2007年3月23日

トリチオシアヌル酸の
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

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室　委託

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

目次

要約 ---------- 1
試験目的 ---------- 2

材料と方法 ---------- 2
1. 被験物質 ---------- 2
2. 陽性対照物質 ---------- 2
3. 細胞と培養条件 ---------- 2
4. S9 反応液の調製 ---------- 3
5. 被験物質調製液の調製 ---------- 3
6. 細胞増殖抑制試験 ---------- 3
7. 染色体異常試験 ---------- 4
8. 染色体分析 ---------- 5

試験成績と考察 ---------- 6
参考文献 ---------- 8
Figure ---------- 9
Tables ---------- 10

要約

トリチオシアヌル酸のチャイニーズ・ハムスター雌肺由来細胞(CHL/IU 細胞)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を検討した。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理における最高処理濃度を S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下ともに 10 mmol/L(1.8 mg/mL)とし、公比 1.5 で計 5 段階の濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率および分裂指数の結果をもとに以下の観察対象群を決定し、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.36、0.53、0.80 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.36、0.53、0.80 mg/mL

その結果、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した高濃度群(0.80 mg/mL)で構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加(出現率はそれぞれ 5.5%および 19.0%)が認められた。トリチオシアヌル酸を培養液に添加すると 1.2 mg/mL 以上の濃度では培養液が黄色化し、pH が 5.79～6.04 まで低下するが、処理 6 時間後では 1.8 mg/mL の濃度群でのみ培養液の黄色化が認められた。染色体分析した 0.80 mg/mL の濃度では添加時の培養液は橙色であり、処理終了時では培養液の変化は認められなかったことから、培養液の酸性化により染色体の構造異常が誘発された可能性は低いと考えられた。しかしながら、明らかに陽性の結果が得られた S9 mix 存在下の条件については、pH 調整した処理群も設定して処理液の酸性化の影響を調べるために確認試験を実施した。また、それと同時に最高処理濃度を 50%の増殖抑制濃度の約 1.5 倍の濃度(0.70 mg/mL)とし、公比 1.5 で計 5 段階の濃度群を設定して 24 時間連続処理による染色体異常試験を行った。

細胞増殖率および分裂指数の結果をもとに以下の観察対象群を決定し、染色体分析を行った。

24 時間連続処理:0.14、0.21、0.31 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理(pH 非調整群):0.36、0.53、0.80 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理(pH 調整群):0.53、0.80、1.2 mg/mL

その結果、24 時間連続処理したいずれの濃度群においても染色体の構造異常および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、S9 mix 存在下で短時間処理した場合、pH 非調整群の高濃度群(0.80 mg/mL)では、11.0%の細胞に染色体の構造異常が誘発され、再現性のある結果が得られた。また、pH 調整群の 0.80 mg/mL の濃度群では染色体の構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかったが、観察可能な高濃度群(1.2 mg/mL)では、31.5%の細胞に染色体の構造異常が誘発された。染色体の構造異常が誘発された群の処理開始時の pH は pH 非調整群では 6.73、pH 調整群では 7.27 であり、処理終了時には培養液の色の変化は認められなかったことから、S9 mix 存在下の短時間処理群で誘発された染色体異常は、培養液の酸性化によるものではなく、トリチオシアヌル酸によって誘発されたと考えられる。また、S9 mix 存在下で短時間処理した確認試験においては、pH 調整の有無にかかわらず、倍数性細胞の有意な増加(出現率:1.5～2.5%)が認められ、その中には核内倍加した細胞が認められた。

以上の結果より、トリチオシアヌル酸は、本試験条件において CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

試験目的

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、トリチオシアヌル酸の染色体異常誘発作用を評価するため、CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるトリチオシアヌル酸[別名(一般名):2,4,6-トリメルカプト-s-トリアジン、略称:TTC、英名:1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

]は、淡黄色粉末で、 から提供を受けた。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は、使用時まで直射日光を避け室温保管した。

被験物質提供者において、実験終了後に返却した被験物質を非 GLP 下で分析した結果、被験物質の組成に変化が認められず、実験期間中安定であったことが確認された(Appendix 2)。なお、被験物質原体の安定性については GLP 下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、実験期間中安定であり、本試験の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質として用いたマイトマイシン C(MMC、ロット番号:428ACI、協和醗酵工業)およびシクロホスファミド(CP、ロット番号:091K1176、Sigma Chemical)を日局注射用水(ロット番号:K4I81 および K4L72、大塚製薬工場)に溶解し、用時調製して試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で我が国において染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手(1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4)し、継代後、液体窒素(−196℃)中に凍結保存(現在の継代数 23)した。その細胞(倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代 4 代(細胞増殖抑制試験)、7 代、9 代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:28019903、Cansera International)を 10 vol%添加したイーグルMEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、CO_2 インキュベーター(5%CO_2、37℃、加湿条件下)内で培養した。イーグルMEM培養液は、製造元(日水製薬)の処方に従ってイーグルMEM培地「ニッスイ」①粉末(日水製薬)、L-グルタミン(日水製薬)および $NaHCO_3$ を混合して調製したものを用いた。

4. S9 反応液の調製

S9(ロット番号:RAA-516、2005 年 2 月 4 日製造、キッコーマン)は、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽(-80℃)に保管した。グルコース-6-リン酸(G-6-P、Sigma Chemical)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(β-$NADP^+$、オリエンタル酵母工業)および KCl を超純水に溶かし、混合液として超低温槽(-80℃)に保管し、使用時はこれに S9、$MgCl_2$ および HEPES(pH 7.2)を加え、S9 mix とした。試験には、10%CS/MEM:S9 mix を 25:5 の割合で混和した S9 反応液 (3 mL/ディッシュ) を加えて処理を行った(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-$NADP^+$、0.83 mmol/L $MgCl_2$、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水に不溶であったが、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したことから、溶媒として DMSO (ロット番号:TCF8379、和光純薬工業)を用いた。被験物質を必要量秤量し、溶媒を加えて溶解させ、原液 (細胞増殖抑制試験および染色体異常試験ともに 180 mg/mL) を用時調製し、それを溶媒で段階希釈して種々の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 1 vol%添加して処理を行った。

S9 mix 存在下の短時間処理については処理液の酸性化の影響を調べるために確認試験(染色体異常試験)を行ったが、処理液の pH を調整しない pH 非調整群については、S9 反応液(60 mL)に被験物質調製原液(180 mg/mL)を 1 vol%(0.6 mL)加え、それを DMSO を 1 vol%含む S9 反応液で希釈して種々の濃度の処理液を調製した。また、pH 調整群については、10%CS/MEM(50 mL)に被験物質調製原液(180 mg/mL)を 1 vol%(0.6 mL)加え、処理液の色が 10%CS/MEM と同程度になるまで 1 mol/L NaOH を加えたのち、S9 mix(10 mL)を加えて最高処理濃度の処理液を調製し、それを DMSO を 1 vol%含む S9 反応液で希釈して種々の濃度の処理液を調製した。

なお、被験物質調製液の調製時に、発熱、発泡および変色のような変化の無いことを目視により確認した。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖におよぼす影響を調べた。CHL/IU 細胞に 0.25%トリプシンを作用させ、4×10^3 個/mL の単一細胞浮遊懸濁液を調製し、その 5 mL(2×10^4 個)をプラスチックディッシュ(直径 6 cm)に播種した。培養開始 3 日目に、以下の

手順で短時間処理および連続処理を行った。すべての処理条件において、試験法ガイドラインに従い 10 mmol/L(1.8 mg/mL)の濃度を最高処理濃度とし、0.056～1.8 mg/mL の濃度範囲(公比 2)で処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM および S9 反応液と交換(3 mL/ディッシュ)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液(30 μL)を各ディッシュに添加し 6 時間処理した。処理後、リン酸緩衝塩類溶液(PBS、Ca^{2+}および Mg^{2+}を含む)で細胞を洗浄し、10%CS/MEM(5 mL/ディッシュ)でさらに 18 時間培養した。また、連続処理する場合には、各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM と交換(5 mL/ディッシュ)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液(50 μL)を各ディッシュに添加し 24 時間処理した。また、培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた結果、すべての処理群で処理開始時および処理終了時ともに 1.8 mg/mL の濃度群で沈殿が認められた他、S9 mix 非存在下で短時間処理した 0.90 mg/mL の濃度群では処理終了時に沈殿が認められた。また、被験物質調製液を添加した際に、培養液の色が 0.45 mg/mL では橙色に、0.90 mg/mL および 1.8 mg/mL では黄色に変化したが、処理終了時では 1.8 mg/mL でのみ培養液の黄色化が認められた。

培養終了後、10 vol%ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計(Monocellater™、オリンパス販売)を用い、陰性(溶媒)対照群と比較した各被験物質処理群の相対増殖率を測定した。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、トリチオシアヌル酸はすべての処理条件において CHL/IU 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した (Fig. 1)。増殖率 50%を挟む 2 点の回帰直線式から 50%の増殖抑制濃度を算出した結果、その濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 1.2 mg/mL および 0.89 mg/mL、24 時間連続処理では 0.45 mg/mL と推定された。

このことから S9 mix 非存在下および存在下での短時間処理ともに試験法ガイドラインに従い 10 mmol/L(1.8 mg/mL)の濃度を最高処理濃度とし、公比 1.5 で計 5 濃度設定して染色体異常試験を実施した。なお、細胞増殖抑制試験で被験物質調製液を添加した際に培養液の黄色化が認められたことから、1.2 mg/mL および 1.8 mg/mL の濃度群については、pH 測定用の処理液を別途調製(n=1)し、pH メータ(PH81、横河電機)を用いて処理時の処理液 pH を測定した。

試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。被験物質処理群、陰性 (溶媒) 対照群と陽性対照群を設けた。1 濃度あたり 4 枚のディッシュ(ただし、陽性対照群では 2 枚)を用い、そのうちの 2 枚は染色体標本を作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。陽性対照群については、S9 mix 非存在下の短時間処理では、MMC(20 μg/mL)を最終濃度が 0.1 μg/mL となるように添加した。また、S9 mix 存在下の短時間処理では、CP(1 mg/mL)を最終濃度が 10 μg/mL となるように添加した。なお、MMC および CP は上記の濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。

短時間処理の結果、S9 mix 非存在下の短時間処理では疑陽性の結果が得られたことから、24 時間連続処理による染色体異常試験を実施した。また、S9 mix 存在下の短時間処理については、陽性の結果が得られたが、培養液の酸性化の影響を確認するために、処理液の pH を調整しない群(pH 非調整群)と調整した群(pH 調整群)を設定して確認試験を行った。

試験操作は、24 時間連続処理群については細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。S9 mix 存在下の短時間処理群については、被験物質を含む処理液を調製し、処理液と液交換することにより処理を行った。すべての処理条件において被験物質処理群、陰性 (溶媒) 対照群と陽性対照群を設けた。各群 4 枚のディッシュ(ただし、陽性対照群では 2 枚)を用い、そのうちの 2 枚は染色体標本を作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。陽性対照群については、連続処理では MMC(20 μg/mL)を最終濃度が 0.05 μg/mL となるように添加した、S9 mix 存在下の短時間処理では、CP(1 mg/mL)を最終濃度が 10 μg/mL となるように添加した。なお、MMC および CP は上記の濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。

また、0.47 mg/mL 以上の濃度群については、pH 測定用の処理液を別途調製(n=1)し、処理時の処理液 pH を測定した。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 μg/mL となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、0.02 w/v% EDTA 含有 PBS(Ca^{2+}および Mg^{2+}不含)をディッシュあたり 5 mL 加えてピペッティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。遠沈(1000～1500 rpm、約 5 分)し、上清を捨てた後、3 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液(メタノール:氷酢酸 = 3:1 (v/v))を 6～7 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作を数回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス(あらかじめフロスト部分に試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入)上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 4～6 枚のスライド標本を作製した。なお、20%未満の相対増殖率(80%を超える増殖抑制)を示す被験物質処理群については、染色体標本を作製しないこととした。

作製したスライド標本を 3 vol%ギムザ液(pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製)で染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立ち、1 枚のディッシュから得られた 1 枚の標本を用いて、濃度の高い方から分裂指数(500 細胞/標本)を分析した。0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、また、標本あたりの分析可能な分裂中期細胞が少ない場合にはその数を考慮して、分析可能な最高濃度群を決定することとした。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がそれぞれ処理条件の分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1 群あたり 200 個(100 細胞/ディッシュ、25 細胞/観察者)の分裂中期細胞(染色体数:23～27 本)について構造異常の種類と数を、

1 群あたり 800 個(400 細胞/ディッシュ、100 細胞/観察者)の分裂中期細胞について倍数性細胞(染色体数が 38 本以上)の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く染色体異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会 [1]による分類法に基づいて行った。染色分体幅より狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

染色体の構造異常(ギャップを除く)を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法 [2] ($p<0.01$、片側)により有意差検定を実施した。また、有意差の認められた処理条件についてはその用量依存性についてコクラン・アーミテッジの傾向性検定 [3] ($p<0.01$、片側)を実施することとした。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

試験成績と考察

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、公比 1.5 で以下の濃度群設定し、短時間処理による染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.36、0.53、0.80、1.2、1.8 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.36、0.53、0.80、1.2、1.8 mg/mL

なお、沈殿の有無を肉眼で観察した結果、1.2 mg/mL および 1.8 mg/mL の濃度で処理開始時に培養液中に沈殿が認められた以外は、すべての処理群で培養液中に沈殿は認められなかった。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに、観察対象群を以下のように決定し、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.36、0.53、0.80 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.36、0.53、0.80 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合、高濃度群(0.80 mg/mL)においてのみ構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加(出現率:5.5%)が認められた。それ以外は、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的有意差は認められなかった(Table 1)。

S9 mix 存在下で短時間処理した場合も同様に、高濃度群(0.80 mg/mL)でのみ構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加(出現率:19.0%)が認められ、それ以外はいずれも統計学的有意差は認められなかった(Table 2)。

以上のように、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、それぞれ疑陽性および陽性の結果が得られたが、被験物質調製液を培養液に添加した際、1.2 mg/mL 以上の濃度群では培養液の黄色化が認められ、処理開始時の処理液の pH を測定したところ、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した 1.2 mg/mL の濃度群ではそれぞれ 5.79 および 6.04、1.8 mg/mL の濃度群ではそれぞれ 5.85 および 6.02 であった。構造異常が有意に増加した 0.80 mg/mL の濃度群では、処理開始時の処理液の pH を測定しなかったが、培養液の色は橙色であり、また、処理終了時の培養液の色は 1.8 mg/mL の濃度群で淡い黄色に変色した以外は特に培養液の色の変化は認められなかった。従って、短時間処理群における染色体分析の結果が、培養液の酸性化による可能性は低いと考えられた。しかしながら、その可能性を完全に否定できないことから、24 時間連続処理による染色体異常試験を実施するとともに、S9 mix 存在下の短時間処理については、pH 調整した群も設けて確認試験を実施した。24 時間連続処理群については、細胞増殖抑制試験結果をもとに公比 1.5 で以下の濃度群を設定し、S9 mix 存在下の短時間処理群については、最初の試験と同じ濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

24 時間連続処理:0.14、0.21、0.31、0.47、0.70 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理(pH 非調整):0.36、0.53、0.80、1.2、1.8 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理(pH 調整):0.36、0.53、0.80、1.2、1.8 mg/mL

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに、観察対象群を以下のように決定し、染色体分析を行った。

24 時間連続処理:0.14、0.21、0.31 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理(pH 非調整):0.36、0.53、0.80 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理(pH 調整): 0.53、0.80、1.2 mg/mL

染色体分析の結果、24 時間連続処理した場合には、いずれの処理群においても構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 3)。

S9 mix 存在下での短時間処理による確認試験においては、pH 非調整群では高濃度群(0.80 mg/mL)で 11.0%の細胞に染色体の構造異常が誘発され、再現性のある結果が得られた。また、中濃度群(0.53 mg/mL)と高濃度群(0.80 mg/mL)で倍数性細胞の統計学的に有意な増加(出現率:それぞれ 2.5%および 1.5%)が認められたほか、核内倍加した細胞(倍数性細胞)も観察された(Table 4)。また、pH 調整群については、0.80 mg/mL の濃度群では染色体の構造異常の統計学的に有意な増加は認められなかったが、高濃度群(1.2 mg/mL)で観察した細胞の 31.5%に染色体の構造異常が誘発された。また、低濃度群(0.53 mg/mL)で倍数性細胞の統計学的に有意な増加(出現率:1.6%)が認められたほか、核

内倍加した細胞も観察された(Table 4)。

以上のように、S9 mix 存在下で短時間処理した場合、構造異常を有する細胞が誘発されたが、処理開始時の処理液の pH は 6.73 であり、処理終了時の培養液の色は特に変化は認められなかったことから、誘発された構造異常は培養液の酸性化ではなく、被験物質そのものによって誘発されたと考えられる。これは、pH 調整群においても染色体の構造異常が誘発されたことからも pH の影響ではなく、被験物質そのものによって染色体異常が誘発されたことを示している。

なお、トリチオシアヌル酸については、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験(試験計画番号:M-04-075)で陰性の結果が得られている。

陽性の結果が得られた S9 mix 存在下の短時間処理に関して D20 値[4)]を求めたところ、構造異常については 1.1 mg/mL、倍数性細胞については対象外となった。なお、構造異常については複数の陽性結果が得られたことから、各結果について D20 値を算出したが、最終的に S 値の最も小さくなる D20 値を採用した。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理において染色体の構造異常を誘発し(Tables 1、3)、CP は短時間処理の S9 mix 存在下において染色体の構造異常を誘発した(Tables 2、4)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

以上の結果より、トリチオシアヌル酸は本試験条件において CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

参考文献

1) 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)

2) 吉村 功 編:「毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ」, サイエンティスト社, 東京(1987)

3) 吉村 功, 大橋靖夫 編集:「毒性試験講座 14, 毒性試験データの統計解析」, 地人書館, 東京(1992)

4) 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)

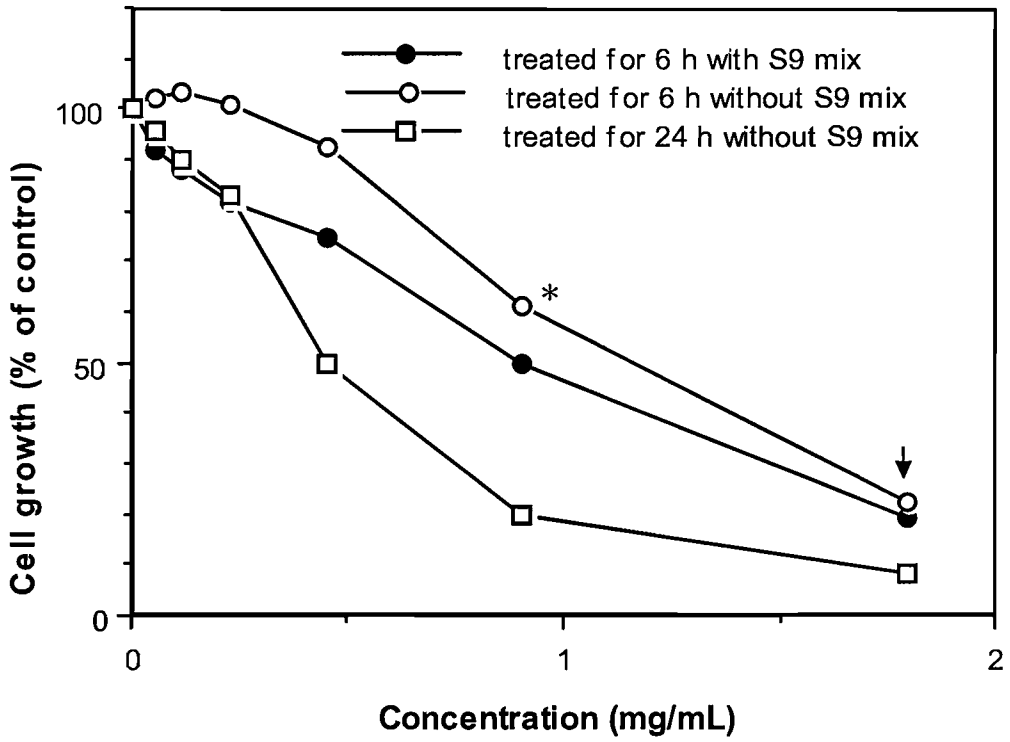

Figure 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,3, 5-Triazine-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-trithione

At 0.90 mg/mL (*) for the short-term treatment without S9 mix, precipitation was observed only at the end of the treatment in the medium by the naked eye. At 1.8 mg/mL (arrow) for the all treatment groups, precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H) -trithione (TTC)** for 6 h without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent [2] cell growth (%)	Mitotic [3] index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others [5]	Number of cells with aberrations		Number [6] of polyploid cells (%)	Trend test [7]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative [1]	0	−	6 - (18)	100.0	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						100	2	0	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						200	2	0	0	1	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	2 (0.3)		
TTC	0.36[mob]	−	6 - (18)	84.0	—	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						100	1	1	3	0	0	0	5	0	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						200	1	2	3	0	0	0	6	0	4 (2.0)	3 (1.5)	1 (0.1)		
TTC	0.53[mob]	−	6 - (18)	68.5	—	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	+	NA
TTC	0.80[mob]	−	6 - (18)	54.5	9.2, 8.6	100	0	1	9	0	0	0	10	0	5 (5.0)	5 (5.0)	1 (0.3)		
						100	4	4	6	0	0	10	24	0	9 (9.0)	6 (6.0)	0 (0.0)		
						200	4	5	15	0	0	10	34	0	14 (7.0)	11 *(5.5)	1 (0.1)		
TTC	1.2[pb, myb]	−	6 - (18)	19.5	—	not made chromosome specimen													
TTC	1.8[pb, mybe]	−	6 - (18)	9.0	—	not made chromosome specimen													
MMC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	—	—	100	2	25	42	2	0	10	81	0	51 (51.0)	49 (49.0)	1 (0.3)		
						100	5	30	47	0	0	0	82	0	51 (51.0)	49 (49.0)	0 (0.0)		
						200	7	55	89	2	0	10	163	0	102 (51.0)	98 *(49.0)	1 (0.1)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrationss; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.
3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$ (one-side) .

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 99.8% and sulfur was 0.13% as impurity.

pb, Precipitation was observed at the beginning of the treatment in the medium by the naked eye.

mob, Medium color changed to orange at the beginning of the treatment.

myb, Medium color changed toyellow at the beginning of the treatment.

mybe, Medium color changed to yellow at the beginning and the end of the treatment.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H) -trithione (TTC)** for 6 h with S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent [2] cell growth (%)	Mitotic [3] index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others [5]	Number of cells with aberrations		Number [6] of polyploid cells (%)	Trend test [7]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative [1]	0	−	6 - (18)	100.0	—	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						100	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						200	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)		
TTC	0.36[mob]	+	6 - (18)	95.5	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.1)		
TTC	0.53[mob]	+	6 - (18)	87.0	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)		
						100	3	0	1	0	0	0	4	0	4 (4.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						200	3	0	1	0	0	0	4	0	4 (2.0)	1 (0.5)	3 (0.4)	+	NA
TTC	0.80[mob]	+	6 - (18)	72.5	6.0, 7.6	100	0	13	30	3	0	0	46	0	23 (23.0)	23 (23.0)	1 (0.3)		
						100	0	9	15	0	0	0	24	0	15 (15.0)	15 (15.0)	1 (0.3)		
						200	0	22	45	3	0	0	70	0	38 (19.0)	38 *(19.0)	2 (0.3)		
TTC	1.2[pb, myb]	+	6 - (18)	27.0	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
TTC	1.8[pb, mybe]	+	6 - (18)	20.0	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
CP	10 μg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	2	7	45	1	0	0	55	1	41 (41.0)	40 (40.0)	0 (0.0)		
						100	3	17	37	1	0	0	58	0	37 (37.0)	37 (37.0)	0 (0.0)		
						200	5	24	82	2	0	0	113	1	78 (39.0)	77 *(38.5)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrationss; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.
3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$ (one-side) .

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 99.8% and sulfur was 0.13% as impurity.

pb, Precipitation was observed at the beginning of the treatment in the medium by the naked eye.

mob, Medium color changed to orange at the beginning of the treatment.

myb, Medium color changed to yellow at the beginning of the treatment.

mybe, Medium color changed to yellow at the beginning and the end of the treatment.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H) -trithione (TTC)** for 24 h without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	Time of exposure (h)	Concurrent [2] cell growth (%)	Mitotic [3] index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others [5]	Number of cells with aberrations		Number [6] of polyploid cells (%)	Trend test [7]	
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative [1]	0	24	100.0	—	100	1	2	0	0	0	0	3	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
					200	1	2	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	2 (0.3)		
TTC	0.14	24	89.0	—	100	1	1	2	0	0	0	4	1	3 (3.0)	2 (2.0)	1 (0.3)		
					100	0	1	2	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
					200	1	2	4	0	0	0	7	1	6 (3.0)	5 (2.5)	2 (0.3)		
TTC	0.21	24	80.5	—	100	2	1	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
					100	1	4	1	0	0	0	6	0	5 (5.0)	5 (5.0)	1 (0.3)		
					200	3	5	1	0	0	0	9	0	8 (4.0)	6 (3.0)	1 (0.1)	NA	NA
TTC	0.31	24	78.5	4.8, 3.8	100	0	2	2	0	0	0	4	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
					100	2	4	0	1	0	0	7	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)		
					200	2	6	2	1	0	0	11	0	8 (4.0)	7 (3.5)	0 (0.0)		
TTC	0.47[pb, mob]	24	45.0	0.6, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
TTC	0.70[pb, mob]	24	38.0	0.0, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
MMC	0.1 μg/mL	6 - (18)	—	—	100	3	20	42	1	0	0	66	0	48 (48.0)	45 (45.0)	0 (0.0)		
					100	1	30	38	1	0	0	70	0	45 (45.0)	45 (45.0)	0 (0.0)		
					200	4	50	80	2	0	0	136	0	93 (46.5)	90 *(45.0)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrationss; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.
3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$ (one-side) .

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 99.8% and sulfur was 0.13% as impurity.

pb, Precipitation was observed at the beginning of the treatment in the medium by the naked eye.

mob, Medium color changed to orange at the beginning of the treatment.

Table 4 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H) -trithione (TTC)** for 6 h with S9 mix (confirmation test)

Group	Concen-tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent [2] cell growth (%)	Mitotic [3] index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others [5]	Number of cells with aberrations		Number [6] of polyploid cells (%)	Trend test [7]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative [1]	0	+	6 - (18)	100.0	—	100	0	1	0	3	0	0	4	0	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (0.5)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						200	0	1	0	3	0	0	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	2 (0.3)		
TTC	0.36	+	6 - (18)	90.0	—	100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	1 (0.3) #		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						200	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	1 (0.1)		
TTC	0.53[pb, mob]	+	6 - (18)	90.0	—	100	2	1	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	16 (4.0) #		
						100	0	2	0	0	0	0	2	0	1 (1.0)	1 (1.0)	4 (1.0) #		
						200	2	3	0	0	0	0	5	0	4 (2.0)	2 (1.0)	20 *(2.5)	+	+
TTC	0.80[pb, mob]	+	6 - (18)	75.5	10.4, 10.0	100	1	3	8	0	0	0	12	0	9 (9.0)	9 (9.0)	7 (1.8) #		
						100	0	8	9	0	0	0	17	0	13 (13.0)	13 (13.0)	5 (1.3) #		
						200	1	11	17	0	0	0	29	0	22 (11.0)	22 *(11.0)	12 *(1.5)		
TTC	1.2[pb, myb]	+	6 - (18)	35.5	0.0, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
TTC	1.8[pb, mybe]	+	6 - (18)	25.0	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
TTC-pH adjusted	0.36	+	6 - (18)	89.5	—	not observed													
TTC-pH adjusted	0.53[pb]	+	6 - (18)	95.0	—	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	6 (1.5) #		
						100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	7 (1.8) #		
						200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	13 *(1.6)		
TTC-pH adjusted	0.80[pb]	+	6 - (18)	90.0	—	100	0	4	0	1	0	0	5	0	4 (4.0)	4 (4.0)	1 (0.3)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5) #		
						200	0	4	0	1	0	0	5	0	4 (2.0)	4 (2.0)	3 (0.4)	+	−
TTC-pH adjusted	1.2[pb]	+	6 - (18)	77.0	6.6, 6.6	100	2	14	32	1	0	0	49	0	26 (26.0)	26 (26.0)	2 (0.5) #		
						100	3	16	61	0	0	0	80	0	38 (38.0)	37 (37.0)	3 (0.8)		
						200	5	30	93	1	0	0	129	0	64 (32.0)	63 *(31.5)	5 (0.6)		
TTC-pH adjusted	1.8[pb]	+	6 - (18)	33.0	0.2, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
CP	10 μg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	4	12	34	2	0	0	52	1	35 (35.0)	33 (33.0)	1 (0.3)		
						100	2	9	29	2	1	0	43	0	35 (35.0)	35 (35.0)	1 (0.3)		
						200	6	21	63	4	1	0	95	1	70 (35.0)	68 *(34.0)	2 (0.3)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrationss; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations cxcluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.
3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$ (one-side) .

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 99.8% and sulfur was 0.13% as impurity.

pb, Precipitation was observed at the beginning of the treatment in the medium by the naked eye.

mob, Medium color changed to orange at the beginning of the treatment.

myb, Medium color changed to yellow at the beginning of the treatment.

mybe, Medium color changed to yellow at the beginning and the end of the treatment.

#, Endoreduplication was observed in polyploid cells.