

# 最終報告書

表 題：p-クロロベンズアルデヒドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR07046

株式会社 化合物安全性研究所

## 目 次

	頁
表紙	1
目次	5
要約	9
緒言	11
材料および方法	11
成績	23
考察	26

## Tables and Figure

Table 1	Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR07046)	28
Figure 1	Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR07046)	29
Table 2	Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR07046)	30
Table 3-1	Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment without metabolic activation) (SR07046)	31
Table 3-2	Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment with metabolic activation) (SR07046)	32
Table 3-3	Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (24 hours treatment without metabolic activation) (SR07046)	33
Table 4	Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test, confirmatory test) (SR07046)	34

Table 5-1	Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test) (SR07046) ······	35
Table 5-2	Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment with metabolic activation, confirmatory test) (SR07046) ······	36
Table 5-3	Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (24 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test) (SR07046) ······	37
Table 6	Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (chromosomal aberration test, confirmatory test2) (SR07046) ······	38
Table 7-1	Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test2) (SR07046) ······	39
Table 7-2	Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (24 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test2) (SR07046) ······	40

## 要 約

p-クロロベンズアルデヒドの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて検討した。試験は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列で実施した。

予備試験 [細胞増殖抑制試験 : 5.47~1400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (10 mM 相当値)] の結果、各試験系列で 50% を超える細胞増殖抑制が認められた。IC<sub>50</sub> 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 249  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の代謝活性化による場合が 714  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 97.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。被験物質の析出が、試験液処理開始時および処理終了時ともに各試験系列の 1400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量で観察された。被験物質処理による培養液 pH への影響は観察されなかった。

本試験 (染色体異常試験) は、予備試験の結果に基づき各試験系列とも IC<sub>50</sub> 値より高用量を最高用量に設定した。また、本試験では各試験系列とも 1 用量でのみ構造異常あるいは数的異常の増加が認められたことから各試験系列について確認試験を実施した。さらに、再現性確認のため短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合については確認試験 2 を実施した。染色体異常誘発性についての試験結果は以下の通りであった。

短時間処理法の代謝活性化によらない場合 [評価用量 : 21.9~263  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (本試験)、43.8~219  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (確認試験)、87.5~263  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (確認試験 2)] では、本試験および確認試験 2 のいずれも 263  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量で構造異常の出現率に 10% を超える増加が認められ、結果は陽性であった [D<sub>20</sub> 値 : 0.24 mg/mL (本試験) および 0.26 mg/mL (確認試験 2)]。

短時間処理法の代謝活性化による場合 [評価用量 : 87.5~700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (本試験)、87.5~583  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (確認試験)] では、本試験の 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量および確認試験の 583  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量で構造異常の出現率に 10% を超える増加が認められ、結果は陽性であった [D<sub>20</sub> 値 : 0.65 mg/mL (本試験) および 0.57 mg/mL (確認試験)]。

連続処理法の 24-0 h 処理による場合 [評価用量 : 5.47~87.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (本試験)、21.9~65.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (確認試験)、21.9~109  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (確認試験 2)] では、本試験の 87.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量ならびに確認試験 2 の 65.7、87.5 および 109  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量で数的異常の出現率に 10% を超える増加が認められ、結果は陽性であった [D<sub>20</sub> 値 : 0.072 mg/mL (本試験) および 0.068 mg/mL (確認試験 2)]。

各試験系列において、構造異常あるいは数的異常の10%を超える増加が認められた用量では細胞増殖の抑制が認められた。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、p-クロロベンズアルデヒドは、本試験条件において、ほ乳類の培養細胞に対し細胞毒性用量において染色体異常誘発性(短時間処理で構造異常および連続処理で数的異常)を有すると判断した。

## 緒 言

p-クロロベンズアルデヒドの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いる染色体異常試験を実施した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

名称	: p-クロロベンズアルデヒド
英名	: p-Chlorobenzaldehyde
CAS No.	: 104-88-1
官報公示整理番号	: 化審法、安衛法 ; 3-1162
構造式	:



分子式	: C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> ClO
分子量	: 140.57
物理化学的性質	: 外観 ; 白色固体
	臭い ; 強い刺激臭
	沸点 ; 213~214°C/760 mmHg (101.3247kPa)
	融点 ; 47~50°C
	引火点 ; 87°C (タグ開放)
	比重 ; 1.200/55°C
	溶解度 ; 水 : 難溶
	有機溶媒 : アルコール、エーテル、ケトンに易溶。
純度	: 99.06% (Appendix 1)
不純物の名称およびその濃度	: 酸分 (p-Chlorobenzoic acid) 0.42% (Appendix 1)

- 入手量 : 1 kg (0.5 kg×2 個、関連試験と共通)
- 安定性 : 通常の状態では安定。高温、多湿を避け保存した。  
 本試験終了後、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し (Appendix 2)、被験物質の安定性について確認した。  
 なお、確認試験および確認試験 2 では、関連試験 [p-クロロベンズアルデヒドのラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験 (SR07047)] においてサンプリング保存された同一ロットの被験物質を使用した。サンプリング保存は、被験物質の保存条件に基づき密封、遮光、冷所の条件で実施されており、被験物質の安定性に問題はないと判断した。
- 危険有害性 : 分類の名称 ; 未分類  
 有害性 ; 粘膜刺激、眼刺激、皮膚刺激  
 急性毒性 ; LD<sub>50</sub> ; ラット (♂) 2450 mg/kg、ラット (♀) 1900 mg/kg  
 局所効果 ; 皮膚刺激性あり。眼刺激性あり。  
 環境影響情報 ; 魚毒 (TLm48) : ヒメダカ 60ppm  
 [以上の危険有害性は、製品安全データシート ; イハラケミカル工業株式会社に基づく。]
- 保存場所 : 被験物質保存室、変異原性試験室および資料保存室
- 保存条件 : 密封、遮光、冷暗所 (実測温度 1~14°C)、火気厳禁
- 保存期間 : 2007 年 6 月 14 日 (受入) ~ 2010 年 9 月 30 日 (最終使用日)
- 取扱上の注意 : 吸い込んだり、眼、皮膚及び衣類に触れないよう適切な保護具を着用し取扱った。
- 残余被験物質の処置 : 2008 年 3 月 26 日に、安定性分析のため製造者へ送付した。

## 2. 被験物質の調製

被験物質は有機溶媒に易溶であるため、ジメチルスルホキシドを溶媒に選択した。

被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシド [ロット番号 TA026 (予備試験および本試験) および WF032 (確認試験および確認試験 2)、株式会社同仁化学研究所] を用いて溶解ならびに希釈し、所定の濃度に用時調製した。

予備試験では 140 mg/mL 調製液を調製し、140 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 70、35、17.5、8.75、4.38、2.19、1.09 および 0.547 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では 140 mg/mL 調製液を調製し、140 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 70、35、17.5、8.75、4.38、2.19、1.09 および 0.547 mg/mL 調製液を調製した。また、140 mg/mL 調製液より 105 mg/mL 調製液を、35 mg/mL 調製液より 26.3 mg/mL 調製液を、17.5 mg/mL 調製液より 13.1 mg/mL 調製液を調製した。

確認試験では 70 mg/mL 調製液を調製し、70 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 35、17.5、8.75、4.38 および 2.19 mg/mL 調製液を、また、70 mg/mL 調製液より 58.3、46.7、30.7、26.3、21.9、13.1、10.9 および 6.57 mg/mL 調製液を調製した。

確認試験 2 では 35 mg/mL 調製液を調製し、35 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 17.5、8.75、4.38 および 2.19 mg/mL 調製液を、また、35 mg/mL 調製液より 30.7、26.3、21.9、13.1、10.9 および 6.57 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験、本試験、確認試験および確認試験 2 とともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液はプレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加し、予備試験および本試験では調製後 1.1 時間以内に、確認試験では調製後 1.2 時間以内に、確認試験 2 では調製後 0.9 時間以内に使用した。

調製はクリーンベンチ内で行い、調製に際してはマスク、手袋、防護メガネおよび白衣を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

### 3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体であるジメチルスルホキシド[ロット番号 TA026(予備試験および本試験)および WF032(確認試験および確認試験 2)、株式会社同仁化学研究所]を使用した。ジメチルスルホキシドはモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用し、プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した。

### 4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシン C [本試験にロット番号 448ADJ(使用期限 2008 年 10 月、協和醗酵工業株式会社)、確認試験にロット番号 498AFJ(使用期限 2010 年 10 月、協和醗酵工業株式会社)および確認試験 2 にロット番号 542AIA(使用期限 2013 年 1 月、協和発酵キリン株式会社)]を使用した。マイトマイシン C は、購入後室温で保存し、日本薬局方注射用水[ロット番号 5L88(本試験)、7K81(確認試験)および 9K88(確認試験 2)、株式会社大塚製薬 T 場]を用いて 5 および 10  $\mu\text{g/mL}$  の濃度に調製した。購入したマイトマイシン C は、1 瓶中に口局マイトマイシン C を 2 mg(力価)含有しており、調製の際には 1 mg(力価)を 1 mg として換算した。



代謝活性化法による場合の陽性対照物質として、ベンゾ[a]ピレン[ロット番号 KLM1182、含量 101.0%、使用期限 2009 年 8 月(購入より 5 年)、和光純薬工業株式会社、本試験]および 3,4-ベンゾピレン[ロット番号 8JB8G、含量 98.2%、使用期限 2014 年 7 月(購入より 5 年)、東京化成工業株式会社、確認試験]を使用した。ベンゾ[a]ピレンおよび 3,4-ベンゾピレンは、購入後冷所(2~8°C)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045 および TA026、株式会社同仁化学研究所)を用いて、それぞれ 1 mg/mL の濃度に調製した。

陽性対照物質の各調製液は-20°C以下で分注凍結保存し、調製後 11 ヶ月以内に試験に使用した(使用期限は調製後 1 年)。保存調製液は解凍後 0.8 時間以内に使用した。

陽性対照物質は、それぞれプレート内の液に対し 1 vol%の割合で添加した。

## 5. 試験系

試験系として、2005 年 5 月 17 日に大日本製薬株式会社より継代数 14 で入手した CHL/IU を使用した。CHL/IU は、雌性の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は 25 本(2n=22)、倍加時間の測定値は 13.6 時間(予備試験、本試験および確認試験)および 15.0 時間(確認試験 2)である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。また、供試細胞と同時に凍結保存した細胞を用いて蛍光染色法によりマイコプラズマチェックを行い、陰性であることを確認した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて  $1 \times 10^6$  cells/mL 細胞浮遊液を調製し、1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内に保存した。解凍後は、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコを用いて 5.0%CO<sub>2</sub>、37.0°C に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター (MC0-175、三洋電機株式会社)内で培養し、3 または 4 日毎に継代を行った。試験では、継代数 17(予備試験)、21(本試験)あるいは 19(確認試験および確認試験 2)の細胞を使用した。

## 6. 培地

イーグル MEM 培地を以下の割合で混合し調製した。

予備試験および本試験では、イーグル MEM 培地(Code 05902、ロット番号 539609、日本製薬株式会社)9.4 g を日本薬局方注射用水(ロット番号 6J92、株式会社大塚製薬工場)に溶解し、さらにフェノールレッド(ロット番号 PKF3307、和光純薬工業株式会社)6 mg を加え、全量を 1 L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム(試薬特級、ロット番号 609F1546、関東化学株式会社)溶液で pH7.2~7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液(試薬特級、L-グルタミン:ロット番号 SDJ5850、和光純薬工業株式会社)を 0.292 g/L となるように添加した。さらに、56°C で

30 分間非働化した牛胎児血清(ロット番号 1271847、GIBCO)を最終調製量の 10%になるように加えた。

確認試験および確認試験 2 では、イーグル MEM 培地 (Code 05900、ロット番号 628001、632001 および 634004、日水製薬株式会社)9.4 g を日本薬局方注射用水[ロット番号 8L88(確認試験)および 9K88(確認試験および確認試験 2)、株式会社大塚製薬工場]に溶解し全量を 1 L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム(試薬特級、ロット番号 905X1946、関東化学株式会社)溶液で pH7.2~7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液[試薬特級、L-グルタミン：ロット番号 PEH6211(確認試験)および CDK3266(確認試験 2)、和光純薬工業株式会社]を 0.292 g/L となるように添加した。さらに、56℃で 30 分間非働化した牛胎児血清(ロット番号 672248、GIBCO)を最終調製量の 10%になるように加えた。

## 7. S9 mix

S9 mix はキッコーマン株式会社より購入し[ロット番号 CAM-555(予備試験および本試験、2007 年 2 月 23 日製造)および CAM-610(確認試験、2010 年 3 月 5 日製造)]、-80℃以下で凍結保存したものを、製造日より 5 ヶ月以内(使用期限：製造後 6 ヶ月)に使用した。

S9 mix は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製した S9 1.05 mL に、コファクターミックス 2.45 mL を加え、次表の組成に調製されたものである。

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	[キッコーマン株式会社製 RAA-555(CAM-555)、および RAA-610(CAM-610) : S9 中蛋白含量 27.77 mg/mL (CAM-555)および 25.51 mg/mL (CAM-610)]	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	(和光純薬工業株式会社 SDN0075)	5 μmol
KCl	[和光純薬工業株式会社 SDQ5562(CAM-555)および PER3473(CAM-610)]	33 μmol
G-6-P	[オリエンタル酵母工業株式会社 118602(CAM-555)および 118906(CAM-610)]	5 μmol
NADP	[オリエンタル酵母工業株式会社 045609(CAM-555)および 0459104(CAM-610)]	4 μmol
HEPES 緩衝液	(株式会社同仁化学研究所 PE026)	4 μmol
蒸留水		0.1 mL

## 8. 試験方法

### (1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)

#### 1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の24-0 h処理による場合の3系列について実施した。

被験物質の最高用量を10 mM相当値(被験物質の分子量140.57)の1400 µg/mLとし、以下公比2で低下させた計9用量(1400、700、350、175、87.5、43.8、21.9、10.9および5.47 µg/mL)の試験群を設定した。

試験系列毎に陰性対照群を設定した。

各群につき2枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

#### 2) 細胞の播種

直径60 mmの培養プレートに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の24-0 h処理による場合では $0.4 \times 10^4$  cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では $0.6 \times 10^4$  cells/mLの細胞浮遊液をそれぞれ5 mLずつ播種し、5.0% CO<sub>2</sub>、37.0°Cに設定したCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。

#### 3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、培養液3 mLに対して試験液を30 µLの割合で試験チューブ内で混合し、その混合液3 mLをプレートに添加し6時間培養した。6時間経過後に、プレート内の液を除去してCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>フリーのDulbeccoのリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地5 mLを加えて更に18時間培養した。

#### 4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、S9 mix 0.5 mLおよび培養液2.5 mLの混和液に対し試験液を30 µLの割合で試験チューブ内で混合し(S9の最終濃度約5 vol%)、その混合液3 mLをプレートに添加し6時間培養した。6時間経過後に、プレート内の液を除去してCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>フリーのDulbeccoのリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地5 mLを加えて更に18時間培養した。

#### 5) 連続処理法の24-0 h処理による場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、培養液5 mLに対して試験液を50 µLの割合で試験チューブ内で混合し、その混合液5 mLをプレートに添加した。更に、24時間培養した。

#### 6) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

## 7) 被験物質による培養液pHへの影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化は認められなかったため、被験物質による培養液 pH への影響は無いものと判断した。

8) 細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) の算出

培養終了後、プレート内の液を除去して Ca<sup>2+</sup>および Mg<sup>2+</sup>フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、10%ホルマリンで約 10~15 分間固定した後、0.1 w/v%クリスタルバイオレットで約 10~15 分間の染色を行った。染色後、水道水を入れた水槽内でプレートを洗浄して風乾させた。対照群のプレートを 100%として、各プレートの細胞増殖率を単層培養細胞密度測定装置 (MONOCELLATER II、東洋測器株式会社) で測定した。細胞増殖率が 50%以下まで低下した場合には、用量を対数化した回帰計算により 50%細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。

## (2) 本試験および確認試験

## 1) 試験群

## a 本試験

予備試験において各試験系列で 50%を超える細胞増殖抑制がみられたことから、各試験系列とも IC<sub>50</sub> 値より高用量を最高用量とした計 6 あるいは 7 用量を設定した。

## b 確認試験

本試験の結果、各試験系列とも評価最高用量においてのみ構造異常あるいは数的異常の出現率に 10%を超える増加が認められた。従って、各試験系列について、本試験での評価最高用量付近の用量間隔を狭めて設定した 6 あるいは 7 用量群による確認試験を実施した。

## c 確認試験 2

確認試験の結果、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、本試験より細胞増殖抑制が強めに出現し、本試験結果の再現性を確認することが出来なかった。従って、両試験系列について確認試験とほぼ同一用量群による確認試験 2 を実施した。

本試験、確認試験および確認試験 2 とともに、陽性対照群を除く各群には被験物質の細胞増殖への影響を確認するためのサテライト群 2 枚を加えた 4 枚のプレートを使用し、陽性対照群では 2 枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

## 2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1) 予備試験 (細胞増殖抑制試験)、2) 細胞の播種と同様の方法で実施した。

- 3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合
  8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、3)短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。
- 4) 短時間処理法の代謝活性化による場合
  8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、4)短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。
- 5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合
  8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、5)連続処理法の 24-0 h 処理による場合と同様の方法で実施した。
- 6) 被験物質の析出の有無の確認
  8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、6)被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。
- 7) 被験物質による培養液pHへの影響の有無の確認
  8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、7)被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。
- 8) 細胞増殖率の測定
  8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、8)細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度(IC<sub>50</sub>)の算出と同様の方法で実施した。IC<sub>50</sub>は算出しなかった。
- 9) 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2 µg/ml のコルセミド[ロット番号 1335046 および 1391345(本試験)、571750(確認試験)および 771425(確認試験 2)、GIBCO]を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02% EDTA-0.25%トリプシン[0.5M EDTA:ロット番号 1390894、GIBCO、2.5%トリプシン:ロット番号 1365588(本試験)、690264(確認試験)および 753372(確認試験 2)、GIBCO]で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を同上の遠沈管に回収して約 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム[ロット番号 403F1156(本試験)および 810X1990(確認試験および確認試験 2)、関東化学株式会社]を加え、穏やかにピペッティングを繰り返しながら常温で 30 分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液[メタノール:酢酸=3:1、メタノール:ロット番号 801W1028(本試験)および 110N1127(確認試験および確認試験 2)、関東化学株式会社、酢酸:ロット番号 EWG7255(本試験)、KWF0791(確認試験)および EPQ3760(確認試験 2)、和光純薬工業株式会社]を加えて細胞を固定した後、約 1000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を 3 回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥

させた。各プレートより、2枚(細胞毒性により、得られた細胞が少ない用量については1枚)の染色体標本を作製した。

各スライドは、2%ギムザ液[ギムザ液：ロット番号 LL130(本試験)および KH933(確認試験および確認試験 2)、和光純薬工業株式会社、インスタント磷酸緩衝液(pH7.2)：ロット番号 R637(本試験)、株式会社 三菱化学ヤトロンならびに A941(確認試験)および R942(確認試験 2)、三菱化学メディエンス株式会社]で20分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤[マリノール、ロット番号 0501201(本試験)および 0701201(確認試験および確認試験 2)、武藤化学薬品株式会社]で封入した。

#### 10) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき1枚あるいは2枚(分裂中期細胞が少ない場合)の標本を選択してブラインド化した。

本試験では、観察用量として、短時間処理法の代謝活性化による場合では細胞増殖率が50%未満で標本の観察が可能な最高用量を高用量とする用量群を、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の24-0 h処理による場合では標本の観察が可能な最高用量を高用量とする用量群を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では21.9、43.8、87.5、175および263  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では87.5、175、350および700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を、連続処理法の24-0 h処理による場合では5.47、10.9、21.9、43.8および87.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5用量を選択した。

確認試験では、観察用量として、各試験系列とも標本の観察が可能な最高用量を高用量とする用量群を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では43.8、87.5、175および219  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では87.5、175、350、467および583  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5用量を、連続処理法の24-0 h処理による場合では21.9、43.8および65.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量を選択した。

確認試験2では、観察用量として、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では標本の観察が可能な最高用量を高用量とする用量群を、連続処理法の24-0 h処理による場合では細胞増殖率が50%未満で標本の観察が可能な最高用量を高用量とする用量群を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では87.5、175、219および263  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を、連続処理法の24-0 h処理による場合では21.9、43.8、65.7、87.5および109  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5用量を選択した。

総合倍率600倍の顕微鏡(BX51TF、オリンパス株式会社)で、1枚あたり100個の分裂中期像(細胞毒性により分裂中期像が少ない場合には評価可能な個数)を観察し、次頁の分類に従って染色体異常の判定を行った。構造異常については $25 \pm 2$ 本の染色体をもつものを観察対象とした。

## ①構造異常(structural aberration)

- ・染色分体切断(ctb: chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合に染色分体切断として判定した。

- ・染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の2ヵ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。

- ・染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。

- ・染色体交換(cse: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

- ・その他(others)

その他の構造異常として、断片化(fragmentation)がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

## ②ギャップ(gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分(染色性が全くみられない部分)で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

## ③数的異常(numerical aberration)

- ・倍数体(poly: polyploid)

染色体数( $25 \pm 2$ )が倍加し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。

- ・その他(others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加(end: endoreduplication)と判定し、倍数体とは区別し計数した。

## 11) 観察結果の集計方法

プレート毎に以下の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常(1個の細胞に複数の構造異常がある場合にも、構造異常を有する細胞数は1として計数)および数的異常を有する細胞の total について、それぞれ出現率(%)を

求めた。出現率(%)は、観察した細胞数(分裂中期像の数)に対する出現数の百分率で算出した。

①構造異常について

- ・ctb: 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte: 染色分体交換をもつ細胞数
- ・csb: 染色体切断をもつ細胞数
- ・cse: 染色体交換をもつ細胞数
- ・others: その他の構造異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの構造異常をもつ細胞数

②ギャップについて

- ・gap: ギャップをもつ細胞数

③数的異常について

- ・poly: 倍数体の細胞数
- ・others: その他の数的異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

## 9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が 10%以上となり、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは 5%以上となる結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

構造異常あるいは数的異常の増加がみられ、陽性と判定した試験系列について、D<sub>20</sub>値(細胞の 20%に異常が認められる濃度)を算出した。算出方法を以下に示す。

- (1) 本試験の短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合、確認試験の短時間処理法の代謝活性化による場合および確認試験 2 の短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合

2 あるいは 3 用量のデータについて、最少二乗法により回帰曲線を求め D<sub>20</sub> 値を算出した。

- (2) 本試験の連続処理法の 24-0 h 処理による場合

全用量のデータについて、最少二乗法により、式 I および式 II で示される回帰曲線を求めた。式 II における陰性対照群の用量(X<sub>0</sub>)は、式 III で求めた値とした。

$$\text{式 I} \quad Y = aX + b$$

$$\text{式 II} \quad Y = a \log X + b$$

Y: 染色体異常の出現率(%)    X: 用量(mg/mL)



$$\text{式 III } X_0 = \text{LogL} - (\text{LogH} - \text{LogL}) / (N - 1)$$

L: 最低用量(mg/mL) H: 最高用量(mg/mL)

N: 被験物質処理群の群数

式 I および式 II の相関係数をそれぞれ求め、得られた回帰曲線より  $D_{20}$  値を算出し、相関係数が大きいものを妥当な  $D_{20}$  値として選択した。

## 成 績

### 1. 予備試験

細胞増殖率の結果を Table 1 および Figure 1 に、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 1 に示す。

各試験系列で 50% を超える細胞増殖抑制が認められ、IC<sub>50</sub> 値は短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 249 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 714 µg/mL および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 97.3 µg/mL であった。

被験物質の析出が、試験液処理開始時および処理終了時ともに各試験系列の 1400 µg/mL の用量で観察された。

被験物質処理による培養液 pH への影響は観察されなかった。

### 2. 本試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 2 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 3-1~3-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50% を超える細胞増殖抑制が、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の 350 µg/mL の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合の 700 µg/mL 以上の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 131 µg/mL 以上の用量で認められた。

被験物質の析出が、試験液処理開始時および処理終了時ともに短時間処理法の代謝活性化による場合の 1050 µg/mL 以上の用量で観察された。

被験物質処理による培養液 pH への影響は観察されなかった。

染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：21.9~263 µg/mL)の 263 µg/mL の用量で 26.5% (D<sub>20</sub> 値：0.24 mg/mL)、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：87.5~700 µg/mL)の 700 µg/mL の用量で 23.5% (D<sub>20</sub> 値：0.65 mg/mL)と、それぞれ 10% を超える増加が認められた。両試験系列の他の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量：5.47~87.5 µg/mL)の構造異常の出現率は、全て 5% 未満であった。

染色体の数的異常の出現率は、連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 87.5 µg/mL の用量で 29.8% (D<sub>20</sub> 値 : 0.072 mg/mL) と 10% を超える増加が認められた。同試験系列の他の用量ならびに短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合の数的異常の出現率は、全て 5% 未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 32.0%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 46.0% および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 43.5% であった。

### 3. 確認試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 4 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 5-1~5-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50% を超える細胞増殖抑制が、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の 263 µg/mL 以上の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合の 700 µg/mL の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 131 µg/mL の用量で認められた。

被験物質の析出および被験物質処理による培養液 pH への影響は観察されなかった。

染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量 : 87.5 ~ 583 µg/mL) の 467 および 583 µg/mL の用量でそれぞれ 5.0 および 23.5% (D<sub>20</sub> 値 : 0.57 mg/mL) と、5% 以上の増加が認められた。同試験系列の他の用量ならびに短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量 : 43.8 ~ 219 µg/mL) および連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量 : 21.9 ~ 65.7 µg/mL) の構造異常の出現率は、全て 5% 未満であった。

染色体の数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の 219 µg/mL の用量で 6.0% および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 65.7 µg/mL の用量で 6.5% と、5% を超える増加が認められた。両試験系列の他の用量および短時間処理法の代謝活性化による場合の数的異常の出現率は、全て 5% 未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 58.5%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 42.5% および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 56.5% であった。

#### 4. 確認試験 2

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 6 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 7-1 および 7-2 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50%を超える細胞増殖抑制が、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の 307  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 109  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で認められた。

被験物質の析出および被験物質処理による培養液 pH への影響は観察されなかった。

染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：87.5~263  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の 219 および 263  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量でそれぞれ 6.0 および 21.5% ( $D_{20}$  値：0.26 mg/mL)と、5%あるいは10%を超える増加が認められた。同試験系列の他の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量：21.9~109  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の構造異常の出現率は、全て5%未満であった。

染色体の数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の 87.5 および 219  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量でそれぞれ 8.0 および 5.0%ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 65.7、87.5 および 109  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量でそれぞれ 19.0、33.7 および 26.3 ( $D_{20}$  値：0.068 mg/mL)と5%あるいは10%を超える増加が認められた。両試験系列の他の用量の数的異常の出現率は、全て5%未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 46.5%および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 57.0%であった。

## 考 察

p-クロロベンズアルデヒドの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて検討した。

本試験 (染色体異常試験) 用量は、予備試験 (細胞増殖抑制試験) の結果に基づき各試験系列とも  $IC_{50}$  より高用量を最高用量に設定した。本試験の結果では、各試験系列とも評価最高用量の 1 用量においてのみ構造異常あるいは数的異常の出現率の増加が認められたことから各試験系列について確認試験を実施した。また、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合については、再現性確認のための確認試験 2 を実施した。

本試験、確認試験および確認試験 2 において染色体異常誘発性を検討した結果、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では本試験および確認試験 2 において構造異常の増加の再現性が、短時間処理法の代謝活性化による場合では本試験および確認試験において構造異常の増加の再現性が、また、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では本試験および確認試験 2 において数的異常の増加の再現性がそれぞれ確認され、いずれも陽性と判断した。構造異常あるいは数的異常の 10% を超える増加が認められた用量は、全て細胞増殖率が 70% 未満の細胞毒性用量であり、染色体異常は細胞毒性用量において発現するものと考えられた。なお、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では確認試験 2 で数的異常の軽度の増加がみられたが再現性ならびに用量との関連性は確認されず陰性と判断した。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、p-クロロベンズアルデヒドは、本試験条件において、ほ乳類の培養細胞に対し細胞毒性用量において染色体異常誘発性 (短時間処理の構造異常および連続処理の数的異常) を有すると判断した。

Table 1 Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR07046)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control <sup>a</sup>	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
p-Chlorobenzaldehyde	5.47	95 , 100 ( 97.5)	94 , 96 ( 95.0)	98 , 93 ( 95.5)
	10.9	94 , 99 ( 96.5)	91 , 98 ( 94.5)	95 , 90 ( 92.5)
	21.9	93 , 94 ( 93.5)	94 , 96 ( 95.0)	90 , 91 ( 90.5)
	43.8	84 , 86 ( 85.0)	89 , 90 ( 89.5)	70 , 62 ( 66.0)
	87.5	75 , 74 ( 74.5)	86 , 87 ( 86.5)	55 , 54 ( 54.5)
	175	64 , 71 ( 67.5)	83 , 83 ( 83.0)	35 , 35 ( 35.0)
	350	34 , 32 ( 33.0)	72 , 77 ( 74.5)	17 , 18 ( 17.5)
	700	15 , 17 ( 16.0)	59 , 41 ( 50.0)	17 , 21 ( 19.0)
	1400	25 <sup>#</sup> , 25 <sup>#</sup> ( 25.0)	29 <sup>#</sup> , 26 <sup>#</sup> ( 27.5)	32 <sup>#</sup> , 23 <sup>#</sup> ( 27.5)
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )		249	714	97.3

a : Dimethyl sulfoxide

<sup>#</sup> : Precipitation at the beginning and end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

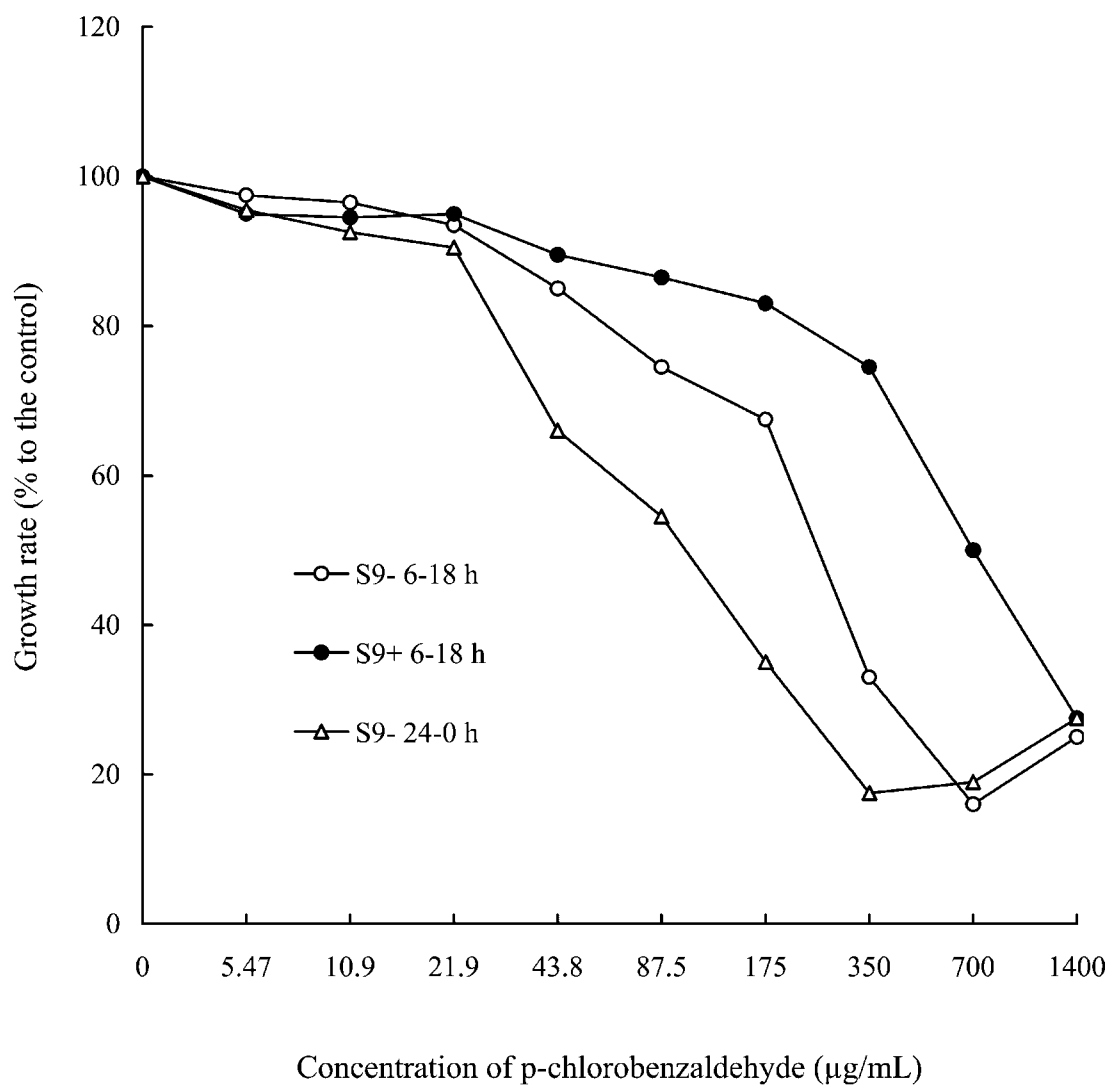


Figure 1 Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR07046)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR07046)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration (µg/mL)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control <sup>a</sup>	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
p-Chlorobenzaldehyde	5.47	-	-	93 , 93 ( 93.0)
	10.9	-	-	94 , 94 ( 94.0)
	21.9	86 , 92 ( 89.0)	-	98 , 100 ( 99.0)
	43.8	87 , 91 ( 89.0)	-	85 , 79 ( 82.0)
	87.5	76 , 79 ( 77.5)	98 , 90 ( 94.0)	59 , 57 ( 58.0)
	131	-	-	43 , 49 ( 46.0)
	175	61 , 64 ( 62.5)	91 , 90 ( 90.5)	36 , 34 ( 35.0)
	263	51 , 50 ( 50.5)	-	-
	350	21 , 30 ( 25.5)	84 , 82 ( 83.0)	-
	700	-	38 , 42 ( 40.0)	-
	1050	-	15 <sup>#</sup> , 16 <sup>#</sup> ( 15.5)	-
1400	-	31 <sup>#</sup> , 24 <sup>#</sup> ( 27.5)	-	

a : Dimethyl sulfoxide

<sup>#</sup> : Precipitation at the beginning and end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

- : Blank



Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment without metabolic activation) (SR07046)

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment <sup>c</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
6-18	-	Control <sup>b</sup>	—	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-
					100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0		
					200	3	0	0	0	0	3 ( 1.5)	0	1	0	1 ( 0.5)		
		p-Chlorobenzaldchycd	21.9	89.0	100	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	+
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
					200	3	0	0	0	0	3 ( 1.5)	0	1	0	1 ( 0.5)		
			43.8	89.0	100	3	0	0	0	0	3	1	0	0	0		
					100	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5		
					200	3	0	0	0	0	3 ( 1.5)	1	5	0	5 ( 2.5)		
			87.5	77.5	100	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3		
					100	2	0	0	0	0	2	0	6	0	6		
					200	2	0	0	0	0	2 ( 1.0)	0	9	0	9 ( 4.5)		
		175	62.5	100	1	0	0	0	0	1	0	4	0	4			
				100	0	1	0	0	0	1	0	2	0	2			
				200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0)	0	6	0	6 ( 3.0)			
		263	50.5	100	6	21	0	0	0	25	0	2	0	2			
				100	6	25	0	1	0	28	0	3	3	6			
				200	12	46	0	1	0	53 (26.5)	0	5	3	8 ( 4.0)			
		350	25.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Mitomycin C	0.1	/	100	6	31	1	1	0	38	0	0	0	0		
100	8				20	0	0	0	26	1	0	0	0				
200	14				51	1	1	0	64 (32.0)	1	0	0	0 ( 0.0)				

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment with metabolic activation) (SR07046)

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment <sup>c</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
6-18	+	Control <sup>b</sup>	—	100.0	100	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	-	
					100	0	0	0	0	0	0	1	0	1			
					200	3	0	0	0	0	3 ( 1.5)	0	1	0	1 ( 0.5)		
		p-Chlorobenzaldehyde	87.5	94.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
					100	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0		
					200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	1	0	0	0 ( 0.0)		
			175	90.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0		
					200	2	0	0	0	0	2 ( 1.0)	0	0	0	0 ( 0.0)		
		350	83.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
				100	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
				200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	1	0	1	1 ( 0.5)			
		700	40.0	100	11	30	0	0	0	33	1	2	0	2			
				100	5	8	1	0	0	14	0	6	0	6			
				200	16	38	1	0	0	47 (23.5)	1	8	0	8 ( 4.0)			
		1050	15.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		1400	27.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Benzo[a]pyrene	10	/	100	5	46	1	1	0	50	0	0	0	0	+	
100	9				36	0	0	0	42	0	0	0	0				
200	14				82	1	1	0	92 (46.0)	0	0	0	0 ( 0.0)				

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (24 hours treatment without metabolic activation) (SR07046)

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment <sup>c</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
24-0	-	Control <sup>b</sup>	—	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-
					100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1		
					200	2	0	0	0	0	2 ( 1.0)	0	2	0	2 ( 1.0)		
		p-Chlorobenzaldehyde	5.47	93.0	100	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	+
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	2	0	0	0	0	2 ( 1.0)	0	0	0	0 ( 0.0)				
			10.9	94.0	100	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0		
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0			
			200	3	0	0	0	0	3 ( 1.5)	0	0	0	0 ( 0.0)				
		21.9	99.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
				100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
				200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	0	1	0	1 ( 0.5)			
		43.8	82.0	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2	0	2		
				100	2	0	0	0	0	2	0	3	0	3			
				200	3	1	0	0	0	4 ( 2.0)	0	5	0	5 ( 2.5)			
		87.5	58.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	38	0	38		
				100	0	0	0	0	0	0	0	24	0	24			
				89	1	1	0	0	0	2	0	24	0	24			
				289	1	1	0	0	0	2 ( 0.7)	0	86	0	86 (29.8)			
		131	46.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
175	35.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Mitomycin C	0.05	/	100	9	45	0	0	0	49	0	1	0	1				
			100	9	33	0	1	0	38	0	1	0	1				
			200	18	78	0	1	0	87 (43.5)	0	2	0	2 ( 1.0)				

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid  
a : Time schedule ; treatment time-recovery time  
b : Dimethyl sulfoxide  
c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive  
- : Blank

Table 4 Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test, confirmatory test) (SR07046)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration (µg/mL)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control <sup>a</sup>	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
p-Chlorobenzaldehyde	21.9	-	-	86 , 97 ( 91.5)
	43.8	83 , 81 ( 82.0)	-	73 , 71 ( 72.0)
	65.7	-	-	60 , 68 ( 64.0)
	87.5	80 , 81 ( 80.5)	93 , 92 ( 92.5)	57 , 60 ( 58.5)
	109	-	-	44 , 57 ( 50.5)
	131	-	-	43 , 43 ( 43.0)
	175	70 , 63 ( 66.5)	93 , 96 ( 94.5)	-
	219	64 , 57 ( 60.5)	-	-
	263	50 , 47 ( 48.5)	-	-
	307	39 , 38 ( 38.5)	-	-
	350	20 , 19 ( 19.5)	86 , 88 ( 87.0)	-
	467	-	86 , 78 ( 82.0)	-
	583	-	59 , 57 ( 58.0)	-
	700	-	26 , 21 ( 23.5)	-

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation and change of pH in culture medium were not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

- : Blank

Table 5-1 Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test) (SR07046)

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment <sup>c</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
6-18	-	Control <sup>b</sup>	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
					100	0	0	1	0	0	1	0	2	0	2		
					200	0	0	1	0	0	1 ( 0.5)	0	2	0	2 ( 1.0)		
		p-Chlorobenzaldehyde	43.8	82.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	±
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	1	0	1 ( 0.5)				
			87.5	80.5	100	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4		
					100	0	0	0	0	0	0	2	1	3			
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	6	1	7 ( 3.5)				
		175	66.5	100	2	1	0	0	0	3	0	0	3	3			
				100	0	2	0	0	0	2	0	1	1	2			
				200	2	3	0	0	0	5 ( 2.5)	0	1	4	5 ( 2.5)			
		219	60.5	100	1	2	0	0	0	3	0	1	1	2			
				100	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10			
				200	1	2	0	0	0	3 ( 1.5)	0	11	1	12 ( 6.0)			
		263	48.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		307	38.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		350	19.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Mitomycin C	0.1	/	100	9	50	0	2	0	56	1	0	0	0		
					100	15	54	2	0	0	61	0	0	0	0		
200	24				104	2	2	0	117 (58.5)	1	0	0	0 ( 0.0)				

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative    ±, equivocal    +, positive

- : Blank

Table 5-2 Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment with metabolic activation, confirmatory test) (SR07046)

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment <sup>c</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
6-18	+	Control <sup>b</sup>	—	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
					200	2	0	0	0	0	2 ( 1.0)	0	0	0	0 ( 0.0)		
		p-Chlorobenzaldchycd	87.5	92.5	100	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	+
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0)	0	0	0	0 ( 0.0)				
			175	94.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	0	1	0	1 ( 0.5)				
		350	87.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3		
				100	1	2	1	0	0	4	0	1	1	2			
		200	1	2	1	0	0	4 ( 2.0)	0	3	2	5 ( 2.5)					
		467	82.0	100	2	4	0	0	0	6	0	6	0	0	6		
				100	2	3	0	0	0	4	0	1	2	3			
		200	4	7	0	0	0	10 ( 5.0)	0	7	2	9 ( 4.5)					
		583	58.0	100	8	19	0	0	0	21	1	0	0	0			
				100	7	22	0	0	0	26	0	0	0	0			
		200	15	41	0	0	0	47 (23.5)	1	0	0	0 ( 0.0)					
		700	23.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		3,4-Benzopyrene	10		100	10	40	0	0	0	44	0	0	0	0		
100	6				38	0	0	0	41	0	0	0	0				
200	16				78	0	0	0	85 (42.5)	0	0	0	0 ( 0.0)				

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank

Table 5-3 Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (24 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test) (SR07046)

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment <sup>c</sup>		
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)			
24-0	-	Control <sup>b</sup>	—	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	0	1	0	1 ( 0.5)			
		p-Chlorobenzaldehyde	21.9	91.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1			
					200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	1	0	1 ( 0.5)			
			43.8	72.0	100	1	0	0	1	0	1	0	4	0	4			
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
					200	2	0	0	1	0	2 ( 1.0)	0	4	0	4 ( 2.0)			
		65.7	64.0	81	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3				
				30	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3				
				37	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3				
				22	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2				
				170	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	11	0	11 ( 6.5)				
		87.5	58.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		109	50.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		131	43.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Mitomycin C	0.05	/	100	9	52	0	3	0	60	0	0	0	0	+				
			100	6	50	0	0	0	53	0	0	0	0					
			200	15	102	0	3	0	113 (56.5)	0	0	0	0 ( 0.0)					

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative    ±, equivocal    +, positive

- : Blank

Table 6 Effects of p-chlorobenzaldehyde on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (chromosomal aberration test, confirmatory test 2) (SR07046)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9-	S9-
		6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control <sup>a</sup>	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
p-Chlorobenzaldehyde	21.9	-	93 , 93 ( 93.0)
	43.8	-	83 , 76 ( 79.5)
	65.7	-	61 , 65 ( 63.0)
	87.5	81 , 79 ( 80.0)	53 , 51 ( 52.0)
	109	-	47 , 41 ( 44.0)
	131	-	40 , 36 ( 38.0)
	175	69 , 69 ( 69.0)	-
	219	60 , 61 ( 60.5)	-
	263	54 , 51 ( 52.5)	-
	307	28 , 26 ( 27.0)	-
350	15 , 17 ( 16.0)	-	

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation and change of pH in culture medium were not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

- : Blank



Table 7-1 Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (6 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test 2) (SR07046)

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment <sup>c</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
6-18	-	Control <sup>b</sup>	—	100.0	100	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	-
					100	0	1	0	0	0	1	0	0	0			
					200	0	3	0	0	0	3 ( 1.5)	0	0	0	0 ( 0.0)		
		p-Chlorobenzaldehyde	87.5	80.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	9	+
					100	0	0	0	0	0	0	0	7	0	7		
					200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	16	0	16 ( 8.0)		
			175	69.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2		
					100	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4		
					200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	4	2	6 ( 3.0)		
		219	60.5	100	0	5	0	0	0	5	0	4	1	5			
				100	2	6	0	0	0	7	0	4	1	5			
				200	2	11	0	0	0	12 ( 6.0)	0	8	2	10 ( 5.0)			
		263	52.5	100	3	21	0	0	0	22	0	3	0	3			
				100	3	19	0	0	0	21	0	5	0	5			
				200	6	40	0	0	0	43 (21.5)	0	8	0	8 ( 4.0)			
		307	27.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		350	16.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Mitomycin C	0.1	/	100	5	41	0	0	0	42	0	0	0	0		
					100	8	45	0	1	0	51	0	0	0	0		
					200	13	86	0	1	0	93 (46.5)	0	0	0	0 ( 0.0)		

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank

Table 7-2 Results of the chromosomal aberration test of p-chlorobenzaldehyde (24 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test 2) (SR07046)

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment <sup>c</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
24-0	-	Control <sup>b</sup>	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	0	0	0 ( 0.0)		
		p-Chlorobenzaldehyde	21.9	93.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	+
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	2	0	2 ( 1.0)				
			43.8	79.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	2	0	2 ( 1.0)				
		65.7	63.0	100	1	1	0	0	0	0	1	0	9	0	9		
				100	0	0	0	0	0	0	0	28	1	29			
		200	1	1	0	0	0	1 ( 0.5)	0	37	1	38 (19.0)					
		87.5	52.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	33		
				100	0	0	0	0	0	0	0	31	0	31			
				53	0	0	0	0	0	0	0	12	0	12			
				56	0	0	0	0	0	0	0	28	0	28			
		309	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	104	0	104 (33.7)					
		109	44.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	15		
				100	0	0	0	0	0	0	0	33	0	33			
				100	0	0	0	0	0	0	0	23	0	23			
100	0			0	0	0	0	0	0	34	0	34					
400	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0	105	0	105 (26.3)							
131	38.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Mitomycin C	0.05	/	100	7	51	0	0	0	55	0	0	0	0	+			
			100	13	55	0	0	0	59	0	0	0					
			200	20	106	0	0	0	114 (57.0)	0	0	0	0 ( 0.0)				

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank