

細胞を10 vol%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業(株))で固定した後、0.1 w/v%クリスタル・バイオレット(関東化学(株))水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30 vol%エタノール、1 vol%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち細胞生存率を算出した。

その結果、いずれの処理法においても明確な細胞増殖抑制は観察されなかった(Fig. 1)。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では短時間処理法ならびに連続処理法のいずれにおいても2612 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM相当)を最高処理濃度とし、以下公比2で減じた計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

なお、陽性対照として、短時間処理法の場合、-S9処理でマイトマイシンC(MMC;協和醗酵工業(株))を0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、+S9処理でシクロホスファミド(CP;塩野義製薬(株))を12.5 $\mu\text{g/mL}$ の用量で、連続処理の場合マイトマイシンCを0.05 $\mu\text{g/mL}$ の用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、細胞増殖抑制試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、

最終濃度で0.2 $\mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド(GIBCO Life Technologies, Inc)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2 vol%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(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。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法²⁾に従って実施した。

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。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めない場合(-gap)について染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞

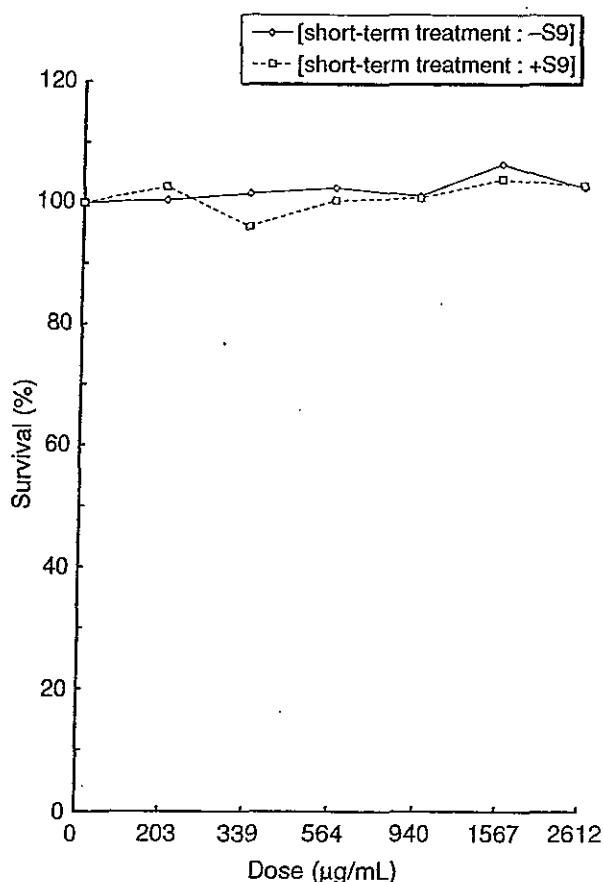


Fig. 1 Dose-survival curves of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione [short-term treatment : 6 hr]

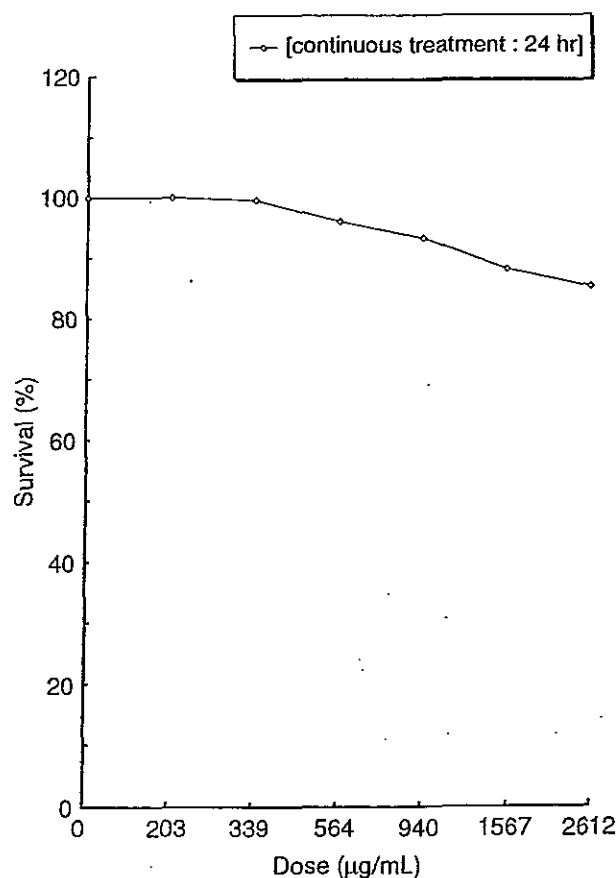


Fig. 2 Dose-survival curve of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione [continuous treatment : 24 hr]

の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が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。最終的には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。

結果および考察

短時間処理法での試験結果をTable 1に示した。1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオン処理群の場合、S9 mix非存在下ならびにS9 mix存在下とも、いずれの用量においても染色体構造異常ならびに倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、S9 mix非存在下における陽性対照物質MMCで処理した細胞、およびS9 mix存在下における陽性対照物質CPで処理した細胞ではいずれにおいても染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

連続処理法での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、染色体構造異常ならびに倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。また、被験物質処理による明確な細胞増殖抑制作用はいずれの用量においても認められなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

以上の試験結果から、本試験条件下において1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンのチャイニーズハムスター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。

なお、本被験物質の類縁体である1,3,5-trichloro-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trioneについてはAmes試験で陰性⁴⁾との報告があり、1,3,5-triethylhexahydro-1,3,5-triazine, triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trioneならびにtrichloromelamineの変異原性に関する報告はなかった。

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat. Res.*, **66**, 277 (1979).
- 2) 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.31-35.
- 3) 石館基監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, pp.19-24.
- 4) 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,” 日本化学物質安全・情報センター, 東京, 1996, pp.130-131.

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 菊池正憲, 益森勝志, 梶原玲子,
永井美穂

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)

Masanori Kikuchi, Shoji Masumori,

Reiko Kajihara, Miho Nagai

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden, Fukuda-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap(%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline ^a	0	6	100.0	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0) -	0 (0.0) -	-
Test substance	653	6	95.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	0 (0.0) -	-
	1306	6	93.8	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	2 (1.0) -	-
	2612	6	94.2	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	0 (0.0) -	-
	2612	6	94.2	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	0 (0.0) -	-
MMC ^b	0.1	6	60.1	200	11	22	87	0	0	0	100 (50.0) +	2 (1.0) -	+

Abbreviations; ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others,
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

Table 2 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap(%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline ^a	0	6	100.0	200	0	0	0	1	0	0	1 (0.5) -	2 (1.0) -	-
Test substance	653	6	98.8	200	2	0	1	0	0	0	1 (0.5) -	0 (0.0) -	-
	1306	6	74.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	0 (0.0) -	-
	2612	6	72.8	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	0 (0.0) -	-
	2612	6	72.8	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	0 (0.0) -	-
CP ^b	12.5	6	38.4	200	14	20	160	1	1	0	164 (82.0) +	0 (0.0) -	+

Abbreviations; ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others,
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (cyclophosphamide)

Table 3 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione [continuous treatment: 24 hr]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap(%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline ^a	0	24	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	0 (0.0) -	-
Test Substance	653	24	94.5	200	3	2	0	1	0	0	3 (1.5) -	1 (0.5) -	-
	1306	24	93.3	200	0	0	1	1	0	0	2 (1.0) -	0 (0.0) -	-
	2612	24	91.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5) -	0 (0.0) -	-
	2612	24	91.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5) -	0 (0.0) -	-
MMC ^b	0.05	24	63.1	200	7	17	66	1	0	0	77 (38.5) +	1 (0.5) -	+

Abbreviations; ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others,
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンのラットを用いる単回投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 2,4-Diamino-6-phenyl-s-triazine in Rats

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンを1群5匹のCrj:CD(SD系)IGSラットに、0(対照)、250、500、1000および2000 mg/kgの用量で単回経口投与し、その急性期の毒性徴候およびLD₅₀値について検討した。

死亡は、雌雄とも1000 mg/kg以上の群で投与翌日から6日目にみられた。一般状態では、投与日(1日目)から自発運動の低下が250 mg/kg以上の群の雄および500 mg/kg以上の群の雌に、よるめき歩行が500 mg/kg以上の群の雌雄に、緩徐呼吸、腹臥位、横臥位、流涙および流涎が1000 mg/kg以上の群の雄および500 mg/kg以上の群の雌にみられ、2日目からは鼻周囲の汚れ、眼周囲の汚れおよび濃黄色尿の排泄または尿による下腹部の汚れが1000 mg/kg以上の群の雄および500 mg/kg以上の群の雌にみられた。生存例では、これらの症状は2から15日目までに250 mg/kg群から順次回復した。体重では、すべての被験物質投与群の雌雄で増加抑制または減少がみられたが、250および500 mg/kg群では4日目、1000 mg/kg群では6ないし8日目、2000 mg/kg群では11ないし15日目に回復した。病理学検査において、死亡例では、前胃に肉眼的に粘膜の肥厚がみられ、組織学的には粘膜下組織の浮腫がみられた。脾臓および胸腺では肉眼的および組織学的に萎縮がみられ、胸腺では肉眼的に白色化もみられた。また、膀胱では濃緑色尿の貯留がみられた。生存例では、前胃に肉眼的に粘膜の白色点がみられ、組織学的には粘膜に扁平上皮の過形成がみられた。

LD₅₀値(95%信頼限界)は、雄で933 mg/kg(583~1494 mg/kg)、雌で1231 mg/kg(838~1808 mg/kg)であった。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジン(Lot No. 7P11, 純度98.0%, ㈱日本触媒提供, 大阪)は、水、アセトン、DMSOに微溶、メタノール、エタノールに易溶である白色粉末である。入手後の被験物質は、低温遮光下で保管し、投与終了後に提供先にて分析を行い試験期間中安定であったことを確認した。媒体は、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na, ナカライテスク㈱, Lot No. M7T4661)の0.5 w/v%水溶液を使用し、これに被験物質を2.5、5、10および20 w/v%濃度になるように

懸濁して投与液を調製した。本調製法による0.1および20 w/v%懸濁液は室温散光下で少なくとも8日間安定であることが確認された。そこで、各投与液は投与4日前に調製し、使用時まで室温保存した。なお、調製日に各投与液中の被験物質濃度を測定し、被験物質濃度はいずれも設定値の±10%以内にあることを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

5週齢のCrj:CD(SD系)IGSラット(日本チャールス・リバー(株))を雌雄各33匹購入し、6日間の検疫馴化を行ったのち、雌雄各25匹を選んで6週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は165.7~183.0 g、雌で126.4~136.6 gであった。動物は温度24±2℃、湿度55±10%、照明12時間(午前7時~午後7時)および換気回数13~15回/時に設定したバリアーシステム飼育室で床敷(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー(株))を入れたポリカーボネイト製ケージに1ケージ当たり2~3匹ずつ収容し、飼育した。飼料は、高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業(株))を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2 ppm)した水をそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量、投与方法、試験群構成および群分け

投与量は、予備試験の結果より設定した。すなわち、本被験物質の100、500、1000および2000 mg/kgをラットに単回経口投与した結果、死亡が1000 mg/kg群の雌雄各1/3例ならびに2000 mg/kg群の雄3/3例および雌2/3例にみられた。したがって、本試験の投与量は死亡が多発すると予想される2000 mg/kgを高用量とし、以下公比2で除した1000、500および250 mg/kgの計4用量をそれぞれ中間量2、中間量1および低用量とした。試験群は、上記4用量に媒体のみを投与する対照を加え計5群とした。1群当たりの動物数は雌雄各5匹とし、群分けは、投与前日の体重を基に層別連続無作為化法で行った。

投与経路は経口とし、16~17時間絶食させた動物に胃管を用いて1回強制投与した。投与容量は10 mL/kgとし、各動物の投与液量は投与日の体重を基に算出した。

4. 観察項目

1) 一般状態

観察期間は投与後14日間とし、この間に一般状態および死亡の有無を投与日(1日目)は投与後6時間まで経

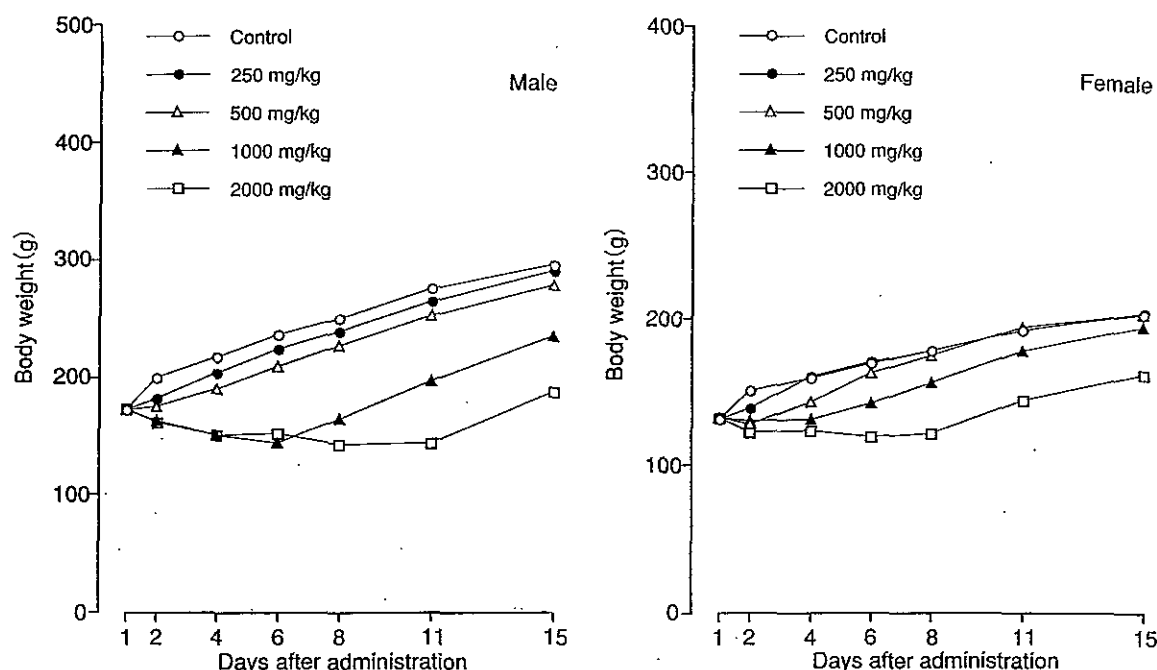


Fig. 1 Body weight changes in rats after a single oral administration of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine

時的に、2日目から14日目は毎日午前および午後の1日2回、15日目は午前中に1回観察した。

2) 体重および摂餌量

1日目の投与前、ならびに2、4、6、8、11および15日目に測定した。

3) 病理学検査

観察期間中に死亡した動物は発見後速やかに、また、観察期間終了後の生存動物はエーテル麻酔下に放血致死させたのち剖検した。肉眼的に異常がみられた器官は摘出して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定保存するとともに、代表例について病理組織学検査を行った。

5. 統計解析

LD₅₀値を投与後14日間の累積死亡動物数からVan der Waerden法により算出した。体重は、各群ごとに平均値と標準偏差を求めた。

結果

1. 死亡の発生状況およびLD₅₀値

死亡の発生状況およびLD₅₀値をTable 1に示した。

1000 mg/kg群の雄3例および雌1例ならびに2000 mg/kg群の雄3例および雌4例が2日目から6日目に死亡した。LD₅₀値(95%信頼限界)は、雄で933 mg/kg(583~1494 mg/kg)、雌で1231 mg/kg(838~1808 mg/kg)であった。

2. 一般状態

250 mg/kg群では、雄1例で投与後1時間から自発運動の低下がみられたが、2日目には回復した。雌では変

化はみられなかった。

500 mg/kg群では、投与後45分から雌雄の全例で自発運動の低下、多数例でよろめき歩行がみられた。また、雌では緩徐呼吸、腹臥位、横臥位、流涎または流涎も散見された。2日目には腹臥位、横臥位、流涎および流涎は回復したが、鼻周囲の汚れ、眼周囲の汚れまたは濃黄色尿の排泄が散見された。これらの症状は雄で2日目、雌で3日目にすべて回復した。

1000 mg/kg以上の群では、雌雄で投与後15分ないし30分から自発運動の低下および緩徐呼吸が全例にみられ、投与後30分ないし45分からはよろめき歩行、腹臥位、横臥位、流涎または流涎がほぼ全例にみられた。2日目からは、雌雄でこれらの症状に加えて鼻周囲の汚れ、眼周囲の汚れ、濃黄色尿の排泄または尿による下腹部の汚れが散見され、更に2日目から6日目には死亡例もみられた。生存例では、上述した症状は1000 mg/kg群の雄で12日目に、雌で7日目に、2000 mg/kg群の雌雄で15日目にすべて回復した。

3. 体重

250 mg/kg群では、雌雄で増加抑制がみられたが、4日目に回復した。

500 mg/kg以上の群では、雌雄で減少または増加抑制がみられたが、500 mg/kg群の雌雄では4日目に、1000 mg/kg群の雌雄では6ないし8日目に、2000 mg/kg群の雌雄では11ないし15日目に回復した。

4. 剖検

死亡例では、前胃粘膜の肥厚が2000 mg/kg群の雌1例、膀胱に濃緑色尿貯留が1000 mg/kg群の雄3例ならびに2000 mg/kg群の雄2例および雌3例、脾臓の萎縮が1000 mg/kg群の雌雄各1例ならびに2000 mg/kg群の雄2

例および雌1例にみられ、胸腺では白色化が1000 mg/kg群の雄1例および2000 mg/kg群の雌雄各1例、萎縮が2000 mg/kg群の雄1例、黒赤色点が1000 mg/kg群の雄2例にみられた。

生存例では、前胃に粘膜の白色点が2000 mg/kg群の雌1例にみられた。

5. 病理組織学検査

死亡例では、剖検に認められた変化に対応して前胃で粘膜下組織の浮腫がみられ、脾臓および胸腺では萎縮がみられた。膀胱には組織学的な変化はみられなかった。

生存例では、前胃に扁平上皮の過形成がみられた。

考察

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、Crj:CD(SD系)IGSラットを用い、2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンの経口投与による単回投与毒性試験を実施した。投与量は0(対照)、250、500、1000および2000 mg/kgとした。

死亡は、1000 mg/kg以上の群の雌雄で投与翌日(2日目)から6日目までにみられた。LD₅₀値(95%信頼限界)は、雄で933 mg/kg(583~1494 mg/kg)、雌で1231 mg/kg(838~1808 mg/kg)であった。

一般状態では、自発運動の低下が250 mg/kg以上の雄および500 mg/kg以上の群の雌にみられ、よろめき歩行が500 mg/kg以上の群の雌雄に、緩徐呼吸、流涎、流涎または濃黄色尿の排泄が1000 mg/kg以上の群の雄および500 mg/kg以上の群の雌にみられた。生存例では、これらの症状は2から15日目までに250 mg/kg群から順次回復した。なお、1000 mg/kg以上の群の雄および500 mg/kg以上の群の雌では、流涎、流涎または濃黄色尿の排泄に関連して鼻周囲、眼周囲または下腹部の汚れがみられたが、これらの変化は自発運動の低下や腹臥位または横臥位状態が持続したことによる身づくろい行動の抑制に伴った変化と考えられた。

体重では、すべての被験物質投与群の雌雄で増加抑制または減少がみられたが、250および500 mg/kg群では4日目、1000 mg/kg群では6ないし8日目、2000 mg/kg群では11ないし15日目に回復した。

病理学検査において、死亡例では、1例のみではあるが肉眼的に前胃粘膜の肥厚がみられ、組織学的には前胃粘膜下組織の浮腫がみられたことから、本被験物質は弱い刺激性を有するものと考えられた。また、脾臓および胸腺では萎縮がみられたが、これらの所見を示した例では3ないし6日目の死亡に至るまでの間、緩徐呼吸、横臥位などの症状が継続してみられ、体重も明らかに減少していることから、衰弱に伴った変化であろうと考えられた。更に、膀胱では濃緑色尿の貯留がみられたが、被験物質の代謝物の尿中排泄によるものと考えられ、膀胱に組織学的な変化はみられなかった。そのほか、死亡例では出血によると思われる胸腺の黒赤色点がみられたが、本変化は死亡例ではしばしばみられる変化であり、

死戦期に生じた変化と考えられた。一方、生存例では、2000 mg/kg群で肉眼的に前胃粘膜の白色点がみられ、組織学的には前胃に扁平上皮の過形成がみられた。本変化は前述の本被験物質の前胃粘膜に対する刺激性による障害の修復像と考えられた。

連絡先

試験責任者：緒方英博

試験担当者：木村栄介、浜村政夫、幸 邦憲、
和泉宏幸、鎌先恵美子

(株)パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所
〒869-0425 熊本県宇土市栗崎町1285
Tel 0964-23-5111 Fax 0964-23-2282

Correspondence

Authors: Hidehiro Ogata (Study director)

Eisuke Kimura, Masao Hamamura,
Kuninori Yuki, Hiroyuki Izumi,
Emiko Kuwasaki

Safety Assessment Laboratory, Panapharm
Laboratories Co., Ltd.

1285 Kurisaki-machi, Uto-shi, Kumamoto, 869-
0425, Japan.

Tel +81-964-23-5111 Fax +81-964-23-2282

Table 1 Mortality and LD₅₀ values in rats after a single oral administration of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine

Sex	Group and dose (mg/kg)	Number of animals	Number of dead animals on day															Total number of dead animals	LD ₅₀ (mg/kg) [95 % confidence limits]
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Male	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	933 ^{a)} [583~1494]
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1000	5	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	
	2000	5	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	
Female	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1231 ^{a)} [838~1808]
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1000	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	2000	5	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	

a): Van der Waerden method.

2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2,4-Diamino-6-phenyl-s-triazine by Oral Administration in Rats

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンの0(媒体対照), 4, 20および100 mg/kg/dayをCrj:CD(SD系)IGSラットの雌雄(各12匹/群)に交配前14日間, 雄ではその後交配期間を含む35日間, 雌では交配期間, 妊娠期間および分娩後3日まで通して経口投与し, 親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

一般状態では, 100 mg/kg群の雄1例が投与18日から自発運動の低下および緩徐呼吸を呈し, 投与21日に死亡した。また, 同群の雌1例が妊娠22日に死亡した。体重では, 雌雄とも20 mg/kg以上の群で増加抑制がみられ, 同群では摂餌量も減少した。

雄の血液学検査では, 100 mg/kg群で赤血球数およびヘマトクリット値の減少および網状赤血球率の増加が認められた。

雄の血液生化学検査では, 100 mg/kg群でアルブミン, A/G比, GOT, GPT, 総コレステロール, リン脂質および総ビリルビンの増加ならびにトリグリセライド, ナトリウムおよびカリウムの減少が認められた。

病理学検査では, 100 mg/kg群の雄で肝臓重量の増加がみられ, 組織学的には雌雄で小葉中心性の肝細胞の肥大が認められた。また, 死亡例では, 100 mg/kg群の雄1例で回腸の粘膜固有層から漿膜にかけて好中球性の細胞浸潤および肉芽形成がみられたほか, 腺胃のびらん, 肺の水腫, 脾臓の萎縮, 胸腺の萎縮および出血がみられ, 同群の雌1例で腺胃のびらん, 肺の水腫, 脾臓の萎縮および副腎の壊死が認められた。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては, 性周期, 黄体数, 交尾率, 着床痕数, 授(受)胎率および交尾所要日数に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時の検査では, 100 mg/kg群の2例で分娩直後の児の回集および保温の不良などが認められた。更に, 100 mg/kg群で死産率の増加およびそれに伴う出生率の減少, 雌雄新生児体重の減少が認められた。各群とも妊娠期間, 出産児数, 出産率, 新生児数および新生児の性比では被験物質投与の影響はみられず, 新生児の外表面検査においても, 異常は認められなかった。

哺育期の検査では, 20 mg/kg群の2例および100 mg/kg群の7例で児の回集, 授乳, 保温などの哺育行動の不良がみられ, これらの母動物では全児が死亡した。また, 20 mg/kg以上の群では母動物の哺育行動の不良に起因した新生児の4日の生存率の減少が認められた。更に, 100 mg/kg群では新生児の哺育4日の体重に低値が認められた。

以上のように, 反復投与毒性では20 mg/kg以上の群の雌雄で体重の増加抑制および摂餌量の減少が認められたことから, 本試験条件下における無影響量は雌雄とも4 mg/kg/dayと推察された。生殖発生毒性では, 親動物の生殖機能に被験物質投与の影響はみられなかったが, 20 mg/kg以上の群で母動物に哺育行動の不良がみられ, 100 mg/kg群で新生児の哺育4日の体重に低値が認められたことから, 本試験条件下における無影響量は親動物に対しては雄で100 mg/kg/day, 雌で4 mg/kg/day, 児動物に対しては20 mg/kg/dayと推察された。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジン(Lot No. 7P11, 純度98.0%, (株)日本触媒提供, 大阪)は, 水, アセトン, DMSOに微溶, メタノール, エタノールに易溶である白色粉末である。入手後の被験物質は, 低温遮光下で保管し, 投与終了後に供給源にて分析を行い試験期間中安定であったことを確認した。媒体は, カルボキシメチルセルロース・ナトリウム(CMC-Na, ナカライテスク(株), Lot No. M7T4661)の0.5 w/v%水溶液を使用し, これに被験物質を0.16, 0.8および4 w/v%濃度になるように懸濁して投与液を調製した。調製した投与液は冷蔵保存した。なお, 投与開始週に投与液の濃度を測定し設定値の±10%以内にあることを確認した。また, 投与開始前に本調製法による0.1%および20%溶液が冷蔵遮光下で少なくとも8日間安定であることを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のCrj:CD(SD系)IGSラット(日本チャールス・リバー(株))を雌雄各55匹購入し, 13日間の検疫馴化を行ったのち, 雌雄各48匹を選んで10週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は雄で347.7~432.2 g, 雌で220.3~255.2 gであった。動物は温度24±2℃, 湿度55±10%, 照明12時間(午前7時~午後7時)および換気回数13~15回/時に設定したバリアーシステム飼育室でステッ

レススチール製ハンガーケージに、投与期間中は1匹(雌雄別)、交配期間中は2匹(雌雄各1匹)、妊娠および哺育期間中は床敷(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株))を入れたポリカーボネイト製ケージに1匹ずつ(哺育期間中は哺育児を含む)収容し、飼育した。飼料は、高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業(株))を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2 ppm)した水をそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量、投与方法、試験群構成および群分け

投与量は、予備試験の結果より設定した。すなわち、本被験物質の30, 100および300 mg/kgを2週間反復経口投与した結果、300 mg/kg群で死亡が雄に、自発運動の低下、緩徐呼吸、体重減少、摂餌量の減少、GPT、総ビリルビンおよび尿素窒素の増加、肝臓重量の増加などが雌雄に、100 mg/kg群で体重減少、摂餌量の減少、GPT、総ビリルビンおよび尿素窒素の増加などが雄に、肝臓重量の増加が雌に認められたが、30 mg/kg群では被験物質投与による明らかな変化はみられなかった。したがって、本試験の高用量には投与期間の延長により雌雄動物に対して明確な影響が現れると推測される100 mg/kgを設定し、以下公比5で除した20および4 mg/kgをそれぞれ中間量および低用量とした。試験群は、上記3用量に媒体のみを投与する対照を加え計4群とした。1群当たりの動物数は雌雄各12匹とし、群分けは、投与前日の体重を基に層別連続無作為化法で行った。

投与経路は経口とし、雄では交配前14日間およびその後交配期間を含む35日間の合計49日間、雌では交配前14日間、交配期間(最長14日間)、妊娠期間および哺育3日までの期間、1日1回、胃管を用いて投与した。投与容量は2.5 mL/kgとし、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については最新の体重を基に、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重を基にそれぞれ算出した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について一般状態の観察および生死の確認を1日2回以上行った。

2) 体重および摂餌量

体重については、雄は投与期間を通じて週2回測定した。雌は、交配前の投与期間および交配期間中は週2回、妊娠期間中は妊娠0(妊娠確認日)、4, 7, 10, 14, 17および21日、哺育期間中は哺育0(分娩日)および4日に測定した。摂餌量については、雄は交配期間を除く投与期間中、週2回測定した。雌は、交配前の投与期間は週2回、妊娠期間中は妊娠1, 4, 7, 10, 14, 17および21日、哺育期間中は哺育1および4日に測定した。

3) 血液学検査

雄全例について、投与期間終了後に、18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で開腹し、後大静脈腹部から採血を

行った。採取した血液はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780, 東亜医用電子(株))を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)および血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、これらを基に平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

4) 血液生化学検査

血液学検査に引き続き採取した血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(7170, (株)日立製作所)により、総蛋白質(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、総ビリルビン(バナジン酸酸化法)、GOT(UVレート法)、GPT(UVレート法)、 γ -GTP(L- γ -グルタミル-3-ヒドロキシメチル-4-ニトロアニリド基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、総コレステロール(COD-HDAOS法)、トリグリセライド(GPO-HDAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(コリンオキシダーゼ・DAOS法)、グルコース(ヘキソキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(ウレアーゼ・GIDH法)、クレアチニン(Jaffe法)、無機リン(PNP-XOD法)およびカルシウム(MXB法)を測定した。また、総蛋白質およびアルブミンからA/G比を算出した。更に、電解質分析装置(PVA- α III, (株)アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)およびクロール(電量滴定法)を測定した。

5) 病理学検査

雄では投与期間終了後の採血を行ったのちに、雌では哺育4日にエーテル麻酔下で外側腸骨動脈を切断して放血致死させ、解剖して諸器官および組織の肉眼的観察を行い、雌について黄体数および着床痕数を調べた。剖検後、脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体および卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え、肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液(精巣および精巣上体はブアン液で前固定)で固定した。なお、10%中性緩衝ホルマリン溶液による固定に先だって、精巣および精巣上体はブアン液で前固定した。固定後、全群の肉眼的異常部位、対照群および100 mg/kg群の脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体および卵巣について、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。また、100 mg/kg群で変化がみられた肺、胸腺、肝臓および脾臓については20 mg/kg群まで同様に検査を行った。