加抑制および肝臓の腫大傾向が認められた。従って、本試験では高用量を1000 mg/kgとし、以下公比5で中用量を200 mg/kg、低用量を40 mg/kgとした。この他に溶媒のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は、雌雄とも交配前14日間、交配期間中、および雄は計画殺前日までの計43日間、雌は交尾成立後分娩を経て哺育3日までとし、オリーブ油に溶解させた被験物質を胃管を用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与量は5 ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

投与液の調製はイエローランプ照明下で行い、投与に供

するまで冷蔵・遮光保存した。また、投与開始前に投与液の安定性および濃度を確認した。

4.反復投与毒性に関する観察・検査

1)一般状態

全例について生死および外観・行動等を毎日観察した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

2)体重および摂餌量

体重は、雄については投与開始日およびその後週1回、雌については投与開始日および交尾成立までは週1回、交尾成立後は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した(交尾確認日を妊娠0日, 分娩確認日を哺育0日とする)。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

3)雄の血液学検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日より約21時間絶食させ、チオペンタールナトリウム(ラボナール:田辺製薬)の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採取した血液の一部をEDTA-2Kにより凝固阻止し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500:東亜医用電子)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A:立石電機)、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000:東亜医用電子)により測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

4)雄の血液生化学検査

雄の全生存動物について、解剖日に採取した血液を室温で約30分間放置した後、3000 r.p.m.(2050 G)で10分間遠心分離し、得られた血清について、GOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、 γ -GTP(SSCC改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(Jendrassik改良法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(O-CPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロライド(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形:日立製作所)により測定した。

5)病理検査

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ剖検し、胸腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、これらの器官に加えて、脳、心臓、脾臓、副腎、卵巣および

雄の剖検で異常が認められた膀胱を採取し、10%リン酸緩衝中性ホルマリン液(精巣および精巣上体はブアン液)にて固定後保存した。雌雄とも対照および1000 mg/kg群の脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および精巣上体について、また剖検所見あるいは器官重量測定の結果から被験物質の影響が疑われた雌雄の膀胱および雌の胸腺について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検した。その結果、雌雄の肝臓、腎臓および副腎、雄の膀胱、雌の胸腺に被験物質による変化が認められたため、200および40 mg/kg群のこれらの器官についても検査を行った。途中死亡した1000 mg/kg群の雄1例については、上記器官の他、精囊、前立腺、肺、胃、十二指腸および尿管を検査した。また、非妊娠雌の卵巣、剖検時に痂皮の認められた1000 mg/kg群の1例の皮膚についても検査した。なお、一部の例の肝臓、腎臓および副腎についてはオイルレッドO染色を実施した。

5.生殖発生毒性に関する観察・検査

1)生殖機能

交配前14日間の投与終了後、各群内で雄1匹対雌1匹の交配対を最長7日間昼夜同居させ、毎日午前中に雌の膈垢を採取し、ギムザ染色して鏡検した。膈垢形成あるいは膈垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配後、交尾成立までに要した日数)、交尾が成立するまでに逸した発情期の回数、交尾率([交尾動物数/同居動物数] \times 100)、受胎率([受胎動物数/交尾動物数] \times 100)を算出した。

2)分娩・哺育状態

交尾が確認された雌については全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が終了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。その後、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、一般状態、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

哺育4日の解剖時に卵巣、子宮を摘出して黄体数および着床数を検査した。交尾確認後25日を経ても分娩しない雌は剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮については、2%KOH水溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間)、出産率([生児出産雌数/受胎雌数] \times 100)、着床率([着床数/黄体数] \times 100)、分娩率([総出産児数/着床数] \times 100)を算出した。

3)新生児の観察・検査

(1)新生児の観察

哺育0日に出産児数、出生生児数、死産児数、性別および外表異常の有無を検査した。その後、一般状態、死亡の有無を毎日観察した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き、10%リン酸緩衝中性ホルマリン液に浸漬・固定後、実体顕微鏡下で剖検した。哺育0および4日

の生存児数から出生率(出生生児数/総出生児数) $\times 100$ 、4日生存率(哺育4日生児数/出生生児数) $\times 100$ を算出した。

(2)体重

哺育0日および4日に1腹毎に雌雄単位でまとめて測定し、それぞれの平均値を算出した。また、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

(3)剖検

全ての生存児について哺育4日に口腔を含む外表を検査した後、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検した。

6.統計解析

計量データはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が一様の場合は一元配置分散分析を、一様でない場合はKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合で各群の例数が一定ならばDunnett法またはDunnett型、不定ならばScheffé法またはScheffé型により多重比較を行った。ただし、下記*印の項目については、Kruskal-Wallisの検定から行った。計数データはFisherの直接確率法により検定した。有意水準は5%以下とした。新生児に関するデータについては、各母動物毎に算出した平均値を統計単位とした。以下に検定の対象となる項目を示す。

1)多重比較検定

体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、器官重量、交尾所要日数*、交尾成立までに逸した発情期の回数*、妊娠期間*、黄体数、着床数、着床率*、分娩率*、新生児数、出生率*、4日生存率*

2)Fisherの直接確率法

交尾率、受胎率、出産率、性比(雄/雌)

結果

1.反復投与毒性

1)死亡動物

1000 mg/kg群の雄1例が投与開始後23日に死亡した。その他に死亡は認められなかった。

2)一般状態

投与直後の軽度または中等度の流涎が1000 mg/kg群の雌および200 mg/kg以上の群の雄で投与開始後3日以降にはほぼ全例に継続して認められた。また、断続的な軽度の流涎は200 mg/kg群の雌、40 mg/kg群の雄でも少数例に観察された。これらの動物の一部には投与直前から流涎し始める動物も認められた。1000 mg/kg群の雄の死亡例は投与開始後22日に貧血、血尿、自発運動の減少および呼吸緩徐を示し、翌日に死亡した。

その他、偶発性と考えられる所見として、脱毛、外傷あるいは痂皮が対照および1000 mg/kg群の雄各1例、200 mg/kg群の雌1例に観察された。

3)体重(Fig. 1,2)

1000 mg/kg群において、雄では投与開始後7日以降終了まで体重増加抑制が認められた。雌では有意差は認められなかったものの、妊娠20日の増加量が若干低値を示し、妊娠後期に体重増加抑制の傾向が認められた。なお、200 mg/kg群の哺育4日の体重増加量が有意な高値を示したが、用量との関連がなかったことから、偶発的な変化と判断した。

4)摂餌量(Fig. 3,4)

1000 mg/kg群の雄で投与開始後7日間の摂餌量に減少が認められたが、その後は対照群とはほぼ同様な推移を示した。雌では交配前、妊娠期間および分娩後とも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

5)雄の血液学検査(Table 1)

いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

6)雄の血液生化学検査(Table 2)

GPTの上昇が200 mg/kg以上の群で、尿素窒素およびカリウムの上昇、トリグリセライドの低下が1000 mg/kg群で認められた。

その他に、200 mg/kg群の総コレステロールが高値を、1000 mg/kg群のグルコースおよびクロライドが低値を示したが、用量との関係が不明確か、または生理的変動範囲内の変化であることから偶発的な変化と判断した。

7)器官重量(Table 3)

肝臓の実重量および対体重比の増加が1000 mg/kg群の雄および200 mg/kg以上の群の雌で、また腎臓の実重量および対体重比の増加が1000 mg/kg群の雌雄で、対体重比の増加が200 mg/kg群の雌で認められた。その他、胸腺の実重量および対体重比の減少が1000 mg/kg群の雌に認められた。

なお、1000 mg/kg群の精巣の対体重比が高値を示したが、実重量では対照群と有意な差がなく、また組織検査および生殖機能検査においても被験物質に起因する変化が認められなかったことから、体重増加抑制が反映した見掛け上の変化と判断した。

8)剖検所見(Table 4)

計画解剖動物において、被験物質に起因する変化が肝臓、腎臓、膀胱、副腎および胸腺に認められた。

肝臓では腫大が1000 mg/kg群の雌雄に、暗赤色化が200 mg/kg以上の群の雄のみに認められた。

腎臓では腫大が1000 mg/kg群の雌雄に、皮髄境界部の褪色が200 mg/kg以上の群の雌のみに認められた。なお、40 mg/kg群の雌1例にも腫大がみられたが、片側のみであったことから偶発病変と判断した。

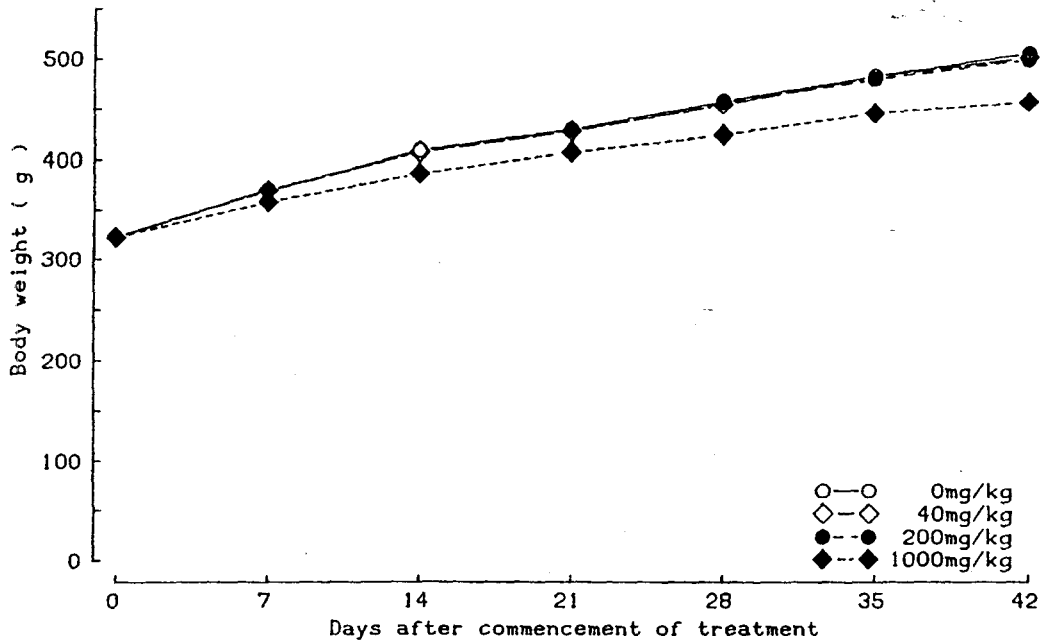


Fig. 1 Bodyweight change of male rats treated orally with 1-methylethylbenzene in the combined reপর dose and reproductive/developmental toxicity screening test

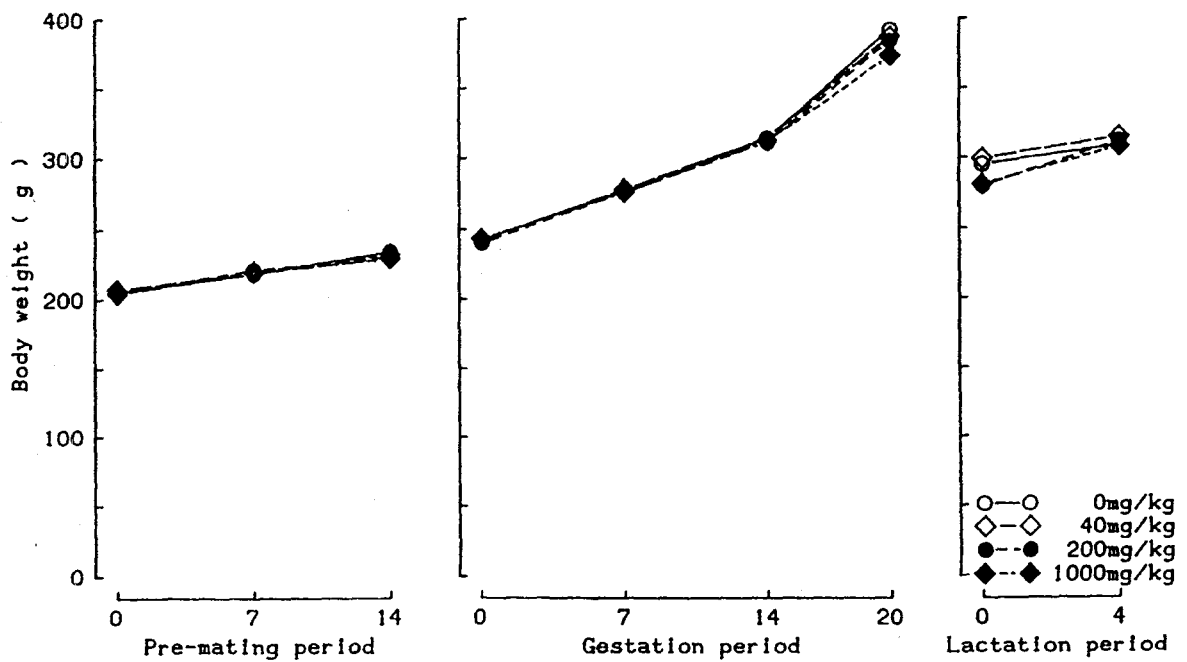


Fig. 2 Bodyweight change of female rats treated orally with 1-methylethylbenzene in the combined reপর dose and reproductive/developmental toxicity screening test