

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの 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 Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in Rats

要約

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの安全性に関する毒性試験の一環として、本被験物質を0(対照)、100、300および1000 mg/kgの用量で1群雌雄各6匹のCrj:CD(SD系)ラットに28日間反復経口投与する毒性試験を実施した。なお、対照群および1000 mg/kg群にはそれぞれ雌雄各6匹の14日間回復群も設けた。

死亡はいずれの群にもみられなかった。一般状態の観察では、1000 mg/kg群の雌雄において、投与期間の初期に散瞳が認められた。本症状は投与後約30分に観察され、4時間後には消失する変化であった。

体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

回復試験では、いずれの検査においても変化は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下での無影響量は雌雄とも300 mg/kg/dayと考えられた。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

2-ナフトール3,6-ジスルホン酸ナトリウム(純度96.4%, Lot No. D-11001, スガイ化学工業(株)提供)は、灰白色の粉末でにおいはない。入手後の被験物質は室温遮光下で保管し、投与期間終了後に供給源にて分析を行い、試験期間中安定であったことを確認した。媒体には日本薬局方 注射用水(株)大塚製薬工場, Lot No. 6B70)を使用し、これに被験物質を1.0、3.0および10.0 w/v%になるように溶解して投与液を調製した。調製は週1又は2回の頻度で行い、調製した投与液は室温保管した。なお、初回調製時に投与液の濃度を測定し、設定値の±5%以内であることを確認した。また、本調製法による0.1~20 w/v%溶液が室温、遮光下で調製後8日間安定であることを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, 日本チャールス・リバー(株))を雌雄各42匹購入し、10日間の検査馴化を行ったのち、雌雄各36匹を選んで6週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は、雄が189.3~220.2 g、雌が144.7~170.8 gであった。動物は、温度24±2℃、湿度55±10%、照明時間7時~19時および換気回数13

~15回/時に設定したバリアーシステム飼育室でステンレススチール製ハンガーケージに個別に収容して、高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業(株))および次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2 ppm)した水を自由に摂取させた。

3. 投与量、投与方法、試験群構成および群分け

投与量は、先に当研究所で実施した2週間反復投与毒性予備試験(投与量:0, 100, 300および1000 mg/kg)の結果から設定した。すなわち、予備試験では、1000 mg/kg群の雌雄で散瞳が認められた。したがって、本試験では、予備試験と同様に1000 mg/kgを高用量とし、以下公比約3で除した300および100 mg/kgを設定した。

投与経路は経口とし、胃管を用いた強制投与を1日1回、28日間反復して行った。投与容量は10 mL/kgとし、個体ごとに最新の体重を基に算出した。

回復試験に供した動物は、投与期間終了後に14日間無処置で飼育した。

試験群は、上記3用量に、注射用水を投与する対照を加え、計4群とした。1群当たりの動物数は、投与期間終了時の剖検例として各群とも雌雄各6匹、さらに、対照群および高用量群については回復期間終了時の剖検例として雌雄各6匹を設けた。

群分けは、投与開始前日の体重を基に層別連続無作為化法で行った。

4. 検査項目

1) 一般状態の観察、体重および摂餌量の測定

投与期間中は毎日投与前、投与後約30分までおよび投与後約4時間に、回復期間中は毎日午前および午後一般状態および死亡の有無を観察した。また、体重および摂餌量を投与期間および回復期間を通して週2回の頻度で測定し、さらに、体重は投与開始日の投与前および剖検日にも測定した。

2) 尿検査

投与4週目および回復2週目に、代謝ケージにて、絶食、給水下で8時から12時までの間に採取した新鮮尿を用いて、比色試験紙(プレテスト8a, 和光純薬工業(株))により、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血およびウロビリノーゲンを検査した。さらに、新鮮尿を1500回転/分で5分間遠心分離し、得られた尿沈渣について鏡検した。また、新鮮尿採取後に給餌、給水下で採取した24時間蓄積尿を用いて、尿量、色調、

浸透圧(氷点降下法; OSMOMETER OM801, VOGEL社)および比重(屈折率法; 尿屈折計, ㈱アタゴ)を測定した。

3) 血液学検査

投与期間終了後および回復期間終了後に、すべての動物を18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウムを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、後大静脈腹部から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780, 東亜医用電子㈱)を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)および血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数[平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球血色素量(MCH)および平均赤血球血色素濃度(MCHC)]を算出した。さらに、血液の一部は塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色を施して白血球百分比を算出するとともに、網状赤血球率検査用のニューメチレンブルー超生体染色標本を作製して保管した。また、3.8%クエン酸ナトリウム加血液を3000回転/分で15分間遠心分離し、得られた血漿を用いて全自動血液凝固測定装置(Sysmex CA-5000, 東亜医用電子㈱)により、プロトロンビン時間(散乱光検出方式)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT, 散乱光検出方式)を測定した。

4) 血液生化学検査

血液学検査に引き続き採取した血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10, ㈱日立製作所)により、総蛋白質(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白質およびアルブミンより算出)、総ビリルビン(アルカリアゾビリルビン法)、GOT(Karmen法)、GPT(Wróblewski-La Due法)、 γ -グルタミルトランスアミナーゼ(L- γ -グルタミル-DBHA基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、コリンエステラーゼ(ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、アセチルコリンエステラーゼ(アセチルコリン基質法)、総コレステロール(COD-DAOS法)、トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(酵素法・DAOS発色法)、グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(ウレアーゼ・GIDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、無機リン(モリブデン酸直接法)およびカルシウム(OCPC法)を測定した。また、電解質分析装置(PVA- α III, ㈱アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)およびクロール(電量滴定法)を測定した。

5) 器官重量の測定、剖検および病理組織学検査

採血後に、外側腸骨動脈を切断して放血死させ、剖検

した。剖検時に、脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。これらの器官に加え、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、膵臓、胃、膀胱、大腿骨(骨髄を含む)および肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液(眼球は2.5%グルタルアルデヒド溶液、精巣はブアン液で前固定)で固定した。

投与期間終了時の対照群および高用量群の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および肉眼的異常組織については、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施して光学顕微鏡で観察した。

5. 統計解析

体重、摂餌量、尿検査(定性反応は除く)、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および体重比器官重量について、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、Bartlett法により分散の均一性を検定した。分散が均一な場合はDunnettの多重比較検定を用いて、異なる場合はSteelの多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。なお、いずれの場合も有意水準は1および5%とした。ただし、病理学検査については、偶発的変化が散見された程度であったため、統計解析は行わなかった。

結果

1. 一般状態

すべての群で死亡例はみられなかった。

1000 mg/kg群では、投与後約30分の観察で散瞳が認められた。散瞳は、雄で投与初日から投与15日まで、雌で投与初日から投与8日まで連日あるいは散発的にみられた。発現例数の総数は雄で3例、雌で4例であった。しかし、いずれも投与後約4時間の観察時には消失していた。このほか、100 mg/kg群の雄1例で投与27日から左耳介付近の頸部皮膚に外傷が、対照群の雌1例で投与12日から右眼に眼内出血がいずれも投与期間終了時までみられたが、他の群にはみられておらず、偶発的変化と考えられた。

回復期間においては、1000 mg/kg群の雌雄では変化は認められなかった。

2. 体重(Fig.1)

投与期間又は回復期間を通して、各被験物質投与群は対照群とほぼ同様な推移を示した。

3. 摂餌量

300 mg/kg群の雄で、投与24日にごく軽度の増加がみられたが、一過性であることおよび1000 mg/kg群には変化は見られていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

回復期間では、1000 mg/kg群は対照群とほぼ同様な推移を示した。

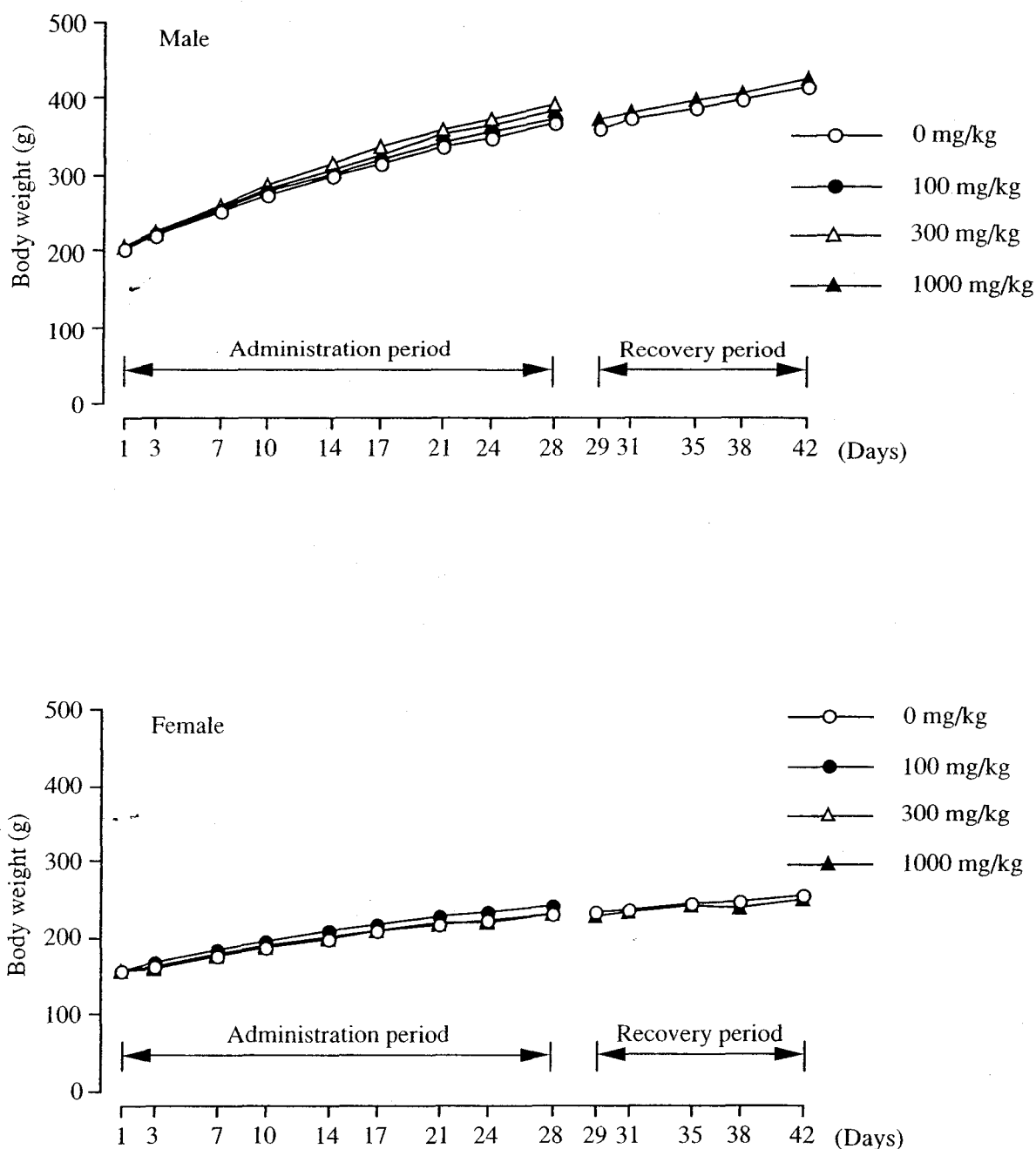


Fig. 1 Mean body weight changes of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test.

4. 尿検査 (Table 1)

投与4週目の検査では、300 mg/kg群の雄で尿量の増加が認められ、浸透圧および比重の減少も認められた。また、浸透圧の減少は100 mg/kg群の雄にもみられたが、同群の雌および1000 mg/kg群では変化はみられなかったことから、上記の変化には毒性学的意義はないと考えられた。

回復2週目の検査では、1000 mg/kg群の雌雄で変化は認められなかった。

5. 血液学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg以上の群の雄でMCVの増加および1000 mg/kg群の雄でMCHCの減少が認められたが、いずれも生理学的な変動範囲内の変化であり、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値には変化は認められなかったことから、毒性学的に意義のない変化と考えられた。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌雄で変化は認められなかった。

6. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg群の雌でリン脂質の減少が、100 mg/kg群の雄でカルシウムの減少が認められたが、300および1000 mg/kg群にはみられなかったことから、毒性学的に意義のない変化と判断した。また、100 mg/kg以上の群の雄でナトリウムの減少が認められたが、いずれも生理学的な変動範囲内の変化であった。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌でA/G比およびトリグリセライドの増加が認められたが、投与期間終了時には認められておらず、またいずれも生理学的な変動範囲内の変化であった。

7. 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg群の雄で胸腺の絶対および相対重量の増加が認められたが、同群の雌および1000 mg/kg群では変化はみられていないことから毒性学的意義はないと思われた。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌で副腎の相対重量の減少が認められた。

8. 剖検

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雄1例で肺の暗赤色点、100 mg/kg群の雄1例で左耳介付近の頸部皮膚に外傷が認められた。また、対照群の雌1例で両眼球に暗赤色点(右側でやや強い)が認められた。

回復期間終了時の検査では、対照群および1000 mg/kg群ともに変化は認められなかった。

9. 病理組織学検査 (Table 5)

投与期間終了時の剖検例において、組織学的変化は肉眼的変化に一致して認められた。すなわち、肺では、限局性の出血および細胞浸潤が1000 mg/kg群の雄1例に、眼球では、両側性の硝子体内出血が対照群の雌1例に認められた。また、頸部皮膚のびらんが100 mg/kg群の雄1例に認められた。

考察

死亡例はいずれの群でも認められなかった。一般状態の観察では、1000 mg/kg群の雌雄で散瞳が認められ、被験物質投与に関連した変化と考えられた。本症状は、雄で投与初日から投与15日まで、雌で投与初日から投与8日まで連日あるいは散発的にみられたが、投与後4時間には消失する変化であった。

体重、摂餌量、尿検査、血液学検査および血液生化学検査では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

病理学検査では、剖検で投与期間終了時にごく少数例の肺、眼球あるいは耳介付近の頸部皮膚に肉眼的変化がみられ、組織学的にも相応する変化がみられたが、これら以外には器官重量を含む病理学検査でまったく変化はみられなかった。

回復試験では、1000 mg/kg群の雌で副腎相対重量の減少が認められたが、投与期間終了時の検査では重量変化および組織学的変化はみられなかったことから、毒性学的意義はないと思われた。また、その他の諸検査あるいは測定においては、雌雄のいずれにも変化はみられなかった。

以上のように、本試験では1000 mg/kg群で散瞳が認められたことから、無影響量は雌雄とも300 mg/kg/dayと考えられた。

連絡先

試験責任者：一鬼 勉

試験担当者：古川浩美, 和泉宏幸, 幸 邦憲,
村田英治, 神谷光一, 浜村政夫,
楯先恵美子

(株)パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所
〒869-0425 熊本県宇土市栗崎町1285
Tel 0964-23-5111 Fax 0964-23-2282

Correspondence

Authors: Tsutomu Ichiki (Study director)

Hiromi Furukawa, Hiroyuki Izumi,
Kuninori Yuki, Eiji Murata,
Koichi Kamiya, Masao Hamamura,
Emiko Kuwasaki

Safety Assessment Laboratory, Panapharm
Laboratories Co., Ltd.

1285 Kurisaki-machi, Uto-shi, Kumamoto,
869-0425, Japan

Tel +81-964-23-5111 Fax +81-964-23-2282

Table 1 Urinary findings of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	100	300	1000	0	1000	
Male							
No. of animals	12	6	6	12	6	6	
Urine volume (mL/24hr)	12.0 ± 4.0	18.0 ± 4.8	18.8 ± 5.9*	15.0 ± 5.3	13.5 ± 4.7	16.0 ± 6.7	
Osmotic pressure (Osm/kg)	1.494 ± 0.394	1.016 ± 0.184**	1.008 ± 0.265**	1.233 ± 0.225	1.415 ± 0.408	1.350 ± 0.475	
Specific gravity	1.045 ± 0.014	1.037 ± 0.010	1.031 ± 0.008*	1.040 ± 0.008	1.044 ± 0.013	1.043 ± 0.016	
Color	pale yellow yellow	1 11	2 4	3 3	4 8	0 6	1 5
pH	6.5 7.0 7.5 8.0 8.5	0 0 0 9 3	0 0 0 3 3	0 0 2 1 3	0 1 1 7 3	0 0 3 3 0	0 0 0 5 1
Protein	- ± + ++	0 9 3 0	1 5 0 0	3 2 1 0	6 5 0 1	1 2 3 0	3 2 1 0
Glucose	-	12	6	6	12	6	6
Ketone body	-	12	6	6	12	6	6
Bilirubin	-	12	6	6	12	6	6
Occult blood	- + ++ +++	12 0 0 0	5 0 0 1	5 1 0 0	9 3 0 0	4 0 0 2	6 0 0 0
Urobilinogen	<1	12	6	6	12	6	6
Epithelial cells	- + +	11 1 1	6 0 0	6 0 0	12 0 11	4 2 5	5 1 6
Erythrocytes	- + +	12 0 12	6 0 6	6 0 6	11 1 12	5 1 6	6 0 6
Leucocytes	-	12	6	6	12	6	6
Casts	-	12	6	6	12	6	6
Crystals	- + ++ +++	9 2 1 0	6 0 0 0	5 1 0 0	10 2 0 0	5 1 0 0	5 0 0 1
Female							
No. of animals	12	6	6	12	6	6	
Urine volume (mL/24hr)	8.1 ± 5.1	6.0 ± 3.4	10.4 ± 3.6	9.0 ± 6.7	11.7 ± 5.1	14.2 ± 5.7	
Osmotic pressure (Osm/kg)	1.488 ± 0.623	1.785 ± 0.366	1.127 ± 0.150	1.623 ± 0.771	1.355 ± 0.350	1.282 ± 0.591	
Specific gravity	1.047 ± 0.021	1.059 ± 0.014	1.035 ± 0.005	1.053 ± 0.027	1.041 ± 0.011	1.038 ± 0.017	
Color	pale yellow yellow yellowish brown	2 9 1	0 6 0	3 3 0	3 7 2	1 5 0	1 5 0
pH	6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0	1 1 1 3 2 4 0	0 0 1 0 3 2 0	0 0 1 0 3 2 0	0 2 0 3 4 2 1	0 0 1 2 1 2 0	0 0 0 2 2 2 0
Protein	- ± + ++	10 1 1 0	5 1 0 0	4 2 0 0	7 3 1 1	6 0 0 0	6 0 0 0
Glucose	-	12	6	6	12	6	6
Ketone body	-	12	6	6	12	6	6
Bilirubin	-	12	6	6	12	6	6
Occult blood	- + ++ +++	11 1 0 0	6 0 0 0	6 0 0 0	10 1 1 0	3 1 1 1	6 0 0 0
Urobilinogen	<1	12	6	6	12	6	6
Epithelial cells	-	12	6	6	12	6	6
Erythrocytes	- + +	12 0 12	6 0 6	6 0 6	12 0 12	5 1 6	6 0 6
Leucocytes	-	12	6	6	12	6	6
Casts	-	12	6	6	12	6	6
Crystals	- +	12 0	6 0	6 0	11 1	6 0	6 0

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 2 Hematological findings of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Leucocyte ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	93 \pm 21	71 \pm 14	86 \pm 36	87 \pm 29	94 \pm 30	103 \pm 30
Erythrocyte ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	792 \pm 30	743 \pm 28	757 \pm 45	766 \pm 29	862 \pm 31	844 \pm 42
Hemoglobin (g/dL)	15.1 \pm 0.4	14.6 \pm 0.3	14.9 \pm 0.6	14.9 \pm 0.5	15.1 \pm 0.6	15.0 \pm 0.6
Hematocrit (%)	46.6 \pm 1.6	45.6 \pm 1.0	46.6 \pm 2.0	46.9 \pm 1.3	47.9 \pm 1.6	47.3 \pm 1.8
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	101.2 \pm 8.8	92.7 \pm 8.5	108.6 \pm 8.3	99.4 \pm 4.7	100.9 \pm 10.2	98.3 \pm 10.2
MCV (fl)	59 \pm 1	62 \pm 1**	62 \pm 1**	61 \pm 2**	56 \pm 1	56 \pm 1
MCH (pg)	19.1 \pm 0.5	19.6 \pm 0.4	19.7 \pm 0.5	19.5 \pm 0.6	17.6 \pm 0.4	17.8 \pm 0.6
MCHC (%)	32.4 \pm 0.5	32.0 \pm 0.3	32.0 \pm 0.2	31.8 \pm 0.4*	31.6 \pm 0.2	31.7 \pm 0.6
Eosinophil (%)	0.5 \pm 0.5	0.5 \pm 0.8	0.5 \pm 0.5	1.0 \pm 1.3	0.2 \pm 0.4	0.2 \pm 0.4
Neutro-Stab. (%)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Neutro-Seg. (%)	13.0 \pm 2.6	13.3 \pm 5.6	14.2 \pm 6.2	11.5 \pm 4.4	6.3 \pm 2.3	8.7 \pm 5.0
Lymphocyte (%)	85.8 \pm 2.7	85.7 \pm 5.4	84.8 \pm 6.5	86.7 \pm 3.9	92.5 \pm 2.6	90.2 \pm 5.2
Basophil (%)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocyte (%)	0.7 \pm 0.5	0.5 \pm 0.5	0.5 \pm 0.5	0.8 \pm 1.2	1.0 \pm 1.1	1.0 \pm 0.9
Prothrombin time (sec)	13.3 \pm 2.9	13.4 \pm 1.7	12.4 \pm 1.3	12.3 \pm 1.2	13.3 \pm 0.9	13.1 \pm 1.6
APTT (sec)	25.2 \pm 1.7	24.3 \pm 2.0	23.2 \pm 3.2	23.3 \pm 0.9	24.2 \pm 1.8	22.4 \pm 2.6
Female						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Leucocyte ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	60 \pm 15	70 \pm 19	64 \pm 10	57 \pm 9	64 \pm 14	46 \pm 14
Erythrocyte ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	751 \pm 29	752 \pm 32	781 \pm 32	738 \pm 31	795 \pm 28	780 \pm 32
Hemoglobin (g/dL)	14.8 \pm 0.4	14.6 \pm 0.6	15.2 \pm 0.5	14.7 \pm 0.6	14.7 \pm 0.4	14.3 \pm 0.2
Hematocrit (%)	45.4 \pm 1.2	45.4 \pm 2.5	46.4 \pm 1.1	44.9 \pm 1.9	45.9 \pm 1.7	44.8 \pm 1.4
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	101.7 \pm 8.5	102.4 \pm 5.4	103.9 \pm 10.2	100.9 \pm 8.0	103.3 \pm 7.7	107.1 \pm 14.7
MCV (fl)	61 \pm 1	60 \pm 2	60 \pm 2	61 \pm 2	58 \pm 1	58 \pm 1
MCH (pg)	19.7 \pm 0.4	19.4 \pm 0.5	19.5 \pm 0.7	20.0 \pm 1.0	18.5 \pm 0.4	18.4 \pm 0.5
MCHC (%)	32.5 \pm 0.5	32.1 \pm 0.8	32.7 \pm 0.3	32.8 \pm 0.6	32.1 \pm 0.5	32.0 \pm 0.6
Eosinophil (%)	0.7 \pm 1.0	1.0 \pm 1.3	1.0 \pm 0.9	1.5 \pm 2.3	0.7 \pm 0.8	1.3 \pm 1.5
Neutro-Stab. (%)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Neutro-Seg. (%)	14.3 \pm 3.3	10.5 \pm 3.5	9.5 \pm 3.8	10.5 \pm 5.3	13.8 \pm 5.4	17.3 \pm 10.7
Lymphocyte (%)	84.3 \pm 3.3	88.3 \pm 4.5	88.7 \pm 4.3	87.2 \pm 7.7	85.0 \pm 6.3	80.2 \pm 10.8
Basophil (%)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocyte (%)	0.7 \pm 0.8	0.2 \pm 0.4	0.8 \pm 1.0	0.8 \pm 0.8	0.5 \pm 0.8	1.2 \pm 0.4
Prothrombin time (sec)	10.5 \pm 0.2	10.5 \pm 0.3	10.6 \pm 0.4	10.5 \pm 0.4	10.3 \pm 0.6	10.2 \pm 0.7
APTT (sec)	18.7 \pm 1.1	19.7 \pm 1.7	18.5 \pm 0.9	20.1 \pm 1.0	17.7 \pm 1.2	16.2 \pm 2.7

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (significantly different from control)Values are mean \pm S.D.

Table 3 Blood chemical findings of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
T.protein (g/dL)	5.0 ± 0.1	4.9 ± 0.2	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.1
A/G ratio	2.60 ± 0.41	2.48 ± 0.26	2.39 ± 0.15	2.42 ± 0.16	2.24 ± 0.23	2.20 ± 0.10
T.bilirubin (mg/dL)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1
GOT (IU/L)	88 ± 13	82 ± 10	95 ± 17	86 ± 14	99 ± 24	100 ± 18
GPT (IU/L)	19 ± 3	18 ± 3	17 ± 3	17 ± 2	19 ± 2	21 ± 3
γ-GTP (IU/L)	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2
ALP (IU/L)	281 ± 42	302 ± 53	246 ± 76	256 ± 67	235 ± 37	227 ± 53
Cholinesterase (IU/L)	50 ± 6	51 ± 13	52 ± 14	58 ± 10	53 ± 16	54 ± 13
Acetylcholinesterase (ΔpH)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02
T.cholesterol (mg/dL)	58 ± 13	55 ± 8	57 ± 8	57 ± 6	54 ± 11	54 ± 7
Triglycerides (mg/dL)	47 ± 16	60 ± 17	55 ± 24	65 ± 28	76 ± 31	67 ± 18
Phospholipids (mg/dL)	97 ± 16	98 ± 9	100 ± 11	101 ± 12	103 ± 15	100 ± 6
Glucose (mg/dL)	107 ± 14	107 ± 10	118 ± 21	108 ± 6	116 ± 12	116 ± 9
BUN (mg/dL)	16.7 ± 2.2	16.1 ± 1.6	16.3 ± 2.7	17.3 ± 2.1	16.4 ± 2.2	17.0 ± 1.0
Creatinine (mg/dL)	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1
IP (mg/dL)	7.7 ± 0.5	7.4 ± 0.6	7.4 ± 0.2	7.7 ± 0.4	6.9 ± 0.5	6.9 ± 0.4
Ca (mg/dL)	9.5 ± 0.1	9.3 ± 0.1*	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.2	9.6 ± 0.2
Na (mEq/L)	147.8 ± 0.7	146.4 ± 0.4**	146.5 ± 0.6**	146.1 ± 0.6**	146.0 ± 1.2	144.9 ± 0.6
K (mEq/L)	4.22 ± 0.18	4.24 ± 0.17	4.36 ± 0.14	4.32 ± 0.12	4.25 ± 0.21	4.32 ± 0.18
Cl (mEq/L)	107.8 ± 0.8	107.5 ± 1.1	106.3 ± 2.1	106.2 ± 1.3	106.3 ± 1.4	105.5 ± 1.1
Female						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
T.protein (g/dL)	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.4	5.5 ± 0.3	5.3 ± 0.2	5.4 ± 0.4	5.5 ± 0.2
Albumin (g/dL)	4.0 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.3	4.0 ± 0.1
A/G ratio	3.14 ± 0.42	2.74 ± 0.13	2.86 ± 0.17	2.77 ± 0.17	2.48 ± 0.10	2.73 ± 0.16**
T.bilirubin (mg/dL)	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
GOT (IU/L)	87 ± 20	81 ± 19	78 ± 10	88 ± 11	109 ± 20	103 ± 13
GPT (IU/L)	15 ± 3	15 ± 3	14 ± 2	15 ± 2	19 ± 2	17 ± 4
γ-GTP (IU/L)	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3
ALP (IU/L)	172 ± 26	162 ± 24	188 ± 63	133 ± 41	144 ± 48	152 ± 18
Cholinesterase (IU/L)	489 ± 80	382 ± 119	433 ± 94	515 ± 127	510 ± 239	485 ± 73
Acetylcholinesterase (ΔpH)	0.39 ± 0.07	0.28 ± 0.10	0.32 ± 0.09	0.41 ± 0.12	0.45 ± 0.23	0.42 ± 0.07
T.cholesterol (mg/dL)	67 ± 5	54 ± 12	60 ± 12	56 ± 7	62 ± 14	71 ± 15
Triglycerides (mg/dL)	24 ± 8	20 ± 5	27 ± 8	22 ± 3	19 ± 4	29 ± 11*
Phospholipids (mg/dL)	132 ± 13	105 ± 18*	121 ± 23	110 ± 12	120 ± 27	139 ± 18
Glucose (mg/dL)	92 ± 14	92 ± 15	95 ± 13	90 ± 11	93 ± 10	99 ± 9
BUN (mg/dL)	24.9 ± 2.9	25.1 ± 2.0	23.8 ± 3.9	24.6 ± 6.3	22.2 ± 2.7	21.3 ± 1.2
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0
IP (mg/dL)	8.6 ± 0.6	8.2 ± 1.1	7.7 ± 0.7	7.8 ± 0.7	6.1 ± 0.6	5.7 ± 0.6
Ca (mg/dL)	9.7 ± 0.2	9.6 ± 0.4	9.8 ± 0.3	9.8 ± 0.3	9.8 ± 0.3	9.6 ± 0.2
Na (mEq/L)	146.5 ± 0.7	146.6 ± 0.7	146.2 ± 0.8	145.8 ± 0.7	145.2 ± 0.5	145.7 ± 0.7
K (mEq/L)	4.44 ± 0.36	4.44 ± 0.23	4.48 ± 0.29	4.29 ± 0.16	4.20 ± 0.24	4.25 ± 0.24
Cl (mEq/L)	109.1 ± 1.1	109.8 ± 1.1	108.4 ± 1.0	108.8 ± 1.3	108.9 ± 1.5	109.0 ± 1.2

*:P<0.05, **:P<0.01 (significantly different from control)

Values are mean±S.D.

Table 4 Organ weights of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days dosing groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Final Body Weight (g)	339.9 ± 25.1	344.4 ± 27.4	360.1 ± 37.4	365.9 ± 26.8	380.2 ± 42.6	392.4 ± 40.7
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.12 ± 0.06	2.09 ± 0.06	2.07 ± 0.06	2.13 ± 0.02	2.12 ± 0.11	2.17 ± 0.12
Heart (g)	1.21 ± 0.17	1.19 ± 0.12	1.30 ± 0.12	1.24 ± 0.12	1.26 ± 0.25	1.30 ± 0.25
Lungs (g)	1.19 ± 0.07	1.19 ± 0.09	1.22 ± 0.08	1.27 ± 0.12	1.26 ± 0.16	1.28 ± 0.08
Thymus (g)	0.54 ± 0.07	0.53 ± 0.07	0.70 ± 0.09*	0.58 ± 0.14	0.44 ± 0.11	0.47 ± 0.05
Liver (g)	10.42 ± 1.12	10.78 ± 1.50	11.42 ± 2.22	11.73 ± 1.89	11.05 ± 1.60	11.10 ± 1.42
Spleen (g)	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.11	0.74 ± 0.13	0.77 ± 0.12	0.72 ± 0.10	0.73 ± 0.08
Kidneys (g)	2.40 ± 0.19	2.44 ± 0.12	2.55 ± 0.28	2.54 ± 0.20	2.66 ± 0.32	2.63 ± 0.34
Adrenals (mg)	50.9 ± 9.2	50.0 ± 7.1	49.6 ± 5.7	58.8 ± 7.0	52.2 ± 9.9	54.0 ± 9.7
Testes (g)	2.99 ± 0.13	2.85 ± 0.10	3.03 ± 0.23	3.05 ± 0.18	2.95 ± 0.27	3.14 ± 0.30
Relative organ weight						
Brain (g/100gB.W.)	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.05	0.58 ± 0.05	0.58 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.56 ± 0.06
Heart (g/100gB.W.)	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.04
Lungs (g/100gB.W.)	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.02
Thymus (g/100gB.W.)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.20 ± 0.01*	0.16 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.02
Liver (g/100gB.W.)	3.06 ± 0.16	3.12 ± 0.22	3.15 ± 0.30	3.19 ± 0.36	2.90 ± 0.22	2.82 ± 0.10
Spleen (g/100gB.W.)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01
Kidneys (g/100gB.W.)	0.71 ± 0.03	0.71 ± 0.04	0.71 ± 0.05	0.69 ± 0.03	0.70 ± 0.04	0.67 ± 0.03
Adrenals (mg/100gB.W.)	15.0 ± 2.4	14.5 ± 1.4	13.8 ± 0.8	16.0 ± 1.2	13.9 ± 3.0	13.9 ± 2.5
Testes (g/100gB.W.)	0.88 ± 0.06	0.83 ± 0.07	0.84 ± 0.07	0.84 ± 0.10	0.78 ± 0.07	0.81 ± 0.09
Female						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Final Body Weight (g)	206.9 ± 12.2	222.6 ± 19.2	213.8 ± 14.8	218.6 ± 10.9	233.1 ± 14.7	231.7 ± 15.7
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.94 ± 0.06	1.96 ± 0.03	1.94 ± 0.09	2.02 ± 0.10	2.02 ± 0.03	2.02 ± 0.05
Heart (g)	0.80 ± 0.06	0.79 ± 0.06	0.79 ± 0.05	0.82 ± 0.06	0.88 ± 0.09	0.84 ± 0.06
Lungs (g)	0.96 ± 0.06	0.95 ± 0.07	0.97 ± 0.04	1.01 ± 0.06	1.03 ± 0.05	0.97 ± 0.07
Thymus (g)	0.39 ± 0.04	0.48 ± 0.09	0.46 ± 0.12	0.39 ± 0.08	0.34 ± 0.08	0.38 ± 0.06
Liver (g)	6.26 ± 0.50	6.62 ± 0.68	6.75 ± 0.47	6.70 ± 0.71	6.62 ± 0.69	6.74 ± 0.77
Spleen (g)	0.47 ± 0.02	0.49 ± 0.08	0.51 ± 0.08	0.50 ± 0.06	0.55 ± 0.03	0.52 ± 0.08
Kidneys (g)	1.62 ± 0.08	1.62 ± 0.10	1.72 ± 0.07	1.69 ± 0.08	1.62 ± 0.14	1.63 ± 0.08
Adrenals (mg)	64.5 ± 6.3	65.4 ± 9.8	60.1 ± 12.7	64.4 ± 8.2	70.9 ± 4.3	64.0 ± 8.9
Ovaries (mg)	76.1 ± 7.6	86.9 ± 5.5	86.0 ± 8.5	90.2 ± 16.6	86.2 ± 10.9	81.2 ± 9.5
Relative organ weight						
Brain (g/100gB.W.)	0.94 ± 0.04	0.89 ± 0.07	0.91 ± 0.07	0.92 ± 0.06	0.87 ± 0.05	0.88 ± 0.06
Heart (g/100gB.W.)	0.39 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.02
Lungs (g/100gB.W.)	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.02	0.46 ± 0.05	0.46 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.42 ± 0.02
Thymus (g/100gB.W.)	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.07	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.17 ± 0.03
Liver (g/100gB.W.)	3.03 ± 0.21	2.98 ± 0.25	3.16 ± 0.22	3.06 ± 0.23	2.84 ± 0.19	2.90 ± 0.17
Spleen (g/100gB.W.)	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02
Kidneys (g/100gB.W.)	0.78 ± 0.04	0.73 ± 0.06	0.81 ± 0.07	0.77 ± 0.05	0.69 ± 0.04	0.71 ± 0.02
Adrenals (mg/100gB.W.)	31.3 ± 3.8	29.7 ± 6.2	28.0 ± 4.8	29.4 ± 3.1	30.4 ± 1.2	27.6 ± 2.3*
Ovaries (mg/100gB.W.)	36.9 ± 3.9	39.3 ± 3.6	40.2 ± 2.1	41.3 ± 7.8	37.0 ± 4.0	35.0 ± 3.2

*: P<0.05 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 5 Histopathological findings of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)											
	0				100				1000			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Male												
No. of animals	6				1				6			
Respiratory system												
Lung	(0)				(0)				(1)			
Hemorrhage, localized									0	1	0	0
Cellular infiltration, localized									0	1	0	0
Nervous system												
Eye ball	(0)				(0)				(0)			
Hemorrhage, vitreous body, bilateral												
Integumentary system												
Integument	(0)				(1)				(0)			
Erosion, cervical skin					0	1	0	0				
Female												
No. of animals	6				6				6			
Respiratory system												
Lung	(0)				(0)							
Hemorrhage, localized												
Cellular infiltration, localized												
Nervous system												
Eye ball	(1)				(0)							
Hemorrhage, vitreous body, bilateral	0	1	0	0								
Integumentary system												
Integument	(0)				(0)							
Erosion, cervical skin												

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, kidney and adrenal in the control group and 1000 mg/kg group.

2-ナフトール-3,6-ジ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 2-naphthol-3,6-disulfonate on Bacteria

要約

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 μg /プレート濃度を設定して行った濃度設定試験では、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において生育阻害は認められず、いずれの濃度においても溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、本試験は、濃度設定試験と同じ濃度を用いて同様に行った。

試験の結果、濃度設定試験と同様、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められず、また、菌の生育阻害も認められなかった。

以上の成績から、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は、細菌に対し遺伝子突然変異を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および *E. coli* WP2 *uvrA*²⁾ 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。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その30 μL をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液は、濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

2. 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-1101, 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、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メタノールに不溶であり、分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$ 、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。

3. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(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、用時調製した。

4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

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))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(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(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO(株)同仁化学研究所)に、SA および 9-AA は蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解した。

5. 培地

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディアAN培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

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	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
グルコース	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トッパアガー)

0.6%寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-

ヒスチジン水溶液, *E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え, トップアガーとした。

6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームテスト用凍結S9 mix(キッコーマン株)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。

7. 試験方法

試験は, プレインキューベーション法で行った。

試験管に使用溶媒, 被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL, 次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL, 代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え, 続いて試験菌液0.1 mLを分注し, 37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後, 45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは, 各濃度とも3枚を使用した。

8. 結果の判定

結果の判定は, 各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に, 以下の3基準を全て満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する(濃度依存性)。
- 3) 濃度設定試験および本試験の結果から, 復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

結果および考察

156~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定(公比2)して行った濃度設定試験(Table 1, 2)では, 直接法および代謝活性化法ともに, いずれの指標菌株においても溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められず, また, いずれの菌株においても被験物質による生育阻害は認められなかった。したがって, 本試験における被験物質の処理濃度は, 最高濃度を5000 μg /プレートとし, 以下公比2で2500, 1250, 625, 313および156 μg /プレートとした。

本試験の結果(Table 3, 4)は, 濃度設定試験と同様, 直接法および代謝活性化法のいずれの場合も, 供試した全ての菌株における復帰変異コロニー数は, 溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。また, いずれの菌株においても生育阻害は認められなかった。

以上の成績から, 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遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

なお, 2-ナフトールの変異原性については, *S. 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, *E. 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) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 3) W. Suter, 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, Sagami-hara-shi,
 kanagawa, 229-1132, Japan
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

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]	[10 \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 ^a	265	289	292 ^b	847	819	926 ^c	399	402	428 ^d	586	482	585 ^e	[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) :NaN₃; 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 ^a	129	137	149 ^b	981	954	972 ^c	244	266	249 ^d	98	102	100 ^e	[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) :NaN₃;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 ^d	112	104	92 ^e
	[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100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

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。

培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従って調製し、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。

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2回、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³⁾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, Sagami-hara-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)	0	-	-
SNDS	1250	24	200	1	0	0	0	0	0	1	1	0(0)	1(0.5)	0	-	-
	2500	24	200	0	2	0	0	0	0	2	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
	5000	24	200	1	2	0	0	0	0	3	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.