試験番号 G-09-021

最終報告書

2,4,6-トリメルカプト-S-トリアジンの
マウスを用いる小核試験

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

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523　神奈川県秦野市落合729-5

TEL　0463-82-4750

目次

要約 5

材料と方法 6
1. 被験物質 6
2. 陰性対照物質 6
3. 陽性対照物質 6
4. 使用動物と飼育条件 7
5. 投与検体の調製 7
6. 投与方法 8
7. 試験操作、観察と解析 8
1) 毒性予備試験 8
2) 小核本試験 9

試験成績と考察 11
1. 毒性予備試験 11
2. 小核本試験 11
参考文献 12
Tables 13

要約

2,4,6-トリメルカプト-S-トリアジンが生体内において染色体異常誘発性を有するか否かを評価するため、ICR 系マウスを用いた強制経口投与による小核試験を実施した。まず、小核本試験における投与量を設定するため毒性予備試験を行い、その結果に基づき小核本試験を実施した。

毒性予備試験は、雌雄マウスを用いて、被験物質を 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の用量で、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間連続強制経口投与した。その結果、雄の 2000 mg/kg/day 投与群と雌の 1000 mg/kg/day 投与群でそれぞれ 3 例中 1 例に自発運動低下と立毛が観察され、2000 mg/kg/day 投与群で雌雄各 1 例が死亡した。

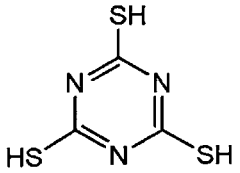
毒性予備試験の結果に基づき、小核本試験は陰性対照群(媒体)、被験物質投与群(250、500 および 1000 mg/kg/day)および陽性対照群(cyclophosphamide monohydrate)の計 5 群を設定し、雄マウスを用いた。陰性対照群および被験物質投与群は、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間連続強制経口投与し、陽性対照群は 50 mg/kg の用量で、単回強制経口投与した。いずれの投与群も、最終投与の約 24 時間後に骨髄塗抹標本を作製して小核の観察を行った。その結果、被験物質投与による小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群の小核出現頻度は 1%水準で有意な増加が認められ、本試験系の妥当性が確認された。なお、赤血球中に占める幼若赤血球の比率には、陰性対照群とその他の群との間に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、2,4,6-トリメルカプト-S-トリアジンはマウス骨髄細胞において染色体異常誘発作用を示さないもの(陰性)と結論する。

材料と方法

1. 被験物質

2,4,6-トリメルカプト-S-トリアジン(別名:トリチオシアヌル酸、英名:2,4,6-Trimercapto-S-triazine、CAS No. 638-16-4、分子式:$C_3H_3N_3S_3$、分子量:177.27、純度:98.2%、Appendix 1)は淡黄色の粉末で、購入し(購入年月日:2009年9月29日)、使用時まで室温(実測値:17.0～23.2℃)で保管した。2,4,6-トリメルカプト-S-トリアジンの構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、投与開始前(2009年11月18日)および投与期間終了後(2009年12月14日)に、臭化カリウム錠剤を作製後、フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300、島津製作所)を用いて、4000 cm^{-1}～400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことを確認した(Appendix 2)。

2. 陰性対照物質

陰性対照物質および被験物質の媒体として、0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液(略称:0.5%CMC Na)を用いた。0.5%CMC Na は、日局カルメロースナトリウム(ロット番号:7213、丸石製薬)を日局注射用水(製造番号:A89AA1、光製薬)に溶解して 0.5 w/v%溶液を調製し、冷蔵、遮光下で保管したものを調製後 1 週間以内に使用した。

3. 陽性対照物質

陽性対照物質として、cyclophosphamide monohydrate(略称:CP、CAS No. 6055-19-2、純度:98.0%、ロット番号:068K1131、製造者:Sigma Chemical)を用いた。CP(購入年月日:2009年9月29日、使用期限:購入後5年)は、使用時まで冷蔵で保管した。

4. 使用動物と飼育条件

日本チャールス・リバー厚木飼育センターから8週齢で購入したICR系マウス[Crlj:CD1(ICR)、SPF]を、入荷日を含む7日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間、毎日1回一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。試験には、検疫期間中の体重が順調に増加し、一般状態に異常の認められなかった動物を9週齢で使用した。検疫期間中は油性フェルトペンにより尾に馴化番号を記し、試験番号、性別、馴化番号および入荷日を記載した動物カードを飼育ケージに付けて識別した。各試験に用いた動物の入荷日、匹数および入荷時体重範囲を下表に示す。余剰動物および毒性予備試験に使用した動物は、各試験の動物飼育終了時に炭酸ガス吸入により安楽死させた。

試験	入荷日	入荷動物数(使用数/余剰数)	入荷時体重範囲
毒性予備試験	2009年11月18日	雄15匹(12/3)	30.1～34.7 g
		雌15匹(12/3)	23.2～27.6 g
小核本試験	2009年12月2日	雄30匹(25/5)	28.6～36.1 g

動物は、全飼育期間を通じて、許容温度:21.0～25.0℃、許容湿度:40.0～75.0%、換気設定:約15回／時間、明暗サイクル:12時間(7時～19時)点灯、12時間(19時～7時)消灯に設定された飼育室内で、床敷としてペパークリーン(日本エスエルシー)を入れたTPX樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm、日本チャールス・リバー)に個別に収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。全飼育期間中における飼育室の温度および湿度の実測値はそれぞれ22.5～24.0℃および 52.0～68.0%であり、いずれも許容範囲内であった。また、供給した飼料、飲料水および床敷の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

動物の群分けは、検疫終了時の測定体重(平均±20%以内の動物を用いた)をもとに、体重別層化無作為抽出法により行った。群分け後の動物には、油性フェルトペンにより尾に動物番号を記し、群ごとに色の異なる動物カードに、試験番号、性別、群(投与量)および動物番号を記入して飼育ケージに付けて識別した。余剰動物は、検疫期間中の識別法を継続した。

5. 投与検体の調製

被験物質は、0.5%CMC Na水溶液中で均一な懸濁状態が得られることが確認されているため、媒体として 0.5%CMC Na を用いた。秤量した被験物質を、乳鉢および乳棒で磨砕後、媒体を加えて最高濃度の被験物質投与検体を調製し、以下同媒体で段階希釈して各濃度の投与検体を調製した。被験物質投与検体は、冷蔵(実測値:2～5℃)、遮光下で保管し、調製後 3 日以内に使用した。被験物質投与検体の調製濃度を以下に示した。

毒性予備試験: 25、50、100 および 200 mg/mL

小核本試験: 25、50 および 100 mg/mL

なお、0.5%CMC Naを媒体とした約0.5 mg/mLおよび約200 mg/mLの被験物質投与検体については、

冷蔵、遮光下で8日間安定であることが秦野研究所において確認されている(試験番号:A-04-007)。

小核本試験に用いた全ての被験物質投与検体について、秦野研究所で高速液体クロマトグラフ(HPLC)法を用いて含量測定および均一性試験を実施した。その結果、各投与検体中における被験物質の平均含量は 97.7～99.1%であり、各測定値のばらつきは 97.5～101%であった(Appendix 3)。これらの値は、試験計画書に記載した判定基準の範囲内(平均含量:調製濃度の 85.0～115%、各測定値のばらつき:平均値の 90.0%～110%)であった。分析法を以下に示す。

各調製検体の0.5 mLを採取し、メタノールで一定量とした後、同溶媒で適宜希釈して試料溶液を調製した。別に、被験物質を必要量秤取し、メタノールに溶解して標準溶液(0.5、2、4 μg/mL)を調製した。試料溶液および標準溶液をHPLC法により測定し、標準溶液から作成する検量線を用いて濃度を求めた。

HPLC 条件

分析カラム:	Atlantis dC_{18} (内径 4.6 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μm、Waters)
移動相:	0.1%りん酸/メタノール混液(4:1 v/v)
流速:	1.0 mL/min
カラム設定温度:	40℃
試料設定温度:	室温
検出波長:	294 nm
試料注入量:	10 μL
オートインジェクタ洗浄液:	水/メタノール混液(1:2 v/v)

陽性対照物質の CP については、秤量後、日局生理食塩液(製造番号:K9A95、大塚製薬工場)に溶解して、5 mg/mL 溶液を調製して使用した。調製は用時に行った。

6. 投与方法

陰性対照物質と被験物質の投与経路および投与回数は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づき強制経口投与とし、注射筒およびマウス用胃管を用いて1日1回、2日間(24時間間隔)連続して行った。陽性対照物質は、注射筒およびマウス用胃管を用いて単回強制経口投与した。投与は、いずれも10時～11時の間に行った。投与容量は 10 mL/kg とし、初回投与の直前に測定した体重に基づいて個別に投与液量を算出した。初回投与時の体重範囲は、毒性予備試験では雄:33.9～38.1 g、雌:25.8～29.3 g、小核本試験では雄:32.4～39.2 g であった。

7. 試験操作、観察と解析

1)毒性予備試験

①試験群の設定

毒性予備試験においては、雌雄のマウスを用いて 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、各群とも雌雄各3匹の動物に投与した。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号	
			雄	雌
250 mg/kg/day 投与群	10	2	T1～T3	T13～T15
500 mg/kg/day 投与群	10	2	T4～T6	T16～T18
1000 mg/kg/day 投与群	10	2	T7～T9	T19～T21
2000 mg/kg/day 投与群	10	2	T10～T12	T22～T24

②一般状態の観察

動物の生死および一般状態の観察は、各投与の直後、約 6 時間後および 22～24 時間後に行った。

2) 小核本試験

①試験群の設定

毒性予備試験の結果に基づき、雄マウスを用いて 250、500 および 1000 mg/kg/day の被験物質投与群、陰性対照群(媒体:10 mL/kg/day)および陽性対照群(CP:50 mg/kg)を加えた 5 群構成とし、各群 5 匹の動物に投与した。なお、陽性対照物質の CP は、ICR 系雄マウスに 50 mg/kg の用量を単回強制経口投与した場合、投与の 24 時間後に小核を有する幼若赤血球の出現頻度が有意に増加することが、秦野研究所で確認されている。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号
陰性対照群(0.5% CMC Na)	10	2	1～5
250 mg/kg/day 投与群	10	2	6～10
500 mg/kg/day 投与群	10	2	11～15
1000 mg/kg/day 投与群	10	2	16～20
陽性対照群(CP:50 mg/kg)	10	1	21～25

②一般状態の観察

動物の生死および一般状態の観察は、各投与の直後、約 6 時間後および 22～24 時間後に行った。

③骨髄塗抹標本の作製

骨髄塗抹標本の作製は、Hayashi らの報告[1)]に従って最終投与の約 24 時間後に行った。頸椎脱臼法によりマウスを安楽死させ、両側の大腿骨を摘出した後、その両端を切断して 0.6 mL のウシ胎児血清(ロット番号:378712、Invitrogen)で骨髄細胞を遠心管に洗い出し、200×*g*で 5 分間遠心分離した。上清を除いた後、遠心管に残った少量の血清で沈渣を再懸濁させ、骨髄細胞浮遊液を作製した。塗抹標本

は各個体につき 3 枚作製し、自然乾燥後、メタノールで 5 分間固定した。各塗抹標本は、フロスト部分に試験番号、動物番号およびスライド番号を記入して識別し、メタノール固定後の塗抹標本には、コード番号表に従って、試験番号、コード番号およびスライド番号を記したラベルを貼付してコード化し、標本観察時まで室温で保管した。

④骨髄塗抹標本のアクリジンオレンジ(AO)蛍光染色および標本観察

ゼーレンゼンの 1/15 mol/L リン酸緩衝液に溶解した 40 μg/mL の AO 溶液を標本観察の直前に骨髄塗抹標本に数滴滴下してカバーグラスをかけ、510 nm の吸収フィルターが装着されたブルー励起の蛍光顕微鏡下で、100 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズを用いて観察した。骨髄塗抹標本は、各個体について 2 名の観察者により 1 匹あたり 2000 個(1 名あたり 1000 個)の幼若赤血球を観察し、そのうち小核を有する幼若赤血球の数を記録した。また、骨髄細胞(赤血球)の増殖抑制の指標として、1 匹あたり 1000 個(1 名あたり 500 個)の赤血球を観察して、幼若赤血球の数を記録した。

⑤統計解析

A. 小核出現頻度

陰性対照群と陽性対照群の小核出現頻度(平均値)が、背景データのばらつきの範囲(平均値±3×標準偏差)内にあるか否かを調べた。なお、背景データは、秦野研究所で 2006 年度から 2008 年度に実施した小核試験の陰性対照値および陽性対照値とした。

小核出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群および陽性対照群の間で、Fisher の正確確率検定法(片側検定)を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して Bonferroni の補正[2)]を行い、有意水準は 5%および 1%とした。また、小核出現頻度の用量(対数値)依存性については、Cochran-Armitage の傾向検定[3)](片側検定)を行い、有意水準は 5%および 1%とした。

B. 赤血球中に占める幼若赤血球の比率

赤血球中に占める幼若赤血球の比率については、まず Bartlett 検定[4)]により陽性対照群を除く各群の分散の一様性について検定を行った。その結果、等分散であったことから、Dunnett 検定[5)](両側検定)を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均値の差の検定を行った。陰性対照群と陽性対照群との比較については、F 検定[4)]により 2 群の分散の一様性について検定を行い、等分散であったことから Student の t 検定[4)](両側検定)を行った。Bartlett 検定および F 検定の有意水準は 5%とし、Dunnett 検定および Student の t 検定の有意水準はいずれも 5%および 1%とした。

被験物質が骨髄細胞の増殖へ影響を及ぼすか否かは、幼若赤血球の比率に関する統計解析の結果を基に、用量反応性および陰性対照群の背景データ等を参考にして判断した。

⑥判定

被験物質が生体内において染色体異常誘発作用を示すか否かの判定は、統計解析の結果を基に、

用量反応性および陰性対照群の背景データ、骨髄細胞増殖への影響等を参考にして総合的に行った。

試験成績と考察

1. 毒性予備試験

毒性予備試験における一般状態および死亡率を Table 1 に示す。雄の 2000 mg/kg/day 投与群と雌の 1000 mg/kg/day 投与群でそれぞれ 3 例中 1 例に自発運動低下と立毛が観察され、2000 mg/kg/day 投与群で雌雄各 1 例が死亡した。

以上の結果から、雌雄とも最大耐量は 1000 mg/kg/day であり、一般状態の変化に明らかな性差は認められなかったことから、小核本試験では雄を用い、1000 mg/kg/day を高用量に設定した。

2. 小核本試験

小核本試験における一般状態および死亡率を Table 2 に示す。いずれの投与群においても、一般状態の変化および死亡例は観察されなかった。

小核出現頻度および赤血球中に占める幼若赤血球の比率を Table 3 に示す。陰性対照群および陽性対照群の小核出現頻度(平均値)は、いずれも秦野研究所の背景データ(Appendix 4)のばらつきの範囲(平均値±3×標準偏差)内であった。

被験物質投与群の小核出現頻度は、いずれの用量においても陰性対照群と比較して有意な増加は認められず、用量に依存して有意に増加する傾向もみられなかった。一方、CP を投与した陽性対照群では、1%水準で有意な小核出現頻度の増加が確認され、本試験系の妥当性が確認された。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、陰性対照群とその他の群との間に有意な差は認められず、被験物質の投与による骨髄細胞(赤血球)の増殖抑制作用はないと判断した。

本被験物質に関しては、秦野研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号: M-04-075)では陰性、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(試験番号: G-04-065)では陽性の結果が報告されているが、今回行った試験条件下では、被験物質投与による小核誘発性は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、2,4,6-トリメルカプト-S-トリアジンはマウス骨髄細胞において染色体異常誘発作用を示さないもの(陰性)と結論する。

参考文献

1) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T.: In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutat. Res. 312: 293-304 (1994)

2) Margolin, B. H., Resnick, M. A., Rimpo, J. Y., Archer, P., Galloway, S. M., Bloom, A. D., Zeiger, E.: Statistical analyses for in vitro cytogenetic assays using Chinese hamster ovary cells. Environ. Mutagen. 8: 183-204 (1986)

3) Margolin, B. H., Risko, K. J.: In "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" Ashby, J. et al. eds., Cambridge Univ. Press (1988), vol.1. pp. 29-42

4) Snedecor, G. W., Cochran, W. G.: In "Statistical Methods" 7th ed., Iowa State University Press, Iowa (1980)

5) Dunnett, C. W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. Am. Statist. Assoc. 50: 1096-1121 (1955)

Table 1 General condition and mortality in CD1(ICR) mice after double oral administrations of 2,4,6-Trimercapto-S-triazine in the preliminary toxicity test

Sex	Dose (mg/kg/day)	Number of mice administered	General condition	Number of mice: Hours after the 1st administration 0	6	22-24	Hours after the 2nd administration 0	6	22-24	Mortality
Male	250	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	500	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	1000	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	2000	3	No abnormality	3	3	3	3	3	1	1 / 3
			Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	1	
			Piloerection	0	0	0	0	0	1	
			Death	0	0	0	0	0	1	
Female	250	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	500	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	1000	3	No abnormality	3	3	3	3	3	2	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	1	
			Piloerection	0	0	0	0	0	1	
	2000	3	No abnormality	3	3	3	3	3	2	1 / 3
			Death	0	0	0	0	0	1	

Table 2 General condition and mortality in male CD1(ICR) mice after double oral administrations of 2,4,6-Trimercapto-S-triazine in the micronucleus test

Dose	Number of mice administered	General condition	Number of mice						Mortality
			Hours after the 1st administration			Hours after the 2nd administration			
			0	6	22-24	0	6	22-24	
Negative control 0.5%CMC Na 10 mL/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
2,4,6-Trimercapto-S-triazine 250 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
2,4,6-Trimercapto-S-triazine 500 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
2,4,6-Trimercapto-S-triazine 1000 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
Positive control CP 50 mg/kg	5	No abnormality	5	5	5	-	-	-	0 / 5

0.5% CMC Na, 0.5% Carboxymethylcellulose sodium salt solution
CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)

Table 3 Results of micronucleus test in male CD1(ICR) mice after double oral administrations of 2,4,6-Trimercapto-S-triazine

Group	Animal No.	% of MNPCEs[a]	% of PCEs in ERYs[b]
Negative control 0.5% CMC Na 10 mL/kg/day	1	0.15	50.1
	2	0.10	56.4
	3	0.25	62.0
	4	0.15	57.6
	5	0.10	57.9
	Total	15 / 10000	2840 / 5000
	Mean ± S.D.	0.15 ± 0.06	56.8 ± 4.3
	Min. - Max.	0.10 - 0.25	50.1 - 62.0
2,4,6-Trimercapto-S-triazine 250 mg/kg/day	6	0.20	64.8
	7	0.20	52.4
	8	0.15	56.1
	9	0.15	55.5
	10	0.15	59.1
	Total	17 / 10000	2879 / 5000
	Mean ± S.D.	0.17 ± 0.03	57.6 ± 4.7
	Min. - Max.	0.15 - 0.20	52.4 - 64.8
2,4,6-Trimercapto-S-triazine 500 mg/kg/day	11	0.05	57.8
	12	0.10	55.8
	13	0.25	66.3
	14	0.10	52.9
	15	0.20	62.5
	Total	14 / 10000	2953 / 5000
	Mean ± S.D.	0.14 ± 0.08	59.1 ± 5.3
	Min. - Max.	0.05 - 0.25	52.9 - 66.3
2,4,6-Trimercapto-S-triazine 1000 mg/kg/day	16	0.20	60.8
	17	0.05	58.7
	18	0.25	53.9
	19	0.15	64.1
	20	0.00	60.1
	Total	13 / 10000	2976 / 5000
	Mean ± S.D.	0.13 ± 0.10	59.5 ± 3.7
	Min. - Max.	0.00 - 0.25	53.9 - 64.1
Positive control CP 50 mg/kg	21	3.30	55.3
	22	2.15	43.2
	23	1.95	63.7
	24	2.00	55.2
	25	1.80	51.4
	Total	224 / 10000 **	2688 / 5000
	Mean ± S.D.	2.24 ± 0.61	53.8 ± 7.4
	Min. - Max.	1.80 - 3.30	43.2 - 63.7

a, % of micronucleated polychromatic erythrocytes in polychromatic erythrocytes observed
b, % of polychromatic erythrocytes in erythrocytes observed
0.5% CMC Na, 0.5% Carboxymethylcellulose sodium salt solution
CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)
**, Significantly higher than the negative control at 1% level (Fisher's exact probability test)