

# (トリフルオロメチル)ベンゼンのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Trifluoromethylbenzene by Oral Administration in Rats

### 要 約

(トリフルオロメチル)ベンゼンは、化学産業の分野で染料あるいは高重合体の原料として使用されている化学物質である。本被験物質の経口投与によるLD<sub>50</sub>値は、マウスで10000 mg/kg、ラットで15000 mg/kgであることが報告されているが<sup>1)</sup>、反復投与毒性あるいは生殖発生毒性についての報告は見当たらない。今回、OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性試験の一環として、(トリフルオロメチル)ベンゼンの、20、100および500 mg/kgをCrj:CD(SD系)ラットの雌雄(各12匹/群)に交配前14日間、雄ではその後交配期間を含む35日間、雌では交配期間、妊娠期間および分娩後3日まで経口投与し、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

#### 1.反復投与毒性

一般状態、体重推移、摂餌量および血液学検査では、被験物質投与の影響はみられなかった。血液生化学検査では、500 mg/kg群に総蛋白質、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライドおよびリン脂質の増加ならびにグルコースの減少が認められた。剖検では、500 mg/kg群の雄で腎臓の肥大および退色がみられ、器官重量では雄で100 mg/kg以上の群に肝臓および腎臓重量の増加、雌では500 mg/kg群に肝臓重量の増加が認められた。病理組織学検査では、100 mg/kg以上の群の雌雄で小葉中心性の肝細胞の肥大がみられ、雄で近位尿細管上皮の硝子滴の出現、壊死および好塩基性変化ならびに近位尿細管の拡張が認められた。

#### 2.生殖発生毒性

親動物の生殖に関しては、性周期、雌雄の交尾率、授(受)胎率、黄体数、着床数、妊娠期間、出産率および分娩状態に被験物質投与の影響は認められなかった。死産率、出生児数、出生率および出生児の性比に被験物質投与の影響はみられず、外表異常の発生もなかった。出生児体重の増加抑制が20 mg/kg以上の投与群でみられたが、剖検では被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも20 mg/kg、生殖発生毒性に関する無影響量は親動物では500 mg/kg、出生児では

20 mg/kg未満と推察された。

### 方 法

#### 1.被験物質および投与液の調製

(トリフルオロメチル)ベンゼン(純度99.7%, Lot No.KCM2054, 和光純薬工業(株)提供)は、エタノールおよびエーテルに易溶、水に不溶の無色透明の液体である。入手後の被験物質は室温で保管し、投与期間終了後に供給源にて分析を行って試験期間中安定であったことを確認した。媒体にはコーンオイル(キシダ化学(株), Lot No L51257F)を使用し、これに被験物質を0.4、2および10 w/v%濃度になるように懸濁して投与液を調製した。調製した投与液は冷蔵保存した。なお、投与開始週に、投与液の濃度を測定し、設定値の±10%以内にあることを確認した。また、投与開始前に、本調製法による0.1、1および10 w/v%懸濁液が低温遮光下で調製後8日間安定であることを確認した。

#### 2.使用動物および飼育条件

9週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, 日本チャールス・リバー(株))を雌雄各55匹購入し、7日間の検疫馴化を行ったのち、雌雄各48匹を選んで10週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は雄で319.7~391.2g、雌で224.7~265.0gであった。動物は温度24±2℃、湿度55±10%、照明12時間(午前7時~午後7時)および換気回数13回/時に設定したバリアーシステム飼育室でステンレススチール製ハンガーケージに、投与期間中は1匹(雌雄別)、交配期間中は2匹(雌雄各1匹)、妊娠および哺育期間中は床敷(ホワイトフレック, 日本チャールス・リバー(株))を入れたポリカーボネイト製ケージに1匹ずつ(哺育期間中は哺育児を含む)収容し、飼育した。飼料は、固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業(株))を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2 ppm)した水をそれぞれ自由に摂取させた。

#### 3.投与量、投与方法、試験群構成および群分け

投与量は、予備試験の結果より設定した。すなわち、本被験物質の0、100、500および1000 mg/kgを2週間反復投与した結果、500 mg/kg以上の群でGPT、総コレステロールおよびリン脂質の増加または増加傾向ならびに肝臓重量の増加がみられ、100 mg/kg群にもその傾向が窺われた。したがって、本試験では高用量を500 mg/kgとし、以下100および20 mg/kgを設定した。

投与経路は経口とし、雄では交配前14日間およびその後交配期間を含む35日間の合計49日間、雌では交配前14日間、交配期間(最長14日間)、妊娠期間および哺育3日までの期間、1日1回、胃管を用いて投与した。投与容量は5 ml/kgとし、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については最新の体重を基に、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重を基にそれぞれ算出した。

試験群は、上記3用量にコーンオイルのみを投与する対照を加え計4群とした。1群当たりの動物数は雌雄各12匹とし、群分けは、投与開始前日の体重を基に層別連続無作為化法で行った。

#### 4.反復投与毒性に関する観察・検査

##### 1) 一般状態

雌雄とも、全例について一般状態の観察および死亡の有無を毎日観察した。

##### 2) 体重および摂餌量

体重については、雄は投与期間を通じて週2回測定した。雌は、交配前の投与期間および交配期間中は週2回、妊娠期間中は妊娠0, 4, 7, 10, 14, 17および21日、哺育期間中は哺育0(分娩日)および4日に測定した。摂餌量については、交配期間を除き体重測定日に測定したが、妊娠および哺育0日は測定せず、翌日測定した。

##### 3) 血液学検査

雄全例について、投与期間終了後に、18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム麻醉下に開腹し、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780, 東亜医用電子(株))を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)および血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、これらを基に平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)および平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

##### 4) 血液生化学検査

血液学検査に引き続き採取した血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10, (株)日立製作所)により、総蛋白質(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白質およびアルブミンより算出)、総ビリルビン(アルカリアゾビリルビン法)、GOT(Karmen法)、GPT(Wróblewski-La Due法)、 $\gamma$ -グルタミルトランスアミナーゼ(L- $\gamma$ -グルタミル-DBHA基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、総コレステロール(COD-DAOS法)、トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(酵素法・DAOS発色法)、グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(ウレアーゼ-GIDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、無機リン(モリブデン酸直接法)および

カルシウム(OCPC法)を測定した。また、電解質分析装置(PVA- $\alpha$ 皿, (株)アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)およびクロール(電量滴定法)を測定した。

##### 5) 病理学検査

雄では投与期間終了後の採血を行ったのちに、雌では哺育4日にエーテル麻醉下で外側腸骨動脈を切断して放血死させ、解剖して諸器官および組織の肉眼的観察を行い、雌について黄体数および着床痕数を調べた。剖検後、脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体および卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え、肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液(精巣および精巣上体はブアン液で前固定)で固定した。対照群および500 mg/kg群の脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体および卵巣については、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。さらに、肝臓、胸腺および腎臓については、被験物質投与に関連したと考えられる変化がみられたため、100 mg/kg以下の投与群のこれらの器官についても同様の検査を行った。また、一部の動物で肝臓および腎臓の脂肪染色を実施した。なお、肉眼的異常部位、交尾が確認されなかった雄の精巣、精巣上体および雌の卵巣については、すべて病理組織学検査を行った。

#### 5.生殖発生毒性に関する観察・検査

##### 1) 生殖機能

雌について交配開始日の2週間前(投与開始日)から交尾確認日まで、毎日午前の一時間に膣垢を採取し、性周期検査を行った。

交配は雌雄(12週齢)1対1で一晩同居させる方法で行い、翌朝膣垢中の精子または膣栓が確認されたものを交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。また、交配は同一群内で行い、交配期間は最長2週間とした。なお、交配相手が死亡した雌については、同群内の交尾が確認された雄と同居させた。交配期間終了後、交尾所要日数、交尾率 [(交尾動物数/同居動物数) × 100] および授(受)胎率 [(受胎動物数/交尾動物数) × 100] を算出した。

##### 2) 分娩および哺育状態ならびに新生児の観察

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩徴候を含め分娩状態および授乳、営巣などの哺育状態を観察するとともに、妊娠期間、出産率 [(生児出産雌数/妊娠雌数) × 100] を算出した。午後12時の時点で分娩が終了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。出産児については、分娩時に出産児数、出生児数、死産児数、出生児の性別および外表異常を検査した。出生児については、出生日および哺育4日に体重を個体

ごとに測定するとともに出生率〔(出生児数/着床痕数)×100〕および4日生存率〔(生後4日の生児数/出生児数)×100〕を算出した。生後4日に出生児の全例をエーテル麻酔下で放血致死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った。

## 6. 統計処理

体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、交尾所要日数、性周期検査値(発情回数、発情周期)、器官重量、妊娠期間、黄体数、着床痕数、総出産児数および出生児数については各群ごとに平均値と標準偏差を求め、Bartlett法により分散の均一性を検定した。分散が均一な場合は一元配置型の分散分析を行い、ここで群間に有意差が認められ、かつ、各群の例数が同じ場合はDunnett法により、異なる場合はScheffé法により対照群と各群の対比較検定を行った。分散が均一でない場合はKruskal-Wallisによって順位検定を行い、群間に有意差が認められ、かつ、各群の例数が同一の場合はDunnett型の、異なる場合はScheffé型の対比較検定を行った。上記分散分析あるいはKruskal-Wallis法で群間に有意差を認めない場合は各群の多重比較は行わなかった。また交尾率、受(授)胎率、出産率および出生児の性比については $\chi^2$ 検定により、死産率、出生率および4日生存率についてはWilcoxonの順位和検定により対照群と各投与群間の比較を行った。いずれの場合も有意水準を5%とした。なお、出生児に関する測定値については一腹単位で処理した。

## 結 果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

各投与群の雌雄とも投与期間を通して被験物質投与による一般状態の変化は認められなかった。なお、投与過誤により500 mg/kg群の雌雄各1例が死亡した。

#### 2) 体重(Fig.1) および摂餌量

各投与群の雌雄とも投与期間を通して体重および摂餌量に对照群との間の差は認められなかった。

#### 3) 血液学検査(Table 1)

500 mg/kg群でMCHにごく軽度の減少がみられたが、他の赤血球系パラメータに変動はみられず、毒性学的意義はないものと考えられた。

#### 4) 血液生化学検査(Table 2)

GOTの低下が100および500 mg/kg群で認められた。さらに、500 mg/kg群で総蛋白質、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質およびカルシウムの増加ならびにグルコースの減少が認められた。

#### 5) 器官重量(Table 3)

雄では、500 mg/kg群で肝臓および腎臓の絶対および

相対重量の増加がみられ、100 mg/kg群においても肝臓の絶対重量の増加傾向および相対重量の増加、腎臓の絶対および相対重量の増加傾向が認められた。

雌では、500 mg/kg群で肝臓の絶対および相対重量の増加が認められた。

## 6) 剖検所見

投与期間終了後の雄の剖検では、500 mg/kg群で腎臓の肥大が2例、退色が3例、小陥凹が1例に認められた。そのほか、对照群の1例に肺の灰白色化がみられた。

哺育4日の雌の剖検では、脾臓と周囲脂肪組織との癒着が对照群の1例、肝臓の横隔膜面結節が20 mg/kg群の1例に認められた。

## 7) 病理組織学検査(Table 4)

雄では、小葉中心性の肝細胞の肥大が500 mg/kg群の11例、100 mg/kg群の10例に認められた。また、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の出現および上皮の壊死が500 mg/kg群の11例、100 mg/kg群の12例、近位尿細管の拡張が500 mg/kg群の9例、100 mg/kg群の1例、近位尿細管上皮の好塩基性変化が500 mg/kg群の6例、100 mg/kg群の2例、腎臓の癒着が500 mg/kg群の1例に認められた。そのほか、偶発的变化として对照群では雄の1例に肺のマクロファージによる肺胞中隔あるいはリンパ球による血管周囲への細胞浸潤および動脈中膜の肥厚がみられた。

雌では、小葉中心性の肝細胞の肥大が500 mg/kg群の10例、100 mg/kg群の3例、胸腺皮質の萎縮が500 mg/kg群の2例に認められた。そのほか、偶発的变化として对照群および500 mg/kg群の各1例に脾臓の髓外造血の亢進、对照群の1例に脾臓と周囲脂肪組織との癒着が認められた。また、对照群の1例に肺のマクロファージによる肺胞中隔あるいはリンパ球による血管周囲への細胞浸潤および動脈中膜の肥厚がみられた。

500 mg/kg群の雌の死亡例では、生存例と同様の小葉中心性の肝細胞の肥大がみられたほか、腎臓の間質の毛細血管、小静脈および動脈ならびに糸球体毛細血管の血栓がみられ、さらに胸腺皮質のリンパ球の壊死および前胃の潰瘍が認められた。

100 mg/kg群の全児死亡例では、肝小葉辺縁部から中間帯にかけての脂肪化、近位尿細管上皮の脂肪化および壊死が認められた。

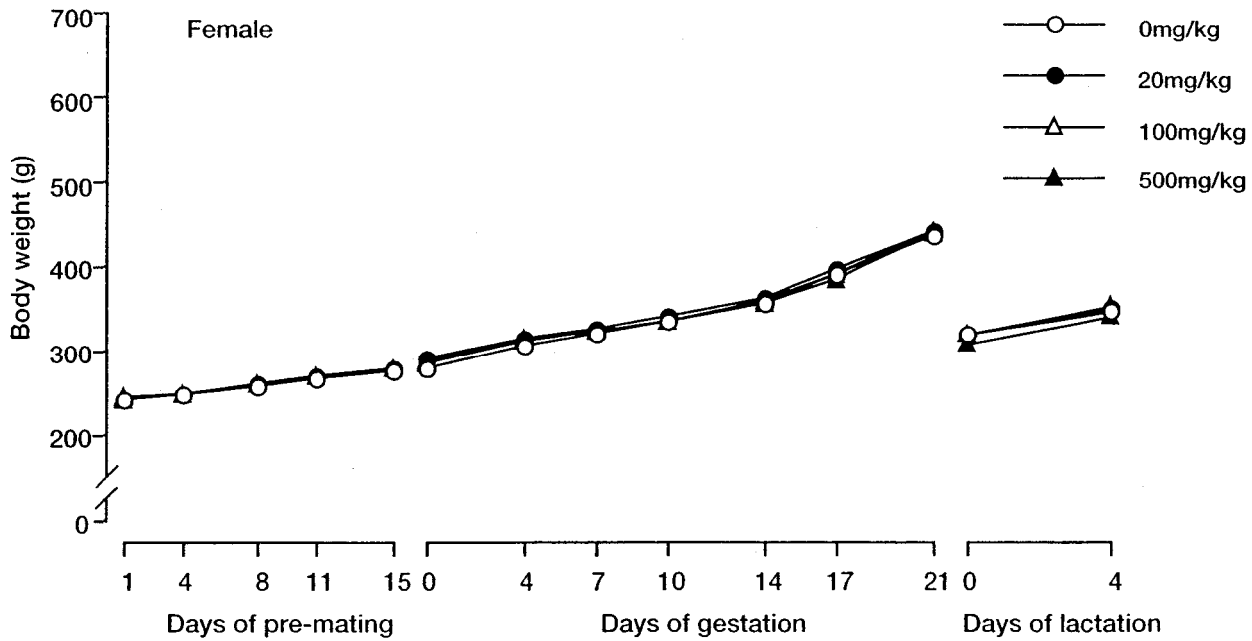
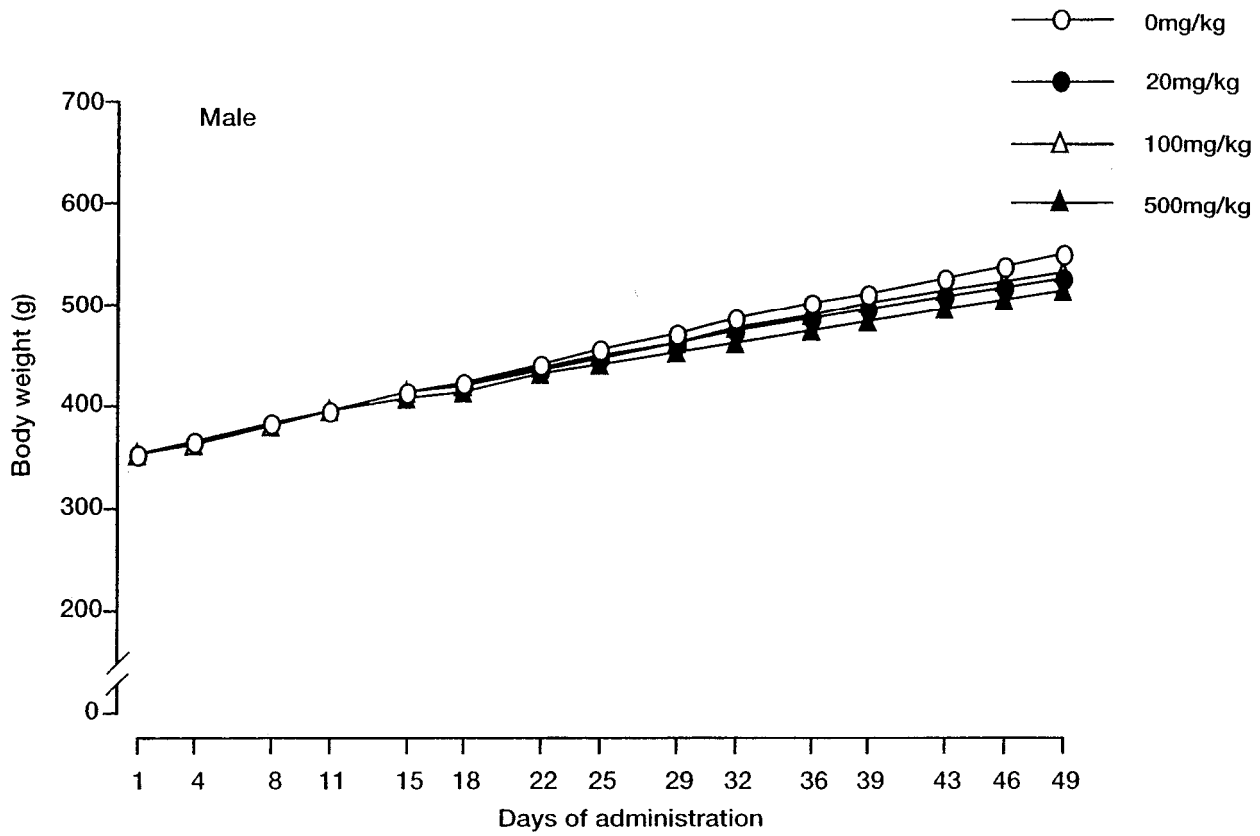


Fig. 1 Mean body weight changes of rats treated orally with trifluoromethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Hematological findings of male rats treated orally with trifluoromethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of animals	12	12	12	11
Leucocyte ( $10^2/\mu\text{l}$ )	79 $\pm$ 16	72 $\pm$ 18	86 $\pm$ 16	77 $\pm$ 19
Erythrocyte ( $10^4/\mu\text{l}$ )	853 $\pm$ 36	872 $\pm$ 35	868 $\pm$ 27	877 $\pm$ 30
Hemoglobin (g/dl)	14.8 $\pm$ 0.6	14.9 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.2	14.6 $\pm$ 0.5
Hematocrit (%)	47.3 $\pm$ 1.9	48.4 $\pm$ 1.8	47.4 $\pm$ 1.3	47.2 $\pm$ 2.0
Platelet ( $10^4/\mu\text{l}$ )	100.3 $\pm$ 12.3	92.0 $\pm$ 10.9	95.9 $\pm$ 8.2	102.5 $\pm$ 7.8
MCV (fl)	56 $\pm$ 1	56 $\pm$ 2	55 $\pm$ 2	54 $\pm$ 2
MCH (pg)	17.3 $\pm$ 0.6	17.1 $\pm$ 0.4	16.8 $\pm$ 0.5	16.6 $\pm$ 0.5*
MCHC (%)	31.2 $\pm$ 0.5	30.9 $\pm$ 0.5	30.8 $\pm$ 0.6	30.9 $\pm$ 0.7

\* : P&lt;0.05 (significantly different from control)

Values are mean  $\pm$  S.D.

Table 2 Blood chemical findings of male rats treated orally with trifluoromethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of animals	12	12	12	11
T.protein (g/dl)	5.3 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.2**
Albumin (g/dl)	3.7 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2**
A/G ratio	2.23 $\pm$ 0.20	2.25 $\pm$ 0.29	2.25 $\pm$ 0.25	2.37 $\pm$ 0.19
GOT (IU/l)	98 $\pm$ 12	86 $\pm$ 12	82 $\pm$ 14*	77 $\pm$ 15**
GPT (IU/l)	24 $\pm$ 4	21 $\pm$ 2	23 $\pm$ 3	22 $\pm$ 4
$\gamma$ -GTP (IU/l)	0.4 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2
ALP (IU/l)	198 $\pm$ 23	203 $\pm$ 29	197 $\pm$ 27	184 $\pm$ 24
T.cholesterol (mg/dl)	50 $\pm$ 9	46 $\pm$ 9	56 $\pm$ 12	85 $\pm$ 10**
Triglycerides (mg/dl)	31 $\pm$ 10	28 $\pm$ 8	35 $\pm$ 12	66 $\pm$ 15**
Phospholipids (mg/dl)	80 $\pm$ 12	77 $\pm$ 12	93 $\pm$ 17	140 $\pm$ 14**
T.bilirubin (mg/dl)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Glucose (mg/dl)	138 $\pm$ 14	132 $\pm$ 12	123 $\pm$ 15	103 $\pm$ 13**
BUN (mg/dl)	14.0 $\pm$ 2.1	14.5 $\pm$ 2.2	14.9 $\pm$ 1.3	16.1 $\pm$ 1.9
Creatinine (mg/dl)	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
IP (mg/dl)	6.4 $\pm$ 0.6	6.4 $\pm$ 0.8	6.4 $\pm$ 0.6	6.1 $\pm$ 0.6
Ca (mg/dl)	9.5 $\pm$ 0.2	9.5 $\pm$ 0.2	9.6 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 0.2**
Na (mEq/l)	147.1 $\pm$ 1.0	147.5 $\pm$ 0.8	146.6 $\pm$ 0.8	147.1 $\pm$ 0.7
K (mEq/l)	4.38 $\pm$ 0.26	4.32 $\pm$ 0.20	4.36 $\pm$ 0.10	4.34 $\pm$ 0.17
Cl (mEq/l)	105.4 $\pm$ 1.4	106.2 $\pm$ 1.1	104.6 $\pm$ 0.8	104.2 $\pm$ 1.1

\* : P&lt;0.05, \*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control)

Values are mean  $\pm$  S.D.

Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with trifluoromethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
<b>Male</b>				
No. of animals	12	12	12	11
<b>Absolute organ weight</b>				
Final Body Weight (g)	516.2 ± 35.7	497.1 ± 40.6	501.1 ± 37.6	477.8 ± 41.6
Brain (g)	2.15 ± 0.09	2.15 ± 0.05	2.14 ± 0.09	2.13 ± 0.06
Heart (g)	1.59 ± 0.10	1.60 ± 0.08	1.52 ± 0.13	1.60 ± 0.20
Lungs (g)	1.60 ± 0.27	1.46 ± 0.13	1.51 ± 0.11	1.42 ± 0.12
Thymus (g)	0.39 ± 0.06	0.40 ± 0.11	0.36 ± 0.07	0.34 ± 0.08
Liver (g)	14.46 ± 1.75	13.35 ± 1.73	15.44 ± 1.20	18.86 ± 1.61**
Spleen (g)	0.78 ± 0.11	0.76 ± 0.13	0.75 ± 0.12	0.78 ± 0.12
Kidneys (g)	3.20 ± 0.28	3.27 ± 0.25	3.51 ± 0.23	4.33 ± 0.65**
Adrenals (mg)	64.5 ± 6.1	65.0 ± 7.4	61.3 ± 6.5	61.8 ± 6.9
Testes (g)	3.45 ± 0.24	3.34 ± 0.20	3.43 ± 0.21	3.47 ± 0.30
Epididymides (g)	1.32 ± 0.09	1.32 ± 0.09	1.31 ± 0.10	1.33 ± 0.10
<b>Relative organ weight</b>				
Brain (g/100 g B.W.)	0.42 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.04
Heart (g/100 g B.W.)	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.33 ± 0.03
Lungs (g/100 g B.W.)	0.31 ± 0.07	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.03
Thymus (g/100 g B.W.)	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02
Liver (g/100 g B.W.)	2.80 ± 0.21	2.68 ± 0.19	3.09 ± 0.25*	3.96 ± 0.24**
Spleen (g/100 g B.W.)	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.03
Kidneys (g/100 g B.W.)	0.62 ± 0.04	0.66 ± 0.04	0.70 ± 0.06	0.91 ± 0.14**
Adrenals (mg/100 g B.W.)	12.5 ± 1.0	13.1 ± 1.3	12.3 ± 1.8	13.0 ± 1.5
Testes (g/100 g B.W.)	0.67 ± 0.06	0.68 ± 0.07	0.69 ± 0.06	0.73 ± 0.06
Epididymides (g/100 g B.W.)	0.26 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.02
<b>Female</b>				
No. of animals	12	12	10	10
<b>Absolute organ weight</b>				
Final Body Weight (g)	347.9 ± 14.2	348.9 ± 19.6	354.0 ± 21.6	342.2 ± 18.8
Brain (g)	2.03 ± 0.08	2.07 ± 0.09	2.07 ± 0.06	2.05 ± 0.05
Heart (g)	1.12 ± 0.12	1.11 ± 0.08	1.07 ± 0.10	1.08 ± 0.13
Lungs (g)	1.25 ± 0.20	1.26 ± 0.14	1.46 ± 0.79	1.19 ± 0.10
Thymus (g)	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.08	0.22 ± 0.07	0.17 ± 0.05
Liver (g)	14.62 ± 1.16	14.65 ± 1.36	15.21 ± 1.28	16.32 ± 1.59*
Spleen (g)	0.68 ± 0.12	0.65 ± 0.06	0.64 ± 0.09	0.62 ± 0.12
Kidneys (g)	2.07 ± 0.16	2.08 ± 0.14	2.10 ± 0.11	2.16 ± 0.07
Adrenals (mg)	76.1 ± 9.2	78.4 ± 8.3	78.6 ± 7.0	74.7 ± 9.6
Ovaries (mg)	101.0 ± 12.2	109.1 ± 14.4	110.9 ± 12.0	108.9 ± 7.3
<b>Relative organ weight</b>				
Brain (g/100 g B.W.)	0.58 ± 0.03	0.60 ± 0.05	0.59 ± 0.04	0.60 ± 0.02
Heart (g/100 g B.W.)	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.32 ± 0.03
Lungs (g/100 g B.W.)	0.36 ± 0.06	0.36 ± 0.04	0.42 ± 0.27	0.35 ± 0.02
Thymus (g/100 g B.W.)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01
Liver (g/100 g B.W.)	4.20 ± 0.23	4.20 ± 0.29	4.30 ± 0.23	4.77 ± 0.44**
Spleen (g/100 g B.W.)	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03
Kidneys (g/100 g B.W.)	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.03	0.63 ± 0.04
Adrenals (mg/100 g B.W.)	21.9 ± 2.6	22.4 ± 2.0	22.2 ± 1.6	21.8 ± 2.3
Ovaries (mg/100 g B.W.)	29.0 ± 3.0	31.4 ± 4.4	31.4 ± 3.5	31.8 ± 2.1

\* : P&lt;0.05, \*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 4 Histopathological findings of rats treated orally with trifluoromethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Dose (mg/kg)				0				20				100				Total			
					Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
<b>Male</b>																				
Number of animals	12				12				12											
<b>Digestive system</b>																				
Liver	(12)				(12)				(12)											
Hypertrophy, centrilobular	12	0	0	0	12	0	0	0	2	9	1	0								
<b>Respiratory system</b>																				
Lung	(12)				(0)				(0)											
Cellular infiltration	11	1	0	0																
Thickening, tunica media, artery	11	1	0	0																
<b>Urinary system</b>																				
Kidney	(12)				(12)				(12)											
Hyaline droplets, proximal tubules	12	0	0	0	12	0	0	0	0	3	9	0								
Necrosis, proximal tubules	12	0	0	0	12	0	0	0	0	7	5	0								
Dilatation, proximal tubules	12	0	0	0	12	0	0	0	11	1	0	0								
Change, basophilic, proximal tubules	12	0	0	0	12	0	0	0	10	2	0	0								
Scar	12	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0								
<b>Female</b>																				
Number of animals	12				12				11				1				12			
<b>Digestive system</b>																				
Liver	(12)				(12)				(11)				(1)				(12)			
Hypertrophy, centrilobular	12	0	0	0	12	0	0	0	8	3	0	0	1	0	0	0	9	3	0	0
Change, fatty, periportal and mid-zonal	12	0	0	0	12	0	0	0	11	0	0	0	0	0	1	0	11	0	1	0
Stomach	(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
Ulcer, forestomach																				
Ulcer, glandular stomach																				
<b>Respiratory system</b>																				
Lung	(12)				(0)				(1)				(1)				(2)			
Cellular infiltration	11	1	0	0					0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
Thickening, tunica media, artery	11	1	0	0					0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
<b>Hematopoietic system</b>																				
Thymus	(12)				(0)				(11)				(0)				(11)			
Atrophy	12	0	0	0					11	0	0	0					11	0	0	0
Necrosis, lymphocyte	12	0	0	0					11	0	0	0					11	0	0	0
<b>Spleen</b>																				
Hematopoiesis, extramedullary, increased	11	1	0	0									1	0	0	0	1	0	0	0
Adhesion, adipose tissue	11	1	0	0									1	0	0	0	1	0	0	0
Proliferation, plasma cell, red pulp	12	0	0	0									1	0	0	0	1	0	0	0
<b>Thoracic lymph node</b>																				
Proliferation, plasma cell, medulla	(0)				(0)				(1)				(0)				(1)			
									0	1	0	0					0	1	0	0
<b>Urinary system</b>																				
Kidney	(12)				(12)				(11)				(1)				(12)			
Change, fatty, proximal tubules	12	0	0	0	12	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	1	11	0	0	1
Thrombus	12	0	0	0	12	0	0	0	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Necrosis, proximal tubules	12	0	0	0	12	0	0	0	11	0	0	0	0	0	1	0	11	0	1	0
<b>Others</b>																				
Thoracic cavity	(0)				(0)				(1)				(0)				(1)			
Abscess									0	1	0	0					0	1	0	0

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 4 - continued Histopathological findings of rats treated orally with trifluoromethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Dose (mg/kg)		500											
			Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++		
Male														
Number of animals	11				1				12					
Digestive system														
Liver	(11)				(1)				(12)					
Hypertrophy, centrilobular	0	0	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0		
Respiratory system														
Lung	(11)				(1)				(12)					
Cellular infiltration	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0		
Thickening, tunica media, artery	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0		
Urinary system														
Kidney	(11)				(1)				(12)					
Hyaline droplets, proximal tubules	0	0	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0		
Necrosis, proximal tubules	0	0	8	3	1	0	0	0	1	0	8	3		
Dilatation, proximal tubules	2	6	1	2	1	0	0	0	3	6	1	2		
Change, basophilic, proximal tubules	5	6	0	0	1	0	0	0	6	6	0	0		
Scar	10	1	0	0	1	0	0	0	11	1	0	0		
Female														
Number of animals	10				2				12					
Digestive system														
Liver	(10)				(2)				(12)					
Hypertrophy, centrilobular	0	0	10	0	1	1	0	0	1	1	10	0		
Change, fatty, periportal and mid-zonal	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0		
Stomach	(0)				(2)				(2)					
Ulcer, forestomach					1 1 0 0				1 1 0 0					
Ulcer, glandular stomach					1 1 0 0				1 1 0 0					
Respiratory system														
Lung	(10)				(2)				(12)					
Cellular infiltration	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0		
Thickening, tunica media, artery	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0		
Hematopoietic system														
Thymus	(10)				(2)				(12)					
Atrophy	8	2	0	0	1	0	1	0	9	2	1	0		
Necrosis, lymphocyte	10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0		
Spleen	(10)				(2)				(12)					
Hematopoiesis, extramedullary, increased	9	1	0	0	2	0	0	0	11	1	0	0		
Adhesion, adipose tissue	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0		
Proliferation, plasma cell, red pulp	10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0		
Thoracic lymph node	(0)				(0)				(0)					
Proliferation, plasma cell, medulla														
Urinary system														
Kidney	(10)				(2)				(12)					
Change, fatty, proximal tubules	10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0		
Thrombus	10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0		
Necrosis, proximal tubules	10	0	0	0	2	0	0	0	10	0	0	0		
Others														
Thoracic cavity	(0)				(1)				(1)					
Abscess					0 1 0 0				0 1 0 0					

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.



## 2. 生殖発生毒性

## 1) 生殖機能 (Table 5)

性周期検査では各投与群とも発情回数および発情周期に対照群との間の差は認められなかった。

生殖能力検査では100 mg/kg群の1組を除いてすべてに交尾がみられ、交尾確認例の全例に妊娠が認められた。したがって、交尾率は、対照群、20, 100および500 mg/kg群でそれぞれ100, 100, 91.67および100%, 受胎率はいずれも100%の成績を示し、交尾所要日数においても対照群と各投与群間の差は認められなかった。なお、100 mg/kg群の未交尾例では、雌雄とも生殖器の剖検および病理組織学検査に変化はみられず、授(受)胎能の欠如を示唆する所見は認められなかった。

## 2) 分娩および哺育ならびに新生児の観察 (Table 6)

分娩時の検査では、500 mg/kg群で1母動物が妊娠23日の分娩後に死亡した。本例では、出産児(死産児4匹、生存児12匹)の発育には特に変化はみられなかったが、血液による下腹部の汚れが顕著にみられ、出産児の羊膜除去、胎盤処理ならびに児の回集などは不充分であった。剖検では、胸水貯留、肺の暗赤色化、気管に泡沫状水様液貯留および前胃粘膜の白色点状在が認められた。

20 mg/kg群の黄体数および100 mg/kg群の着床痕数にそれぞれ増加が認められたが、500 mg/kg群の黄体数および着床痕数に変化は認められなかった。

各投与群とも妊娠期間、総出産児数、出産率、死産率、出生児数、出生率および出生児の性比に対照群との間に差は認められなかった。また、外表異常児は、各投与群とも1例も認められなかった。

出生児の体重では、各投与群とも出生日および生後4日ともに減少が認められた。

哺育期の検査では、児の回集、授乳などの哺育行動の低下が100 mg/kg群の1母動物にみられ、分娩後2日までに出生児の全例が死亡した。

4日生存率では、500 mg/kg群に減少が認められた。なお、100 mg/kg群にも減少傾向が認められたが、この変化は当該群の1母動物に全児死亡がみられたことによるものであった。

出生児の剖検では、肝臓内側左葉の黄白色化が100 mg/kg群の1例に認められたのみであった。

## 考 察

## 1. 反復投与毒性

肝臓および腎臓で被験物質投与に起因した変化が認められた。肝臓では、重量の増加が雄の100 mg/kg以上の投与群および雌の500 mg/kg群に認められ、小葉中心性の肝細胞の肥大が雌雄の100 mg/kg以上の投与群でみられた。また、腎臓では、重量の増加と近位尿細管上皮における硝子滴の出現、壊死、好塩基性変化および近位尿細管の拡張が雄の100 mg/kg以上の投与群に認められた。本被験物質とはハロゲン基が異なるトリクロロトルエンでも肝臓および腎臓に対する影響が報告されており<sup>2)</sup>、

これらの類似化合物では肝臓および腎臓が標的器官になる可能性が示唆された。雄の血液生化学検査では、500 mg/kg群で総蛋白質、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライドおよびリン脂質の増加ならびにグルコースの減少が認められたが、これらも本被験物質の肝臓に対する影響に関連した変化のように考えられた。また、当該群ではカルシウムの増加も認められたが、これはアルブミンの増加に伴った変化と思われた。しかし、被験物質投与に起因した症状の発現や、体重および摂餌量に対する影響はいずれの投与群にも認められず、全身状態の悪化を来すような毒性には至らなかったと考えられた。なお、腎臓では雄の500 mg/kg群の1例に肉眼的に小陥凹がみられ、組織学的には瘢痕が認められたが、本変化は正常ラットでも時折みられる変化であり、発生例数も少ないことから被験物質投与に起因したものとは考え難かった。また、胸腺では雌の500 mg/kg群の2例に組織学的に萎縮がみられたが、変化の程度は軽微で発生例数も少ないことおよび雄では胸腺をはじめリンパ系への作用を示唆する変化は認められなかったことから、被験物質の直接的な影響よりは分娩に伴ったストレス性の変化である可能性が高いと思われた。

以上のことから、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも20 mg/kgと推定された。

## 2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、性周期、雌雄の交尾率および授(受)胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時の観察では、500 mg/kg群の1母動物が妊娠23日の分娩の終了後に死亡した。本例では妊娠期間中の一般状態ならびに出産児の発育には特に変化はみられなかったが、分娩時に顕著な出血がみられ、出産児の羊膜除去、胎盤処理ならびに児の回集などの母性行動が正常に行われた形跡は認められなかったことから、その死因については分娩に伴う消耗性の変化と考えられた。しかしながら、このような分娩異常は当該群のほかの母動物には観察されず、出現例数も少ないことから被験物質投与との直接的な関連性はないように思われた。当該群では妊娠期間、総出産児数、出産率、死産率、出生児数、出生率および出生児の性比に被験物質投与の影響は認められなかった。一方、20 mg/kg以上の群で出生日に体重減少が認められ、本被験物質の胎生期の発育に対する影響が示唆されたが、胚致死作用を窺わせる出生児数の減少はみられておらず、外表異常も観察されなかった。

哺育期の観察においても、出生児の継続した体重の増加抑制がみられ、500 mg/kg群に4日生存率の低下がごく軽度で認められた。体重の増加抑制は、胎生期の発育抑制を反映しているものと考えられ、その内、特に低い体重を示した児が生存できなかったものと考えられた。そのほか、哺育不良による全児死亡が100 mg/kg群の1母動物に認められたが、500 mg/kg群に全児死亡は観察されなかったことから特に問題視する変化とは考え難かった。

Table 5 Reproductive performance of rats treated orally with trifluoromethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of females examined	12	12	12	12
Count of estrus <sup>a)</sup>	3.42 ± 0.67	3.58 ± 0.51	3.50 ± 0.52	3.42 ± 0.51
Estrous cycle <sup>b)</sup>	4.04 ± 0.14	4.08 ± 0.29	4.03 ± 0.10	4.08 ± 0.29
No. of mated				
Male	12	12	12	11
Female	12	12	12	12
No. of copulated <sup>c)</sup>				
Male	12(100)	12(100)	11(91.67)	11(100)
Female	12(100)	12(100)	11(91.67)	12(100)
No. of impregnated <sup>d)</sup>	12(100)	12(100)	11(100)	11(100)
No. of pregnant <sup>d)</sup>	12(100)	12(100)	11(100)	12(100)
Duration of mating <sup>b)</sup>	2.25 ± 1.29	2.58 ± 1.31	2.55 ± 2.02	1.67 ± 0.89

a) Values are mean ± S.D.

b) Values are mean ± S.D. (day)

c) Values in parentheses represent percentages to the number of mated.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of copulated.

Table 6 Findings of delivery of F<sub>0</sub> dams treated orally with trifluoromethylbenzene and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of dams	12	12	11	11
Gestational days <sup>a)</sup>	22.33 ± 0.49	22.08 ± 0.29	22.00 ± 0.00	22.36 ± 0.50
No. of corpora lutea <sup>b)</sup>	190(15.83 ± 1.53)	216(18.00 ± 2.13)*	192(17.45 ± 1.21)	192(17.45 ± 1.29)
No. of implantations <sup>b)</sup>	179(14.92 ± 1.16)	197(16.42 ± 2.27)	187(17.00 ± 1.10)*	183(16.64 ± 1.21)
No. of litter <sup>b)</sup>	168(14.00 ± 1.41)	191(15.92 ± 2.07)	171(15.55 ± 1.63)	173(15.73 ± 2.00)
Gestation index <sup>c)</sup>	100	100	100	100
No. of stillborns <sup>d)</sup>				
Male	0	6	2	5
Female	2	1	6	7
Total	2(1.19)	8(4.19) <sup>i)</sup>	8(4.68)	12(6.94)
No. of live newborns <sup>b)</sup>	166(13.83 ± 1.40)	183(15.25 ± 1.76)	163(14.82 ± 1.60)	161(14.64 ± 2.54)
Birth index <sup>e)</sup>	92.74	92.89	87.17	87.98
Sex ratio of live newborns <sup>f)</sup>	1.08(86/80)	1.01(92/91)	1.06(84/79)	0.99(80/81)
Body weight of live newborns (g) <sup>g)</sup>				
Male				
On day 0	6.7 ± 0.5	6.1 ± 0.5*	6.2 ± 0.4	6.0 ± 0.4**
4	11.1 ± 1.0	9.9 ± 1.0*	9.8 ± 0.9**	9.4 ± 0.4**
Female				
On day 0	6.4 ± 0.5	5.7 ± 0.4**	5.8 ± 0.4**	5.7 ± 0.4**
4	10.5 ± 0.8	9.4 ± 0.9*	9.0 ± 0.7**	8.8 ± 0.5**
Viability index <sup>h)</sup>	98.80	98.91	92.64	91.28*
No. of external anomalies	0	0	0	0

\* : P<0.05, \*\* : P<0.01 (significantly different from control)

a) Values are mean ± S.D. (day)

b) Values in parentheses represent mean ± S.D.

c) Gestation index=(Number of females with live newborns/Number of pregnant females)×100

d) Values in parentheses represent percentages to the number of litters.

e) Birth index=(Number of live newborns/Number of implantations)×100

f) Values in parentheses represent the number of male/female live newborns.

g) Values are mean ± S.D.

h) Viability index=(Number of live newborns on day 4 after birth/Number of live newborns)×100

i) Including 1 cannibalized

以上のことから、本試験条件下における生殖発生毒性に関する無影響量は雄および雌の生殖に対しては500 mg/kg、児の発生に対しては20 mg/kg未満と推察された。

文 献

- 1) D. V. Sweet, "Registry of Toxic Effects of Chemical Substances", Vol. 5, U.S. Government printing office, Washington, D C, 1987, pp.1985-1986.
- 2) I. Chu, et al., *J. Environ. Sci. Health*, **B19**, 183 (1984).

連絡先

試験責任者：淵上勝野  
試験担当者：大塚辰雄，和泉宏幸，永井憲児，  
木村栄介  
(株)パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所  
〒869-04 熊本県宇土市栗崎町1285  
Tel 0964-23-5111 Fax 0964-23-2282

Correspondence

Authors: Katsuya Fuchigami (Study director)  
Tatsuo Otsuka, Hiroyuki Izumi,  
Kenji Nagai, Eisuke Kimura  
Safety Assessment Laboratory, Panapharm  
Laboratories Co., Ltd.  
1285 Kurisaki-machi, Uto-shi, Kumamoto, 869-04,  
Japan  
Tel +81-964-23-5111 Fax +81-964-23-2282

# (トリフルオロメチル)ベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Trifluoromethylbenzene on Bacteria

### 要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、(トリフルオロメチル)ベンゼンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で行ったところ、S9 mixの添加の有無にかかわらず抗菌性が認められた。したがって、本試験の最高用量はいずれも、当初 TA100, WP2 *uvrA*, TA98は2000  $\mu\text{g}$ /プレート、TA1535およびTA1537は1000  $\mu\text{g}$ /プレートとし、6用量を設定することとした。しかし、S9 mix 無添加試験では、本被験物質は弱い抗菌作用を幅広い用量にわたって示し、かつ試験ごとに抗菌性を示す用量に変動が認められたことから、WP2 *uvrA*とTA98の2回目の本試験、およびTA100は2回ともS9 mix 無添加試験の最高用量1000  $\mu\text{g}$ /プレートに変更して6用量を設定し、本試験とした。

その結果、抗菌性は、S9 mix 無添加試験では、500  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100, TA1535 およびTA1537)あるいは1000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA1535 およびWP2)用量で、S9 mix 添加試験では、1000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA1535, TA98 およびTA1537)あるいは2000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100およびWP2)の用量で認められた。復帰変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いた検定菌について、いずれの用量においても増加は認められなかったことから、(トリフルオロメチル)ベンゼンは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

### 方法

#### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium*の4菌株<sup>1)</sup>は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA*株<sup>2)</sup>は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用い、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

#### 〔被験物質〕

(トリフルオロメチル)ベンゼン(CAS No. 98-08-8)は、分子量146.11の無色透明な液体である。試験には、和光純薬工業(株)製〔ロット番号: KCM2054, 純度98.0%以上(不純物: 水分0.2%以下, その他不明)〕のものを購入し、使用時まで冷蔵保管して用いた。

(トリフルオロメチル)ベンゼンは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに10~50 mg/mlの範囲で溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、(トリフルオロメチル)ベンゼンのDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(313  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )溶液は本試験IIで調製したのものについて、また高濃度(300 mg/ml)溶液は染色体異常試験における最高濃度として調製したのものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、99.0および99.7%であった。また、本試験IIで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は低濃度および高濃度(20.0 mg/ml)のいずれも103%であった。

#### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

#### 〔培地およびS9 mixの組成〕

##### 1) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

\*: WP2 *uvrA* 用には, 0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

## 2) 合成培地

培地は, 日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお, 培地 1 l あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクトアガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml を流して固めてある。

## 3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol

\*\* : 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および 5, 6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 を用いた。

### 〔試験方法〕

プレート法により, S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また, 対照群として被験物質調製液の代わりに DMSO, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。培養は 37℃ で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した。

用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では 3 枚ずつ, 各用量については 1 枚ずつとした。また, 本試験においては両対照群および各用量につき, 3 枚ずつを用い, それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回, 本試験は同一用量について 2 回実施し, 結果の再現性の確認を行った。

### 〔判定基準〕

用いた 5 種の検定菌のうち, 1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は, 本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。

## 結果および考察

### 〔用量設定試験〕

50~5000  $\mu$ g/プレート の範囲で公比を約 3 として, 試験を実施したところ, S9 mix の添加の有無にかかわらず, TA100, WP2 *uvrA*, TA98 は 1500  $\mu$ g/プレート以上で, その他の検定菌では 500  $\mu$ g/プレート以上で抗菌性が認められた。

### 〔本試験〕

結果をそれぞれ Table 1, 2 に示した。(トリフルオロメチル)ベンゼンの用量は当初 TA100 (S9 mix 無添加), TA1535, TA1537 は 31.3~1000  $\mu$ g/プレート, TA100 (S9 mix 添加), WP2 *uvrA*, TA98 は 62.5~2000  $\mu$ g/プレートの範囲で, 公比を 2 として試験を行った。しかし, 本被験物質は弱い抗菌作用が幅広い用量で認められ, 特に S9 mix 無添加試験の, WP2 *uvrA* および TA98 では試験ごとに抗菌性を示す用量に変動がみられ, 抗菌性を示さない用量が 4 用量に満たない場合があったため, 最高用量を 1000  $\mu$ g/プレートに変更して再試験を行った。その結果, 本試験 I と II のいずれも, 用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において, 溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき, (トリフルオロメチル)ベンゼンは, 用いた試験系において変異原性を有しないもの (陰性) と判定した。

Table 1. Mutagenicity of trifluoromethylbenzene\*\* in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	97 114 127 (113 $\pm$ 15.0)	10 8 13 (10 $\pm$ 2.5)	18 22 20 (20 $\pm$ 2.0)	26 21 18 (22 $\pm$ 4.0)	11 8 5 (8 $\pm$ 3.0)	
	31.3	106 93 122 (107 $\pm$ 14.5)	11 11 15 (12 $\pm$ 2.3)	ND	ND	10 8 6 (8 $\pm$ 2.0)	
	62.5	111 121 118 (117 $\pm$ 5.1)	13 14 8 (12 $\pm$ 3.2)	15 25 17 (19 $\pm$ 5.3)	23 25 26 (25 $\pm$ 1.5)	7 9 9 (8 $\pm$ 1.2)	
	125	102 141 123 (122 $\pm$ 19.5)	10 11 6 (9 $\pm$ 2.6)	13 20 24 (19 $\pm$ 5.6)	30 13 26 (23 $\pm$ 8.9)	9 7 9 (8 $\pm$ 1.2)	
	250	111 103 102 (105 $\pm$ 4.9)	6 9 8 (8 $\pm$ 1.5)	18 17 21 (19 $\pm$ 2.1)	17 22 15 (18 $\pm$ 3.6)	8 5 10 (8 $\pm$ 2.5)	
	500	91 93 99 (94 $\pm$ 4.2)	7* 11* 6* (8 $\pm$ 2.6)	20 16 26 (21 $\pm$ 5.0)	14 13 18 (15 $\pm$ 2.6)	4 7 6 (6 $\pm$ 1.5)	
	1000	97* 100* 100* (99 $\pm$ 1.7)	10* 11* 11* (11 $\pm$ 0.6)	16 25 18 (20 $\pm$ 4.7)	15* 21* 22* (19 $\pm$ 3.8)	6* 4* 4* (5 $\pm$ 1.2)	
	2000			12* 24* 16* (17 $\pm$ 6.1)	25* 17* 14* (19 $\pm$ 5.7)		
S9mix (+)	0	122 108 105 (112 $\pm$ 9.1)	10 13 18 (14 $\pm$ 4.0)	23 22 20 (22 $\pm$ 1.5)	43 35 33 (37 $\pm$ 5.3)	9 7 17 (11 $\pm$ 5.3)	
	31.3	ND	14 16 8 (13 $\pm$ 4.2)	ND	ND	13 8 13 (11 $\pm$ 2.9)	
	62.5	89 123 102 (105 $\pm$ 17.2)	8 10 7 (8 $\pm$ 1.5)	30 24 24 (26 $\pm$ 3.5)	29 31 39 (33 $\pm$ 5.3)	15 11 8 (11 $\pm$ 3.5)	
	125	91 83 105 (93 $\pm$ 11.1)	14 15 18 (16 $\pm$ 2.1)	22 40 39 (34 $\pm$ 10.1)	19 30 27 (25 $\pm$ 5.7)	14 13 11 (13 $\pm$ 1.5)	
	250	77 98 103 (93 $\pm$ 13.8)	10 9 6 (8 $\pm$ 2.1)	24 28 23 (25 $\pm$ 2.6)	31 27 30 (29 $\pm$ 2.1)	14 9 8 (10 $\pm$ 3.2)	
	500	89 91 91 (90 $\pm$ 1.2)	8* 7* 15* (10 $\pm$ 4.4)	25 23 17 (22 $\pm$ 4.2)	33 36 23 (31 $\pm$ 6.8)	18 11 15 (15 $\pm$ 3.5)	
	1000	86 74 95 (85 $\pm$ 10.5)	7* 15* 11* (11 $\pm$ 4.0)	33 18 23 (25 $\pm$ 7.6)	21 21 41 (28 $\pm$ 11.5)	18* 14* 15* (16 $\pm$ 2.1)	
	2000	65* 72* 84* (74 $\pm$ 9.6)		16* 32* 31* (26 $\pm$ 9.0)	26* 27* 27* (27 $\pm$ 0.6)		
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	618 627 632 (626 $\pm$ 7.1)	268 257 282 (269 $\pm$ 12.5)	146 138 104 (129 $\pm$ 22.3)	727 733 772 (744 $\pm$ 24.4)	628 786 686 (700 $\pm$ 79.9)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	970 981 1008 (986 $\pm$ 19.6)	243 223 213 (226 $\pm$ 15.3)	1423 1378 1280 (1360 $\pm$ 73.1)	259 263 258 (260 $\pm$ 2.6)	184 179 194 (186 $\pm$ 7.6)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\*: Purity was above 98.0% and water was contained below 0.2% as impurity.

ND: Not done

Table 2. Mutagenicity of trifluoromethylbenzene\*\* in reverse mutation test ( II ) of on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu$ g/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	88 114 113 (105 $\pm$ 14.7)	18 15 16 (16 $\pm$ 1.5)	20 15 19 (18 $\pm$ 2.6)	22 22 14 (19 $\pm$ 4.6)	11 14 9 (11 $\pm$ 2.5)	
	31.3	103 110 105 (106 $\pm$ 3.6)	14 11 14 (13 $\pm$ 1.7)	17 17 19 (18 $\pm$ 1.2)	30 22 20 (24 $\pm$ 5.3)	7 4 10 (7 $\pm$ 3.0)	
	62.5	95 100 100 (98 $\pm$ 2.9)	17 14 8 (13 $\pm$ 4.6)	20 21 34 (25 $\pm$ 7.8)	20 17 18 (18 $\pm$ 1.5)	5 11 10 (9 $\pm$ 3.2)	
	125	93 93 108 (98 $\pm$ 8.7)	14 13 13 (13 $\pm$ 0.6)	22 32 18 (24 $\pm$ 7.2)	21 14 20 (18 $\pm$ 3.8)	9 14 8 (10 $\pm$ 3.2)	
	250	106 82 114 (101 $\pm$ 16.7)	13 7 14 (11 $\pm$ 3.8)	21 19 22 (21 $\pm$ 1.5)	17 22 21 (20 $\pm$ 2.6)	10 7 11 (9 $\pm$ 2.1)	
	500	80* 68* 78* (75 $\pm$ 6.4)	15* 5* 5* (8 $\pm$ 5.8)	22 14 16 (17 $\pm$ 4.2)	16 23 29 (23 $\pm$ 6.5)	8* 10* 7* (8 $\pm$ 1.5)	
	1000	3* 78* 79* (53 $\pm$ 43.6)	4* 2* 4* (3 $\pm$ 1.2)	25* 28* 19* (24 $\pm$ 4.6)	18* 16* 19* (18 $\pm$ 1.5)	7* 7* 9* (8 $\pm$ 1.2)	
S9mix (+)	0	112 121 120 (118 $\pm$ 4.9)	8 12 12 (11 $\pm$ 2.3)	33 28 32 (31 $\pm$ 2.6)	44 36 29 (36 $\pm$ 7.5)	19 10 19 (16 $\pm$ 5.2)	
	31.3	ND	13 13 18 (15 $\pm$ 2.9)	ND	ND	10 17 12 (13 $\pm$ 3.6)	
	62.5	138 129 124 (130 $\pm$ 7.1)	17 14 6 (12 $\pm$ 5.7)	35 33 29 (32 $\pm$ 3.1)	45 32 42 (40 $\pm$ 6.8)	17 26 16 (20 $\pm$ 5.5)	
	125	133 103 118 (118 $\pm$ 15.0)	17 18 17 (17 $\pm$ 0.6)	28 26 31 (28 $\pm$ 2.5)	27 38 44 (36 $\pm$ 8.6)	14 22 20 (19 $\pm$ 4.2)	
	250	124 95 104 (108 $\pm$ 14.8)	9 14 13 (12 $\pm$ 2.6)	23 29 21 (24 $\pm$ 4.2)	43 38 25 (35 $\pm$ 9.3)	11 10 13 (11 $\pm$ 1.5)	
	500	81 96 107 (95 $\pm$ 13.1)	12 12 11 (12 $\pm$ 0.6)	24 23 26 (24 $\pm$ 1.5)	36 24 33 (31 $\pm$ 6.2)	13* 11* 9* (11 $\pm$ 2.0)	
	1000	75 96 104 (92 $\pm$ 15.0)	13* 6* 6* (8 $\pm$ 4.0)	24 23 19 (22 $\pm$ 2.6)	25* 27* 23* (25 $\pm$ 2.0)	7* 10* 11* (9 $\pm$ 2.1)	
	2000	59* 72* 84* (72 $\pm$ 12.5)		18* 20* 22* (20 $\pm$ 2.0)	20* 23* 22* (22 $\pm$ 1.5)		
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu$ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	506 526 513 (515 $\pm$ 10.1)	207 224 235 (222 $\pm$ 14.1)	100 116 124 (113 $\pm$ 12.2)	756 631 787 (725 $\pm$ 82.6)	890 726 734 (783 $\pm$ 92.5)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu$ g/plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1164 1206 1145 (1172 $\pm$ 31.2)	254 288 268 (270 $\pm$ 17.1)	913 869 854 (879 $\pm$ 30.7)	372 303 455 (377 $\pm$ 76.1)	163 180 169 (171 $\pm$ 8.6)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\* : Purity was above 98.0% and water was contained below 0.2% as impurity.

ND : Not done

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：坂本京子, 川上久美子, 原 巧,  
清水 ゆり, 松木容彦, 中込まどか,  
飯田さやか  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 秦野市落合 729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Kyoko Sakamoto, Kumiko Kawakami,  
Takumi Hara, Yuri Shimizu,  
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi,  
and Sayaka Iida  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627



# トリフルオロメチルベンゼンの 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 Trifluoromethylbenzene on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

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、(トリフルオロメチル)ベンゼンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.3 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。一方、短時間処理の(6時間)S9 mix存在下および非存在下では、50%を明らかに越える増殖抑制が認められなかったことから、1.5 mg/ml(10 mM)の濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、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。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した高濃度群(0.3 mg/ml)においては、細胞毒性のため分析できなかったが、その他の処理群では、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。また、短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理した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、(トリフルオロメチル)ベンゼンは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS:Biocell)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

(トリフルオロメチル)ベンゼンは揮発しやすいことまたプラスチック底面を溶解することから、培養にはガ

ラス製フラスコ(25 cm<sup>2</sup>, 池本理化(株))を用いた。2×10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたガラス製フラスコに播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. 被験物質

(トリフルオロメチル)ベンゼン(略号:TFMB, CAS No.:98-08-8, ロット番号:KCM2054, 和光純薬工業(株)製造)は、無色透明の液体で、水に対しては不溶で、DMSOおよびアセトンには可溶であり、融点-29.02℃、沸点102.5℃、分子式C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>、分子量146.11、純度98%以上(不純物として水分2%以下)の物質である。

被験物質原体は、水分により分解して、刺激性の沸化水素と安息香酸になる。溶媒中(DMSO)では、313 μg/ml~300 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、フラスコあたりの観察細胞(400細胞)における分裂中期細胞の頻度(分裂指数:Mitotic index)を調べ、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.3 mg/mlであった。一方、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下では、処理したすべての濃度範囲で50%

を明らかに越える増殖抑制は認められなかった(Fig. 1).

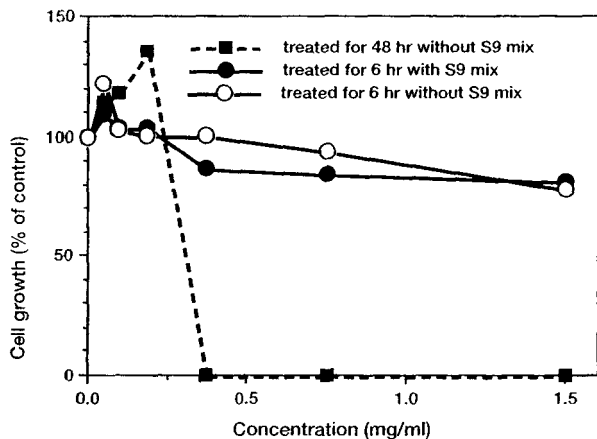


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with trifluoromethylbenzene

### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では0.3 mg/ml、短時間処理では、それぞれ1.5 mg/ml(10 mM)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

### 8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

### 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyloid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

### 10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林<sup>2)</sup>の

方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法<sup>3)</sup>(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>4)</sup>( $p < 0.05$ )を行った。原則として以上2回の検定でともに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

### 結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。(トリフルオロメチル)ベンゼンを加えて24時間および48時間連続処理した高濃度群(0.3 mg/ml)では、細胞毒性により分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。(トリフルオロメチル)ベンゼンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、(トリフルオロメチル)ベンゼンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with trifluoromethylbenzene (TFMB)\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)	Polyploid <sup>4)</sup> (%)	SA	NA
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
TFMB	0.075	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TFMB	0.15	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	NT	NT
TFMB	0.30	24	0 <sup>T</sup>											T		
MC	0.00005	24	200	2	22	56	1	0	0	81	0	62 (31.0)	62 (31.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TFMB	0.075	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TFMB	0.15	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	NT	NT
TFMB	0.30	48	0 <sup>T</sup>											T		
MC	0.00005	48	200	3	28	60	2	6	20	119	13	68 (34.0)	67 (33.5)	0.50		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested, T: Toxic; This group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed and less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. \*: Purity was more than 98%, and water was contained (less than 2%).

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with trifluoromethylbenzene (TFMB)\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)	Polyploid <sup>4)</sup> (%)	SA	NA
Control				200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
TFMB	0.38	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38		
TFMB	0.75	-	6-(18)	200	1	1	0	1	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13	NT	NT
TFMB	1.5	-	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	2	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
TFMB	0.38	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00		
TFMB	0.75	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	NT	NT
TFMB	1.5	+	6-(18)	200	0	0	2	0	0	0	2	4	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	1	14	5	0	2	0	22	1	20 (10.0)	20 (10.0)	0.00		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. \*: Purity was more than 98%, and water was contained (less than 2%).

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) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, “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.
- 4) 吉村 功, 大橋靖夫 編, “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.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
試験担当者: 山影康次, 中川ゆづき, 日下部博一,  
橋本恵子, 水谷正寛, 古畑紀久子  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)  
Kohji Yamakage, Yuzuki Nakagawa,  
Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto,  
Masahiro Mizutani, Kikuko Furuhashi  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627