

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-(1H,3H,5H)- トリオンの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine- 2,4,6-(1H,3H,5H)-trione on Bacteria

要約

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-(1H,3H,5H)-トリオンについて、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菌株を用いた。試験は2回繰り返して実施し、S9 mix無添加群の各試験菌株およびS9 mix添加群のいずれの菌株とも156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ のそれぞれ6用量で実施した。

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突然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-(1H,3H,5H)-トリオンは、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11年3月31日ならびに平成11年6月29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 KGaA)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°C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: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)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 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mmol/L 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 mmol/L 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)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°C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
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol
精製水	残量

5. 被験物質

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-(1H,3H,5H)-トリオン(ロット番号: 00915-1)は純度99.0%(不純物としてイソシアヌル酸を含む)の白色粉末である。本剤は水に易溶で、アセトン、

メタノールに可溶である。水、光に対して安定であり、生理食塩液中でも安定である。日産化学工業(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所(4℃)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

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(株)大塚製薬工場)で溶解して調製原液を準備した。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、速やかに処理を行った。

7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250 μg/plateの用量を用いて予備的な試験を実施した。S9 mix無添加群およびS9 mix添加群のいずれの用量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、S9 mix添加群とも5000 μg/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(NaN₃;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、0.1mol/L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添加した。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(×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、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*)-トリオン処理による生育阻害作用は観察されなかった。また、復帰突然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倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、コロニー計数時、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。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、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²⁾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) 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,” 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：嶋田佐和子，菊池正憲，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582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)
Sawako Shimada, Masanori Kikuchi,
Mayumi Itakura
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shioshinden, 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 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (1st trial) [direct method: -S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	100	97	95	12	12	9	24	24	19	17	16	21	5	6	6
		[97 \pm 3]			[11 \pm 2]			[22 \pm 3]			[18 \pm 3]			[6 \pm 1]		
	156	103	101	96	11	11	9	21	23	17	20	16	15	5	5	7
		[100 \pm 4]			[10 \pm 1]			[20 \pm 3]			[17 \pm 3]			[6 \pm 1]		
	313	95	88	93	9	7	8	22	20	22	15	17	18	5	5	6
		[92 \pm 4]			[8 \pm 1]			[21 \pm 1]			[17 \pm 2]			[5 \pm 1]		
	625	107	101	100	9	6	8	17	22	18	20	24	16	3	4	2
		[103 \pm 4]			[8 \pm 2]			[19 \pm 3]			[20 \pm 4]			[3 \pm 1]		
1250	84	90	90	6	7	9	17	16	24	19	16	14	2	6	4	
	[88 \pm 3]			[7 \pm 2]			[19 \pm 4]			[16 \pm 3]			[4 \pm 2]			
2500	91	89	87	9	10	8	21	17	14	14	18	16	6	5	5	
	[89 \pm 2]			[9 \pm 1]			[17 \pm 4]			[16 \pm 2]			[5 \pm 1]			
5000	96	103	106	10	13	11	17	16	18	14	12	14	7	4	6	
	[102 \pm 5]			[11 \pm 2]			[17 \pm 1]			[13 \pm 1]			[6 \pm 2]			
Positive control		475	469	484 ^a	384	369	355 ^b	122	136	138 ^a	651	663	659 ^c	416	438	406 ^d
		[476 \pm 8]			[369 \pm 15]			[132 \pm 9]			[658 \pm 6]			[420 \pm 16]		

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) NaN_3 ; 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 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (1st trial) [activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	104	104	104	8	6	8	23	27	22	24	28	21	9	10	9
		[104 \pm 0]			[7 \pm 1]			[24 \pm 3]			[24 \pm 4]			[9 \pm 1]		
	156	104	104	102	6	6	8	25	24	27	19	17	18	7	11	11
		[103 \pm 1]			[7 \pm 1]			[25 \pm 2]			[18 \pm 1]			[10 \pm 2]		
	313	108	106	103	9	10	6	18	21	17	19	25	18	11	8	11
		[106 \pm 3]			[8 \pm 2]			[19 \pm 2]			[21 \pm 4]			[10 \pm 2]		
	625	94	93	94	8	6	9	24	19	21	22	23	19	9	13	8
		[94 \pm 1]			[8 \pm 2]			[21 \pm 3]			[21 \pm 2]			[10 \pm 3]		
1250	89	94	95	10	7	8	27	24	22	25	22	17	11	7	6	
	[93 \pm 3]			[8 \pm 2]			[24 \pm 3]			[21 \pm 4]			[8 \pm 3]			
2500	89	91	94	8	8	6	21	20	23	24	28	22	8	14	9	
	[91 \pm 3]			[7 \pm 1]			[21 \pm 2]			[25 \pm 3]			[10 \pm 3]			
5000	92	88	93	9	7	7	22	21	26	19	26	20	8	7	6	
	[91 \pm 3]			[8 \pm 1]			[23 \pm 3]			[22 \pm 4]			[7 \pm 1]			
Positive control		785	822	853 ^a	349	348	363 ^b	653	667	646 ^c	410	422	401 ^d	142	148	132 ^b
		[820 \pm 34]			[353 \pm 8]			[655 \pm 11]			[411 \pm 11]			[141 \pm 8]		

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 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (2nd trial) [direct method: -S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	104	96	87	13	10	15	23	29	25	16	15	17	8	6	4
		[96 \pm 9]			[13 \pm 3]			[26 \pm 3]			[16 \pm 1]			[6 \pm 2]		
	156	87	97	86	7	12	9	27	21	20	14	15	14	9	6	9
		[90 \pm 6]			[9 \pm 3]			[23 \pm 4]			[14 \pm 1]			[8 \pm 2]		
	313	106	85	85	8	10	10	23	30	28	17	16	9	8	9	6
		[92 \pm 12]			[9 \pm 1]			[27 \pm 4]			[14 \pm 4]			[8 \pm 2]		
	625	106	95	90	11	12	8	22	22	24	9	14	12	5	8	11
	[97 \pm 8]			[10 \pm 2]			[23 \pm 1]			[12 \pm 3]			[8 \pm 3]			
1250	102	89	83	9	9	6	20	27	20	15	15	10	6	9	8	
	[91 \pm 10]			[8 \pm 2]			[22 \pm 4]			[13 \pm 3]			[8 \pm 2]			
2500	94	100	83	9	10	6	23	23	28	16	13	15	10	7	5	
	[92 \pm 9]			[8 \pm 2]			[25 \pm 3]			[15 \pm 2]			[7 \pm 3]			
5000	81	101	90	8	10	7	21	23	17	11	13	17	4	6	5	
	[91 \pm 10]			[8 \pm 2]			[20 \pm 3]			[14 \pm 3]			[5 \pm 1]			
Positive control		445	432	416 ^a	371	375	335 ^a	107	119	124 ^a	655	621	607 ^a	489	426	460 ^a
		[431 \pm 15]			[360 \pm 22]			[117 \pm 9]			[628 \pm 25]			[458 \pm 32]		

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 b) NaN_3 ; 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 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (2nd trial) [activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	104	102	112	7	8	9	23	25	27	24	22	26	14	17	15
		[106 \pm 5]			[8 \pm 1]			[25 \pm 2]			[24 \pm 2]			[15 \pm 2]		
	156	86	87	82	12	9	7	22	22	23	24	23	26	14	9	9
		[85 \pm 3]			[9 \pm 3]			[22 \pm 1]			[24 \pm 2]			[11 \pm 3]		
	313	100	93	104	11	12	8	19	23	25	18	28	23	12	7	11
		[99 \pm 6]			[10 \pm 2]			[22 \pm 3]			[23 \pm 5]			[10 \pm 3]		
	625	99	86	101	14	10	9	19	29	28	27	22	18	7	7	11
	[95 \pm 8]			[11 \pm 3]			[25 \pm 6]			[22 \pm 5]			[8 \pm 2]			
1250	80	83	87	12	11	7	23	26	30	21	17	24	14	13	11	
	[83 \pm 4]			[10 \pm 3]			[26 \pm 4]			[21 \pm 4]			[13 \pm 2]			
2500	100	88	86	11	9	12	26	27	29	22	25	18	16	14	13	
	[91 \pm 8]			[11 \pm 2]			[27 \pm 2]			[22 \pm 4]			[14 \pm 2]			
5000	80	80	94	9	8	13	21	24	25	18	25	20	7	10	10	
	[85 \pm 8]			[10 \pm 3]			[23 \pm 2]			[21 \pm 4]			[9 \pm 2]			
Positive control		888	892	885 ^a	411	365	400 ^b	659	660	675 ^c	408	405	417 ^d	127	139	145 ^b
		[888 \pm 4]			[392 \pm 24]			[665 \pm 9]			[410 \pm 6]			[137 \pm 9]		

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 $\mu\text{g}/\text{plate}$

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-(1H,3H,5H)-トリオンの 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 1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine- 2,4,6-(1H,3H,5H)-trione on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

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-(1H,3H,5H)-トリオ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、短時間処理法ならびに連続処理法とも10 mM相当の濃度を含む653~2612 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量を設定した。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、連続処理法では、S9 mix非存在下における24時間連続処理後、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、短時間処理ならびに連続処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下では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-(1H,3H,5H)-トリオンは、染色体異常を誘発しない(陰性)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 KGaA)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を融解し3~5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制試験では継代数14の細胞を、染色体異常試験では同9の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス株)に、メンブランフィルター(0.45 μm :Featuring Corning and Costar Products)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(GIBCO Life Technologies, Inc)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°C)に保存した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(Formaおよび三洋電機メデイ

カシステム株)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。また、S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 μmol
精製水	残量

5. 被験物質

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-(1H,3H,5H)-トリオン(ロット番号:00915-1)は純度99.0%(不純物としてイソシアヌル酸を含む)の白色粉末である。本剤は水に易溶で、アセトン、メタノールに可溶である。水、光に対して安定であり、生理食塩液中でも安定である。日産化学工業株(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所(4°C)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

試験の都度、被験物質を日本薬局方生理食塩液(株)大塚製薬工場)で溶解して調製原液を準備した。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、速やかに処理を行った。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

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。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。連続処理法の場合、24時間連続して処理を実施した。

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、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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9処理でシクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で、連続処理の場合マイトマイシンCを0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、

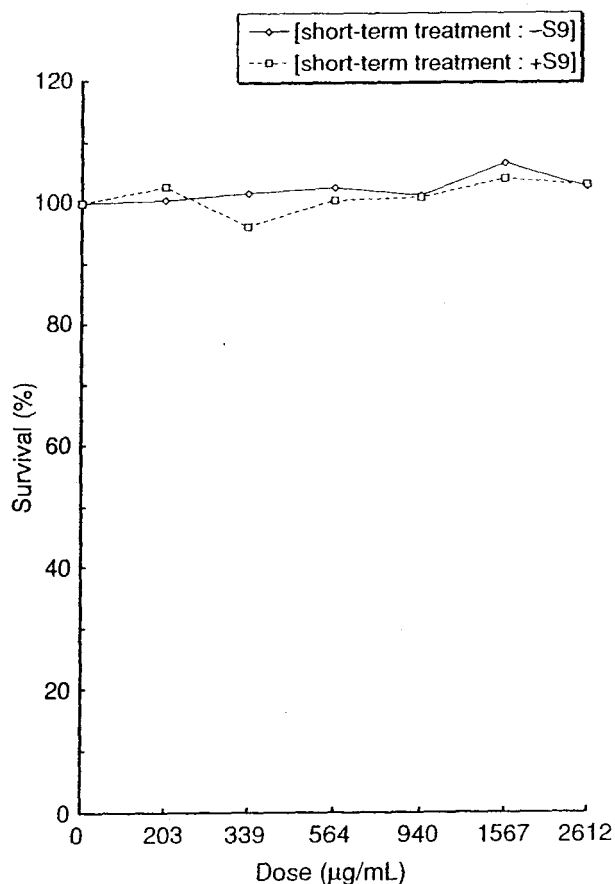


Fig. 1 Dose-survival curves of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione [short-term treatment : 6 hr]

最終濃度で0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

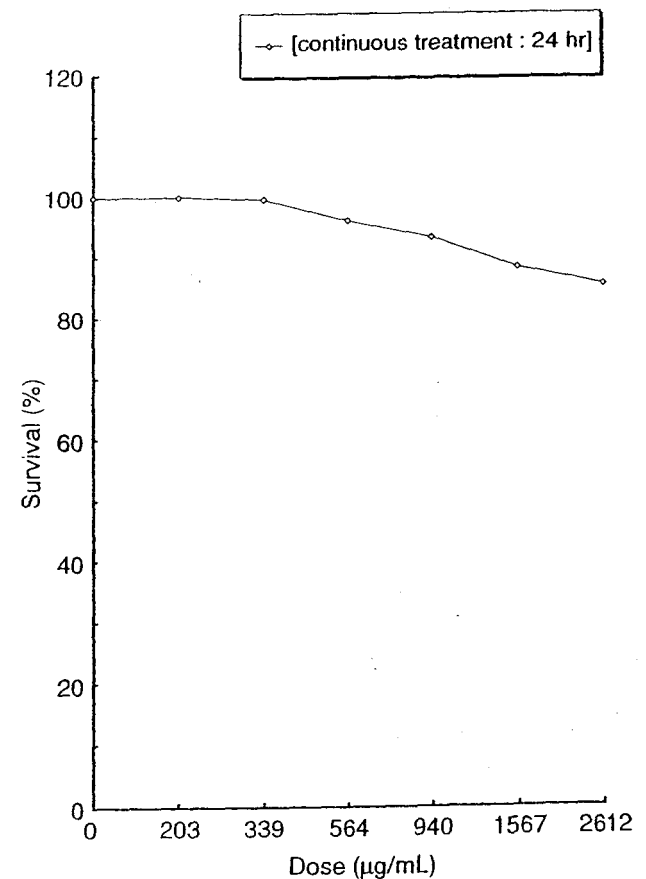


Fig. 2 Dose-survival curve of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione [continuous treatment : 24 hr]

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, 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/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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	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)-	-
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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	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)-	-
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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	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)-	-
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)

