2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノールの哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

# 最　終　報　告　書

作成日　2004年　10月　7日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

# 目　　次


要　　約 …… 8
緒　　言 …… 9
方　　法 …… 9
　1．被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質 …… 9
　2．検体液 …… 10
　3．試験細胞 …… 10
　4．培養液 …… 11
　5．S9 mix …… 11
　6．細胞数の調整及び細胞播種 …… 11
　7．細胞増殖抑制試験 …… 11
　8．染色体異常試験 …… 12
　9．標本観察 …… 14
　10．試験の成立条件 …… 14
　11．統計学的方法 …… 14
　12．判定基準 …… 14
試験成績 …… 15
　1．短時間処理法 …… 15
　2．連続処理法 …… 15
考　　察 …… 16
文　　献 …… 16

Attachment, Table, Figure, Appendix及びPhotographの目次


| | | | |
|---|---|---|---|
| Table 1 | Cell growth inhibition test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells -The short treatment method- | …… | 21 |
| Table 2 | Cell growth inhibition test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells -The continuous treatment method- | …… | 22 |
| Table 3 | Chromosomal aberration test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells -The short treatment method- | …… | 23 |
| Table 4 | Chromosomal aberration test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells -The continuous treatment method- | …… | 24 |
| Figure 1 | Cell growth inhibition test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells | …… | 25 |

# 要　約

2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノールの染色体異常誘発性の有無を，哺乳類の培養細胞（CHL/IU細胞）を用い，短時間処理法（6時間処理のS9 mix添加及び無添加）と連続処理法（24時間処理）で検討した．

1. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の実施に先駆けて，試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施した．

50%細胞増殖抑制濃度（以下$IC_{50}$）は，短時間処理法のS9 mix添加では82.6 μg/mL，S9 mix無添加では90.8 μg/mLであった．一方，連続処理法の24時間処理では40.8 μg/mLであった．

2. 染色体異常試験

染色体異常試験の試験濃度は，細胞増殖抑制試験の結果に基づき，$IC_{50}$及び細胞の生存率を指標に，短時間処理法のS9 mix添加及び無添加では12.5，25，50，100及び200 μg/mLに，連続処理法の24時間処理では3.1，6.3，12.5，25及び50 μg/mLに設定した．

試験の結果，短時間処理法（S9 mix添加及び無添加）及び連続処理法とも，染色体異常（構造異常）を有する細胞の出現率は5%未満となった．

3. 対照物質

各試験で用いた陽性対照物質は，明らかな陽性結果を示し，陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は，当試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった．

以上の結果，当試験の条件下において，2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノールは，染色体異常を誘発しないと判定する．

# 緒　言

2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノールの安全性に関する非臨床試験の一環として，哺乳類の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について検討した．

# 方　法

## 1．被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質

### 1.1 被験物質

被験物質の2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノール（CAS No.88-85-7）は，分子量：240.22，水に不溶，通常の取り扱いにおいては安定な黄色の塊，溶融時は黄色澄明の液体である．

当試験には，　　から購入したもの（ロット番号：　　，純度：96.0 %）を用いた．入手後は，試験施設の被験物質保管室の保管庫に冷蔵（2～10 °C）の条件下で保管した．

### 1.2 媒体

媒体には，ジメチルスルホキシド［以下DMSO，紫外部吸収スペクトル用，ロット番号：NJ151，株式会社同仁化学研究所，使用期限：2008年5月5日（自社規定），保管条件：室温（15～30 °C）・遮光］を用いた．

### 1.3 陽性対照物質

試験には，マイトマイシンC(以下MMC)とジメチルニトロサミン(以下DMN)を用いた．

MMC［商品名：マイトマイシン協和S，1バイアル中に，日局マイトマイシンC 2 mg(力価）と日局塩化ナトリウム48 mgを含有，ロット番号：380ABC，使用期限：2006年3月，協和醗酵工業株式会社］と，DMN［純度：99.4%，ロット番号：DWP3368，使用期限：2007年2月21日(自社規定)，和光純薬工業株式会社］は，いずれも市販品を購入した．購入後は，いずれも使用時まで当試験施設の被験物質保管室の保管庫内に，冷蔵(1～10 °C)の条件下で保管した．

### 1.4 陰性対照物質

陰性対照物質は，被験物質の媒体として用いたDMSOとした．

## 2．検体液

### 2.1 被験物質

細胞増殖抑制試験では，被験物質501.70 mgをDMSOに溶解して1.0 mLとし，最高濃度液(501.70 mg/mL)を調製した．また，染色体異常試験の短時間処理法では，被験物質209.0 mgをDMSOに溶解して5.0 mLとし，最高濃度液(41.8 mg/mL)を，連続処理法では，被験物質52.3 mgをDMSOに溶解して5.0 mLとし，最高濃度液(10.46 mg/mL)を調製した．最高濃度液より低い濃度液は，最高濃度液からDMSOで段階希釈して調製した．調製は用時に行い，使用後の残液は廃棄処分した．なお，調製に際して，純度による換算を行った(換算計数：1.04)．また，当試験における表示濃度は培養液に添加したときの最終濃度であるため，各調製液はあらかじめ表示濃度の201倍の濃度を調製した．

### 2.2 陽性対照物質

MMC及びDMNとも，生理食塩液（局方品，ロット番号：K1E90，株式会社大塚製薬工場）に溶解して必要濃度（表示濃度の11倍）を調製した．調製は用時に行い，使用後の残液は廃棄処分した．

| | 物質名 | 調製濃度（μg/mL） | 試験濃度（μg/mL） |
|---|---|---|---|
| 連続処理法 | MMC | 0.55 | 0.05 |
| 短時間処理法 | DMN | 5500 | 500 |
| | MMC | 1.1 | 0.1 |

## 3．試験細胞

試験には，2000年11月28日に大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクツ部から入手したチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を用いた．細胞は液体窒素中に凍結保管(-196 °C)した．試験に際し，凍結保管してある細胞(継代数15回)を融解して増殖させ，染色体数及び倍化時間を検査した［検査日：2003年11月17日～2003年11月21日］．

試験には，当試験施設の基準に適合した細胞(倍化時間：15～18時間，染色体数：23～27本の染色体を有する細胞が80%以上)を用いた．検査の結果をAttachment 1に示した．

細胞の継代は，培養ビン(Nunc製)を用いて3～4日ごとに行った．以下に各試験における再培養からの継代数を示した．

細胞増殖抑制試験 …… 4回
染色体異常試験（短時間処理法） …… 8回
染色体異常試験（連続処理法） …… 9回

なお，実験操作は空調設備を備えた染色体異常試験室(A棟)で行った．

4．培養液

Eagleの最少必須培養液(Eagle's minimum essential medium，以下Eagle's MEM)の組成を，Attachment 2に示した．

培養液は，Eagle's MEM粉末(ロット番号：1150315，GIBCO，リストNo.61100-061)と炭酸水素ナトリウムを注射用水に溶解し，1 Nの塩酸でpHを7.0～7.1に調整した．メンブランフィルター(φ0.22 μm)濾過した後，非働化(56 °C，30分)した仔牛血清(ロット番号：382245，GIBCO)を最終調製量の10%となるように加えて調製した．なお，調製した培養液は用時に37 °Cに加温して使用した．

5．S9 mix

S9は，Attachment 3の方法により2003年8月1日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの（ロット番号：03080105）を用いた．S9は2003年8月28日に購入し，調製時まで-80 °C設定の冷凍庫［型式：BFV-130（LR），エスペック株式会社］内に凍結保管した．

S9 mixは，S9以外の各物質を調製混合して溶液とし，これをメンブランフィルター（φ0.2 μm）で濾過した後，使用直前にS9を加えて調製した．S9 mixの組成をAttachment 4に示した．

6．細胞数の調整及び細胞播種

培養ビンに0.25%トリプシン液を加えて細胞を剥離し，遠心分離［4 °C，1000 r.p.m.，5分間，小形冷却遠心機（型式：05PR-22，日立工機株式会社），以下同様］により細胞を回収した後，新鮮な培養液を加えて細胞浮遊液を作製した．この浮遊液中の細胞数を血球計算盤を用いて計測し，細胞数が$2\times10^4$個/5 mLになるように培養液を加えて調整した．調整した細胞浮遊液を5 mLずつ，直径60 mmの滅菌シャーレ（CORNING）に播種し，温度を37 °C，$CO_2$濃度を5%に設定した炭酸ガスインキュベーター（型式：BNA-121D，エスペック株式会社，以下$CO_2$インキュベーター）内で3日間培養したものを試験に用いた．

シャーレは，細胞増殖抑制試験では1濃度につき1枚を，染色体異常試験では1濃度につき細胞数の計測用に1枚，染色体標本作製用に2枚を用いた．また，シャーレには試験番号，被験物質名又は対照物質名，濃度を記入し，さらに短時間処理法の場合はS9 mixの有無を，連続処理法の場合は培養時間を記入することにより識別した．

7．細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノールの試験濃度を設定するために，細胞増殖抑制試験を行った．試験は，短時間処理法のS9 mix添加及び無添加と連続処理法の24時間処理の3系列で実施した．

短時間処理法では，S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後，ここにS9 mix 0.5 mLと検体液15 μLを添加した．S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後に，検体液をS9 mix添加の場合と同様に添加した．いずれのシャーレも$CO_2$インキュベーター内で6時間培養した後，新鮮な培養液5.0 mLに取り替え，さらに18時間培養した．一方，連続処理法では，シャーレに検体液25 μLを添加し，$CO_2$インキュベーター内で24時間培養した．

短時間処理法及び連続処理法とも，培養終了後，各シャーレに0.25 %トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し，遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて，生細胞数を計測した．計測は1枚のシャーレ当たり3回行い，その平均値を用いて陰性対照群の生細胞数を100%として各濃度における細胞の生存率を求めた．

試験濃度は，短時間処理法及び連続処理法とも「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成9年10月31日）に基づき，10 mMの2400 μg/mLを最高濃度とし，以下公比2により1200，600，300，150，75，37.5，18.8，9.4及び4.7 μg/mLの計10濃度を設定し，その他に陰性対照を設けた．

試験結果をTable 1，2及びFigure 1に示した．

短時間処理法，S9 mix添加における細胞の生存率は，4.7～18.8 μg/mLでは90%以上を示したが，37.5 μg/mL以上の濃度では濃度が増加するに従いその値は減少し，300 μg/mL以上の濃度では生細胞は認められなかった．S9 mix無添加における細胞の生存率は，4.7～37.5 μg/mLでは90%以上を示したが，75 μg/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し，300 μg/mL以上の濃度では生細胞は認められなかった．

Probit法により算出した$IC_{50}$は，S9 mix添加では82.6 μg/mL，S9 mix無添加では90.8 μg/mLであった．

なお，600 μg/mL以上の濃度において，S9 mix添加及び無添加とも，検体液添加時，処理終了時に黄色の微細な析出が認められた．

連続処理法，24時間処理における細胞の生存率は，4.7及び9.4 μg/mLでは90%以上を示したが，18.8 μg/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し，150 μg/mL以上の濃度では生細胞は認められなかった．

Probit法により算出した$IC_{50}$は，40.8 μg/mLであった．

なお，600 μg/mL以上の濃度において検体液添加時及び処理終了時に黄色の微細な析出が認められた．

## 8．染色体異常試験

試験は，短時間処理法のS9 mix添加及び無添加と連続処理法の24時間処理の3系列で実施した．

### 8.1 試験濃度及び処理群

細胞増殖抑制試験の結果に基づき，$IC_{50}$及び細胞の生存率を指標に，短時間処理法のS9 mix添加及び無添加では12.5，25，50，100及び200 μg/mLに，連続処理法の24時間処理では3.1，6.3，12.5，25及び50 μg/mLに設定した．

処理群は，各試験系列ごとに被験物質，陰性対照及び陽性対照群を設けた．陽性対照として短時間処理法のS9 mix添加にはDMN（500 μg/mL）を，S9 mix無添加にはMMC（0.1 μg/mL）を，連続処理法にはMMC（0.05 μg/mL）を用いた．

8.2 検体液の処理

8.2.1 短時間処理法

S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後に，S9 mix 0.5 mLと被験物質及び陰性対照物質の場合は15 μLを，陽性対照物質の場合は0.3 mLを添加した．S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後に，検体液をS9 mix添加の場合と同様に添加した．いずれのシャーレも$CO_2$インキュベーター内で6時間培養した後，新鮮な培養液5.0 mLに取り替え，さらに18時間培養してから染色体標本の作製及び生細胞数の計測をした．

8.2.2 連続処理法

シャーレに，被験物質及び陰性対照物質の場合は25 μLを，陽性対照物質の場合は0.5 mLを添加し，$CO_2$インキュベーター内で24時間培養した後に染色体標本の作製及び生細胞数の計測をした．

8.2.3 標本作製

短時間処理法及び連続処理法とも，培養終了2時間前に10 μg/mL濃度のコルセミド液を各シャーレに0.1 mL添加して，分裂中期細胞を得た．培養終了後，各シャーレに0.25%トリプシン液を約3 mL加えて細胞を剥離し，遠心分離により細胞を回収した後，75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理（37 °C，15分間）をした．低張処理が終了した後，再び遠心分離し，メタノールと酢酸を3:1の割合で混合して氷冷した固定液で脱水固定を行い，同固定液で細胞浮遊液を調製した．この細胞浮遊液をスライドグラス上の2ヵ所に一滴ずつ滴下して細胞を広げ，乾燥後，2%のGiemsa染色液で約15分間染色した．

スライド標本は1シャーレ当たり3枚作製し，乱数を用いてコード番号を割り付けた．なお，観察終了後にスライド標本はカバーグラスで封入し，試験番号，被験物質名又は対照物質名，濃度，試験法，S9 mixの有無（短時間処理法）又は培養時間（連続処理法），標本作製日を記入したラベルを貼付した．

8.2.4 細胞数の計測

短時間処理法及び連続処理法とも，培養終了後，各シャーレに0.25%トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し，遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて，生細胞数を計測した．計測は1枚のシャーレ当たり3回行い，その平均値を用いて陰性対照群の生細胞数を100%として各濃度における細胞の生存率を求めた．

9．標本観察

石館の方法[1]を参考にして，染色体がよく広がった分裂中期像の細胞を1シャーレ当たり100個，1濃度当たり200個観察した．標本の観察はコード番号順に行い，観察結果と試験濃度との照合は，すべての標本観察終了後に行った．ただし，短時間処理法のS9 mix添加及び無添加の最高濃度である200 μg/mLでは分裂中期細胞が認められなかった．

染色体異常は，数的異常と構造的異常に分類した．数的異常は倍数体（polyploid）のみを観察対象とし，構造的異常は①染色分体型ギャップ（chromatid gap，以下ctg），②染色体型ギャップ（chromosome gap，以下csg），③染色分体型切断（chromatid break，以下ctb），④染色体型切断（chromosome break，以下csb），⑤染色分体型交換（chromatid exchange，以下cte），⑥染色体型交換（chromosome exchange，以下cse），⑦断片化（fragmentation，以下frg）に分類し，これらの染色体異常を有する細胞を陽性細胞1個として記録した．なお，ギャップと切断の判別は，染色体または染色分体の断片が軸の同一線上にあるものをギャップとし，同一線上からはずれているものを切断としたが，断片が同一線上にあっても非染色性部分が染色分体幅より大きいものは切断とした．染色体異常の総数は，ギャップを含めた場合と含めない場合とに分けて記録した．

当試験で認められた染色体異常を，型別に代表例について写真撮影した（Photograph 1～5）．

10．試験の成立条件

陰性対照群において，染色体異常を有する細胞の出現率が5%未満で，陽性対照群においてギャップ以外の染色体異常を有する細胞の出現率が10%以上を示し，さらに陰性及び陽性対照群の染色体異常の出現率が，ほぼ当試験施設のバックグラウンドデータ（Attachment 5）の範囲内を示し，試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした．

11．統計学的方法

染色体異常を有する細胞の出現率は，下記の判定基準に従ったため有意差検定は行わなかった．

12．判定基準

試験の結果は，数的異常又は構造的異常を有する細胞の出現率が5%未満の場合を陰性，5%以上10%未満の場合を疑陽性とした．さらにその出現率が10%以上を示し，濃度の増加に伴って増加した場合を陽性とした．なお，構造的異常の染色体を有する細胞の出現率は，ギャップを含めた場合と含めない場合で算出し，ギャップを含めない場合の出現率により判定した．

## 試験成績

### 1．短時間処理法

試験結果をTable 3（Appendix 1-1～1-2）に示した．

2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノール処理群の数的異常細胞の出現率は，S9 mix添加の有無にかかわらず，すべての濃度で2.0%以下と陰性であった．同様に，構造的異常細胞の出現率も，S9 mix添加の有無にかかわらず，すべての濃度で1.0%以下と陰性であった．

なお，S9 mix添加及びS9 mix無添加の最高濃度である200 μg/mLでは細胞毒性のため，分裂中期細胞が認められなかった．

S9 mix添加における細胞の生存率は，12.5及び25 μg/mLでは90%以上を示したが，50 μg/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し，最高濃度の200 μg/mLでは8%であった．S9 mix無添加における細胞の生存率は，12.5及び25 μg/mLでは90%以上を示したが，50 μg/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し，最高濃度の200 μg/mLでは25%であった．

検体液添加時と処理終了時の被験物質の析出は，S9 mix添加の有無にかかわらず，すべての濃度において認められなかった．

陰性対照における数的異常細胞の出現率は，S9 mix添加では0.5%，S9 mix無添加では0%であった．構造的異常細胞の出現率は，S9 mix添加の有無にかかわらず0%であった．また，陽性対照（S9 mix添加：DMN；500 μg/mL，S9 mix無添加：MMC；0.1 μg/mL）の数的異常細胞の出現率は，S9 mix添加では0%，S9 mix無添加では0.5%であった．構造的異常細胞の出現率は，S9 mix添加では68.5%，S9 mix無添加では51.0%であった．

陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は，バックグラウンドデータの範囲内であり，試験条件を満たすものであった．

### 2．連続処理法

試験結果をTable 4（Appendix 2-1）に示した．

2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノール処理群の数的異常細胞の出現率は，すべての濃度で0.5%と陰性であった．同様に，構造的異常細胞の出現率も，すべての濃度で1.0%以下と陰性であった．

細胞生存率は，3.1～12.5 μg/mLでは90%以上を示したが，25 μg/mLでは77%，最高濃度の50 μg/mLでは42%であった．

検体液添加時と処理終了時の被験物質の析出は，すべての濃度において認められなかった．

陰性対照における数的異常細胞の出現率は0.5%，構造的異常細胞の出現率は0%であった．また，陽性対照（MMC：0.05 μg/mL）における数的異常細胞の出現率は0.5%，構造的異常細胞の出現率は43.5%であった．

陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は，バックグラウンドデータの範囲内であり，試験条件を満たすものであった．

## 考　察

2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノールの染色体異常誘発性の有無を，哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験により検討した．

2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノール処理群の数的異常細胞及び構造的異常細胞の出現率は，いずれの試験系列においても，5%未満であったため，2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノールは数的異常及び構造的異常を誘発しないものと思われる．

短時間処理法及び連続処理法の各試験系においても，陰性対照及び陽性対照群の異常細胞出現率は，バックグラウンドデータの範囲内であり，試験の成立条件を満たすものであった．

以上の結果，当試験の条件下において，2-*sec*-ブチル-4, 6-ジニトロフェノールは，染色体異常を誘発しないと判定する．なお，2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールは当試験施設で同時期に実施した細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている[2]．また，関連物質の2，4-ジニトロフェノールでは復帰変異試験において疑陽性，染色体異常試験において陽性との報告がある[3),4)]．

## 文　献

1) 石館 基監修：染色体異常試験データ集（改訂増補），株式会社エル・アイ・シー（東京，1987）．
2) 三輪芳久ら：2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号：901122），株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所（2004）．
3) 野田篤ら：化学物質毒性試験報告，8，27（2001）．
4) 野田篤ら：化学物質毒性試験報告，8，33（2001）．

Table 1. Cell growth inhibition test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells
-The short treatment method-

| Test Substance | Concentration (μg/mL) | Treated for 6 hr with S9 mix | | | Treated for 6 hr without S9 mix | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | No. of cells (×10⁴/plate) | Survival ratio[a)] (%) | $IC_{50}$ (μg/mL) | No. of cells (×10⁴/plate) | Survival ratio[a)] (%) | $IC_{50}$ (μg/mL) |
| Negative control (Dimethylsulfoxide) | — | 60 | 100 | — | 60 | 100 | — |
| 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol | 4.7 | 61 | 102 | 82.6 | 59 | 98 | 90.8 |
| | 9.4 | 61 | 102 | | 58 | 97 | |
| | 18.8 | 54 | 90 | | 58 | 97 | |
| | 37.5 | 47 | 78 | | 54 | 90 | |
| | 75 | 41 | 68 | | 40 | 67 | |
| | 150 | 19 | 32 | | 21 | 35 | |
| | 300 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| | 600* | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| | 1200* | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| | 2400* | 0 | 0 | | 0 | 0 | |

a): (2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol treated group / negative control) × 100.

* : Yellow fine precipitations were noted in the cultured fluid in petri plate.

Table 2. Cell growth inhibition test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells
-The continuous treatment method-

| Test Substance | Concentration (μg/mL) | Treated for 24 hr | | |
|---|---|---|---|---|
| | | No. of cells ($\times 10^4$/plate) | Survival ratio[a] (%) | $IC_{50}$ (μg/mL) |
| Negative control (Dimethylsulfoxide) | – | 60 | 100 | – |
| 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol | 4.7 | 59 | 98 | 40.8 |
| | 9.4 | 58 | 97 | |
| | 18.8 | 53 | 88 | |
| | 37.5 | 33 | 55 | |
| | 75 | 16 | 27 | |
| | 150 | 0 | 0 | |
| | 300 | 0 | 0 | |
| | 600* | 0 | 0 | |
| | 1200* | 0 | 0 | |
| | 2400* | 0 | 0 | |

a): (2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol treated group / negative control) × 100.

* : Yellow fine precipitations were noted in the cultured fluid in petri plate.

Table 3. Chromosomal aberration test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells
— The short treatment method —

| Test substance | Concentration (μg/mL) | With(+) or without(-) S9mix | No.of metaphase examined | No.of polyploid cells | Incidence[a] (%) | Judgement[b] | Structural aberrations: Types[c] and numbers (cumulative) ctg | csg | ctb | csb | cte | cse | frg | No.of cells with chromosome aberration (+g) | (-g) | Incidence[d] (%) (+g) | (-g) | Judgement[b] | Survival ratio[e] (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Negative control | — | + | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 100 |
| 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol | 12.5 | + | 200 | 3 | 1.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0.5 | 0.5 | — | 97 |
| | 25 | + | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0.5 | 0.5 | — | 92 |
| | 50 | + | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0.5 | 0.5 | — | 70 |
| | 100 | + | 200 | 4 | 2.0 | — | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1.0 | 1.0 | — | 43 |
| | 200 | + | NM[f] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 |
| Dimethylnitrosamine | 500 | + | 200 | 0 | 0 | — | 0 | 0 | 42 | 0 | 114 | 0 | 0 | 137 | 137 | 68.5 | 68.5 | + | 81 |
| Negative control | — | — | 200 | 0 | 0 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 100 |
| 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol | 12.5 | — | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 97 |
| | 25 | — | 200 | 2 | 1.0 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 95 |
| | 50 | — | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0.5 | 0.5 | — | 78 |
| | 100 | — | 200 | 2 | 1.0 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 47 |
| | 200 | — | NM[f] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 25 |
| Mitomycin C | 0.1 | — | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 58 | 0 | 63 | 0 | 0 | 102 | 102 | 51.0 | 51.0 | + | 88 |

Negative control: Dimethylsulfoxide.
a): (Polyploid cells / observed metaphase cells) × 100.
b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .
c): ctg: chromatid gap; csg: chromosome gap; ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.
d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.
e): (2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol treated group or positive control / negative control) × 100.
f): No metaphase cells were observed.
(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

Table 4. Chromosomal aberration test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells
— The continuous treatment method —

| Test substance | Concentration (μg/mL) | Time of treatment (hr) | No.of metaphase examined | No.of polyploid cells | Incidence[a] (%) | Judgement[b] | Structural aberrations: Types[c] and numbers (cumulative) | | | | | | | No.of cells with chromosome aberration | | Incidence[d] (%) | | Judgement[b] | Survival ratio[e] (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | ctg | csg | ctb | csb | cte | cse | frg | (+g) | (-g) | (+g) | (-g) | | |
| Negative control | — | 24 | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 100 |
| 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol | 3.1 | 24 | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 97 |
| | 6.3 | 24 | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 94 |
| | 12.5 | 24 | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1.0 | 1.0 | — | 95 |
| | 25 | 24 | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0.5 | 0.5 | — | 77 |
| | 50 | 24 | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 42 |
| Mitomycin C | 0.05 | 24 | 200 | 1 | 0.5 | — | 0 | 0 | 40 | 0 | 58 | 0 | 0 | 87 | 87 | 43.5 | 43.5 | + | 88 |

Negative control: Dimethylsulfoxide.
a): (Polyploid cells / observed metaphase cells) × 100.
b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .
c): ctg: chromatid gap; csg: chromosome gap; ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.
d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.
e): (2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol treated group or positive control / negative control) × 100.
(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

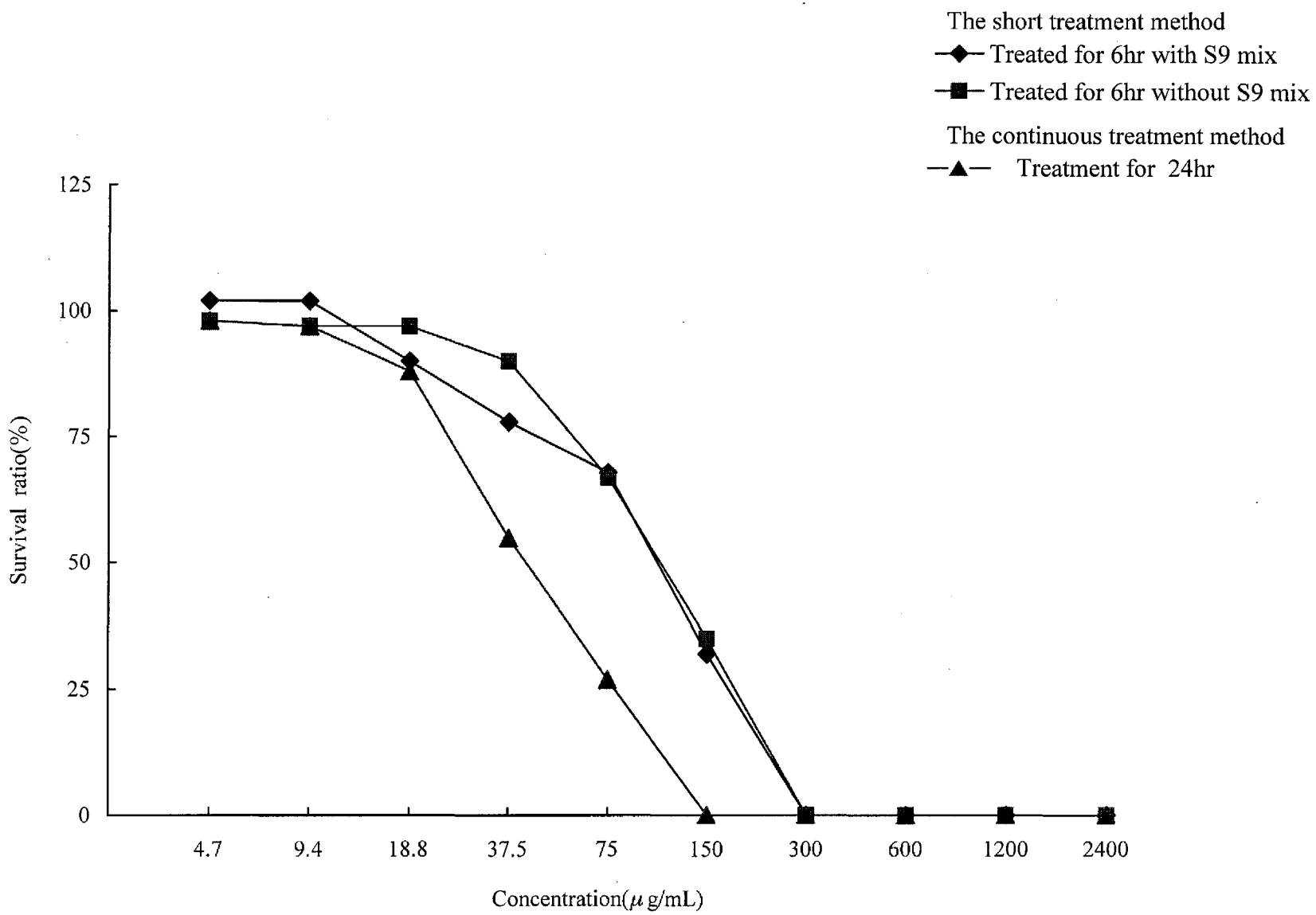


Figure 1. Cell growth inhibition test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in cultured CHL cells.

Study No. 970922