最 終 報 告 書

『3,4-ジクロロベンジルクロリドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験』

試験受託者試験番号：N-172

試験番号 H-09003

群馬県渋川市有馬 1967-11

株式会社 SRD 生物センター

試験実施の概括

試験名称：3,4-ジクロロベンジルクロリドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
試験受託者試験番号 N-172
試験番号 H-09003

1.試験目的

3,4-ジクロロベンジルクロリドについてほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無を検討する。

2. GLP

厚生労働省、経済産業省ならびに環境省の「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」［平成 15 年 11 月 21 日（薬食発第 1121003 号）厚生労働省医薬食品局長、（平成 15・11・17 製局第 3 号）経済産業省製造産業局長、（環保企発第 031121004 号）環境省総合環境政策局長連名基準、最終改正：平成 20 年 7 月 4 日］

3.参照したガイドライン

「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、最終改正：平成18年11月20日）ならびに「OECD Guideline for the Testing of Chemicals #473 (adopted on July 21, 1997)」（以下、ガイドラインと略す）

4.試験委託者

名　称	国立医薬品食品衛生研究所
所在地	東京都世田谷区上用賀 1-18-1

5.試験受託者

名　称	日生研株式会社
所在地	東京都青梅市新町 9-2221-1

6.試験施設

名　称	株式会社 SRD 生物センター　渋川ラボラトリー
所在地	群馬県渋川市有馬 1967-11

7.記録、資料および標本の保存

(1) 保存期間

最終報告書提出から 10 年とし、その後の保存については試験受託者と協議の上決定する。

(2) 保存物と保存場所

①試験計画書（原本）、試験に関する記録文書、最終報告書（原本）、試験実施によって得られた生データ、資料類、被験物質保存サンプル
：株式会社 SRD 生物センター　渋川ラボラトリー

②標　本　：株式会社 SRD 生物センター　榛名ラボラトリー

目　次

頁

最終報告書の作成 …… (4の1)

試験実施の概括 …… (4の2)

Ⅰ. 要　約 …… 1

Ⅱ. 試験目的 …… 2

Ⅲ. 試験材料および方法 …… 2

Ⅳ. 試験結果 …… 9

Ⅴ. 考察および結論 …… 10

Ⅵ. 参考文献 …… 10

Fig.1-1. The effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on the growth of CHL/IU cells in short time treatment method (dose determination test) …… 11

Fig.1-2. The effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on the growth of CHL/IU cells in continuous treatment method (dose determination test) …… 12

Fig.2-1. The effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on the growth of CHL/IU cells in short time treatment method (dose determination test: 2nd test) …… 13

Fig.2-2. The effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on the growth of CHL/IU cells in continuous treatment method (dose determination test: 2nd test) …… 14

Fig.3-1. Dose-response curve of the incidence of chromosomal aberrations induced by 3,4-Dichlorobenzyl chloride in short time treatment method …… 15

Fig.3-2. Dose-response curve of the incidence of chromosomal aberrations induced by 3,4-Dichlorobenzyl chloride in continuous treatment method …… 16

Table 1. Effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on cell growth (dose determination test) …… 17

Table 2. Effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on cell growth (dose determination test: 2nd test) …… 18

Appendix 1. Chromosomal aberration test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in CHL/IU cells (Short time treatment with and without S9 mix) ····· 19

Appendix 2. Chromosomal aberration test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in CHL/IU cells (Continuous treatment for 24 hr) ····· 20

Ⅰ. 要　約

3,4-ジクロロベンジルクロリドの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株(CHL/IU 細胞)を用いて、短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間培養系列にて染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験は、S9 無添加培養系列で 0.035、0.03、0.025、0.02 mg/mL、S9 添加培養系列で 0.17、0.12、0.07、0.035 mg/mL、24 時間培養系列で 0.03、0.025、0.02、0.015 mg/mL のそれぞれ 4 用量で実施した。

その結果、被験物質で処理した全ての培養系列において構造異常を有する細胞（構造異常細胞）あるいは数的異常細胞（倍数体）の出現頻度は陰性対照群と同程度であった。なお、被験物質の沈殿は認められなかった。

一方、各培養系列の陽性対照群では、構造異常を有する細胞の出現頻度に顕著な増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの染色体異常誘発性は陰性と判断された。

Ⅱ．試験目的

3,4-ジクロロベンジルクロリドについてほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無を検討した。

Ⅲ．試験材料および方法

1.被験物質 注

(1) 名　称	3,4-ジクロロベンジルクロリド
(2) 別名（商品名）	3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97%
(3) CAS No.	102-47-6
(4) 化学式	$C_7H_5O_{13}$
(5) 分子量	195.47
(6) Lot No.	
(7) 純　度	99.9%
(8) 外　観	無色透明液体
(9) 保管条件	室温
(10) 同一性	提供された情報と送付された被験物質のラベルを目視により比較し、同一であることを確認した。
(11) 安定性	試験受託者で保管している同じロット番号の被験物質について、試験受託者にて安定性分析を実施した。その結果、約 16 週間保存後において安定であったため、当該試験の実験期間中においても安定であったと判断した。

(12) 提供者（試験受託者）

名　称	日生研株式会社
所在地	東京都青梅市新町 9-2221-1

(13) 残余被験物質の処分

残余被験物質はサンプルとして少量採取した後、試験受託者に返却する。

注：本被験物質は、Sigma-Aldrich 社製造の製品（3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97%）を試験受託者が購入したものである。特性は製造元の情報による。

2.対照物質

(1) 陰性対照物質

Dimethyl Sulfoxide（DMSO、特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社）を用いた。

(2) 陽性対照物質

① Mitomycin C（MMC）

MMC（Lot No.KLH1017、和光純薬工業株式会社）は注射用蒸留水（局方、Lot No. 61008D、扶桑薬品工業株式会社）で溶解し、生理食塩液（局方、Lot No. 60820D、扶桑薬品工業株式会社）で段階希釈して 10 μg/mL（最終濃度；0.1 μg/mL）となるように調製後、−20℃以下（型式：GR-W22A、冷凍冷蔵庫、株式会社東芝）に保存したものを連続処理法および短時間処理法の S9 無添加培養系列の場合に用時解凍して用いた。

②Benzo[a]pyrene（B[a]P）

B[a]P（Lot No. KLG2702、和光純薬工業株式会社）は 4 mg/mL（最終濃度；20 μg/mL）となるように DMSO（特級、Lot No.PEL2769、和光純薬工業株式会社）に溶解し、−80℃以下（型式：MDF-192AT、超低温フリーザー、三洋電機特機株式会社）に保存したものを短時間処理法の S9 添加培養系列の場合に用時解凍して用いた。

3.被験物質の用量および調製

(1) 用量

細胞増殖抑制試験では 0.003、0.008、0.025、0.074、0.222、0.667、2 mg/mL（最終濃度）、細胞増殖抑制試験 2 回目の短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL（最終濃度）、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.005、0.01、0.015、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL（最終濃度）とした。また、染色体異常試験の短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL（最終濃度）、S9 添加培養系列では 0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL（最終濃度）、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mL（最終濃度）とした。

(2) 使用した溶媒および溶媒選択の理由

DMSO（特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社）を用いた。事前に溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、水には不溶であったが DMSO には任意の割合で溶解したことから、DMSO を選択した。

(3) 調製方法

被験物質を高精度・分析用セミ・ミクロ電子天びん（型式：ER-182A、株式会社エー・アンド・デイ）で、細胞増殖抑制試験で 1000 mg（実秤量値：1001.0 mg）、細胞増殖抑制試験 2 回目で 70 mg（実秤量値：70.2 mg）、染色体異常試験では 85 mg（実秤量値：85.2 mg）秤量後、DMSO に溶解させ、それぞれ 5 mL、10 mL および 5 mL にメスアップしたものを最高用量とし、段階希釈して試験に供した。なお、被験物質液は用時調製した。また、被験物質液の状態を調製時に確認した結果、発熱、発泡、着色（変色）はなかった。

4.使用細胞

本邦で染色体異常試験に汎用されており、検出感度に優れているチャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（CHL／IU 細胞）を使用した。使用株化細胞は 1991 年 10 月 31 日、国立医薬品食品衛生研究所（旧名：国立衛生試験所）より入手した。なお、同株化細胞は入手後培養し、石館の方法 [1] で、液体窒素容器中で凍結保存した。また、細胞株の保存ロットについてマイコプラズマの汚染がないものを使用した。

5.培養液

(1) 培養液

Eagle's Minimum Essential Medium（MEM；Lot No.464676、GIBCO、Invitrogen）

(2) 添加血清

Bovine serum（BS；Lot No. 687676、GIBCO、Invitrogen）

(3) 調製

$NaHCO_3$（特級、Lot No. WKF0320、和光純薬工業株式会社）2.2 g を純水 950 mL に溶解させ、さらに MEM 9.6 g を加え溶解させた。これを 0.1 mol/L HCl で pH 7.2 に調整し、シリンジフィルター（0.2 μm、IWAKI GLASS）を用いて濾過滅菌した。その後 900 mL を採取し、非働化した BS を 100 mL 加えたものを使用した。

6.ラット肝ホモジネート（S9）および S9 mix の調製

(1) S9 の種類と購入先および保存法

Phenobarbital および 5,6-Benzoflavone で誘導された Sprague－Dawley 系雄性ラットの S9（Lot No. RAA-590）をキッコーマン株式会社から購入し、－80℃以下（型式：MDF-192AT、サンヨー超低温フリーザー、三洋電機メディカシステム株式会社）で保存した、製造後 6 ヵ月以内のものを用時に解凍して使用した。

(2) S9 mix の組成と調製法

1 mL あたりの S9 mix の組成を以下に示す。

成　分	組　成
S9	0.3 mL (30%)
$MgCl_2$	5 μmol
KCl	33 μmol
ｸﾞﾙｺｰｽ-6-ﾘﾝ酸	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol

S9 mix は上記組成で必要量を用時調製した。調製方法として、ｸﾞﾙｺｰｽ-6-ﾘﾝ酸 (Lot No. 118803) および NADP (Lot No. 045604、以上、オリエンタル酵母工業株式会社) を純水に溶解し、これに 50 mmol/L $MgCl_2$、330 mmol/L KCl の混合液、さらに、HEPES 緩衝液を混合させ、シリンジフィルター (0.2 μm、IWAKI GLASS) で濾過滅菌した後、S9 を加えた。

7.試験操作

試験は石館の方法 [1] に従って実施した。培養系列として短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間時間培養系列の計 3 系列を設定した。ただし、細胞増殖抑制試験 2 回目は S9 無添加培養系列よび 24 時間培養系列のみ実施した。

識別方法はシャーレの側面および蓋に油性インキで試験を識別する符合およびシャーレを識別する番号を記入した。

(1) 前培養

凍結保存された細胞を解凍後、5 mL の培養液を用いて 25 cm^2 細胞培養用フラスコ (Becton Dickinson labware) に入れ、CO_2 インキュベーター (型式： 3110 シリーズ、サーモエレクトロン株式会社) で培養した (実測値：CO_2 濃度 5%、温度 37.0℃、湿度 95%) 。培養終了後、トリプシン処理して浮遊させた細胞を 1000rpm で 5 分間遠心分離 (型式：5800、ユニバーサル冷却遠心機、久保田商事株式会社) して集め新鮮培養液に懸濁した後、血球計算盤を用いて細胞数を計数した。計数結果から、細胞数が 1×10^4 cells/mL となるように新鮮培養液で希釈調整した。

(2) 細胞増殖抑制試験

継代培養後、1×10^4 cells/mLに調整した細胞浮遊液を35 mm細胞培養用シャーレ（Becton Dickinson labware）に2 mLずつ播き（継代数17）3日間培養した後、全シャーレに通し番号を記入し、連続処理法の24時間培養系列、短時間処理法のS9添加およびS9無添加培養系列の計3系列に分別した。なお、各培養系列の各用量について2枚ずつのシャーレを使用した。連続処理法の場合には各シャーレに陰性対照物質または被験物質液を0.01 mL/mLずつ加え、CO_2濃度5%、温度37.0℃、湿度95%に設定したCO_2インキュベーター（型式：MIP-3158 サーモエレクトロン株式会社）で24時間培養した。

短時間処理法のS9添加およびS9無添加培養系列の場合には、S9添加培養系列のみS9の最終濃度が5%となる量のS9 mixを加え、その後、各シャーレに連続処理法と同様な条件で陰性対照物質または各被験物質液を加えた。両系列とも6時間培養後にシャーレ内を生理食塩液で洗浄した後、新鮮培地を加え、さらにCO_2インキュベーター内で18時間培養した。

培養終了後、シャーレ内を生理食塩液で洗浄後、細胞を10%ホルマリン水溶液で固定した。その後0.1%クリスタル・バイオレットで10分間染色したあと、水洗、乾燥させた。これをモノセレーター(オリンパス光学工業株式会社)を用いてそれぞれのシャーレの染色性から間接的に細胞増殖率を測定した。得られた結果を図示し、概略の50%細胞増殖抑制濃度を求めた。

(3) 細胞増殖抑制試験2回目

短時間処理法のS9無添加培養系列および連続処理法の24時間培養系列について、細胞増殖抑制試験と同様の方法で行った。試験には継代数20の細胞を用いた。

(4) 染色体異常試験

継代培養した細胞浮遊液を血球計算板を用いて細胞数を確認した後、1×10^4 cells/mLに希釈調整し、必要枚数の60 mm細胞培養用シャーレ（標本作製用、Becton Dickinson labware）に5 mL、35 mm細胞培養用シャーレ（細胞増殖率測定用）に2 mLずつ入れた（継代数22）。3日間培養した後、連続処理法の24時間培養系列、短時間処理法のS9添加およびS9無添加培養系列の計3系列に分別し、各系列について陰性対照群、陽性対照群をおいた。なお、各培養系列、用量につき標本作製用2枚、細胞増殖率測定用1枚とした。

連続処理法の24時間培養系列では、シャーレに陰性対照物質および各濃度の被験物質液を0.01 mL/mL、陽性対照物質のMMCを0.01 mL/mL添加して24時間培養した。

短時間処理法のS9添加およびS9無添加培養系列の場合、S9添加培養系列のみ

S9 の最終濃度が 5%となる量の S9 mix を加え、さらにシャーレに連続処理法と同様な条件で陰性対照物質または各濃度の被験物質液を加え、陽性対照物質として S9 無添加培養系列の場合は MMC を 0.01 mL/mL、S9 添加培養系列の場合は B[a]P を 0.005 mL/mL 加えた。両系列とも 6 時間培養後にシャーレ内を生理食塩液で洗浄した後、新鮮培地を加え、さらに 18 時間培養した。連続処理法および短時間処理法ともに温度 37.0℃、湿度 95%、CO_2 濃度 5%に設定した CO_2 インキュベーター内で培養した。

全ての培養系列の全シャーレについて、培養終了 2 時間前にコルセミド溶液（Lot No.PEL7660、和光純薬工業株式会社）を最終濃度が 0.2 μg/mL となるよう加え、分裂中期細胞を蓄積させた。培養終了後、37℃で温めた 0.25%トリプシン溶液で細胞を剥離し、1000 rpm で 5 分間遠心分離（テーブルトップ遠心機、型式:8100、久保田商事株式会社）して細胞を集めた後、0.075 mol/L KCl 溶液により 37℃で 15 分間低張処理した。冷却したカルノア液(メタノール：酢酸の容量比が 3：1 の混合液)を 1 mL 加え、遠心分離をして上清を捨て、さらに 5 mL のカルノア液で細胞を固定した。再び遠心分離し、以下、同様な処理を 2 回繰り返した。その後、濡らしたガーゼ上のスライドグラス 2 ヵ所に、得られた細胞懸濁液を 1～2 滴ずつ滴下した。

乾燥させたスライドグラスを 50 mmol/L リン酸緩衝液（pH 6.8）で 1.5%に調製したギムザ染色液で約 15 分間染色し、水洗、乾燥させてプレート標本とし、作製したプレート標本にランダマイズした番号を割り当てた。

全ての培養系列について、培養終了時に陰性対照群と各用量群の細胞増殖率を細胞増殖抑制試験と同様な方法で測定した。

8.観　察

よく広がった 1 用量当たり 200 個（各プレート当たり 100 個）の分裂中期像を、倍率が 750 倍の微分干渉型生物顕微鏡（BHS-323N、株式会社オリンパス）で観察した。

染色体異常の分類については、数的異常は倍数体、構造異常は染色分体型切断(ctb)、染色分体型交換(cte)、染色体型切断(csb)、染色体型交換(cse)およびその他(o)に分類した。染色分体あるいは染色体型ギャップ(g)については上記分類とは別に記録した。ギャップの判定基準は染色分体幅よりも狭い非染色性部位のものとした。その他とは 1 個の分裂中期像に多数のギャップ、切断などがあった場合に断片化（Frg.）として記録した。これらの異常を 1 個でも有する細胞を異常細胞 1 個として記録した。

染色体が観察できる細胞がない場合、またはプレート当たり 50 個以下である場合は Toxic（TOX）として記録した。

9.判　定

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群と比較して明らかに上昇し、かつ、用量依存性が認められた場合、または、単独な用量で明らかに上昇し、かつ、再現性が認められた場合には陽性と判定し、それ以外は陰性と判定した。

ギャップについては、構造異常に含めない結果で表記し、総合判定でもギャップを含めない結果で評価した。

10.統計学的解析

統計学的手法は用いなかった。

Ⅳ. 試験結果

50%細胞増殖抑制濃度を求めるために 0.003、0.008、0.025、0.074、0.222、0.667 および 2 mg/mL の用量で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の顕著な減少が認められ、短時間処理法の S9 添加培養系列におけ 50%細胞増殖抑制濃度は約 0.1 mg/mL と求められた。しかしながら短時間処理法の S9 無添加培養系列および連続処理法の 24 時間培養系列では、急激な細胞増殖抑制作用により適切な 50%細胞増殖抑制濃度を求めることできなかった。なお、被験物質の沈殿は 0.222 mg/mL 以上で認められた（Fig. 1-1、1-2、Table 1）。

細胞増殖抑制試験の結果から、短時間処理法の S9 無添加培養系列では、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列では、0.005、0.01、0.015、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL のそれぞれ 7 用量で細胞増殖抑制試験 2 回目を実施した。その結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の減少が認められ、50％細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法の S9 無添加培養系列で約 0.028 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列で約 0.025 mg/mL と求められた。なお、被験物質の沈殿は認められなかった（Fig. 2-1、2-2、Table 2）。

以上の結果から染色体異常試験は、短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL、S9 添加培養系列では 0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mL のそれぞれ 4 用量で実施した。その結果、いずれの培養系列においても陰性対照の構造異常細胞の出現頻度は 0.5%、数的異常（倍数体）細胞の出現頻度は 0.0%であった。また、被験物質処理群ではいずれも、構造異常細胞の出現頻度は 0.5～1.5%、数的異常（倍数体）細胞の出現頻度は 0.0%であり、陰性対照群と同程度であった。被験物質の沈殿は認められなかった。一方、各陽性対照群では、それぞれ染色体の構造異常細胞の出現頻度に顕著な増加が認められ、構造異常細胞の出現頻度は、短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列では 25.5 および 41.0%、連続処理法の 24 時間培養系列では 36.5%であった。また、全ての培養系列での数的異常（倍数体）細胞の出現頻度は 0.0%であった。染色体異常試験で測定した細胞増殖率は、短時間処理法の S9 無添加培養系列の 0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL ではそれぞれ 86、60、39、32％、S9 添加培養系列の 0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL ではそれぞれ 93、77、49、29%、連続処理法の 24 時間培養系列の 0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mL では 99、73、48、30%であった（Fig. 3-1、3-2、Appendix 1、2）。

V. 考察および結論

3,4-ジクロロベンジルクロリドの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を用いて短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間培養系列にて、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験および同試験 2 回目の結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の減少が認められ、50％細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法の S9 無添加培養系列で約 0.028 mg/mL、S9 添加培養系列で約 0.1 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列で約 0.025 mg/mL と求められた。なお、被験物質の沈殿は細胞増殖抑制試験の 0.222mg/mL 以上で認められた。

これらのことより染色体異常試験の用量は、強い細胞毒性を示す用量から、弱い細胞毒性を示す用量あるいは細胞毒性を示さない用量まで網羅されるように設定した。すなわち短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL、S9 添加培養系列では 0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mL のそれぞれ 4 用量とした。その結果、被験物質で処理した全ての培養系列において、構造異常細胞あるいは数的異常（倍数体）細胞の出現頻度は陰性対照群と同程度であった。被験物質の沈殿は認められなかった。

各陽性対照群では、構造異常を有する細胞の出現頻度が顕著に増加し、陰性および陽性各対照群では、共にバックグランドデータ（添付資料 1）の Mean±2.5S.D.の範囲内であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

また、染色体異常試験の細胞増殖率より、いずれの培養系列においても強い細胞毒性を示す用量から、弱い細胞毒性を示す用量あるいは細胞毒性を示さない用量まで網羅されている。これらのことから当該試験の用量設定は適切である事が示された。

以上の結果から、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの染色体異常誘発性は陰性と判定された。

VI. 参考文献

1）石館基：染色体異常による変異原の検出法、変異原と毒性、1（4）、64-73、1978.

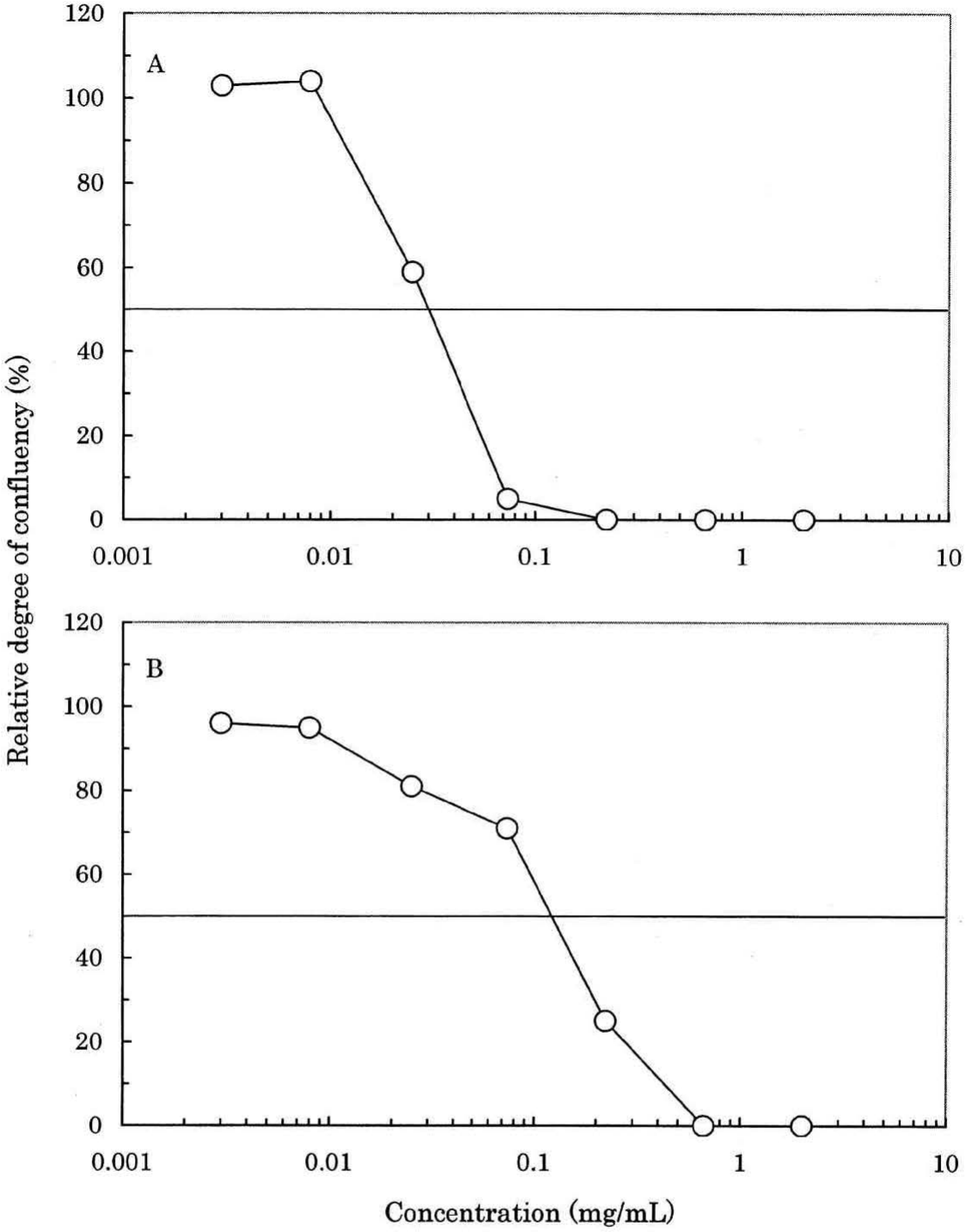

Fig. 1-1. The effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on the growth of CHL/IU cells in short time treatment method (dose determination test)

A : Short time treatment without S9 mix

B : Short time treatment with S9 mix

Study No. H-09003

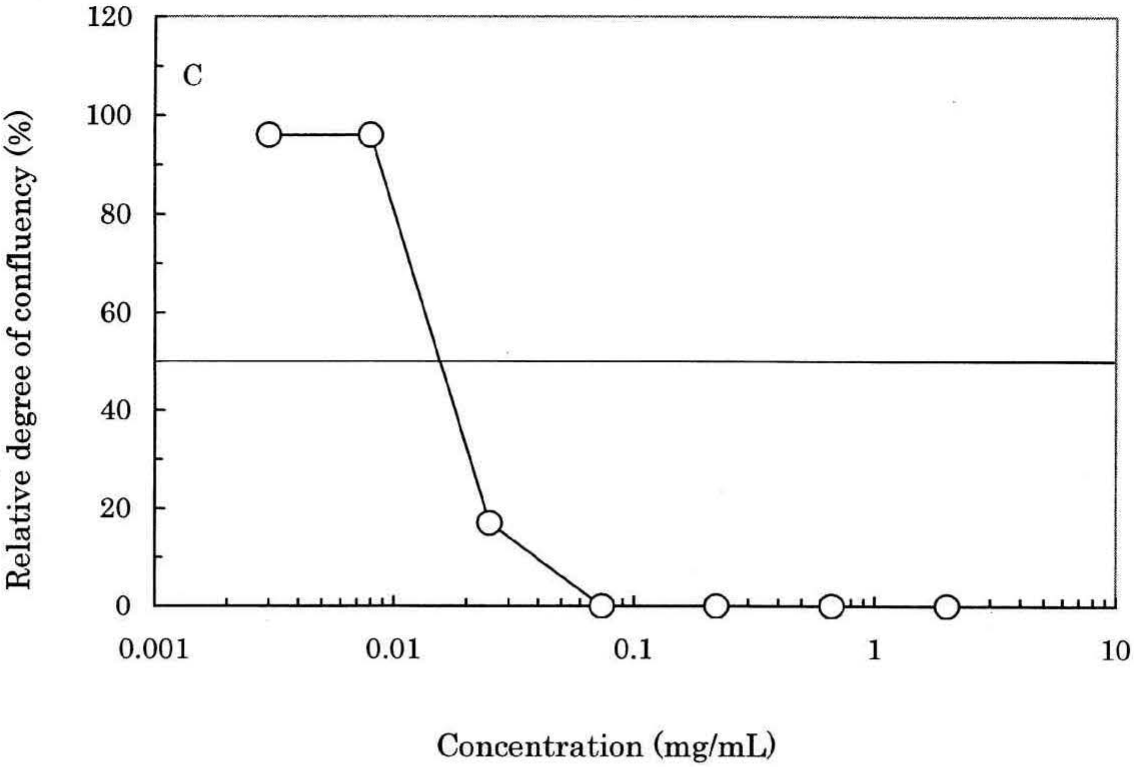

Fig. 1-2. The effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on the growth of CHL/IU cells in continuous treatment method (dose determination test)
C : Continuous treatment for 24 hr

Study No H-09003

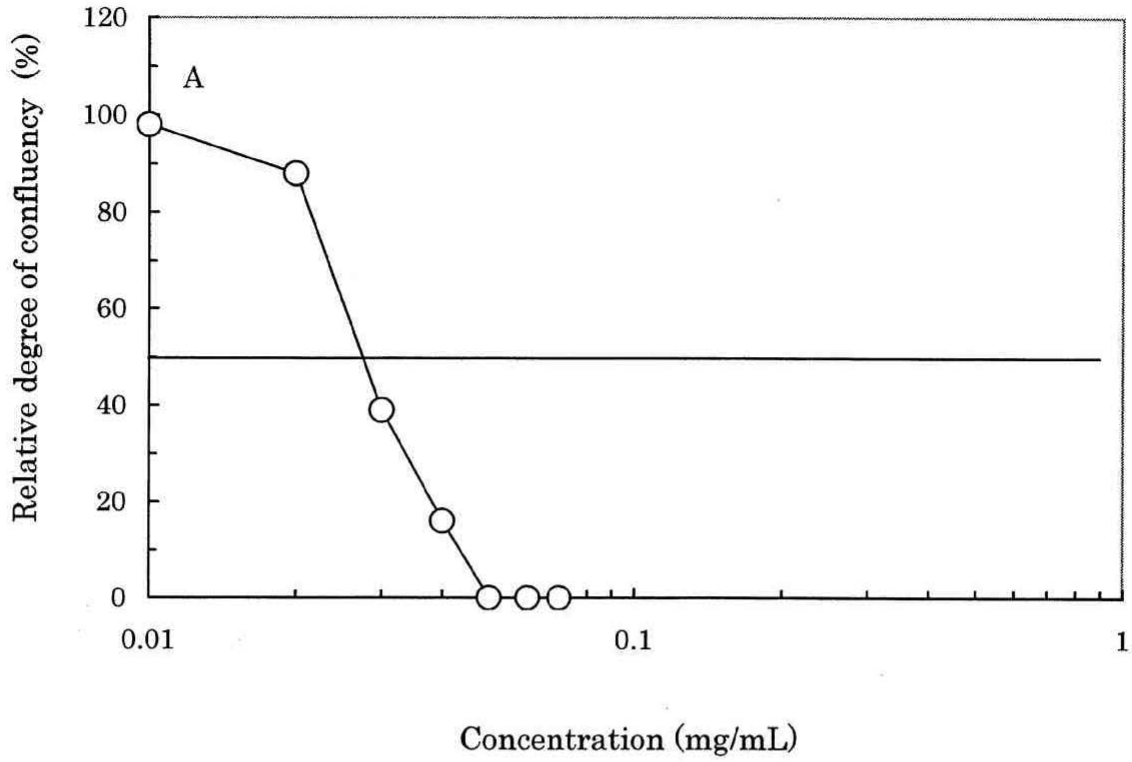

Fig. 2-1. The effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on the growth of CHL/IU cells in short time treatment method (dose determination test: 2nd test)
A : Short time treatment without S9 mix

Study No. H-09003

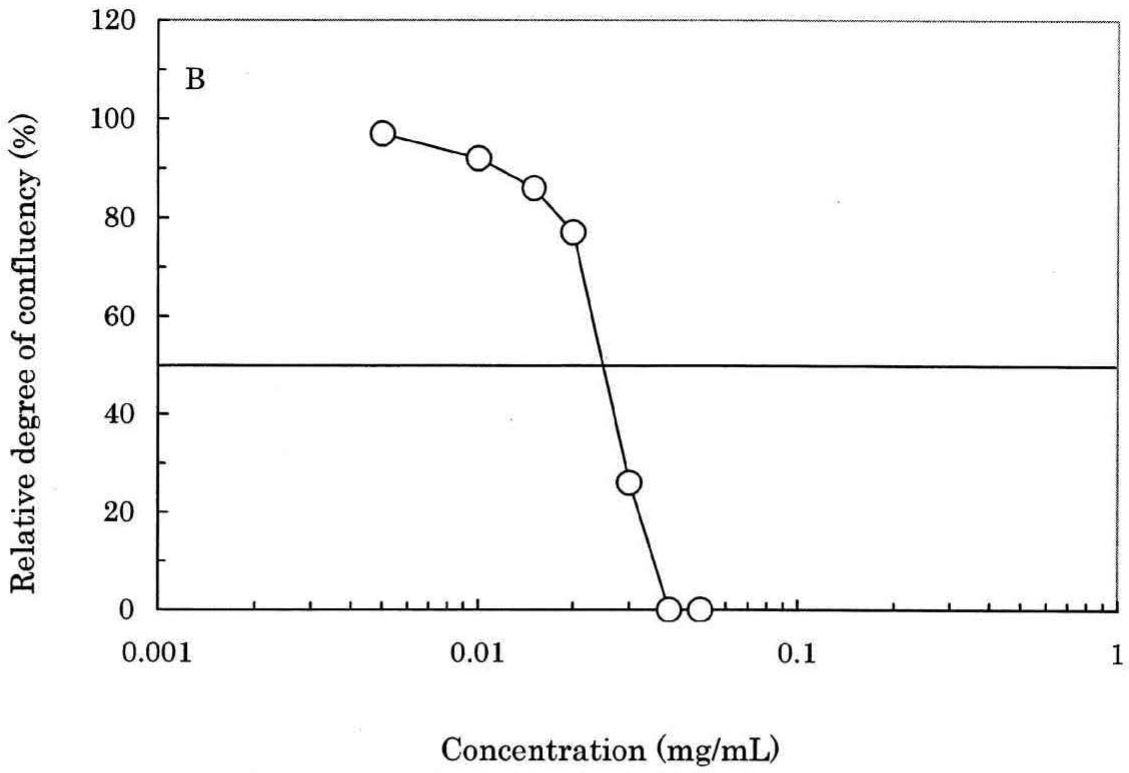

Fig. 2-2. The effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on the growth of CHL/IU cells in continuous treatment method (dose determination test: 2nd test)
B : Continuous treatment for 24 hr

Study No. H-09003

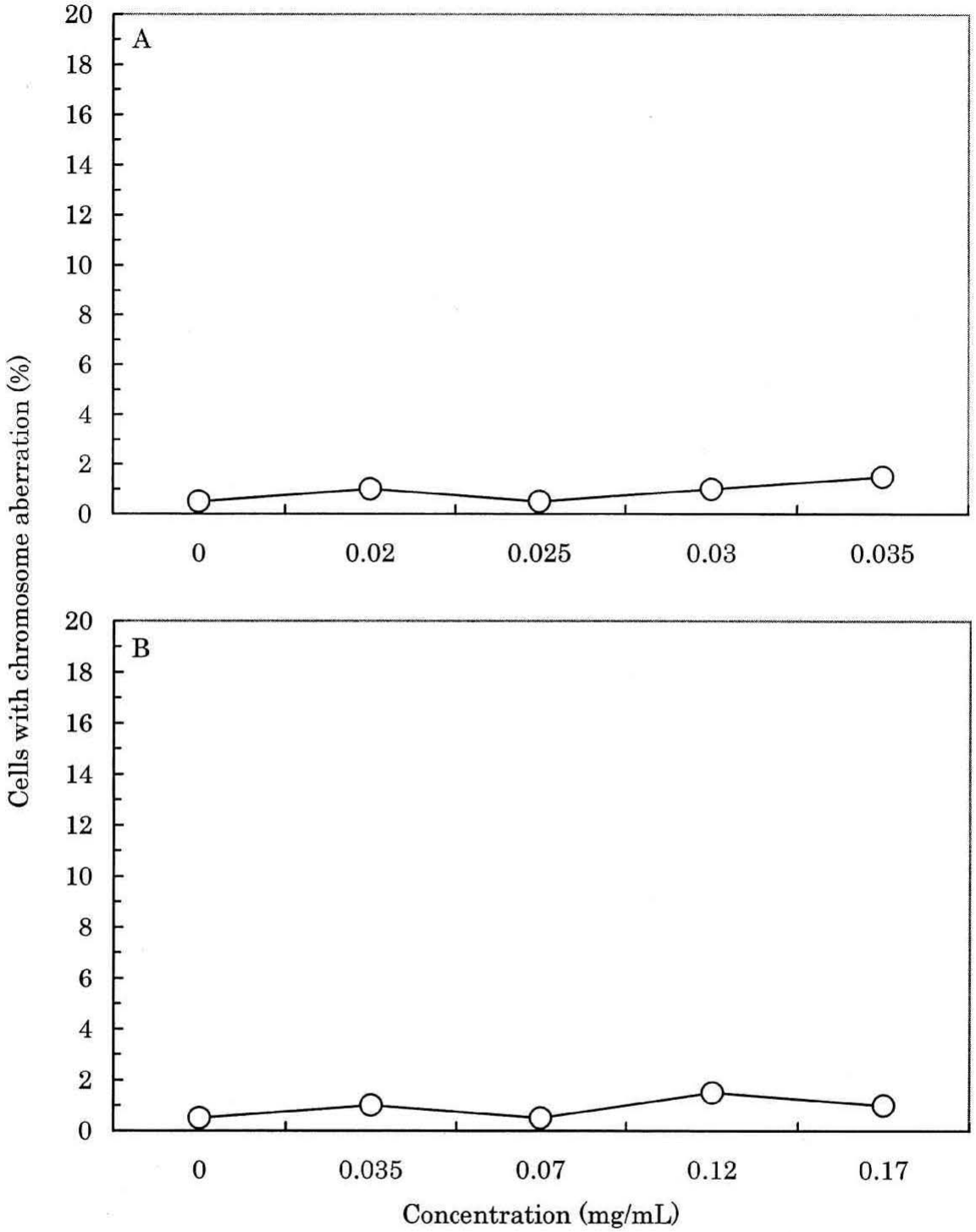

Fig. 3-1. Dose-response curve of the incidence of chromosomal aberrations induced by 3,4-Dichlorobenzyl chloride in short time treatment method

A : Short time treatment without S9 mix
B : Short time treatment with S9 mix

Study No. H-09003

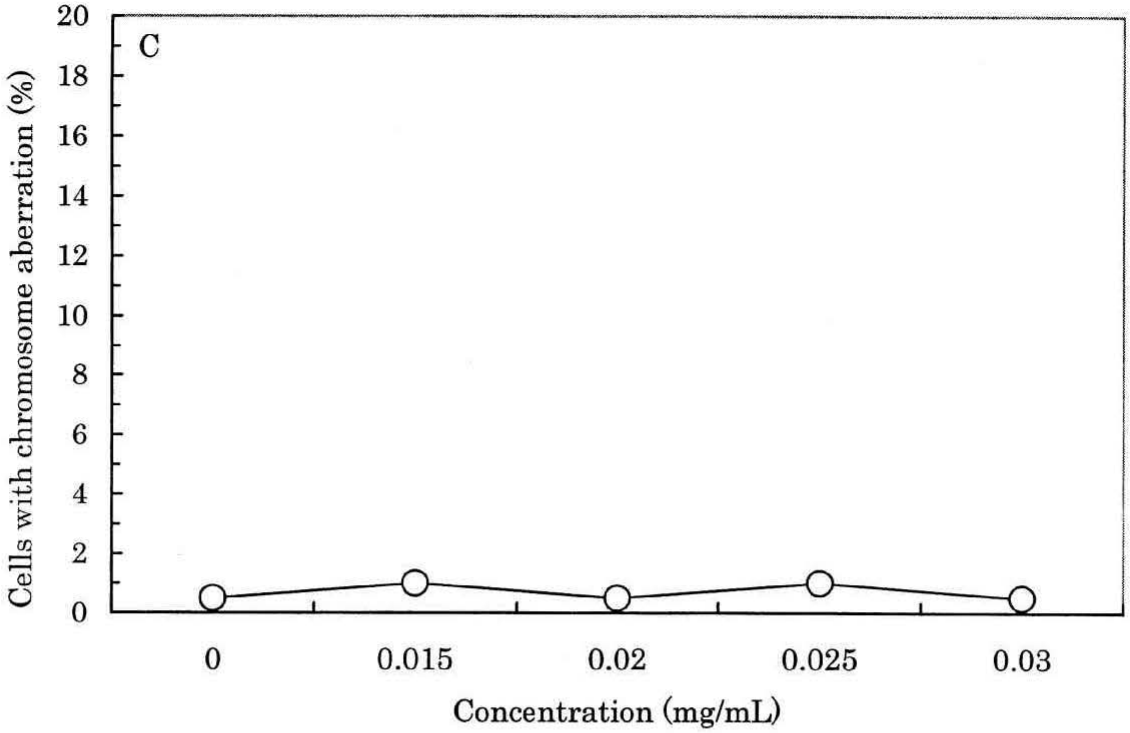

Fig. 3-2. Dose-response curve of the incidence of chromosomal aberrations induced by 3,4-Dichlorobenzyl chloride in continuous treatment method

C : Continuous treatment for 24 hr

Study No. H-09003

Table 1. Effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on cell growth (dose determinaton test)

Concentration (mg/mL)	Short time treatment		Continuous treatment	
	Without S9 mix	With S9 mix	Treatment for 24 hr	
	Cell growth (%)	Cell growth (%)	Cell growth (%)	
0 (Solvent)	100	100	100	
0.003	103	96	96	
0.008	104	95	96	
0.025	59	81	17	
0.074	5	71	0	
0.222 †	0	25	0	
0.667 †	0	0	0	
2 †	0	0	0	

Solvent: DMSO

†: Precipitation of test substance

Study No. H-09003

Table 2. Effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride on cell growth (dose determinaton test: 2nd test)

Concentration (mg/mL)	Short time treatment	Continuous treatment
	Without S9 mix	Treatment for 24 hr
	Cell growth (%)	Cell growth (%)
0 (Solvent)	100	100
0.005	—	97
0.01	98	92
0.015	—	86
0.02	88	77
0.03	39	26
0.04	16	0
0.05	0	0
0.06	0	—
0.07	0	—

Solvent: DMSO

Study No. H-09003

Appendix 1. Chromosomal aberration test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in CHL/IU cells (Short time treatment with and without S9 mix)

Treatment time (hr)	With(+)or without(-) S9 mix	Concentration of the test substance (mg/mL)	Number and the percentage(%) of cells showing structural chromosomal aberrations							Total gap of chromatid and chromosome	Cell growth index (%)	Number and the percentage(%) of cells showing polyploids			
			Number of observed cells	Chromatid break	Chromatid exchange	Chromosome break	Chromosome exchange	Others	Total number			Number of observed cells	Number of polyploids	Others	Total number
6−18	−	Negative control [DMSO] 0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	1		100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	−	0.02	100	0	1	0	0	0	1	0	86	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	1		100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	−	0.025	100	0	1	0	0	0	1	1	60	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	−	0.03	100	0	0	0	1	0	1	0	39	100	0	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	−	0.035	100	1	1	0	0	0	1	0	32	100	0	0	0
			100	0	2	0	0	0	2	0		100	0	0	0
			200	1 (0.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	−	Positive control [MMC] 0.0001	100	6	16	0	3	0	22	4		100	0	0	0
			100	11	22	0	2	0	29	5		100	0	0	0
			200	17 (8.5)	38 (19.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	51 (25.5)	9 (4.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	+	Negative control [DMSO] 0	100	0	0	0	0	0	0	1	100	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	+	0.035	100	0	1	0	0	0	1	0	93	100	0	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	+	0.07	100	0	0	0	0	0	0	0	77	100	0	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	1		100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	+	0.12	100	0	1	0	1	0	2	0	49	100	0	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	+	0.17	100	0	1	0	0	0	1	0	29	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	1		100	0	0	0
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6−18	+	Positive control [B(a)P] 0.02	100	19	27	0	4	0	39	7		100	0	0	0
			100	13	28	0	6	0	43	8		100	0	0	0
			200	32 (16.0)	55 (27.5)	0 (0.0)	10 (5.0)	0 (0.0)	82 (41.0)	15 (7.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

6−18 : Cells were cultured for 6 hr after the addition of test substance and followed by 18 hr recovery period after removing test substance.
( ) : Mean
Negative control [DMSO] : Dimethyl sulfoxide
Positive control [MMC] : Mitomycin C, [B(a)P] : Benzo[a]pyrene

Appendix 2. Chromosomal aberration test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in CHL/IU cells (Continuous treatment for 24 hr)

Treatment time (hr)	Concentration of the test substance (mg/mL)	Number and the percentage(%) of cells showing structural chromosomal aberrations							Total gap of chromatid and chromosome	Cell growth index (%)	Number and the percentage(%) of cells showing polyploids			
		Number of observed cells	Chromatid break	Chromatid exchange	Chromosome break	Chromosome exchange	Others	Total number			Number of observed cells	Number of polyploids	Others	Total number
24	Negative control [DMSO] 0	100	0	0	0	1	0	1	1	100	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24	0.015	100	0	1	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
		100	0	0	0	1	0	1	1		100	0	0	0
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24	0.02	100	1	0	0	0	0	1	0	73	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24	0.025	100	1	0	0	0	0	1	1	48	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24	0.03	100	0	0	0	0	0	0	1	30	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24	Positive control [MMC] 0.0001	100	16	19	0	4	0	35	8		100	0	0	0
		100	19	21	1	5	0	38	9		100	0	0	0
		200	35 (17.5)	40 (20.0)	1 (0.5)	9 (4.5)	0 (0.0)	73 (36.5)	17 (8.5)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

( ) : Mean
Negative control [DMSO] : Dimethyl sulfoxide
Positive control [MMC] : Mitomycin C

Study No. H-09003

Attached sheet 1. Historical background data (Mean ± 2.5S.D.)

S9 mix	Treatment time (hr)	Substance used	Number of observed cells	Polyploide cells (%,± 2.5S.D.)	Structural chromosomal aberration (%)							
						Chromatid-type		Chromosome-type		Others	Total	
					g	ctb	cte	csb	cse		−g	+g
−	6-18	Negative control										
		DMSO	2200	0.0 ± 0.00	0.5 ± 1.27	0.3 ± 1.19	0.2 ± 1.07	0.0 ± 0.00	0.1 ± 0.74	0.0 ± 0.00	0.6 ± 1.23	1.1 ± 1.32
		Positive control										
		MMC	5700	0.1 ± 0.64	3.6 ± 3.47	9.4 ± 6.60	15.8 ± 8.70	0.2 ± 1.00	1.9 ± 3.10	0.0 ± 0.00	22.1 ± 7.23	23.4 ± 7.22
+	6-18	Negative control										
		DMSO	2200	0.1 ± 0.74	0.4 ± 1.26	0.3 ± 1.14	0.2 ± 0.99	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.53	0.0 ± 0.00	0.5 ± 1.28	0.9 ± 1.53
		Positive control										
		B [a] P	5700	0.3 ± 1.11	7.4 ± 6.99	16.4 ± 8.87	28.4 ± 14.21	0.5 ± 1.64	4.6 ± 4.98	0.0 ± 0.00	40.8 ± 11.06	42.3 ± 11.34
−	24	Negative control										
		DMSO	2200	0.0 ± 0.53	0.3 ± 1.19	0.5 ± 1.27	0.2 ± 0.99	0.0 ± 0.00	0.1 ± 0.74	0.0 ± 0.00	0.7 ± 1.14	1.0 ± 1.21
		Positive control										
		MMC	5900	0.3 ± 1.18	7.6 ± 6.33	16.7 ± 7.98	25.5 ± 11.20	0.5 ± 1.70	3.8 ± 4.19	0.0 ± 0.00	38.6 ± 10.47	40.1 ± 10.65

MMC : Mitomycin C , B [a]P : Benzo [a] pyrene
DMSO : Dimethyl sulfoxide

Data collection period : Negative control August 24, 2006～March 25, 2009
Positive control October 27, 2006～March 25, 2009

Study No. H-09003