

最終報告書

ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の
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

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課 化学物質安全対策室 委託

試験施設

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729 番地の 5

TEL 0463-82-4751

試験委託者 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課 化学物質安全対策室
(東京都千代田区霞が関 1-2-2)

試験番号 G-16-049

被験物質 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩

試験項目 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

試験開始日 2016年11月10日


実験開始日 2016年11月18日

実験終了日 2017年1月17日

試験終了日 試験責任者の押印日


試験資料保存場所 秦野研究所資料保存施設

保存期間 試験終了後10年間
その後の保存については試験委託者と協議する。

運営管理者 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
所長 

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日付け、薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知 一部改正平成27年12月21日、薬生発1221第1号厚生労働省医薬・生活衛生局長、20151209製局第1号経済産業省製造産業局長、環境企発第1512211号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成23年3月31日付け、薬食発0331第8号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施したものである。

年 月 日

試験責任者 

試験従事者

試験責任者

試験担当者

培養

検体調製および細胞処理

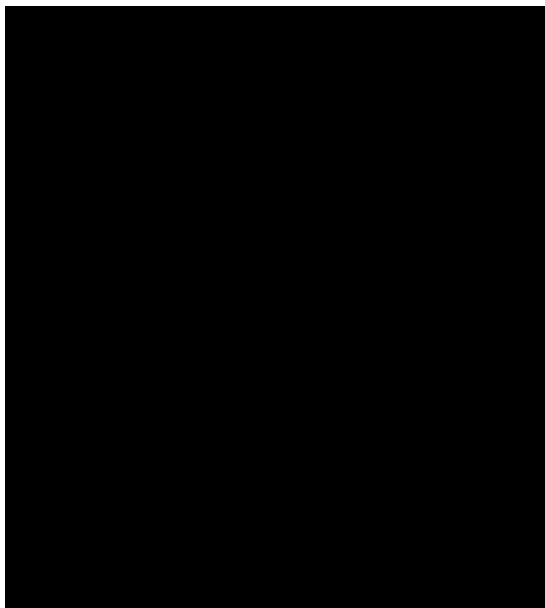
細胞数測定用サンプル作製

細胞数測定

染色体標本作製

染色体分析

被験物質管理



目次

要約 -----5

試験目的 -----6

試験ガイドラインと GLP -----6

材料と方法 -----6

 1. 被験物質 -----6

 2. 陽性対照物質 -----7

 3. 細胞と培養条件 -----7

 4. S9 反応液 -----7

 5. 被験物質調製液の調製 -----8

 6. 細胞毒性試験 -----8

 7. 染色体異常試験 -----9

 8. 染色体分析 -----10

 9. 試験成立条件 -----10

 10. 判定 -----10

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従
わなかったこと -----10

試験成績および考察 -----11

参考文献 -----12

図 -----13

表 -----14

資料 -----17

(最終ページ:18 ページ)

信頼性保証書

要約

ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の CHL/IU 細胞(チャイニーズ・ハムスター、雌肺由来)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を調べた。

用量設定のために細胞毒性試験を行った結果、S9 mix 存在下の短時間処理では 50%を超える細胞毒性は認められなかった。一方、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では 50%を超える細胞毒性が認められ、50%の相対細胞数増加率を示す被験物質濃度は、それぞれ 1.5 mg/mL および 0.23 mg/mL と推定された。

肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時共に、すべての処理条件で被験物質処理群の培養液中に沈殿は認められなかった。

以上のことから、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 2.0 mg/mL を最高濃度とし、公比 1.5 で以下の 7 濃度群を設定した。また、24 時間連続処理では 0.35 mg/mL を最高濃度とし、公比 1.2 で以下の 8 濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.18、0.26、0.40、0.59、0.89、1.3、2.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.18、0.26、0.40、0.59、0.89、1.3、2.0 mg/mL

24 時間連続処理:0.098、0.12、0.14、0.17、0.20、0.24、0.29、0.35 mg/mL

肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時共に、すべての処理条件で被験物質処理群の培養液中に沈殿は認められなかった。

染色体分析に先立ち、すべての処理条件で 40%未満の相対細胞数増加率を示した最も低い濃度について、分裂指数を分析した。その結果、いずれも染色体分析可能と判断し、相対細胞数増加率を考慮し以下の 3 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.59、0.89、1.3 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.89、1.3、2.0 mg/mL

24 時間連続処理:0.14、0.17、0.20 mg/mL

染色体分析の結果、すべての処理条件で被験物質処理群に構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩は本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

試験目的

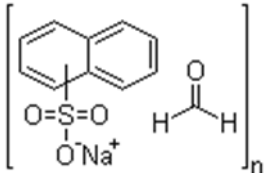
ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の染色体異常誘発作用を調べるため、その CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知 一部改正平成 27 年 12 月 21 日、薬生発 1221 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局長、20151209 製局第 1 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 1512211 号環境省総合環境政策局長通知) に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知) を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

- | | |
|-------------------|---|
| 1) 名称 | ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩 |
| 2) 官報公示整理番号 (化審法) | (4)-557 |
| 3) 商品名 | デモール N |
| 4) 英名 | Sodium poly [(naphthaleneformaldehyde) sulfonate] |
| 5) 化学名 (IUPAC 名) | Disodium 5-[(6-sulfonatophthalen-1-yl) methyl] naphthalene-2-sulfonate |
| 6) CAS 番号 | 9084-06-4 |
| 7) 分子式 | $(C_{11}H_7O_4SNa)_n$ |
| 8) 分子量 | 情報なし |
| 9) 物理化学的性状 | 性状:うすい黄褐色の粉末
融点:購入元からのデータなし
沸点:購入元からのデータなし
1-オクタノール/水分分配係数:購入元からのデータなし
蒸気圧:購入元からのデータなし
溶解性:水に溶ける |
| 10) 構造式 |  |

- 11) ロット番号 CTM4138
- 12) 純度 被験物質は重合物（高分子）であることから、和光純薬工業株式会社で販売している製品を 100%として試験を行った。
- 13) 不純物 情報なし
- 14) 安定性 推奨保管条件下で安定（購入元からのデータより）。なお、当試験施設において本被験物質を用いる各種毒性試験の実験開始前と終了後に性状の確認および赤外吸収スペクトルを測定し、色調や性状、スペクトルに変化がないことを確認した（試験番号:M-16-075）。
- 15) 保管場所 室温（1～30°C、実測値:15.0～24.3°C）、遮光、密閉
- 16) 購入元 和光純薬工業株式会社

2. 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C（MMC、ロット番号:572ADD、協和発酵キリン）を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド（CP、ロット番号:SLBG4216V、Sigma Chemical）を用いた。

試験には、これらの陽性対照物質を日局注射用水（ロット番号:K5H73、大塚製薬工場）に溶かし、凍結保存（-30°C）した原液（MMC:20 µg/mL、CP:1 mg/mL、調製日:MMC、CPともに 2016 年 8 月 1 日）を用時解凍して、調製後 6 か月以内に試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国においては染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手（1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4）し、継代後、液体窒素（気相）中に凍結保存（現在の継代数 23）した。その細胞（倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし）を、解凍後、継代 10 代（細胞毒性試験）および 6 代（染色体異常試験）で試験に用いた。

培養には、新生児牛血清（NBCS、ロット番号:S12160S0750、Biowest）を 10 vol% 添加したイーグル MEM 培養液（10%NBCS/MEM）を用い、CO₂ インキュベーター（5%CO₂、37 °C の加湿条件下）内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末（日水製薬）4.7 g に精製水を 500 mL 加えて溶解し、高圧蒸気滅菌（121 °C、15 分）したものに、L-グルタミン（日水製薬）を約 0.15 g、10 w/v%NaHCO₃ 水溶液を約 10 mL 無菌的に添加して調製した。

4. S9 反応液

S9（ロット番号:RAA201608A、2016 年 8 月 19 日製造、キッコーマンバイオケミファ）は、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽（-80°C）に保管し、製造後 6 か月以内に使用した。グルコース-6-リン酸（G-6-P、Sigma）、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業）および KCl を精製水に溶かし、混合液として超低温槽（-80°C）に保管し、使用時（調製後 6 か月以内に使用）はこれに

S9、MgCl₂ および HEPES (pH 7.2) を加え、S9 mix とした。試験には 10%NBCS/MEM:S9 mix を 22:5 の割合で混和した S9 反応液を用いた(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP⁺、0.83 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水に溶解したことから、媒体として日局注射用水(ロット番号:K5H73、大塚製薬工場)を用いた。

被験物質を秤量したのち、媒体を加えて原液(細胞毒性試験、染色体異常試験ともに 20.0 mg/mL)を用時調製した。その原液を媒体で希釈して下記の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 10 vol%添加して処理を行った。

細胞毒性試験

0.313、0.625、1.25、2.50、5.00、10.0、20.0 mg/mL (公比 2)

染色体異常試験

S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理:1.76、2.63、3.95、5.93、8.89、13.3、20.0 mg/mL (公比 1.5)

24 時間連続処理:0.977、1.17、1.41、1.69、2.03、2.43、2.92、3.50 mg/mL (公比 1.2)

媒体中での被験物質の安定性については、被験物質調製液(原液)の調製時に目視により、発熱、発泡などの変化がないことを確認した。

含量試験については、「医薬品・化学物質 GLP 解説(2002)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。

6. 細胞毒性試験

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、試験法ガイドラインに従って 2.0 mg/mL を最高処理濃度として公比 2 で 7 濃度群 (0.031、0.063、0.13、0.25、0.50、1.0、2.0 mg/mL) を設定して細胞毒性試験を実施した。

CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシン溶液を用いて剥がした後、 8×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (4×10^4 個) をプラスチックディッシュ (直径 6 cm) に播種した。培養開始 3 日目に以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%NBCS/MEM または S9 反応液と交換 (2.7 mL/ディッシュ) したのち、媒体(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 10 vol%添加 (0.3 mL/ディッシュ) し、6 時間処理した。処理後、MEM (血清不含) で洗浄し、10%NBCS/MEM (5 mL/ディッシュ) でさらに 18 時間培養した。連続処理する場合は、各ディッシュの培養液を 10%NBCS/MEM と交換 (4.5 mL/ディッシュ) したのち、媒体(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 10 vol%添加 (0.5 mL/ディッシュ) し、24 時間処理した。なお、処理開始時に 2 枚の

ディッシュについて培養液を捨て、5 mL の 0.02 w/v% EDTA 含有 PBS (Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含) を加えて細胞を剥がし、細胞を遠沈管に移した後、0.5 mL の細胞浮遊液を 9 mL の ISOTON[®] II (Beckman Coulter) に加え、コールターカウンター (Z2, Beckman Coulter) で細胞数を測定した。また、処理開始時および終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了後、上記と同様の方法で細胞を剥がして得られた細胞懸濁液を用いてコールターカウンターで各ディッシュの細胞数を測定し、その測定結果をもとに下記の計算式を用いて相対細胞数増加率 (RICC, relative increase in cell counts) を算出して細胞毒性 (100-RICC) の指標とした。

$$\text{相対細胞数増加率 (\%)} = \frac{\text{処理群の細胞数} - \text{処理開始時の細胞数}}{\text{陰性対照群の細胞数} - \text{処理開始時の細胞数}} \times 100$$

7. 染色体異常試験

細胞毒性試験とはほぼ同じ試験条件で染色体異常試験を行った。

細胞毒性試験の結果をもとに最高濃度を決定し、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理は公比 1.5 で 7 濃度群、24 時間連続処理は公比 1.2 で 8 濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

陽性対照群については、培養液を 10%NBCS/MEM または S9 反応液と交換し、日局注射用水を 10 vol% 加えたのち、MMC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、S9 mix 非存在下の短時間処理では 0.015 mL/ディッシュ (最終濃度: 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、連続処理では 0.0125 mL/ディッシュ (最終濃度: 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では CP (1 mg/mL) を 0.030 mL/ディッシュ (最終濃度: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加した。なお、MMC および CP はこれらの濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、陰性対照群および被験物質処理群については、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した。培養終了後、培養液を捨て 0.02 w/v% EDTA 含有 PBS (Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含) をディッシュあたり 5 mL 加えてピペッティングにより細胞を剥がし、細胞を遠沈管に移した。陽性対照群を含むすべての処理群について、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON[®] II に加え、コールターカウンターで細胞数を測定した。残りの細胞懸濁液については遠沈 (1400 rpm, 5 分) し、上清を捨てた後、3 mL の低張液 (0.075 mol/L KCl 水溶液) を加え、30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール: 氷酢酸=3:1 (v/v)) を 6 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作をさらに 2 回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス (あらかじめフロスト部分に試験番号、コード番号およびスライド番号を記入) 上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 5 枚のスライド標本作製した。

作製したスライド標本を 70 vol%メタノールに軽く浸漬したのち 3 vol%ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製) で 8 分染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立ち、1 ディッシュから得られた1枚の標本を用いて、すべての処理条件で40%未満の相対細胞数増加率を示した最も低い濃度について分裂指数の分析（500細胞/標本）を行い、0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断した。

ディッシュ1枚から得られたスライド標本3枚を、3人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1群あたり300個（150細胞/ディッシュ、50細胞/観察者）の分裂中期細胞（染色体数:23~27本）について構造異常の種類と数を、1群あたり600個（300細胞/ディッシュ、100細胞/観察者）の分裂中期細胞について倍数性細胞（染色体数が38本以上）の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く構造異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会¹⁾による分類法に基づいて行った。ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

9. 試験成立条件

以下の基準に合致した場合、該当した処理条件については試験不成立とし、再試験を実施するか、試験不成立としない理由を報告書に記載することとした。

- 1) 処理した最高用量が試験法ガイドラインの基準を満たしていない場合
- 2) 分析可能な被験物質処理群が各試験条件で3群得られない場合
- 3) 陰性対照群の構造異常を有する細胞の出現率が5.0%を超えた場合
- 4) 陽性対照群の構造異常を有する細胞の出現率が20%未満の場合

10. 判定

染色体の構造異常（ギャップを除く）を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法（ $p < 0.01$ 、片側）により有意差検定を実施した。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

本試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

試験成績および考察

用量設定のために実施した細胞毒性試験の結果、S9 mix 存在下の短時間処理は 50%を超える細胞毒性（50%未満の相対細胞数増加率）は認められなかった。一方、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では 50%を超える細胞毒性が認められ、50%の相対細胞数増加率を示す被験物質濃度は、それぞれ 1.5 mg/mL および 0.23 mg/mL と推定された（図 1）。

肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時共に、すべての処理条件で被験物質処理群の培養液中に沈殿は認められなかった。

以上のことから、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理は、50%の相対細胞数増加率が、濃度設定の上限である 2.0 mg/mL に近いこと、および 50%を超える細胞毒性が認められなかったことから、2.0 mg/mL を最高濃度とし、公比 1.5 で以下の被験物質処理群を設定した。また、24 時間連続処理は、50%の相対細胞数増加率を示した被験物質濃度の約 1.5 倍となる 0.35 mg/mL を最高濃度とし、公比 1.2 で以下の被験物質処理群を設定し、染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.18、0.26、0.40、0.59、0.89、1.3、2.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.18、0.26、0.40、0.59、0.89、1.3、2.0 mg/mL

24 時間連続処理:0.098、0.12、0.14、0.17、0.20、0.24、0.29、0.35 mg/mL

肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時共に、すべての処理条件で被験物質処理群の培養液中に沈殿は認められなかった。

染色体分析に先立ち、すべての処理条件で 40%未満の相対細胞数増加率を示した最も低い濃度の被験物質処理群（S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理:1.3 mg/mL および 2.0 mg/mL、24 時間連続処理:0.20 mg/mL）について分裂指数を分析した。その結果、すべての処理条件で 0.5%以上となり染色体分析可能と判断した。なお、いずれの処理条件も、50～60%の細胞毒性（40～50%の相対細胞数増加率）を示した被験物質処理群は得られなかった。

従って、染色体分析を行う最高濃度は、全ての処理条件で十分な細胞毒性を示していると考えられる 40%未満の相対細胞数増加率を示した最も低い濃度の被験物質処理群とし、それより低い 2 濃度を含む以下の計 3 濃度群について染色体分析を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.59、0.89、1.3 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.89、1.3、2.0 mg/mL

24 時間連続処理:0.14、0.17、0.20 mg/mL

染色体分析の結果、全ての処理条件で、被験物質処理群に構造異常を有する細胞、および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった（表 1、表 2、表 3）。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および連続処理において染色体の構造異常を誘発し(表 1、表 3)、CP は S9 mix 存在下の短時間処理において染色体の構造異常を誘発した(表 2)。これらの結果より、本実験系の成立が確認された。

なお、ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩については、当試験施設で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号:M-16-075)で陰性の結果が得られている。また、当被験物質の関連物質である naphthalene に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験では陰性²⁾、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では陽性³⁾の結果が報告されている。また、4-Amino-1-naphthalene sulfonic acid に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性⁴⁾の結果が報告されている。

以上の結果より、ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩は、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

参考文献

- 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)
- 2) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修、労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく既存化学物質 変異原性試験データ集、社団法人日本化学物質安全・情報センター 編集・発行、東京(1996)、p.193
- 3) 祖父尼俊雄 監修、染色体異常試験データ集、改訂 1998 年版、Life-Science Information Center、東京(1998)、p.346
- 4) L.E. Kier, D.J. Brusick, A.E. Auletta, et.al.: The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. Mutation Research, 168: 69-240 (1986)

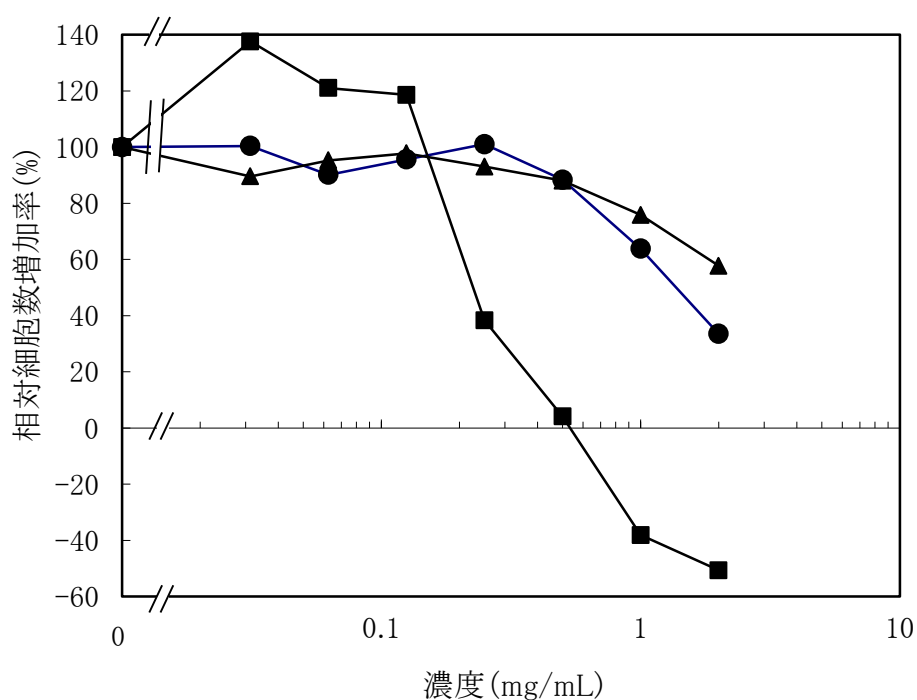


図 1 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩で CHL/IU 細胞を処理したときの細胞毒性作用(細胞毒性試験)

- : S9 mix 非存在下の短時間処理
- ▲: S9 mix 存在下の短時間処理
- : 24 時間連続処理

肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時共に、すべての処理条件で被験物質処理群の培養液中に沈殿は認められなかった。

表1 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩 (SNS) でチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞) を6時間処理 (S9 mix非存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 (mg/mL)	S 9 mix	処理 時間 (hrs)	相対細胞 ²⁾ 数増加率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分 析 細胞数	構造異常の種類と数						その他 ⁵⁾ の異常 合計	構造異常を有する細胞の数		倍 数 性 ⁶⁾ 細胞の数 (%)	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾		ギャップを 含む (%)	ギャップを 除く (%)		
陰性対照 ¹⁾	0	-	6 - (18)	100	NA	150	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.3)	1 (0.7)	0 (0.0)
						150	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.7)	1 (0.7)	3 (1.0)
						300	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.0)	2 (0.7)	3 (0.5)
SNS	0.18	-	6 - (18)	80	NA	分析せず											
SNS	0.26	-	6 - (18)	103	NA	分析せず											
SNS	0.40	-	6 - (18)	76	NA	分析せず											
SNS	0.59	-	6 - (18)	70	NA	150	0	2	0	2	0	0	4	0	3 (2.0)	3 (2.0)	0 (0.0)
						150	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (1.3)	1 (0.7)	0 (0.0)
						300	1	2	0	3	0	0	6	0	5 (1.7)	4 (1.3)	0 (0.0)
SNS	0.89	-	6 - (18)	56	NA	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						150	0	0	2	0	0	0	2	0	2 (1.3)	2 (1.3)	0 (0.0)
						300	0	0	2	0	0	0	2	0	2 (0.7)	2 (0.7)	0 (0.0)
SNS	1.3	-	6 - (18)	35	8.8, 9.6	150	1	1	0	5	0	0	7	0	4 (2.7)	3 (2.0)	0 (0.0)
						150	0	0	0	3	0	0	3	0	1 (0.7)	1 (0.7)	0 (0.0)
						300	1	1	0	8	0	0	10	0	5 (1.7)	4 (1.3)	0 (0.0)
SNS	2.0	-	6 - (18)	20	NA	強い細胞毒性のため分析せず											
MMC	0.1 µg/mL	-	6 - (18)	63	NA	150	3	24	92	6	0	0	125	0	77 (51.3)	76 (50.7)	0 (0.0)
						150	2	28	72	1	0	0	103	5	68 (45.3)	68 (45.3)	0 (0.0)
						300	5	52	164	7	0	0	228	5	145 (48.3)	144 *(48.0)	0 (0.0)

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体交換, csb: 染色体切断, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず.

1) 媒体として用いた日局注射用水を10 vol%加えた. 2) コールターカウンターにより各ディッシュにおける細胞数を測定し, 相対細胞数増加率 (Relative Increase in Cell Counts, RICC) を以下の計算式により算出した.

$[(\text{処理群の細胞数} - \text{処理開始時の細胞数}) / (\text{陰性対照群の細胞数} - \text{処理開始時の細胞数})] \times 100$

3) ディッシュあたり500細胞分析した. 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10個とスコアした.

5) アテニューエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが, 構造異常からは除外した. 6) 各群600細胞分析した.

*: フィッシャーの直接確率法で陰性対照群と有意差あり (p<0.01, 片側).

表2 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩(SNS)でチャイニーズ・ハムスター培養細胞(ChL/IU 細胞)を6時間処理(S9 mix存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 (mg/mL)	S9 mix	処理 時間 (hrs)	相対細胞 ²⁾ 数増加率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数						その他 ⁵⁾ の異常	構造異常を有する細胞の数		倍数性 ⁶⁾ 細胞の数 (%)		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾		合計	ギャップを 含む(%)		ギャップを 除く(%)	
陰性対照 ¹⁾	0	+	6 - (18)	100	NA	150	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
						150	1	2	0	0	0	3	0	3 (2.0)	2 (1.3)	1 (0.3)		
						300	2	2	0	0	0	4	0	4 (1.3)	2 (0.7)	1 (0.2)		
SNS	0.18	+	6 - (18)	98	NA													
SNS	0.26	+	6 - (18)	89	NA													
SNS	0.40	+	6 - (18)	85	NA													
SNS	0.59	+	6 - (18)	65	NA													
SNS	0.89	+	6 - (18)	58	NA	150	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.3)	1 (0.7)	0 (0.0)	
						150	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						300	2	1	0	0	0	3	0	3 (1.0)	1 (0.3)	0 (0.0)		
SNS	1.3	+	6 - (18)	52	NA	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
						150	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.3)	1 (0.7)	0 (0.0)		
						300	1	0	0	1	0	2	0	2 (0.7)	1 (0.3)	0 (0.0)		
SNS	2.0	+	6 - (18)	31	14.0, 12.4	150	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.3)	2 (1.3)	0 (0.0)	
						150	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.7)	1 (0.7)	0 (0.0)		
						300	0	1	1	1	0	3	0	3 (1.0)	3 (1.0)	0 (0.0)		
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	52	NA	150	4	30	125	0	0	0	159	0	93 (62.0)	92 (61.3)	0 (0.0)	
						150	8	32	120	4	0	0	164	0	97 (64.7)	94 (62.7)	0 (0.0)	
						300	12	62	245	4	0	0	323	0	190 (63.3)	186 *(62.0)	0 (0.0)	

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体交換, csb: 染色体切断, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, CP: シクロフォスファミド, NA: 分析せず.

- 1) 媒体として用いた日局注射用水を10 vol%加えた. 2) コールターカウンターにより各ディッシュにおける細胞数を測定し, 相対細胞数増加率(Relative Increase in Cell Counts, RICC)を以下の計算式により算出した.

$$[(\text{処理群の細胞数} - \text{処理開始時の細胞数}) / (\text{陰性対照群の細胞数} - \text{処理開始時の細胞数})] \times 100$$
3) ディッシュあたり500細胞分析した. 4) 1細胞中に 10個以上の異常がある場合は異常の数を 10個とスコアした.
5) アテニューエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが, 構造異常からは除外した. 6) 各群600細胞分析した.
*: フィッシャーの 直接確率法で陰性対照群と有意差あり (p<0.01, 片側).

表3 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩 (SNS) でチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞) を24時間処理 (S9 mix非存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 (mg/mL)	S 9 mix	処理 時間 (hrs)	相対細胞 ²⁾ 数増加率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分 析 細胞数	構造異常の種類と数						その他 ⁵⁾ の異常 合計	構造異常を有する細胞の数		倍 数 性 ⁶⁾ 細胞の数 (%)	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾		ギャップを含 む (%)	ギャップを除 く (%)		
陰性対照 ¹⁾	0	-	24	100	NA	150	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.7)	1 (0.7)	0 (0.0)
						150	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.7)
						300	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (0.7)	1 (0.3)	2 (0.3)
SNS	0.098	-	24	113	NA	分析せず											
SNS	0.12	-	24	110	NA	分析せず											
SNS	0.14	-	24	90	NA	150	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.7)	1 (0.7)	0 (0.0)
						150	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						300	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)
SNS	0.17	-	24	71	NA	150	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.7)	1 (0.7)	0 (0.0)
						150	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						300	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)
SNS	0.20	-	24	27	8.8, 6.4	150	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.7)
						150	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
						300	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.3)
SNS	0.24	-	24	26	NA	強い細胞毒性のため分析せず											
SNS	0.29	-	24	25	NA	強い細胞毒性のため分析せず											
SNS	0.35	-	24	17	NA	強い細胞毒性のため分析せず											
MMC	0.05 µg/mL	-	24	73	NA	150	1	16	52	1	0	0	70	0	60 (40.0)	60 (40.0)	1 (0.3)
						150	7	37	48	1	0	0	93	0	63 (42.0)	60 (40.0)	0 (0.0)
						300	8	53	100	2	0	0	163	0	123 (41.0)	120 *(40.0)	1 (0.2)

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体交換, csb: 染色体切断, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体),

mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず.

1) 媒体として用いた日局注射用水を10 vol%加えた. 2) コールターカウンターにより各ディッシュにおける細胞数を測定し, 相対細胞数増加率(Relative Increase in Cell Counts, RICC)を以下の計算式により算出した.

$$[(\text{処理群の細胞数} - \text{処理開始時の細胞数}) / (\text{陰性対照群の細胞数} - \text{処理開始時の細胞数})] \times 100$$

3) ディッシュあたり500細胞分析した. 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10個とスコアした.

5) アテニューエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが, 構造異常からは除外した. 6) 各群600細胞分析した.

*: フィッシャーの直接確率法で陰性対照群と有意差あり (p<0.01, 片側).

資料 1

検査成績書

一般財団法人 食品薬品安全センター 御中


2016年10月4日
和光純薬工業株式会社

Code No.049-18345

デモールN



規格/等級	-	
Lot No.	CTM4138	
数量	500g	
検査項目	検査成績	規格値
外観	うすい黄褐色の粉末	うすい黄褐色の粉末
水溶状	澄明	試験適合(わずかな微濁以内)
乾燥減量(105°C)	2.7%	5.0%以下
pH(20g/l、25°C)	7.4	6.0~9.0
検査年月日	2014/04/24	

判定	合格	検査責任者	
----	----	-------	--

(1/1)

成績書発行番号

9681564

資料 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPACの命名法による)	ジナトリウム=5-[(6-スルフォネートナフタレン-1-イル) メチル] ナフタレン-2-スルフォネート		
別名	ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩 Sodium poly[(naphthaleneformaldehyde)sulfonate] Disodium 5-[(6-sulfonatophthalen-1-yl)methyl]naphthalene-2-sulfonate		
C A S 番号	9084-06-4		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分子量	—————		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	被験物質は重合物(高分子)であることから、和光純薬工業株式会社で販売されている製品を100%とした		
試験に供した新規化学物質のロット番号	CTM4138		
不純物の名称及び含有率	—————		
蒸気圧	—————		
対水溶解度	水に溶解 (50.0 mg/mL)*		
1-オクタノール/水分配係数	—————		
融点	—————		
沸点	—————		
常温における性状	うすい黄褐色の粉末		
安定性	推奨保管条件下で安定(購入元からのデータより)。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度*	溶媒中の安定性*
	水	50.0 mg/mLで溶解	50.0 mg/mLの濃度では、調製時および調製後3時間経過時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	DMSO	50.0 mg/mLで不溶	50.0 mg/mLの濃度では、調製時および調製後3時間経過時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	アセトン	100 mg/mLで不溶	100 mg/mLの濃度では、調製時および調製後3時間経過時に発熱、発泡および変色は認められなかった。

【備考】 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

*: 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所において確認した。