最終報告書

表　　題：4-ブロモ-2,5-ジクロロフェノールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：ＳＲ０８２１１

株式会社 化合物安全性研究所

目　次

頁

表紙 ····· 1

目次 ····· 4

要約 ····· 8
緒言 ····· 10
材料および方法 ····· 10
成績 ····· 20
考察 ····· 22
参考資料 ····· 22

Tables and Figure

Table 1　Effects of 4-bromo-2,5-dichlorophenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08211) ····· 24
Figure 1　Effects of 4-bromo-2,5-dichlorophenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08211) ····· 25
Table 2　Effects of 4-bromo-2,5-dichlorophenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR08211) ····· 26
Table 3-1　Results of the chromosomal aberration test of 4-bromo-2,5-dichlorophenol (6 hours treatment without metabolic activation) (SR08211) ····· 27
Table 3-2　Results of the chromosomal aberration test of 4-bromo-2,5-dichlorophenol (6 hours treatment with metabolic activation) (SR08211) ····· 28

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of 4-bromo-2,5-dichlorophenol (24 hours treatment without metabolic activation) (SR08211) ····· 29

要　約

4-ブロモ-2,5-ジクロロフェノールの *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：9.45～2420 μg/mL(10 mM 相当値)]の結果、各試験系列で50%以上の細胞増殖抑制が認められた。IC_{50} 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 87.0 μg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 93.8 μg/mL および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 17.4 μg/mL であった。被験物質の析出が、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 処理による場合の 2420 μg/mL の用量ならびに短時間処理法の代謝活性化による場合の 605 μg/mL 以上の用量で観察された。被験物質による培養液 pH の低下が、試験液処理開始時では各試験系列の 1210 μg/mL 以上の用量で、試験液処理終了時では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 処理による場合の 2420 μg/mL の用量ならびに短時間処理法の代謝活性化による場合の 1210 μg/mL 以上の用量で観察された。

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_{50} 値より高用量を最高用量とした試験群を設定した。その結果、染色体の構造異常および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(評価用量：4.69～125 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：4.69～37.5 μg/mL)のいずれの用量においても5%未満であった。一方、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：9.38～125 μg/mL)では、18.8 μg/mL 以上の複数の用量で構造異常の出現率が 10%以上となり陽性と判断した(D_{20} 値：0.024 mg/mL)。また、数的異常の出現率は 37.5 μg/mL の用量でのみ5%を超えるものであった(9.0%)が主に核内倍加によるもので、また、より高用量においても核内倍加の出現が認められたことから、数的異常については疑陽性とするのが適当と判断した。なお、染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群において、染色体異常誘発性の各評価用量に被験物質の析出あるいは培養液 pH への影響はみられなかった。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は、各試験系列で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、4-ブロモ-2,5-ジクロロフェノールは、本試験条件において、代謝活性化系の存在下でほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有すると判断した。

緒　言

4-ブロモ-2,5-ジクロロフェノールの *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

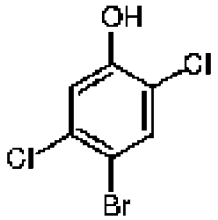
名称　　：4-ブロモ-2,5-ジクロロフェノール

英名　　：4-Bromo-2,5-dichlorophenol [1,2]

CAS No.　　：1940-42-7

化審法官報公示整理番号：(3)-956 [3]

構造式　　：



分子式　　：$C_6H_3BrCl_2O$ [2]

分子量　　：241.899 [2]

物理化学的性質　：形状　；固体 [3]

外観　；粉末および塊 [3]

色　　；うすい赤黄色 [3]

沸点/沸騰範囲；187℃/10.7kPa [3]

融点　；73℃ [3]

溶解性；メタノールに可溶。 [3]

試験施設において、蒸留水(日本薬局方注射用水)、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液、ジメチルスルホキシドおよびアセトンを用いて調製

確認を行った。確認内容を、2. 被験物質の調製(11頁)に記載した。

純度(GC)　：99.5%(Appendix 1)

入手量　：150 g (25 g×6、関連試験と共用)
保存条件[3)]　：密栓、冷暗所(実測範囲：2～8℃)。火気や熱源等の着火源から遠ざけ保存した。
保存場所　：検体保存室および変異原性試験室
保存期間　：2009年4月28日(受入)～2010年6月28日(最終使用日)
安定性および反応性　：通常の取扱い条件においては安定。[3)]
実験終了後に、試験に使用した同一ロットの被験物質の純度に関する分析成績を入手し、被験物質の安定性について確認した(Appendix 2)。
危険有害性[3)]　：有害性；吸入したとき、皮膚に接触したときおよび飲み込んだとき有害である。眼、呼吸器および皮膚を刺激する。
分類の名称；分類の基準に該当しない。
急性毒性データ；orl-rat LD_{50}：1350 mg/kg
局所効果；眼、呼吸器および皮膚を刺激する。
取扱上の注意　：取扱いは換気のよい場所で行い適切な保護具を着用し、また粉じんが飛散しないように取扱った。
残余被験物質の処置　：試験操作終了後、残余被験物質は産業廃棄物として回収した。

2. 被験物質の調製

試験施設において、被験物質の調製確認を行った。被験物質は蒸留水(日本薬局方注射用水、50 mg/mLの濃度まで検討)および0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液(50 mg/mLの濃度まで検討)とは混合せず、調製困難であった。ジメチルスルホキシドおよびアセトンでは500 mg/mLの濃度まで溶解し、反応性はみられなかった。以上のことから、当該試験の溶媒としてジメチルスルホキシドを選択した。

被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 WF032、株式会社同仁化学研究所)を用いて溶解ならびに希釈し、所定の濃度に調製した。

予備試験では242 mg/mL調製液を調製し、242 mg/mL調製液から公比2の段階希釈により121、60.5、30.3、15.1、7.56、3.78、1.89および0.945 mg/mL調製液を調製した。

本試験では 15 mg/mL 調製液を調製し、15 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 7.5、3.75、1.88、0.938 および 0.469 mg/mL 調製液を調製した。また、15 mg/mL 調製液より 12.5、10、1.56 および 1.25 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験および本試験ともに、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、予備試験では調製後 1.0 時間以内に、本試験では調製後 1.3 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、保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、ジメチルスルホキシド(ロット番号 WF032、使用期限 2013 年 3 月、株式会社同仁化学研究所)をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

ジメチルスルホキシドは、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(ロット番号 498AFJ、使用期限 2010 年 10 月、協和発酵工業株式会社)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 7K81、株式会社大塚製薬工場)を用いて 5 および 10 μg/mL の濃度に調製した。購入したマイトマイシン C は、1 瓶中に日局マイトマイシン 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、3,4-ベンゾピレン[ロット番号 8JB8G、使用期限 2014 年 7 月(購入より 5 年)、東京化成工業株式会社]を使用した。3,4-ベンゾピレンは、購入後冷所(2～8℃)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 TA026、株式会社同仁化学研究所)を用いて 1 mg/mL の濃度に調製した。なお、購入した 3,4-ベンゾピレンの含量は 98.2%であった。

陽性対照物質の各調製液は-20℃以下で分注凍結保存し、調製後 11 ヵ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 1.0 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 13.3 時間である。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 1×10^6 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^2 培養フラスコを用いて 5.0%CO_2、37.0℃に設定した CO_2 インキュベーター(MCO-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)あるいは 21(本試験)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。

イーグル MEM 培地 (Code 05900、ロット番号 628001 および 632001、カナマイシンおよびフェノールレッド含有、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 および 9K88、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 7.5%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、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。なお、牛胎児血清は 56℃で 30 分間非働化した後に使用した。オートクレーブ滅菌後は、無菌的に調製した。

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-610、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 4 ヵ月以内(使用期限：製造後 6 ヵ月)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、次頁の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-610、S9 中蛋白含量 25.51 mg/mL)	0.3 mL
$MgCl_2$	(和光純薬工業株式会社 SDN0075)	5 μmol
KCl	(和光純薬工業株式会社 PER3473)	33 μmol
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 118906)	5 μmol
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 0459104)	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試験法ガイドラインに従い 10 mM 相当値(被験物質の分子量:241.899)の 2420 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 9 用量(2420、1210、605、303、151、75.6、37.8、18.9 および 9.45 μg/mL)の試験群を設定した。更に、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 0.4×10^4 cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では 0.6×10^4 cells/mL の細胞浮遊液をそれぞれ 5 mL ずつ播種し、5.0% CO_2、37.0℃に設定した CO_2 インキュベーター内で培養した。

3) 試験液の処理

a 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^{2+} および Mg^{2+} 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。

b 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^{2+}およびMg^{2+}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。

c 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。

4) 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。

5) 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。培養液色に変化が認められない場合には、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。培養液色の変化が認められた場合には、pH試験紙(東洋濾紙株式会社)で培養液のpHを確認した。

6) 細胞増殖率の測定および50%細胞増殖抑制濃度(IC_{50})の算出

培養終了後、プレート内の液を除去してCa^{2+}およびMg^{2+}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。陰性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(MONOCELLATERⅡ、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_{50})を算出した。

(2) 本試験

1) 試験群

予備試験の結果、各試験系列で 50%以上の細胞増殖抑制がみられたことから、各試験系列ともIC_{50}値より高用量を最高用量とした計6～8用量を設定した。

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、2)細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 試験液の処理

a 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、3)試験液の処理、a 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。

b 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、3)試験液の処理、b 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。

c 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、3)試験液の処理、c 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。

4) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、4)被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

5) 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、5)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。

6) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1)予備試験、6)細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度(TC_{50})の算出と同様の方法で実施した。IC_{50} 値は算出しなかった。

7) 染色体標本の作製

培養終了の約 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 571750、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 690264、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 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 810X1990、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 110N1127、関東化学株式会社、酢酸：ロット番号 KWF0791、和光純薬工業株式会社)を加えて細胞を固定した後、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

スライドグラス上に滴下し、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 KH933、和光純薬工業株式会社、インスタント燐酸緩衝液(pH7.2):ロット番号 R942、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 0701201、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

8) 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 枚の標本(細胞毒性により分裂中期像の少ない用量では 2 枚のプレート)を選択してブラインド化した。

各試験系列とも、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 6 あるいは 7 用量を選択した。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 4.69、9.38、18.8、37.5、75、100、および 125 μg/mL の 7 用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では 9.38、18.8、37.5、75、100 および 125 μg/mL の 6 用量を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 4.69、9.38、12.5、15.6、18.8 および 37.5 μg/mL の 6 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(分裂中期像が少ない場合には観察可能な個数)を選択して観察し、以下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±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±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。

9) 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%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは 5%以上増加す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。

なお、短時間処理法の代謝活性化による場合の数的異常の判定においては、出現率は最大でも 9.0%と低かったものの陰性対照群ではほとんど出現することのない核内倍加が複数用量で認められたことから、「染色体異常試験データ集、改定 1998 年版」[4] に記載の染色体異常試験結果の判定を参考に、5～10%の出現率に適用される疑陽性との判定を採用した。

また、構造異常の増加がみられ陽性と判定した短時間処理法の代謝活性化による場合について D_{20} 値(細胞の 20%に異常が認められる濃度)を算出した。D_{20} 値は、当該試験系列では複数用量で 10%を超える出現率が認められたものの用量との関連性が明確ではなく、中間用量で出現率の低下がみられていることから、構造異常の出現率が 10%を超えた最低用量とその用量と連続した低用量の 2 用量を用いて、最小二乗法により回帰曲線を求め算出した。

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た。IC_{50}値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 87.0 μg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 93.8 μg/mLおよび連続処理法の24-0 h処理による場合が17.4 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処理による場合の2420 μg/mLの用量ならびに短時間処理法の代謝活性化による場合の605 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 の低下が、試験液処理開始時では各試験系列の 1210 μg/mL 以上の用量で、処理終了時では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処理による場合の2420 μg/mLの用量および短時間処理法の代謝活性化による場合の1210 μg/mL以上の用量で観察された。

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%を越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では100 μg/mL以上の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合では125 μg/mL以上の用量および連続処理法の24-0 h処理による場合では37.5 μg/mLの用量で認められた。

被験物質の析出は、いずれの試験系列にも観察されなかった。

被験物質処理による培養液pHへの影響は、いずれの試験系列にも観察されなかった。

染色体の構造異常および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(評価用量：4.69～125 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：4.69～37.5 μg/mL)ではいずれの用量においても5%未満であった。短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：9.38～125 μg/mL)では、構造異常の出現率は用量と

の関連性は明確ではなかったものの、18.8、75、100 および 125 μg/mL の用量でそれぞれ 14.0、12.5、15.5 および 17.5%と 10%を超え、また、37.5 μg/mL の出現率は 5.5%と 5%を超えるものであった(D_{20}値:0.024 mg/mL)。また、数的異常の出現率は 37.5 μg/mL の用量で 9.0%となり 5%を超え主に核内倍加によるものであった。また、出現率は 5%未満であったものの核内倍加は 18.8、75、100 および 125 μg/mL の用量においても出現が認められた。

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 68.5%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 45.0%および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 68.0%であった。

考　察

4-ブロモ-2,5-ジクロロフェノールの *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。

予備試験(細胞増殖抑制試験)の結果に基づき、本試験(染色体異常試験)用量として、各試験系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量とする計 6～8 用量を設定した。

本試験の結果、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、構造異常および数的異常ともにその出現率は全て 5%未満であり陰性と判断した。短時間処理法の代謝活性化による場合では、18.8 μg/mL 以上の複数の用量で構造異常の出現率が 10%以上となり陽性と判断した。また、数的異常の出現率は 37.5 μg/mL の用量でのみ 5%を超えるものであった(9.0%)が主に核内倍加によるものであり、また、より高用量においても核内倍加の出現が認められたことから、数的異常については疑陽性とするのが適当と判断した。

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、4-ブロモ-2,5-ジクロロフェノールは、本試験条件において、代謝活性化系の存在下でほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有すると判断した。

参考資料

1) オンラインカタログ；東京化成工業株式会社
2) 日本化学物質辞書 Web；独立行政法人 科学技術振興機構
3) 製品安全データシート(2006 年 4 月 3 日改訂)、東京化成工業株式会社
4) 祖父尼俊雄監修、「染色体異常試験データ集、改定 1998 年版」、株式会社　エル・アイ・シー

Table 1 Effects of 4-bromo-2,5-dichlorophenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08211)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration (μg/mL)	S9- 6-18 h (Mean)	S9+ 6-18 h (Mean)	S9- 24-0 h (Mean)
Control [a]	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
4-Bromo-2,5-dichlorophenol	9.45	100 , 96 (98.0)	92 , 91 (91.5)	88 , 85 (86.5)
	18.9	82 , 80 (81.0)	82 , 89 (85.5)	46 , 44 (45.0)
	37.8	74 , 65 (69.5)	77 , 75 (76.0)	36 , 34 (35.0)
	75.6	64 , 54 (59.0)	64 , 70 (67.0)	28 , 31 (29.5)
	151	15 14 (14.5)	13 , 12 (12.5)	9 , 11 (10.0)
	303	13 , 11 (12.0)	12 , 11 (11.5)	11 , 16 (13.5)
	605	7 , 10 (8.5)	9 * , 9 * (9.0)	11 , 11 (11.0)
	1210	12 # , 12 # (12.0)	17 *†, 16 *† (16.5)	25 # , 26 # (25.5)
	2420	26 *†, 18 *† (22.0)	23 *†, 30 *† (26.5)	38 *†, 41 *† (39.5)
IC_{50} (μg/mL)		87.0	93.8	17.4

a : Dimethyl sulfoxide
* : Precipitation at the beginning and end of treatment
# : Decrease of pH in culture medium at the beginning of treatment
† : Decrease of pH in culture medium at the beginning and end of treatment
The figure in parentheses represents mean value of two plates.

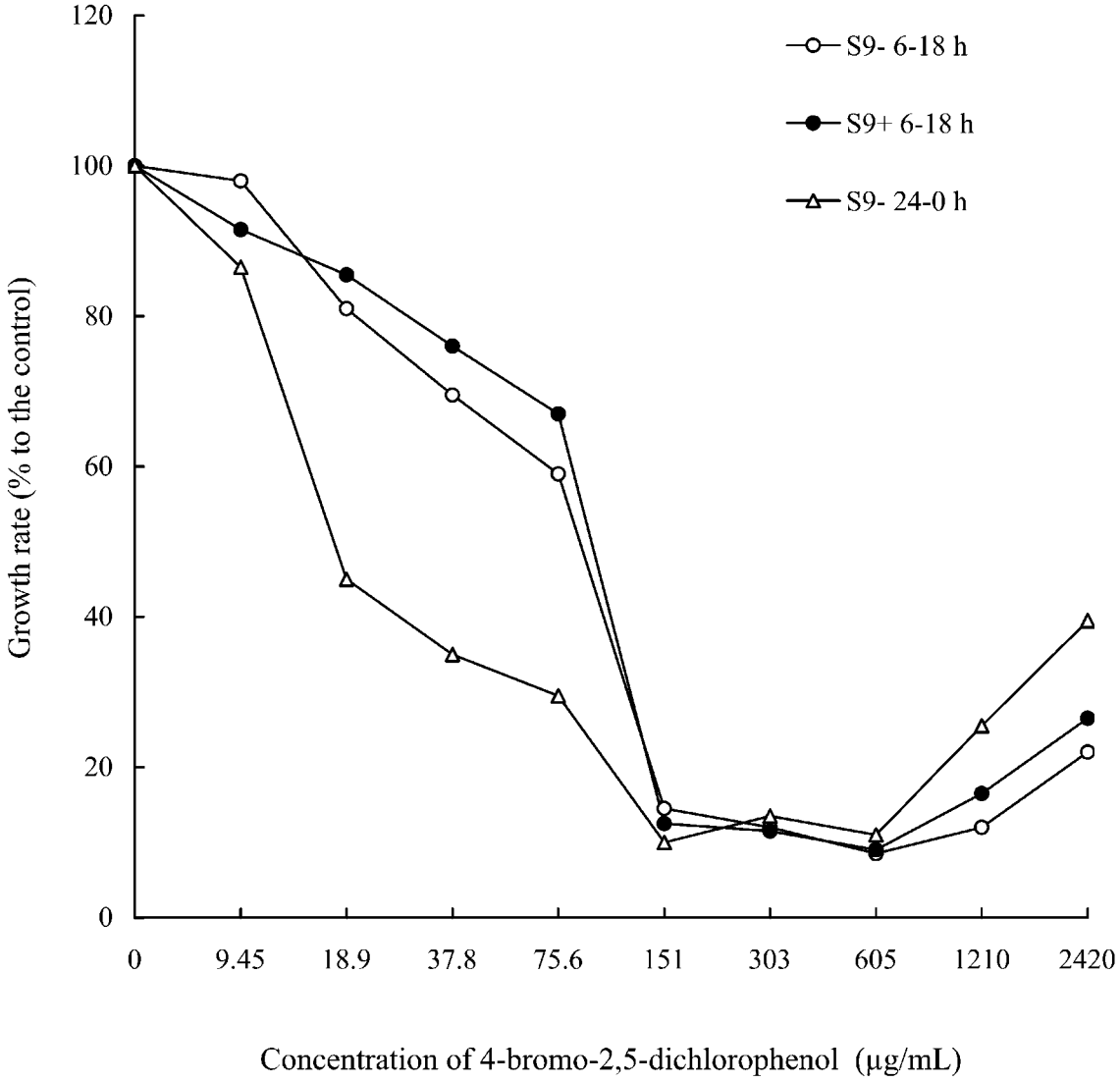


Figure 1 Effects of 4-bromo-2,5-dichlorophenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08211)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of 4-bromo-2,5-dichlorophenol on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR08211)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration (μg/mL)	S9- 6-18 h (Mean)	S9+ 6-18 h (Mean)	S9- 24-0 h (Mean)
Control [a]	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
4-Bromo-2,5-dichlorophenol	4.69	98 , 111 (104.5)	-	96 , 102 (99.0)
	9.38	104 , 107 (105.5)	96 , 104 (100.0)	87 , 93 (90.0)
	12.5	-	-	76 , 92 (84.0)
	15.6	-	-	71 , 83 (77.0)
	18.8	97 , 94 (95.5)	81 , 91 (86.0)	49 , 53 (51.0)
	37.5	67 , 73 (70.0)	82 , 86 (84.0)	36 , 38 (37.0)
	75	55 , 51 (53.0)	62 , 69 (65.5)	-
	100	44 , 50 (47.0)	50 , 56 (53.0)	-
	125	39 , 47 (43.0)	46 , 40 (43.0)	-
	150	21 , 29 (25.0)	21 , 19 (20.0)	-

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 3-1 Results of the chromosomal aberration test of 4-bromo-2,5-dichlorophenol (6 hours treatment without metabolic activation) (SR08211)

Time schedule [a] (hours)	S9	Group	Concentration (μg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment [c]
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	–	Control [b]	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	–
					100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
					200	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0	1	0	1 (0.5)	
		4-Bromo-2,5-dichlorophenol	4.69	104.5	100	2	0	0	0	0	2	0	1	0	1	–
					100	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	
					200	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0	4	0	4 (2.0)	
			9.38	105.5	100	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	2	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0 (0.0)	
			18.8	95.5	100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	3	0	3 (1.5)	
			37.5	70.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	
					100	2	1	0	0	0	3	0	3	1	4	
					200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0	3	3	6 (3.0)	
			75	53.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	1	2	
					100	1	1	0	0	0	2	0	1	0	1	
					200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0	2	1	3 (1.5)	
			100	47.0	100	2	1	1	0	0	3	0	0	1	1	
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	2	2	
					200	3	1	1	0	0	4 (2.0)	0	0	3	3 (1.5)	
			125	43.0	100	2	3	0	0	0	4	0	0	1	1	
					64	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					62	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4	
					226	2	3	0	0	0	4 (1.8)	0	4	2	6 (2.7)	
			150	25.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mitomycin C	0.1		100	16	62	0	0	0	70	0	0	0	0	+
					100	16	61	0	0	0	67	1	0	0	0	
					200	32	123	0	0	0	137 (68.5)	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 +, positive

-: Blank

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of 4-bromo-2,5-dichlorophenol (6 hours treatment with metabolic activation) (SR08211)

Time schedule [a] (hours)	S9	Group	Concentration (μg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment [c]
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	+	Control [b]	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	–
					100	2	1	0	0	0	3	1	0	0	0	
					200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	1	1	0	1 (0.5)	
		4-Bromo-2,5-dichlorophenol	9.38	100.0	100	2	1	1	0	0	4	0	0	0	0	+
					100	2	1	1	0	0	3	0	0	0	0	
					200	4	2	2	0	0	7 (3.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			18.8	86.0	100	5	15	0	0	0	16	0	0	1	1	
					100	5	9	1	0	0	12	0	1	0	1	
					200	10	24	1	0	0	28 (14.0)	0	1	1	2 (1.0)	
			37.5	84.0	100	5	4	0	0	0	7	0	4	5	9	
					100	1	3	0	0	0	4	0	0	9	9	
					200	6	7	0	0	0	11 (5.5)	0	4	14	18 (9.0)	
			75	65.5	100	7	12	1	0	0	14	0	1	1	2	
					100	8	4	0	0	0	11	0	0	3	3	
					200	15	16	1	0	0	25 (12.5)	0	1	4	5 (2.5)	
			100	53.0	100	5	11	0	0	0	14	1	0	1	1	
					100	4	15	0	0	0	17	0	0	1	1	
					200	9	26	0	0	0	31 (15.5)	1	0	2	2 (1.0)	
			125	43.0	100	1	10	1	0	0	11	0	2	2	4	
					100	8	19	0	0	0	24	1	0	4	4	
					200	9	29	1	0	0	35 (17.5)	1	2	6	8 (4.0)	
			150	20.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		3,4-Benzopyrene	10		100	9	41	0	1	0	45	0	0	0	0	+
					100	11	39	0	1	0	45	0	0	0	0	
					200	20	80	0	2	0	90 (45.0)	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 4-bromo-2,5-dichlorophenol (24 hours treatment without metabolic activation) (SR08211)

Time schedule [a] (hours)	S9	Group	Concentration (μg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment [c]
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
24-0	–	Control [b]	—	100.0	100	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)	
		4-Bromo-2,5-dichlorophenol	4.69	99.0	100	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)	
			9.38	90.0	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			12.5	84.0	100	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	0	0	1	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
			15.6	77.0	100	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)	
			18.8	51.0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					87	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					263	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.4)	
			37.5	37.0	27	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					30	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					233	1	0	0	0	0	1 (0.4)	0	1	0	1 (0.4)	
		Mitomycin C	0.05		100	13	64	1	1	0	71	0	0	0	0	+
					100	8	60	0	0	0	65	0	0	0	0	
					200	21	124	1	1	0	136 (68.0)	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