

最終報告書

2-ナフトールのマウスを用いる小核試験

試験番号 : 7818 (115-183)

平成 17 年 3 月 1 日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人

食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約	4
2. 表題	5
3. 試験目的	5
13. 被験物質	8
14. 試験材料および方法	10
15. 試験結果	16
16. 考察および結論	17
17. 参考文献	18

Figure

Figure 1	Dose-effect relationship for 2-Naphthol obtained in the micronucleus assay [male mice receiving two doses]	21
----------	---	----

Tables

Table 1	Mortality in the dose-finding study with 2-Naphthol [male mice receiving two doses]	22
Table 2	Mortality in the dose-finding study with 2-Naphthol [female mice receiving two doses]	23

Table 3	Micronucleus assay with 2-Naphthol	
	[male mice receiving two doses]	24

1. 要約

2-ナフトールの変異原性について、小核多染性赤血球誘発性の有無を検討するため、BDF₁系雄マウスを用いた*in vivo*小核試験を実施した。

用量設定試験の結果、毒性兆候の発現に明確な性差は認められなかった。したがって毒性兆候が認められる用量付近の250 mg/kgを高用量とした125および62.5 mg/kgの3用量を1日1回、2日間連続して1群当たり6~8匹の雄マウスに強制経口投与し、そのうち5匹について小核誘発性を検討した。

2-ナフトール投与群における小核多染性赤血球 (MNPCE) 出現頻度は陰性対照群と同等の値を示し、統計学的に有意な増加は認められなかった。また、観察全赤血球中の多染性赤血球 (PCE) の割合についても、陰性対照群と比較し統計学的に有意差は認められなかった。

なお、陽性対照マイトマイシンC腹腔内投与群 (投与量0.5 mg/kg) においては、全個体ともMNPCEの出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。

したがって、本試験条件下では2-ナフトールはマウス骨髄細胞に対して小核を誘発しないもの (陰性) と判断した。

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

2-ナフトール (英名 : 2-Naphthol)

13.2. ロット番号

13.3. 純度

99.5%

13.4. 製造元

13.5. 保存条件

冷暗所, 密閉

13.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-1 : 4.9~7.6°C ; 平成 16 年 5 月 18 日~平成 16 年 10 月 26 日)

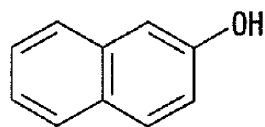
13.7. CAS No.

135-19-3

13.8. 化学名

2-ヒドロキシナフタレン

13.9. 構造式



13.10. 分子量

144.17

13.11. 物質の状態

白~灰色のフレーク状固体

13.12. 融点

121~123°C

13.13. 溶解性

水 : 0.08 g/L (25°C)

アルコール, エーテル, クロロホルム, ベンゼンに可溶.

13.14. 安定性

光, 空気中にて変色. 酸化性物質と反応する.

13.15. 分配係数 (Octanol/Water)

2.70 (25°C)

13.16. 蒸気圧

0.00032 mmHg (25°C), 10 mmHg (145.5°C)

13.17. 残余被験物質の処理

被験物質の一部 (0.5 g) を保存した後, 残りは品質試験等の実施のため被験物質提供元へ返却した.

14. 試験材料および方法

14.1. 試験動物

14.1.1. 種

マウス

14.1.2. 系統

BDF₁ (C57BL/6 × DBA/2) [SPF]

14.1.3. 購入先

日本エスエルシー株式会社

14.1.4. 週齢および体重

購入時：8 週齢

投与時：9 週齢 (用量設定試験：【雄】 25.2～29.1 g 【雌】 19.6～21.9 g, 小核試験：【雄】 24.5～27.7 g)

14.1.5. 試験動物数

用量設定試験：雄 19 匹, 雌 19 匹 (購入数) ; 雄 20 匹, 雌 20 匹 (入荷数)

小核試験：雄 38 匹 (購入数) ; 雄 40 匹 (入荷数)

14.1.6. 使用動物数

各試験群雄雌各 3 匹, 5 試験群, 計 30 匹 (用量設定試験)

各試験群雄 6 匹*, 5 試験群, 計 32 匹 (小核試験)

* : ただし 250 mg/kg 群では 8 匹使用

14.1.7. 種・系統選択理由

安全性試験ならびに小核試験で広く利用されており, 入手のし易さ等を考慮して本系統のマウスを使用した。

14.2. 飼育管理

14.2.1. 飼育環境

温度ならびに湿度を制御したマウス飼育室 [801 号室] (W 3.5 × D 5.5 × H 2.5 m, 48.1 m³) で動物を飼育した。試験期間中の温度は, 23.5～24.6°C (用量設定試験) および 23.4～24.3°C (小核試験), 相対湿度は 54～64% (用量設定試験) および 54～67% (小核試験) であった。換気回数 1 時間当たり 18 回, 照明 12 時間 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定した。

自動給水装置を取り付けた Micro-IsolatorTM System (Lab Products Inc.) ラックを使用し, zystone 製飼育ケージ (W 19.0 × D 32.7 × H 14.2 cm, 飼育スペース 8822 cm³) に床敷き

(ALPHA-dri™ : Shepherd Specialty Papers, Inc. ; Lot No. 02104) を入れ、動物を検疫・馴化期間中は2匹、群分け後は2~3匹ずつ収容した。使用した床敷きの分析値が日本実験動物飼料協会/コンタミナント分析基準案の許容基準値内であることを確認し、その分析結果を最終報告書に添付した (Reference data 1)。

14.2.2. 飼料

動物には固型飼料 (MF : オリエンタル酵母工業株式会社 ; Lot No. 040310) を自由に摂取させた。

使用した飼料の汚染物質に関する分析をロット毎に、財団法人日本食品分析センターで行った。分析値が日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認し、その分析結果を最終報告書に添付した (Reference data 2)。

14.2.3. 給水

動物には水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた。

水道法に基づいた水道水の分析を3ヵ月に1回、株式会社エコプロ・リサーチで実施した。検査値が上水道水質基準 (平成15年5月30日厚生労働省令第101号) の基準値内であることを確認し、その検査結果を最終報告書に添付した (Reference data 3)。

14.3. 検疫および馴化

各動物について疾病の有無を7日観察すると共に、その間動物を飼育環境に馴化させた。検疫・馴化期間中の観察において、用量設定試験では、2例 (仮動物番号雌4および8番) が検疫・馴化期間中の体重増加量が規定値に満たなかったことから、群分け対象動物から除外した。その他、体重あるいは健康状態に異常を示した動物はみられなかった。

14.4. 個体識別および群分け

検疫・馴化期間中はケージに付した仮動物番号と、動物の毛刈により個体の識別を行った。

1回目の投与当日に動物を体重により層別化し、無作為抽出法を用いて各試験群 (用量設定試験で3匹/群、小核試験で6~8匹/群 (250 mg/kg 群では8匹、その他の試験群では6匹/群) を構成するように分けた。各動物は、フェルトペンで尾部に識別マークを記入し識別した。群分け後のケージには試験番号、動物番号等を記入したラベルを装着した。

なお、余剰動物については炭酸ガスを用いて安楽死させた。

14.5. 被験物質液の調製

懸濁性の検討を実施した結果、本被験物質が0.5 w/v%メチルセルロースに良好に懸濁したため、被験物質を0.5 w/v%メチルセルロース (0.5 w/v% MC : メチルセルロース 400

cP 溶液：和光純薬工業株式会社；Lot No. PKG2104）に乳棒と乳鉢を用いて懸濁させた。

用量設定試験では投与直前に 100 mg/mL 液を準備した後、使用媒体で順次希釈し 50.0, 25.0, 12.5 および 6.25 mg/mL 液を調製した。各調製液は、投与初日ならびに投与 2 日目の用時に調製した。

小核試験では 25.0 mg/mL 液を準備した後、使用媒体で順次希釈し 12.5 および 6.25 mg/mL 溶液を調製した。調製後速やかに投与に用いた。各調製液は、投与初日ならびに投与 2 日目の用時に調製した。

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性（媒体）対照

使用媒体（0.5 w/v% MC）を投与した。

14.6.2. 陽性対照

マイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；2 mg 力価；Lot No. 415ACF）を 5 mL の注射用水（日本薬局方注射用水：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K3G77）に溶解し、さらに生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K3I70）を用いて 8 倍に希釈（0.05 mg/mL）した後、0.5 mg/kg の用量を投与した。投与直前に調製した。

14.7. 用量設定試験（予備試験）

14.7.1. 用量

本被験物質の化学物質等安全データシートの急性毒性情報により、マウス皮下投与におけるLDL₀が 100 mg/kgであったことから、1000 mg/kgを最高用量とし、以下 500, 250, 125 および 62.5 mg/kgの計 5 用量を被験物質処理群として設定した。雄雌の両性で実施した。

14.7.2. 試験群の構成

試験群	性	試験用量 (mg/kg)	動物数	動物番号
2-ナフトール	雄	62.5	3	1101~1103
		125	3	1201~1203
		250	3	1301~1303
		500	3	1401~1403
		1000	3	1501~1503
	雌	62.5	3	2101~2103
		125	3	2201~2203
		250	3	2301~2303
		500	3	2401~2403
		1000	3	2501~2503

14.7.3. 投与方法および投与回数

ガイドラインに従って被験物質の投与経路は経口投与とし、ディスポーザブルシリンジとテフロン製ゾンデを用いて1日1回、24時間間隔で2日間連続投与した。投与容量は体重10g当たり0.1mLとし、群分け時の体重から投与液量(mL)を求めた。

14.7.4. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時、検疫・馴化期間終了時(群分け時)および最終投与後24時間に電子天秤(PG802-S: Mettler Toledo AG)を用いて体重を測定した。また、死亡動物については死亡発見時に体重を測定した。

初回投与後0.5, 1, 4, 18および24時間、最終投与後0.5, 1, 4, 18および24時間に動物の一般状態を観察し、各用量の最終投与後24時間での生存率を求めた。

観察終了後、生存動物については炭酸ガスを用いて安楽死させた。

14.8. 小核試験(本試験)

14.8.1. 用量

用量設定試験の結果、毒性兆候が認められる用量付近の250mg/kgを最高用量に125および62.5mg/kgの3用量(公比2)を設定した。また、雄雌の毒性発現に顕著な差が認められなかったため、小核試験は雄のみで実施した。

14.8.2. 試験群の構成

試験群	試験用量 (mg/kg)	動物数		動物番号
		投与数	評価数	
陰性対照	0	6	5	3001~3006
2-ナフトール	62.5	6	5	3101~3106
	125	6	5	3201~3206
	250	8	5	3301~3308
陽性対照*	0.5	6	5	3401~3406

* : MMC

14.8.3. 投与動物数

評価数 5 匹を確保するため、250 mg/kg 群では 8 匹に投与し、その他の試験群では 6 匹に投与した。死亡 1 匹（動物番号：3305）を除き、生存例全例について標本作製し、動物番号の小さい順に 5 匹について評価に使用した。

14.8.4. 投与方法および投与回数

媒体および被験物質の投与方法等については 14.7.3. に記載した方法に準じた。

陽性対照物質の場合、小核試験で通常用いられていることから腹腔内投与とし、マイクロスリンジと 25G 注射針を用いて 1 回投与した。

投与容量は体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、群分け時の体重から投与液量 (mL) を求めた。

14.8.5. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時、検疫期間終了時（群分け時）および標本作製直前に電子天秤（PG802-S あるいは PG2002）を用いて体重を測定した。

初回投与後 1, 4, 21, 24 時間および最終投与後 1, 4, 21 時間ならびに標本作製直前に動物の一般状態を観察した。陽性対照群については、投与後 1, 4, 21 時間ならびに標本作製直前に一般状態を観察した。

14.8.6. 骨髄塗抹標本の作製

最終投与後 24 時間（陽性対照群は投与後 24 時間）に動物を炭酸ガス吸入法で安楽死させた。大腿骨を摘出し少量の非働化（56°C, 30 分）済みウシ胎児血清（Invitrogen Corp.; Lot No. 1172087）を用いて骨髄細胞を洗い出し、遠心分離法により余剰血清を除いた後、各動物につき 3 枚の塗抹標本作製した。十分に乾燥させた塗抹標本をメタノールで固定した。その後、各動物につき 2 枚の塗抹標本を 3% ギムザ液（Merck KGaA; Lot No. OB279210）で 30 分間染色した。1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（Merck KGaA;

pH 6.8 : Lot No. TP601374) および精製水で洗浄し、乾燥させた。さらに0.01%クエン酸水溶液および精製水で洗浄した後、再び乾燥させた。

生存動物全例について骨髓塗抹標本を作製した。

14.8.7. 小核を有する多染性赤血球（小核多染性赤血球）の観察

全ての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

動物1匹当たり2000個の多染性赤血球（polychromatic erythrocyte : PCE）を顕微鏡下（×1000）で観察した。小核多染性赤血球（micronucleated polychromatic erythrocyte : MNPCE）数を計測するとともに、骨髓に対する影響を調べるため観察赤血球500個中の多染性赤血球数についても計測した。

14.8.8. 観察赤血球中の多染性赤血球の割合の算出

観察全赤血球に対する多染性赤血球の割合は次式を用いて算出した。

$$\text{多染性赤血球の割合 (\%)} = \frac{\text{多染性赤血球数}}{\text{観察全赤血球数}} \times 100$$

14.8.9. 小核多染性赤血球出現頻度の算出

小核多染性赤血球の出現頻度は次式を用いて算出した。

$$\text{小核多染性赤血球出現頻度 (\%)} = \frac{\text{小核多染性赤血球数}}{\text{観察全多染性赤血球数}} \times 100$$

14.9. 結果の解析

各試験群の小核多染性赤血球の出現頻度は陰性対照群と他の群（陽性対照群を含む）において、条件付き二項検定（Kastenbaum and Bowman の推計学的方法：有意水準上側0.025）を行った。

観察赤血球中の多染性赤血球の割合は、陰性対照群と他の群（陽性対照群を含まない）においてDunnettの多重比較（有意水準：両側0.05）を行い、陰性対照群と陽性対照群においてはAspin-Welchのt検定（有意水準：両側0.05）を実施した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群あるいは陽性対照群において統計学的な有意差が認められた場合、陽性と判定した。

15. 試験結果

15.1. 用量設定試験

試験結果を Table 1~2 および Appendix 1~4 に示した。

2-ナフトール投与により、雄において、1000 mg/kg の初回目投与後 18 時間以内に 3 匹中全例の死亡が、また 500 mg/kg の初回目投与後 18 時間以内に 3 匹中 2 例の死亡が認められた。雌では 1000 mg/kg の初回目投与後 4 時間以内に、また 500 mg/kg の初回目投与後 18 時間以内に 3 匹中全例の死亡が、250 mg/kg では初回目投与後 24 時間以内に 3 匹中 1 例の死亡が認められた。

雄雌とも 250 mg/kg で平均値で 2 g 以上の体重減少がみられた。また、250 mg/kg の用量において、雄雌の初回投与後 0.5 時間から毒性兆候が認められ、雄では 2 回目の投与後 0.5, 1 および 4 時間の 2 匹に自発運動減少および体温低下が認められ、雌では 2 回目の投与後 0.5, 1 および 4 時間の生存例 2 匹に自発運動減少あるいは体温低下が認められた。

以上の結果より被験物質の毒性には明確な性差が無いと判断した。

15.2. 小核試験

試験結果を Figure 1, Table 3 および Appendix 5 に示した。

個体別に多染性赤血球 2000 個を観察した結果、陰性対照群では小核 (MNPCE) が 2~6 個認められ、その出現頻度は 0.18%であった。また、観察全赤血球中における多染性赤血球の割合 (PCE 比) は 57.6%であった。

2-ナフトール投与による MNPCE の出現頻度は、62.5 mg/kg で 0.27%, 125 mg/kg で 0.22%および 250 mg/kg で 0.29%であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。また、被験物質の骨髄細胞に対する影響の指標である PCE 比は、62.5, 125 および 250 mg/kg 群でそれぞれ 54.6, 54.8 および 48.7%であった。各投与群において陰性対照群に比べて有意な減少は認められなかった。

一方、陽性対照群の MNPCE 出現頻度は 1.18% (多染性赤血球 2000 個中 15~32 個) と明確に増加し、陰性対照群に比べ統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。さらに、PCE 比は 54.0%であった。

15.2.1. 体重および一般状態

試験結果を Appendix 6 および 7 に示した。

2-ナフトール投与により、250 mg/kg で初回投与後 21 時間に投与 8 匹中 1 例の死亡が認められた。なお、250 mg/kg においては初回投与後 1 時間から自発運動減少等の毒性兆候が認められ、平均値で 3 g の体重減少もみられた。

16. 考察および結論

2-ナフトールの変異原性, すなわち小核赤血球誘発性の有無を検討するため, 雄マウスを用いて *in vivo* 小核試験を実施した.

用量設定試験結果を基に, 毒性兆候が認められる用量付近の250 mg/kgを高用量に125および62.5 mg/kgの3用量を設定した. また, 雄雌の毒性発現に顕著な差が認められなかったことから, 小核試験は雄のみで実施した.

2-ナフトール投与群におけるMNPCE出現頻度は各処理群とも陰性対照群と同等の値を示し, 統計学的に有意な増加は認められなかった. また, 観察全赤血球中のPCE比についても統計学的に有意な減少はみられなかった.

本被験物質2-ナフトール(2-Naphthol)について*S. typhimurium*を用いる復帰突然変異試験で陰性¹⁾, DNA修復試験では,*Bacillus subtilis*を用いた場合には陰性¹⁾, *E. coli*を用いた場合には陽性¹⁾, 発がん性については陰性¹⁾と報告されている.

類縁体であるナフタレン(Naphthalene), α -ナフチルアミン(α -Naphthylamine)はCHL細胞を用いた染色体異常試験で陽性²⁾, 2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウム(Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate)は細菌を用いる復帰突然変異試験およびCHL細胞を用いた染色体異常試験で陰性³⁾との報告があった.

また, 陰性対照のMNPCE出現頻度, 観察全赤血球中のPCE比は背景データの範囲内(Appendix 8)であり, 陽性対照群のMNPCE出現頻度が陰性対照群と比較して有意な($p \leq 0.025$)増加を示したことから, 本試験が適切な条件下でなされたと判断された.

以上の試験結果から, 本試験条件下において2-ナフトールのマウスに対する小核の誘発性, すなわち染色体の構造異常ないし数的異常誘発性は, ないものと判定した.

17. 参考文献

- 1) Stuter W, Jaeger I. Comparative evaluation of different pair of DNA repair-deficient and DNA repair-proficient bacterial tester strains for rapid detection of chemical mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 1982; 97(1): 1-18.
- 2) 祖父尼俊雄監修, “染色体異常試験データ集 (改訂 1998 年版)”, エル・アイ・シー, 東京, 1999
- 3) 野田篤, 昆尚美, 化学物質毒性試験報告書 Vol. 6, 372-378, 2002

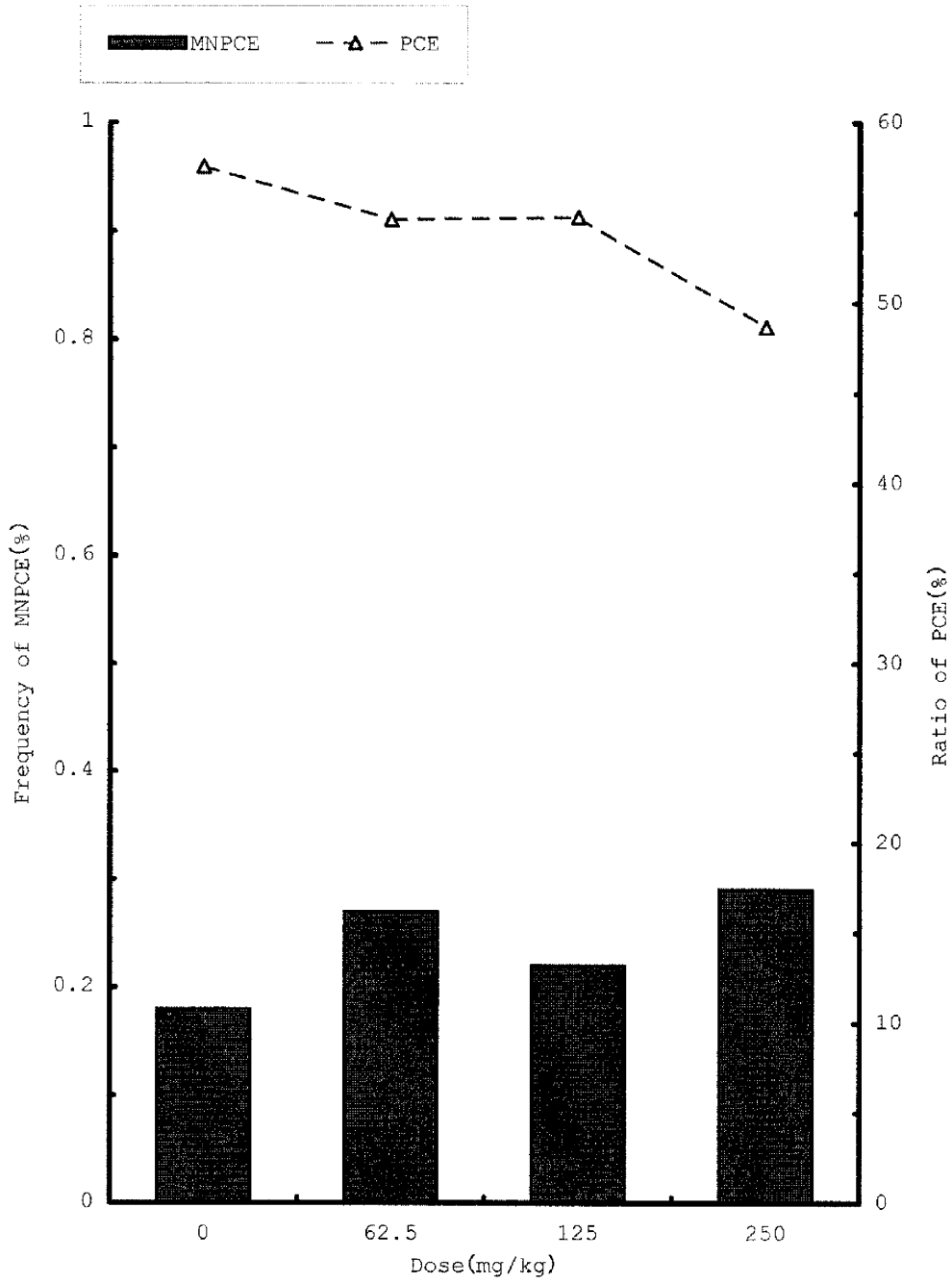


Figure 1. Dose-effect relationship for 2-Naphthol obtained in the micronucleus assay [male mice receiving two doses]

Table 1. Mortality in the dose-finding study with 2-Naphthol
[male mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Time after the 1st administration										Mortality	
			0.5h	1h	4h	18h	24h	24.5h	25h	28h	42h	48h		
2-Naphthol	62.5	1101	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		1102	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		1103	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
	125	1201	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		1202	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		1203	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
	250	1301	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		1302	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		1303	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
500	1401	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	2 / 3	
	1402	live	live	live	dead									
	1403	live	live	live	dead									
1000	1501	live	live	dead									3 / 3	
	1502	live	live	live	dead									
	1503	live	live	live	dead									

Table 2. Mortality in the dose-finding study with 2-Naphthol
[female mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Time after the 1st administration										Mortality	
			0.5h	1h	4h	18h	24h	24.5h	25h	28h	42h	48h		
2-Naphthol	62.5	2101	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		2102	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		2103	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
	125	2201	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		2202	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		2203	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
	250	2301	live	live	live	live	dead							1 / 3
		2302	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		2303	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
500	2401	live	live	live	dead								3 / 3	
	2402	live	live	dead										
	2403	live	live	live	dead									
1000	2501	live	live	dead									3 / 3	
	2502	live	live	dead										
	2503	live	live	dead										

Table 3. Micronucleus assay with 2-Naphthol
[male mice receiving two doses]

Exp. No. 7818 (115-183)

Compound	Dose (mg/kg)	Number of animals	Frequency of MNPCE [%] (Mean \pm S.D.)	Range of MNPCE/2000PCE (Min - Max)	Ratio of PCE [%] (Mean \pm S.D.)
0.5w/v% MC a)	0	5	0.18 \pm 0.08	2 - 6	57.6 \pm 5.8
2-Naphthol	62.5	5	0.27 \pm 0.10	3 - 8	54.6 \pm 2.1
	125	5	0.22 \pm 0.04	3 - 5	54.8 \pm 9.8
	250	5	0.29 \pm 0.09	3 - 8	48.7 \pm 7.9
MMC b)	0.5	5	1.18 \pm 0.34 * (KB)	15 - 32	54.0 \pm 3.5

Significant difference from control *:p \leq 0.025

(KB): Kastenbaum and Bowman method

a) : Negative control (0.5w/v% Methylcellulose solution)

b) : Positive control (Mitomycin C)