



4-ヒドロキシ安息香酸の  
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を  
用いる染色体異常試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人 食品薬品安全センター  
秦野研究所

# [目 次]

	頁
要約 -----	1
緒言 -----	2
材料と方法 -----	3
1 細胞 -----	3
2 被験物質および陽性対照物質 -----	3
3 S9 反応液 -----	3
4 細胞増殖抑制試験 -----	4
5 染色体異常試験 -----	4
6 染色体分析 -----	5
7 小核標本作製（確認試験） -----	6
8 小核の観察および小核の判定基準 -----	6
9 染色体異常試験 ( <i>in vitro</i> 小核試験の確認試験) -----	7
10 最終判定 -----	7
結果 -----	7
参考文献 -----	8

Fig. 1

Tables 1~4

## [要 約]

4-ヒドロキシ安息香酸 (HBA) は、CHL/IU 細胞 (チャイニーズ・ハムスター、肺) に染色体異常を誘発しなかった。

HBA の CHL/IU 細胞に対する 50%増殖抑制濃度は、連続処理 (新鮮培地中で 24時間処理)、短時間処理の S9 mix 存在下 (S9 反応液中で 6時間処理後 18時間の回復時間) および非存在下 (S9 反応液の代わりに MEM 培地を使用) で 1.2 mg/mL であった。

このことから染色体異常試験において、連続処理 (24時間および 48時間処理) および短時間処理 (S9 mix 存在下および非存在下) とともに 1.4 mg/mL (10 mM) を最高処理濃度とし、公比 2 で各濃度を設定した。染色体分析は、全ての系列で 0.70 mg/mL の濃度を含む 3濃度群を観察対象とした。

HBA による染色体の構造異常は、連続処理および S9 mix 存在下で短時間処理した場合において有意に増加した (24 時間連続処理の 0.70 mg/mL : 30.5%、48 時間連続処理の 0.70 mg/mL : 19.5%、S9 mix 存在下で短時間処理の 0.70 mg/mL : 28.2%、 $p < 0.05$ )。一方、48時間連続処理における 0.70 mg/mL の濃度において、倍数性細胞が有意に増加した (12.62%、 $p < 0.05$ )。HBA を培養液に添加すると、培養液が黄色化することから、本物質の染色体異常誘発に関しては、培養液の酸性化による可能性と、HBA 自身の DNA 傷害作用による 2つの可能性が考えられた。

このため、染色体異常と倍数性染色体が有意に増加した48時間連続処理群について、被験物質溶液の pH を調整し、*in vitro*小核試験および染色体異常試験による確認試験を実施したところ、小核および染色体異常の誘発は認められなかった。従って、4-ヒドロキシ安息香酸処理によって誘発された染色体異常は、それ自身の DNA への傷害作用よりも、培養液の酸性化によって、二次的に生じることが示唆された。

## [ 緒 言 ]

化学物質の遺伝毒性を評価するための短期検索法の一つとして、哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験がある。化学物質によって誘発される染色体異常には、大別して構造異常（ギャップ、切断、交換）と数的異常（倍数性細胞、異数性細胞）があり、前者はDNA傷害、後者は細胞の分裂機構の異常などを反映している。本試験で用いたCHL/IU細胞は、染色体数が少なく、一般的に化学物質に対して染色体異常の検出感度が高いため、染色体異常試験によく用いられる。

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、HBA の細胞遺伝学的影響を評価するため、CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。なお本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和 62 年 3 月 31 日、環保業第 237 号、薬発第 306 号、62 基局第 303 号）および「OECD 毒性試験ガイドライン：473」に準拠し、「化学物質 GLP 基準」（昭和 59 年 3 月 31 日、環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号、改訂昭和 63 年 11 月 18 日、環企研第 233 号、衛生第 38 号、63 基局第 823 号）に基づいて実施した。

## [材料と方法]

### 1 細胞

CHL/IU 細胞 (JCRB 細胞バンクより入手) は、牛胎児血清 (Cansera International、ロット番号: 2605420 および Filtron、ロット番号: 55301) を 10% 含むイーグル MEM 培地 (日水製薬) を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>、37°C) 内で培養した。また、解凍後継代 10 代以内で試験に用いた (親株の継代数は、1988 年 2 月に入手した時点で 4 代、現在は 12 代)。

### 2 被験物質および陽性対照物質

被験物質である HBA (CAS No. 99-96-7) の物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。

HBA は から提供された後、室温で保管し、使用のつどジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業、ロット番号: ESJ4625 および DLJ5663) に溶解して希釈した。

陽性対照物質として用いたシクロホスファミド (CPA、Sigma Chemical、ロット番号: 73H0846) およびマイトマイシン C (MC、協和醗酵工業、ロット番号: 051AEG および 118AFG) は、注射用蒸留水 (大塚製薬工場、ロット番号: K5H71、K6I94 および K7A89) に溶かし、用時調製して用いた。

### 3 S9 反応液

S9 (キッコーマン、ロット番号: RAA-333、1995 年 9 月製造) は、7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットにフェノバルビタールと 5, 6-ベンゾフラボンを投与して肝臓から調製したものを購入し、使用時まで -80°C に保管した。グルコース 6-リン酸 (G-6-P、Sigma Chemical)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (酸化型、β-NADP<sup>+</sup>、オリエンタル酵母) および KCl を蒸留水に溶かし、混合液として -80°C に保管し、使用時はこれに S9、MgCl<sub>2</sub> および HEPES を加え、S9 mix とした。S9 mix 存在下で短時間処理する場合、S9 mix、2 倍濃度 MEM 培地 (血清不含で S9 mix と等量) および MEM 培地 (血清不含) を混和した S9 反応液をディッシュに加えた (5% S9、0.83 mM G-6-P、0.67 mM β-NADP<sup>+</sup>、0.83 mM MgCl<sub>2</sub>、5.5 mM KCl、0.67 mM HEPES)。一方、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合は、S9 反応液の代わりに MEM 培地を使用した。

#### 4 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖におよぼす影響を調べた。CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシンを用いて単離した後、 $4 \times 10^3$  個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL ( $2 \times 10^4$  個) をプラスチックディッシュ (直径 6 cm、Corning) に播種して 3 日間培養した。

連続処理では、新鮮培地 5 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 25  $\mu$ L ずつ添加し 24 時間処理した。

S9 mix 存在下における短時間処理では、S9 反応液 3 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 15  $\mu$ L ずつ添加し 6 時間処理した。リン酸緩衝塩類溶液 ( $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  を含む) で洗浄後、新鮮培地 5 mL に交換し、さらに 18 時間培養した。一方、S9 mix 非存在下の処理群においては、S9 反応液の代わりに MEM 培地を用いた以外の操作は、S9 mix 存在下の処理群と同様に行った。

連続および短時間処理ともに、0.044 ~ 1.4 mg/mL (10 mM) の濃度範囲で処理した。培養終了後、10%ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計 (Monocellater™、オリンパス光学工業) を用い、溶媒対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。1 濃度あたり 2 枚のディッシュを用いた。

#### 5 染色体異常試験

HBA は細胞増殖抑制試験の連続および短時間処理において、処理濃度に依存して CHL/IU 細胞の増殖を抑制した (Fig. 1)。また、50%増殖抑制濃度は、連続処理、短時間処理の S9 mix 存在下および非存在下で 1.2 mg/mL であった。

このことから染色体異常試験において、全ての処理方法で 1.4 mg/mL (10 mM) を最高処理濃度とし、公比 2 で各濃度を設定した (0.18、0.35、0.70、1.4 mg/mL)。

染色体異常試験においては 1 濃度あたり 4 枚のディッシュを用い、そのうちの 2 枚は染色体標本作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。連続処理では 24 時間と 48 時間の被験物質処理群に溶媒対照群と陽性対照群および無処理対照群 (新鮮培地と交換) を設け、短時間処理では、被験物質を S9 mix 存在下と非存在下で 6 時間処理した。なお、処理群の他、溶媒対照群、陽性対照群および無処理対照群を設けた。処理群に関しては、被験物質

を培地に添加すると黄色に変化することから、処理直後と処理終了後に培地の pH 測定を行った。

陽性対照群については、MC を新鮮培地 5 mL に最終濃度が 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加し、または CPA を S9 反応液および MEM 培地 3 mL に最終濃度が 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した。

染色体標本作製のディッシュについては培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した。培養終了後、培地を除き、0.02% EDTA 含有リン酸緩衝塩類溶液 ( $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  を含まない) により細胞をはがし、10 mL の遠沈管に集め遠沈した (1000 ~ 1200 rpm、5 分)。上清を捨てた後、沈殿した細胞に 0.075 M KCl 水溶液 3 mL を加え、30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール : 氷酢酸 = 3 : 1 v/v) を 6 mL を加え遠沈した後、上清を除き、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。固定液の交換を数回行った後、少量の固定液で細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス (あらかじめフロスト部分に試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入) 上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 6 枚のスライド標本作製した。

3% ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 M リン酸緩衝液で希釈調製) でスライド標本を染色後、蒸留水ですすいで風乾した。試験計画番号および標本作製の日付を明示したスライドケースに、スライド標本をコード番号順に入れて保存した。

染色体分析に先立って、細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、観察対象とする 3 濃度群を決定した。20% 以上の相対増殖率で、かつ 2 ディッシュともに 0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度を、観察対象の最高濃度群とした。

## 6 染色体分析

細胞増殖率の測定結果 (Table 1、2) と分裂指数により、全ての処理方法で 0.70 mg/mL が、染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む 3 濃度群を観察対象とした。

染色体分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験 (MMS) 研究会<sup>1)</sup> による分類法に基づいて行った。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を観察した。各群ごとに、観察細胞数、染色体型および染色分体型の構造異常の種類と数、倍数性細胞の数を

記録用紙に記入した。また、異常を有する細胞は、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で表し、記録用紙に記録した。ディッシュ 1枚から得られたスライド標本 4枚を、各試験 4人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。構造異常は 1群 200個、倍数性細胞は 1群 800個の分裂中期細胞を分析した。

溶媒の背景データ (Appendix 2) と被験物質処理群間で、フィッシャーの直接確率法<sup>2)</sup>により、familywise の有意水準を 5%として有意差検定を実施した。直接確率法で有意差がある場合、用量依存性の有無をコクラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup> ( $p < 0.05$ ) により判定した。両検定でともに有意差が認められた場合を陽性とし、直接確率法でのみ有意差が認められた場合は疑陽性とした。

#### 7 小核標本作製 (確認試験)

48時間連続処理群においては、確認試験として *in vitro* 小核試験を行った。実験操作は、標本作製方法および被験物質処理方法以外、染色体異常試験と同様に実施した。

被験物質処理は、被験物質調製液を 1.4 mg/mL (10 mM) の濃度となるように加えた培養液 (1N NaOH 水溶液で pH 7.35 に調製) を新鮮培地で順次希釈し、ディッシュに加えることにより行った。細胞を剥離し、遠心して得られた細胞に 3 mL の 0.15 M KCl を加えてピペティングし、約20分間低張処理をした。その後、メタノール・酢酸 (5:1) の固定液を細胞懸濁液に加え、細胞を固定した。遠心して固定液を捨て、再び固定液を 10 mL 加えてピペティングし、遠心した。固定液を捨て、少量の固定液を加えて細胞を懸濁後、スライド上に一滴滴下して風乾した。染色は、水で調整した 40  $\mu$ g/mL のアクリジンオレンジ溶液をスライド上に数滴落とし、カバーグラスをかけた。

#### 8 小核の観察および小核の判定基準

観察は蛍光顕微鏡を用いて行い、細胞質を含み細胞質周辺の明瞭な間期細胞1000個/群について観察し、小核を持った細胞を算定した。小核の判定は通常の基準に従った<sup>4)</sup>。なお、小核は以下のようにタイプ分けを行った。

Type 1 : 顕微鏡下でようやく確認できるほどの小さな小核

Type 2 : 典型的な小核 (主核の1/3以下の直径を有するもの)



Type 3：大きな小核（主核の1/3を超える直径を有するもの）

Multi：multiple micronuclei（4個以上の小核を有するもの）

Polynuclei：多核（1細胞あたり2つ以上の核を有するもの）

小核試験では、溶媒対照群と被験物質処理群間で小核のタイプ毎にフィッシャーの直接確率法（ $p < 0.05$ ）により、有意差検定を行った。小核誘発性の判定は、生物学的な観点からの判断を加味して行った。

#### 9 染色体異常試験（*in vitro*小核試験の確認試験）

48時間連続処理群では、前述の小核試験に加え、染色体異常試験による追加試験を実施した。実験操作、染色体分析および判定については、先に実施した染色体異常試験と同様に行った。但し、被験物質処理方法については、前述の小核試験と同様に行った（最高処理濃度の培地で pH 7.50 に調製）。確認試験では、1.4 mg/mL（10 mM）の濃度においても細胞増殖抑制は認められず、染色体分析はこの濃度を含む3濃度で行った。

#### 10 最終判定

本被験物質の染色体異常誘発性の最終判定は、染色体異常試験と2回の確認試験（*in vitro*小核試験および染色体異常試験）を基に、再現性等を検討して行った。

### [結 果]

短時間処理の S9 mix 非存在下において、HBA は染色体の構造異常を誘発しなかった（Table 2）。しかし、連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下において、染色体の構造異常が有意に増加し（24時間処理の 0.70 mg/mL：30.5%、48時間処理の 0.70 mg/mL：19.5%、短時間処理の S9 mix 存在下の 0.70 mg/mL：28.2%、 $p < 0.05$ ）、傾向性検定でも有意差が認められた（ $p < 0.05$ 、Table 1、2）。また、倍数性細胞については、48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下において有意に増加し（48時間連続処理の 0.70 mg/mL：12.62%、 $p < 0.05$ 、短時間処理 S9 mix 存在下の 0.18 mg/mL と 0.70 mg/mL：1.13% と 1.18%、 $p < 0.05$ ）、傾向性検定では 48時間連続処理群において有意差が認められた（ $p$

<0.05、Table 1)。HBA を培養液に添加すると培養液が黄色に変化したため、処理直後と処理終了時の培養液の pH 測定を同時に実施した。その結果、観察対照の最高濃度 (0.70 mg/mL) において、処理直後および処理終了後の pH (2ディッシュの平均値) が、24時間連続処理ではそれぞれ 6.11 および 6.63 (48時間処理後は 6.72)、短時間処理の S9 mix 存在下ではそれぞれ 5.83 および 6.21 となった。一方、染色体異常が認められなかった短時間処理の S9 mix 非存在下では、培養液の pH が同様にそれぞれ 6.06 および 6.92 となり、処理終了後の pH は S9 mix 存在下の場合と比べて高かった。従って、本試験で誘発された染色体の構造異常に関しては、HBA 添加による培養液の酸性化による可能性<sup>5)</sup> と、HBA それ自身による DNA 傷害作用に起因する場合の 2通りが考えられた。

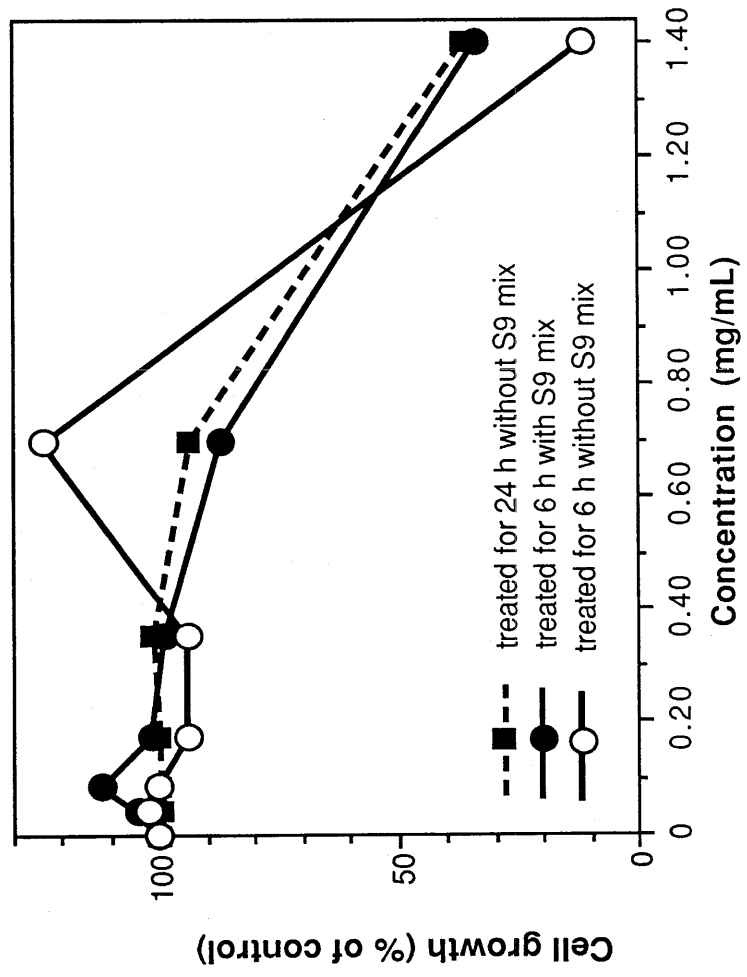
このため、染色体の構造異常と倍数性細胞が有意に増加した48時間連続処理群について、被験物質添加後の培養液の pH を調整後、*in vitro*小核試験および染色体異常試験を追加試験として実施した。その結果、Table 3 に示すように最高濃度 (1.4 mg/mL: 10mM) においてのみ小核 (Type 2) の有意な増加が認められたが、出現頻度は 1.9% と低く、また Type 2 以外の異常の増加は認められなかった。一方、染色体異常試験の追加試験 (Table 4) においても、染色体の有意な増加は認められなかった。これらの結果より、4-ヒドロキシ安息香酸処理によって観察された染色体異常は、それ自身の DNA 傷害作用に基づくものではなく、培養液の酸性化によって生じた二次的な作用によることが示唆された。

本試験および追加試験において陽性対照物質として用いた MC は、連続処理において染色体の構造異常を誘発し (Table 1、4)、CPA は、短時間処理の S9 mix 存在下において染色体の構造異常を誘発した (Table 2)。また、追加試験として実施した *in vitro*小核試験においても、MC は Type 2 の小核を誘発した (Table 3)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

#### [参考文献]

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」, 朝倉書店, 東京 (1988)
- 2) 吉村 功編:「毒性・薬効データの統計解析、事例研究によるアプローチ」, サイエンス社, 東京 (1987)

- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編集: 「毒性試験講座 14、毒性試験データの統計解析」, 地人書館, 東京 (1992)
- 4) 日本組織培養学会編: 培養細胞小核試験「トキシコロジー試験法」, 朝倉書店, 東京 (1991)
- 5) Morita, T. *et al.*: Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, pp 297 - 305 (1992)



**Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-hydroxybenzoic acid**

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4-hydroxybenzoic acid (HBA)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of structural aberrations										No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent cytotoxicity (%) <sup>6)</sup>					
			analysed	gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total	Others <sup>3)</sup>	TAG (%)	TA (%)	SA	NA							
Control <sup>1)</sup>			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.38			
Solvent	0	24	200	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0.25			100.0
HBA	0.18	24	200	2	1	0	0	1	0	4	4	4	2	2	2	2	2	2	0.38			96.5
HBA	0.35	24	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.38	+	NT	93.0
HBA	0.70	24	200	12	49	45	0	0	0	30	136	61*	55	55	27.5	27.5	27.5	0.63			57.5	
HBA	1.4***	24	200	7	58	168	2	0	10	245	123	61.5	121	121	60.5	60.5	60.5	0.75			0.0	
MC	0.00005	24	200	7	58	168	2	0	10	245	123	61.5	121	121	60.5	60.5	60.5	0.75			0.0	
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.38			100.0
HBA	0.18	48	200	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.50			100.5
HBA	0.35	48	200	1	1	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.38	+	+	93.0
HBA	0.70	48	200	3	20	28	7	4	10	72	39*	19.5	36	36	18.0	18.0	18.0	12.62*			72.0	
HBA	1.4***	48	200	8	71	194	12	4	40	329	130	65.0	126	126	63.0	63.0	63.0	0.88			0.0	
MC	0.00005	48	200	8	71	194	12	4	40	329	130	65.0	126	126	63.0	63.0	63.0	0.88			0.0	

Abbreviations, gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, cse : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C, NT: not tested.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$ . 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. \* : Significantly different from historical solvent control data at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\* : Purity of test substance was 99.7 wt%. Salicylic acid (0.02 wt%) and 4-hydroxyisophthalic acid (0.03 wt%) were contained as impurities. \*\*\* : Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-hydroxybenzoic acid (HBA)\*\* with and without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of structural aberrations						No. of cells with aberrations		Trend test <sup>5)</sup> SA NA	Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)						
				analysed	gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup> total	Others <sup>3)</sup>			TAG (%)	TA (%)				
Control <sup>1)</sup>	0	—	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2	( 1.0 )	1	( 0.5 )	0.63	—	100.0
Solvent	0	—	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	( 0.0 )	0	( 0.0 )	0.63	—	101.0
HBA	0.18	—	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1	1	( 0.5 )	1	( 0.5 )	0.38	—	96.0
HBA	0.35	—	6-(18)	200	0	1	0	4	0	0	5	0	2	( 1.0 )	2	( 1.0 )	0.63	NT	125.0
HBA	0.70	—	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1	( 0.5 )	0	( 0.0 )	0.50	—	6.0
HBA	1.4***	—	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CPA	0.005	—	6-(18)	200	2	2	0	0	0	0	4	1	4	( 2.0 )	2	( 1.0 )	0.88	—	—
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1	( 0.5 )	1	( 0.5 )	0.63	—	100.0
HBA	0.18	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1	( 0.5 )	1	( 0.5 )	1.13*	—	98.5
HBA	0.35	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1	( 0.5 )	1	( 0.5 )	0.63	+	87.5
HBA	0.70	+	6-(18)	181	9	67	52	4	0	40	172	0	51*	( 28.2 )	48	( 26.5 )	1.18*7)	—	27.5
HBA	1.4***	+	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34.5
CPA	0.005	+	6-(18)	200	6	96	262	12	1	50	427	0	151	( 75.5 )	151	( 75.5 )	0.38	—	—

Abbreviations, gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, ctc : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide, NT: not tested.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$ . 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7) Five hundred and eight cells were analysed. \* : Significantly different from historical solvent control data at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\* : Purity of test substance was 99.7 wt%. Salicylic acid (0.02 wt%) and 4-hydroxyisophthalic acid (0.03 wt%) were contained as impurities. \*\*\* : Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 3 *In vitro* micronucleus test of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4-hydroxybenzoic acid (HBA)\*\* for 48 h in confirmation test

Group	Concentration (mg/mL)	No. of cells analysed	No. of micronuclei scored in each type (%)				Concurrent <sup>2)</sup> cytotoxicity (%)	
			Type 1	Type 2	Type 3	Polynuclei		
Solvent <sup>1)</sup>	0	1000	0 ( 0.0 )	9 ( 0.9 )	1 ( 0.1 )	1 ( 0.1 )	0 ( 0.0 )	100.0
HBA	0.18	1000	2 ( 0.2 )	12 ( 1.2 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	117.0
HBA	0.35	1000	0 ( 0.0 )	7 ( 0.7 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	118.0
HBA	0.70	1000	0 ( 0.0 )	8 ( 0.8 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	117.5
HBA	1.4	1000	2 ( 0.2 )	19* ( 1.9 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.1 )	0 ( 0.0 )	119.5
MC	0.00005	1000	3 ( 0.3 )	139* ( 13.9 )	1 ( 0.1 )	2 ( 0.2 )	0 ( 0.0 )	—

Abbreviations, MC: mitomycin C, Type 1: very small micronucleus like a pin hole, Type 2: typical micronucleus (one third and less than one third diameters of main nucleus), Type 3: large micronucleus (more than one third diameter of main nucleus), Multi: multiple micronuclei, Polynuclei: there are two and more than two nuclei per cell.

1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™.

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. \*\* : Purity of test substance was 99.7 wt%. Salicylic acid (0.02 wt%) and 4-hydroxyisophthalic acid (0.03 wt%) were contained as impurities.

Table 4 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4- hydroxybenzoic acid (HBA)\*\* without S9 mix in confirmation test

Group	Concen- tration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of analysed cells	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent cytotoxicity (%) <sup>6)</sup>
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	1	0	1	1	0	3	0	3 ( 1.5 )	3 ( 1.5 )	0.50			100.0
HBA	0.35	48	200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	2 ( 1.0 )	0.38			109.5
HBA	0.70	48	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.38	NT	NT	125.0
HBA	1.4	48	200	0	0	1	1	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.38			120.5
MC	0.00005	48	200	3	13	50	7	3	10	86	2	55 *( 27.5 )	52 *( 26.0 )	0.00			—

Abbreviations, gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C, NT: not tested.

1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$ . 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. \* : Significantly different from historical solvent control data at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\* : Purity of test substance was 99.7 wt%. Salicylic acid (0.02 wt%) and 4- hydroxyisophthalic acid (0.03 wt%) were contained as impurities.