

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のバツ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ヵ月以内のキッコーマン(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

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. 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°C)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°C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°C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°C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

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 ^{d)}	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 ^{d)}	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 ^d	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 ^d	343	357	334 ^b	763	726	745 ^c	266	284	282 ^d	143	152	147 ^b
	[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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48時間処理で800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の-S9処理で5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および同+S9処理では625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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°C, 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蔵所(4°C)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(株))を用い、CO₂濃度5%、37°C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(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。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ウエ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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、同48時間処理で190 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48時間処理で800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の-S9処理では5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9処理では625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48時間処理で0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、染色体の形態的変化としてギャップ(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。

すべての標本をプ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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

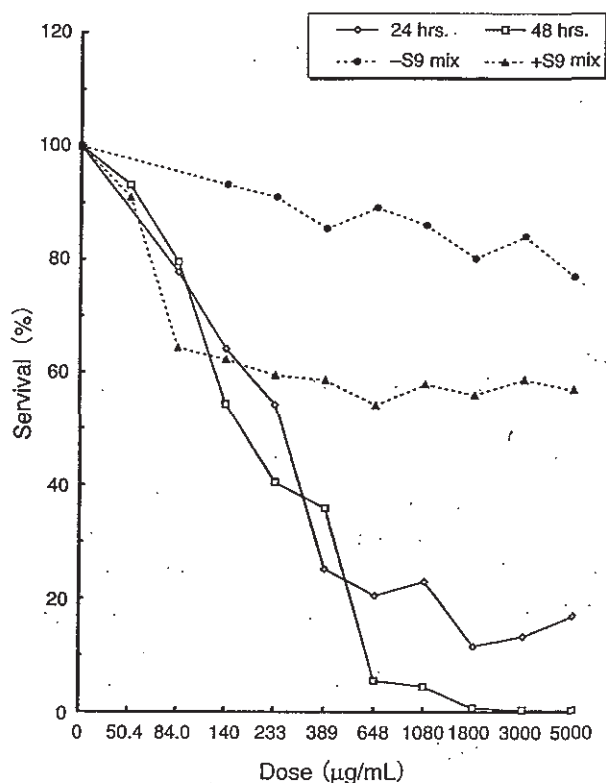


Fig. 1 Dose-survival curves of 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine

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、数的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*E. 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, Fukude-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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	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 (μg/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 (μg/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