

# 4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate on Bacteria

### 要約

OECD既存化学物質安全点検に係わる毒性調査事業の一環として、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰突然変異試験をブレインキューベーション法により実施した。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下および共存下の各菌株について 5000 ~ 313  $\mu\text{g}$ /プレート (公比2) の5濃度を設定した。

本試験を2回実施した結果、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの変異原性は陰性と結論した。

### 方法

#### 〔使用菌株〕

カリフォルニア大学B.N. Ames教授より1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および東京大学医科学研究所 松島教授より1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> の5菌株を用いた。各菌株は超低温槽で -80℃以下に凍結保存したものを使用した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その20  $\mu\text{L}$  をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath社) 25 g を1 Lの精製水に溶解して作製した液体完全培地10 mLに接種し、37℃で8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

#### 〔被験物質〕

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム (ロット番号: 6622, スガイ化学工業(株)提供) は、分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NNaO}_3\text{S}$ 、分子量245.24 (無水)、純度: 76.1% (不純物(概略値)として  $\alpha$ -ナフチルアミン約50 ppm,  $\beta$ -ナフチルアミン10~20 ppm, 1-アミノナフタレン-5-スルホン酸約0.1%, 2-アミノナフタレン-6-スルホン酸約0.1~0.2%を含む) の粉末であり、通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前およ

び実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムは注射用水 (DW, (株)大塚製薬工場) を用いて最高濃度 (50 mg/mL) の溶液を調製した後、同溶媒で所定濃度に段階希釈したものをを用いた。

#### 〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

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

$\text{NaN}_3$  : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

ENNG: *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (Sigma Chemical Co.)

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

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

$\text{NaN}_3$  は DW に、その他はジメチルスルホキシド (関東化学(株)) に溶解したものを使用した。

#### 〔培地およびS9 mixの組成〕

##### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いてD-ビオチン、L-ヒスチジンおよびL-トリプトファン の0.5 mM混合水溶液を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水100 mLに対して、粉末寒天 (Bacto-Agar, Difco社) 0.6 g, 塩化ナトリウム0.5 gの割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を1/10量加えて混和し、約45℃に保温した。

##### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業(株)) を購入し、使用した。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム七水塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20 g
寒天 (OXOID Agar No.1)	15 g

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 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで

水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol
滅菌精製水	残量

\*:購入したS9(キッコーマン(株))を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 $\times$ g遠心上清分画である。

#### [試験方法]

試験はプレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mLを分注し、S9 mix 0.5 mLと菌懸濁液0.1 mLを加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪し、プレインキュベーションを行った。S9 mixを共存させない場合には、S9 mixの代わりに0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mLを加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2 mLを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養し、復帰変異コロニー数を計測した。同時に実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた。予備試験では各濃度につき1枚のプレートを使用し、本試験では各濃度につき3枚のプレートを使用した。本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

#### [試験結果の判定基準]

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

### 結果および考察

#### [予備試験]

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu$ g/プレートの濃度で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu$ g/プレートの5濃度を設定した。

#### [本試験]

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともに、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照

値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。

以上の結果から、4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸ナトリウムの変異原性は陰性と結論した。

#### 文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).

#### 連絡先

試験責任者: 宮川 誠

試験担当者: 榎本佳明, 清水優子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

#### Correspondence

Authors: Makoto Miyagawa (Study director)

Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate on bacteria

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants(number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	151 134 ( 145) 149 ( $\pm 9$ )	10 6 ( 13) 22 ( $\pm 8$ )	52 48 ( 48) 43 ( $\pm 5$ )	13 19 ( 18) 21 ( $\pm 4$ )	7 13 ( 10) 9 ( $\pm 3$ )
	313	149 165 ( 148) 131 ( $\pm 17$ )	17 15 ( 14) 10 ( $\pm 4$ )	46 47 ( 46) 46 ( $\pm 1$ )	16 26 ( 20) 19 ( $\pm 5$ )	11 9 ( 9) 7 ( $\pm 2$ )
	625	130 139 ( 142) 158 ( $\pm 14$ )	10 13 ( 12) 13 ( $\pm 2$ )	36 58 ( 45) 40 ( $\pm 12$ )	16 19 ( 17) 16 ( $\pm 2$ )	5 11 ( 10) 13 ( $\pm 4$ )
	1250	154 136 ( 142) 137 ( $\pm 10$ )	18 11 ( 14) 12 ( $\pm 4$ )	34 50 ( 46) 53 ( $\pm 10$ )	12 13 ( 15) 19 ( $\pm 4$ )	13 9 ( 10) 8 ( $\pm 3$ )
	2500	135 146 ( 142) 144 ( $\pm 6$ )	8 11 ( 9) 9 ( $\pm 2$ )	46 45 ( 45) 43 ( $\pm 2$ )	15 14 ( 14) 13 ( $\pm 1$ )	6 8 ( 9) 12 ( $\pm 3$ )
	5000	134 138 ( 134) 131 ( $\pm 4$ )	12 6 ( 12) 17 ( $\pm 6$ )	40 42 ( 43) 47 ( $\pm 4$ )	14 18 ( 16) 17 ( $\pm 2$ )	7 9 ( 8) 8 ( $\pm 1$ )
S9 mix (+)	0	156 149 ( 153) 154 ( $\pm 4$ )	16 19 ( 17) 17 ( $\pm 2$ )	47 37 ( 42) 42 ( $\pm 5$ )	30 23 ( 25) 21 ( $\pm 5$ )	11 8 ( 10) 11 ( $\pm 2$ )
	313	157 153 ( 159) 167 ( $\pm 7$ )	20 15 ( 15) 11 ( $\pm 5$ )	53 43 ( 50) 54 ( $\pm 6$ )	22 27 ( 24) 22 ( $\pm 3$ )	8 8 ( 10) 13 ( $\pm 3$ )
	625	169 181 ( 180) 190 ( $\pm 11$ )	16 11 ( 13) 13 ( $\pm 3$ )	45 53 ( 46) 41 ( $\pm 6$ )	32 23 ( 26) 23 ( $\pm 5$ )	8 8 ( 9) 11 ( $\pm 2$ )
	1250	192 164 ( 178) 177 ( $\pm 14$ )	13 10 ( 14) 19 ( $\pm 5$ )	54 38 ( 50) 57 ( $\pm 10$ )	27 27 ( 24) 17 ( $\pm 6$ )	10 18 ( 11) 5 ( $\pm 7$ )
	2500	155 180 ( 183) 215 ( $\pm 30$ )	16 16 ( 17) 19 ( $\pm 2$ )	51 43 ( 47) 48 ( $\pm 4$ )	19 23 ( 22) 24 ( $\pm 3$ )	11 9 ( 10) 11 ( $\pm 1$ )
	5000	202 156 ( 182) 189 ( $\pm 24$ )	13 10 ( 13) 17 ( $\pm 4$ )	45 42 ( 46) 50 ( $\pm 4$ )	26 25 ( 27) 30 ( $\pm 3$ )	11 9 ( 9) 8 ( $\pm 2$ )
Positive control	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	799 740 ( 750) 712 ( $\pm 44$ )	405 382 ( 421) 477 ( $\pm 50$ )	648 541 ( 578) 545 ( $\pm 61$ )	748 687 ( 704) 678 ( $\pm 38$ )	529 354 ( 431) 410 ( $\pm 89$ )
	Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 mix (+)	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1172 1253 (1190) 1146 ( $\pm 56$ )	422 412 ( 423) 436 ( $\pm 12$ )	1717 1747 (1721) 1700 ( $\pm 24$ )	475 433 ( 424) 365 ( $\pm 56$ )	179 137 ( 167) 186 ( $\pm 27$ )

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>:sodium azide

ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)  
( $\pm$ S.D.)

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate on bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	127 160 (141) 135 ( $\pm 17$ )	15 14 (16) 19 ( $\pm 3$ )	42 32 (38) 39 ( $\pm 5$ )	22 16 (19) 18 ( $\pm 3$ )	8 10 (11) 14 ( $\pm 3$ )
	313	143 140 (148) 160 ( $\pm 11$ )	12 16 (16) 20 ( $\pm 4$ )	30 25 (30) 34 ( $\pm 5$ )	19 14 (16) 16 ( $\pm 3$ )	14 13 (13) 11 ( $\pm 2$ )
	625	140 147 (138) 127 ( $\pm 10$ )	15 20 (15) 9 ( $\pm 6$ )	25 24 (28) 34 ( $\pm 6$ )	16 22 (17) 12 ( $\pm 5$ )	11 7 (10) 12 ( $\pm 3$ )
	1250	159 135 (147) 146 ( $\pm 12$ )	11 10 (13) 17 ( $\pm 4$ )	33 37 (32) 26 ( $\pm 6$ )	17 19 (20) 24 ( $\pm 4$ )	25 16 (19) 16 ( $\pm 5$ )
	2500	143 148 (148) 154 ( $\pm 6$ )	16 15 (16) 17 ( $\pm 1$ )	40 36 (33) 23 ( $\pm 9$ )	12 14 (16) 22 ( $\pm 5$ )	14 10 (12) 13 ( $\pm 2$ )
	5000	136 129 (137) 147 ( $\pm 9$ )	16 11 (14) 14 ( $\pm 3$ )	27 38 (33) 34 ( $\pm 6$ )	10 26 (20) 23 ( $\pm 9$ )	9 11 (12) 15 ( $\pm 3$ )
S9 mix (+)	0	172 167 (166) 158 ( $\pm 7$ )	12 19 (16) 17 ( $\pm 4$ )	29 40 (33) 30 ( $\pm 6$ )	26 23 (24) 24 ( $\pm 2$ )	20 16 (18) 17 ( $\pm 2$ )
	313	183 163 (178) 189 ( $\pm 14$ )	19 14 (18) 22 ( $\pm 4$ )	35 30 (35) 40 ( $\pm 5$ )	23 34 (25) 18 ( $\pm 8$ )	20 9 (15) 17 ( $\pm 6$ )
	625	181 157 (169) 170 ( $\pm 12$ )	26 26 (27) 28 ( $\pm 1$ )	38 29 (33) 33 ( $\pm 5$ )	32 30 (34) 40 ( $\pm 5$ )	12 24 (20) 23 ( $\pm 7$ )
	1250	204 193 (189) 171 ( $\pm 17$ )	16 19 (17) 15 ( $\pm 2$ )	29 25 (25) 22 ( $\pm 4$ )	29 30 (27) 21 ( $\pm 5$ )	12 13 (12) 11 ( $\pm 1$ )
	2500	220 184 (198) 191 ( $\pm 19$ )	23 15 (21) 25 ( $\pm 5$ )	30 39 (36) 40 ( $\pm 6$ )	21 30 (25) 23 ( $\pm 5$ )	9 10 (10) 11 ( $\pm 1$ )
	5000	210 193 (205) 213 ( $\pm 11$ )	19 13 (16) 16 ( $\pm 3$ )	50 30 (40) 41 ( $\pm 10$ )	28 27 (31) 38 ( $\pm 6$ )	18 22 (20) 21 ( $\pm 2$ )
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	633 593 (597) 565 ( $\pm 34$ )	432 442 (436) 433 ( $\pm 6$ )	514 537 (520) 509 ( $\pm 15$ )	723 596 (668) 686 ( $\pm 65$ )	370 439 (425) 467 ( $\pm 50$ )
	Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 mix (+)	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1149 1116 (1145) 1169 ( $\pm 27$ )	412 404 (406) 403 ( $\pm 5$ )	1499 1743 (1604) 1569 ( $\pm 126$ )	354 378 (368) 372 ( $\pm 12$ )	200 213 (211) 220 ( $\pm 10$ )

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>: sodium azide

ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)  
( $\pm$ S.D.)

# 4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of Sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても5000 µg/mLを最高濃度とし、それぞれ公比2で3用量を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、48時間処理の5000 µg/mLで、染色体構造異常細胞の出現頻度は6.5%であった。このため、48時間処理について、同濃度で確認試験を実施した。その結果、構造異常細胞の出現頻度は5%未満となり、再現性は認められなかった。なお、連続処理法のいずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理群においても、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。

以上の結果より、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1996年11月、入手時:継代14代、凍結時:17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5代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(CS:GIBCO BRL, ロット番号:35K7844)を10%添加したイーグルMEM(日本製薬(株)培養液)を用いた。

#### 3. 培養条件

2×10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mixの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

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム(ロット番号:6622, スガイ化学工業(株)提供)は、分子式C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>NNaO<sub>3</sub>S, 分子量245.24(無水), 純度:76.1%(不純物(概略値)としてα-ナフチルアミン約50 ppm, β-ナフチルアミン10~20 ppm, 1-アミノナフタレン-5-スルホン酸約0.1%, 2-アミノナフタレン-6-スルホン酸約0.1~0.2%を含む)の粉末である。通常取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

#### 5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒は局方生理食塩液(生食, (株)大塚製薬工場, ロット番号:K6F82)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、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10(v/v)%になるように加えた。なお、被験物質質量の際は、純度換算を実施した。

#### 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(Monocellator™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を測定し、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、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても5000 µg/mLまで50%の細胞増殖を抑制しなかった(Fig.1)。

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、染色体異常試験は連続処理法および短時間処理法のいずれの処理条件においても5000 µg/mLを最高濃度とし、それぞれ公比2で3用量を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(MMC, 協和発酵工業(株), ロット番号:119AFG)を0.03 µg/mL, 短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(BP, 東京化成工業(株), ロット番号:AX01)を20 µg/mLを設定した。

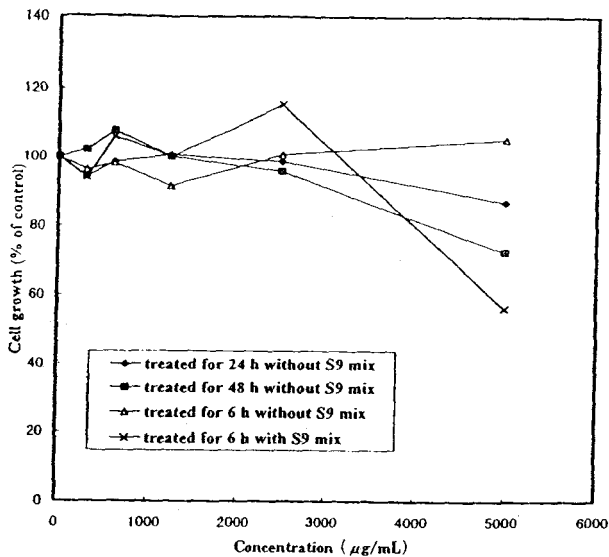


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate

### 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。スライド標本は各ディッシュにつき2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20分間染色した。

### 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、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、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

### 10. 記録と測定

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。構造異常は、ギャップを持つ細胞を含めた場合(+gap)と含めない場合(-gap)とに区別して集計した。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>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

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1, 3に示した。4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムを加えて24時間および48時間連続処理した結果、48時間処

理の5000 µg/mLで、染色体構造異常細胞の出現頻度は6.5%であった。このため、48時間処理について、同濃度で確認試験を実施した。その結果、構造異常細胞の出現頻度は5%未満となり、再現性は認められず構造異常誘発作用は認められないと判断した。なお、連続処理法のいずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞は、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。一方、陽性対照物質のBPで処理した細胞は、S9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

従って、上記の試験条件下で、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

なお、類似化合物である1-アミノナフタレン(CAS No.:134-32-7)の短時間処理法のS9 mix存在下および2-アミノ-5-ヒドロキシ-7-ナフタレンスルホン酸(CAS No.:87-02-5)の短時間処理法のS9 mix存在下の染色体異常試験は陽性と報告されている<sup>2,3)</sup>。さらに、ナフタレン(CAS No.:91-20-3)の短時間処理法のS9 mix存在下の染色体異常試験は、構造異常誘発作用は陽性、倍数性細胞誘発作用は疑陽性と報告されている<sup>2)</sup>。

### 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, "改訂増補)染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 1987.
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課 監修, "労働安全衛生法, 有害物質調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集," (社)日本化学物質安全・情報センター, 1996.

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
SN	1250	24	200	0	4	1	1	0	0	6	6 (3.0)	6 (3.0)	0.0	-	-
	2500	24	200	1	3	0	0	0	0	4	3 (1.5)	4 (2.0)	0.0	-	-
	5000	24	200	0	3	0	0	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
	MMC	0.03	24	200	5	37	17	1	1	0	61	55 (27.5)	58 (29.0)	0.0	+
Solvent	0	48	200	0	1	1	1	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
SN	1250	48	200	0	1	0	1	1	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
	2500	48	200	0	5	0	1	0	0	6	6 (3.0)	6 (3.0)	0.0	-	-
	5000	48	200	3	10	0	0	0	0	13	10 (5.0)	13 (6.5)	0.5	±	-
MMC	0.03	48	200	3	40	26	6	0	0	75	65 (32.5)	67 (33.5)	0.0	+	-

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), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SN: sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate, MMC: mitomycin C (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate with and without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
SN	1250	-	6-(18)	200	0	2	0	1	1	0	4	4 (2.0)	4 (2.0)	0.0	-	-
	2500	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.0	-	-
	5000	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.5	-	-
SN	1250	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	2500	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.5	-	-
	5000	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
BP	20	+	6-(18)	200	0	55	159	3	1	0	218	164 (82.0)	164 (82.0)	0.0	+	-

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), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SN: sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987).

Table 3 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate without S9 mix [confirmation test]

Group	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap(%)	+gap(%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.5		
SN	1250	48	200	1	0	1	1	0	0	3	2 ( 1.0)	3 ( 1.5)	0.5	-	-
	2500	48	200	2	2	0	1	0	0	5	3 ( 1.5)	5 ( 2.5)	0.0	-	-
	5000	48	200	1	6	0	0	0	0	7	6 ( 3.0)	7 ( 3.5)	0.0	-	-
MMC	0.03	48	200	1	45	48	2	0	0	96	77 (38.5)	78 (39.0)	0.0	+	-

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), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SN: sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate, MMC: mitomycin C (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987).

## 連絡先

試験責任者: 太田絵律奈

試験担当者: 中川宗洋, 石毛裕子,  
穴澤由美子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

## Correspondence

Authors: Erina Ohta (Study director)

Munehiro Nakagawa, Yuko Ishige,  
Yumiko Anazawa

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874



無断転載・複製(コピー)を禁ず