厚生省生活衛生局　殿

試　験　報　告　書

m-トルイル酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 7L635)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目　次

要約 ---------- 7

材料および方法 ---------- 8

1. 試験物質 ---------- 8

2. 細胞 ---------- 9

3. 培地 ---------- 9

4. S9 mix ---------- 9

5. 試験物質調製液 ---------- 10

6. 細胞増殖抑制試験 ---------- 10

7. 染色体異常試験 ---------- 12

8. 確認試験 ---------- 14

結果 ---------- 15

考察および結論 ---------- 15

参考文献 ---------- 16

表 ---------- 17

図 ---------- 26

要 約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い，*m*-トルイル酸の *in vitro* における染色体異常試験を実施した．

細胞増殖抑制試験の結果，50 %細胞増殖抑制濃度は，連続処理法の 24, 48 時間処理で 812, 455 μg/ml，短時間処理法の S9 mix 共存下，非共存下で 863, 1182 μg/ml であった．従って，染色体異常試験は，連続処理法の 24 時間処理および短時間処理法では，2000 μg/ml を最高濃度とし，その 1/2，1/4 および 1/8 の 4 濃度，連続処理法の 48 時間処理では 1000 μg/ml を最高濃度とし，その 1/2，1/4，1/8 および 1/16 の 5 濃度で実施した．その結果，染色体構造異常細胞の出現頻度は連続処理法の 48 時間処理の 1000，500 μg/ml においてそれぞれ 11.0，5.0 %を示した．また，短時間処理法の S9 mix 共存下の 1000 μg/ml では 5.0 %，S9 mix 非共存下の 2000 μg/ml では 7.0 %を示した．

このため，短時間処理法における結果の再現性および用量依存性を確認するために，短時間処理法の S9 mix 共存下は 1000，750，500 μg/ml，非共存下は 2000，1500，1000 μg/ml のそれぞれ 3 濃度で確認試験を実施した．その結果，S9 mix 非共存下の 2000，1500 μg/ml において染色体構造異常細胞のの出現頻度は 68.6，8.5 %であった．その他の処理条件では，染色体構造異常細胞の誘発は観察されなかった．また，数的異常細胞の誘発は全ての処理条件で観察されなかった．

以上の結果より，本試験条件下における *m*-トルイル酸の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した．

材料および方法

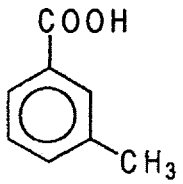
1. 試験物質

1.1 被験物質

から送付された *m*-トルイル酸(CAS 番号：99-04-7，ロット番号：　　純度：98.79 %)は，使用時まで冷暗所に保存した．被験物質は下記の構造式，分子量を有する水に 98 mg/100 ml（25 ℃）で溶解，ジメチルスルホキシド，アセトンに易溶，ゴマ油に殆ど不溶の無色または淡黄色の固体である．

被験物質の安定性は，被験物質供給者より安定性を保証する資料を入手し，確認した．

構造式：



分子量：136.15

不純物：安息香酸　0.41 %

o-トルイル酸　0.11 %

その他低沸分　0.69 %

1.2 対照物質

1) 陰性対照物質

ジメチルスルホキシド（DMSO と略す．関東化学㈱，ロット番号：810S1815，純度 99.7 %）

2) 陽性対照物質

(1) 連続処理法

マイトマイシン C（MMC と略す．協和醗酵工業㈱，ロット番号：139AFK，含量 104 %）

(2) 短時間処理法

ベンゾ[a] ピレン（BP と略す．東京化成工業㈱，ロット番号：AX01，含量 99.5 %）

2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した．細胞は大日本製薬㈱より 1996 年 11 月 6 日に購入し，細胞懸濁液に対し 10 %の割合で DMSO を添加したものを 1 ml に小分けして，液体窒素中で凍結保存した．試験には，これを融解して培養し，その後の継代数が 5 代以内のものを使用した．細胞の培養には，プラスチックシャーレ（直径 6 cm または 10 cm； Becton Dickinson and Company）を用い，炭酸ガス細胞培養装置内（NAPCO 社，7300 型，炭酸ガス 5 %，温度 37 ℃，加湿）で培養した．

3. 培地

3.1 イーグル最少培地

イーグル最少培地（MEM と略す．イーグル MEM 培地「ニッスイ」①，日水製薬㈱）を添付の処方に従い調製し，オートクレーブ滅菌（121 ℃，15 分間）を行った．この 1 *l* に，別に滅菌処理した 2.92 % L- グルタミン水溶液 10 ml と 10 %炭酸水素ナトリウム水溶液 12.7 ml を添加した．

3.2 培養液

上記の MEM 900 ml に対して，非働化（56 ℃, 30 分間加熱処理）した仔牛血清（GIBCO BRL, ロット番号：39K0464）を 100 ml 添加した．

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目 30 mg/kg，2 日目以降 60 mg/kg を 3 日間 1 日 1 回腹腔内投与）と 5, 6- ベンゾフラボン（3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導したSD系雄ラット肝由来S9（キッコーマン㈱，細胞増殖抑制試験および本試験；ロット番号 RAA-374，1997 年 12 月 4 日製造，確認試験；ロット番号 RAA-379，1998 年 3 月 6 日製造）を購入し，使用した．使用時まで -80 ℃ 以下で保存した．

4.2 S9 mix

S9 mix 10 ml あたり以下の組成で用時調製し，使用時まで氷中に保存した．

D- グルコース 6- リン酸	14.1 mg
β -NADP $^{+}$	33.5 mg
（以上，用時秤量）	
20 mM HEPES （pH 7.2）	2 ml
50 mM 塩化マグネシウム六水和物	1 ml
330 mM 塩化カリウム	1 ml
精製水	3 ml
（以上，予め滅菌調製した溶液を添加）	
S9	3 ml

5. 試験物質調製液

5.1 被験物質溶液

溶媒検討の結果，本被験物質は，局方生理食塩液には50 mg/ml で不溶，1 %カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液には 50 mg/ml で均一に懸濁しなかった．DMSO には約 550 mg/ml で調製限界であった．これらの結果から，本被験物質の溶媒は DMSO を用いた．

被験物質を DMSO で所定濃度に用時溶解した．これを同じ溶媒を用いて希釈し，所定濃度の被験物質溶液を調製した．

5.2 陽性対照溶液

MMC は，局方生理食塩液（㈱大塚製薬工場，ロット番号：K7F75）で 3 μg/ml に用時調製した．BP は，DMSO（関東化学㈱，ロット番号：810S1814）で 4 mg/ml に溶解し，凍結保存したものを室温で融解し使用した．

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の処理濃度を決定するために，細胞増殖抑制試験を実施した．

6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち，連続処理法の 24, 48 時間処理および短時間処理法の S9 mix 共存下で，調製限界である 2780 μg/ml（200 倍溶液を調製．調製濃度：556 mg/ml）を最高濃度として 278, 27.8 μg/ml の 3 濃度で予備試験を実施した．この試験では，1 濃度あたり 1 枚のシャーレを用い位相差倒立顕微鏡で細胞の状態を観察した．

その結果，陰性対照群を 100 %としたときの細胞生存率は，いずれの処理条件においても 2780 μg/ml では 0 %，278 μg/ml では 70 ～ 100 %，27.8 μg/ml では 100 %であった．

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は，連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1 および 39.1 μg/ml の 7 濃度を設定した．

6.2 細胞処理

4×10^3個/ml の細胞懸濁液を 6 cm シャーレに 5 ml 播き，3 日間培養した．

シャーレから培養液を除去した後，連続処理法では，細胞を被験物質溶液 0.025 ml，培養液 5 ml で 24 または 48 時間処理した．

短時間処理法では，S9 mix 共存下は，細胞を被験物質溶液 0.015 ml，S9 mix 0.5 ml，培養液 2.5 ml で，また，S9 mix 非共存下は，被験物質溶液 0.015 ml，培養液 3 ml で 6 時間処理した後，MEM で 3 回洗浄し新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間培養した．

陰性対照として，溶媒も各条件で同様に処理した．

各濃度あたり 2 枚のシャーレを用いた．

被験物質処理開始時および処理終了時（短時間処理法は 6 時間処理終了時）に，陰性対照と全処理濃度について，細胞処理液を微量採取し，pH を pH メーター（twin pH B-212，㈱堀場製作所）で測定した．被験物質調製液の pH も，調製時に同様に測定した．

6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+}, Mg^{2+}フリーのリン酸緩衝液（PBS(-)と略す．ダルベッコ PBS「ニッスイ」，日水製薬㈱）で一回洗浄後，0.25 %トリプシン処理後，培養液を加え，ピペッティングすることにより細胞を剥離し，血球計算盤で細胞を数えた．

6.4 50 %細胞増殖抑制濃度(IC_{50})の算出

連続処理法および短時間処理法のそれぞれについて，陰性対照値を 100 %として生存曲線を作成し，被験物質の 50 %細胞増殖抑制濃度(IC_{50})を算出した．なお，IC_{50}は，プロビット法により算出した．

7. 染色体異常試験

7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果は図 1 ～ 2 に示すごとく，IC_{50} は連続処理法の 24, 48 時間処理で 812, 455 μg/ml，短時間処理法の S9 mix 共存下，非共存下で 863, 1182 μg/ml あった．

この結果より，連続処理法の 24 時間処理および短時間処理法では 2000 μg/ml を最高用量とし，その 1/2，1/4 および 1/8 の 4 濃度，連続処理法の 48 時間処理では 1000 μg/ml を最高用量とし，1/2，1/4，1/8 および 1/16 の 5 濃度で染色体異常試験を実施した．

陽性対照である MMC, BP の濃度はそれぞれ，染色体異常誘発性が知られている 0.03, 20 μg/ml とした．

7.2 細胞処理

細胞を 6.2 と同様に処理した．

陽性対照については，連続処理法では，細胞を培養液 5 ml，MMC 溶液 0.05 ml で，短時間処理法の S9 mix 共存下では培養液 2.5 ml，S9 mix 0.5 ml，BP 溶液 0.015 ml で，S9 mix 非共存下では培養液 3 ml，BP 溶液 0.015 ml で同様に処理した．

7.3 標本作製

処理終了の 2 時間前に，コルセミドを最終濃度が 0.1 μg/ml となるように各シャーレに加え，分裂中期の細胞を蓄積させた．処理終了後，細胞表面を PBS(-) で 1 回洗浄し，0.25 %トリプシン処理により細胞を剥離した後，遠心分離（1000 rpm，5 分間；以下同じ）により細胞を集めた．上清を除去し，これに 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 ml を加えて低張処理（37 ℃，15 分）を行った．更に，冷却したメタノール・酢酸(3:1)混合液 4 ml を加え細胞を固定した後，遠心分離し，上清を除去した．さらに同固定液 4 ml を加え，同様の操作を 2 ～ 3 回繰り返した．固定終了後，少量の固定液で細胞を懸濁し，濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラス上の 2 箇所に滴下し，乾燥した．これを 3 %ギムザ溶液で 20 分間染色し，水洗，乾燥後，封入して観察標本とした．各シャーレにつき 2 枚の標本を作製した．

7.4 観　察

1) 予備鏡検

標本作製後，試験の適否確認のため予備鏡検を行った．

その結果，連続処理法の 24 時間処理の 2000 μg/ml の両方のシャーレおよび短時間処理法の S9 mix 共存下の 2000 μg/ml の 1 枚のシャーレから作製した標本において 50 個以上の分裂細胞が観察されなかったため，観察対象から除外した．

陰性対照および陽性対照については，各々構造異常細胞の出現状態が適切であることを確認した．

2) 分裂指数／分裂活性

予備鏡検時に，シャーレ 1 枚につき 1000 個，1 濃度 2000 個の細胞中の分裂中期細胞を数え，分裂指数を求めた．またこれから陰性対照と各処理群の分裂指数の比（分裂活性）を算出した．

3) 構造異常および数的異常

陰性対照群，陽性対照群および被験物質処理群について，構造異常および数的異常を盲検法で観察した．

(1) 構造異常

シャーレ 1 枚につき 100 個，1 濃度 200 個の細胞を調べた．

染色体がよく拡がった分裂中期細胞を観察し，構造異常細胞を数えた．ただし，構造異常がなく，染色体数が 25 ± 2 本でない細胞は除外した．異常の分類は以下のとおりとした[1]．

- ギャップ　(染色分体型および染色体型を含む；gap と略す)
- 染色分体型切断　(ctb と略す)
- 染色分体型交換　(cte と略す)
- 染色体型切断　(csb と略す)
- 染色体型交換　(二動原体，環状染色体など；cse と略す)
- 断片化　(frg と略す)

ギャップは，染色分体に見られる非染色部分が染色分体の軸上にあり，その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず，非染色部分の形状が明確なものとし切断とは区別した．

(2) 数的異常

シャーレ 1 枚につき 100 個，1 濃度 200 個の分裂中期細胞を調べ，核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた．

7.5 試験結果の判定基準

構造異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし，ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合（-gap）と含めた場合（+gap）で集計した．

被験物質の染色体異常誘発性の判定は，+gap の構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に5％未満を陰性（－），両方またはいずれかが5％以上10％未満を疑陽性（±），いずれか一方または両方が10％以上を陽性（＋）とした．

7.6 結果のまとめ

染色体構造異常をもつ細胞および倍数体の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度(%)を表示するとともに，用量依存性について図示した．また，結果が陽性の場合は D_{20} 値（分裂中期像の20％に異常を誘発させるために必要な被験物質濃度，mg/ml）を算出し，代表的な染色体異常像の写真を添付した．

8. 確認試験

染色体異常試験の結果，短時間処理法の S9 mix 共存下および非共存下において，判定は疑陽性であり，また，用量依存性が確認できなかった．このことから，再現性および用量依存性を確認するために，短時間処理法の S9 mix 共存下は1000，750，500 μg/ml，非共存下は2000，1500，1000 μg/ml のそれぞれ3濃度で確認試験を実施した．

処理方法等については，7項に準じた．

結　果

結果を表 1 ～ 9 および図 3 ～ 8 に示す.

染色体構造異常の出現頻度は，連続処理法の 48 時間処理の 1000，500 μg/ml においてそれぞれ 11.0，5.0 %を示した．また，短時間処理法の S9 mix 共存下の 1000 μg/ml では 5.0 %，S9 mix 非共存下の 2000 μg/ml では 7.0 %を示した．このため，短時間処理法の S9 mix 共存下は 1000，750，500 μg/ml，非共存下は 2000，1500，1000 μg/ml のそれぞれ 3 濃度で確認試験を実施した．その結果，S9 mix 非共存下の 2000，1500 μg/ml において構造異常の出現頻度はそれぞれ 68.6，8.5 %であった.

染色体異常試験において，1000 μg/ml 以上の全ての処理群で，被験物質処理開始時，培養液の色が黄変し，溶解していた被験物質が析出し，沈殿した.

被験物質処理開始時および処理終了時の細胞処理液の pH を測定した．その結果，構造異常細胞の誘発が見られた本試験における連続処理法の 48 時間処理の 1000，500 μg/ml および短時間処理法の S9 mix 非共存下の 1000 μg/ml，確認試験における S9 mix 非共存下の 1500, 2000 μg/ml においては，いずれの pH も 6.2 以上であった.

その他の処理条件では構造異常の出現頻度は 5 %未満であった．また，いずれの処理条件においても被験物質による数的異常細胞の出現頻度は 5 %未満であった.

本試験および確認試験の結果から算出した D_{20} 値は，連続処理法の 48 時間処理では 2.0 mg/ml，短時間処理法の S9 mix 非共存下では 1.2 mg/ml であった.

なお，陽性対照による染色体構造異常細胞の出現頻度は著しく増加した.

考 察 お よ び 結 論

m-トルイル酸の染色体異常誘発性を検討するため，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した．その結果，染色体構造異常細胞の出現頻度は連続処理法の 48 時間処理の 1000，500 μg/ml においてそれぞれ 11.0，5.0 %を示した．また，短時間処理法の S9 mix 共存下の 1000 μg/ml では 5.0 %，S9 mix 非共存下の 2000 μg/ml では 7.0 %を示した．このため短時間処理法における結果の再現性および用量依存性

を確認するために，短時間処理法の S9 mix 共存下は 1000，750，500 μg/ml，非共存下は 2000，1500，1000 μg/ml のそれぞれ 3 濃度で確認試験を実施した．その結果，S9 mix 非共存下の 2000，1500 μg/ml において構造異常の出現頻度はそれぞれ 68.6，8.5 %であった．その他の処理条件では 5 %未満であった．数的異常細胞の出現頻度は，連続処理法および短時間処理法のいずれも 5 %未満であった．

連続処理法の 48 時間処理および短時間処理法の S9 mix 非共存下においては被験物質処理開始時および終了時の細胞処理液の pH が 6.2 以上の処理群で 5 %以上の染色体構造異常細胞が認められた．この結果から，この構造異常誘発は低 pH 条件によって引き起こされたものではなく，被験物質の持つ染色体異常誘発性によるものであると考えられた[2]．

一方，陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は期待通りの値を示し，本試験が技術的に成立していることが示された．

従って，*m*-トルイル酸の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した．

なお，類似化合物の染色体異常誘発性に関する情報は添付資料 1 にまとめた．

参 考 文 献

1) 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会：“化学物質による染色体異常アトラス” 朝倉書店，東京，1988

2) T. Morita et. al. “Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells” Mutation Research, *240*, 195-202, 1990

表1　染色体異常試験結果（連続処理法）［本試験］

被験物質名：　m-トルイル酸

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	数的異常細胞の出現数と出現頻度 (%)	判2)定	染色体構造異常細胞 1)の出現数と出現頻度 (%) ギャップ gap	染色分体型 ctb	染色分体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	frg	合計 -gap	合計 +gap	判2)定
溶媒 [DMSO]	24	0	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
	48	0	100	0	−	0	1	1	0	0	0	2	2	−
			100	0		0	0	2	1	0	0	3	3	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	5 (2.5)	
被験物質	24	250	100	0	−	0	1	0	0	0	0	1	1	−
			100	0		0	1	0	1	0	0	2	2	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	
		500	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	2	1	1	0	0	3	3	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	
		1000◇☆	100	0	−	0	3	1	0	0	0	4	4	−
			100	0		0	3	0	0	0	0	3	3	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	6 (3.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (3.5)	7 (3.5)	
		2000◇☆	TOX											
	48	62.5	100	0	−	0	0	0	0	1	0	1	1	−
			100	0		0	0	0	0	1	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	
		125	100	0	−	0	0	0	0	1	0	1	1	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
		250	100	0	−	0	0	1	0	0	0	1	1	−
			100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	
		500	100	0	−	0	3	3	0	0	0	5	5	±
			100	0		0	4	0	1	0	0	5	5	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	7 (3.5)	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (5.0)	10 (5.0)	
		1000◇☆	TOX											
			100	0	−	0	5	6	0	0	0	11	11	+
			100	0 (0.0)		0 (0.0)	5 (5.0)	6 (6.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (11.0)	11 (11.0)	
陽性対照 [MMC]	24	0.03	100	0	−	0	11	16	0	0	0	25	25	+
			100	0		0	2	12	0	0	0	14	14	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	13 (6.5)	28 (14.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	39 (19.5)	39 (19.5)	
	48	0.03	100	0	−	0	16	39	4	2	0	53	53	+
			100	1		2	16	39	0	0	1	53	54	
			200	1 (0.5)		2 (1.0)	32 (16.0)	78 (39.0)	4 (2.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	106 (53.0)	107 (53.5)	

1）　gap：染色分体型または染色体型のギャップ，ctb：染色分体型切断，cte：染色分体型交換，csb：染色体型切断，cse：染色体型交換，frg：断片化
2）　判定は，+gapの構造異常細胞または数的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(±)，10%以上を陽性（＋）とした．
DMSO：ジメチルスルホキシド　　MMC：マイトマイシンC
◇：被験物質処理開始時，溶解していた被験物質が析出し，培養液中に沈殿した．
☆：被験物質処理開始時，培養液の色が黄変した．

表２　染色体異常試験結果（短時間処理法）［本試験］

被験物質名：　m-トルイル酸

処理	S9 mix の有無	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	数的異常細胞の出現数と出現頻度 (%)	判2)定	染色体構造異常細胞 1)の出現数と出現頻度 (%) ギャップ gap	染色分体型 ctb	染色分体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	frg	合計 -gap	合計 +gap	判2)定
溶媒 [DMSO]	−	0	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	0	0	2	1	0	3	3	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	
	+	0	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
被験物質	−	250	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
		500	100	1	−	2	0	0	0	2	0	2	4	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1 (0.5)		2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	4 (2.0)	
		1000◇☆	100	3	−	0	1	0	0	0	0	1	1	−
			100	0		0	1	0	1	0	0	2	2	
			200	3 (1.5)		0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	
		2000◇☆		TOX	−									±
			100	0		0	4	6	0	0	0	7	7	
			100	0 (0.0)		0 (0.0)	4 (4.0)	6 (6.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (7.0)	7 (7.0)	
	+	250	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		1	0	0	0	0	0	0	1	
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	
		500	100	0	−	0	0	1	0	0	0	1	1	−
			100	0		1	0	0	0	1	0	1	2	
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)	
		1000◇☆	100	0	−	0	2	6	0	0	0	6	6	±
			100	2		0	1	4	0	0	0	4	4	
			200	2 (1.0)		0 (0.0)	3 (1.5)	10 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (5.0)	10 (5.0)	
		2000◇☆		TOX										
陽性対照 [BP]	−	20	100	0	−	0	0	1	1	0	0	2	2	−
			100	0		0	1	0	0	0	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	
	+	20	100	0	−	2	9	76	0	0	0	79	80	+
			100	0		1	8	83	2	0	0	85	85	
			200	0 (0.0)		3 (1.5)	17 (8.5)	159 (79.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	164 (82.0)	165 (82.5)	

1）　gap：染色分体型または染色体型のギャップ，ctb：染色分体型切断，cte：染色分体型交換，csb：染色体型切断，cse：染色体型交換，frg：断片化
2）　判定は，+gapの構造異常細胞または数的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(±)，10%以上を陽性（＋）とした．
Ｓ９の用量（５％），被験物質処理時間（６ｈ），被験物質処理後の細胞回復時間（１８ｈ）
DMSO：ジメチルスルホキシド　　BP：ベンゾ[a]ピレン
◇：被験物質処理開始時，溶解していた被験物質が析出し，培養液中に沈殿した．
☆：被験物質処理開始時，培養液の色が黄変した．

表３　染色体異常試験結果（確認試験）［確認試験］

被験物質名：　m-トルイル酸

処理	S9 mix の有無	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	数的異常細胞の出現数と出現頻度 (%)	判2)定	染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%) ギャップ gap	染色分体型 ctb	染色分体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	frg	合計 -gap	合計 +gap	判2)定
溶媒 [DMSO]	−	0	100	0	−	1	0	0	0	1	0	1	2	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	
	+	0	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	1		0	1	0	0	0	0	1	1	
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
被験物質	−	1000◇	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	0	0	1	0	0	1	1	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
		1500◇☆	100	0	−	0	2	9	0	0	0	9	9	±
			100	0		0	4	5	0	0	0	8	8	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	6 (3.0)	14 (7.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (8.5)	17 (8.5)	
		2000◇☆	72	0	−	4	16	41	0	1	2	48	50	+
			100	0		2	24	61	0	0	0	68	68	
			172	0 (0.0)		6 (3.5)	40 (23.3)	102 (59.3)	0 (0.0)	1 (0.6)	2 (1.2)	116 (67.4)	118 (68.6)	
	+	500	100	1	−	0	0	0	0	1	0	1	1	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
		750◇	100	0	−	0	1	1	0	0	0	1	1	−
			100	1		0	0	1	0	0	0	1	1	
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	
		1000◇☆	100	0	−	1	2	6	0	0	0	6	6	−
			100	1		0	1	1	0	1	0	3	3	
			200	1 (0.5)		1 (0.5)	3 (1.5)	7 (3.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	9 (4.5)	9 (4.5)	
陽性対照 [BP]	−	20	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−
			100	0		0	0	0	2	0	0	2	2	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	
	+	20	100	0	−	1	12	82	0	1	0	86	86	+
			100	0		0	10	79	0	2	0	81	81	
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	22 (11.0)	161 (80.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	167 (83.5)	167 (83.5)	

1）　gap：染色分体型または染色体型のギャップ，ctb：染色分体型切断，cte：染色分体型交換，csb：染色体型切断，cse：染色体型交換，frg：断片化
2）　判定は，+gapの構造異常細胞または数的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(±)，10%以上を陽性（+）とした．
Ｓ９の用量（５%），被験物質処理時間（６ｈ），被験物質処理後の細胞回復時間（１８ｈ）
DMSO：ジメチルスルホキシド　　BP：ベンゾ[a]ピレン
◇：被験物質処理開始時，溶解していた被験物質が析出し，培養液中に沈殿した．
☆：被験物質処理開始時，培養液の色が黄変した．

表 4　被験物質調製液および細胞処理液の pH 測定結果　[細胞増殖抑制試験]

1.被験物質調製液

(1) 連続処理法，短時間処理法

濃度 (μg/ml)	DMSO	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500
pH	10.7	8.4	7.4	6.8	6.5	5.6	4.8	3.7

2.細胞処理液

(1) 連続処理法　24 時間処理

濃度 (μg/ml)		DMSO	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500
pH	処理開始時	7.7	7.6	7.6	7.6	7.4	7.1	6.7	6.6
	24 時間処理終了時	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.3	7.0	5.1

(2) 連続処理法　48 時間処理

濃度 (μg/ml)		DMSO	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500
pH	処理開始時	7.7	7.6	7.6	7.6	7.4	7.1	6.7	6.6
	48 時間処理終了時	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.2	6.9	5.0

(3) 短時間処理法　S9 mix 非共存下

濃度 (μg/ml)		DMSO	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500
pH	処理開始時	7.9	7.9	7.9	7.9	7.7	7.5	6.9	6.9
	処理終了時	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.4	7.1	5.2

(4) 短時間処理法　S9 mix 共存下

濃度 (μg/ml)		DMSO	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500
pH	処理開始時	7.8	7.7	7.7	7.7	7.5	7.2	6.7	6.6
	処理終了時	7.2	7.2	7.2	7.2	7.0	7.0	6.5	5.0

表 5　被験物質調製液および細胞処理液の pH 測定結果　[本試験]

1.被験物質調製液

濃度(μg/ml)	DMSO	62.5	125	250	500	1000	2000
pH	8.7	5.8	5.4	5.8	5.2	4.9	4.1

2.細胞処理液

(1)連続処理法　24時間処理

濃度(μg/ml)		DMSO	250	500	1000	2000
pH	処理開始時	7.7	7.5	7.3	6.7	6.8
	24 時間処理終了時	7.2	7.3	7.1	7.0	5.9

(2)連続処理法　48時間処理

濃度(μg/ml)		DMSO	62.5	125	250	500	1000
pH	処理開始時	7.7	7.7	7.5	7.5	7.3	6.7
	48 時間処理終了時	7.4	7.3	7.2	7.2	7.1	7.0

(3)短時間処理法　S9 mix 非共存下

濃度(μg/ml)		DMSO	250	500	1000	2000
pH	処理開始時	7.8	7.6	7.3	7.0	6.9
	処理終了時	7.3	7.3	7.2	7.0	6.0

(4)短時間処理法　S9 mix 共存下

濃度(μg/ml)		DMSO	250	500	1000	2000
pH	処理開始時	7.5	7.2	7.2	6.6	6.6
	処理終了時	6.9	6.9	6.8	6.4	5.3

表 6　被験物質調製液および細胞処理液の pH 測定結果　[確認試験]

1.被験物質調製液

濃度 (μg/ml)	DMSO	500	750	1000	1500	2000
pH	10.8	6.2	5.5	5.2	4.9	4.4

2.細胞処理液

(1) 短時間処理法　S9 mix 非共存下

濃度 (μg/ml)		DMSO	1000	1500	2000
pH	処理開始時	8.3	7.4	7.3	7.0
	24 時間処理終了時	7.4	7.2	7.0	6.2

(2) 短時間処理法　S9 mix 共存下

濃度 (μg/ml)		DMSO	500	750	1000
pH	処理開始時	7.9	7.4	7.1	7.0
	48 時間処理終了時	7.1	7.0	6.8	6.6

表７　分裂指数（連続処理法）［本試験］

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	分裂中期細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (DMSO)	24	0	2000	118	5.9	100
m-トルイル酸	24	250	2000	51	2.6	43
	24	500	2000	43	2.2	36
	24	1000	2000	74	3.7	63
	24	2000	2000	0	0.0	0
陽性対照 (MMC)	24	0.03	2000	47	2.4	40
陰性対照 (DMSO)	48	0	2000	97	4.9	100
m-トルイル酸	48	62.5	2000	110	5.5	113
	48	125	2000	69	3.5	71
	48	250	2000	120	6.0	124
	48	500	2000	45	2.3	46
	48	1000	2000	48	2.4	49
陽性対照 (MMC)	48	0.03	2000	75	3.8	77

DMSO：ジメチルスルホキシド
MMC：マイトマイシンC

表８　分裂指数（短時間処理法）［本試験］

処理	S9 mix の有無	処理濃度（μg/ml）	観察細胞数	分裂中期細胞数	分裂指数（%）	分裂活性（%）
陰性対照（DMSO）	－	0	2000	94	4.7	100
m-ﾄﾙｲﾙ酸	－	250	2000	73	3.7	78
	－	500	2000	92	4.6	98
	－	1000	2000	98	4.9	104
	－	2000	2000	40	2.0	43
陽性対照（BP）	－	20	2000	146	7.3	155
陰性対照（DMSO）	＋	0	2000	129	6.5	100
m-ﾄﾙｲﾙ酸	＋	250	2000	130	6.5	101
	＋	500	2000	187	9.4	145
	＋	1000	2000	57	2.9	44
	＋	2000	1058	28	2.6	41
陽性対照（BP）	＋	20	2000	27	1.4	21

DMSO：ジメチルスルホキシド
BP：ベンゾ[a]ピレン

表９　分裂指数（短時間処理法）［確認試験］

処理	S9 mix の有無	処理濃度（μg/ml）	観察細胞数	分裂中期細胞数	分裂指数（%）	分裂活性（%）
陰性対照（DMSO）	－	0	2000	103	5.2	100
m-トルイル酸	－	1000	2000	133	6.7	129
	－	1500	2000	95	4.8	92
	－	2000	2000	15	0.8	15
陽性対照（BP）	－	20	2000	104	5.2	101
陰性対照（DMSO）	＋	0	2000	171	8.6	100
m-トルイル酸	＋	500	2000	132	6.6	77
	＋	750	2000	116	5.8	68
	＋	1000	2000	65	3.3	38
陽性対照（BP）	＋	20	2000	18	0.9	11

DMSO：ジメチルスルホキシド
BP：ベンゾ[a]ピレン

図１　m-トルイル酸の細胞毒性(連続処理法)

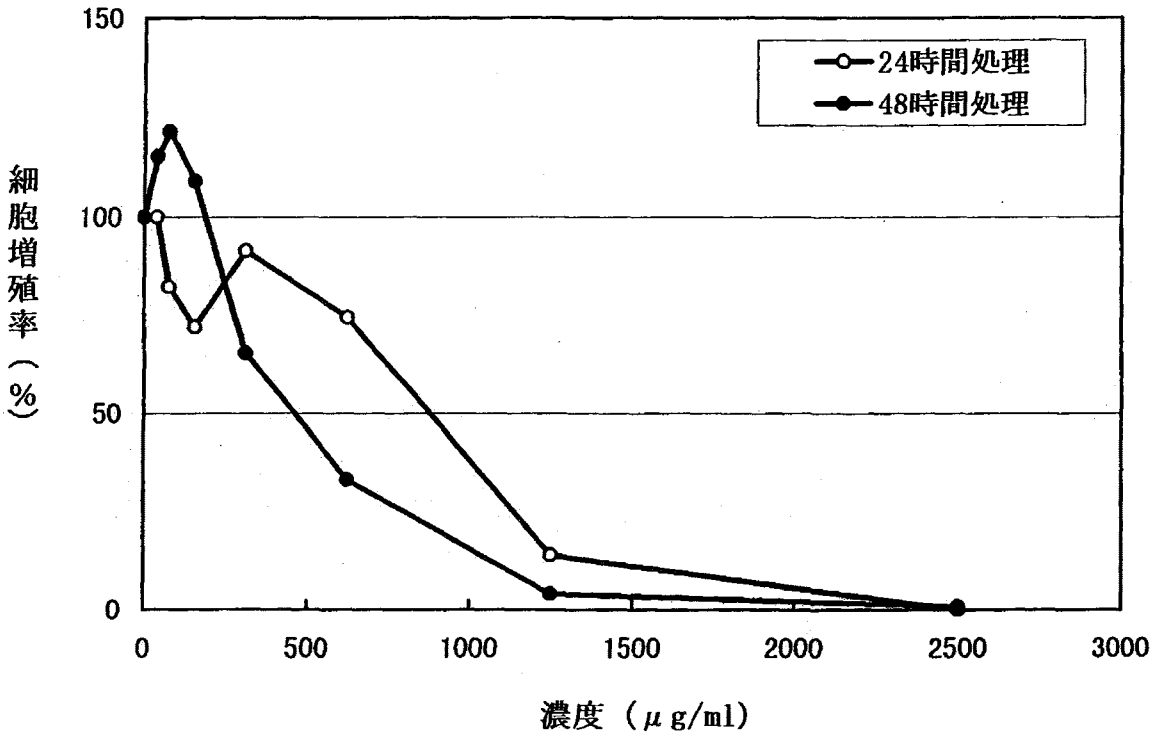


図２　m-トルイル酸の細胞毒性(短時間処理法)
(6時間処理，18時間回復)

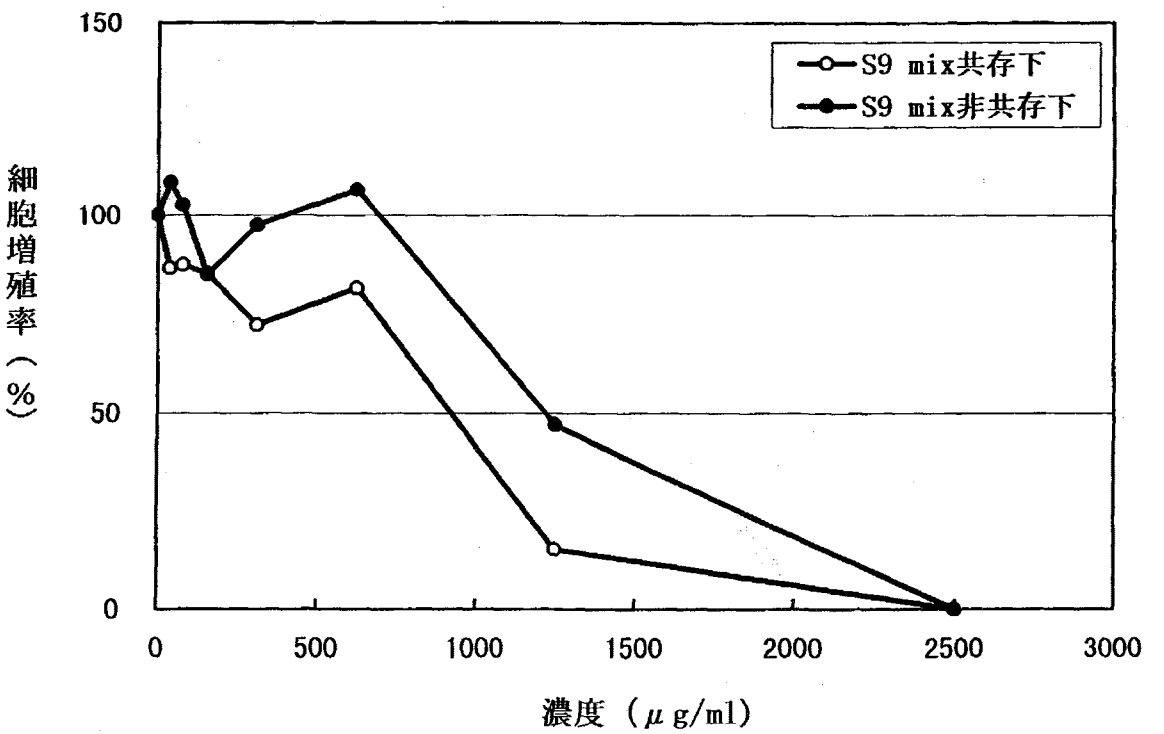


図３　m-トルイル酸の構造異常細胞出現頻度［本試験］
(連続処理法)

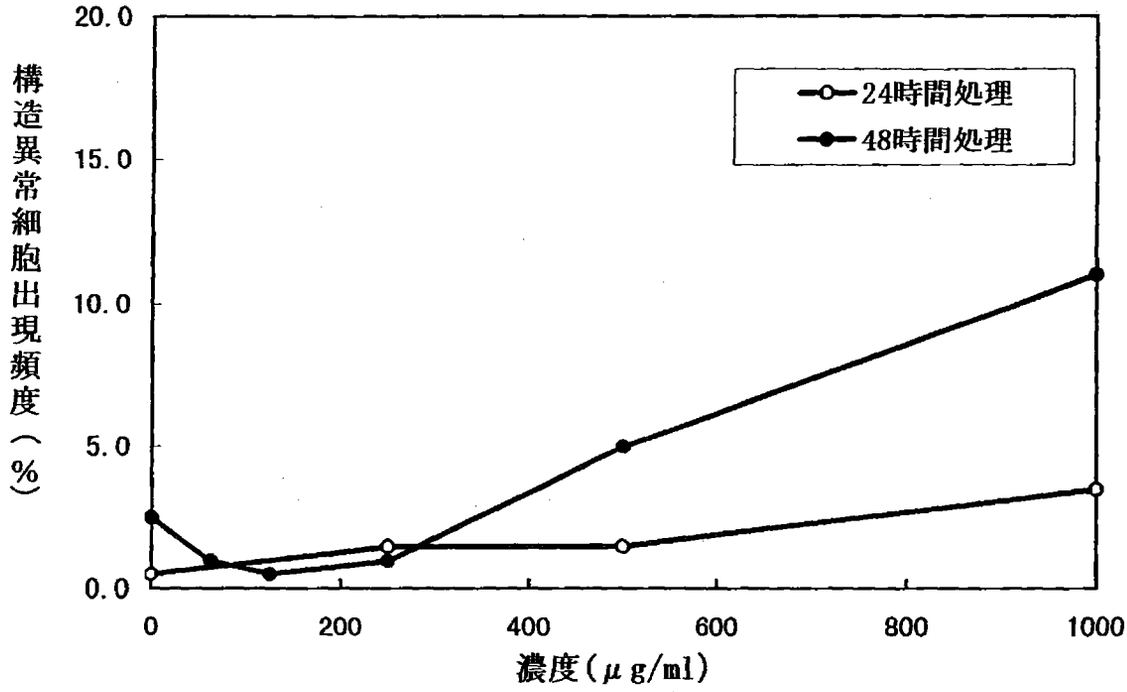


図４　m-トルイル酸の構造異常細胞出現頻度［本試験］
(短時間処理法)

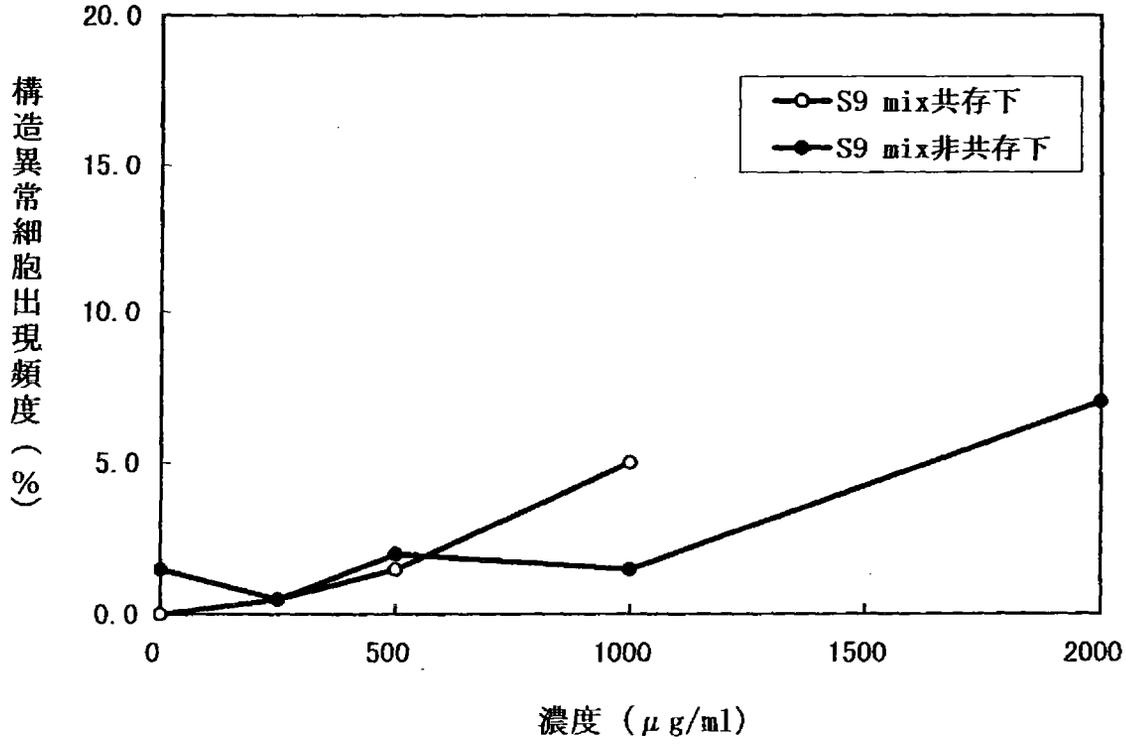


図５　m-トルイル酸の数的異常細胞出現頻度［本試験］
（連続処理法）

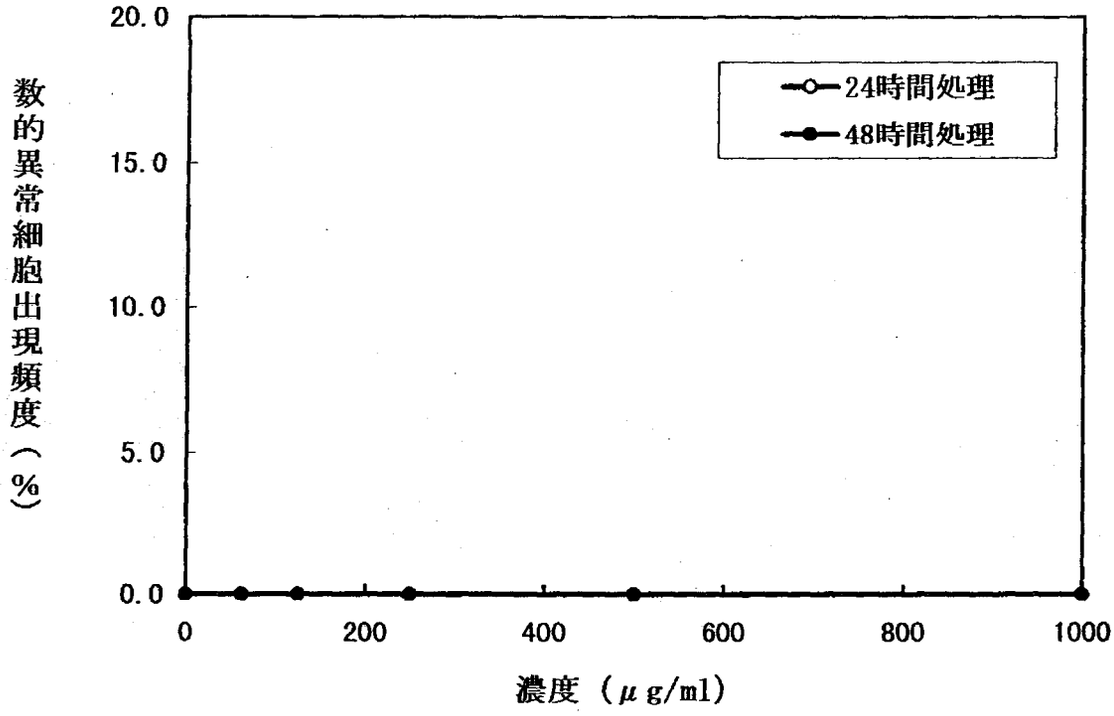


図６　m-トルイル酸の数的異常細胞出現頻度［本試験］
（短時間処理法）

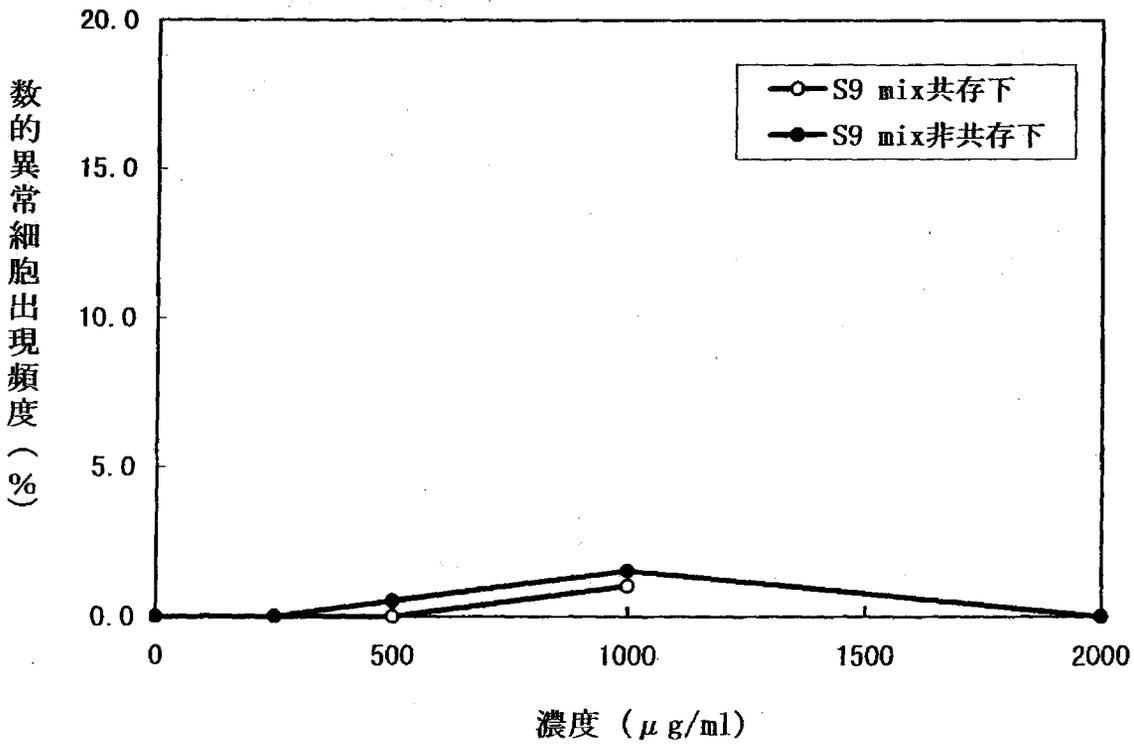


図７　m-トルイル酸の構造異常細胞出現頻度［確認試験］
(短時間処理法)

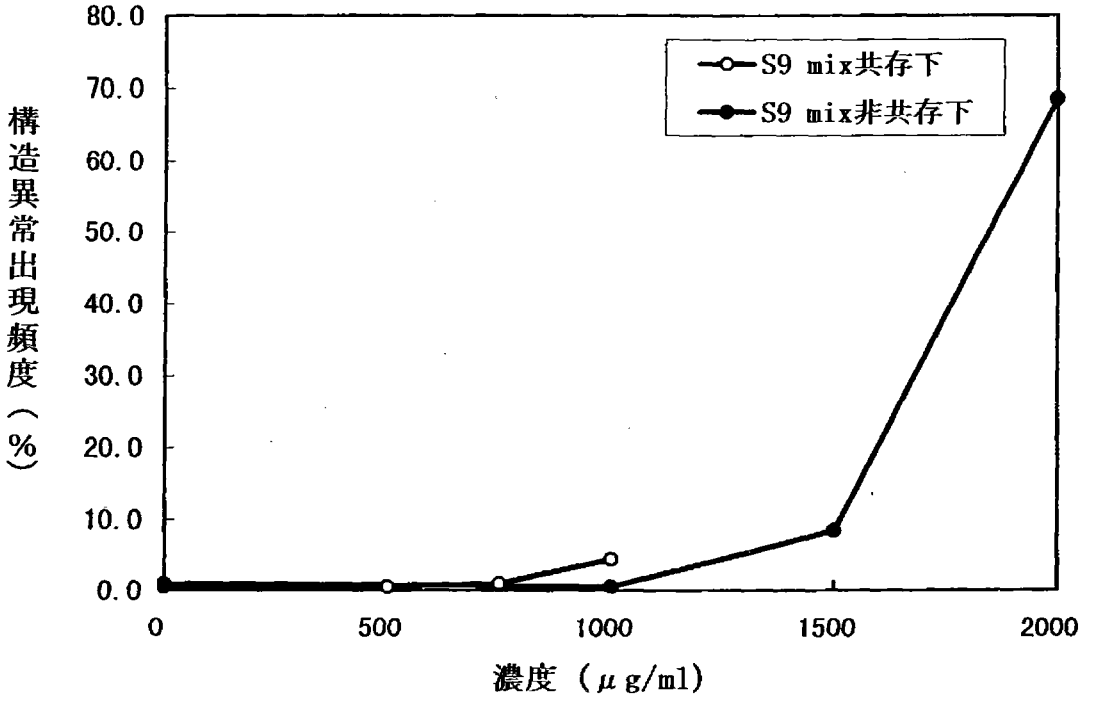
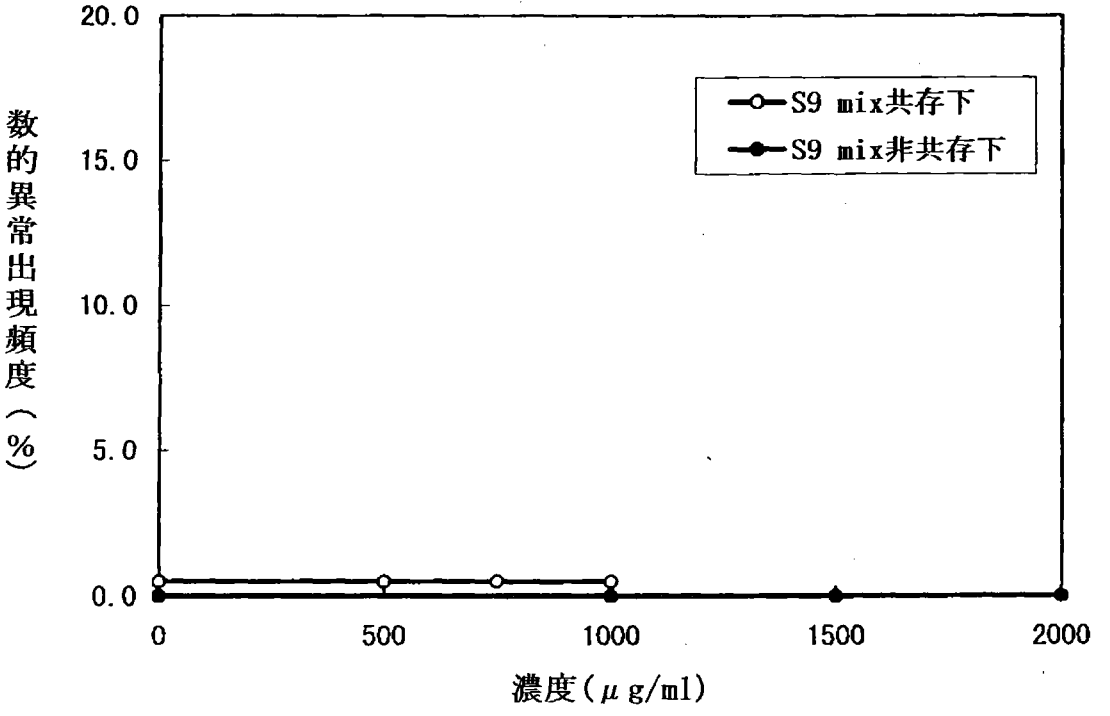



図８　m-トルイル酸の数的異常細胞出現頻度［確認試験］
(短時間処理法)