

(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

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
材 料 お よ び 方 法	3
結 果 お よ び 考 察	7
結 論	8
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1 ~ 3	

【要 約】

(トリフルオロメチル) ベンゼンの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討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および2回の本試験を行った。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 TA100, WP2 *uvrA*, TA98 は1500 μg /プレート 以上で、TA1535, TA1537は500 μg /プレート 以上の用量で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を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、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の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。

【緒 言】

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た。

この試験は、サルモネラ(ネズミチフス菌)におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異⁽¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異⁽²⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素(S9 mix)によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験するS9 mix添加試験と、被験物質をそのまま検定菌に作用させるS9 mix無添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号)および「OECD毒性試験ガイドライン:471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」(昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号)に基づいて実施した。

【材料および方法】

〔検定菌〕

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

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、
から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に
から分与
を受けた。

検定菌は -80°C 以下で凍結保存したものを、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について行った。

試験に際して、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°C 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 (TFMB、CAS No. 98-08-8) は、分子量 146.11 の無色透明な液体である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は

ロット番号 純度 98.0%以上 (不純物: 水分 0.2%以下) のものを購入した。被験物質は、使用時まで冷蔵保管した。

TFMBは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: KCL2807)
に $10 \sim 50 \text{ mg/ml}$ 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。

TFMBのDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、低濃度 ($313 \mu\text{g/ml}$) 溶液は当該試験の本試験Ⅱで調製したものについて、また高濃度 (300 mg/ml) 溶液は当研究所で実施した染色体異常試験 (G-94-019) 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、調製後4時間までの安定性を調べた。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。これらの値は当研究所で規定している基準内（4時間後における平均含量が初期値の90%以上）であった（Appendix 2）。

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、調製液の濃度はいずれも当研究所の規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の90～110%）であった（Appendix 3）。

〔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))	ロット番号 46,	純度99.9%)	
SA	: アジ化ナトリウム	(ロット番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 2-アミノアントラセン	(ロット番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2, 2AA は DMSO 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 (TA菌株用)

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) バクアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン [*]	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	イオニン	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（ロット番号：DJ030HJ、1994年8月11日製造）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	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルウム	10 g	バクトアガー (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 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	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カルウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 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 (キッコーマン(株)、ロット番号 RAA-309、1994年5月13日製造および RAA-317、同年10月27日製造)を用いた。PB および BF の投与量は 1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したもので、ラットの解剖および S9 の調製は 5 日目であった。

[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。

小試験管中にトッペアガー 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使用溶媒、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、それぞれそ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2回実施し、結果の再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

本試験系における結果の判定には、統計学的手法は用いないこととした。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〕

結果を Table 1 に示した。TFMBについて 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他は 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 添加、無添加いずれの試験も TA1535, TA1537 を 1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA*, TA98 および TA100 を 2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。TFMBの用量は当初 TA100 (S9 mix 無添加)、TA1535, TA1537は 31.3～1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100 (S9 mix 添加)、WP2 *uvrA*, TA98 は 62.5～2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、TA100, WP2 *uvrA*, TA98 では試験ごとに抗菌性を示す用量に変動がみられた。そこで、上記 3 菌株について抗菌性を示さない用量が 4 用量に満たなかった試験については（データは示さず）、最高用量を 1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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。

TFMBについて実施したすべての試験において、陽性対照群ではいずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

以上の結果に基づき、(トリフルオロメチル)ベンゼン(TFMB)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。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態、および試験計画書からの逸脱はなかった。

【文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp. 161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of (trifluoromethyl)benzene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mea \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	92	88	83	14	10	13	31	25	24	17	20	27	8	3	8	
		(88 \pm 4.5)			(12 \pm 2.1)			(27 \pm 3.8)			(21 \pm 5.1)			(6 \pm 2.9)			
	50	80			18			27			19			9			
	150	88			14			36			25			8			
	500	98			10 *			19			21			7 *			
	1500	101 *			11 *			16 *			12 *			5 *			
	5000	81 *			0 *			14 *			16 *			0 *			
S9mix (+)	0	85	85	110	16	15	16	23	23	23	26	34	31	8	7	7	
		(93 \pm 14.4)			(16 \pm 0.6)			(23 \pm 0.0)			(30 \pm 4.0)			(7 \pm 0.6)			
	50	86			17			30			29			18			
	150	77			12			30			28			12			
	500	91			12 *			36			32			12 *			
	1500	78 *			7 *			20 *			15 *			9 *			
	5000	72 *			12 *			22 *			19 *			11 *			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	451	557	477	308	292	250	146	123	118	686	670	745	835	1053	1077	
		(495 \pm 55.2)			(283 \pm 30.0)			(129 \pm 14.9)			(700 \pm 39.5)			(988 \pm 133.3)			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1144	1310	1219	333	240	272	1467	1476	1419	512	480	517	244	228	208	
		(1224 \pm 83.1)			(282 \pm 47.2)			(1454 \pm 30.6)			(503 \pm 20.1)			(227 \pm 18.0)			

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.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of (trifluoromethyl)benzene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)																			
		Base - pair substitution type						Frameshift type													
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537								
S9mix (-)	0	97	114	127	10	8	13	18	22	20	26	21	18	11	8	5	(113 ± 15.0)	(10 ± 2.5)	(20 ± 2.0)	(22 ± 4.0)	(8 ± 3.0)
	31.3	106	93	122	11	11	15	ND	ND	ND	ND	ND	10	8	6	(107 ± 14.5)	(12 ± 2.3)			(8 ± 2.0)	
	62.5	111	121	118	13	14	8	15	25	17	23	25	26	7	9	9	(117 ± 5.1)	(12 ± 3.2)	(19 ± 5.3)	(25 ± 1.5)	(8 ± 1.2)
	125	102	141	123	10	11	6	13	20	24	30	13	26	9	7	9	(122 ± 19.5)	(9 ± 2.6)	(19 ± 5.6)	(23 ± 8.9)	(8 ± 1.2)
	250	111	103	102	6	9	8	18	17	21	17	22	15	8	5	10	(105 ± 4.9)	(8 ± 1.5)	(19 ± 2.1)	(18 ± 3.6)	(8 ± 2.5)
	500	91	93	99	7 *	11 *	6 *	20	16	26	14	13	18	4	7	6	(94 ± 4.2)	(8 ± 2.6)	(21 ± 5.0)	(15 ± 2.6)	(6 ± 1.5)
	1000	97 *	100 *	100 *	10 *	11 *	11 *	16	25	18	15 *	21 *	22 *	6 *	4 *	4 *	(99 ± 1.7)	(11 ± 0.6)	(20 ± 4.7)	(19 ± 3.8)	(5 ± 1.2)
	2000							12 *	24 *	16 *	25 *	17 *	14 *						(17 ± 6.1)	(19 ± 5.7)	
S9mix (+)	0	122	108	105	10	13	18	23	22	20	43	35	33	9	7	17	(112 ± 9.1)	(14 ± 4.0)	(22 ± 1.5)	(37 ± 5.3)	(11 ± 5.3)
	31.3				14	16	8	ND	ND	ND	ND	ND	13	8	13		(13 ± 4.2)			(11 ± 2.9)	
	62.5	89	123	102	8	10	7	30	24	24	29	31	39	15	11	8	(105 ± 17.2)	(8 ± 1.5)	(26 ± 3.5)	(33 ± 5.3)	(11 ± 3.5)
	125	91	83	105	14	15	18	22	40	39	19	30	27	14	13	11	(93 ± 11.1)	(16 ± 2.1)	(34 ± 10.1)	(25 ± 5.7)	(13 ± 1.5)
	250	77	98	103	10	9	6	24	28	23	31	27	30	14	9	8	(93 ± 13.8)	(8 ± 2.1)	(25 ± 2.6)	(29 ± 2.1)	(10 ± 3.2)
	500	89	91	91	8 *	7 *	15 *	25	23	17	33	36	23	18	11	15	(90 ± 1.2)	(10 ± 4.4)	(22 ± 4.2)	(31 ± 6.8)	(15 ± 3.5)
	1000	86	74	95	7 *	15 *	11 *	33	18	23	21	21	41	18 *	14 *	15 *	(85 ± 10.5)	(11 ± 4.0)	(25 ± 7.6)	(28 ± 11.5)	(16 ± 2.1)
	2000	65 *	72 *	84 *				16 *	32 *	31 *	26 *	27 *	27 *				(74 ± 9.6)		(26 ± 9.0)	(27 ± 0.6)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	970	981	1008	243	223	213	1423	1378	1280	259	263	258	184	179	194	(986 ± 19.6)	(226 ± 15.3)	(1360 ± 73.1)	(260 ± 2.6)	(186 ± 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 3. Results of reverse mutation test (II) of (trifluoromethyl)benzene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Me± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9mix (-)	0	88	114	113	18	15	16	20	15	19	22	22	14	11	14	9
		(105 ± 14.7)			(16 ± 1.5)			(18 ± 2.6)			(19 ± 4.6)			(11 ± 2.5)		
	31.3	103	110	105	14	11	14	17	17	19	30	22	20	7	4	10
		(106 ± 3.6)			(13 ± 1.7)			(18 ± 1.2)			(24 ± 5.3)			(7 ± 3.0)		
	62.5	95	100	100	17	14	8	20	21	34	20	17	18	5	11	10
		(98 ± 2.9)			(13 ± 4.6)			(25 ± 7.8)			(18 ± 1.5)			(9 ± 3.2)		
	125	93	93	108	14	13	13	22	32	18	21	14	20	9	14	8
		(98 ± 8.7)			(13 ± 0.6)			(24 ± 7.2)			(18 ± 3.8)			(10 ± 3.2)		
250	106	82	114	13	7	14	21	19	22	17	22	21	10	7	11	
	(101 ± 16.7)			(11 ± 3.8)			(21 ± 1.5)			(20 ± 2.6)			(9 ± 2.1)			
500	80 *	68 *	78 *	15 *	5 *	5 *	22	14	16	16	23	29	8 *	10 *	7 *	
	(75 ± 6.4)			(8 ± 5.8)			(17 ± 4.2)			(23 ± 6.5)			(8 ± 1.5)			
1000	3 *	78 *	79 *	4 *	2 *	4 *	25 *	28 *	19 *	18 *	16 *	19 *	7 *	7 *	9 *	
	(53 ± 43.6)			(3 ± 1.2)			(24 ± 4.6)			(18 ± 1.5)			(8 ± 1.2)			
S9mix (+)	0	112	121	120	8	12	12	33	28	32	44	36	29	19	10	19
		(118 ± 4.9)			(11 ± 2.3)			(31 ± 2.6)			(36 ± 7.5)			(16 ± 5.2)		
	31.3	ND			13	13	18	ND			ND			10	17	12
					(15 ± 2.9)									(13 ± 3.6)		
	62.5	138	129	124	17	14	6	35	33	29	45	32	42	17	26	16
		(130 ± 7.1)			(12 ± 5.7)			(32 ± 3.1)			(40 ± 6.8)			(20 ± 5.5)		
	125	133	103	118	17	18	17	28	26	31	27	38	44	14	22	20
		(118 ± 15.0)			(17 ± 0.6)			(28 ± 2.5)			(36 ± 8.6)			(19 ± 4.2)		
250	124	95	104	9	14	13	23	29	21	43	38	25	11	10	13	
	(108 ± 14.8)			(12 ± 2.6)			(24 ± 4.2)			(35 ± 9.3)			(11 ± 1.5)			
500	81	96	107	12	12	11	24	23	26	36	24	33	13 *	11 *	9 *	
	(95 ± 13.1)			(12 ± 0.6)			(24 ± 1.5)			(31 ± 6.2)			(11 ± 2.0)			
1000	75	96	104	13 *	6 *	6 *	24	23	19	25 *	27 *	23 *	7 *	10 *	11 *	
	(92 ± 15.0)			(8 ± 4.0)			(22 ± 2.6)			(25 ± 2.0)			(9 ± 2.1)			
2000	59 *	72 *	84 *				18 *	20 *	22 *	20 *	23 *	22 *				
	(72 ± 12.5)						(20 ± 2.0)			(22 ± 1.5)						
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1164	1206	1145	254	288	268	913	869	854	372	303	455	163	180	169
		(1172 ± 31.2)			(270 ± 17.1)			(879 ± 30.7)			(377 ± 76.1)			(171 ± 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