

最終報告書

o-ジクロロベンゼンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：4190（115-108）

平成12年7月13日

試験委託者
厚生省 生活衛生局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約	3
2. 表題	4
3. 試験目的	4
11. 被験物質	6
12. 試験材料および方法	8
13. 試験結果	15
14. 考察および結論	17
15. 参考文献	18

Figures		F-1~4
Figure 1	Dose-survival curves of o-Dichlorobenzene [short-term treatment]	F-1
Figure 2	Incidence of structural aberrations induced by o-Dichlorobenzene [short-term treatment : -S9]	F-2
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by o-Dichlorobenzene [short-term treatment : +S9]	F-3
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by o-Dichlorobenzene (confirmative examination) [short-term treatment : +S9]	F-4

Tables		T-1~4
Table 1	Results of growth inhibition test on o-Dichlorobenzene [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Dichlorobenzene [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Dichlorobenzene [short-term treatment : +S9]	T-3
Table 4	Results of the confirmative examination of o-Dichlorobenzene [short-term treatment : +S9]	T-4

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、*o*-ジクロロベンゼンは染色体異常を誘起するものと判断した。

o-ジクロロベンゼンの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に、試験用量を設定した。染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理で 80.0, 130, 180 および 230 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量ならびに同+S9 処理では 130, 180, 230 および 280 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、*o*-ジクロロベンゼン処理群の場合、-S9 処理では染色体構造異常が認められなかったが、+S9 処理では染色体構造異常の僅かな誘発がみられ疑陽性結果が得られたことから、180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 および 280 $\mu\text{g/mL}$ の 11 用量を用いた確認試験を実施した。その結果、被験物質処理群では用量依存を僅かに伴った染色体構造異常の誘発 (陽性：+) が認められた。

また、短時間処理法-S9 処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。

2. 表題

o-ジクロロベンゼンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討した。

11. 被験物質**11.1. 被験物質名**

o-ジクロロベンゼン
(o-Dichlorobenzene)

11.2. ロット番号**11.3. 純度**

99.7 wt%

11.4. 保管条件

直射日光を避け密封, 室温保管

11.5. 別名

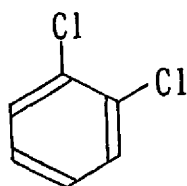
1,2-ジクロロベンゼン

11.6. 化学名

1,2-ジクロロベンゼン

11.7. CAS 番号

95-50-1

11.8. 構造式又は示性式**11.9. 分子量**

146.94

11.10. 常温における性状

無色透明液体

11.11. 融点/沸点

融点: -17°C

沸点: 180°C

11.12. 溶媒に対する溶解度等

20℃の水 100 mL に 0.013 g 溶解する.

ほとんどの有機溶剤に可溶.

11.13. 安定性

この物質を強く加熱すると空気と空気より重い爆発性の混合気を生じる.

高温で分解すると腐食性の塩化水素が生じる. 空気に触れると酸化する.

11.14. 蒸気圧

0.13 KPa (20℃)

11.15. 取り扱い上の注意

保護具を着用し, 目, 皮膚, 粘膜等へ直接触れないようにした. 空気と混合して爆発の危険性があるので, 蒸気漏れには充分注意した. 取り扱い後は水または石鹼を用いて手洗い, 洗顔を行った. 揮発性物質の可能性があるので, 秤量, 希釈操作ならびに処理の際には十分に配慮した.

11.16. 残余被験物質の処理

被験物質の残余は, 被験物質提供元に返却した.

12. 試験材料および方法

12.1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株（CHL細胞）を選択した。

CHL細胞は昭和59年11月15日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け、一部についてはジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；Merck KGaA；純度99.7%以上；Lot No. K23082678 651）を容量比で10%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し、3～5日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験で継代数9の細胞を、染色体異常試験および確認試験ではそれぞれ13および12の細胞を用いた。

12.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（岩城硝子株式会社；Lot No. I8710【予備試験および本試験】、I9701【確認試験】）に、メンブランフィルター（孔径0.45 μm：Featuring Corning and Costar Products）を用いて濾過除菌した非働化（56℃、30分）済み仔牛血清（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1019033）を最終濃度で10%になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所（4℃）に保存した。

12.3. 培養条件

CO₂ インキュベーター（Forma および三洋電機メディカシステム株式会社）を用い、CO₂ 濃度5%、37℃の条件で細胞を培養した。

12.4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のS9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. CAM-403）を試験に使用した。

12.4.1. S9 の調製方法

調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法等を以下に示す.

a. ロット番号	RAA-403
b. 調製日	1999年4月23日 (誘導物質投与開始後5日目)
c. 使用動物	ラット: Sprague-Dawley系
d. 性/週齢	雄/7週齢
e. 体重	189~245 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF)
h. 投与量	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目),
および	60 mg/kg 3回 (2~4日目)
投与回数	BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	24.96 mg/mL

12.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液	4 μmol

12.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に可溶であり, かつ同溶液中で安定であることから, 被験物質を DMSO (Merck KGaA ; Lot No. K24605778 830) に溶解させ調製原液とした. この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に順次希釈した後, 直ちに処理を行った. なお, 本被験物質情報から揮発性が疑われたため, 調製には蓋付き試験管を用いた. モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO を被験物質の調製に使用した.

12.6. 対照群

12.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒で試験した。

12.6.2. 陽性対照（短時間処理法-S9 処理）

注射用水（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K8K78）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 247AHK）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で試験した。

12.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K8K78）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 8016）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で試験した。

12.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

12.7.1. 試験用量

予備的な試験（8.10, 27.0, 90.0, 300 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5 用量：公比 10/3）の結果、-S9 処理の 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞が死滅しており（処理後 6 時間時点での観察）+S9 処理の 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても細胞が死滅していた。本結果を参考に、細胞増殖抑制試験の用量として下記に示した 8 あるいは 6 用量（公比 5/3）を設定した。

試験	用量数	試験用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
短時間処理法-S9 処理	8	28.0 ~ 1000
短時間処理法+S9 処理	6	77.8 ~ 1000

12.7.2. 使用フラスコ数

1 用量当たり 2 個のフラスコを用いた。

12.7.3. 短時間処理法-S9 処理

滅菌済み培養用フラスコ（培養面積 25 cm²：ガラス製）に培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 2 mL 除いた後、使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質液を 30 μ L 加えた。シリコン栓で密栓したまま 6 時間培養を続けた後、各フラスコの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1022866）を用いて細胞を洗浄した。培養液（3 mL）を新鮮なものに交換し、さらに 18 時間培養を続けた後に細胞生存率（陰性対照に対する比）を求めた。

12.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各フラスコに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 2.5 mL を除き、S9 mix を 500 μ L 添加した後、溶媒あるいは被験物質液を 30 μ L 加えた。
以下の操作は 12.7.3. に記載の方法に準じた。

12.7.5. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各フラスコから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を 1 回洗浄した。10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. ACG8912）を加えて約 10 分間細胞を固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 607E4067）水溶液で 10 分間染色した。各フラスコを水洗した後、十分乾燥させた。各フラスコに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 20 mL 加え、5 分間放置した後、580 nm での吸光度を分光光度計（105-50 型；株式会社 日立製作所）を用いて測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求め、さらにプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には 130~360 μ g/mL の 3 点（-S9 処理および+S9 処理）を用いた。
なお、細胞生存率の平均値は各フラスコの上捨五入する以前の値から求めた。

12.7.6. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した。

細胞増殖を 50% 抑制する濃度は、短時間処理法-S9 処理で 176 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および+S9 処理で 188 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。

なお、被験物質暴露終了時、-S9 処理の 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上および+S9 処理の 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で油滴状の析出がみられた。

12.8. 染色体異常試験（本試験）

12.8.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に、各試験系それぞれ 7 用量（公差 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ：下表参照）を本試験の用量に設定した。

試験	試験用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
短時間処理法-S9 処理	80.0	130	180	230	280	330	380
短時間処理法+S9 処理	80.0	130	180	230	280	330	380

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

短時間処理法+S9 処理において染色体構造異常の出現に関し疑陽性（±）と判定されたことから、180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 および 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 11 用量（公差 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を用いた確認試験を実施し、230~270 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5 用量について顕微鏡観察を実施した。

12.8.2. 試験フラスコ数

1 用量当たり 2 個のフラスコを用いた。

12.8.3. 短時間処理法-S9 処理

滅菌済み培養用フラスコ（培養面積 25 cm^2 ：ガラス製）に 8×10^3 細胞/ mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 2 mL を除いた後、溶媒あるいは被験物質液 30 μL または陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。シリコン栓で密栓したまま 6 時間培養を続けた後、各フラスコの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1022866）を用いて細胞を洗浄した。培養液（3 mL ）を新鮮なものに交換し、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

12.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各フラスコに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 2.5 mL を除き S9 mix を 500 μ L 添加した後、溶媒あるいは被験物質液 30 μ L または陽性対照物質溶液 300 μ L を加えた。以下の操作は 12.8.3. に記載の方法に準じた。但し、確認試験では細胞の洗浄にはダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 1026396) を用いた。

12.8.5. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に最終濃度で 0.2 μ g/mL となるようコルセミド溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1019640) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1017538 【本試験】、1022349 【確認試験】) を用いてフラスコから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、4°C に冷却した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 3 回交換した後、新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 1~2 滴ずつ滴下した。スライド標本を十分乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 : Merck KGaA ; Lot No. TP334974 816) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. 840288308) で 12 分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

12.8.6. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各フラスコについて、ATP フォトメーター (ルミテスター K-100 : キッコーマン株式会社) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。なお、細胞生存率の平均値は各フラスコの四捨五入する以前の値から求めた。

12.8.7. 染色体の観察

各フラスコ当たり 100 個, すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 ($\times 600$) で観察し, 染色体の形態的变化としてギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した. ただし, 染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し, 染色体切断様の像が認められる場合, その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満, かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した. また, 数的異常として 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し, 倍数体等の出現数についても計数した.

すべての標本をコード化した後, マスキング法で観察した.

12.9. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った. 異常細胞の出現頻度が 5% 未満を陰性 (-), 5% 以上 10% 未満を疑陽性 (\pm), 10% 以上, かつ再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合, 陽性 (+) と判定した.

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった.

12.10. D_{20} 値および TR 値の算出法

D_{20} 値は分裂中期像の 20% に何らかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度 (mg/mL) であり, 最小二乗法により算出した. TR 値は一定濃度 (mg/mL) あたりの交換型異常 (cte) 出現数を示す比較値であり, 染色分体交換の出現頻度 (%) を被験物質濃度 (mg/mL 換算) で割ることにより算出した.

13. 試験結果

13.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 2, Table 2 および Appendix 1 に示した.

o-ジクロロベンゼン処理群での染色体構造異常および倍数性細胞の出現頻度は陰性対照と同等であった. また, 試験用量に依存した細胞増殖抑制作用が認められ, 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での細胞生存率は 0.2% まで減少していた.

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 42.5% であった.

なお, 被験物質暴露終了時, 380 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で油滴状の析出物が認められた.

13.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 2 に示した.

o-ジクロロベンゼン処理群での染色体構造異常の出現頻度は, 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.0%, 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 3.0%, 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6.5% (±) を示した. 倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群とほぼ同等であった. また, 試験用量に依存した細胞増殖抑制作用が認められ, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での細胞生存率は 0.4% まで減少していた.

一方, 陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 56.5% であった.

なお, 被験物質暴露終了時, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で油滴状の析出物が認められた.

13.3. 確認試験（短時間処理法+S9 処理）

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 3 に示した。

被験物質処理群での染色体構造異常は 230 µg/mL で 7.0% (±), 240 µg/mL で 5.5% (±), 250 µg/mL で 4.0% および 260 µg/mL で 11.0% (+) であった。倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群と同等であった。また、試験用量に依存した細胞増殖抑制作用が認められ、270 µg/mL での細胞生存率は 4.2% まで減少していた。

一方、陽性対照での染色体構造異常出現頻度は 68.0% であった。

なお、被験物質暴露終了時、250 µg/mL 以上で油滴状の析出物が認められた。

13.4. D₂₀ 値および TR 値算出結果

本染色体異常試験（確認試験）結果から算出した D₂₀ 値 (mg/mL) および TR 値は次の通りであった。

試験系	異常の種類	D ₂₀ 値	TR 値
短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.699	23.1

14. 考察および結論

o-ジクロロベンゼンの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。細胞増殖抑制試験結果を基に、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理で細胞の増殖が抑制される用量まで検討した。

その結果、o-ジクロロベンゼン処理において-S9 処理では染色体構造異常ならびに倍数性細胞の誘発が認められなかった。一方、+S9 処理では染色体構造異常の僅かな誘発が認められ疑陽性と判定されたことから確認試験を実施した。その結果、染色体構造異常の誘発において用量依存的な増加傾向が認められ、260 $\mu\text{g/mL}$ では強い細胞増殖抑制作用が見られるものの陽性判定基準の 10%を超えるものであった。また、変異原性の強さに関する相対的比較値である D_{20} 値および TR 値は 0.699 (mg/mL) および 23.1 と算出され、既知変異原性物質と比較して o-ジクロロベンゼンの変異原性は弱いことを示していた。

本被験物質 (o-ジクロロベンゼン) については Ames 試験で陰性との報告があった¹⁾。一方、ヒト鼻粘膜細胞に染色体異常を誘発する²⁾との報告があり、本試験の染色体異常を誘発するという結果と一致した。類縁体である p-ジクロロベンゼンについては Ames 試験で陰性³⁾、染色体異常試験で陰性⁴⁾、ヒトリンパ球に対して姉妹染色体交換を誘発する⁵⁾との報告があるが、m-ジクロロベンゼンの変異原性に関する報告はなかった。

一方、陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり、本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下において o-ジクロロベンゼンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常 (構造異常) 誘発性は陽性と判定した。

15. 参考文献

- 1) 石館基:微生物を用いる変異原性試験データ集, life-science Information center, 1991.
- 2) Zapata-Gayon C., Zapata-Gayon N. and Gonzalez-Angulo A. : Arch. Environ. Health 37(4), 231-235, 1982.
- 3) Loeser E and Litchfield MH : Food Chem. Toxicol.21(6), 825-832, 1983.
- 4) 石館基:染色体異常試験データ集, life-science Information center, 1987.
- 5) Carbonell E., Puig M., Xamena N., Creus A. and Marcos R. : Mutat. Res. 263(1), 57-59, 1991.

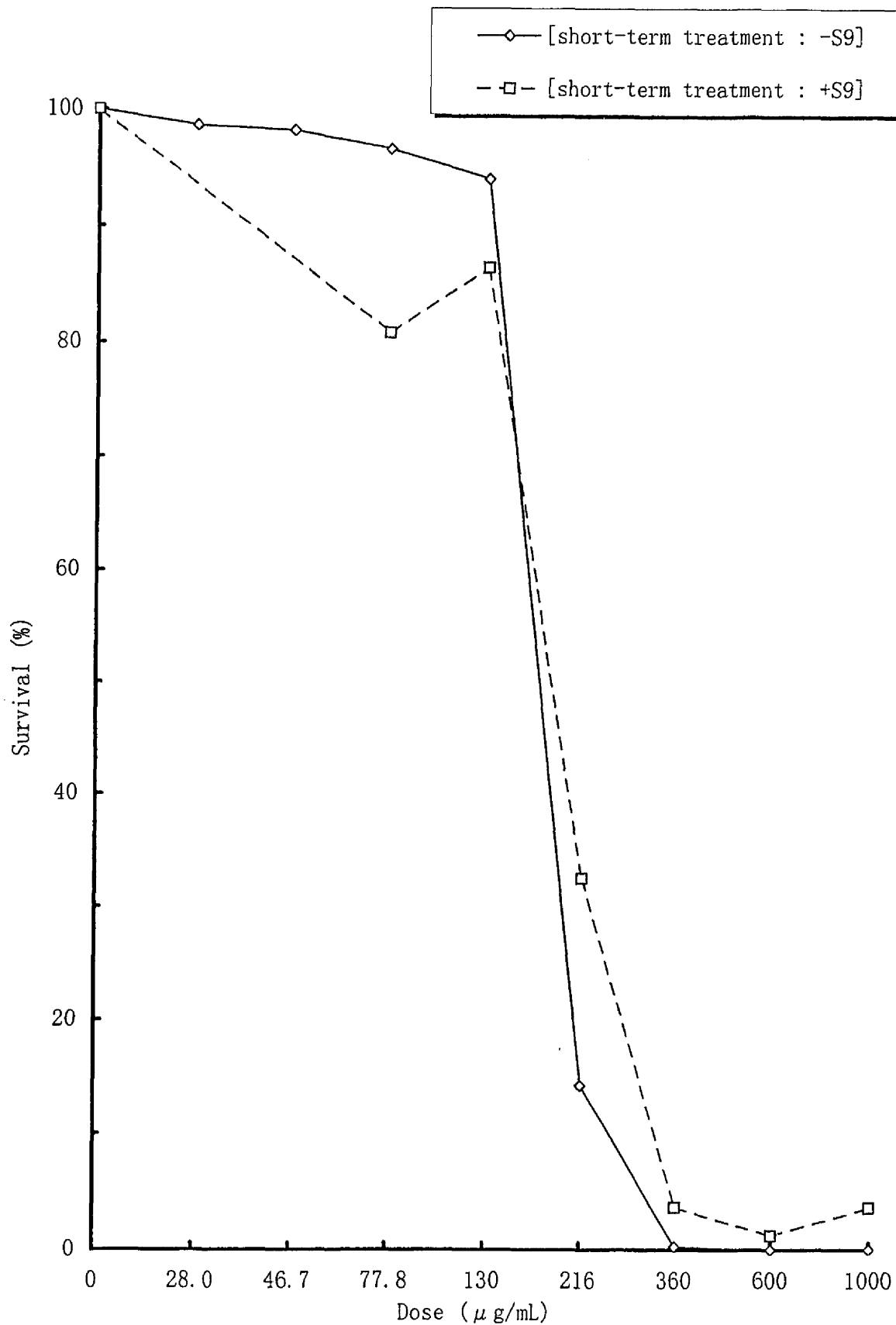
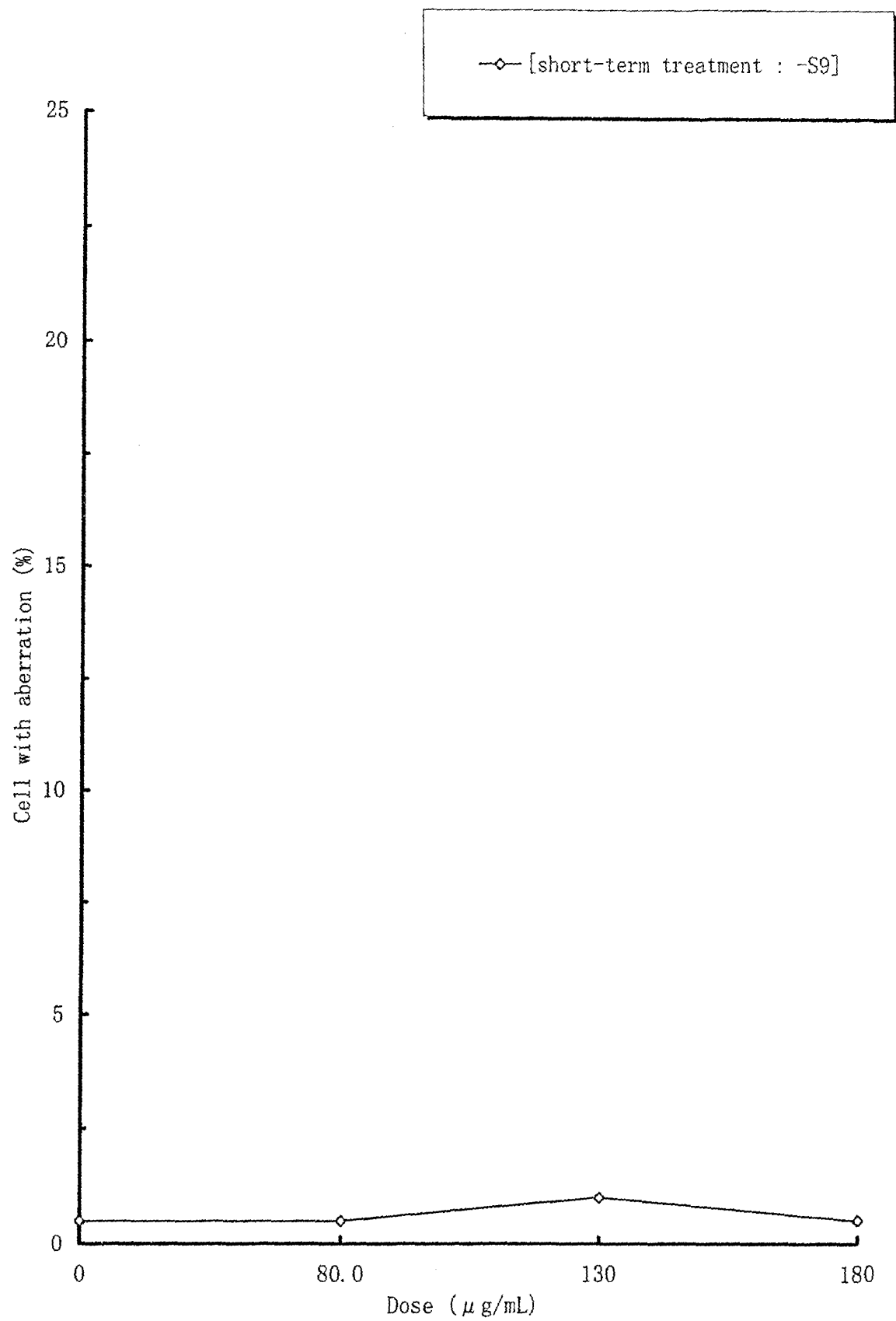


Figure 1. Dose-survival curves of o-Dichlorobenzene [short-term treatment]



2. Incidence of structural aberrations induced by o-Dichlorobenzene [short-term treatment:-S9]

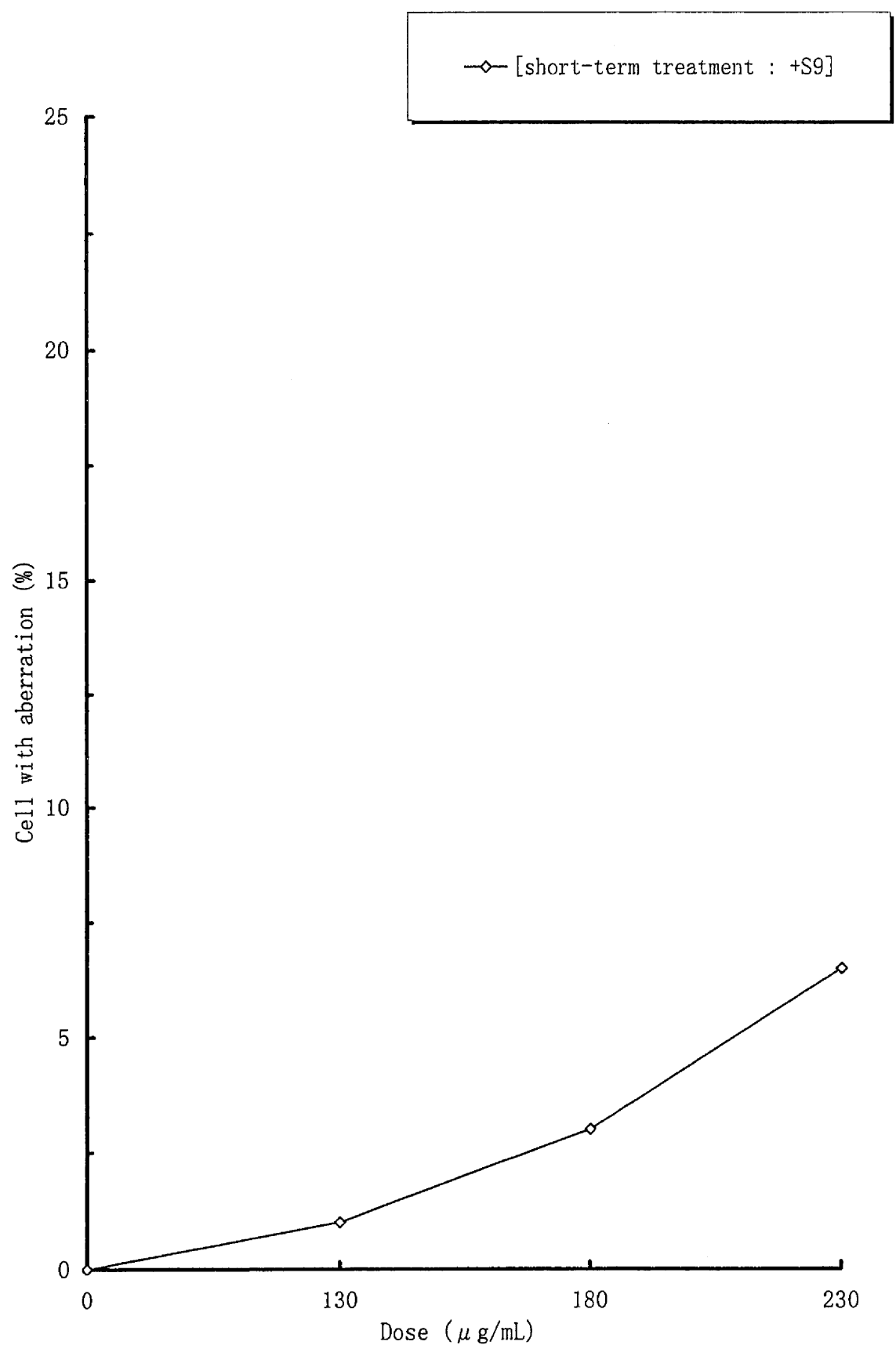


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by o-Dichlorobenzene [short-term treatment:+S9]

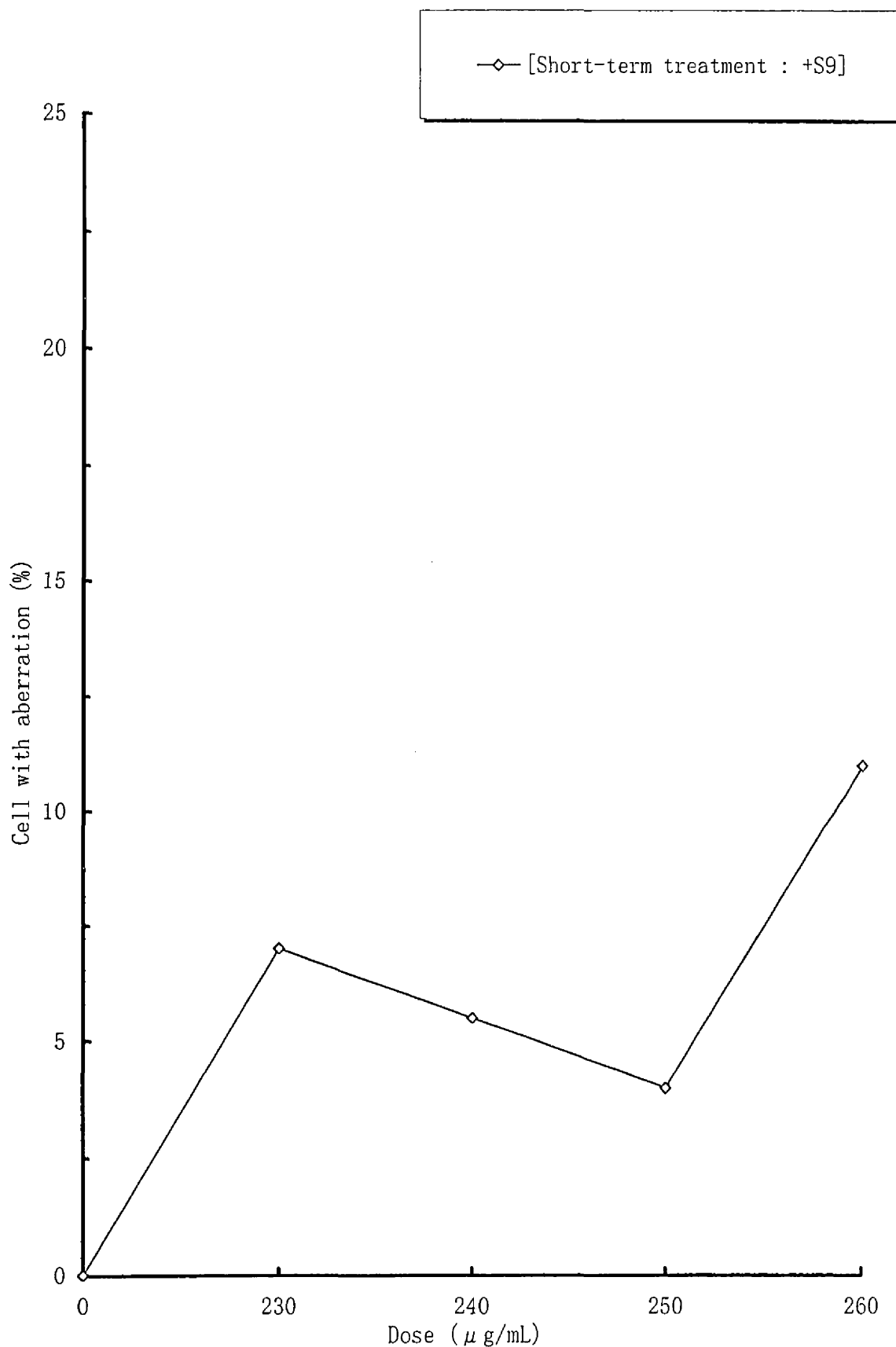


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by o-Dichlorobenzene (confirmative examination) [Short-term treatment:+S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on o-Dichlorobenzene [short-term treatment]

Exp. No. 4190 (115-108)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	28.0	102.6 94.7	[98.7]	Test substance	77.8	82.8 78.8	[80.8]
		98.4 98.1	[98.3]			82.3 90.6	[86.4]
	46.7	96.1 97.1	[96.6]		130	26.1 38.9	[32.5]
		94.1 94.0	[94.1]			2.6 4.7	[3.7]
	77.8	14.0 14.5	[14.3]		216	1.1 1.4	[1.3]
		0.6 0.0	[0.3]			3.8 3.4	[3.6]
	130	0.0 0.0	[0.0]		360 d)	0.0 0.0	[0.0]
		0.0 0.0	[0.0]			0.0 0.0	[0.0]
	216	0.0 0.0	[0.0]		600 d)	0.0 0.0	[0.0]
		0.0 0.0	[0.0]			0.0 0.0	[0.0]
	360	0.0 0.0	[0.0]		1000 d)	0.0 0.0	[0.0]
		0.0 0.0	[0.0]			0.0 0.0	[0.0]
	600 d)	0.0 0.0	[0.0]		1000 d)	0.0 0.0	[0.0]
		0.0 0.0	[0.0]			0.0 0.0	[0.0]
	1000 d)	0.0 0.0	[0.0]			0.0 0.0	[0.0]
		0.0 0.0	[0.0]			0.0 0.0	[0.0]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— 176 (μ g/mL)[short-term treatment : +S9] ——— 188 (μ g/mL)

a): Negative control

d): Visible precipitation was occurred at the end of treatment period

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Dichlorobenzene
[Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 4190 (115-108)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	1	1	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	-
Test substance	80.0	75.4	200	1	1	0	0	0	0	0.5 -	0.5 -	-
	130	70.4	200	2	1	1	0	0	0	1.0 -	0.0 -	-
	180	69.8	200	0	0	0	1	0	0	0.5 -	0.0 -	-
	230	0.2	Toxic									
MMC b)	0.1	59.6	200	9	31	64	1	0	0	42.5 +	0.0 -	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Dichlorobenzene
 [Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4190 (115-108)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0.0 -	0.5 -	-
Test substance	130	92.3	200	1	0	1	0	1	0	1.0 -	2.0 -	-
	180	62.4	200	1	2	5	0	0	0	3.0 -	0.0 -	-
	230	28.7	200	5	5	8	0	0	0	6.5 \pm	0.5 -	\pm
	280 d)	0.4	Toxic									
CP b)	12.5	91.0	200	6	24	104	0	1	0	56.5 +	0.0 -	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 4. Results of the confirmative examination of o-Dichlorobenzene
[Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4190 (115-108)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	-
Test substance	230	13.7	200	4	3	11	0	0	0	7.0 \pm	1.0 -	\pm
	240	6.0	200	3	3	7	0	1	0	5.5 \pm	0.5 -	\pm
	250 d)	5.0	200	3	2	6	0	0	0	4.0 -	1.5 -	-
	260 d)	4.9	200	2	8	12	1	0	2	11.0 +	0.5 -	+
	270 d)	4.2	Toxic									
CP b)	12.5	86.3	200	6	27	125	0	1	0	68.0 +	0.5 -	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period