

Table 1 Results of the bacterial reversion test of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine (1st trial)
[direct method: -S9 mix]

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
0	115	124	115	12	15	15	20	15	16	24	22	22	8	7	6
	[118 $\pm$ 5]			[14 $\pm$ 2]			[17 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 1]			[7 $\pm$ 1]		
156	119	127	114	15	13	13	16	13	18	21	23	18	10	8	7
	[120 $\pm$ 7]			[14 $\pm$ 1]			[16 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 2]		
313	116	114	113	9	9	9	12	10	13	25	22	24	7	10	10
	[114 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 0]			[12 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 2]		
625	101	105	112	8	8	11	17	20	21	18	22	24	6	6	5
	[106 $\pm$ 6]			[9 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]		
1250	118	109	109	9	9	13	14	16	15	20	23	22	6	7	7
	[112 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 2]			[15 $\pm$ 1]			[22 $\pm$ 2]			[7 $\pm$ 1]		
2500	114	108	100	9	7	9	15	14	16	22	15	16	7	8	5
	[107 $\pm$ 7]			[8 $\pm$ 1]			[15 $\pm$ 1]			[18 $\pm$ 4]			[7 $\pm$ 2]		
5000	93	105	97	7	5	13	9	14	16	16	20	16	5	7	8
	[98 $\pm$ 6]			[8 $\pm$ 4]			[13 $\pm$ 4]			[17 $\pm$ 2]			[7 $\pm$ 2]		
Positive control	568	565	572 ^{a)}	541	554	549 ^{b)}	130	122	120 ^{b)}	596	622	625 ^{c)}	419	402	424 ^{d)}
	[568 $\pm$ 4]			[548 $\pm$ 7]			[124 $\pm$ 5]			[614 $\pm$ 16]			[415 $\pm$ 12]		

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 2 Results of the bacterial reversion test of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine (1st trial)
[activation method: +S9 mix]

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
0	135	124	130	12	8	10	15	14	18	28	31	27	17	17	18
	[130 $\pm$ 6]			[10 $\pm$ 2]			[16 $\pm$ 2]			[29 $\pm$ 2]			[17 $\pm$ 1]		
156	132	125	129	12	14	10	20	19	18	32	28	25	20	15	19
	[129 $\pm$ 4]			[12 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 1]			[28 $\pm$ 4]			[18 $\pm$ 3]		
313	137	136	147	7	11	9	22	22	22	28	27	26	14	16	14
	[140 $\pm$ 6]			[9 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 0]			[27 $\pm$ 1]			[15 $\pm$ 1]		
625	132	135	128	8	9	10	18	17	16	33	36	35	13	13	15
	[132 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 1]			[17 $\pm$ 1]			[35 $\pm$ 2]			[14 $\pm$ 1]		
1250	127	121	129	14	12	15	16	19	17	26	27	31	17	16	19
	[126 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 2]			[17 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 3]			[17 $\pm$ 2]		
2500+	130	122	122	9	11	13	16	25	17	35	8	30	12	8	11
	[125 $\pm$ 5]			[11 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 5]			[31 $\pm$ 4]			[10 $\pm$ 2]		
5000+	124	123	126	5	9	10	11	10	9	32	31	28	12	14	12
	[124 $\pm$ 2]			[8 $\pm$ 3]			[10 $\pm$ 1]			[30 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 1]		
Positive control	688	681	706 ^{a)}	280	302	299 ^{b)}	660	642	673 ^{c)}	204	204	213 ^{d)}	135	150	147 ^{b)}
	[692 $\pm$ 13]			[294 $\pm$ 12]			[658 $\pm$ 16]			[207 $\pm$ 5]			[144 $\pm$ 8]		

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Results of the bacterial reversion test of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine (2nd trial)
[direct method:-S9 mix]

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
0	103	106	104	13	13	14	29	23	25	23	23	19	8	11	11
	[104 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 2]		
156	119	118	123	17	15	14	17	17	16	30	25	26	8	14	10
	[120 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 2]			[17 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 3]		
313	125	112	123	10	15	12	15	20	20	30	28	29	13	15	10
	[120 $\pm$ 7]			[12 $\pm$ 3]			[18 $\pm$ 3]			[29 $\pm$ 1]			[13 $\pm$ 3]		
625	113	103	105	10	9	14	21	20	23	29	23	25	7	8	8
	[107 $\pm$ 5]			[11 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 1]		
1250	120	103	106	13	11	14	14	18	15	27	24	27	13	11	10
	[110 $\pm$ 9]			[13 $\pm$ 2]			[16 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 2]			[11 $\pm$ 2]		
2500	104	107	106	14	18	13	8	13	12	28	29	26	12	14	11
	[106 $\pm$ 2]			[15 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 3]			[28 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 2]		
5000	101	85	93	9	12	11	8	12	9	21	22	24	11	8	12
	[93 $\pm$ 8]			[11 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 2]		
Positive control	519	537	499 ^{d)}	455	477	479 ^{b)}	147	139	149 ^{a)}	580	580	562 ^{c)}	501	522	495 ^{d)}
	[518 $\pm$ 19]			[470 $\pm$ 13]			[145 $\pm$ 5]			[574 $\pm$ 10]			[506 $\pm$ 14]		

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of the bacterial reversion test of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine (2nd trial)
[activation method: +S9 mix]

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
0	141	140	135	14	16	12	22	21	18	33	30	29	19	21	19
	[139 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 2]			[20 $\pm$ 2]			[31 $\pm$ 2]			[20 $\pm$ 1]		
156	140	141	141	13	13	12	28	25	23	40	34	38	28	22	25
	[141 $\pm$ 1]			[13 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 3]			[37 $\pm$ 3]			[25 $\pm$ 3]		
313	142	149	143	20	14	19	28	27	27	36	37	33	18	15	17
	[145 $\pm$ 4]			[18 $\pm$ 3]			[27 $\pm$ 1]			[35 $\pm$ 2]			[17 $\pm$ 2]		
625	169	164	156	12	7	8	22	22	23	31	31	33	16	13	12
	[163 $\pm$ 7]			[9 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 1]			[32 $\pm$ 1]			[14 $\pm$ 2]		
1250	139	144	143	18	17	15	19	18	17	31	27	28	17	16	17
	[142 $\pm$ 3]			[17 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 1]			[29 $\pm$ 2]			[17 $\pm$ 1]		
2500 +	124	124	132	14	17	13	12	11	12	30	26	31	15	16	17
	[127 $\pm$ 5]			[15 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 1]			[29 $\pm$ 3]			[16 $\pm$ 1]		
5000 +	163	165	160	14	11	13	14	14	14	26	26	29	11	14	13
	[163 $\pm$ 3]			[13 $\pm$ 2]			[14 $\pm$ 0]			[27 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 2]		
Positive control	832	805	802 ^{a)}	343	357	334 ^{b)}	763	726	745 ^{c)}	266	284	282 ^{d)}	143	152	147 ^{a)}
	[813 $\pm$ 17]			[345 $\pm$ 12]			[745 $\pm$ 19]			[277 $\pm$ 10]			[147 $\pm$ 5]		

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジン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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 2,4-Diamino-6-phenyl-s-triazine on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンが培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、連続処理法の24時間処理で1600 $\mu\text{g/mL}$ 、48時間処理で800 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の-S9処理で5000 $\mu\text{g/mL}$ および同+S9処理では625 $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とした。連続処理法の24時間処理は、最高処理濃度の1/4、1/8および1/16を、48時間処理では最高処理濃度の1/2、1/4、1/8をそれぞれ高濃度、中濃度および低濃度とした。また、短時間処理法の-S9処理で最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度および低濃度とし、+S9処理では最高処理濃度の1/8、1/16、1/32をそれぞれ高濃度、中濃度および低濃度として設定した。連続処理法では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理法ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

その結果、連続処理法の48時間処理ならびに短時間処理法の+S9処理で、染色体構造異常の誘発作用が認められた。

また、連続処理法の高用量群では分裂機構障害を示唆するC-分裂(C-mitosis)の出現が多数認められたことから、連続処理法の48時間処理で最高処理濃度を1600 $\mu\text{g/mL}$ とした確認試験を実施した。最高処理濃度および最高処理濃度の1/2、1/4、1/8を設定した。

その結果、倍数性細胞の誘発作用が認められた。

さらに、連続処理法の24時間処理では染色体構造異常の出現頻度が10%未満の増加を示し、短時間処理法の+S9処理では明確な用量依存性が認められなかったことから、最高処理濃度をそれぞれ900 $\mu\text{g/mL}$ および160 $\mu\text{g/mL}$ とした追加試験を実施した。連続処理法の24時間処理で最高処理濃度より公差100で6段階減じた7用量、短時間処理法の+S9処理では最高処理濃度より公差20で5段階減じた6用量を設定した。

その結果、いずれの処理群においても試験用量に依存した染色体構造異常の誘発作用が認められた。

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、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を選択した。昭和59年11月15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、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞液を融解し数回継代したものを使用した。なお、本染色体異常試験では継代数32、確認試験では同48、追加試験では同29の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(LIFE TECHNOLOGIES社)に、メンブランフィルター(0.45 μm :CORNING社)を用いて加圧濾過除菌した非働化(56℃, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4℃)に保存した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機㈱)を用い、CO₂濃度5%, 37℃の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン㈱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。また、S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従って調製された。

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て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. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

12ウェルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

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、連続処理法において顕著な細胞増殖抑制が観察されたが、短時間処理法においては明確な細胞増殖抑制は観察されなかった(Fig. 1)。プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は連続処理法24時間処理で219 $\mu\text{g/mL}$ 、同48時間処理で190 $\mu\text{g/mL}$ であった。

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連続処理法の24時間処理で1600 $\mu\text{g/mL}$ 、48時間処理で800 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の-S9処理では5000 $\mu\text{g/mL}$ 、+S9処理では625 $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とし、以下公比2で減じた計4~7用量ならびに溶媒対照群を設定した。

また、連続処理法の高用量群では、分裂機構障害を示唆するC-mitosisの出現が多数認められたことから、連続処理法48時間処理で確認試験を実施した。1600 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比2で減じた4用量を設定した。

さらに、連続処理法の24時間処理では染色体構造異常の出現頻度が10%未満の増加を示し、短時間処理法の+S9処理では明確な用量依存性が認められなかったことから、最高処理濃度をそれぞれ900 $\mu\text{g/mL}$ および160 $\mu\text{g/mL}$ とした追加試験を実施した。連続処理法の24時間処理で最高処理濃度より公差100で6段階減じた7用量、短時間処理法の+S9処理では最高処理濃度より公差20で5段階減じた6用量を設定した。

なお、陽性対照として、連続処理法の場合、マイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業(株))を、24時間処理で0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、48時間処理で0.025 $\mu\text{g/mL}$ の用量で、短時間処理法の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を、12.5 $\mu\text{g/mL}$ の用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのディッシュを用い、予備試験と同様に

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(LIFE TECHNOLOGIES社)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 mM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

各ディッシュあたり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。

すべての標本をブラインド処理した後、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た場合(+gap)と、含めない場合(-gap)とに区別し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

連続処理法での試験結果をTable 1に示した。2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジン処理群の場合、24時間処理において染色体構造異常のわずかな誘発が観察されたが(出現頻度は9.0%)、倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。なお、800 $\mu\text{g/mL}$ では被験物質の影響によりほとんどの分裂中期像がC-mitosisを呈していた。48時間処理においては用量に依存した染色体構造異常の明確な誘発が認められた(200, 400 $\mu\text{g/mL}$ での出現頻度は11.0, 35.5%)。また、倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかったが、800 $\mu\text{g/mL}$ での分裂中期像の約30%がC-mitosisを呈しており、その内約15%が倍数性を有していた。なお、被験物質の影響により800 $\mu\text{g/mL}$ で染色体異常の観察可能な細胞は141細胞のみであった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。

短時間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、S9 mix非存在下においてはいずれの用量においても染色体構造異常の誘発傾向は観察されなかったが、S9 mix存在下においては染色体構造異常

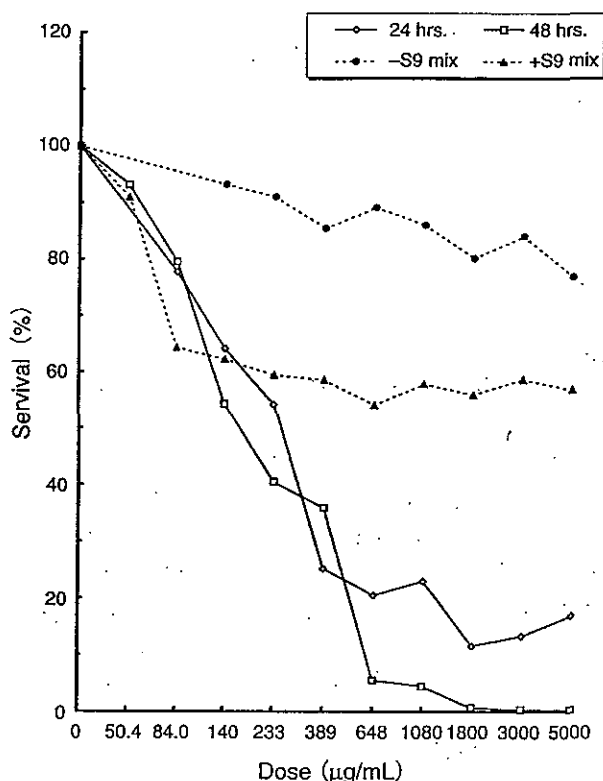


Fig. 1 Dose-survival curves of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine

の顕著な誘発が認められた(出現頻度は41.5%)。また、倍数性細胞の誘発傾向はS9 mix非存在下および存在下のいずれにおいても観察されなかった。一方、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

連続処理法においてC-mitosisが多数認められ、数倍の異常の誘発性について否定できないため、48時間処理法の確認試験を実施した。ただし、被験物質に起因するC-mitosisを防ぐため、48時間の暴露期間終了時に被験物質を除去し、細胞周期1周期程度(24時間)の回復時間の後に染色体標本作製した。その結果、被験物質処理群の場合、用量に依存した倍数性細胞の誘発が認められた(Table 3)。

連続処理法24時間処理および短時間処理法+S9処理において、染色体構造異常の出現頻度が1用量のみ高値を示したことから追加試験を実施し、結果をTable 4に示した。被験物質処理群の場合、いずれの試験系においても用量に依存した染色体構造異常の誘発が観察された。なお、連続処理法の24時間処理は、900 μg/mLにおいて被験物質の影響によりほとんどの分裂中期像がC-mitosisを呈していた。また、短時間処理法の+S9処理では、160 μg/mLにおいて被験物質の影響により観察可能な分裂中期像はほとんど存在しなかった。

変異原性の強さに関する相対的比較値であるD₂₀値およびTR値はそれぞれ0.0456(μg/mL)および365と算出された。なお、暴露終了時、連続処理法の400 μg/mL以上および短時間処理法の100 μg/mL以上の用量で粉末状

被験物質が培養液中に散在しているのが観察された。

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、陽性と判定した。

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*を用いた復帰突然変異試験で陰性⁴⁾と報告されている。

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・シー社, 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,” 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: 益森勝志, 永井美穂, 熊平智司,
北澤倫世
(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)
Shoji Masumori, Miho Nagai,
Satoshi Kumadaira, Michiyo Kitazawa,
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shiōshinden Aza Arahama, 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 cells treated with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine [continuous treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth				SA	Pol
Test substance	0	24	200	1	1	0	0	0	0	1.0	0.5	0.0	-	-
	100	24	200	1	1	1	0	0	0	1.5	1.0	0.0	-	-
	200	24	200	4	0	2	0	0	0	3.0	1.0	0.5	-	-
	400 #	24	200	4	5	9	0	0	0	9.0	7.0	0.0	±	-
	800 #	24	Toxic											
MMC*	0.05	24	200	7	24	51	0	0	0	35.5	33.5	0.0	+	-
Test substance	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-	-
	100	48	200	3	1	1	0	0	0	2.5	1.0	0.0	-	-
	200	48	200	3	4	16	0	0	0	11.0	9.5	1.0	+	-
	400 #	48	200	15	31	45	0	0	0	35.5	33.5	0.0	+	-
	800 #	48	141	8	15	29	0	0	0	29.1	26.2	0.0	+	-
MMC*	0.025	48	200	7	22	59	0	0	1	37.5	37.0	0.5	+	-

*:Positive control (Mitomycin C)

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

SA:structural aberration Pol:polyploid cell

#:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 2 Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine [short-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				SA	Pol
Test substance	0	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-	-
	1250 #	-	6-(18)	200	4	2	1	0	0	0	3.5	1.5	0.0	-	-
	2500 #	-	6-(18)	200	2	3	2	0	0	0	3.5	2.5	1.0	-	-
	5000 #	-	6-(18)	200	3	2	0	0	0	0	2.5	1.0	0.0	-	-
CP*	12.5	-	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	0.0	-	-
Test substance	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-	-
	19.5	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	1.0	0.5	0.0	-	-
	39.1	+	6-(18)	200	0	0	3	0	0	0	1.5	1.5	0.0	-	-
	78.1	+	6-(18)	200	8	31	57	0	0	0	41.5	40.0	1.0	+	-
	156 #	+	6-(18)	Toxic											
CP*	12.5	+	6-(18)	200	4	49	142	1	0	0	76.0	75.5	0.0	+	-

*:Positive control (Cyclophosphamide)

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

SA:structural aberration Pol:polyploid cell

#:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 3 Results of the confirmative examination of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine
[continuous treatment:48 hrs]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Polyploid cells (%)	Final judgement	
					SA	Pol
Test substance	0	48-(24)	200	0.5	-	-
	200	48-(24)	200	0.0	-	-
	400 #	48-(24)	200	2.5	NE	-
	800 #	48-(24)	200	11.5		+
	1600 #	48-(24)	200	14.5		+

SA:structural aberration Pol:polyploid cell NE:Not examined

#:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 4 Results of the confirmative examination of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine (additoinal test)
[continuous treatment:24 hrs, short-term treatment:+S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				SA	Pol
Test substance	0	-	24	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-	-
	300	-	24	200	3	2	2	0	0	0	3.0	2.0	0.5	-	-
	400 #	-	24	200	0	5	5	0	0	0	5.0	5.0	0.0	±	-
	500 #	-	24	200	3	7	4	0	0	0	7.0	5.5	0.0	±	-
	600 #	-	24	200	1	5	5	0	0	0	5.5	5.0	0.0	±	-
	700 #	-	24	200	4	11	7	0	0	1	10.0	8.0	0.5	+	-
	800 #	-	24	200	2	8	12	1	1	0	11.0	10.0	0.0	+	-
	900 #	-	24	Toxic											
MMC*	0.05	-	24	200	5	28	59	0	0	0	39.5	39.5	0.0	+	-
Test substance	0	+	6-(18)	200	0	0	2	0	0	0	1.0	1.0	0.5	-	-
	60.0	+	6-(18)	200	0	0	2	0	0	0	1.0	1.0	0.5	-	-
	80.0	+	6-(18)	200	1	1	10	0	0	0	5.0	5.0	0.5	±	-
	100 #	+	6-(18)	200	1	14	34	0	0	1	20.0	20.0	0.5	+	-
	120 #	+	6-(18)	200	9	29	57	0	0	1	31.5	30.5	0.0	+	-
	140 #	+	6-(18)	200	5	18	47	0	0	0	25.5	25.0	0.0	+	-
	160 #	+	6-(18)	Toxic											
CP**	12.5	+	6-(18)	200	3	24	94	0	0	0	50.0	49.5	0.0	+	-

*:Positive control (Mitomycin C) **:Positive control (Cyclophosphamide)

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

SA:structural aberration Pol:polyploid cell

#:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

4-(1-メチルエチル)アニリンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 4-(1-Methylethyl)aniline in Rats

要約

既存化学物質の安全性を評価するため、4-(1-メチルエチル)アニリンを雌雄のCrj:CD(SD)系ラットに単回経口投与し、急性毒性を検討した。

投与量は雌雄ともに700, 910, 1183, 1538および2000 mg/kgの5用量とした。

死亡動物は、雌雄とも910 mg/kg以上の用量群で投与後24時間以降3日までみられ、その多くが投与翌日に認められた。LD₅₀値(95%信頼限界)は雌雄ともに985 mg/kg(846~1146 mg/kg)であった。

一般状態の観察では雌雄ともにすべての用量群で歩行異常、自発運動低下および流涎がみられ、910 mg/kg以上の用量群で流涎ならびに腹臥位、側臥位あるいは円背位が認められた。さらに一部の群で被毛の汚れおよび腹部膨満が観察された。なお、観察期間終了時まで生存していた動物では投与後2ないし3日頃まで自発運動低下、歩行異常あるいは腹部膨満が認められたが、投与後4ないし5日にはすべて回復した。

生存動物の体重は、雌雄とも投与後7および14日の測定で前回の測定値に比較して増加していた。

剖検では、雄の2000 mg/kg、雌の1183および2000 mg/kgで一部の死亡動物の膀胱あるいは胃に赤色の内容物が認められたが、その他の動物には肉眼的異常は認められなかった。

方法

1. 被験物質

4-(1-メチルエチル)アニリン(三井化学㈱、東京)は、無色～黄褐色の液体で水に難溶。アルコール、ベンゼン等に可溶、分子量135.20の物質である。本試験に用いたロット9701918の純度は99.27 wt%であった。

2. 供試動物

5週齢のCrj:CD(SD)系ラット(SPF)雌雄各35匹を日本チャールス・リバー㈱(神奈川)から購入した。動物は検収後、試験環境に7日間馴化し、6週齢で投与した。

3. 飼育

動物は、温度23±2℃、湿度55±10%、換気回数20回/時間、照度150~300 Lx、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に設定された飼育室で、㈱東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し、ステンレス製

網目飼育ケージに5匹ずつ収容して飼育した。飼育ケージおよび給餌器は週1回取り換えた。動物には、オリエンタル酵母工業㈱製造の固型飼料MFを自由に摂取させ、飲料水としては、水道水を自由に摂取させた。なお、飼育室の環境調節は試験期間中、目標範囲内であった。動物の馴化期間を含め、観察期間中データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

4. 用量設定理由

本試験に先立ち、雌雄各1群当たり2匹に125, 250, 500, 1000および2000 mg/kgを投与し、5日間にわたり中毒症状および生死の観察を行った結果、雌雄ともに2000 mg/kg群で2例全例が死亡したが、1000 mg/kg以下の群に死亡例は認められなかったことから、本試験の投与用量は雌雄ともに700~2000 mg/kgの5用量(公比1.3)を設定した。

5. 群分け

動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。動物の識別は耳介入墨法により行った。投与時の体重は、雄が170~184 g、雌が127~142 gであった。なお、余剰動物は炭酸ガス吸入法により安楽死させた。

6. 投与液の調製および投与方法

被験物質は140, 182, 237, 308および400 mg/mLの濃度となるようにトウモロコシ油(ナガライテスク㈱、Lot No. V6B7902)に溶解した。すべての投与群について投与液の濃度分析を実施した結果、設定濃度の101~103%の範囲であり、適切に調製されていた。

投与容量は体重100 gあたり0.5 mLとし、個体別に測定した体重に基づいて投与量を算出した。

投与回数は1回とし、投与前16時間絶食させた動物に金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。給餌は被験物質投与後3時間に行った。

7. 一般状態の観察

中毒症状および生死の観察は、投与6時間までは1時間毎に、以後1日2回、14日間にわたって実施した。

8. 体重

体重は投与直前、投与後7および14日に測定し、死亡動物については死亡発見時にも測定した。

Table 1 Mortality and LD₅₀ values of rats treated orally with 4-(1-methylethyl) aniline

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Number of deaths ^a								Mortality	LD ₅₀ values ^b (95 % confidence limits)
			1	2	3	4	5	6	7	8-14		
Male	700	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	985 mg/kg (846 - 1146 mg/kg)
	910	5	0	2	0	0	0	0	0	0	2/5	
	1183	5	0	4	0	0	0	0	0	0	4/5	
	1538	5	1	4	-	-	-	-	-	-	5/5	
	2000	5	1	4	-	-	-	-	-	-	5/5	
Female	700	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	985 mg/kg (846 - 1146 mg/kg)
	910	5	0	1	1	0	0	0	0	0	2/5	
	1183	5	0	4	0	0	0	0	0	0	4/5	
	1538	5	3	2	-	-	-	-	-	-	5/5	
	2000	5	1	4	-	-	-	-	-	-	5/5	

a: Days after administration

b: LD₅₀ values estimated by Probit method

9. 50 %致死量(LD₅₀)の算出

プロビット法により、投与後14日の死亡率からLD₅₀値およびその95 %信頼限界を算出した。

10. 病理学検査

観察期間中の死亡例については死亡発見時に、また生存例については観察期間終了時にエーテル麻酔後放血安楽死させ解剖し、肉眼的病理所見を病理解剖所見用紙に記録した。

結果

1. 死亡率およびLD₅₀値

死亡動物は、雌雄とも910 mg/kg以上の用量群で投与後24時間から3日の間に認められた。700, 910, 1183, 1538および2000 mg/kg群の死亡率は雌雄ともにそれぞれ0, 40, 80, 100 および100 %で、LD₅₀値(95 %信頼限界)は雌雄ともに985(846~1146)mg/kgであった。

2. 一般状態

雌雄ともにすべての用量群で歩行異常、自発運動低下および流涎が投与後1ないし2時間から認められた。さらに、雄の1538, 雌の1183および1538 mg/kg群では投与後1時間以降、その他の910 mg/kg以上の群では投与後6時間以降に流涎ならびに腹臥位、側臥位あるいは円背位を示し死亡する動物が認められた。その他の所見として、一部の群で被毛の汚れおよび腹部膨満が観察された。なお、観察期間終了時まで生存していた動物では投与後2ないし3日頃まで自発運動低下、歩行異常あるいは腹部膨満が認められたが、投与後4ないし5日にはすべて回復した。

3. 体重

生存動物では雌雄とも投与後7および14日の測定で前回の測定値に比較して増加していた。

4. 病理所見

雄の2000 mg/kg, 雌の1183および2000 mg/kgで一部の死亡動物の膀胱あるいは胃に赤色の内容物が認められたが、その他の動物には肉眼的異常は認められなかった。

考察

4-(1-メチルエチル)アニリンについてラットを用いる急性経口毒性試験を実施した。

その結果、死亡動物は投与後24時間から3日の間に認められた。中毒症状として、雌雄ともに歩行異常、自発運動低下、腹臥位、側臥位、円背位、流涎、流涙、被毛の汚れおよび腹部膨満が認められた。剖検では雌雄の死亡動物で胃または膀胱に赤色内容物が認められたが、生存動物に肉眼的異常は認められなかった。LD₅₀値(95 %信頼限界)は雌雄ともに985(846~1146)mg/kgであった。

連絡先

試験責任者：藤島 敦

試験担当者：藤原正孝

(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: Atsushi Fujishima (Study director)

Masataka Fujiwara

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

4-(1-メチルエチル)アニリンのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 4-(1-Methylethyl)aniline by Oral Administration in Rats

要約

4-(1-メチルエチル)アニリンの6, 20および60 mg/kgをSD系(Crj:CD)のラットの交配前2週間および交配期間の2週間を通じて経口投与し、さらには雄では交配期間終了後20日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物の反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

雌の60 mg/kg群で妊娠25日に1例が死亡した。一般状態の観察では、眼貧血および流涎が雌雄とも20および60 mg/kg群で観察され、皮膚の蒼白が主として60 mg/kg群の妊娠期間の雌に観察された。

体重では、20および60 mg/kg群の雄と60 mg/kg群の妊娠期間の雌で軽度な増加抑制が認められ、摂餌量では60 mg/kg群の雄で投与期間の初期に低値が認められた。

雄の血液学検査では、20および60 mg/kg群でメトヘモグロビン比率が高値を示し、さらに60 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数およびMCHCが低値を、MCV, MCH, 血小板数および網赤血球比率が高値を示した。血液凝固能検査では被験物質投与の影響は認められなかった。血液生化学検査では60 mg/kg群でアルブミン、A/Gおよび総ビリルビンが高値を示した。

病理学検査では、骨髄、脾臓および肝臓に被験物質の影響が示唆される変化が認められた。器官重量は、脾臓重量が雄の60 mg/kg群、雌の20および60 mg/kg群で高値を示し、肝臓重量が雄の20および60 mg/kg群ならびに雌の60 mg/kg群で高値を示した。剖検所見では脾臓の黒色化および肥大が雌雄の20および60 mg/kg群で認められ、病理組織学検査では骨髄の造血亢進(赤血球系造血)、脾臓のうっ血、色素沈着および髄外造血(赤血球系造血)が雌雄の20および60 mg/kg群で、肝臓の髄外造血が雄の60 mg/kg群、雌の20および60 mg/kg群で、肝臓(クッパー細胞)の色素沈着および肝細胞肥大が雌雄の60 mg/kg群でそれぞれ発生率の増加あるいは程度の増強が認められた。

2. 生殖発生毒性

性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時観察および妊娠期間にも被験物質投与の影響は

認められなかったが、60 mg/kg群で雌雄の新生児の哺育0日の体重が低値を示し、新生児の4日の生存率が低値を示したことから、被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された。その他、出産率、出生率に被験物質投与の影響は認められず、新生児の外表、死亡児および哺育4日の剖検にも被験物質投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では4-(1-メチルエチル)アニリンの反復投与によりメトヘモグロビン血症および貧血が惹起され、それらに起因すると考えられる一般状態、血液学検査値、血液生化学検査値、骨髄、肝臓および脾臓の変化が雌雄の20 mg/kg以上の投与群で認められ、無影響量(NOEL)は雌雄とも6 mg/kg/dayと判断された。雌雄の生殖能に及ぼす影響は60 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は60 mg/kg/dayと判断された。児動物の発生・発育に及ぼす影響は60 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、新生児の4日の生存率が低値を示したことから無影響量は20 mg/kg/dayと判断された。

方法

1. 被験物質

4-(1-メチルエチル)アニリン[三井化学(株)製造、東京、Lot No. 970918、純度99.27 wt%]は、無～黄褐色の液体であり、使用時まで室温で遮光下密栓保管した。本ロットは投与期間中安定であったことを確認した。

被験物質は、トウモロコシ油(Lot No. V7P1509、ナカライテスク(株)製造)に溶解し、1,2,4および12 mg/mLの濃度になるよう各群の投与液を調製した。調製後は、使用時まで冷暗条件下で密閉保管した。投与液中の被験物質は1および60 mg/mLの場合、調製後遮光下冷蔵庫保存で8日目まで安定であることを確認した。

投与液の濃度確認のため全試験群について、調製開始時に調製した各群の投与液から無作為にサンプルを抽出し投与液中の被験物質濃度の分析を実施した。その結果、投与液は設定濃度の96.5～102.0%の範囲で調製されていた。したがって、投与液にはほぼ所定量の4-(1-メチルエチル)アニリンが含有されていたことを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)(神奈川)から購入した生後8週齢のSprague-Dawley(Crj:CD(SD), SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は7日間