

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：2464（115-031）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

| | | |
|----|---------|-----|
| 1. | 要 約 | 1 頁 |
| 2. | 試 験 題 目 | 2 |
| 3. | 試 験 目 的 | 2 |
| 4. | 試 験 番 号 | 2 |

| | | |
|-----|-----------|----|
| 9. | 被 験 物 質 | 3 |
| 10. | 試験材料および方法 | 4 |
| 11. | 試 験 結 果 | 10 |
| 12. | 考察および結論 | 12 |
| 13. | 参考とした資料 | 13 |

Figures, Tables および Appendices

| | | |
|----------|---|----|
| Figure 1 | Dose-survival curves of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method] | 15 |
| Figure 2 | Dose-survival curves of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method] | 16 |
| Figure 3 | Incidence of structural aberrations induced by 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method] | 17 |
| Figure 4 | Incidence of structural aberrations induced by 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method] | 18 |

| | | |
|---------|---|----|
| Table 1 | Results of growth inhibition test on 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method] | 19 |
| Table 2 | Results of growth inhibition test on 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method] | 20 |
| Table 3 | Chromosome aberration test on CHL cells treated with 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method : 24 hrs] | 21 |
| Table 4 | Chromosome aberration test on CHL cells treated with 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method : 48 hrs] | 22 |
| Table 5 | Chromosome aberration test on CHL cells treated with 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method : +S9] | 23 |
| Table 6 | Chromosome aberration test on CHL cells treated with 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method : -S9] | 24 |

1. 要 約：

本試験条件下において、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸には、染色体異常を誘発する作用がないものと判断した。

すなわち、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL) を用いた *in vivo* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に、試験用量を設定した。直接法（24ならびに48時間処理）および代謝活性化法（+S9ならびに -S9処理）で溶解限界濃度を含む 375、750 および 1,500 $\mu\text{g/ml}$ の3用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても明確な染色体異常の誘発は認められなかった。

また、直接法の陽性対照物質マイトマイシンC (MMC) および代謝活性化法の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。

2. 試験題目： 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
3. 試験目的： 染色体異常誘発性を検討するため、環保業第 237号、薬発第 306号、62基局第 303号（昭和62年3月31日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」およびOECD化学品テストガイドライン 473（1983年）に従って、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。
なお、試験の実施は環企研第 233号、衛生第38号、63基局第 823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」およびOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとした。
4. 試験番号： 2464（115-031）

9. 被 験 物 質：

- 1) 被験物質名 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸
- 2) ロット番号
- 3) 純 度 91.8%
- 4) 不 純 物 水分： 3.5 wt %， 硫酸ナトリウム分： 2.0 wt %
- 5) 提 供 先
- 6) 保管条件 室温
- 7) 一 般 名 J 酸
- 8) 化 学 名 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸
- 9) 化学構造
- NC1=CC=C2C(=C1)C(=C(C=C2)O)S(=O)(=O)O
- 10) 分 子 式 $C_{10}H_9NO_4S$
- 11) 分 子 量 239.26
- 12) CAS No. 87-02-5
- 13) 物質の状態 粉末
- 14) 溶 解 性 水、アセトンにほとんど不溶
- 15) 安 定 性 ほぼ安定
- 16) 被験物質保管および
残余被験物質の処理 試験終了後、約 2 g を安評センターに保管し、残りは提供先の
スガイ化学工業株式会社に返却した。

10. 試験材料および方法：

1) 試験細胞株

増殖速度、核型の安定性および既知変異原性物質に対する感受性、再現性等を考慮した結果、本染色体異常試験においてはチャイニーズ・ハムスターの肺から分離した線維芽細胞株（CHL 細胞）を用いた。

上記の細胞株は昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK社；独国、純度99.7%以上；Lot No. 027 1126178）を添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3～5日ごとに継代した。

なお、染色体異常試験には継代数14の細胞を用いた。

2) 培養液の調製

Eagle-MEM 粉末培地（LIFE TECHNOLOGIES 社、米国：L-グルタミン含有；Lot No. 75N3440 および 76P8541）1袋を約 800 ml の精製水で溶解した後、2.2 g の炭酸水素ナトリウム（関東化学株式会社、東京都中央区；Lot No. 604E1491）を加えた。1 N 塩酸を用いて pH を 7.2 に調整し、その後 1,000 ml に定容した。メンブランフィルター（アクロキャップ™；0.2 μm；Gelman Sciences 社、米国）を用いて加圧濾過除菌した後、あらかじめ非働化（56℃、30分）しておいた仔牛血清（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 39N4920）を最終濃度10%になるよう加えた。冷暗所に調製後の培養液を保存した。

3) 培養条件

CO₂ インキュベーター（FORMA 社、米国あるいは三洋電機特機株式会社、大阪府守口市）を用い、CO₂ 濃度 5%、37℃の条件で細胞を培養した。

4) S9 mix

キッコマン株式会社（千葉県野田市）から S9 mix（Lot No. CAM-312）を購入し、使用時まで超低温フリーザー（MDF-390AT；三洋電機特機株式会社）に -80℃ で凍結保存した。製造後 6 カ月以内の S9 mix を使用した。

S9 のロット番号、誘導物質及び誘導方法等は、添付書類によると以下のとおりである。

| | |
|-----------------|---|
| a. ロット番号 | RAA-312 |
| b. 製造日 | 平成6年6月24日 |
| c. 使用動物 | ラット：Sprague-Dawley 系 |
| d. 性 / 週齢 | 雄 / 7週齢 |
| e. 体重 | 191 ~ 241 g |
| f. 誘導物質 | Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflavone (BF) |
| g. 投与量 および回数 | PB：30 mg/kg 1回（1日目）、60 mg/kg 3回（2～4日目） BF：80 mg/kg 1回（3日目） |
| h. 投与方法 | 腹腔内投与 |
| i. 蛋白含量 | 28.1 mg/ml |

また、S 9 mixの組成を以下に示した。

| 成 分 | S 9 mix 1 ml 中の量 |
|-------------------|------------------|
| S 9 | 0.3 ml |
| MgCl ₂ | 5 μmol |
| KCl | 33 μmol |
| G-6-P | 5 μmol |
| NADP | 4 μmol |
| HEPES緩衝液 | 4 μmol |
| 精製水 | 残量 |

5) 被験物質溶液の調製

DMSO (MERCK 社; Lot No. 217 K151078 および 309 K18572778) に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。

なお、本被験物質の純度は95%以下であるため、秤量に際しては純度を100%に換算した。

6) 対照試験

a. 溶媒対照

使用溶媒のDMSO (Lot No. 217 K151078 および 309 K18572778) を容量比 0.5%添加して試験した。

b. 陽性対照 (直接法の場合)

注射用蒸留水 (株式会社 大塚製薬工場、徳島県鳴門市; Lot No. K4E87) 5 ml に溶解したマイトマイシンC (MMC: 協和醗酵工業株式会社、東京都千代田区; Lot No. 968ADD) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液: 株式会社 大塚製薬工場、Lot No. K4A92) を用いて希釈した後、24時間処理で0.05 μg/ml、48時間処理で0.025 μg/mlの用量で試験した。

c. 陽性対照 (代謝活性化法の場合)

注射用蒸留水 (Lot No. K4E87) 5 ml に溶解したシクロホスファミド (CP: 塩野義製薬株式会社、大阪府大阪市; Lot No. 4016) を生理食塩液 (Lot No. K4A92) を用いて希釈した後、12.5 μg/mlの用量で試験した。

7) 細胞増殖抑制試験

a. 直接法

細胞増殖用マルチプレート (12ウェル: 住友ベークライト株式会社、東京都千代田区) のウェルに24時間処理の場合、培養液を用いて 6.8×10^3 細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml を、48時間処理の場合、 3.4×10^3 細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml をそれぞれ播種した。培養3日目に溶媒 (溶媒対照群) あるいは被験物質溶液を 5 μl 加え、さらに24あるいは48時間培養を続けた後に細胞生存率 (溶媒対照に対する比) を求めた。

b. 代謝活性化法

培養液を用いて 6.8×10^3 細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml を各ウェルに播種した。培養 3 日目に +S9 処理の場合、培養液 500 μ l を除き S9 mix 100 μ l、溶媒あるいは被験物質溶液 3 μ l を加え、-S9 処理では培養液 400 μ l を除き、次いで溶媒あるいは被験物質溶液 3 μ l のみ加え (S9 mix は添加しない) 6 時間培養した。培養液を除去した後、生理食塩液を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 μ l を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に細胞生存率を求めた。

c. 試験用量

細胞増殖抑制試験における試験用量を下表に示した。

各試験それぞれ溶解限界濃度を含む 5 用量 (公比 5/3) を設定した。あらかじめ予備的な試験を実施した結果を基に本用量を設定した。

| 試 験 | 用量数 | 試験用量 (μ g/ml) |
|---------------|-----|--------------------|
| 直接法 24 時間処理 | 5 | 194~1,500 |
| 直接法 48 時間処理 | 5 | 194~1,500 |
| 代謝活性化法 +S9 処理 | 5 | 194~1,500 |
| 代謝活性化法 -S9 処理 | 5 | 194~1,500 |

8) 50%細胞増殖抑制濃度の算出

7) で処理を行った各プレートから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を 1 回洗浄した。組織固定用 10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業株式会社、大阪府大阪市; Lot No. E1012) を加えて約 10 分間細胞を固定した後、0.1% クリスタル・バイオレット (関東化学株式会社、東京都中央区; Lot No. 112G0031) 水溶液で 10 分間染色した。各プレートを水洗した後、十分乾燥させた。

各ウェルに色素溶出液 (30% エタノール、1% 酢酸水溶液) 2 ml を加え、5 分間程度放置した後、分光光度計 (UV-201; 株式会社日立製作所、東京都千代田区) を用いて 580 nm での吸光度を測定した。各ウェルの吸光度から固定された細胞の色素量を溶媒対照の値に対する比 (細胞生存率) として算出した。

9) 染色体異常試験

a. 直接法

直径 60 mmのプレート（住友ベークライト株式会社）に24時間処理の場合、培養液を用いて 8×10^3 細胞/mlに調製した細胞浮遊液 5 ml（ 4×10^4 細胞）を、48時間処理の場合、同様に 4×10^3 細胞/mlに調製した細胞浮遊液 5 ml（ 2×10^4 細胞）を播種した。培養3日目に溶媒または被験物質溶液 25 μ lあるいは陽性対照物質溶液 500 μ lを加え、24および48時間後に染色体標本を作製した。

b. 代謝活性化法

培養液を用いて 8×10^3 細胞/mlに調製した細胞浮遊液 5 ml（ 4×10^4 細胞）をプレートに播種した。培養3日目に培養液 2.5 mlを除きS9 mix 500 μ l、溶媒または被験物質溶液 15 μ lあるいは陽性対照物質溶液 300 μ lを加え6時間培養した。また対照として、溶媒または被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液のみを加えた群（培養液 2 mlを除くのみでS9 mixは添加しない）についても同様に培養した。培養液を除去した後、生理食塩液を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mlを加え、さらに18時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

c. 試験用量

本試験における試験用量を下表に示した。

細胞増殖抑制試験結果を基に、以下の3用量（公比2）を設定した。

| 試 験 | 試 験 用 量 (μ g/ml) | | |
|--------------|-----------------------|------|-------|
| 直接法 24時間処理 | 375, | 750, | 1,500 |
| 直接法 48時間処理 | 375, | 750, | 1,500 |
| 代謝活性化法 +S9処理 | 375, | 750, | 1,500 |
| 代謝活性化法 -S9処理 | 375, | 750, | 1,500 |

10) 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に、最終濃度で0.2 µg/ml、すなわち培養液1 ml 当たり20 µlのコルセミド溶液(LIFE TECHNOLOGIES社; Lot No. 24N4041)を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。培養液の全量を遠心管に移した後、0.25%トリプシン溶液(LIFE TECHNOLOGIES社; Lot No. 15K8141)を用いてプレートより細胞を剥離させ、遠心管内の培養液に加えた。遠心分離(1,000 r. p. m.、5分間)により上清をのぞき、回収した細胞にあらかじめ37℃に保温しておいた75 mM塩化カリウム水溶液をおよそ5 ml 加え、37℃で15~20分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、4℃に冷却した固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。固定液を3回新鮮なものに交換した後、細胞に固定液を適量加えて細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に1~2滴ずつ滴下した。スライド標本を十分乾燥させ、1/100 M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.2: MERCK社; Lot No. 322 S 601868)を用いて希釈したギムザ溶液で12分程度染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

11) 染色体の観察

各プレートあたり100個の分裂中期像を顕微鏡下(×600程度)で観察し、染色体の形態的变化、すなわちギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。ただし、ギャップはその不連続部分(非染色性部位)が明確であり、当該染色体の分体幅と同程度以上、かつ本来の位置からずれていない場合にのみ計数した。

構造異常の観察と同時に、倍数性細胞の出現数についても記録した。

また、正常細胞(正常核型)とともに代表的な異常細胞について顕微鏡写真を撮影した。すべての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

12) プレート(ウエル)数および識別

細胞増殖抑制試験で用量当たり2ウエル、染色体異常試験で用量当たり2枚のプレートを使用した。

油性ペンで番号等を明記することにより、各プレートを識別した。

13) 結果の解析

構造異常のギャップのみ保有する細胞を異常細胞に含めた場合(+gap)と、含めない場合(-gap)とに区別して出現頻度を算出し、最終評価に際しては +gap での出現頻度を基に判定した。また、同一細胞に2種以上の異常型が出現した場合、それぞれの型の出現数を1個と記録した。

各試験群の構造異常を有する細胞ならびに倍数性細胞の出現頻度を、下記に示す基準を用いて判断し、さらに再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

5%未満……………陰 性 (-)

5%以上~10%未満……疑陽性 (±)

10%以上……………陽 性 (+)

1 1. 試験結果：

1) 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験結果をFigure 1、2 および Table 1、2 に示した。

直接法48時間処理の 1,500 $\mu\text{g/ml}$ (溶解限界濃度) で僅かな細胞増殖抑制が観察されたが、他の試験系では明確な抑制作用は見られなかった。

ただし、被験物質溶液添加時に 900 $\mu\text{g/ml}$ 以上では白色粉末状の析出物が観察された。これらの析出物は処理後1時間以内に消失した。また、324 μg /プレート以上では用量に依存して培養液が酸性側に傾いた。

以上の結果を基に染色体異常試験の試験用量を設定した。直接法ならびに代謝活性化法とも 375~1,500 $\mu\text{g/ml}$ の3用量について顕微鏡観察を実施した。

2) 染色体異常試験

a. 直接法24時間処理

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 3 および Table 3 に、各プレートの分析結果を Appendix 1 に示した。

溶媒対照における染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は、ギャップのみ保有の細胞を含めた場合 (+gap)、含めない場合 (-gap) いずれも 0.5% であり、倍数性細胞の出現頻度についても 0.5% であった。

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸を 375、750 および 1,500 $\mu\text{g/ml}$ で処理した場合の染色体構造異常出現頻度は、+gap で 0.5、2.5 および 3.5%、-gap でも同頻度であった。倍数性細胞の出現頻度は各群それぞれ 0.0、0.0 および 1.0% であった。

なお、溶解限界濃度の 1,500 $\mu\text{g/ml}$ 処理においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった。

一方、陽性対照物質 (MMC) で処理した細胞は、ギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb) あるいは染色分体交換 (cte) などの異常が多数観察され、その出現頻度は +gap で 55.0% と顕著な増加を示した。

b. 直接法48時間処理

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 3 および Table 4 に、各プレートの分析結果を Appendix 2 に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gap および -gap いずれも 0.0% であり、倍数性細胞の出現頻度についても 0.0% であった。

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸処理群での構造異常出現頻度は 375、750 および 1,500 $\mu\text{g/ml}$ 処理でそれぞれ 1.5、4.5 および 2.0% (+gap)、-gap でも同程度であった。倍数性細胞の出現頻度は各群 0.5% 以下であった。

なお、高用量の 1,500 $\mu\text{g/ml}$ 処理においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった。

陽性対照では構造異常細胞が +gap で 55.0% 出現した。

c. 代謝活性化法 (+ S 9 処理)

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 4 および Table 5 に、各プレートの分析結果を Appendix 3 に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は、+gap、-gapいずれも 0.0%、倍数性細胞の出現頻度については 0.5%であった。

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸を 375、750 および 1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の構造異常出現頻度は、+gapで 0.5、0.5 および 1.0%、-gapにおいてもまったく同じ出現頻度であった。倍数性細胞については、各群 1.5%以下の出現頻度であった。なお、高用量の 1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった。

また、代謝活性化を必要とする陽性対照物質 CP で処理した細胞では、多数の異常が出現し、+gapで40.5%の細胞に構造異常が認められた。

d. 代謝活性化法 (- S 9 処理)

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 4 および Table 6 に、各プレートの分析結果を Appendix 4 に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は、+gapで 0.5%、-gapで 0.0%であり、倍数性細胞の出現頻度も 0.0%であった。

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸処理群における構造異常出現頻度は 375、750 および 1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理でそれぞれ 0.5、0.0 および 0.0% (+gap)、-gapにおいても同じ頻度であった。また、倍数性細胞はいずれの処理群においても観察されなかった。

なお、高用量の 1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった。

一方、CPで処理した群では代謝活性化が行われないため、染色体異常の明確な誘発は認められなかった。

なお、直接法、代謝活性化法とも被験物質添加の際、白色の析出物の生成が認められた。

また、375 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では用量に依存して培養液の pH が酸性側に変化していた。

12. 考察および結論：

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。細胞増殖抑制試験結果を基に直接法ならびに代謝活性化法において、溶解限界濃度まで検討した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれの試験群においても、溶媒対照群に比較して染色体異常の明確な誘発は認められなかった。

一方、溶媒対照群あるいは陽性対照群での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり、本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下において7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

13. 参考とした資料 :

- Ishidate, M., Jr., and Odashima, S. : Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* -A screening for chemical carcinogens. Mut. Res., 48 : 337~354, 1977.
- 石館 基 : 培養細胞を用いる染色体異常の検出法、組織培養、 5 : 115~122, 1979.
- Evans, H. J. : Cytological methods of detecting chemical mutagens. In A. Hollander (Ed.), Chemical Mutagens, Vol. 4 :1~25, Plenum, New York, 1976.
- Matsuoka, A., *et al.* : Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. Mut. Res., 66 : 277~290, 1979.
- 石館 基 監修 : 染色体異常試験データ集、リアライズ、東京、1983.
- Evans, H. J. and O' Riordan, M. L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests, Mut. Res., 31 : 135~148, 1975.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. Toxicol. Appl. Pharmacol., 22, 269~275, 1972.

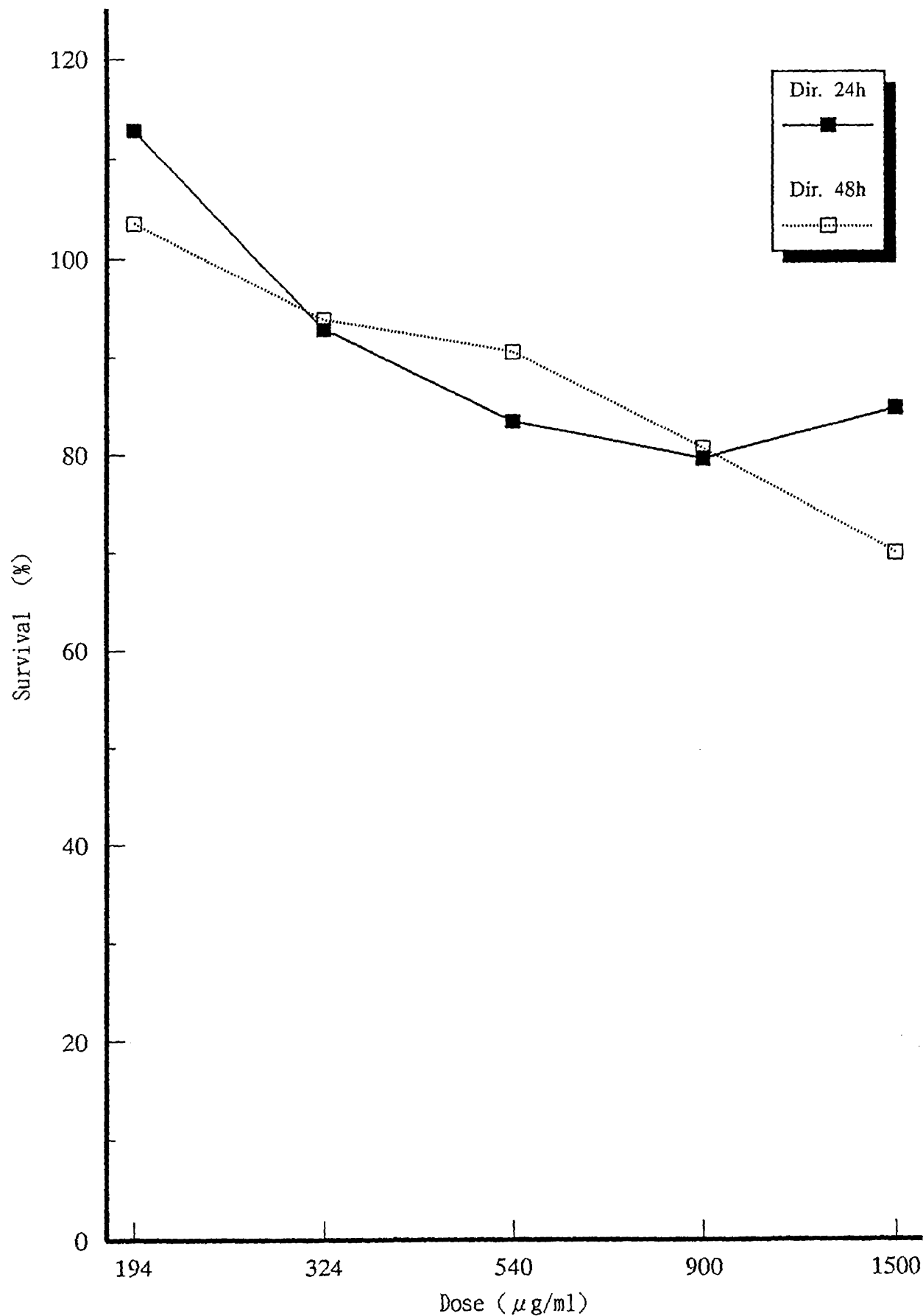


Figure 1. Dose-survival curves of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method]

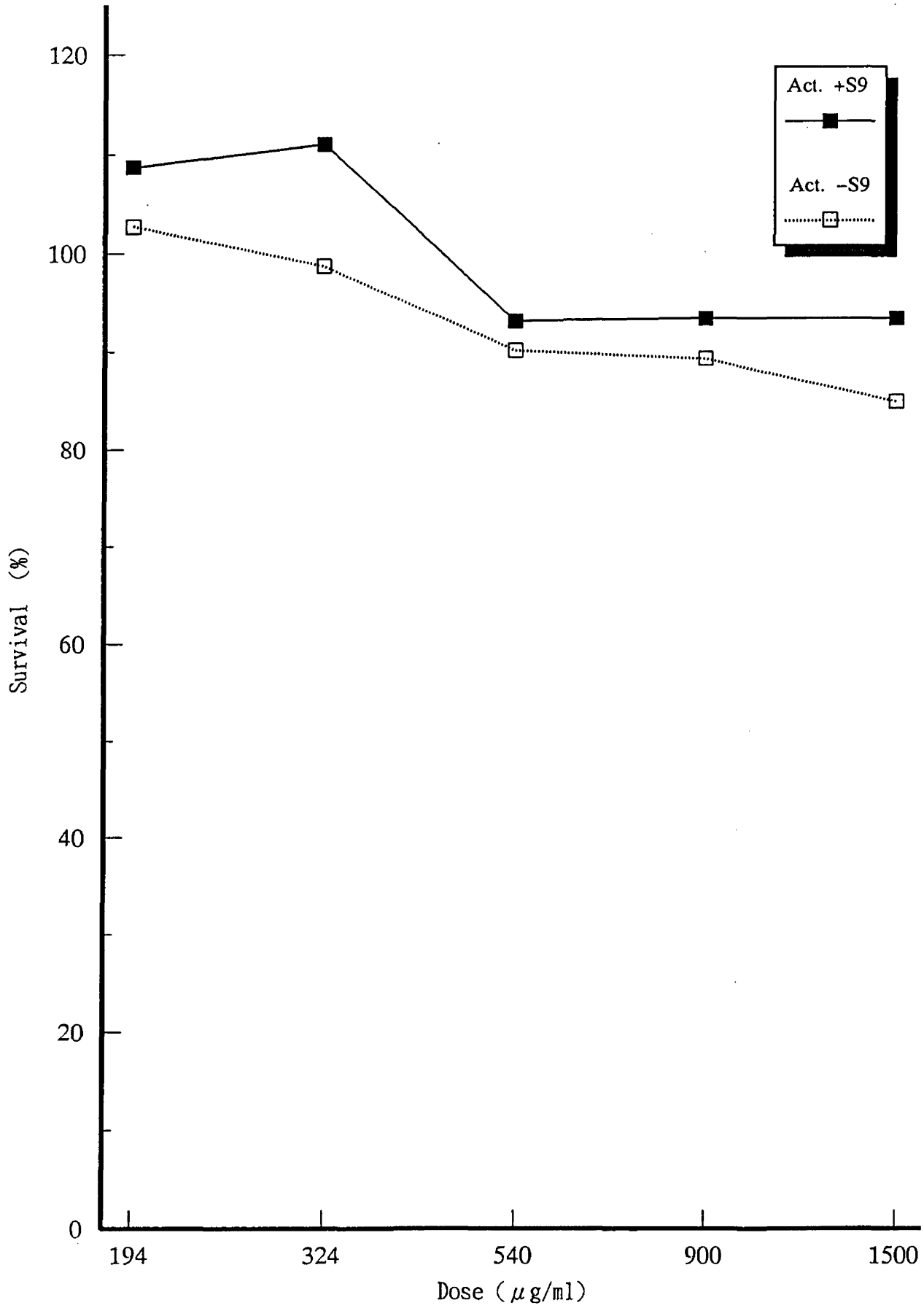


Figure 2. Dose-survival curves of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method]

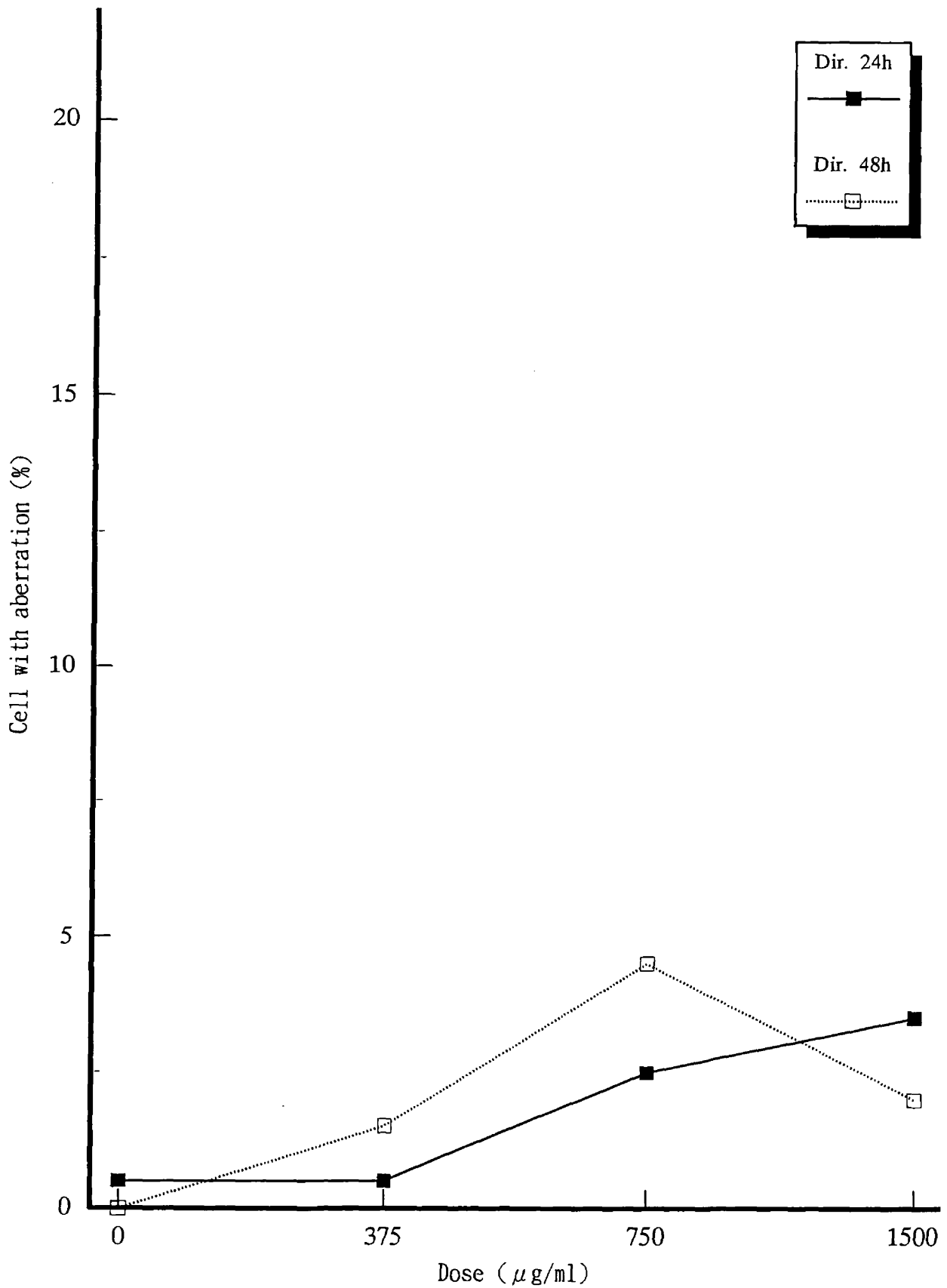


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method]

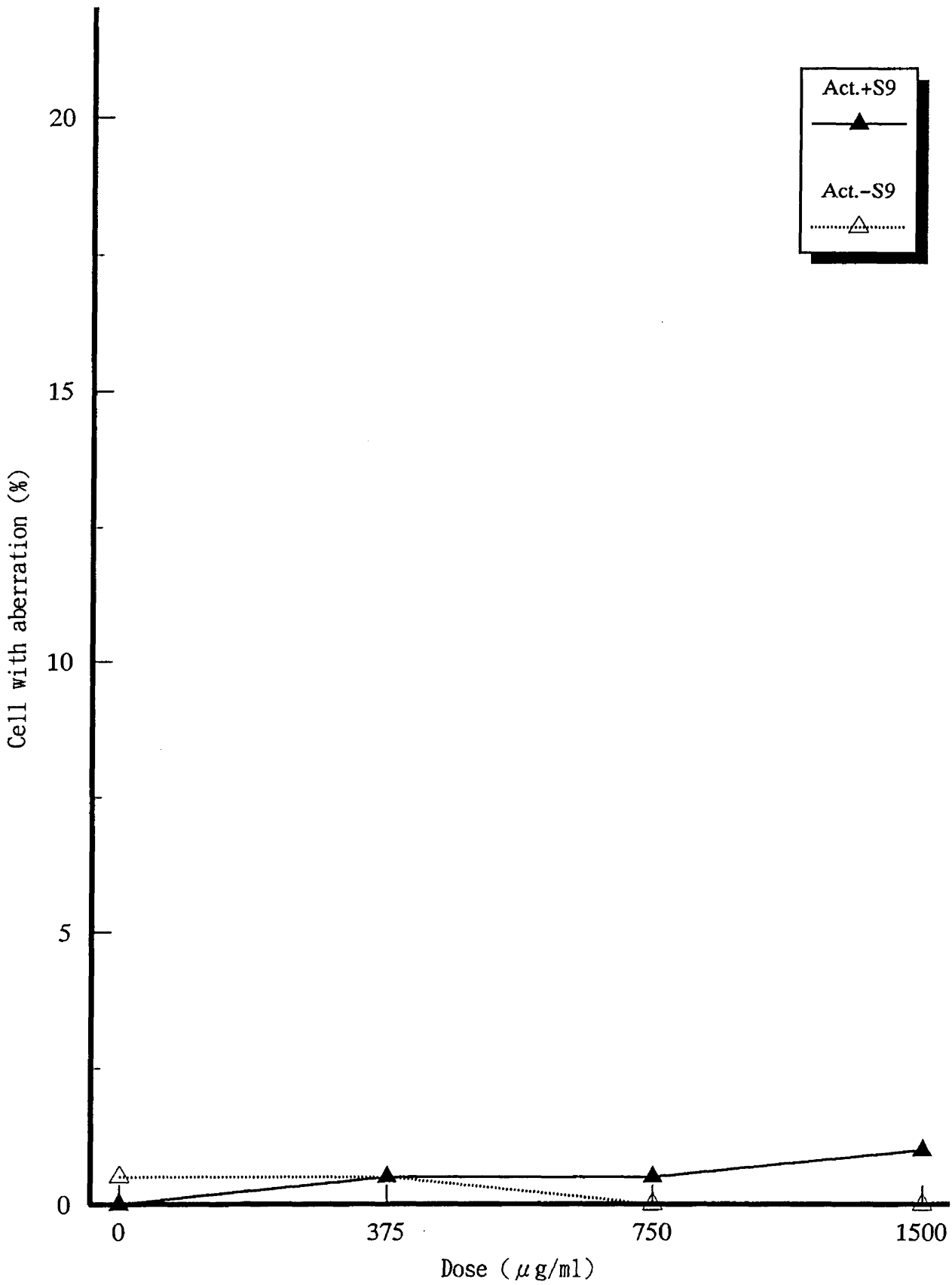


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method]

Table 1. Results of growth inhibition test on 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method]

| Dose ($\mu\text{g/ml}$) | 24 h treatment | | 48 h treatment | |
|---------------------------|----------------|----------|---------------------------|-----------------------|
| | Survival (%) | [Mean] | Dose ($\mu\text{g/ml}$) | Survival (%) [Mean] |
| 0 | 100.0 | [100.0] | 0 | 100.0 [100.0] |
| 194 | 101.3 | [112.8] | 194 | 107.1 [103.5] |
| 324 | 95.2 | [92.8] | 324 | 92.6 [93.8] |
| 540 | 84.7 | [83.4] | 540 | 90.8 [90.5] |
| 900 | 81.2 | [79.6] | 900 | 83.7 [80.7] |
| 1500 | 86.5 | [84.8] | 1500 | 71.0 [70.0] |

50% Growth inhibition dose was as follows:

24 h treatment ----- >1500 ($\mu\text{g/ml}$)

48 h treatment ----- >1500 ($\mu\text{g/ml}$)

Table 2. Results of growth inhibition test on 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method]

| Dose ($\mu\text{g/ml}$) | With S9 mix | | Without S9 mix | |
|---------------------------|--------------|----------|---------------------------|-----------------------|
| | Survival (%) | [Mean] | Dose ($\mu\text{g/ml}$) | Survival (%) [Mean] |
| 0 | 100.0 | [100.0] | 0 | 100.0 [100.0] |
| 194 | 108.0 | [108.7] | 194 | 103.5 [102.7] |
| 324 | 107.0 | [111.0] | 324 | 103.3 [98.7] |
| 540 | 99.8 | [93.1] | 540 | 90.0 [90.1] |
| 900 | 93.4 | [93.4] | 900 | 88.7 [89.3] |
| 1500 | 97.8 | [93.4] | 1500 | 85.6 [84.9] |

50% Growth inhibition dose was as follows:

With S9 mix ----- >1500 ($\mu\text{g/ml}$)

Without S9 mix ----- >1500 ($\mu\text{g/ml}$)

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid
[direct method : 24 hrs]

| Compound | Dose (μ g/ml) | Number of cells | No. of cells with structural aberrations | | | | | Total (+gap) (%) | Total (-gap) (%) | Polyploid cells (%) | Final judge- ment |
|-----------|-----------------------|-----------------------|---|-----|-----|-----|-----|------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | | gap | ctb | csb | cte | cse | | | | |
| DMSO # | 0 | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | - |
| Test sub. | 375 | 200 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0 | - |
| | 750 | 200 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 2.5 | 2.5 | 0.0 | - |
| | 1500 | 200 | 0 | 2 | 0 | 5 | 0 | 3.5 | 3.5 | 1.0 | - |
| MMC # | 0.05 | 200 | 10 | 30 | 0 | 100 | 0 | 55.0 | 55.0 | 0.0 | + |

#: Solvent control #: Positive control (mitomycin C)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [direct method : 48 hrs]

| Compound | Dose (μ g/ml) | Number of cells | No. of cells with structural aberrations | | | | | Total (+gap) (%) | Total (-gap) (%) | Polyploid cells (%) | Final Judge- ment |
|-----------|-----------------------|-----------------------|---|-----|-----|-----|-----|------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | | gap | ctb | csb | cte | cse | | | | |
| DMSO # | 0 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | - |
| Test sub. | 375 | 200 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1.5 | 1.5 | 0.5 | - |
| | 750 | 200 | 1 | 2 | 0 | 5 | 1 | 4.5 | 4.0 | 0.0 | - |
| | 1500 | 200 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 2.0 | 2.0 | 0.0 | - |
| MMC # | 0.025 | 200 | 7 | 38 | 0 | 100 | 2 | 55.0 | 55.0 | 0.0 | + |

#: Solvent control #: Positive control (mitomycin C)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid
[activation method: +S9]

| Compound | Dose ($\mu\text{g/ml}$) | Number of cells | No. of cells with structural aberrations | | | | | | Total (+gap) (%) | Total (-gap) (%) | Polyploid cells (%) | Final judge- ment |
|-----------|------------------------------|-----------------------|---|-----|-----|-----|-----|------|------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | | gap | ctb | ctb | ctc | cse | oth | | | | |
| DMSO # | 0 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | - | |
| Test sub. | 375 | 200 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0 | - | |
| | 750 | 200 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.5 | - | |
| | 1500 | 200 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | - | |
| CP ## | 12.5 | 200 | 4 | 20 | 0 | 71 | 0 | 40.5 | 39.0 | 0.0 | + | |

#: Solvent control #: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break ctc: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

Table 6. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [activation method: -S9]

| Compound | Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | Number of cells | No. of cells with structural aberrations | | | | | | Total (+gap) (%) | Total (-gap) (%) | Polyploid cells (%) | Final judge- ment |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | | gap | ctb | csb | cte | cse | oth | | | | |
| DMSO # | 0 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.0 | 0.0 | - |
| Test sub. | 375 | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0 | - |
| | 750 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | - |
| | 1500 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | - |
| CP ## | 12.5 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | - |

#: Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others