厚生省生活衛生局　殿

試　験　報　告　書

4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 6L681)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目 次

要約 …… 7

材料および方法 …… 8

1. 試験物質 …… 8

2. 細胞 …… 9

3. 培地 …… 9

4. S9 mix …… 9

5. 試験物質調製液 …… 10

6. 細胞増殖抑制試験 …… 10

7. 染色体異常試験 …… 11

8. 確認試験 …… 13

結果 …… 14

考察および結論 …… 14

参考文献 …… 14

表 …… 15

図 …… 21

要 約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い，4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑの *in vitro* における染色体異常試験を実施した．

細胞増殖抑制試験の結果，いずれの条件においても，被験物質は細胞増殖を 50 %以上抑制しなかった．従って，染色体異常試験は，5000 μg/ml を最高濃度とし，その 1/2 および 1/4 の 3 濃度で実施した．その結果，連続処理法の 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，連続処理法の 48 時間処理について，染色体異常試験と同濃度で確認試験を実施した．その結果，いずれの濃度においても，染色体構造異常細胞の誘発は観察されなかった．その他の処理条件では，染色体構造異常細胞の誘発は観察されなかった．また，全ての処理条件において，数的異常細胞の誘発は観察されなかった．

以上の結果より，本試験条件下における 4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した．

材料および方法

1. 試験物質

1.1 被験物質

.から送付された4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ(CAS 番号：130-13-2，ロット番号:　　純度76.1 %)を使用時まで室温に保存した．被験物質は下記の示性式,分子量を有する水に可溶の臭気等のない粉末である．試験に使用したロットの安定性は，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．

示性式：

$$NH_2C_{10}H_6SO_3Na \cdot 4H_2O$$

分子量：245.22(無水)

不純物：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 %

(以上，全て概略値)

1.2 対照物質

1) 陰性対照物質

局方生理食塩液（生食と略す．㈱大塚製薬工場，ロット番号：K6F82)

2) 陽性対照物質

(1)連続処理法

マイトマイシンC　(MMC と略す．協和醗酵工業㈱，ロット番号：119AFG，含量 100 %)

(2)短時間処理法

ベンゾ[a] ピレン　(BP と略す．東京化成工業㈱，ロット番号：AX01，含量 99.5 %)

2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株CHL/IUを使用した．細胞は大日本製薬㈱より 1996 年 11 月 6 日に購入し，細胞懸濁液に対し 10 %の割合でジメチルスルホキシド（DMSO と略す）を添加したものを 1 ml に小分けして，液体窒素中で凍結保存した．試験には，これを融解して培養し，その後の継代数が 5 代以内のものを使用した．細胞の培養には，プラスチックシャーレ（直径 6 cm または 10 cm； Becton Dickinson and Company）を用い，炭酸ガス細胞培養装置内（NAPCO 社，7300 型，炭酸ガス 5 %，温度 37 ℃，加湿）で培養した．

3. 培地

3.1 イーグル最少培地

イーグル最少培地（MEM と略す．イーグル MEM 培地「ニッスイ」①，日水製薬㈱）を添付の処方に従い調製し，オートクレーブ滅菌（121 ℃，15 分間）を行った．この 1 *l* に，別に滅菌処理した 2.92 % L- グルタミン水溶液 10 ml と 10 %炭酸水素ナトリウム水溶液 12.7 ml を添加した．

3.2 培養液

上記の MEM 900 ml に対して，非働化（56 ℃, 30 分間加熱処理）した仔牛血清（GIBCO BRL, ロット番号：35K7844）を 100 ml 添加した．

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目 30 mg/kg，2 日目以降 60 mg/kg を 3 日間 1 日 1 回腹腔内投与）と 5, 6- ベンゾフラボン（3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9（キッコーマン㈱，ロット番号：RAA-355，1996 年 11 月 22 日製造）を購入し，使用した．使用時まで -80 ℃ 以下で保存した．

4.2 S9 mix

S9 mix 10 ml あたり以下の組成で用時調製し，使用時まで氷中に保存した．

D- グルコース 6- リン酸	14.1 mg
β -NADP $^{+}$	33.5 mg
（以上，用時秤量）	
20 mM HEPES （pH 7.2）	2 ml
50 mM 塩化マグネシウム六水和物	1 ml
330 mM 塩化カリウム	1 ml
精製水	3 ml
（以上，予め滅菌調製した溶液を添加）	
S9	3 ml

5. 試験物質調製液

5.1 被験物質溶液

溶媒検討の結果，本被験物質は，生食に 50 mg/ml で溶解した．従って，本被験物質の溶媒は生食を用いた．

被験物質を所定濃度で生食に溶解し，メンブランフィルターでろ過滅菌を行った．この溶液をさらに同じ溶媒で希釈し各処理濃度の 10 倍の被験物質溶液を用時調製した．なお，被験物質秤量の際は，純度換算（76.1 %）を実施した．

5.2 陽性対照溶液

MMC は，生食（㈱大塚製薬工場，ロット番号：K6K83）で 3 μg/ml に用時調製した．BP は，DMSO（関東化学㈱，ロット番号：610E1229）で 4 mg/ml に溶解し，凍結保存したものを室温で融解し使用した．

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の処理濃度を決定するために，細胞増殖抑制試験を実施した．

6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち，連続処理法の 24, 48 時間処理および短時間処理法の S9 mix 共存下で, 5000, 2500, 500, 50 μg/ml の 4 濃度で予備試験を実施した．この試験では，1 濃度あたり 1 枚のシャーレを用い，処理 24 または 48 時間後に位相差倒立顕微鏡で細胞の状態を観察した．

その結果，いずれの処理条件および処理濃度においても，細胞の状態は陰性対照と差が認められなかった．

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は，連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても 5000, 2500, 1250, 625, 313 μg/ml の 5 濃度を設定した.

6.2 細胞処理

4×10^3個/ml の細胞懸濁液を 6 cm シャーレに 5 ml 播き，3 日間培養した.

シャーレから培養液を除去した後，連続処理法では，細胞を被験物質溶液 0.5 ml, 培養液 4.5 ml で 24 または 48 時間処理した.

短時間処理法では，S9 mix 共存下は，細胞を被験物質溶液 0.3 ml，S9 mix 0.5 ml, 培養液 2.2 ml で，また，S9 mix 非共存下は，被験物質溶液 0.3 ml，培養液 2.7 ml で 6 時間処理後，MEM で 3 回洗浄し新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間培養した.

陰性対照として，被験物質溶液に使用した溶媒も各条件で同様に処理した．各濃度あたり 2 枚のシャーレを用いた.

6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+}, Mg^{2+}フリーのダルベッコのリン酸緩衝液（PBS(-)と略す. ダルベッコ PBS「ニッスイ」，日水製薬㈱）で洗浄し，メタノールで 10 分間固定，3 %ギムザ液（1/150 M リン酸緩衝液, pH 6.8,で希釈）で 10 分間染色後，軽く水洗し乾燥した．染色した各シャーレを単層培養細胞密度計（モノセレーター，オリンパス光学工業㈱）を用いて細胞増殖率を測定した.

6.4 50 %細胞増殖抑制濃度(IC_{50})の算出

連続処理法および短時間処理法のそれぞれについて，陰性対照値を 100 %として生存曲線を作成し，被験物質の 50 %細胞増殖抑制濃度(IC_{50})を算出した．なお，IC_{50}は，プロビット法により算出した.

7. 染色体異常試験

7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果を図 1 ～ 2 に示すごとく，5000 μg/ml まで細胞の増殖を抑制しなかった.

この結果から，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，その 1/2 および 1/4 の 3 濃度(5000，2500，1250 μg/ml)で染色体異常試験を実施した.

陽性対照である MMC, BP の濃度はそれぞれ，染色体異常誘発性が知られてい

る 0.03, 20 μg/ml とした.

7.2 細胞処理

細胞を 6.2 と同様に処理した.

陽性対照については，連続処理法では，細胞を培養液 5 ml，MMC 溶液 50 μl で，短時間処理法の S9 mix 共存下では培養液 2.5 ml，S9 mix 0.5ml，BP 溶液 15 μl で，S9 mix 非共存下では培養液 3 ml，BP 溶液 15 μl で同様に処理した.

7.3 標本作製

処理終了の 2 時間前に，コルセミドを最終濃度が 0.1 μg/ml となるようにシャーレに加え，分裂中期の細胞を蓄積させた．処理終了後，細胞表面を PBS(-) で 1 回洗浄し，0.25 % トリプシン（溶媒：PBS(-)）処理により細胞を剥離し，遠心分離（1000 rpm，5 分間；以下同じ）により細胞を集めた．上清を除去し，これに 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 ml を加えて低張処理（37 ℃，15 分）を行った．更に，冷却したメタノール・酢酸(3:1)混合液 4 ml を加え細胞を固定し,遠心分離後，固定液を捨て新しい固定液を 4 ml 加えた．この操作を 3 ～ 4 回繰り返した．固定終了後，少量の固定液で細胞を懸濁し，濡らした手ぬぐいに置いたスライドガラス上の 2 箇所に滴下し，乾燥して染色体標本とした．これを 3 %ギムザ溶液で 20 分間染色し，水洗，乾燥後，封入剤で封入して観察標本とした．各シャーレ 2 枚の標本を作製した.

7.4 観　察

1) 予備鏡検

標本作製後，試験の適否確認のため予備鏡検を行った.

その結果，いずれの標本においても 1 枚のシャーレあたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため，全ての標本を観察対象とした.

陰性対照および陽性対照については，各々構造異常細胞の出現状態が適切であることを確認した.

2) 分裂指数／分裂活性

予備鏡検時に，シャーレ 1 枚につき 1000 個，1 濃度 2000 個の細胞中の分裂中期細胞を数え，分裂指数を求めた．またこれから陰性対照と各処理群の分裂指数の比（分裂活性）を算出した.

3) 構造異常および数的異常

陰性対照，陽性対照および被験物質処理群について，構造異常および数的異常を盲検法で観察した．

(1) 構造異常

シャーレ1枚につき100個，1濃度200個の細胞を調べた．

染色体がよく拡がった分裂中期細胞を観察し，構造異常細胞を数えた．ただし，構造異常がなく，染色体数が25±2本でない細胞は除外した．異常の分類は以下のとおりとした[1]．

- ギャップ (染色分体型および染色体型を含む；gap と略す)
- 染色分体型切断 (ctb と略す)
- 染色分体型交換 (cte と略す)
- 染色体型切断 (csb と略す)
- 染色体型交換 (二動原体，環状染色体など；cse と略す)
- 断片化 (frg と略す)

ギャップは，染色分体に見られる非染色部分が染色分体の軸上にあり，その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず，非染色部分の形状が明確なものとし切断とは区別した．

(2) 数的異常

シャーレ1枚につき100個，1濃度200個の分裂中期細胞を調べ，核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた．

7.5 試験結果の判定基準

構造異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし，ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合（-gap）と含めた場合（+gap）で集計した．

被験物質の染色体異常誘発性についての判定は，+gap の構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に5％未満を陰性(－)，両方またはいずれかが5％以上10％未満を疑陽性(±)，いずれか一方または両方が10％以上を陽性(＋)とした．

7.6 結果のまとめ

染色体構造異常をもつ細胞および倍数体の出現数並びに合計およびそれぞれの出現頻度(%)を表示するとともに，用量依存性について図示した．

8. 確認試験

連続処理法の48時間処理について確認試験を実施した．被験物質濃度は5000, 2500, 1250 μg/ml の3濃度とし，7. 染色体異常試験と同様に処理した．

結 果

結果を表 1 ～ 6 および図 3 ～ 8 に示す.

連続処理法の 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，連続処理法の 48 時間処理について，染色体異常試験と同濃度で確認試験を実施した．その結果，いずれの濃度においても，染色体構造異常細胞の出現頻度は 5 %未満であった.

その他の処理条件では，染色体構造異常細胞の出現頻度は 5 %未満であった．数的異常細胞の出現頻度は，全ての処理条件において 5 %未満であった.

一方，陽性対照による染色体構造異常細胞の出現頻度は著しく増加した.

考 察 お よ び 結 論

4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑの染色体異常誘発性を検討するため，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した．その結果，連続処理法の 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，連続処理法の 48 時間処理について，染色体異常試験と同濃度で確認試験を実施した．その結果，5000 μg/ml まで染色体構造異常細胞の誘発は観察されなかった.

連続処理法の 24 時間処理および短時間処理法の 5000 μg/ml まで，染色体構造異常細胞の誘発は観察されなかった．また，全ての処理条件において，数的異常細胞の誘発は観察されなかった.

一方，陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞出現頻度は期待通りの値を示し，本試験が技術的に成立していることが示された.

従って，4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した.

なお，類似化合物の染色体異常誘発性に関する情報は添付資料 1 にまとめた.

参 考 文 献

1) 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会：“化学物質による染色体異常アトラス” 朝倉書店，東京，1988

表1　染色体異常試験結果（連続処理法）［本試験］

被験物質名：　4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数 (%)	判2)定	染色体構造異常細胞 1)の出現数と出現頻度(%) ギャップ gap	染色分体型 ctb	染色分体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	frg	合計 -gap	合計 +gap	判2)定
溶媒［生食］	24	0	100	0		0	1	0	0	0	0	1	1	
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
	48	0	100	0		0	0	1	1	0	0	2	2	
			100	0		0	1	0	0	0	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	
被験物質	24	1250	100	0		0	1	0	1	0	0	2	2	
			100	0	−	0	3	1	0	0	0	4	4	−
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	4 (2.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	6 (3.0)	
		2500	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	−	1	3	0	0	0	0	3	4	−
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	4 (2.0)	
		5000	100	0		0	1	0	0	0	0	1	1	
			100	0	−	0	2	0	0	0	0	2	2	−
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	
	48	1250	100	0		0	1	0	1	0	0	2	2	
			100	0	−	0	0	0	0	1	0	1	1	−
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	
		2500	100	0		0	2	0	0	0	0	2	2	
			100	0	−	0	3	0	1	0	0	4	4	−
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	6 (3.0)	
		5000	100	0		2	6	0	0	0	0	6	8	
			100	1	−	1	4	0	0	0	0	4	5	±
			200	1 (0.5)		3 (1.5)	10 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (5.0)	13 (6.5)	
陽性対照［MMC］	24	0.03	100	0		4	18	7	0	0	0	24	26	
			100	0	−	1	19	10	1	1	0	31	32	+
			200	0 (0.0)		5 (2.5)	37 (18.5)	17 (8.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	55 (27.5)	58 (29.0)	
	48	0.03	100	0		3	23	17	4	0	0	40	42	
			100	0	−	0	17	9	2	0	0	25	25	+
			200	0 (0.0)		3 (1.5)	40 (20.0)	26 (13.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	65 (32.5)	67 (33.5)	

1）　gap：染色分体型または染色体型のギャップ，ctb：染色分体型切断，cte：染色分体型交換，csb：染色体型切断，cse：染色体型交換，frg：断片化
2）　判定は，＋gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が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．
生食：局方生理食塩液　　MMC：マイトマイシンC

（試験番号：6L681）

表２　染色体異常試験結果（短時間処理法）［本試験］

被験物質名：　4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ

処理	S9 mix の有無	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数 (%)	判2)定	染色体構造異常細胞 1)の出現数と出現頻度 (%) ギャップ gap	染色分体型 ctb	染色分体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	frg	合計 -gap	合計 +gap	判2)定
溶媒［生食］	−	0	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0		0	0	0	0	1	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
	+	0	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
被験物質	−	1250	100	0	−	0	2	0	1	0	0	3	3	−
			100	0		0	0	0	0	1	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	4 (2.0)	4 (2.0)	
		2500	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		1	1	0	0	0	0	1	2	
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	
		5000	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	+	1250	100	0	−	0	0	1	0	0	0	1	1	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
		2500	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
		5000	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
陽性対照［BP］	−	20	100	0	−	0	0	1	0	0	0	1	1	−
			100	0		0	1	0	0	0	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	
	+	20	100	0	−	0	36	80	2	0	0	82	82	+
			100	0		0	19	79	1	1	0	82	82	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	55 (27.5)	159 (79.5)	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	164 (82.0)	164 (82.0)	

1）　gap：染色分体型または染色体型のギャップ，ctb：染色分体型切断，cte：染色分体型交換，csb：染色体型切断，cse：染色体型交換，frg：断片化
2）　判定は，＋gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が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．
Ｓ９の用量（5%），被験物質処理時間（6h），被験物質処理後の細胞回復時間（18h）
生食：局方生理食塩液　　BP：ベンゾ[a]ピレン

表3　染色体異常試験結果（連続処理法）［確認試験］

被験物質名：　4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数 (%)	判2)定	染色体構造異常細胞1)の出現数と出現頻度(%) ギャップ gap	染色分体型 ctb	染色分体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	frg	合計 -gap	合計 +gap	判2)定
溶媒［生食］	48	0	100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
被験物質	48	1250	100	0		1	0	1	1	0	0	2	3	
			100	1	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			200	1 (0.5)		1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)	
		2500	100	0		2	2	0	0	0	0	2	4	
			100	0	−	0	0	0	1	0	0	1	1	−
			200	0 (0.0)		2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	5 (2.5)	
		5000	100	0		1	2	0	0	0	0	2	3	
			100	0	−	0	4	0	0	0	0	4	4	−
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	7 (3.5)	
陽性対照［MMC］	48	0.03	100	0		0	25	26	0	0	0	43	43	
			100	0	−	1	20	22	2	0	0	34	35	+
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	45 (22.5)	48 (24.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	77 (38.5)	78 (39.0)	

1）　gap：染色分体型または染色体型のギャップ，ctb：染色分体型切断，cte：染色分体型交換，csb：染色体型切断，cse：染色体型交換，frg：断片化
2）　判定は，＋gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が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．
生食：局方生理食塩液　　MMC：マイトマイシンC

表４　分裂指数（連続処理法）［本試験］

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	分裂中期細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照（生食）	24	0	2000	145	7.3	100
4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム	24	1250	2000	96	4.8	66
	24	2500	2000	67	3.4	46
	24	5000	2000	48	2.4	33
陽性対照（MMC）	24	0.03	2000	96	4.8	66
陰性対照（生食）	48	0	2000	111	5.6	100
4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム	48	1250	2000	100	5.0	90
	48	2500	2000	78	3.9	70
	48	5000	2000	60	3.0	54
陽性対照（MMC）	48	0.03	2000	88	4.4	79

生食：局方生理食塩液
MMC：マイトマイシンC

表５　分裂指数（短時間処理法）［本試験］

処理	S9 mix の有無	処理濃度（μg/ml）	観察細胞数	分裂中期細胞数	分裂指数（%）	分裂活性（%）
陰性対照（生食）	－	0	2000	132	6.6	100
4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ	－	1250	2000	138	6.9	105
	－	2500	2000	135	6.8	102
	－	5000	2000	98	4.9	74
陽性対照（BP）	－	20	2000	115	5.8	87
陰性対照（生食）	＋	0	2000	169	8.5	100
4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ	＋	1250	2000	196	9.8	116
	＋	2500	2000	205	10.3	121
	＋	5000	2000	192	9.6	114
陽性対照（BP）	＋	20	2000	43	2.2	25

生食：局方生理食塩液
BP：ベンゾ[a]ピレン

表６　分裂指数（連続処理法）［確認試験］

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	分裂中期細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照（生食）	48	0	2000	142	7.1	100
4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム	48	1250	2000	110	5.5	77
	48	2500	2000	60	3.0	42
	48	5000	2000	46	2.3	32
陽性対照（MMC）	48	0.03	2000	74	3.7	52

生食：局方生理食塩液
MMC：マイトマイシンC

図１　4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの細胞毒性
(連続処理法)

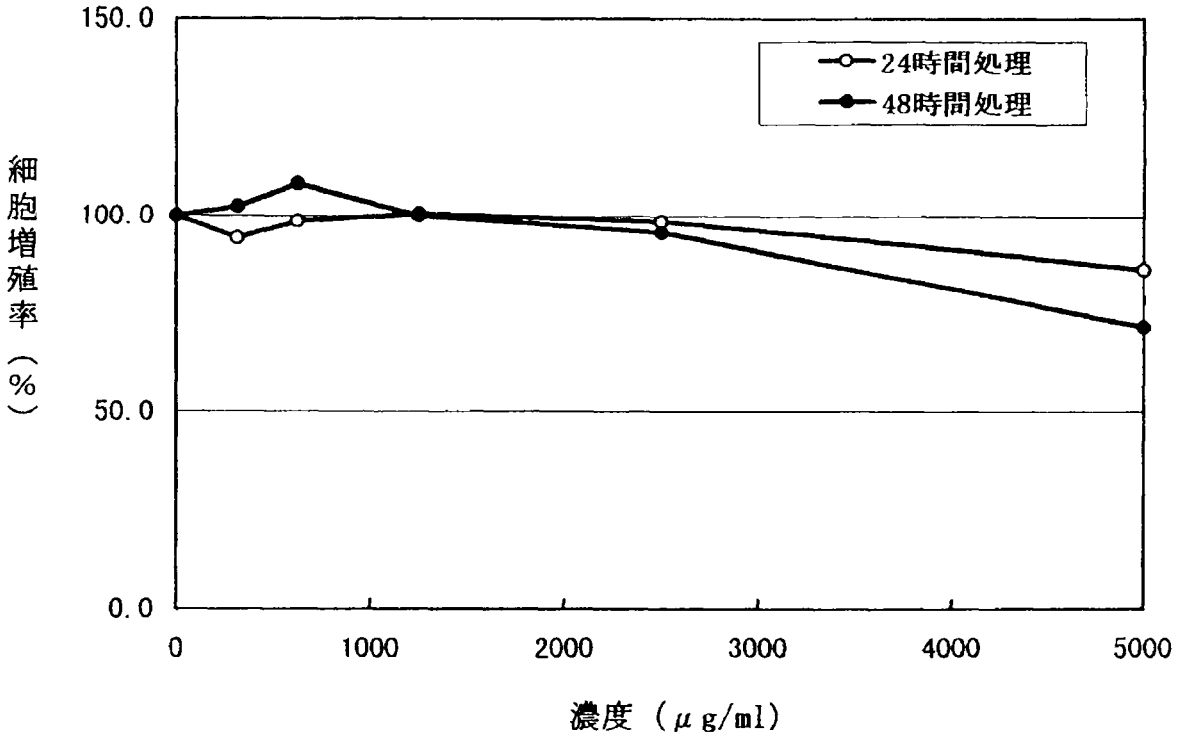

図２　4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの細胞毒性
(短時間処理法)(6時間処理，18時間回復)

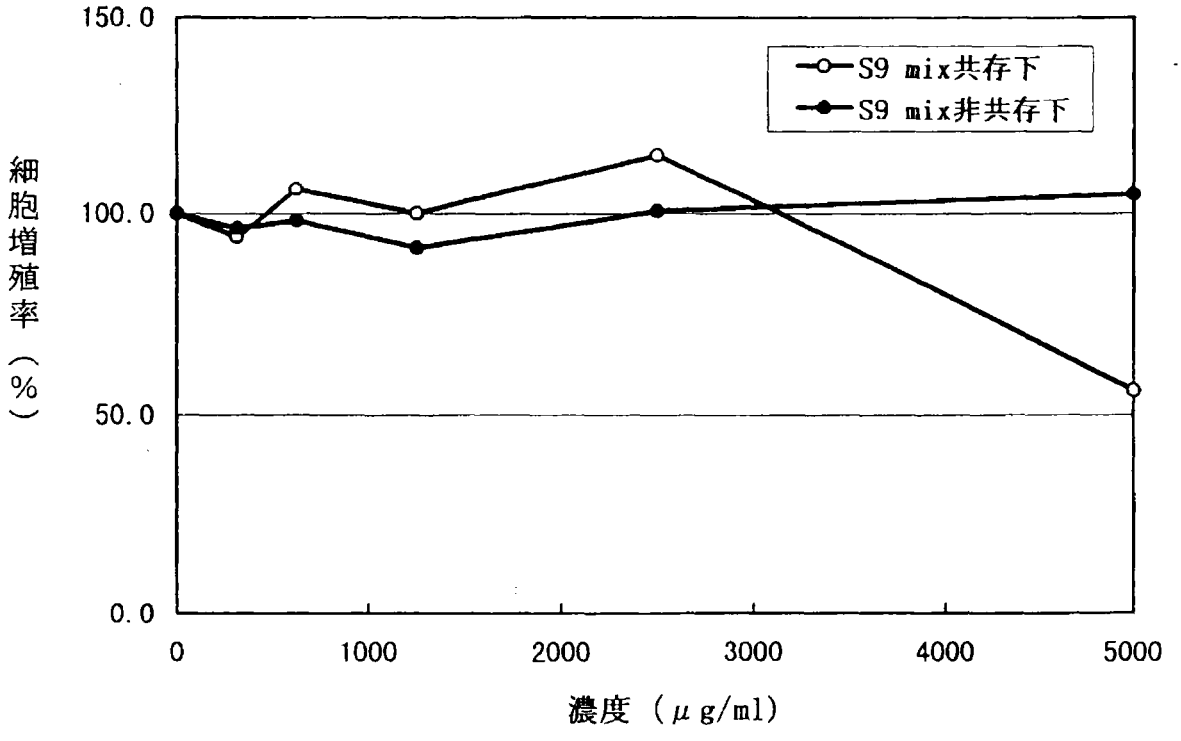

図３　4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑの
構造異常細胞出現頻度(連続処理法)［本試験］

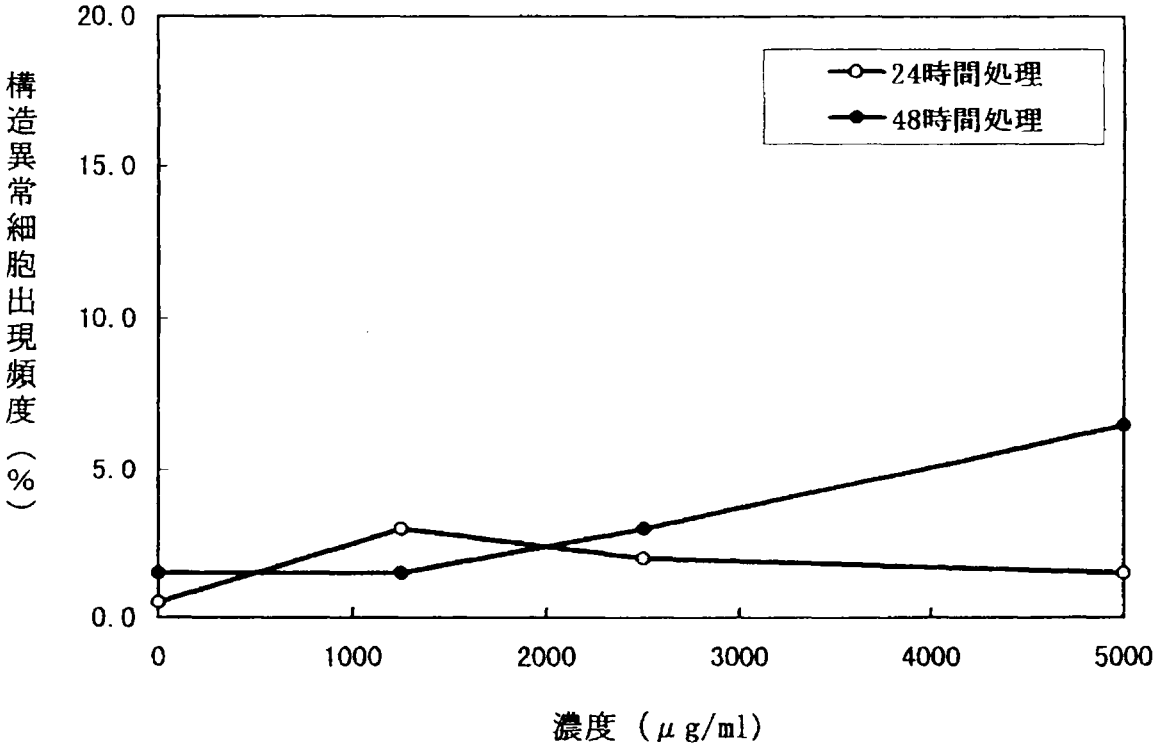

図４　4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑの
構造異常細胞出現頻度（短時間処理法）［本試験］

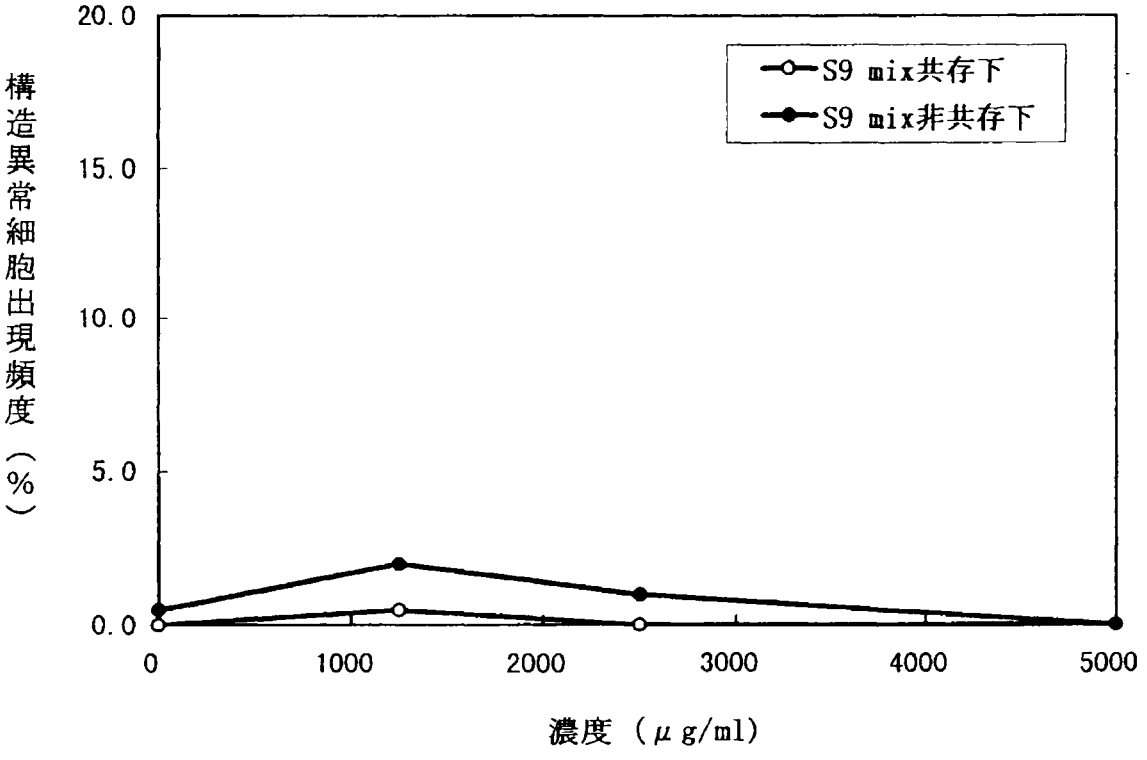

図５　4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの
倍数体細胞出現頻度(連続処理法)［本試験］

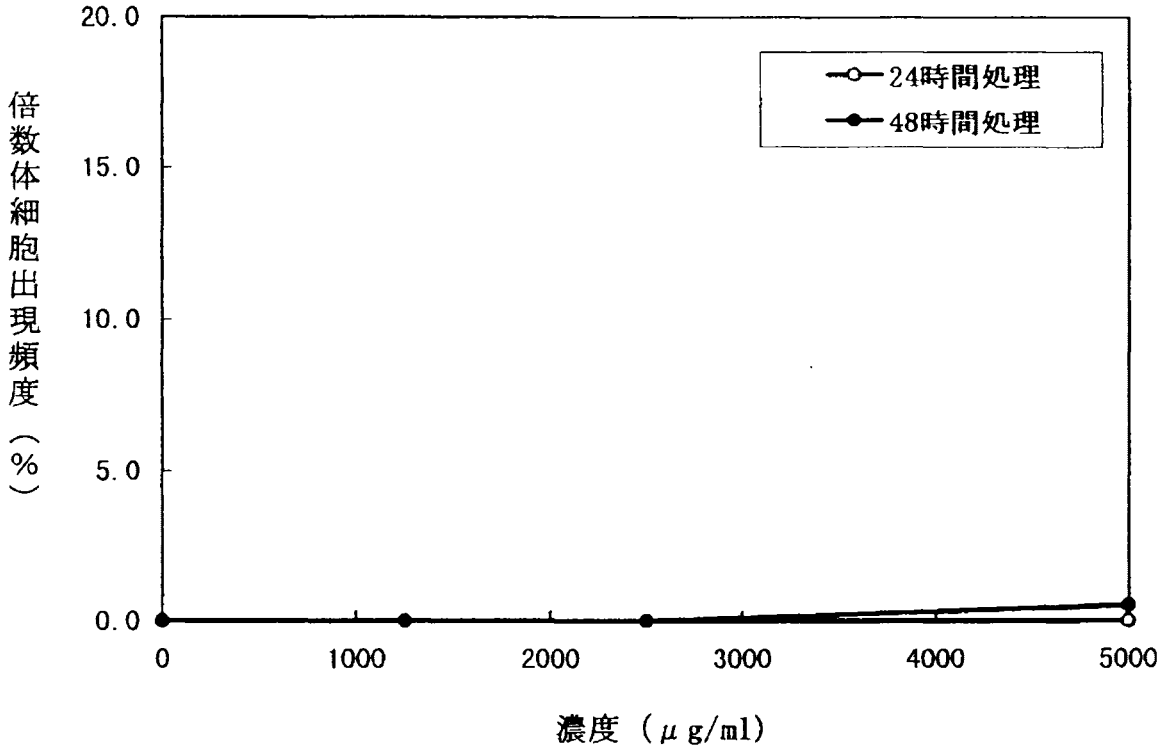

図６　4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの
倍数体細胞出現頻度（短時間処理法）［本試験］

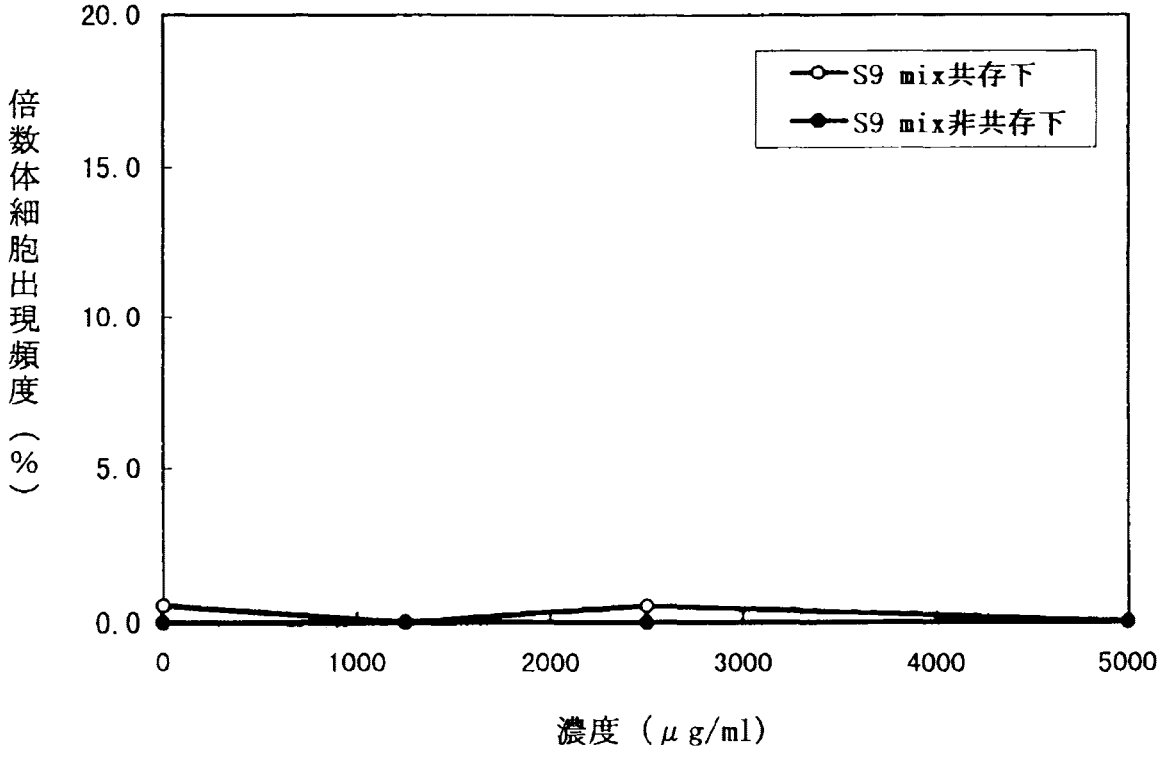

図７　4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑの
構造異常細胞出現頻度（連続処理法）
［確認試験］

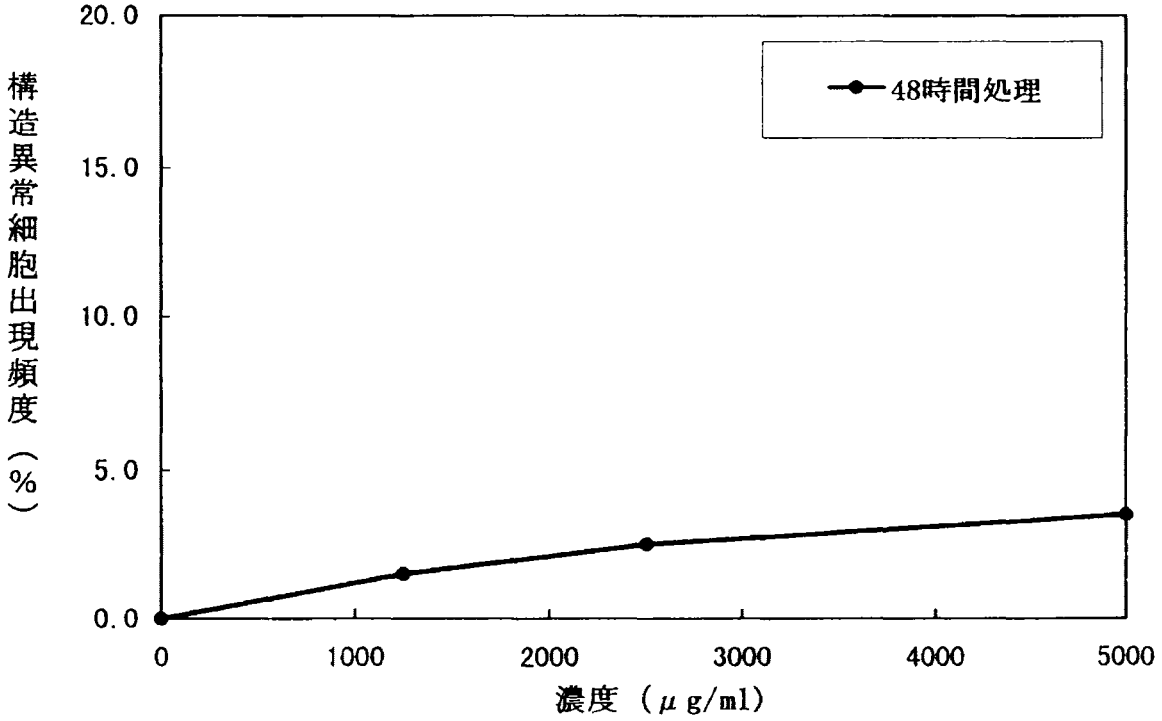
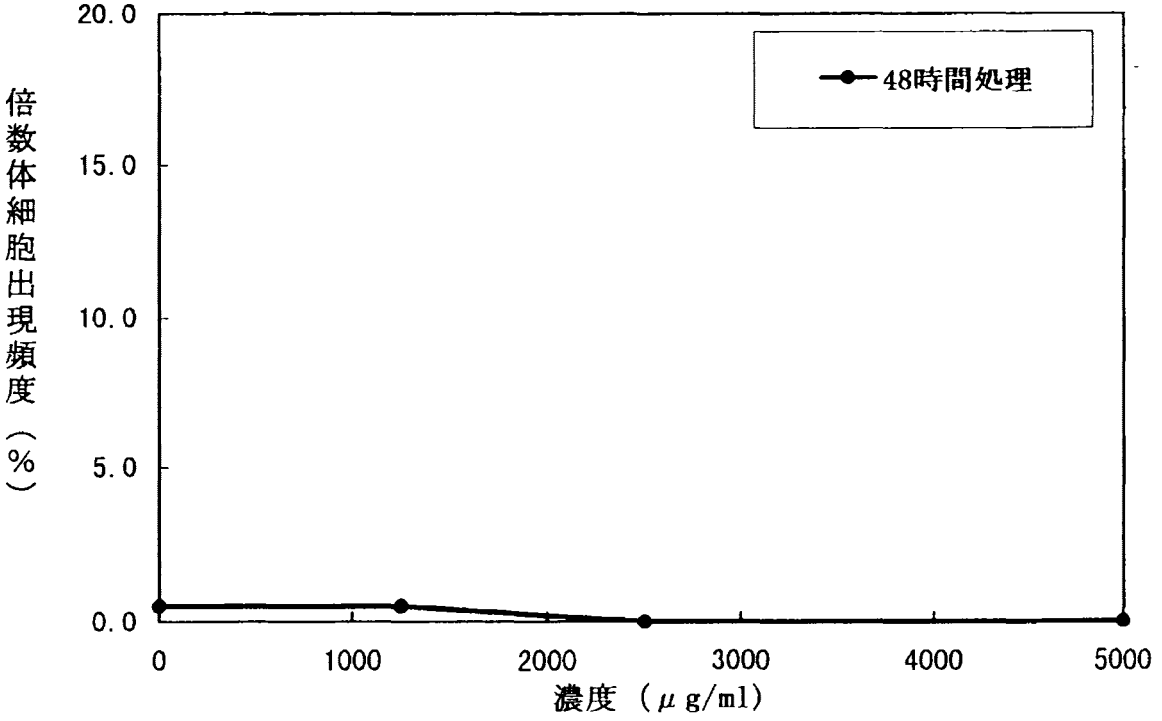
図８　4-ｱﾐﾉ-1-ﾅﾌﾀﾚﾝｽﾙﾎﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑの
倍数体細胞出現頻度（連続処理法）
［確認試験］