最終報告書

4-メチル安息香酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

（試験番号：B020082）

2004 年 6 月 16 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

目次

要約 ····· 5
材料および方法 ····· 7
1. 被験物質および対照物質 ····· 7
2. 細胞 ····· 8
3. 培地 ····· 9
4. S9 mix ····· 9
5. 被験物質懸濁液および陽性対照物質溶液の調製 ····· 10
6. 細胞増殖抑制試験 ····· 11
7. 染色体異常試験 ····· 12
8. 結果のまとめ ····· 15
結果 ····· 16
考察および結論 ····· 19
参考文献 ····· 20

表 1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）[本試験]（通常系） ····· 22
表 2 染色体異常試験の結果（短時間処理法）[確認試験 1]（通常系） ····· 23
表 3 染色体異常試験の結果（短時間処理法）[確認試験 1]（強緩衝系） ····· 24
表 4 染色体異常試験の結果（短時間処理法）[確認試験 2]（強緩衝系） ····· 25
表 5 染色体異常試験の結果（連続処理法）[本試験]（通常系） ····· 26
表 6 染色体異常試験の結果（連続処理法）[本試験]（強緩衝系） ····· 27
表 7 染色体異常試験の結果（連続処理法）[確認試験]（強緩衝系） ····· 28
表 8 細胞処理液 pH 測定結果（短時間処理法）[確認試験 1] ····· 29
表 9 細胞処理液 pH 測定結果（短時間処理法）[確認試験 2] ····· 29
表 10 細胞処理液 pH 測定結果（連続処理法）[本試験] ····· 29
表 11 細胞処理液 pH 測定結果（連続処理法）[確認試験] ····· 29

図 1　4-メチル安息香酸の細胞毒性（短時間処理法・－S9 mix） …… 30
図 2　4-メチル安息香酸の細胞毒性（短時間処理法・＋S9 mix） …… 30
図 3　4-メチル安息香酸の細胞毒性（連続処理法） …… 31
図 4　4-メチル安息香酸の構造異常細胞出現頻度（短時間処理法・－S9 mix） …… 32
図 5　4-メチル安息香酸の数的異常細胞出現頻度（短時間処理法・－S9 mix） …… 32
図 6　4-メチル安息香酸の構造異常細胞出現頻度（短時間処理法・＋S9 mix） …… 33
図 7　4-メチル安息香酸の数的異常細胞出現頻度（短時間処理法・＋S9 mix） …… 33
図 8　4-メチル安息香酸の構造異常細胞出現頻度（連続処理法） …… 34
図 9　4-メチル安息香酸の数的異常細胞出現頻度（連続処理法） …… 34

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，4-メチル安息香酸の *in vitro* における染色体異常試験を実施した．

予備試験の結果に基づいて，細胞増殖抑制試験の用量は，短時間処理法の S9 mix 非共存下（以下－S9 mix）および S9 mix 共存下（以下＋S9 mix）では 500，1000，2000，3000，4000，5000 μg/mL，連続処理法の 24 時間処理（以下 24 時間処理）では 250，500，1000，2000，3000，4000，5000 μg/mL を設定した．

その結果，50％細胞増殖抑制用量は，－S9 mix で 1242 μg/mL，＋S9 mix で 1005 μg/mL，24 時間処理で 775 μg/mL であった．これらの結果に基づいて，短時間処理法の染色体異常試験（本試験）は，－S9 mix では 500，1000，1500，2000 μg/mL，＋S9 mix では 250，500，1000，1500 μg/mL を設定した．

短時間処理法の本試験の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 2000 μg/mL で 9.5％であった．ただし，この用量における細胞増殖率は，平均 8％であった．また，1500 および 2000 μg/mL では，被験物質処理開始時および終了時に，培養液の黄変が認められ，細胞処理液の pH が低下していると考えられた．このため，この染色体異常誘発は，細胞毒性あるいは細胞処理液の pH 低下に起因する可能性が示唆された．

一方，＋S9 mix では，染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの用量においても 5％未満であった．ただし，細胞増殖率（平均）は 1000，1500 μg/mL でそれぞれ 82，5％であり，1500 μg/mL の標本は細胞毒性のため観察不可能であった．よって，細胞増殖率が 50％付近となる用量における染色体異常誘発に関するデータを得ることができなかった．

以上の結果に基づいて，短時間処理法について確認試験 1 を実施した．細胞増殖抑制試験と同様の処理（通常系）と並行して，MEM 培地の代わりに強緩衝 MEM 培地を用いた処理（強緩衝系）を実施した．通常系，強緩衝系とも，－S9 mix では 1400，1600，1800，2000 μg/mL，＋S9 mix では 1000，1200，1400 μg/mL を設定した．

確認試験 1 の結果，通常系では，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 1600，1800 μg/mL でそれぞれ 5.0，11.0％，＋S9 mix の 1200，1400 μg/mL でそれぞれ 7.0，13.0％であった．一方，強緩衝系では，いずれの処理条件のいずれの用量においても，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 5％未満であった．また，細胞処理液の pH 低下が抑

制され，いずれの処理条件のいずれの用量においても，50％以上の細胞増殖抑制は認められなかった．よって，強緩衝系では，適用ガイドラインで要求されている 5000 μg/mL を最高用量とした試験が実施可能であると考えられた．

以上の結果に基づいて，短時間処理法について，強緩衝系で，－S9 mix，＋S9 mix のいずれも 1250，2500，5000 μg/mL を設定して確認試験 2 を実施した．

また，上記の結果から，短時間処理法の本試験および確認試験 1 の通常系で認められた染色体異常誘発は，細胞毒性あるいは細胞処理液の pH 低下に起因するものであり，強緩衝系での試験によってこれらの影響を抑制できることが示唆された．このことから，短時間処理法の確認試験 2 と並行して，連続処理法について，通常系では 250，500，1000，1500 μg/mL，強緩衝系では 1250，2500，5000 μg/mL を設定して本試験を実施した．

短時間処理法の確認試験 2 の結果，いずれの用量においても，染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5％未満であった．

連続処理法の本試験の結果，通常系では，いずれの用量においても，染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5％未満であった．一方，強緩衝系では，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，1250，2500 μg/mL においてそれぞれ 7.0，7.5％であり，判定は疑陽性であった．

この結果に基づき，連続処理法の強緩衝系について，1000，2000，3000 μg/mL で確認試験を実施した．

連続処理法の確認試験の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，1000，2000 μg/mL においてそれぞれ 5.0，12.0％であり，染色体異常誘発の再現性が確認された．そして，これらの用量における細胞処理液の pH は 7.0 以上であり，細胞増殖率も 70％以上であったことから，この染色体異常誘発は，細胞処理液の pH 低下や細胞毒性に起因するものではなく，本被験物質の有する染色体異常誘発性によるものであると考えられた．

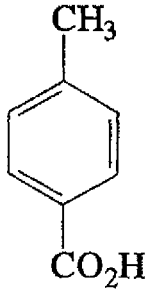
以上の結果より，4-メチル安息香酸は，本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有すると結論した．

材料および方法

1. 被験物質および対照物質

1.1 被験物質

から提供された4-メチル安息香酸を室温で保存し，使用した．被験物質の純度，組成および物理化学的性質は以下の通りである．

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	Benzoic acid, 4-methyl-		
別　　名	4-メチル安息香酸，パラトルイル酸 (PTLA)		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は，その製法の概要)			
試験に供した新規化学物質の純度	98.85％	試験に供した新規化学物質の Lot No.	
不純物の名称及び濃度	水分　0.01％ 灰分　0.01％		
CAS 番号	99-94-5	蒸 気 圧	－
分　子　量	136.15	分配係数	－
融　　点	180℃～181℃	常温における性状	白色結晶性粉末
沸　　点	274℃～275℃		
安　定　性	－		

溶媒に対する溶解度等	溶　媒	溶　解　度	溶媒中の安定性
	水	0.055％（30℃）	－
	生食	50 mg/mL で不溶*1	－
	DMSO	500 mg/mL で不溶*1	－
	ｱｾﾄﾝ	500 mg/mL で不溶*1	－
	ｱﾙｺｰﾙ，ｴﾀﾉｰﾙ ﾒﾀﾉｰﾙ	易溶	－

生食：生理食塩液，DMSO：ジメチルスルホキシド

*1：当研究所での溶媒検討の結果による．

1.2 陰性対照物質（被験物質の懸濁媒体）

カルボキシメチルセルロースナトリウム（ナカライテスク㈱，ロット番号 M0B1469）

（1 w/v%水溶液 [以下 1% CMC-Na]として使用した．）

1.3 陽性対照物質

マイトマイシン C（以下 MMC，協和発酵工業㈱，

ロット番号 342AJH，含量 103%

[短時間処理法・本試験，確認試験 1]

ロット番号 366AAK，含量 102%

[短時間処理法・確認試験 2，連続処理法・本試験，確認試験]）

ベンゾ〔a〕ピレン（以下 BP，東京化成工業㈱，ロット番号 GG01，含量 95.6%）

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．この細胞は，染色体数のモードが 25 本と少なく，染色体が比較的大きいため標本観察が容易である等の利点があり，培養細胞を用いる染色体異常試験で広く使用されている．

細胞は 2001 年 7 月 17 日[①②]および 2002 年 3 月 5 日[③]に大日本製薬㈱から購入し（購入時継代数：14），細胞懸濁液に対し最終 10 v/v%の割合で DMSO（関東化学㈱，ロット番号 210G1441）を添加したものを 1 mL に小分けし，液体窒素中で凍結保存した（凍結時継代数：17[②③]，18[①]）．この凍結ロットの細胞について特性検査を実施し，染色体数は 25 本，細胞周期は 13.5 時間[①]，12.5 時間[②]，16.4 時間[③]，マイコプラズマ陰性であることが確認された．試験には，同凍結ロットの細胞を融解して培養し，融解後 4 週間以内（継代数：18～22）のものを使用した．細胞の培養には，プラスチックプレート（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（炭酸ガス 5%，温度 37℃に設定，加湿，NAPCO 社，7300 型または 6301C 型）で培養した．（①：細胞増殖抑制試験，②：短時間処理法・染色体異常試験 [本試験，確認試験 1]，③：短時間処理法・染色体異常試験 [確認試験 2]，連続処理法・染色体異常試験 [本試験，確認試験]）

3. 培地

3.1 MEM

イーグルMEM培地「ニッスイ」①（日水製薬㈱，ロット番号460201，460205）約8.3 gを精製水880 mLに溶解し，オートクレーブ滅菌（121℃，20分間）後，別に滅菌処理した2.92 w/v% L-グルタミン水溶液と10 w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ8.8 mL，11.2 mL添加した．以下この溶液をMEMとした．

3.2 MEM培地

MEM 900 mLに，非働化（56℃, 30分間加熱処理）した仔牛血清（GIBCO BRL，ロット番号296130）を100 mL添加した．

3.3 強緩衝MEM培地

イーグルMEM培地「ニッスイ」①約8.3 gを精製水868.8 mLに溶解し，オートクレーブ滅菌後，別に滅菌処理した2.92 w/v% L-グルタミン水溶液と10 w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ8.8 mL，22.4 mL添加した．この溶液に，非働化した仔牛血清を100 mL添加した．

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1日目に30 mg/kgを1回腹腔内投与，2日目以降60 mg/kgを1日1回3日間腹腔内投与）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（7週齢，体重214～239g①，208～243g②）肝由来S9（キッコーマン㈱, ロット番号RAA-459①;2002年2月22日製造, 最終蛋白濃度:1.26 mg/mL, ロット番号 RAA-468②；2002 年 8 月 9 日製造，最終蛋白濃度：1.40 mg/mL）を事前（2002年3月5日①， 2002年8月21日②）に購入したものを使用した．購入したS9は使用時まで－80℃以下（実測値；－84～－82℃①, ②）に設定した超低温冷凍庫で保存した．

（①：細胞増殖抑制試験，本試験，確認試験1，②：確認試験2）

4.2 S9 mix

S9 mix 1 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．

S9	0.3 mL
D-グルコース 6-リン酸	5 μmol
β-$NADP^+$	4 μmol
HEPES（pH 7.2）	4 μmol
塩化マグネシウム	5 μmol
塩化カリウム	33 μmol
精製水	残量

5. 被験物質懸濁液および陽性対照物質溶液の調製

5.1 被験物質懸濁液の調製

溶媒検討の結果，本被験物質は，生食には 50 mg/mL で，DMSO には 500 mg/mL で，アセトンには 500 mg/mL でそれぞれ溶解しなかった．一方，1% CMC-Na には 50 mg/mL で均一に懸濁し，発熱，発泡，変色は認められなかった．よって，本被験物質の溶媒（懸濁媒体）には 1% CMC-Na を選択した．

被験物質を予定量秤量し，1% CMC-Na を添加し，振盪撹拌および超音波処理により懸濁させた．これを最高濃度懸濁液とした．

最高濃度懸濁液を 1% CMC-Na で段階希釈し，各処理用量の 10 倍濃度の被験物質懸濁液を調製した．被験物質懸濁液は用時調製し，被験物質の秤量，希釈，分注および調製後の保存は黄色灯下で行った．また，処理までの保存時間は，下記の通りであった．

細胞増殖抑制試験：10～35 分

短時間処理法・本試験：15～25 分

短時間処理法・確認試験 1：15～25 分

短時間処理法・確認試験 2：15 分

連続処理法・本試験：20～30 分

連続処理法・確認試験：5 分

5.2 陽性対照物質溶液の調製

MMC は 2 mg 入りバイアル瓶の内容物を，注射用水（㈱大塚製薬工場，ロット番号 K2A84，K2F72）5 mL に用時溶解した（400 μg/mL 溶液）．これを生食（㈱大塚製薬工場，ロット番号 K2A79）で段階希釈し，各処理条件における処理用量の 10 倍濃度の溶液（短時間処理法：1 μg/mL，連続処理法：0.5 μg/mL）を調製した．

BP は，処理用量の 200 倍濃度の溶液を調製（DMSO［関東化学㈱，ロット番号 207G1673］に 4 mg/mL で溶解）した．使用時まで凍結保存した．

6. 細胞増殖抑制試験

6.1 被験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち，短時間処理法 S9 mix 非共存下（以下−S9 mix）および共存下（以下＋S9 mix）ならびに連続処理法 24 時間処理（以下 24 時間処理）において予備試験を実施した．予備試験（用量：50，500，5000 μg/mL）は 1 用量あたり 1 枚のプレートを用いて実施した．処理終了後のプレートを位相差倒立顕微鏡下で観察し，陰性対照を 100％として相対的な細胞密度を判断した．

その結果，被験物質処理プレートの細胞密度は下記の通りであった．

処理条件＼用量（μg/mL）	50	500	5000
−S9 mix	100％	100％	0％
＋S9 mix	100％	100％	0％
24 時間処理	100％	80％	0％

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は下記の用量を設定した．

−S9 mix：500，1000，2000，3000，4000，5000 μg /mL

＋S9 mix：500，1000，2000，3000，4000，5000 μg /mL

24 時間処理：250，500，1000，2000，3000，4000，5000 μg /mL

6.2 細胞処理

4×10^3個/mL に調製した細胞浮遊液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き，3 日間前培養した．

MEM 培地を除去した後，下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加え，連続処理法では 24 時間，短時間処理法では 6 時間細胞を処理した．短時間処理法では 6 時間処理後，MEM で細胞表面を 1 回洗浄し，新たに MEM 培地 5 mL を加え，さらに 18 時間培養した．陰性対照物質として被験物質の懸濁媒体を用い，下記条件で同様に処理した．

	被験物質懸濁液または陰性対照物質	S9 mix	MEM 培地
−S9 mix	0.3 mL	−	2.7 mL
＋S9 mix	0.3 mL	0.5 mL	2.2 mL
24 時間処理	0.5 mL	−	4.5 mL

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（以下 PBS(-)，ダルベッコ PBS「ニッスイ」，日水製薬㈱）で洗浄後，0.25 w/v%トリプシン処理し，培養液を加えて細胞を剥離した後，血球計算盤で細胞を計数した．

6.4 50%細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について，陰性対照値を 100%として生存曲線を作成し，被験物質の 50%細胞増殖抑制用量（IC_{50}）を算出した．

7. 染色体異常試験

染色体異常試験は，下記の順序で実施した．

① 短時間処理法（本試験）

② 短時間処理法（確認試験 1）

③ 短時間処理法（確認試験 2），連続処理法（本試験）

④ 連続処理法（確認試験）

7.1 被験物質用量および陽性対照物質用量

細胞増殖抑制試験の結果より算出した IC_{50} は，－S9 mix で 1242 μg/mL，＋S9 mix で 1005 μg/mL，24 時間処理で 775 μg/mL であった．

これらの結果に基づいて，短時間処理法の染色体異常試験（本試験）を下記の用量で実施した．

－S9 mix：500，1000，1500，2000 μg/mL

＋S9 mix：250，500，1000，1500 μg/mL

短時間処理法の本試験の結果（詳細は「結果」参照）に基づいて，短時間処理法について確認試験 1 を実施した．細胞増殖抑制試験と同様の処理（通常系）と並行して，MEM 培地の代わりに強緩衝 MEM 培地を用いた処理（強緩衝系）を実施した．通常系，強緩衝系とも，下記の用量を設定した．

－S9 mix：1400，1600，1800，2000 μg/mL

＋S9 mix：1000，1200，1400 μg/mL

確認試験 1 の結果（詳細は「結果」参照）に基づいて，短時間処理法について，強緩衝系で下記用量を設定して確認試験 2 を実施した．

－S9 mix（強緩衝系）：1250，2500，5000 μg/mL

＋S9 mix（強緩衝系）：1250，2500，5000 μg/mL

また，短時間処理法の確認試験 2 と並行して，連続処理法について，下記の処理条件および用量で本試験を実施した（実施経緯詳細は「結果」参照）.

24 時間処理（通常系）：250，500，1000，1500 μg/mL

24 時間処理（強緩衝系）：1250，2500，5000 μg/mL

連続処理法の本試験の結果（詳細は「結果」参照）に基づき，連続処理法の強緩衝系について，下記の用量で確認試験を実施した.

24 時間処理（強緩衝系）：1000，2000，3000 μg/mL

陽性対照物質の用量は，－S9 mix では MMC を 0.1 μg/mL，24 時間処理では MMC を 0.05 μg/mL とした．＋S9 mix では BP を 20 μg/mL とした．これらは，いずれも染色体異常誘発性が知られている用量である.

7.2 細胞処理

細胞増殖抑制試験と同様に細胞を処理した.

短時間処理法の確認試験ならびに連続処理法の本試験および確認試験では，強緩衝系においては，MEM 培地の代わりに強緩衝 MEM 培地を使用した.

短時間処理法の確認試験ならびに連続処理法の本試験および確認試験では，処理開始時および処理終了時に，細胞処理液を微量採取し，陰性対照群を含む各被験物質処理用量における細胞処理液の pH を，pH メーター（twin pH B-212，㈱堀場製作所）で測定した.

陽性対照については，下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した．短時間処理法の確認試験ならびに連続処理法の本試験では，通常系，強緩衝系のいずれにも陽性対照群を設けた．陽性対照群については，細胞処理液の pH 測定を実施しなかった.

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	MEM 培地
－S9 mix	0.3 mL	－	－	2.7 mL
＋S9 mix	－	0.015 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.5 mL	－	－	4.5 mL

7.3 標本作製

各プレートに，標本作製の 2 時間前にコルセミドを最終用量が 0.1 μg/mL となるように加え，分裂中期細胞を蓄積した．処理終了後，細胞表面を PBS(-)で洗浄し，0.25 w/v％トリプシン処理にて細胞を剥離した後，遠心管に回収し，遠心分離（1000 rpm，5 分間；以

下同様）により細胞を集めた．上清を除去後，各遠心管に0.075 mol/L 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．次に，冷却した固定液（メタノール・酢酸 [3 : 1 〈v/v〉] 混合液，以下同様）0.5 mL を加え細胞を半固定した後，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 回繰り返した．その後，適量の固定液で細胞を再浮遊させ，濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに2 箇所滴下して乾燥させた．これを3 v/v%ギムザ溶液で20 分間染色し，水洗，乾燥後，封入して染色体標本とした．なお，標本は，各プレートにつき2 枚ずつ作製した．

7.4 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した．標本作製時にトリプシン処理にて剥離した細胞の一部を採取し，血球計算盤で細胞を計数した．陽性対照群については測定を実施しなかった．

7.5 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い，各プレートから作製した2 枚の標本で合わせて 50 個以上の分裂中期細胞が得られた場合，そのプレートの標本を観察の対象とした．また，陰性対照群および陽性対照群については，構造異常細胞の有無が適切であることを確認した．

(2) 構造異常および数的異常

標本はプレート1 枚につき100 個，すなわち1 用量200 個の分裂中期細胞を盲検法で観察した．分裂中期細胞は，染色体がよく拡がった細胞を観察した．

構造異常は以下の分類[1]に従って観察した．ただし，動原体数が25±2 または35 以上でない細胞は除外した．

染色分体型切断
染色分体型交換
染色体型切断
染色体型交換　　(二動原体，環状染色体など)
断片化

ギャップは染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした．他の異常と区別して記録し，構造異常には含めなかった．

数的異常は動原体数が35 以上のものとし，核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた．

7.6 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構造異常細胞として集計した．なお，観察可能

な分裂中期細胞数がプレートあたり 50 個未満の標本のデータは集計から除外した.

被験物質の染色体異常誘発性の判定は，各処理条件において，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（−），いずれか一方または両方が 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.

結果が疑陽性の場合，あるいは染色体異常試験結果から再検討が必要と考えられる場合は，確認試験を実施した．確認試験の処理用量は，染色体異常試験の結果に基づいて適切な用量段階を設定した（詳細は 7.1 項参照）．確認試験の結果，再現性が認められた場合は陽性と判定し，再現性が認められない場合は陰性と判定した.

結果の評価に統計学的手法は用いなかった.

8. 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度（%）を表示した．染色体異常は種類別に細胞数を表示した．なお，観察可能な分裂中期細胞数がプレートあたり 50 個未満の標本の欄は“TOX”と記載した．また，細胞増殖抑制試験および染色体異常試験の結果を図示した.

陽性となった試験条件については，D_{20} 値（分裂中期細胞の 20%に異常を誘発させるために必要な用量，mg/mL）を算出した．また，本報告書に代表的な染色体異常像の写真を添付した.

結果

細胞増殖抑制試験において，いずれの処理条件でも，1000 μg/mL 以上で，被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．また，2000 μg/mL 以上では，細胞処理液の黄変が認められ，pH 低下が示唆された．

細胞増殖抑制試験の結果，IC_{50} は，－S9 mix で 1242 μg/mL，＋S9 mix で 1005 μg/mL，24 時間処理で 775 μg/mL であった（図 1～3）．

短時間処理法の本試験において，－S9 mix では 1500 μg/mL 以上，＋S9 mix では全ての用量で，被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．また，1500 μg/mL 以上では，細胞処理液の黄変が認められ，pH 低下が示唆された．

短時間処理法の本試験の予備鏡検の結果，＋S9 mixの1500 μg/mLの標本において，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかったため，この用量の標本を観察対象から除外した．

短時間処理法の本試験の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 2000 μg/mL で 9.5％であった．ただし，この用量における細胞増殖率は，平均 8％であった．染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの用量においても 5％未満であった（表 1，図 1，4，5）．

一方，＋S9 mix では，染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの用量においても 5％未満であった．ただし，細胞増殖率（平均）は 1000，1500 μg/mL でそれぞれ 82，5％であり，1500 μg/mL の標本は細胞毒性のため観察不可能であった．よって，細胞増殖率が 50％付近となる用量における染色体異常誘発に関するデータを得ることができなかった（表 1，図 2，6，7）．

短時間処理法の確認試験 1 において，全ての用量で被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．通常系では，－S9 mix の 1600 μg/mL 以上および＋S9 mix の全ての用量で，細胞処理液の黄変が認められ，pH の低下も認められた．一方，強緩衝系では，いずれの用量においても，細胞処理液の黄変は認められず，pH の著しい低下も認められなかった（表 8）．

短時間処理法の確認試験1の予備鏡検の結果，－S9 mixの通常系の2000 μg/mLの一方のプ

レートの標本において，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかったため，このプレートの標本を観察対象から除外した．

短時間処理法の確認試験 1 の結果，通常系では，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 1600, 1800 μg/mL でそれぞれ 5.0, 11.0%，＋S9 mix の 1200, 1400 μg/mL でそれぞれ 7.0, 13.0%であった．一方，強緩衝系では，いずれの処理条件のいずれの用量においても，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった．また，強緩衝系では，細胞処理液の pH 低下が抑制され，いずれの処理条件のいずれの用量においても，50%以上の細胞増殖抑制は認められなかった．よって，強緩衝系では，適用ガイドラインで要求されている 5000 μg/mL を最高用量とした試験が実施可能であると考えられた．通常系および強緩衝系で，染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの処理条件のいずれの用量においても 5%未満であった（表 2，3，図 1，2，4～7）．

また，上記の結果から，短時間処理法の本試験および確認試験 1 の通常系で認められた染色体異常誘発は，細胞毒性あるいは細胞処理液の pH 低下に起因するものであり，強緩衝系での試験によってこれらの影響を抑制できることが示唆された．このことから，短時間処理法の確認試験 2 と並行して，連続処理法の本試験を実施することとした．

短時間処理法の確認試験 2 において，全ての用量で被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．－S9 mix の 5000 μg/mL および＋S9 mix の 2500 μg/mL 以上で，細胞処理液の黄変が認められ，pH の低下も認められた（表 9）．

短時間処理法の確認試験2の予備鏡検の結果，－S9 mixの5000 μg/mLおよび＋S9 mixの5000 μg/mLの標本において，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかったため，この用量の標本を観察対象から除外した．

短時間処理法の確認試験 2 の結果，いずれの用量においても，染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった（表 4，図 1，2，4～7）．

連続処理法の本試験において，通常系の 1000 μg/mL 以上および強緩衝系の 2500 μg/mL 以上で，被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．通常系の 1500 μg/mL および強緩衝系の 5000 μg/mL で，細胞処理液の黄変が認められ，pH の低下も認められた（表 10）．

連続処理法の本試験の予備鏡検の結果，通常系の1500 μg/mLおよび強緩衝系の5000 μg/mL

の標本において，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかったため，この用量の標本を観察対象から除外した．

連続処理法の本試験の結果，通常系では，いずれの用量においても，染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった．一方，強緩衝系では，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，1250，2500 μg/mL においてそれぞれ 7.0，7.5%であり，判定は疑陽性であった．強緩衝系で，染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの用量においても 5%未満であった（表 5，6，図 3，8，9）．

連続処理法の確認試験において，3000 μg/mL で被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．また 3000 μg/mL で，細胞処理液の黄変が認められ，pH の低下も認められた（表 11）．

連続処理法の確認試験の予備鏡検の結果，3000 μg/mLの標本において，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかったため，この用量の標本を観察対象から除外した．

連続処理法の確認試験の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，1000，2000 μg/mL においてそれぞれ 5.0, 12.0%であり，染色体異常誘発の再現性が確認された．そして，これらの用量における細胞処理液の pH は 7.0 以上であり，細胞増殖率も 70%以上であった（表 7，11，図 3，8，9）．

連続処理法の確認試験の結果から算出した D_{20} 値は，3.6 mg/mL であった．

すべての陰性対照群における染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった（表 1～7，図 4～9）．また，すべての陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 10%以上であった（表 1～7）．

考察および結論

4-メチル安息香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．

短時間処理法では，いずれの処理条件においても，通常系で 10%以上の染色体構造異常誘発が認められた．しかし，強緩衝系では，いずれの処理条件のいずれの被験物質処理群においても，染色体異常出現頻度は 5%未満であった．このため，通常系で認められた染色体異常誘発は，細胞処理液の pH 低下に起因するものである可能性が示唆された．

連続処理法では，強緩衝系において，5%以上の染色体構造異常誘発が認められ，確認試験において再現性が確認された．染色体異常誘発の認められた用量における pH は 7.0 以上であり，細胞増殖率も 70%以上であったことから，この染色体異常誘発は，細胞処理液の pH 低下や細胞毒性に起因するものではなく，本被験物質の有する染色体異常誘発性によるものであると考えられた．

すべての陰性対照群では，染色体構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度は 5%未満であり，すべての陽性対照群では，染色体構造異常細胞の出現頻度は 10%以上であったことから，当試験が技術的に成立していることが示された．

従って，4-メチル安息香酸は本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体構造異常誘発性を有すると結論した．

なお，本物質の類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料にまとめた．

参考文献

1. 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第 3 分科会・遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社，東京，2000

表 1　染色体異常試験の結果(短時間処理法)[本試験](通常系)

被験物質の名称　4-メチル安息香酸

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
		(μg/mL)	観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)		(%)	観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 − 18	−	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	1	93	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	107	100	2	0	2
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	100	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6 − 18	−	500	100	1	0	0	0	0	1	0	98	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	93	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	96	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	−	1000	100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0
			100	0	0	3	0	0	3	0	48	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	59	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	1500 P, A	100	2	0	0	0	0	2	0	52	100	1	0	1
			100	4	2	0	0	0	5	0	40	100	1	0	1
			200	6 (3.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (3.5)	0	46	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6 − 18	−	2000 P, A	100	11	4	0	0	0	11	0	10	100	1	0	1
			100	6	4	0	0	0	8	0	6	100	2	0	2
			200	17 (8.5)	8 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (9.5)	0	8	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6 − 18	−	陽性対照 (MMC 0.1)	100	29	16	0	0	0	37	0		100	0	0	0
			100	32	14	0	0	0	39	0		100	0	0	0
			200	61 (30.5)	30 (15.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	76 (38.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	119	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	81	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	250 P	100	0	0	1	0	0	1	0	75	100	0	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	0	85	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	80	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	500 P	100	0	0	0	0	0	0	0	80	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1	130	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	105	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	1000 P	100	0	1	0	0	0	1	0	76	100	1	1	2
			100	4	3	1	0	0	6	0	87	100	3	0	3
			200	4 (2.0)	4 (2.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (3.5)	0	82	200	4 (2.0)	1 (0.5)	5 (2.5)
6 − 18	+	1500 P, A	TOX								8	TOX			
											3				
											5				
6 − 18	+	陽性対照 (BP 20)	100	25	59	0	0	0	67	0		100	0	0	0
			100	16	44	0	0	0	45	0		100	0	0	0
			200	41 (20.5)	103 (51.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	112 (56.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　BP:ベンゾ[a]ピレン　CMC-Na:1w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

TOX:細胞毒性のため，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかった．

P:被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．

A:被験物質処理終了時に，細胞処理液の黄変が認められた．

B0200082

表 2　染色体異常試験の結果(短時間処理法)[確認試験1](通常系)

被験物質の名称　4-メチル安息香酸

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6－18	－	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	104	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	96	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6－18	－	1400 P	100	3	2	0	0	0	4	0	60	100	1	0	1
			100	1	1	0	0	0	2	1	55	100	1	0	1
			200	4 (2.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	1	58	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6－18	－	1600 P, A	100	0	0	0	0	0	0	0	30	100	0	0	0
			100	9	5	0	0	0	10	1	43	100	1	0	1
			200	9 (4.5)	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (5.0)	1	36	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	－	1800 P, A	100	12	4	0	0	0	13	0	8	100	3	0	3
			100	4	8	0	0	0	9	0	19	100	0	0	0
			200	16 (8.0)	12 (6.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	22 (11.0)	0	14	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6－18	－	2000 P, A	100	1	0	0	0	0	1	1	41	100	2	0	2
			TOX								1	TOX			
			100	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	1	21	100	2 (2.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
6－18	－	陽性対照 (MMC 0.1)	100	40	18	0	0	0	47	0		100	1	0	1
			100	28	11	0	0	0	36	0		100	0	0	0
			200	68 (34.0)	29 (14.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	83 (41.5)	0		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	＋	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	1	0	0	0	1	0	92	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	108	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	＋	1000 P, A	100	0	0	0	0	0	0	0	56	100	1	0	1
			100	3	0	0	0	0	3	0	55	100	1	0	1
			200	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	56	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6－18	＋	1200 P, A	100	1	3	0	0	0	3	0	46	100	2	0	2
			100	7	6	0	0	0	11	0	23	100	0	0	0
			200	8 (4.0)	9 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (7.0)	0	34	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6－18	＋	1400 P, A	100	13	15	0	0	0	22	1	20	100	0	0	0
			100	3	1	0	0	0	4	0	27	100	2	0	2
			200	16 (8.0)	16 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	26 (13.0)	1	24	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6－18	＋	陽性対照 (BP 20)	100	33	80	0	0	0	88	0		100	0	0	0
			100	29	82	0	0	0	85	0		100	0	0	0
			200	62 (31.0)	162 (81.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	173 (86.5)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　BP:ベンゾ[a]ピレン　CMC-Na:1w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液
TOX:細胞毒性のために，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかった．
P:被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．
A:被験物質処理終了時に，細胞処理液の黄変が認められた．

B020082

表 3　染色体異常試験の結果(短時間処理法)[確認試験1](強緩衝系)

被験物質の名称　4-メチル安息香酸

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ	細胞増殖率	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
		(μg/mL)	観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)	の出現数	(%)	観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6－18	－	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	1	0	0	0	1	0	97	100	0	0	0
			100	4	0	0	0	0	4	1	103	100	0	0	0
			200	4 (2.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	1	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6－18	－	1400 P	100	0	0	0	0	0	0	0	73	100	3	0	3
			100	1	4	0	0	0	5	0	97	100	3	0	3
			200	1 (0.5)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0	85	200	6 (3.0)	0 (0.0)	6 (3.0)
6－18	－	1600 P	100	0	1	0	0	0	1	0	66	100	3	0	3
			100	0	1	0	0	0	1	1	86	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1	76	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6－18	－	1800 P	100	0	0	0	0	0	0	0	59	100	2	0	2
			100	2	2	0	0	0	4	0	74	100	3	0	3
			200	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	0	66	200	5 (2.5)	0 (0.0)	5 (2.5)
6－18	－	2000 P	100	2	0	0	0	0	2	0	110	100	2	0	2
			100	1	0	0	0	0	1	0	98	100	0	0	0
			200	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	104	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6－18	－	陽性対照 (MMC 0.1)	100	45	12	0	0	0	50	0		100	0	0	0
			100	59	23	1	0	0	64	2		100	0	0	0
			200	104 (52.0)	35 (17.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	114 (57.0)	2		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6－18	＋	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	103	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	＋	1000 P	100	0	1	0	0	0	1	0	118	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	0	137	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	128	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	＋	1200 P	100	0	0	0	0	0	0	0	133	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	119	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	126	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	＋	1400 P	100	0	0	0	0	0	0	0	124	100	2	0	2
			100	1	2	0	0	0	3	0	110	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	117	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6－18	＋	陽性対照 (BP 20)	100	29	64	0	0	0	74	0		100	0	0	0
			100	18	53	0	0	0	58	0		100	0	0	0
			200	47 (23.5)	117 (58.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	132 (66.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　BP:ベンゾ[a]ピレン　　CMC-Na:1w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

P:被験物質処理終了時に、プレート中に被験物質が認められた.

B020082

表 4　染色体異常試験の結果(短時間処理法)[確認試験2](強緩衝系)

被験物質の名称　4-メチル安息香酸

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
		(μg/mL)	観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)		(%)	観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6－18	－	陰性対照(CMC-Na)	100	1	0	0	0	0	1	0	105	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	－	1250 P	100	2	0	0	0	0	2	0	96	100	1	0	1
			100	3	0	0	0	0	3	0	107	100	0	0	0
			200	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0	101	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	－	2500 P	100	1	1	0	0	0	1	0	47	100	1	1	2
			100	2	2	0	0	0	3	0	64	100	0	0	0
			200	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	0	55	200	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (1.0)
6－18	－	5000 P, A	TOX								6	TOX			
											3				
											5				
6－18	－	陽性対照(MMC 0.1)	100	22	8	0	0	0	29	1		100	0	0	0
			100	28	18	0	0	0	39	0		100	1	0	1
			200	50 (25.0)	26 (13.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	68 (34.0)	1		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	＋	陰性対照(CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	96	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	104	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6－18	＋	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	0	82	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	124	100	2	0	2
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	103	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6－18	＋	2500 P, A	100	1	0	0	0	0	1	0	52	100	2	0	2
			100	0	1	0	0	0	1	0	50	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	51	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6－18	＋	5000 P, A	TOX								1	TOX			
											1				
											1				
6－18	＋	陽性対照(BP 20)	100	18	75	0	0	0	77	0		100	0	0	0
			100	27	73	0	0	0	75	0		100	0	0	0
			200	45 (22.5)	148 (74.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	152 (76.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　BP:ベンゾ[a]ピレン　　CMC-Na:1w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

TOX:細胞毒性のため，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかった．

P:被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．

A:被験物質処理終了時に，細胞処理液の黄変が認められた．

B020082

表 5　染色体異常試験の結果(連続処理法)[本試験](通常系)

被験物質の名称　4-メチル安息香酸

処理-回復時間(h)	被験物質の用量	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率	染色体数的異常の細胞数(出現頻度%)			
	(μg/mL)	観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)		(%)	観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 − 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	93	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	107	100	1	0	1
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 − 0	250	100	1	0	0	0	0	1	0	74	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	88	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	81	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	500	100	0	0	0	0	0	0	0	65	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	66	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	66	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	1000 P	100	1	0	0	0	0	1	0	57	100	3	0	3
		100	2	0	0	0	0	2	0	65	100	0	0	0
		200	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	61	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
24 − 0	1500 P, A	TOX								48	TOX			
										35				
										41				
24 − 0	陽性対照 (MMC 0.05)	100	11	5	0	0	0	15	0		100	0	0	0
		100	18	5	0	0	0	22	0		100	0	0	0
		200	29 (14.5)	10 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (18.5)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　　CMC-Na:1w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

TOX:細胞毒性のため, プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかった.

P:被験物質処理終了時に, プレート中に被験物質が認められた.

A:被験物質処理終了時に, 細胞処理液の黄変が認められた.

B020082

表 6　染色体異常試験の結果(連続処理法)[本試験](強緩衝系)

被験物質の名称　4-メチル安息香酸

処理-回復時間(h)	被験物質の用量	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率	染色体数的異常の細胞数(出現頻度%)			
	(μg/mL)	観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)		(%)	観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 － 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	120	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0	80	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 － 0	1250	100	8	2	0	0	0	10	0	93	100	3	0	3
		100	4	0	0	0	0	4	0	84	100	0	0	0
		200	12 (6.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (7.0)	0	89	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
24 － 0	2500 P	100	7	2	0	0	0	9	1	29	100	0	0	0
		100	5	1	0	0	0	6	0	51	100	3	0	3
		200	12 (6.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (7.5)	1	40	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
24 － 0	5000 P, A	TOX								15	TOX			
										9				
										12				
24 － 0	陽性対照 (MMC 0.05)	100	26	6	0	0	0	31	0		100	0	0	0
		100	23	8	0	0	0	29	0		100	0	0	0
		200	49 (24.5)	14 (7.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	60 (30.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　　CMC-Na:1w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

TOX:細胞毒性のため，プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかった．

P:被験物質処理終了時に，プレート中に被験物質が認められた．

A:被験物質処理終了時に，細胞処理液の黄変が認められた．

B020082

表 7　染色体異常試験の結果(連続処理法)[確認試験](強緩衝系)

被験物質の名称　4-メチル安息香酸

処理-回復時間(h)	被験物質の用量 (μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 − 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	2	0	0	0	0	2	1	117	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	83	100	0	0	0
		200	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	1	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	1000	100	6	0	0	0	0	6	0	77	100	0	0	0
		100	4	0	0	0	0	4	0	82	100	1	0	1
		200	10 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (5.0)	0	80	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 − 0	2000	100	8	1	1	0	0	10	0	75	100	0	0	0
		100	14	0	0	0	0	14	0	72	100	0	0	0
		200	22 (11.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	24 (12.0)	0	73	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	3000 P, A	TOX								43	TOX			
										31				
										37				
24 − 0	陽性対照 (MMC 0.05)	100	48	12	0	0	0	50	0		100	0	0	0
		100	46	22	0	0	0	58	0		100	1	0	1
		200	94 (47.0)	34 (17.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	108 (54.0)	0		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)

MMC: マイトマイシンC　　CMC-Na: 1w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

TOX: 細胞毒性のため, プレートあたり50個以上の分裂中期像が得られなかった.

P: 被験物質処理終了時に, プレート中に被験物質が認められた.

A: 被験物質処理終了時に, 細胞処理液の黄変が認められた.

B020082

表8 細胞処理液pH測定結果(短時間処理法)[確認試験1]

			陰性対照	1000	1200	1400	1600	1800	2000
−S9 mix	通常系	処理開始時	8.2			7.4	7.2	7.1	7.3
		処理終了時	8.0			7.3	7.0	6.8	6.9
	強緩衝系	処理開始時	8.5			7.9	7.7	7.7	8.0
		処理終了時	8.3			8.0	8.1	7.9	8.2
＋S9 mix	通常系	処理開始時	7.9	7.3	7.2	7.1			
		処理終了時	7.7	7.2	7.1	6.8			
	強緩衝系	処理開始時	8.3	8.0	7.7	7.7			
		処理終了時	8.4	8.1	7.9	8.1			

表9 細胞処理液pH測定結果(短時間処理法)[確認試験2]

			陰性対照	1250	2500	5000
−S9 mix	強緩衝系	処理開始時	8.6	7.9	7.2	6.6
		処理終了時	7.7	7.4	7.1	5.8
＋S9 mix	強緩衝系	処理開始時	8.2	7.8	7.0	6.0
		処理終了時	7.5	7.2	6.8	5.6

表10 細胞処理液pH測定結果(連続処理法)[本試験]

			陰性対照	250	500	1000	1250	1500	2500	5000
24時間処理	通常系	処理開始時	7.9	7.8	7.6	7.5		7.4		
		処理終了時	7.6	7.5	7.4	7.3		6.9		
	強緩衝系	処理開始時	8.0				7.4		7.1	6.9
		処理終了時	8.1				7.7		7.3	5.6

表11 細胞処理液pH測定結果(連続処理法)[確認試験]

			陰性対照	1000	2000	3000
24時間処理	強緩衝系	処理開始時	8.2	7.7	7.5	7.1
		処理終了時	7.4	7.5	7.5	7.0

図1 4-メチル安息香酸の細胞毒性
(短時間処理法・－S9 mix)

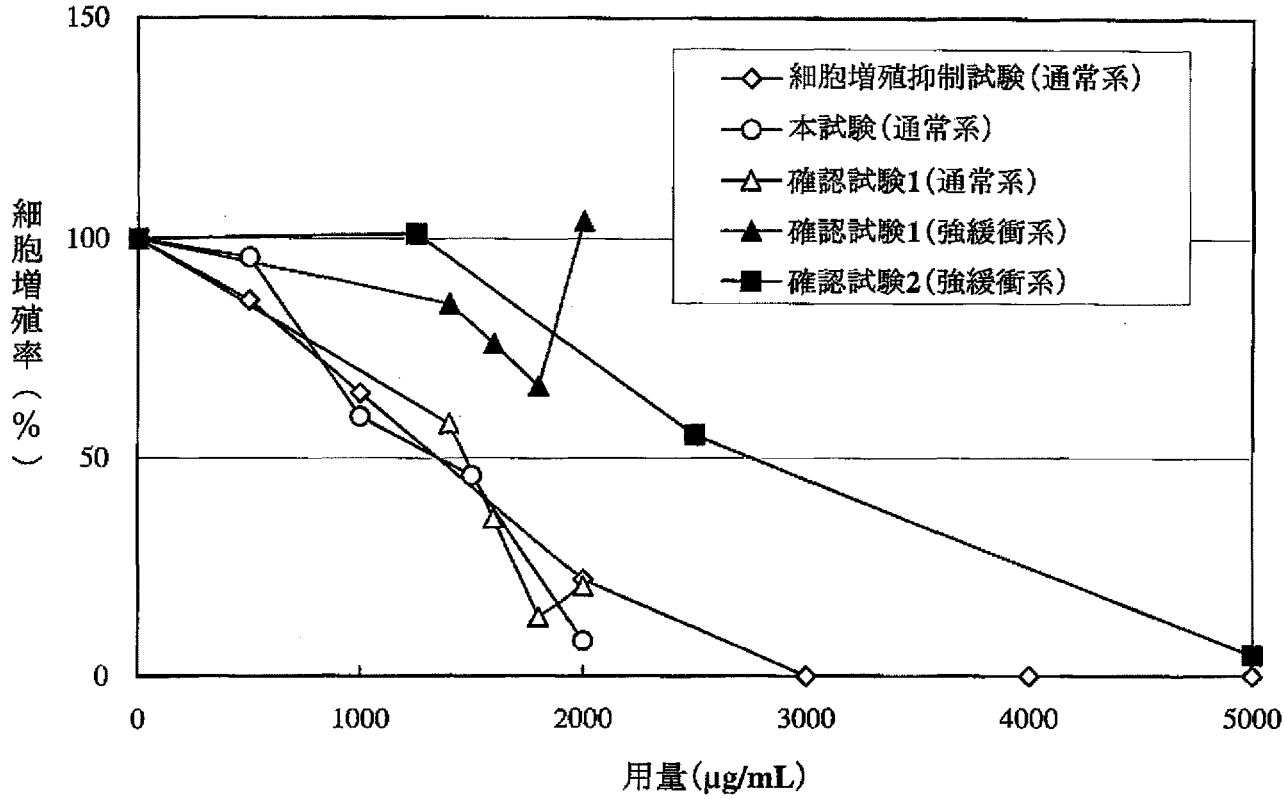


図2 4-メチル安息香酸の細胞毒性
(短時間処理法・＋S9 mix)

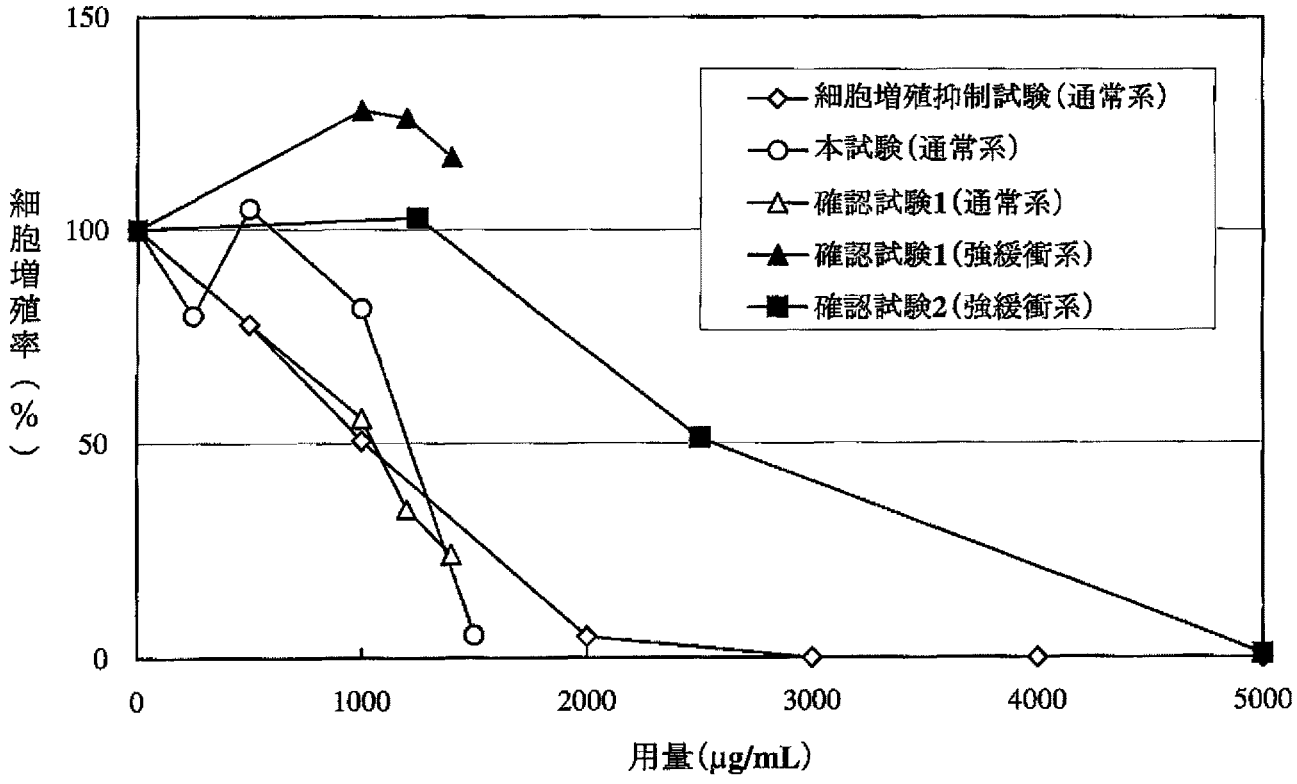


図3 4-メチル安息香酸の細胞毒性
(連続処理法)

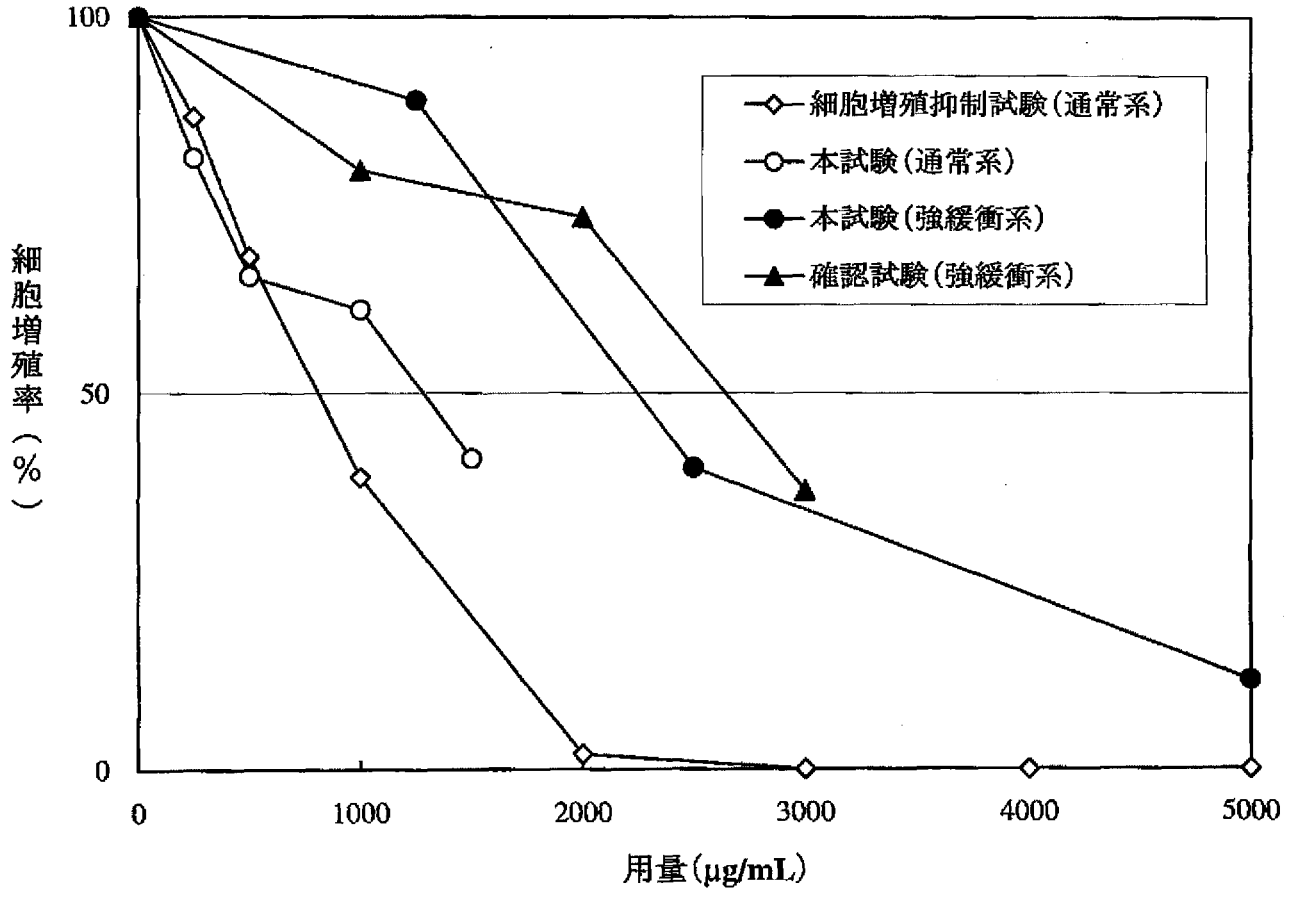


図4 4-メチル安息香酸の構造異常細胞出現頻度
(短時間処理法・－S9 mix)

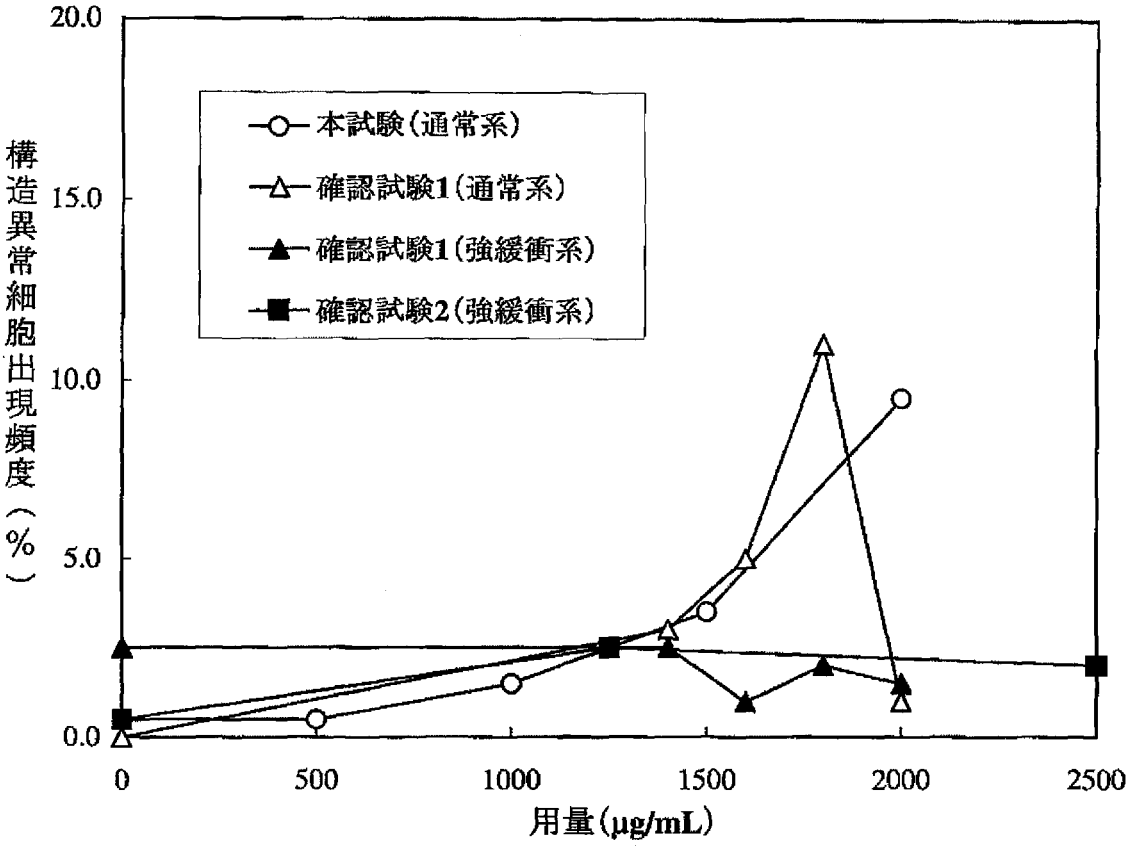


図5 4-メチル安息香酸の数的異常細胞出現頻度
(短時間処理法・－S9 mix)

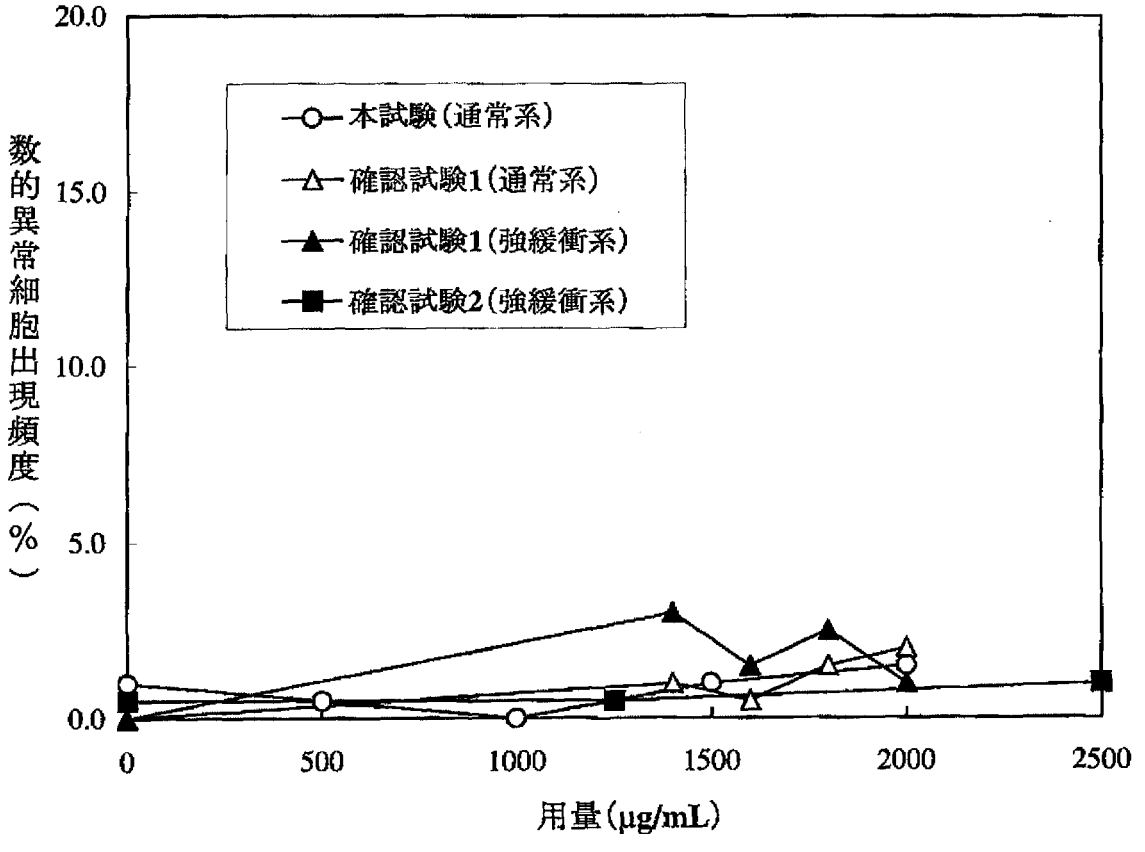


図6 4-メチル安息香酸の構造異常細胞出現頻度
（短時間処理法・＋S9 mix）

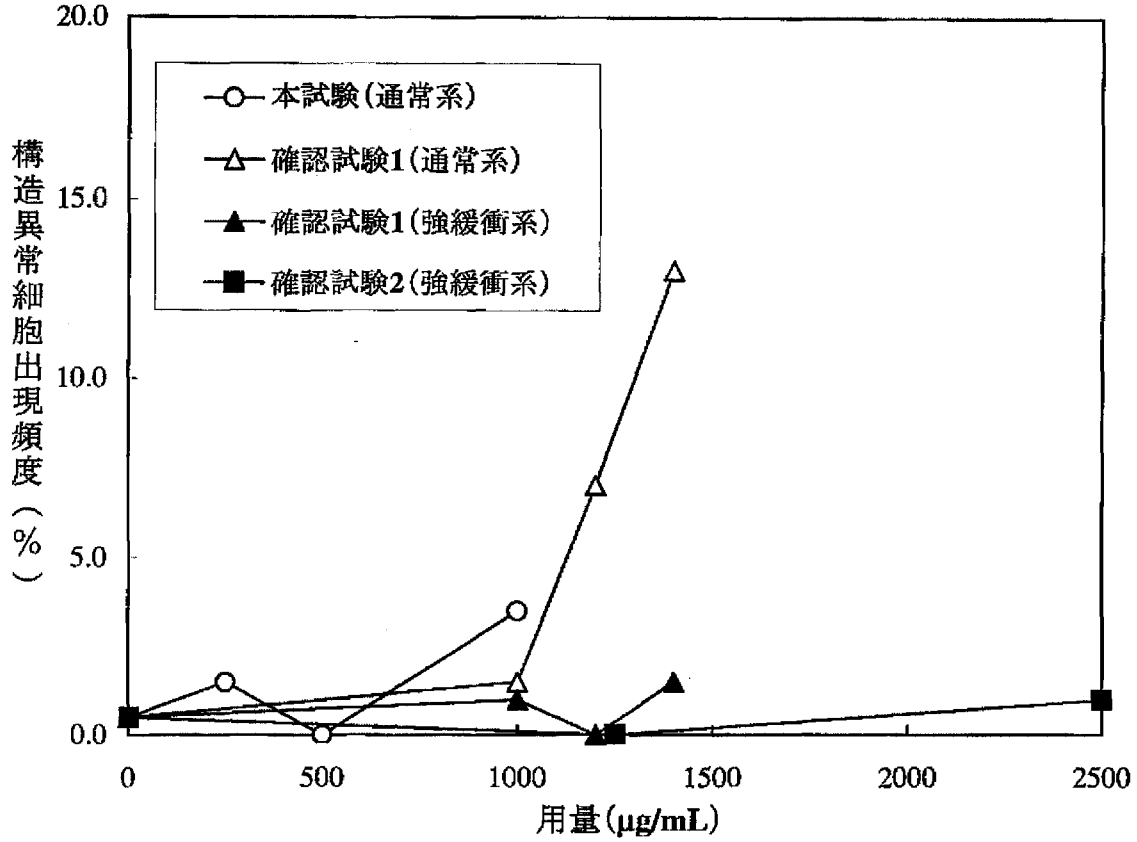


図7 4-メチル安息香酸の数的異常細胞出現頻度
（短時間処理法・＋S9 mix）

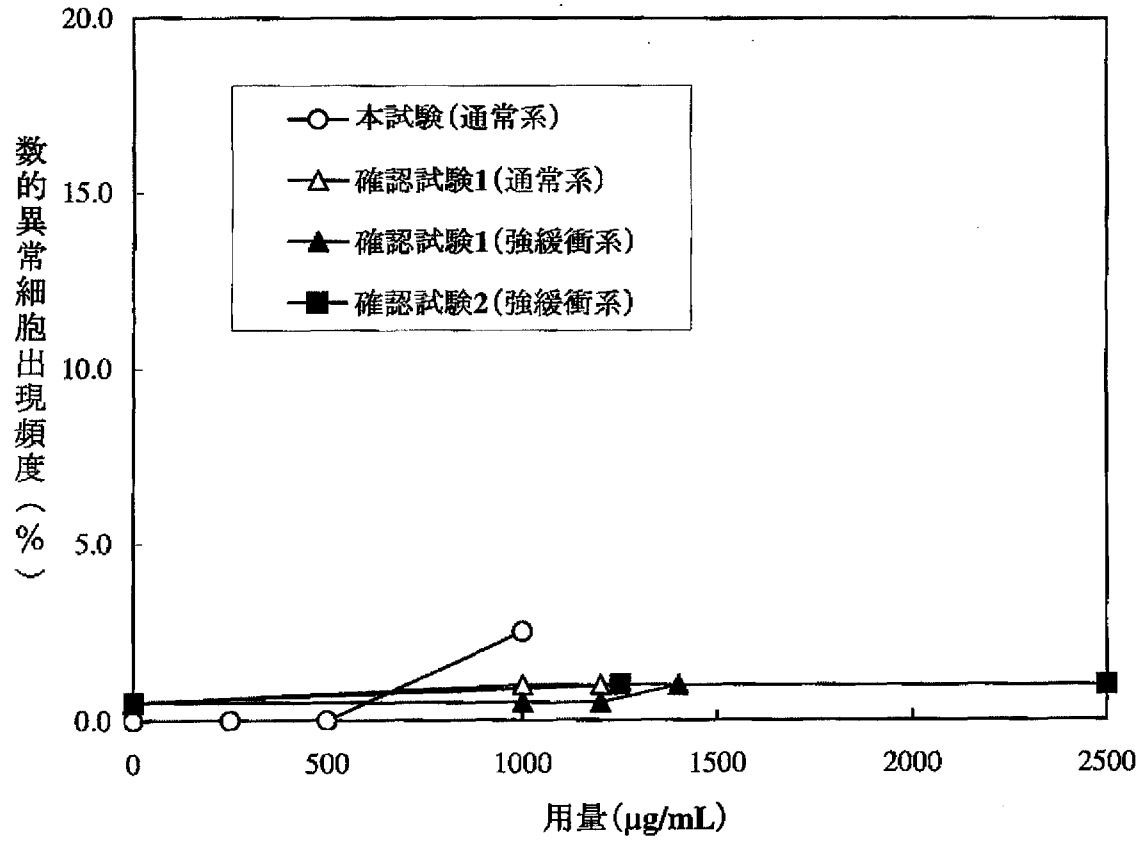


図8 4-メチル安息香酸の構造異常細胞出現頻度
（連続処理法）

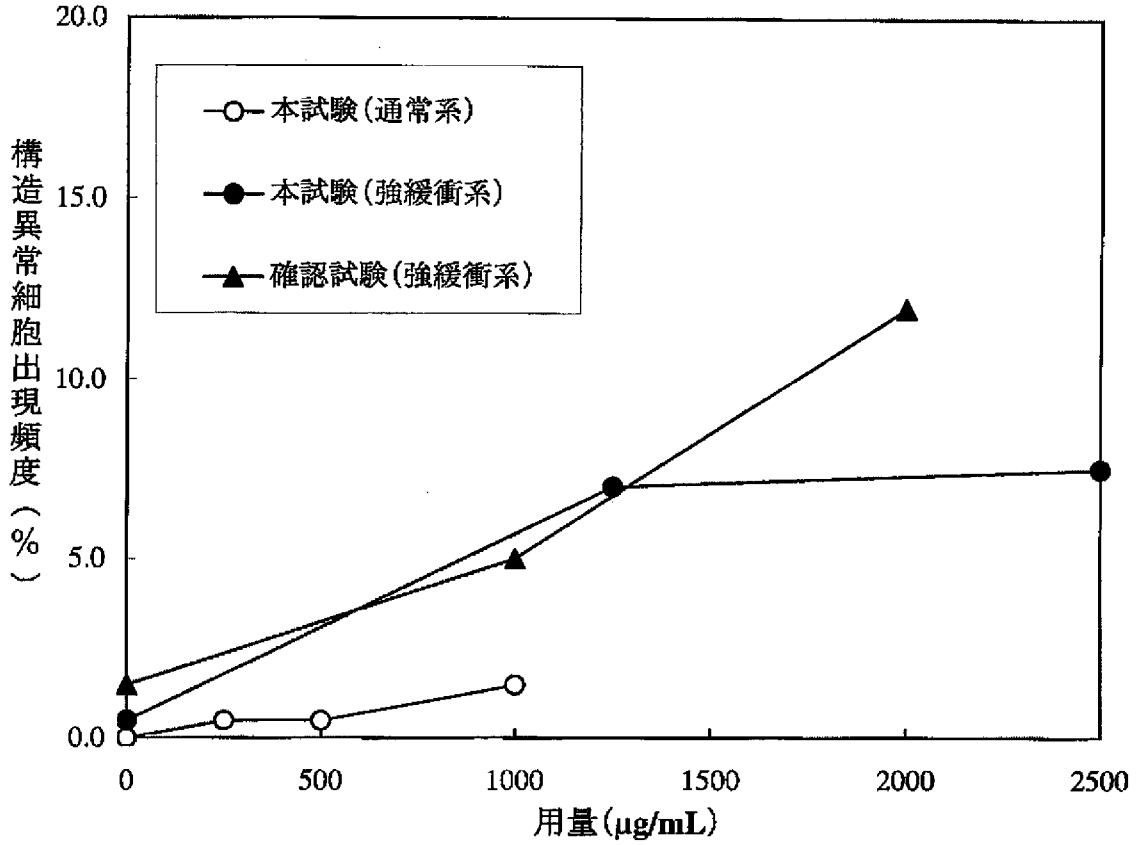
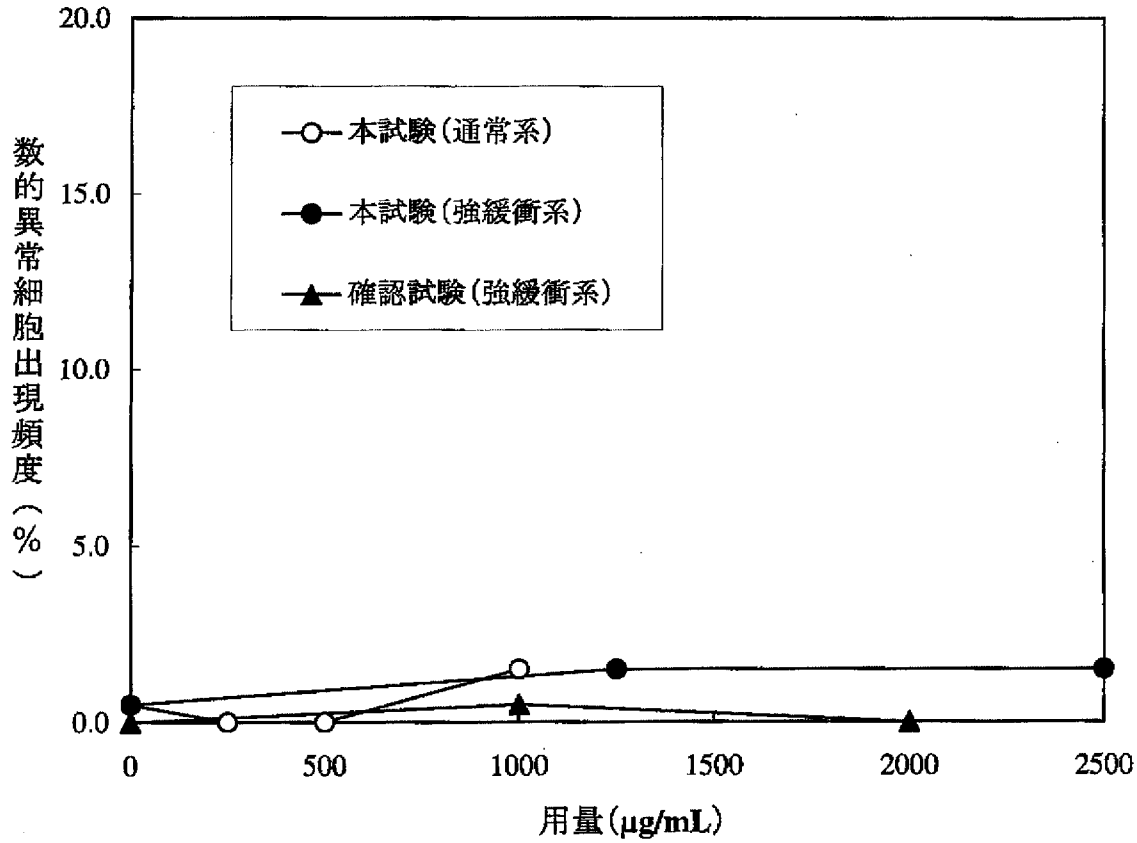



図9 4-メチル安息香酸の数的異常細胞出現頻度
（連続処理法）