

最終報告書

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウム
の哺乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験

(試験番号：96-073)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Study No. 96-073

目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 対照物質	3
3. 溶媒	3
4. 試験細胞株	3
5. 培地	3
6. 培養条件	3
7. S9 mix	4
8. 細胞増殖抑制試験	4
1) 被験物質の供試液の調製	5
2) 細胞の処理	5
3) 細胞増殖率の測定	5
9. 染色体異常試験	6
1) 被験物質および陽性対照物質の濃度	6
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製	6
3) 細胞の処理	7
(1) 連続処理法	7
(2) 短時間処理法	7
4) 試験群の構成および使用シャーレ数	7
5) 染色体標本の作製	8
6) 染色体の観察	8
7) 染色体異常の分類および集計	8
8) 試験結果の判定	9

結果	9
1. 染色体異常試験（連続処理法）	9
2. 染色体異常試験（短時間処理法）	10
結論および参考事項	10
参考文献	10

表

表 1	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試験結果 （連続処理法）	12
表 2	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試験結果 （短時間処理法）	14

図

図 1	構造異常を有する細胞の出現頻度	16
図 2	倍数性細胞の出現頻度	17

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繊維芽細胞株 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 $\mu\text{g/ml}$ 濃度を最高濃度として細胞増殖抑制試験を行ったところ、連続処理法および短時間処理法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 5000 $\mu\text{g/ml}$ 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。

試 験 目 的

この試験は、2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの哺乳動物培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするため実施した。

材料および方法^{1), 2)}

1. 被験物質

名 称： 2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウム

別名 R酸ジナトリウム塩, 2,7-ナフタレンジスルホン酸,
3-ヒドロキシ-ジナトリウム塩

C A S 番号： 135-51-3

ロット番号：

純 度： 96.4 % (平成8年11月6日分析)

(不純物 水：約3%；無機分：0.1%以下；微量の異性体)

供 給 者：

入 手 日：

入 手 量： 5 g

物理化学的性状：

化 学 名 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)

示 性 式 $C_{10}H_6OH(SO_3Na)_2$

分 子 式 $C_{10}H_6O_7S_2Na_2$

分 子 量 348.26

性状(常温) 緑がかった灰色の粉末

溶 解 性 水：可溶；アセトン，DMSO，メタノール：不溶

安 定 性： 安定 (実験終了後，残余被験物質を試験委託者において分析した結果，純度は96.0 % (1997年2月27日分析) で，実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。)

保管条件： 冷暗所（4℃），密栓（湿気を避ける）

2. 対照物質

陰性対照物質は，被験物質の溶媒として使用した生理食塩液〔(株)大塚製薬工業，ロット番号 K4K78〕を用いた。陽性対照物質は，直接法では *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, Sigma chemical 社，ロット番号 109C-0469) を，代謝活性化法では 3,4-Benzo [a]pyrene (B[a]P, Sigma chemical 社，ロット番号 57F-3434) を用いた。

3. 溶媒

被験物質は水に易溶であるため，溶媒には生理食塩液を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P の溶媒には，ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社，ロット番号 WDG4420) を用いた。

4. 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 DMSO を添加し，液体窒素条件下で保存しておいたものを培地に戻し，解凍後の継代数が3回までのものを使用した。

5. 培地

Eagle-MEM 粉末培地 (Gibco Laboratories, ロット番号 73K2362) を常法に従い調製し，これに非働化 (56℃, 30分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 36N2761) を10%の割合で添加したものをを用いた。

6. 培養条件

供試細胞は CO₂ インキュベーター (Napco 社, 6200型) を用い，CO₂ 濃度 5%，空気 95%，温度 37℃，加温条件下で培養した。

7. S9 mix

S9 mixは、ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素画分 (S9) にコファクターを加えて凍結された市販品を、キッコーマン株式会社から購入〔ロット番号 CAM-351, 平成8年9月6日製造, 平成8年11月20日購入 (細胞増殖抑制試験), 平成8年12月18日購入 (染色体異常試験)] し, -80°C 以下で保存したものを使用時に冷水中で融解して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 ml 当たりの組成は, 次のとおりである。

〔S9 製造法〕

A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体 重: 198~243 g

B. 誘導法

- a) 誘導物質: Phenobarbital (PB), 5,6-Benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与方法 (投与開始日起算):
 - 1 日目 - PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目 - PB 60 mg/kg
 - 3 日目 - BF 80 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離 ($9,000\times g$) し, その上清を採取。

〔S9 mix 1 ml あたりの組成〕

S9	0.3 ml
MgCl ₂	5 $\mu\text{mol}/0.1\text{ml}$
KCl	33 $\mu\text{mol}/0.1\text{ml}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}/0.1\text{ml}$
NADP	4 $\mu\text{mol}/0.1\text{ml}$
HEPES 緩衝液	4 $\mu\text{mol}/0.2\text{ml}$
蒸留水	0.1 ml

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な濃度を検討するため, 連続処理法および短時間処理法で 78, 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で, 次に記載する細胞増殖抑制試験を行なった。試験には各濃度について 2 枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を生理食塩液に溶解して最高濃度の供試液（原液）を調製した。すなわち、連続処理法および短時間処理法ともに、原液の濃度は 55.0 mg/ml とした。次いで原液の一部を生理食塩液で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。被験物質の供試液の添加量は、各シャーレの培地量の 10% (v/v) とした。

2) 細胞の処理

連続処理法の場合、直径 3.5 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 6×10^3 個/ml の細胞を含む培地 2 ml を加え、培養開始 3 日後に生理食塩液（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.2 ml を加えて 24 時間および 48 時間培養した。一方、短時間処理法の場合は、直接法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は培地を取り替えず、生理食塩液または被験物質の供試液各 0.2 ml をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレの培地を取り除き、S9 mix 希釈液（S9 mix を培地で 6 倍に希釈したもの）を 2 ml 加えた後、生理食塩液または被験物質の供試液各 0.2 ml をシャーレに加えた。そして、培養 6 時間後に培地を取り除き、新鮮培地で細胞表面を 3 回洗浄し、新しい培地 2 ml を加えて 18 時間培養した。培養終了後、培地を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計（オリンパス光学工業株式会社、モノセレータ）によって測定し、陰性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。

その結果は、下表に示したとおり、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においては、50%を上回る細胞増殖抑制は認められず、いずれの場合においても 50%細胞増殖抑制濃度は、 $5000 \mu\text{g/ml}$ 以上であると判断された。

〔連続処理法〕

濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞増殖率 (%)			
	24 時間処理		48 時間処理	
0 (溶媒)	100	100 [100.0] ^a	100	100 [100.0]
78	104	101 [102.5]	86	88 [87.0]
156	103	99 [101.0]	89	96 [92.5]
313	99	96 [97.5]	79	89 [84.0]
625	98	99 [98.5]	80	89 [84.5]
1250	92	96 [94.0]	86	83 [84.5]
2500	95	89 [92.0]	72	83 [77.5]
5000	79	85 [82.0]	58	62 [60.0]

a : 平均値

〔短時間処理法〕

濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞増殖率 (%)			
	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
0 (溶媒)	100	100 [100.0] ^a	100	100 [100.0]
78	105	99 [102.0]	102	89 [95.5]
156	96	95 [95.5]	111	96 [103.5]
313	95	95 [95.0]	107	101 [104.0]
625	97	86 [91.5]	104	90 [97.0]
1250	100	88 [94.0]	99	96 [97.5]
2500	98	81 [89.5]	98	88 [93.0]
5000	91	86 [88.5]	95	85 [90.0]

a : 平均値

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の濃度

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の濃度は、連続処理法および短時間処理法ともに本試験法ガイドラインで規定されている上限量の $5000 \mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、以下公比2で 2500 および $1250 \mu\text{g/ml}$ の計3濃度を設定した。陽性対照物質の MNNG は $2.5 \mu\text{g/ml}$, B[a]P は $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で試験した。

2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を生理食塩液に溶解して最高濃度の供試液（原液）を調製した。すなわち、連続処理法および短時間処理法ともに原液の濃度は 55.0 mg/ml とした。次いで、上述の 8-1) に記載した方法と同様の操作で原液の一部を生理食塩液で順次希釈し、所定濃度の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/ml, B[a]P は 2.0 mg/ml の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4×10^3 個/ml の細胞を含む培地 5 ml を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に加え、3日間培養後、下記の方法で処理した。培養には1濃度当たり2枚のシャーレを使用した。

(1) 連続処理法

生理食塩液および被験物質の各供試液は 0.5 ml, MNNG の供試液は 0.025 ml を各シャーレに添加し、24時間および48時間培養した。

(2) 短時間処理法

S9 mix 非存在下の場合、各シャーレから培地 2 ml を抜き取り、生理食塩液および被験物質の各供試液は 0.3 ml, B[a]P の供試液は 0.015 ml を各シャーレに添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合、各シャーレから培地 2.5 ml を抜き取った後、各シャーレに S9 mix を 0.5 ml ずつ添加し、さらに、生理食塩液および被験物質の各供試液は 0.3 ml, B[a]P の供試液は 0.015 ml を各シャーレに添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養6時間後に培地を取り除き、新鮮培地で細胞表面を3回洗浄し、新しい培地 5 ml を加え、さらに 18 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

[連続処理法]

濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	使用シャーレ数	
	24時間処理	48時間処理
0 (陰性対照) ^a	2	2
1250	2	2
2500	2	2
5000	2	2
2.5 (陽性対照) ^b	2	2

a : 生理食塩液, b : MNNG, 使用シャーレ総数 : 20

〔短時間処理法〕

濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) ^a	2	2
1250	2	2
2500	2	2
5000	2	2
10 (陽性対照) ^b	2	2

a : 生理食塩液, b : B[a]P, 使用シャーレ総数 : 20

5) 染色体標本の作製

標本作製の2時間前に、培養中の各シャーレにコルセミドを最終濃度として $0.2\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。培養終了後、培地を取り除き、0.2%トリプシン水溶液 2 ml で処理して細胞をシャーレから剝離し、新鮮培地 5 ml を入れた遠沈管に移し、1000 rpm, 5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の 75 mM 塩化カリウム水溶液 4 ml を加えて懸濁し、 37°C で15分間低張処理した。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 (v/v) 1 ml を添加して固定した。1000 rpm で5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液 4 ml で懸濁・固定した。この操作を3回繰り返したのち、少量の固定液で適切な密度の細胞を懸濁し、スライドガラスの2か所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、S ϕ rensen 緩衝液 (pH 6.8) を用いて希釈した 1.4% ギムザ液で約15分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本を作製した。標本は、シャーレ当たり3枚作製した。

6) 染色体の観察

染色体は、60倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600倍で検鏡した。標本はすべてコード化し、盲検法でおこなった。各供試濃度とも染色体が明瞭に識別できる染色体の数が 25 ± 2 本の分裂中期像について、1シャーレ当たり100個、すなわち、1濃度当たり2枚のシャーレの200個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計³⁾

染色体異常の分類は、構造異常については、ギャップ (染色分体型および染色体型)、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換 (二動原体、環状染色体など) およびその他 (断片化) とした。数的異常については、倍数性細胞のみを記録した。

ギャップは、染色体の染色性が全く認められない部位を対象とし、その部位が染色分体幅

以上のもので、しかも染色分体の縦軸線上にあるものとした。ただし、非染色部位が染色分体の縦軸線上にあっても著しく離れている場合には、切断とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計をおこなった。構造異常の総数は、観察した細胞 200個中に認められた異常細胞数をギャップのみを有する細胞を含めた場合と、含めない場合とに区別して表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、ギャップを含めた構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^2 検定をおこなって有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性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。）をおこなった。その結果、陰性対照群に比較して、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

1. 染色体異常試験（連続処理法）

結果は表 1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では24時間および48時間処理でそれぞれ 0%および 1.0%であった。被験物質群においては24時間および48時間処理では 0.5~1.5%および 0.5~2.0%の範囲であり、陰性対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常の出現頻度は、24時間および48時間処理でそれぞれ 98.5%および 93.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数性細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群においては、24時間および48時間処理でともに 0~0.5%の範囲の低い出現頻度で認められ、陽性対照群では、48時間処理でのみ0.5%の出現頻度であった。

2. 染色体異常試験（短時間処理法）

結果は表 2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では、S9

mix 非存在下および存在下でそれぞれ 1.5%および 0.5%であった。被験物質群においては、S9 mix 非存在および存在下でそれぞれ 1.0%および 0~1.0%の範囲であり、陰性対照群との間に有意な差は認められなかった。一方、陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常の出現頻度は、S9 mix 非存在下で 2.5%、S9 mix 存在下で 60.5%を示し、B[a]P は代謝活性化されて顕著な染色体異常を誘発することが確認された。

倍数性細胞については、陰性対照および陽性対照群においては認められなかった。被験物質群においては、S9 mix 存在下でのみ 0~0.5%の範囲の出現頻度で認められた。

結論および参考事項

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肺由来の繊維芽細胞株 CHL を用いた *in vitro* における染色体異常試験を実施した結果、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても、構造異常あるいは倍数性異常などの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。

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⁴⁾ からみても明らかな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、サルモネラ菌を用いた復帰突然変異試験で陰性、DNA 修復試験では、枯草菌を用いた場合は陰性、大腸菌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⁵⁾。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⁶⁾。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.

- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal aberration test on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, **66**, 277-290.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Suter, W. and Jaeger, I. (1982). Comparative evaluation of different pairs of DNA repair-deficient and DNA repair-proficient bacterial tester strains for rapid detection of chemical mutagens and carcinogens, *Mutation Research*, **97**, 1-18.
- 6) 賀田恒夫, 石館 基 監修, “環境変異原データ集,” サイエンティスト社, 東京, 1980, p.289.

表1-1 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試験結果 (連続処理法: 24時間処理)

試験群	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	観察 細胞数	倍數性細胞		構造異常を有する細胞数と出現頻度 (%)						判定					
			細胞数 (%)	判定	ギャップ		染色分体型		染色体型			交換	その他	合計		
					g	切断	交換	切断	交換	切断				交換	+g	-g
陰性対照 (生理食塩液)	--	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0		0	0	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)
被験物質	1250	100	0		1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	--
2500	100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0		0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	
	200	1(0.5)	--	0(0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	2(1.0)	--
5000	100	0		0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
	100	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	
	200	0(0)	--	1(0.5)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	2(1.0)	2(1.0)	--
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	0		8	16	98	3	0	0	0	0	99	98	98	
		100	0		3	21	98	2	0	0	0	0	98	98	98	
	200	0(0)	--	11(5.5)	37(18.5)	196(98.0)	5(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	197(98.5)**	196(98.0)	196(98.0)	+	

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合 -g: ギャップのみを有する細胞を除く場合 MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 **: P < 0.01

表 1-2 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試験結果 (連続処理法: 48時間処理)

試験群	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	観察 細胞数	倍數性細胞		構造異常を有する細胞数と出現頻度 (%)		合計		判定	
			細胞数 (%)	判定	ギャップ		染色体型			その他
					g	交換	切断	交換		
陰性対照 (生理食塩液)	--	100	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0
		200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)
被験物質	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	3
		200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	4(2.0)
2500		100	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	1	0	0	0	0	0
		200	0(0)	--	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)
5000		100	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	0	0	1
		200	1(0.5)	--	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	1	11	23	87	11	5	0	93
		100	0	7	18	91	11	3	0	93
		200	1(0.5)	--	18(9.0)	178(89.0)	22(11.0)	8(4.0)	0(0)	186(93.0)**

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合 -g: ギャップのみを有する細胞を除く場合 MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 **: P < 0.01

表2-1 2-ナフトール-3, 6-ジスルホンナトリウムの染色体異常試験結果 (短時間処理法: S9mix 非存在下)

試験群	濃度 (μ g/ml)	観察 細胞数	倍數性細胞		構造異常を有する細胞				出現頻度 (%)		判定	
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		其他		合計
						切断	交換	切断	交換			
陰性対照 (生理食塩液)	--	100	0	--	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	--	1	0	0	1	0	3	0	2
		200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	3(1.5)	0(0)	2(1.0)
被験物質	1250	100	0	--	0	0	0	1	0	1	0	1
		100	0	--	1	0	0	0	0	1	0	0
		200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	0(0)	1(0.5)
	2500	100	0	--	1	0	0	0	0	2	0	1
		100	0	--	0	0	0	0	0	0	0	0
		200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	1(0.5)
	5000	100	0	--	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	--	0	0	0	1	0	2	0	2
		200	0(0)	--	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
陽性対照 (B[a]P)	10	100	0	--	2	0	0	0	0	3	0	1
		100	0	--	1	0	0	0	0	2	0	1
		200	0(0)	--	3(1.5)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	5(2.5)	0(0)	2(1.0)

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合 -g: ギャップのみを有する細胞を除く場合 B[a]P: 3, 4-benzo[a]pyrene

表2-2 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試験結果(短時間処理法: S9mix 存在下)

試験群	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	観察 細胞数	倍數性細胞		構造異常を有する細胞数と出現頻度(%)						判定			
			細胞数 (%)	判定	ギャップ		染色分体型		染色体型			其他	合計	
					g	切断	交換	切断	交換	切断			交換	+g
陰性対照 (生理食塩液)	--	100	0		0	0	0	0	1	0	0	1	1	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	0(0)	--	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	--
被験物質	1250	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	1		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)	--
	2500	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0		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)	--
	5000	100	0		0	0	1	0	0	0	0	1	1	
		100	0		1	0	0	0	0	0	0	1	0	
		200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	1(0.5)	--
陽性対照 (B[a]P)	10	100	0		8	6	53	4	0	0	0	58	55	
		100	0		5	3	58	1	0	0	0	63	59	
		200	0(0)	--	13(6.5)	9(4.5)	111(55.5)	5(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	121(60.5)**	114(57.0)	+

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合

-g: ギャップのみを有する細胞を除く場合

B[a]P: 3, 4-benzo[a]pyrene

** : $P < 0.01$

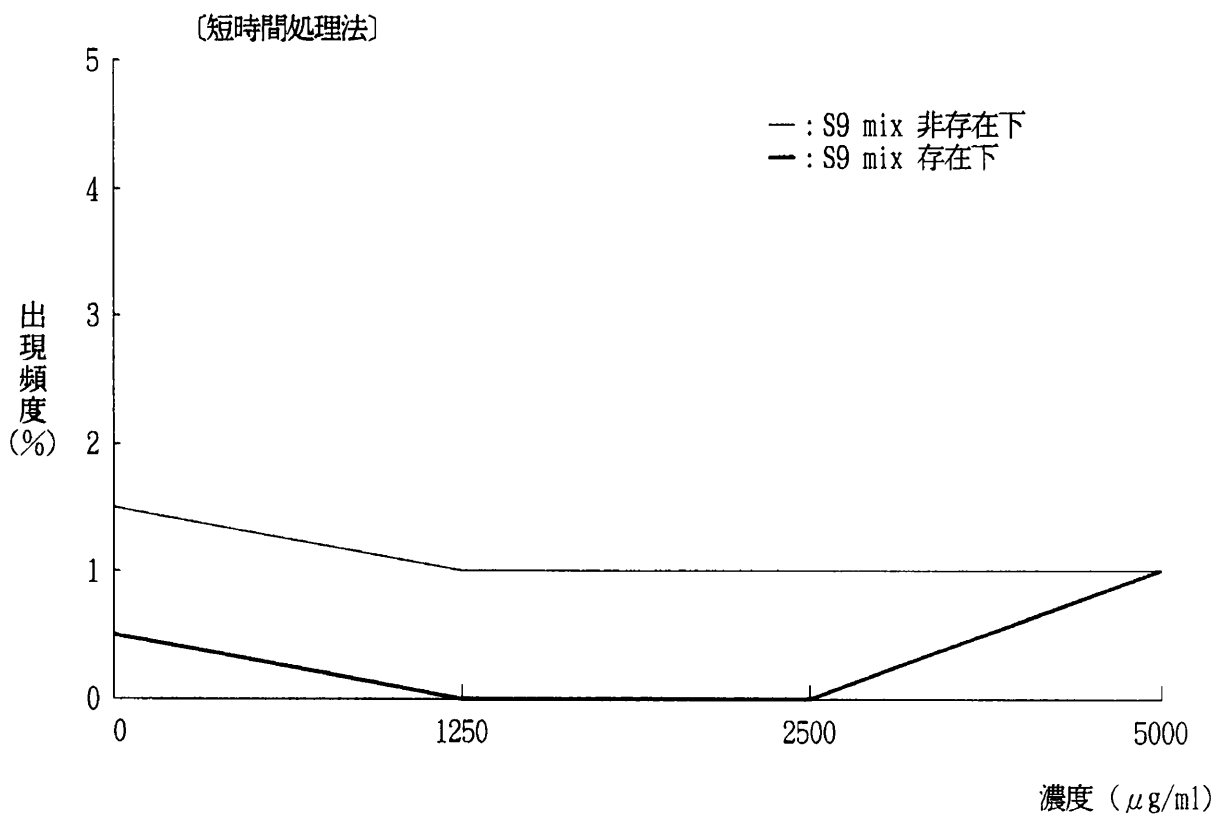
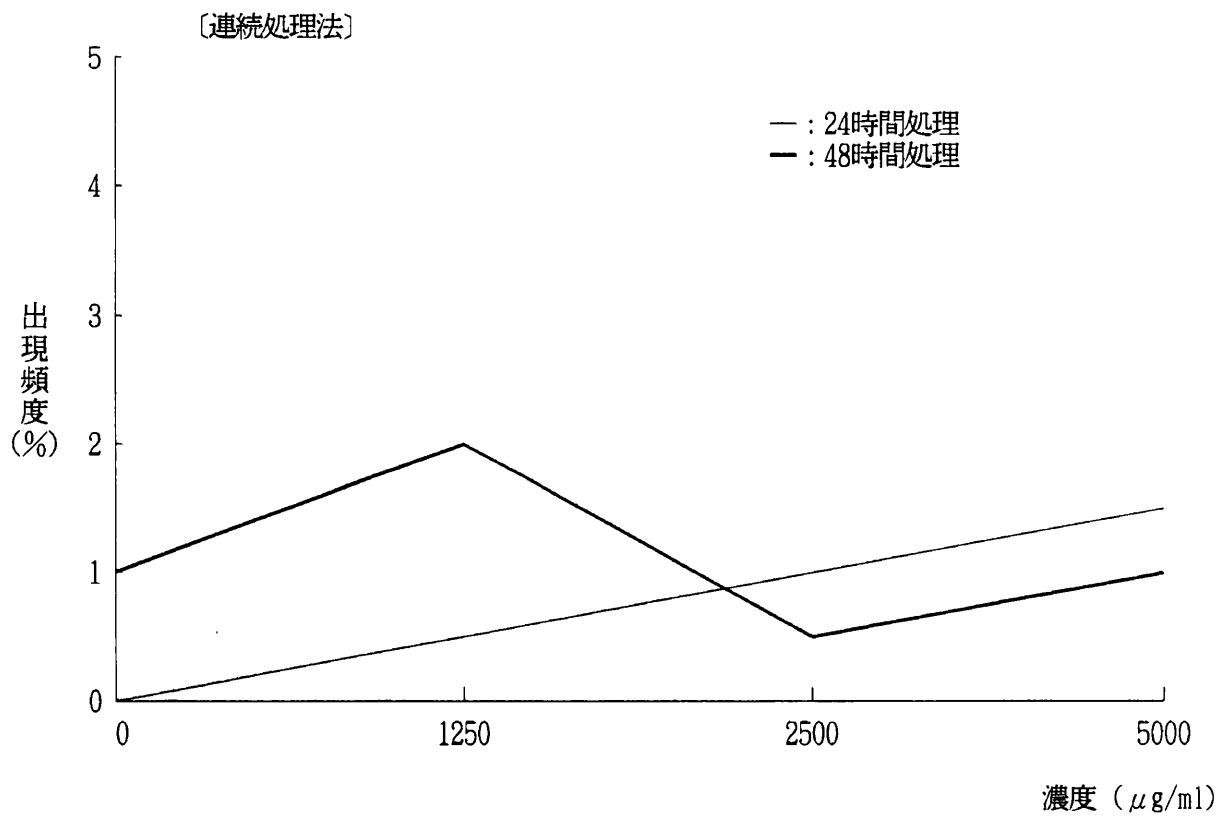


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

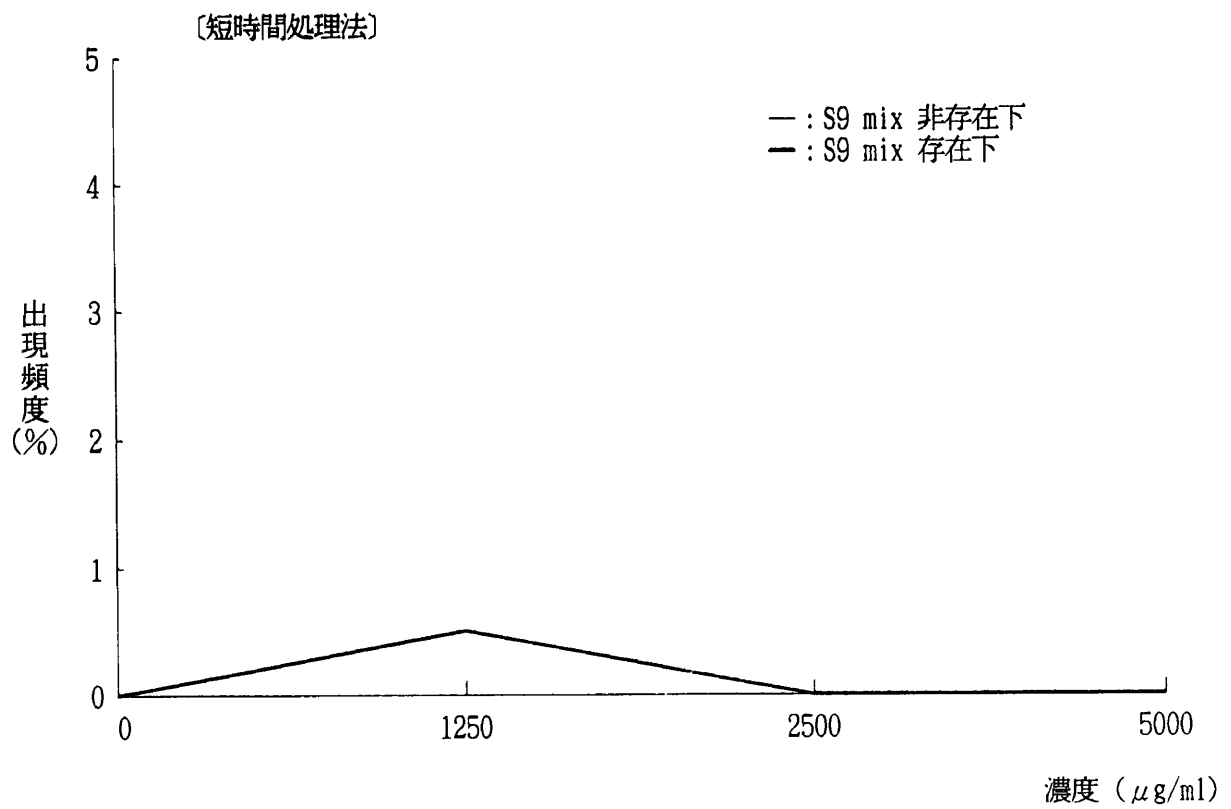
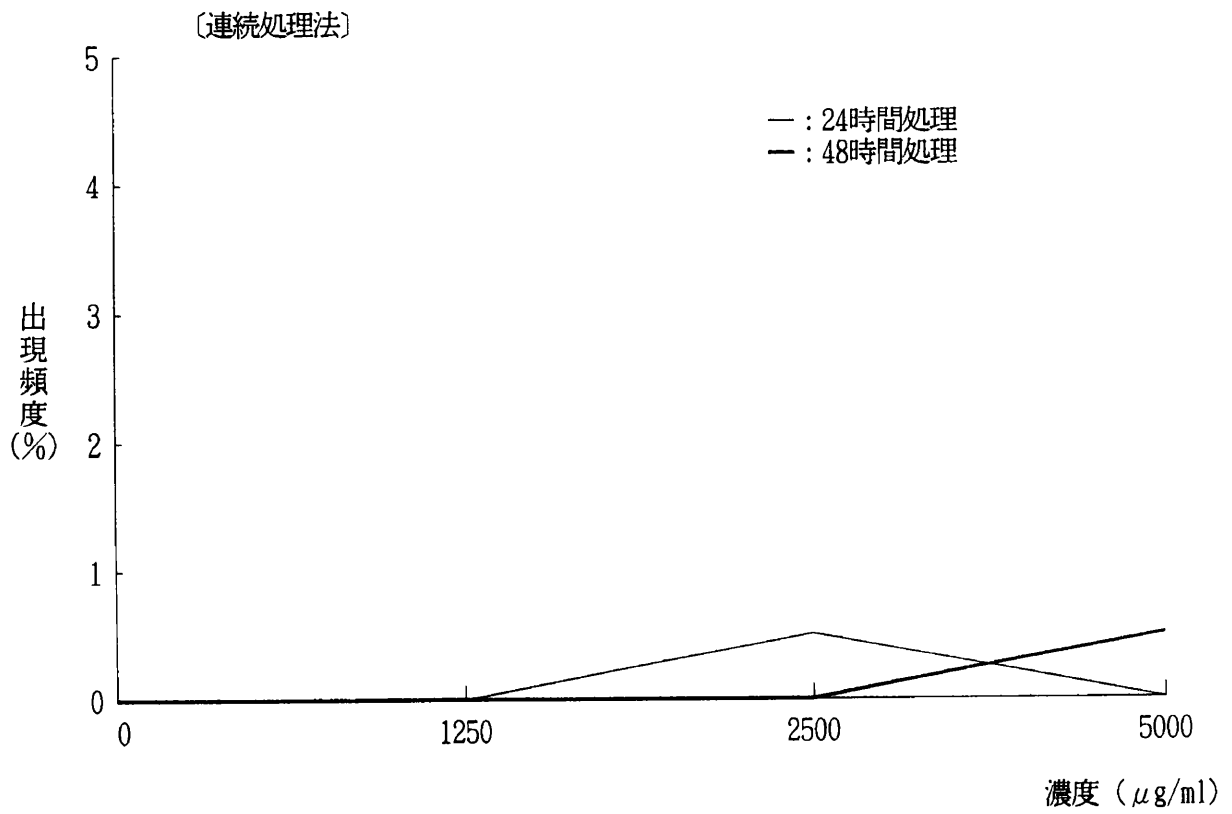


図 2 倍数性細胞の出現頻度