

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能

雌について、投与開始日(投与1日)から15日間、毎日午前の一定時間に膣垢を採取し、性周期検査を行った。

交配は雌雄(12週齢)1対1で一晩同居させる方法で行い、翌朝膣垢中の精子または膣栓が確認された日を妊娠0日とした。また、交配は同一群内で行い、交配期間は最長2週間とした。交配期間終了後、交尾所要日数、交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕および授(受)胎率〔(受胎動物数/交尾動物数)×100〕を算出した。

2) 分娩および哺育状態ならびに新生児の観察

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩徴候を含め分娩状態および授乳、営巣などの哺育状態を観察するとともに、妊娠期間、出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕を算出した。午後0時の時点で分娩が終了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。出産児については、分娩時に出産児数、新生児数、死産児数、新生児の性別および外表異常を検査した。新生児については、出生日および哺育4日に体重を個体ごとに測定するとともに出生率〔(新生児数/着床痕数)×100〕および新生児の4日の生存率〔(哺育4日の生児数/新生児数)×100〕を算出した。哺育4日に新生児の全例をエーテル麻酔下で放血致死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った。

6. 統計解析

体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、交尾所要日数、性周期検査(発情回数、発情周期)、器官重量、妊娠期間、黄体数、着床痕数、総出産児数、新生児数および新生児の体重については各群ごとに平均値と標準偏差を求め、対照群と被験物質投与群間でまず分散の均一性をBartlett法により検定した。分散が均一な場合はDunnettの多重比較検定を用いて対照群との比較を行い、分散が均一でない場合は、Steelの多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。また交尾率、授(受)胎率、出産率および新生児の性比については χ^2 検定により、死産率、出生率および4日生存率についてはWilcoxonの順位和検定により、病理学検査についてはMann-WhitneyのU検定により対照群と各投与群間の比較を行った。いずれの場合も有意水準を1および5%とした。なお、新生児に関する測定値については一腹単位で処理した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

雄では、100 mg/kg群の1例が投与18日の投与前から自発運動の低下および緩徐呼吸を呈し、投与21日の投与前に死亡した。20 mg/kg以下の群では、死亡の発生はなく、一般状態にも変化は認められなかった。

雌では、100 mg/kg群の1例が妊娠22日の投与前に死

亡した。このほか、100 mg/kg群の別の1例では、妊娠9日から剖検日(哺育4日)まで胸部の皮下腫瘍が認められた。20 mg/kg以下の群では、死亡の発生はなく、一般状態にも変化は認められなかった。なお、20 mg/kg群の2例および100 mg/kg群の7例は、哺育3日までに全児が死亡したため、途中剖検した。

2) 体重(Fig. 1)

雄では、20 mg/kg以上の群で投与期間を通して体重の増加抑制またはその傾向がみられ、投与期間中の総体重増加量は有意な低値を示した。

雌では、100 mg/kg群で交配前の投与期間中の投与4および8日に増加抑制が認められた。また、妊娠および哺育期間中では20 mg/kg以上の群で体重の増加抑制またはその傾向が認められた。

3) 摂餌量

雄では、20 mg/kg以上の群で投与初期に減少がみられ、その後、回復したが、交配期間終了後の投与後期には再度減少した。

雌では、20 mg/kg以上の群で投与初期に減少がみられ、その後、回復したが、哺育4日には再度減少した。なお、100 mg/kg群では投与8～15日には増加が認められた。このほか用量相関のない偶発的変化として、4 mg/kg群で妊娠21日に増加が認められた。

4) 血液学検査(Table 1)

100 mg/kg群で赤血球数およびヘマトクリット値の減少ならびにMCHおよびMCHCの増加が認められた。また、100 mg/kg群では網状赤血球率も増加した。なお、20 mg/kg群においてもMCHの増加が認められた。

5) 血液生化学検査(Table 2)

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。このほか、20 mg/kg群でGPT、アルカリ性フォスファターゼおよびクレアチニンの減少がみられたが、いずれも生理学的な変動範囲内の変化であった。

6) 器官重量(Table 3)

雄では、100 mg/kg群で胸腺の絶対および相対重量の減少または減少傾向、肝臓および副腎の絶対および相対重量の増加または増加傾向が認められた。このほか雄では、100 mg/kg群で脾臓の絶対重量の減少が、また、20 mg/kg群で肺、腎臓、副腎、精巣および精巣上体の相対重量の増加、100 mg/kg群で脳、心臓、肺、腎臓、精巣および精巣上体の相対重量の増加が認められた。

雌では、100 mg/kg群で脳の相対重量の増加が認められた。

このほか、用量相関のない偶発的変化として、4 mg/kg群の雄で副腎の絶対重量の増加、20 mg/kg群の

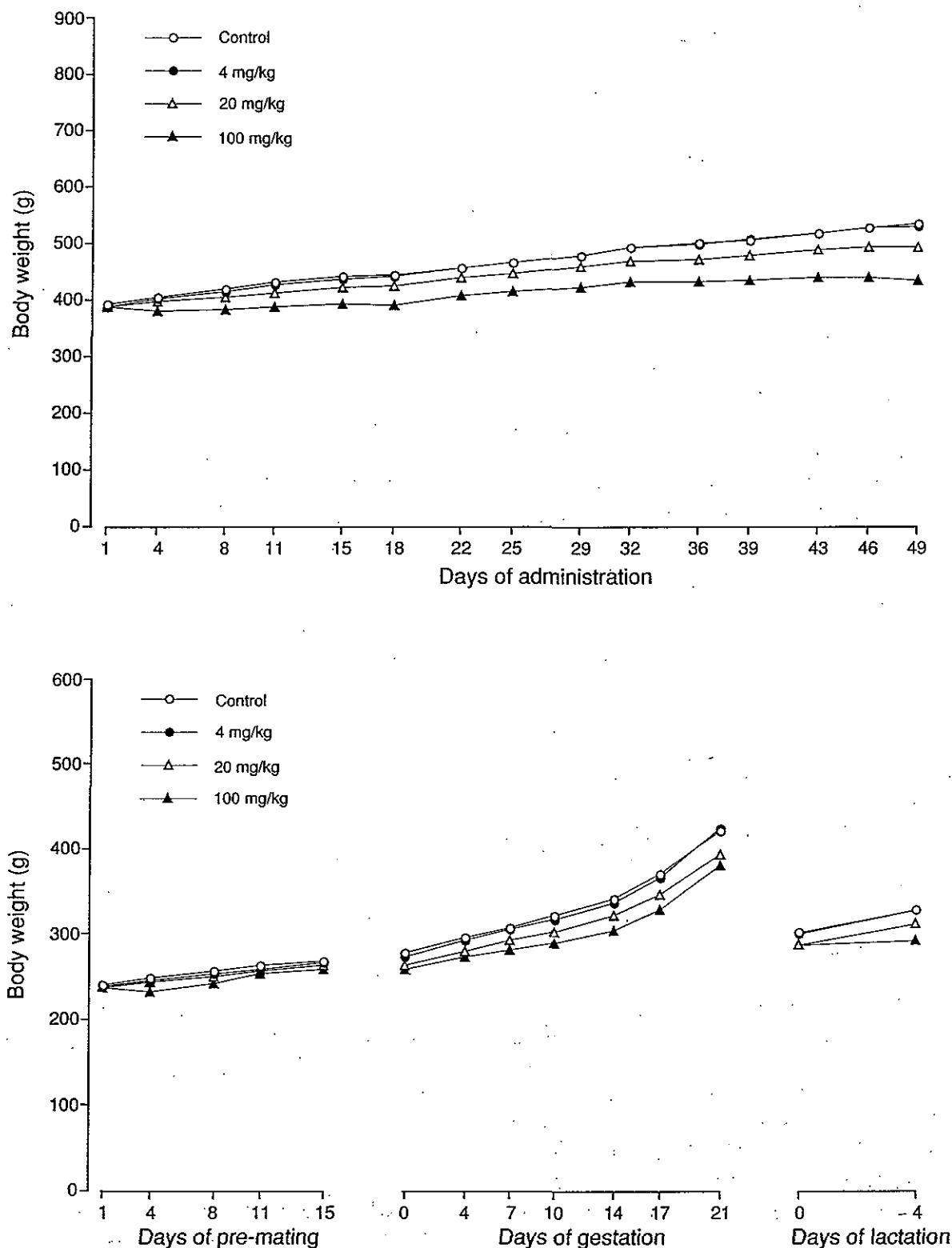


Fig. 1 Mean body weight changes of rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

雌で心臓の絶対および相対重量の減少が認められた。

7) 剖検所見

投与期間終了後の雄の剖検では、精巣および精巣上体の萎縮が対照群でそれぞれ2および1例、精巣上体の灰白色結節が対照群、4および100 mg/kg群でそれぞれ1、

1および2例認められた。

哺育4日の雌の剖検では、腎臓の灰白色斑および皮下の灰白色腫瘍が100 mg/kg群で各1例認められた。

死亡例の剖検では、100 mg/kgの雄1例で腺胃粘膜の暗赤色点、回腸および盲腸の拡張、胸腺の萎縮および暗赤色化ならびに脾臓の萎縮がみられ、100 mg/kg群の雌

1例で腺胃粘膜の暗赤色点、水様物による胃の膨満および脾臓の萎縮が認められた。

全児死亡の母動物および不妊例の剖検では、いずれも異常は認められなかった。

8) 病理組織学検査 (Table 4)

100 mg/kg 群の雄5例および雌7例で小葉中心性の肝細胞の肥大が認められた。このほか、雄では対照群、4および100 mg/kg 群のそれぞれ1、1および3例で精巣上体の精子肉芽腫、対照群の2例で精巣の萎縮がみられ、精巣の萎縮がみられたうちの1例では精巣上体管腔内の精子の減少およびcell debrisも認められた。雌では、100 mg/kg 群の1例で腎盂および乳頭の移行上皮の増殖がみられ、同群では限局性の尿細管上皮の好塩基性化および乳腺の腺癌がそれぞれ各1例認められた。更に、雌では対照群、20および100 mg/kg 群のそれぞれ1、3および1例で胸腺の萎縮が認められた。

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、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、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

1) 生殖機能 (Table 5)

性周期検査では、各群とも発情回数および発情周期において対照群との間に差は認められなかった。

生殖能力検査では、各群ともすべての例で交尾がみられたが、対照群および100 mg/kg 群の各1例が不妊であった。したがって、交尾率は各群とも100%、受(授)胎率は対照群、4、20および100 mg/kg 群でそれぞれ91.67、100、100および91.67%であり、対照群と各群との間に差は認められなかった。また、交尾所要日数においても、対照群と各群との間に差は認められなかった。

2) 分娩および哺育ならびに新生児の観察 (Table 6)

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。このほか、4 mg/kg 群で死産率の増加がみられたが、20 mg/kg 群では同様の変化は認められなかったことから、偶発的变化と考えられた。妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数、新生児数、出産率および新生児の性比では各群とも対照群との間に差は認められなかった。新生児の外表面検査においても、各群と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、20 mg/kg 以上の群では新生児の4日の生存率の減少が認められた。更に、100 mg/kg 群では雌雄とも新生児の哺育4日の体重に低値が認められた。

考察

1. 反復投与毒性試験

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。更に、20 mg/kg 以上の群では雌雄とも体重の増加抑制および摂餌量の減少が認められた。

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がみられ、MCHおよびMCHCの増加も認められた。しかし、ヘモグロビン量に変化はなく、病理組織学検査では脾臓で赤血球の破壊像であるヘモジデリンの沈着等は認められなかった。赤血球数およびヘマトクリット値は摂餌量の制限により減少することも報告されていることから、100 mg/kg 群でみられた赤血球数およびヘマトクリット値の減少は、同群でみられた摂餌量の減少に起因した変化と考えられた。また、100 mg/kg 群では赤血球の減少に伴う反応性の変化として、網状赤血球率の増加が認められた。なお、20 mg/kg 群においてもMCH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、総ビリルビン、総コレステロールおよびリン脂質の増加ならびにトリグリセライドの減少がみられたことから、肝臓への影響が示唆された。このほか、100 mg/kg 群でナトリウムおよびカリウムの減少がみられたが、電解質の変動と関連が深い腎臓では、病理組織学的にも異常はみられず、その発生機序については不明であった。

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。一般に肝臓の代謝酵素の誘導により小葉中心性の肝細胞が肥大することが知られている²⁾ことから、薬物代謝酵素が誘導された可能性が考えられた。なお、前述の如く血液生化学検査では肝胆道疾患の指標とされるGOTおよびGPTの上昇がみられたが、肝細胞、胆管上皮の壊死等の傷害性変化は認められなかった。100 mg/kg 群の雄では副腎重量の増加および胸腺重量の減少がみられたが、いずれも対応する組織学的変化はなく、これらの変化はストレスが負荷された動物で観察されるものであり、100 mg/kg 群の雄は投与期間を通して体重増加が抑制されていたことから、被験物質投与に関連したストレスに起因したものと考えられた。このほか、20 mg/kg 群の雄で肺、腎臓、副腎、精巣および精巣上体の相対重量の増加、100 mg/kg 群の雄で脳、心臓、肺、腎臓、精巣および精巣上体の相対重量の増加ならびに脾臓の絶対重量の減少、100 mg/kg 群の雌で脳の相対重量の増加がみられたが、いずれも絶対重量および相対重量がともに変動したものはなく、病理組織学検査においても被験物質投与の影響はみられなかったこと、20 mg/kg 以上の群では体重の増加抑制がみられ、最終体重が低値を示していることから、これらの変化は体重の低値に起因したものと考えられた。上述のほか病理組織学検査では、100 mg/kg 群の雌で腎盂および乳頭の移行

上皮の増殖，限局性の尿細管上皮の好塩基性化，乳腺の腺癌がみられたが，いずれも発生頻度は低く，自然発生することが知られている³⁻⁵⁾ことから，被験物質投与との関連性はないものと考えられた。また，4および100 mg/kg群の雄で精巣上体の精子肉芽腫，20および100 mg/kg群の雌で胸腺の萎縮がみられたが，同様の変化は対照群においてもみられており，その変化の程度も同等であったことから，被験物質投与との関連性はないものと考えられた。

死亡した100 mg/kg群の雄1例では，回腸の好中球性の細胞浸潤および肉芽の形成もみられたが，その発生原因については不明であった。このほか，肺の水腫，腺胃のびらん，脾臓の萎縮，胸腺の萎縮および出血もみられたが，本例では死亡までに自発運動の低下および緩徐呼吸が継続して認められていることから，衰弱に伴う変化と考えられた。また，死亡した100 mg/kg群の雌1例では，腺胃のびらん，肺の水腫，脾臓の萎縮および副腎の壊死がみられたが，本例の死亡は分娩直前であったことから，周産期の生理的な負荷に被験物質投与の影響が加わったことにより生じた衰弱性の変化と考えられた。

以上のように，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反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも4 mg/kg/dayと推察された。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては，性周期，交尾率，授(受)胎率，交尾所要日数，黄体数および着床痕数に被験物質投与の影響は認められなかった。また，妊娠期間，出産児数および出産率にも被験物質投与の影響は認められなかった。一方，分娩時の観察では，100 mg/kg群の2例で分娩直後の哺育行動の不良が認められた。また，哺育期間の観察においては，全児死亡の母動物が20 mg/kg群で2例，100 mg/kg群で7例みられ，これらの例ではいずれも児の回集，授乳，保温などの哺育行動の不良が認められた。これらのことから，本被験物質の周産期投与による分娩および哺育行動への影響が示唆された。

更に，100 mg/kg群では死産率の増加およびそれに伴う出生率の減少がみられたが，この変化については，前述した母動物の分娩直後の哺育行動の不良に起因したものと考えられた。また，20 mg/kg以上の群では，新生児の4日の生存率の減少がみられたが，この変化は，母動物に哺育行動の不良がみられ全児が死亡したことに起因したものであり，直接的な原因は母動物の哺育行動の不良と考えられた。また，新生児の体重では，100 mg/kg群で雌雄とも出生時の体重が低く，哺育4日においても増加抑制がみられたことから，胎生期および哺育期の被験物質投与による胎児および出生児の発育に及ぼす影響が示唆された。

以上のように，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生殖発生毒性に関す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。

文献

- 1) J. C. Edozien, and B. R. Switzer, *J. Nutr.*, 107, 1016(1977).
- 2) J. R. Glaistar, "Principles of Toxicological Pathology," eds. by Taylor & Francis, London and Philadelphia, 1986, pp. 83-85.
- 3) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," ed. by P. Greaves, Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 548-549.
- 4) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," ed. by P. Greaves, Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 61-62.
- 5) 渡辺満利, "毒性試験講座5. 毒性病理学," 前川昭彦, 林裕造編, 地人書館, 東京, 1992, p. 279.

連絡先

試験責任者：和泉宏幸

試験担当者：木村栄介, 幸 邦憲, 千々波智子,
鎌先恵美子, 一鬼 勉

(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: Hiroyuki Izumi (Study director)

Eisuke Kimura, Kuninori Yuki,

Tomoko Chijiwa, Emiko Kuwasaki,
Tsutomu Ichiki

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 Hematological findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose (mg/kg)	0	4	20	100
No. of animals	12	12	12	12
Leukocyte ($10^3/\mu\text{L}$)	79 $\pm$ 13	80 $\pm$ 16	74 $\pm$ 15	71 $\pm$ 16
Erythrocyte ($10^6/\mu\text{L}$)	886 $\pm$ 33	882 $\pm$ 46	854 $\pm$ 38	816 $\pm$ 62**
Hemoglobin (g/dL)	15.0 $\pm$ 0.7	15.2 $\pm$ 0.6	15.0 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.9
Hematocrit (%)	47.8 $\pm$ 1.9	48.2 $\pm$ 2.3	47.4 $\pm$ 2	44.8 $\pm$ 3.2*
Platelet ($10^4/\text{mL}$)	99.6 $\pm$ 8	102.7 $\pm$ 12.3	97.6 $\pm$ 9.9	94.3 $\pm$ 8.8
MCV (fL)	54 $\pm$ 2	55 $\pm$ 1	56 $\pm$ 1	55 $\pm$ 2
MCH (pg)	16.9 $\pm$ 0.7	17.2 $\pm$ 0.5	17.6 $\pm$ 0.5*	17.9 $\pm$ 0.6**
MCHC (%)	31.4 $\pm$ 0.4	31.5 $\pm$ 0.5	31.6 $\pm$ 0.6	32.5 $\pm$ 0.5**
Reticulocyte (%)	32 $\pm$ 4	31 $\pm$ 3	33 $\pm$ 3	43 $\pm$ 9**
Prothrombin time (sec)	14.3 $\pm$ 2.0	13.8 $\pm$ 2.1	13.0 $\pm$ 1.4	12.8 $\pm$ 0.9
APTT (sec)	24.8 $\pm$ 1.8	23.8 $\pm$ 4.1	24.0 $\pm$ 3.5	23.0 $\pm$ 2.8
Fibrinogen (mg/dL)	220.8 $\pm$ 13.2	223.5 $\pm$ 20.7	214.5 $\pm$ 16.1	204.9 $\pm$ 15

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (significantly different from control).
Values are mean $\pm$ S.D.

Table 2 Blood chemical findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose (mg/kg)	0	4	20	100
No. of animals	12	12	12	12
T.protein (g/dL)	5.5 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.3
Albumin (g/dL)	3.6 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.2**
A/G ratio	1.87 $\pm$ 0.22	2.00 $\pm$ 0.2	2.06 $\pm$ 0.19	2.61 $\pm$ 0.52**
GOT (IU/L)	105 $\pm$ 18	98 $\pm$ 20	94 $\pm$ 13	139 $\pm$ 39**
GPT (IU/L)	29 $\pm$ 7	24 $\pm$ 5	23 $\pm$ 3*	55 $\pm$ 47**
γ -GTP (IU/L)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
ALP (IU/L)	184 $\pm$ 10	178 $\pm$ 34	169 $\pm$ 22**	160 $\pm$ 29
T.cholesterol (mg/dL)	47 $\pm$ 10	51 $\pm$ 13	54 $\pm$ 9	61 $\pm$ 10*
Triglycerides (mg/dL)	30 $\pm$ 11	26 $\pm$ 14	28 $\pm$ 9	13 $\pm$ 5*
Phospholipids (mg/dL)	87 $\pm$ 14	91 $\pm$ 19	91 $\pm$ 13	103 $\pm$ 13*
T.bilirubin (mg/dL)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1**
Glucose (mg/dL)	102 $\pm$ 14	105 $\pm$ 19	104 $\pm$ 13	100 $\pm$ 11
BUN (mg/dL)	17.6 $\pm$ 4	16.7 $\pm$ 1.6	16.1 $\pm$ 2.2	18.6 $\pm$ 2.6
Creatinine (mg/dL)	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1*	0.4 $\pm$ 0.1
IP (mg/dL)	6.4 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.6	6.8 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.5
Ca (mg/dL)	9.9 $\pm$ 0.2	10.0 $\pm$ 0.3	10.0 $\pm$ 0.4	9.9 $\pm$ 0.3
Na (mEq/L)	146.8 $\pm$ 0.9	147.1 $\pm$ 0.8	146.5 $\pm$ 0.8	145.5 $\pm$ 1.6*
K (mEq/L)	4.30 $\pm$ 0.18	4.32 $\pm$ 0.18	4.3 $\pm$ 0.21	3.97 $\pm$ 0.22**
Cl (mEq/L)	106.4 $\pm$ 1.1	105.9 $\pm$ 1.4	106.2 $\pm$ 1.9	105.4 $\pm$ 1.7

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (significantly different from control).
Values are mean $\pm$ S.D.

Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	4	20	100
Male				
No. of animals	12	12	12	11
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	501.5 ± 38.4	498.5 ± 47.1	462.1 ± 29.1*	400.3 ± 35.7**
Brain (g)	2.18 ± 0.08	2.24 ± 0.1	2.17 ± 0.07	2.09 ± 0.11
Heart (g)	1.62 ± 0.19	1.62 ± 0.16	1.61 ± 0.12	1.54 ± 0.16
Lungs (g)	1.48 ± 0.10	1.55 ± 0.16	1.51 ± 0.16	1.41 ± 0.13
Thymus (g)	0.31 ± 0.10	0.30 ± 0.06	0.31 ± 0.09	0.20 ± 0.09**
Liver (g)	13.02 ± 1.76	12.31 ± 1.74	12.00 ± 1.16	13.36 ± 1.52
Spleen (g)	0.88 ± 0.13	0.82 ± 0.13	0.79 ± 0.11	0.70 ± 0.08**
Kidneys (g)	3.18 ± 0.31	3.14 ± 0.32	3.24 ± 0.41	3.07 ± 0.28
Adrenals (mg)	58.8 ± 7.9	68.2 ± 12.3*	64.8 ± 8.1	74.9 ± 7.9**
Testes (g)	3.17 ± 0.64	3.4 ± 0.23	3.51 ± 0.32	3.58 ± 0.36
Epididymides (g)	1.29 ± 0.18	1.35 ± 0.13	1.38 ± 0.09	1.25 ± 0.18
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.44 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.47 ± 0.02	0.53 ± 0.05**
Heart (g/100g B.W.)	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.39 ± 0.04**
Lungs (g/100g B.W.)	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.02*	0.35 ± 0.03**
Thymus (g/100g B.W.)	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.02
Liver (g/100g B.W.)	2.58 ± 0.17	2.46 ± 0.14	2.60 ± 0.17	3.33 ± 0.19**
Spleen (g/100g B.W.)	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02
Kidneys (g/100g B.W.)	0.64 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.70 ± 0.06**	0.77 ± 0.04**
Adrenals (mg/100g B.W.)	11.8 ± 2.0	13.7 ± 2.2	14.1 ± 1.9*	18.9 ± 2.8**
Testes (g/100g B.W.)	0.63 ± 0.13	0.69 ± 0.08	0.76 ± 0.08**	0.90 ± 0.11**
Epididymides (g/100g B.W.)	0.26 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.30 ± 0.02**	0.31 ± 0.04**
Female				
No. of animals	11	12	10	3
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	328.6 ± 22.8	328.6 ± 19.6	312.6 ± 13.5	291.7 ± 5.6*
Brain (g)	2.11 ± 0.08	2.12 ± 0.08	2.14 ± 0.14	2.10 ± 0.15
Heart (g)	1.06 ± 0.05	1.05 ± 0.09	0.94 ± 0.11**	0.97 ± 0.04
Lungs (g)	1.17 ± 0.05	1.17 ± 0.08	1.14 ± 0.08	1.09 ± 0.06
Thymus (g)	0.19 ± 0.09	0.2 ± 0.07	0.20 ± 0.11	0.26 ± 0.15
Liver (g)	13.11 ± 1.31	13.26 ± 1.41	12.05 ± 0.90	12.07 ± 1.62
Spleen (g)	0.68 ± 0.09	0.72 ± 0.12	0.61 ± 0.08	0.60 ± 0.06
Kidneys (g)	2.07 ± 0.20	2.06 ± 0.14	2.06 ± 0.14	2.12 ± 0.32
Adrenals (mg)	75.8 ± 9.0	77.2 ± 11.3	77.3 ± 4.3	73.7 ± 6.3
Ovaries (mg)	101.7 ± 13.2	106.0 ± 14.9	102.2 ± 16.6	109.8 ± 9.8
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.72 ± 0.06*
Heart (g/100g B.W.)	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.03*	0.33 ± 0.01
Lungs (g/100g B.W.)	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.03
Thymus (g/100g B.W.)	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.05
Liver (g/100g B.W.)	3.99 ± 0.35	4.03 ± 0.31	3.86 ± 0.32	4.14 ± 0.50
Spleen (g/100g B.W.)	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02
Kidneys (g/100g B.W.)	0.63 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.66 ± 0.04	0.73 ± 0.12
Adrenals (mg/100g B.W.)	23.1 ± 3.0	23.5 ± 2.9	24.8 ± 1.7	25.3 ± 2.7
Ovaries (mg/100g B.W.)	31.1 ± 4.7	32.3 ± 4.3	32.7 ± 4.4	37.7 ± 4.1

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (significantly different from control).
Values are mean ± S.D.

Table 4 Histopathological findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Dose (mg/kg)	0				4				20			
		Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice			
		12				12				12			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Liver		(12)				(0)				(12)			
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		12	0	0	0					12	0	0	0
Stomach		(0)				(0)				(0)			
Erosion, glandular stomach													
Small intestine		(0)				(0)				(0)			
Cellular infiltration, neutrophil, ileum													
Granulation, ileum													
Respiratory system													
Lung		(12)				(0)				(12)			
Edema		12	0	0	0					12	0	0	0
Hematopoietic system													
Thymus		(12)				(0)				(12)			
Atrophy		12	0	0	0					12	0	0	0
Hemorrhage		12	0	0	0					12	0	0	0
Spleen		(12)				(0)				(12)			
Atrophy		12	0	0	0					12	0	0	0
Genital system													
Testis		(12)				(0)				(0)			
Atrophy		10	2	0	0								
Epididymis		(12)				(1)				(0)			
Granuloma, spermatic		11	1	0	0	0	1	0	0				
Decrease, sperm		11	0	0	1	1	0	0	0				
Cell debris lumen		11	1	0	0	1	0	0	0				

*: $P < 0.05$ (significantly different from control).

Grade sign; -: none, +: mild, ++: moderate, +++: marked.

There are no remarkable changes in the heart, kidney, adrenal and brain of all animals in control and 100 mg/kg groups, and large intestine of one animal in 100 mg/kg group.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 4 (continued)

Organs and findings	Dose (mg/kg)	100											
		Terminal sacrifice				dead				Total			
		11				1				12			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Liver		(11)				(1)				(12)			
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		6	5	0	0	1	0	0	0	7	5	0	0*
Stomach		(0)				(1)				(1)			
Erosion, glandular stomach						0	1	0	0	0	1	0	0
Small intestine		(0)				(1)				(1)			
Cellular infiltration, neutrophil, ileum						0	1	0	0	0	1	0	0
Granulation, ileum						0	1	0	0	0	1	0	0
Respiratory system													
Lung		(11)				(1)				(12)			
Edema		11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Hematopoietic system		(11)				(1)				(12)			
Thymus		11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Atrophy		11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Hemorrhage													
Spleen		(11)				(1)				(12)			
Atrophy		11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Genital system													
Testis		(11)				(1)				(12)			
Atrophy		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Epididymis		(11)				(1)				(12)			
Granuloma, spermatic		8	3	0	0	1	0	0	0	9	3	0	0
Decrease, sperm		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Cell debris lumen		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0

*: $P < 0.05$ (significantly different from control).

Grade sign; -: none, +: mild, ++: moderate, +++: marked.

There are no remarkable changes in the heart, kidney, adrenal and brain of all animals in control and 100 mg/kg groups, and large intestine of one animal in 100 mg/kg group.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 5 Reproductive performance of rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	4	20	100
No. of females examined	12	12	12	12
Count of estrus ^{a)}	3.83 ± 0.39	3.67 ± 0.49	3.58 ± 0.51	3.17 ± 1.19
Estrous cycle ^{b)}	4.08 ± 0.29	4.19 ± 0.58	4.29 ± 0.40	3.98 ± 0.39
No. of mated				
Male	12	12	12	12
Female	12	12	12	12
No. of copulated ^{c)}				
Male	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
Female	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
No. of impregnated ^{d)}	11 (91.67)	12 (100)	12 (100)	11 (91.67)
No. of pregnant ^{d)}	11 (91.67)	12 (100)	12 (100)	11 (91.67)
Duration of mating ^{b)}	3.67 ± 3.08	2.67 ± 1.23	1.83 ± 1.11	3.25 ± 1.22

Not significantly different from control.

a) Values are mean ± S.D.

b) Values are mean ± S.D. (day).

c) Values in parentheses represent percentages to the number of mated.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of copulated.

Table 6 Findings of delivery of F₀ dams treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	4	20	100
No. of dams	11	12	12	10
Gestational days ^{a)}	22.27 ± 0.47	22.50 ± 0.52	22.08 ± 0.29	22.3 ± 0.48
No. of corpora lutea ^{b)}	190 (17.27 ± 2.76)	199 (16.58 ± 1.16)	195 (16.25 ± 2.01)	170 (17.00 ± 2.21)
No. of implantations ^{b)}	179 (16.27 ± 2.76)	191 (15.92 ± 1.83)	183 (15.25 ± 2.96)	164 (16.40 ± 2.37)
No. of litter ^{b)}	170 (15.45 ± 3.14)	177 (14.45 ± 1.66)	165 (13.75 ± 3.70)	152 (15.20 ± 2.25)
Gestation index ^{c)}	100	100	100	100
No. of stillborns ^{d)}				
Male	0	1	2	23
Female	0	3	2	20
Total	0	4 (2.26)*	4 (2.42)	43 (28.29)**
No. of live newborns ^{b)}	170 (15.45 ± 3.14)	173 (14.42 ± 1.62)	161 (13.42 ± 3.45)	109 (10.90 ± 5.07)
Birth index ^{e)}	94.97	90.58	87.98	66.46**
Sex ratio of live newborns ^{f)}	0.87 (79/91)	0.90 (82/91)	0.96 (79/82)	0.98 (54/55)
Body weight of live newborns (g) ^{g)}				
Male On day 0	6.3 ± 0.7	6.8 ± 0.5	6.2 ± 0.6	5.1 ± 0.6**
4	9.6 ± 1.5	10.6 ± 0.9	9.9 ± 1.5	6.8 ± 1.2**
Female On day 0	6.0 ± 0.6	6.5 ± 0.4	5.8 ± 0.6	4.7 ± 0.6**
4	9.2 ± 1.6	10.1 ± 0.8	9.3 ± 1.0	5.8 ± 1.3**
Viability index ^{h)}	99.41	99.42	75.78*	11.93**
No. of external anomalies	0	0	0	0

*: P < 0.05, **: P < 0.01 (significantly different from control).

a) Values are mean ± S.D. (day).

b) Values in parentheses represent mean ± S.D.

c) Gestation index = (Number of dams with live newborns/Number of pregnant females) × 100.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of litter.

e) Birth index = (Number of live newborns/Number of implantations) × 100.

f) Values in parentheses represent the number of male/female live newborns.

g) Values are mean ± S.D.

h) Viability index = (Number of live newborns on day 4 after birth/Number of live newborns) × 100.

2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2,4-Diamino-6-phenyl-s-triazine on Bacteria

要約

2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用い、用量設定試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株についてそれぞれ156～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下では2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537¹⁾ ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成10年1月21日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩、0.2%クエン酸・1水塩、1%リン酸二カリウム・無水塩、0.192%リン酸一アンモニウム、0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2%のグルコース

(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社:No.1)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5%を含む0.6% Bacto-agar(DIFCO社)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバッフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2: OXOID社)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪:100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成 分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol
精製水	残 量

5. 被験物質

被験物質の2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジン(ロット番号:7P11)は純度98.0%以上(不純物としてメラミン0.1～0.2%, ジシアンアミド0.04%およびベンゾアミド0.01%を含む)の固体である。(株)日本触媒(大阪)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元におい

で残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

DMSO(MERCK社)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。

従って、本試験においてはS9 mix無添加群ならびに添加群の各試験菌株について5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF-2:和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム(NaN_3 :和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法¹⁾の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μL 、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μL 、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500 μL 添加し、さらに試験菌液100 μL を加え、37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ45℃に保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また、独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の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

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれにおいても、2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジン処理による生育阻害作用は観察されなかった。また、復帰変異コロニー数については、S9 mix無添加群、S9 mix添加群とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお、コロニー数計測時、S9 mix添加群の2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量において、粉末状の析出物が観察された。以上の試験結果から、本試験条件下において、2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

なお、類縁化合物である2,4-ジアミノ-6-メチル-s-トリアジンの変異原性については、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた復帰変異試験で陰性²⁾と報告されている。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3(1976).
- 3) 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, 東京, 1991, p. 177.

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 植田ゆみ子, 板倉真由実

(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字荒浜
582-2

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

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Yumiko Ueta, Mayumi Itakura

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

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan.

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