

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

Values are mean \pm S.D.

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

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
Male				
No. of animals	12	12	12	11
Absolute organ weight				
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
Relative organ weight				
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
Female				
No. of animals	12	12	10	10
Absolute organ weight				
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
Relative organ weight				
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<0.05, ** : P<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							
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Male																				
Number of animals	12				12				12											
Digestive system																				
Liver																				
Hypertrophy, centrilobular	12	0	0	0	12	0	0	0	2	9	1	0								
Respiratory system																				
Lung																				
Cellular infiltration	11	1	0	0	(0)				(0)											
Thickening, tunica media, artery	11	1	0	0																
Urinary system																				
Kidney																				
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								
Female																				
Number of animals	12				12				11				1				12			
Digestive system																				
Liver																				
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																				
Ulcer, forestomach	(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
Ulcer, glandular stomach																				
Respiratory system																				
Lung																				
Cellular infiltration	11	1	0	0	(0)				(1)				(1)				(2)			
Thickening, tunica media, artery	11	1	0	0																
Hematopoietic system																				
Thymus																				
Atrophy	12	0	0	0	(0)				(11)				(0)				(11)			
Necrosis, lymphocyte	12	0	0	0																
Spleen																				
Hematopoiesis, extramedullary, increased	11	1	0	0	(0)				(0)				(1)				(1)			
Adhesion, adipose tissue	11	1	0	0																
Proliferation, plasma cell, red pulp	12	0	0	0																
Thoracic lymph node																				
Proliferation, plasma cell, medulla	(0)				(0)				(1)				(0)				(1)			
Urinary system																				
Kidney																				
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
Others																				
Thoracic cavity																				
Abscess	(0)				(0)				(1)				(0)				(1)			

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

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

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

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	0	12	0	
Respiratory system														
Lung	(11)				(1)				(12)					
Cellular infiltration	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0	0	
Thickening, tunica media, artery	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	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	0	
Necrosis, proximal tubules	0	0	8	3	1	0	0	0	1	0	8	3	0	
Dilatation, proximal tubules	2	6	1	2	1	0	0	0	3	6	1	2	0	
Change, basophilic, proximal tubules	5	6	0	0	1	0	0	0	6	6	0	0	0	
Scar	10	1	0	0	1	0	0	0	11	1	0	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	0	
Change, fatty, periportal and mid-zonal	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	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	0	
Thickening, tunica media, artery	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0	0	
Hematopoietic system														
Thymus	(10)				(2)				(12)					
Atrophy	8	2	0	0	1	0	1	0	9	2	1	0	0	
Necrosis, lymphocyte	10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0	0	
Spleen	(10)				(2)				(12)					
Hematopoiesis, extramedullary, increased	9	1	0	0	2	0	0	0	11	1	0	0	0	
Adhesion, adipose tissue	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0	0	
Proliferation, plasma cell, red pulp	10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0	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	0	
Thrombus	10	0	0	0	1	0	1	0	11	0	1	0	0	
Necrosis, proximal tubules	10	0	0	0	2	0	0	0	10	0	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对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、对照群、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对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十分であった。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对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²⁾、

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生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、出生児の羊膜除去、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、この様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 ^{a)}	3.42 ± 0.67	3.58 ± 0.51	3.50 ± 0.52	3.42 ± 0.51
Estrous cycle ^{b)}	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 ^{c)}				
Male	12(100)	12(100)	11(91.67)	11(100)
Female	12(100)	12(100)	11(91.67)	12(100)
No. of implantations ^{d)}	12(100)	12(100)	11(100)	11(100)
No. of pregnant ^{d)}	12(100)	12(100)	11(100)	12(100)
Duration of mating ^{b)}	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 F₀ 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 ^{a)}	22.33 ± 0.49	22.08 ± 0.29	22.00 ± 0.00	22.36 ± 0.50
No. of corpora lutea ^{b)}	190(15.83 ± 1.53)	216(18.00 ± 2.13)*	192(17.45 ± 1.21)	192(17.45 ± 1.29)
No. of implantations ^{b)}	179(14.92 ± 1.16)	197(16.42 ± 2.27)	187(17.00 ± 1.10)*	183(16.64 ± 1.21)
No. of litter ^{b)}	168(14.00 ± 1.41)	191(15.92 ± 2.07)	171(15.55 ± 1.63)	173(15.73 ± 2.00)
Gestation index ^{c)}	100	100	100	100
No. of stillborns ^{d)}				
Male	0	6	2	5
Female	2	1	6	7
Total	2(1.19)	8(4.19) ⁱ⁾	8(4.68)	12(6.94)
No. of live newborns ^{b)}	166(13.83 ± 1.40)	183(15.25 ± 1.76)	163(14.82 ± 1.60)	161(14.64 ± 2.54)
Birth index ^{e)}	92.74	92.89	87.17	87.98
Sex ratio of live newborns ^{f)}	1.08(86/80)	1.01(92/91)	1.06(84/79)	0.99(80/81)
Body weight of live newborns (g) ^{g)}				
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 ^{h)}	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：測上勝野
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 μg /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 μg /プレート、TA1535およびTA1537は1000 μg /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 μg /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 μg /プレート(TA100, TA1535 およびTA1537)あるいは1000 μg /プレート(TA1535 およびWP2)用量で、S9 mix 添加試験では、1000 μg /プレート(TA1535, TA98 およびTA1537)あるいは2000 μg /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¹⁾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²⁾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、ニュートリエントプロス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。

塩化ナトリウム	0.0%
(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toa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 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

** : 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。

小試験管中にトッブアガー 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°C 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 μg / 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 μg / プレート以上で、その他の検定菌では 500 μg / 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 μg / プレート, TA100 (S9 mix 添加), WP2 *uvrA*, TA98 は 62.5 ~ 2000 μg / 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 μg / 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 tritluoromethylbenzene** in reverse mutation test (II) of 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	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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	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㈱)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 cm², 池本理化㈱)を用いた。2×10⁴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CO₂インキュベーター(5% CO₂)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㈱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C₇H₅F₃、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㈱)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%