

μ -トルイル酸のマウスを用いる小核試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

表題	p-トルイル酸のマウスを用いる小核試験
試験委託者	厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 (東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2)
試験番号	G-05-088
被験物質	p-トルイル酸
試験項目	小核試験
試験資料保管場所	秦野研究所資料保管室
保管期間	試験終了後 10 年間 10 年間経過後の取り扱いについては試験委託者と協議の上決定する。
試験施設	財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 (神奈川県秦野市落合 729-5)

目次

要約	1
試験目的	1
試験ガイドラインと GLP	1
材料と方法	2
1. 被験物質	2
2. 陽性対照物質	2
3. 実験動物および飼育条件	2
4. 投与検体の調製および投与方法	3
5. 試験操作、観察および解析	5
1) 毒性予備試験	5
2) 小核本試験	6
結果と考察	8
1. 毒性予備試験	8
2. 小核本試験	8
参考文献	9
Table	11

要約

p-トルイル酸の生体内における染色体異常誘発性を評価するために、ICR 系マウスを用いて強制経口投与による小核試験を実施した。まず、小核本試験の投与量を決定するために毒性予備試験を行って最大耐量を求め、その結果に基づいて小核本試験を実施し、陰性の結果を得た。

毒性予備試験では、雌雄マウスを用いて、*p*-トルイル酸を 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の用量で、24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。その結果、雌雄ともに死亡は認められなかった。また、500 mg/kg/day 以上の用量で、雌雄ともに同様の毒性症状が認められた。したがって、雌雄マウスの間には毒性の明らかな性差は認められず、いずれも最大耐量は 2000 mg/kg/day 以上であった。

毒性予備試験の結果に基づき、小核本試験は、雄マウスを用いて *p*-トルイル酸を 500、1000 および 2000 mg/kg/day の用量で、24 時間間隔で 2 回強制経口投与し、最終投与の 24 時間後に骨髓の塗抹標本作製し、小核の観察を行った。その結果、*p*-トルイル酸の投与による小核出現頻度に、統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、cyclophosphamide monohydrate を 50 mg/kg 投与した陽性対照群では、小核出現頻度が 1%水準で有意に増加し、本試験系が生体内における染色体異常検出系として技術的に問題ないものであることが確認された。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、陰性対照群とそれ以外の群との間に統計学的に有意な差は認められず、被験物質の投与による骨髓細胞の増殖抑制作用は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、*p*-トルイル酸は、マウス骨髓細胞において染色体異常誘発作用を示さないものと結論する。

試験目的

p-トルイル酸の生体内における染色体異常誘発性を検討するために、マウス骨髓細胞を用いる小核試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第

1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、一部改正 平成 17 年 4 月 1 日)および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 474/哺乳動物の赤血球を用いる小核試験」(1997 年 7 月 21 日採択)に準拠し、「化学物質 GLP」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、最終改正 平成 17 年 4 月 1 日)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である *p*-トルイル酸[別名:4-メチル安息香酸、略称:MBA、英名:benzoic acid, 4-methyl-, CAS No.:99-94-5、分子量:136.15、分子式: $C_8H_8O_2$ 、ロット番号: 含量: 99.3%、製造:]は、ごくうすい黄褐色結晶性粉末である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は 使用時まで密閉容器に入れ、遮光条件下で室温保管した。

被験物質原体の安定性については、被験物質提供者において、実験終了後に返却した被験物質の含量を分析した結果、被験物質は実験期間中安定であったことが確認された(Appendix 2、GLP 基準外)。なお、被験物質原体の安定性については GLP 基準下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、実験期間中安定であり、当該試験の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質は、cyclophosphamide monohydrate(略称:CP、CAS No.: 6055-19-2、ロット番号:113K1406、純度:99.8%、製造者:Sigma Chemical)を用いた。陽性対照物質は 2005 年 1 月 18 日に購入し、使用時まで冷蔵した。

3. 実験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(CRJ)厚木飼育センターから 8 週齢で購入した ICR 系マウス[Crlj:CD1(ICR), SPF]を、入荷日を含む 6 日間(毒性予備試験)あるいは 7 日間(小核本試験)、検疫と馴化を兼ねて飼育し、外観および一般状態に異常の認められない動物を 9 週齢で試験に使用した。検疫期間中は、動物には、油性フェルトペンにより尾に入荷動物番号を記し、飼育

ケージには、試験番号、性別、入荷動物番号および入荷日を記載した動物カードを付けて個体識別を行った。各試験に用いた動物の入荷日、匹数および入荷時体重範囲を以下に示す。余剰動物は、各試験の最終観察終了後に炭酸ガスにより安楽死させた。

試験	入荷日	入荷動物数	体重範囲
毒性予備試験	2006 年 8 月 2 日	雄 15 匹	28.3～32.7 g
		雌 15 匹	25.6～27.7 g
小核本試験	2006 年 8 月 16 日	雄 30 匹	28.8～32.9 g

動物は、全飼育期間を通じて、許容温度:21.0～25.0℃、許容湿度:40.0～75.0%、換気回数:約 15 回/時間、照明 12 時間(7 時～19 時)に設定された飼育室内で、床敷としてペーパーグリーン(日本エスエルシー)を入れた TPX 樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm、CRJ)に 1 匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温度および湿度の実測値はそれぞれ 22.0～24.5℃および 49.0～71.0%であり、いずれも許容範囲内にあった。また、供給した飼料、水および床敷の分析結果では、試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかった。

動物の群分けは、検疫終了時の測定体重が、平均値の±20%以内の範囲にある動物の中から雌雄各 12 匹(毒性予備試験)および雄 25 匹(小核本試験)を選択し、体重別層化無作為抽出法により行った。群分け後の動物には、油性フェルトペンにより尾に動物番号を記し、ケージには、群ごとに色の異なる動物カードに、試験番号、性、群(投与量)および動物番号を記入して飼育ケージに付けて個体識別を行った。

4. 投与検体の調製および投与方法

被験物質は、0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液(0.5% CMC Na)中で、良好な懸濁状態が得られることから、被験物質の媒体(陰性対照物質)として 0.5% CMC Na を用いた。0.5% CMC Na は、日局カルメロースナトリウム(製造番号:4720、丸石製薬)を日局注射用水(製造番号:K6A81、大塚製薬工場)に溶解して 0.5 w/v%に調製した。0.5% CMC Na は、調製後、冷蔵、遮光条件下で保管し、調製後 1 週間以内に使用した。

被験物質投与検体は、濃度ごとに調製を行った。すなわち、濃度ごとに被験物質を秤量し、乳鉢および乳棒を用いて磨砕しながら 0.5% CMC Na を加えて懸濁した。各懸濁液は、コンディショニングミキサー「あわとり練太郎」(型式:AR-360M)を用いてミキシングした(公転速度:2000 rpm、

自転速度:600 rpm、5 分)後、メートルグラスを用い、0.5% CMC Na を加えて各濃度の被験物質投与検体を調製した。被験物質投与検体は、調製後、冷蔵(実測値:2~5℃)、遮光、気密条件下で保管し、調製後 3 日以内に使用した。被験物質投与検体の調製濃度を以下に示す。

毒性予備試験:25.0、50.0、100 および 200 mg/mL

小核本試験:50.0、100 および 200 mg/mL

被験物質投与検体の調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。

なお、被験物質は媒体中で、1.00 および 200 mg/mL の濃度において冷蔵で 3 日間の安定性および均一性が、秦野研究所で実施した別試験(試験番号:A-01-069)において確認されている。

小核本試験に用いた全ての被験物質投与検体については、秦野研究所で、下記の高速液体クロマトグラフ(HPLC)法を用いて含量測定および均一性試験を行った。

分析法

被験物質投与検体の 1 mL を採取し、メタノールで一定量とした後、メタノールで適宜希釈して試料溶液を調製した。別に、被験物質を必要量ひょう取し、メタノールに溶解して標準溶液(2、5 あるいは、10 µg/mL)を調製した。試料溶液および標準溶液を以下の HPLC 法で測定し、標準溶液から作成する検量線を用いて濃度を求めた。

HPLC 条件

分析カラム	Inertsil ODS-2(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 µm、 ジーエルサイエンス)
移動相	0.1%リン酸/アセトニトリル混液(6:4 v/v)
流量	1.0 mL/min
カラム設定温度	40℃
測定波長	254 nm
試料注入量	10 µL
オートインジェクタ洗浄液	メタノール

含量測定および均一性試験の結果、50.0、100 および 200 mg/mL 調製液中の *p*-トルイル酸の平均含量と投与検体あたり 3 試料の測定値のばらつきは、それぞれ 99.4、95.4%および 95.9%と、

平均値の 98.6～102%であり、いずれも、試験計画書に記載した許容基準(含量:85.0～115%、均一性:平均値の 90.0～110%)を満たした(Appendix 3)。

陽性対照物質の CP については、日局生理食塩液(製造番号:K6A78、大塚製薬工場)に溶解して、5 mg/mL 溶液を調製し、速やかに投与に用いた。

陰性対照物質および被験物質は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づいて強制経口投与とし、注射筒およびマウス用胃管を用いて 24 時間間隔で 2 回投与した。陽性対照物質は、注射筒およびマウス用胃管を用いて 1 回強制経口投与した。毒性予備試験の投与は 2006 年 8 月 8 および 9 日に、小核本試験の投与は 2006 年 8 月 23 および 24 日(陽性対照群は 2006 年 8 月 24 日のみ)に行った。投与時刻は、いずれも午前 10 時～11 時の間であった。投与容量は 10 mL/kg/day とし、初回投与の直前に測定した体重に基づいて個体ごとに算出した。初回投与時の体重範囲は、毒性予備試験では雄:31.9～36.8 g、雌:28.2～32.2 g、小核本試験では雄:32.9～37.9 g であった。

5. 試験操作、観察および解析

1) 毒性予備試験

①実験群の設定

毒性予備試験においては、雌雄のマウスを用いて以下の被験物質投与群を設け、各群の動物数を雌雄各 3 匹とした。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号	
			雄	雌
MBA 250 mg/kg/day 投与群	10	2	T1～T3	T13～T15
MBA 500 mg/kg/day 投与群	10	2	T4～T6	T16～T18
MBA 1000 mg/kg/day 投与群	10	2	T7～T9	T19～T21
MBA 2000 mg/kg/day 投与群	10	2	T10～T12	T22～T24

②一般状態の観察

各投与の直後、約 6 時間後および 22～24 時間後に生死および一般状態を観察した。

2) 小核本試験

① 実験群の設定

毒性予備試験の結果に基づいて、雄マウスを用いて 500、1000 および 2000 mg/kg/day の被験物質投与群と、陰性対照群(媒体:10 mL/kg/day)および陽性対照群(CP:50 mg/kg)を加えた 5 群構成とし、各群 5 匹の動物に投与を行った。なお、陽性対照の CP については、ICR 系雄マウスに 50 mg/kg の用量を単回強制経口投与した場合、投与後 24 時間に小核を有する幼若赤血球の出現頻度が有意に増加することが、秦野研究所において確認されている。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号
陰性対照群 (0.5% CMC Na)	10	2	1～5
MBA 500 mg/kg/day 投与群	10	2	6～10
MBA 1000 mg/kg/day 投与群	10	2	11～15
MBA 2000 mg/kg/day 投与群	10	2	16～20
陽性対照群 (CP 50 mg/kg)	10	1	21～25

② 一般状態の観察

各投与の直後、約 6 時間後および 22～24 時間後に生死および一般状態を観察した。

③ 骨髓塗抹標本の作製

小核の観察のための骨髓塗抹標本は、Hayashi らの論文¹⁾に従って最終投与約 24 時間後に作製した。頸椎脱臼法によりマウスを安楽死させ、両側の大腿骨を摘出した後、その両端を切断して 0.6 mL のウシ胎仔血清 (Lot No.: 1248874、Life Technologies) で骨髓細胞を遠心管に洗い出し、200×g で 5 分間遠心分離して上清を除いた。沈渣をピペッティングした後、骨髓細胞浮遊液から各個体につき 3 枚の骨髓塗抹標本作製した。骨髓塗抹標本には、試験番号と動物番号およびスライド番号を記入した。骨髓塗抹標本は、自然乾燥後、メタノールで 5 分間固定した。骨髓塗抹標本には、コード番号表に従って、試験番号とコード番号およびスライド番号を記載したラベルを貼付してコード化し、標本観察時まで室温で保管した。

④骨髓塗抹標本のアクリジンオレンジ(AO)蛍光染色および小核の観察

ゼーレンゼンの 1/15 mol/L リン酸緩衝液に溶解した 40 µg/mL の AO 溶液を標本観察の直前に骨髓塗抹標本に数滴滴下し、カバーガラスをかけて 510 nm の吸収フィルターが装着されたブルー励起の蛍光顕微鏡下で、100 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズを用いて観察した。骨髓塗抹標本は、各個体について 2 名の観察者により観察した。1 匹あたり 2000 個 (1 名あたり 1000 個) の幼若赤血球を観察し、そのうち小核を有する幼若赤血球の数を記録した。また、骨髓細胞の増殖抑制の指標として、1 匹あたり 1000 個 (1 名あたり 500 個) の赤血球 (幼若赤血球および成熟赤血球) を観察して、幼若赤血球の数を記録した。

⑤統計解析

(小核出現頻度)

陰性対照群と陽性対照群の小核出現頻度 (平均値) が、秦野研究所の背景データのばらつきの範囲 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) 内にあるか否かを調べた。

小核出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群および陽性対照群の間で、Fisher の正確確率検定法 (片側検定) を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して Bonferroni の補正²⁾を行った。また、小核出現頻度の用量 (対数値) 依存性について、Cochran-Armitage の傾向検定³⁾ (片側検定) を行った。いずれの検定についても、有意水準は 5% および 1% とした。

(赤血球中に占める幼若赤血球の比率)

骨髓細胞の増殖抑制の指標としての幼若赤血球の比率について、まず Bartlett 検定⁴⁾により陽性対照群を除く各群の分散の一致性の検定を行った。その結果、等分散であったことから、Dunnett 検定⁵⁾ (両側検定) を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均値の差の検定を行った。陰性対照群と陽性対照群との比較については、F 検定⁴⁾により 2 群間の分散の一致性の検定を行い、等分散であったことから Student の *t* 検定⁴⁾ (両側検定) を行った。Bartlett 検定および F 検定の有意水準は 5% とした。Dunnett 検定および Student の *t* 検定の有意水準は 5% および 1% とした。

幼若赤血球の比率に関する統計解析の結果をもとに、用量反応性および陰性対照群の背景データ等を参考にして、被験物質の骨髓細胞の増殖への影響を調べた。

⑥判定

被験物質が骨髓細胞において、染色体異常誘発作用を示すか否かの判定は、統計解析の結果をもとに、用量反応性および陰性対照群の背景データ、骨髓細胞の増殖への影響等を参考にして総合的に行った。

結果と考察

1. 毒性予備試験

雌雄マウスを用いて 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、24 時間間隔で 2 回強制経口投与による毒性予備試験を実施した。その結果、雌雄ともに死亡は認められなかった。また、500 mg/kg/day 以上の用量で、雌雄ともに自発運動低下あるいは腹臥位姿勢が認められた (Appendix 4)。

上記の結果から、毒性症状に明らかな性差は認められず、雌雄ともに最大耐量は 2000 mg/kg/day 以上であった。従って、小核本試験は雄のみを用いて、高用量を 2000 mg/kg/day として行うこととした。

2. 小核本試験

いずれの投与群においても、死亡は認められなかった (Appendix 5)。

小核出現頻度および赤血球中に占める幼若赤血球の比率を Table 1 に示す。陰性対照群および陽性対照群の小核出現頻度 (平均値) は、いずれも秦野研究所の背景データ (Appendix 6) のばらつきの範囲 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) 内であった。

被験物質投与群の小核出現頻度は、いずれの用量においても陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量に依存して有意に増加する傾向もみられなかった。一方、CP を投与した陽性対照群では、小核出現頻度が 1% 水準で有意に増加し、本試験系が生体内に

おける染色体異常検出系として技術的に問題ないものであることが確認された。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、陰性対照群とそれ以外の群との間に統計学的に有意な差は認められず、被験物質の投与による骨髓細胞の増殖抑制作用は認められなかった。この試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について」に示された投与量の上限である 2000 mg/kg/day を最高用量としていることから、試験結果は小核誘発性を評価する上で十分信頼性の高いものと考えられる。

なお、本被験物質については、復帰突然変異試験では陰性、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では陽性の結果が報告されている⁶⁾。関連物質である4-ヒドロキシ安息香酸については、復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でともに陰性の結果が報告されている⁷⁾。3-メチル安息香酸については、復帰突然変異試験では陰性、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では陽性の結果が報告されている⁸⁾。

以上の結果から、本試験条件下では、マウス骨髓細胞において、*p*-トルイル酸は染色体異常誘発作用を示さないものと結論する。

参考文献

- 1) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T.: In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.* 312: 293-304 (1994)
- 2) Margolin, B. H., Resnick, M. A., Rimpo, J. Y., Archer, P., Galloway, S. M., Bloom, A. D., Zeiger, E.: Statistical analyses for in vitro cytogenetic assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mutagen.* 8: 183-204 (1986)
- 3) Margolin, B. H., Risko, K. J.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" Ashby, J. et al. eds., Cambridge Univ. Press (1988), vol.1. pp. 29-42
- 4) Snedecor, G. W., Cochran, W. G.: in "Statistical Methods" 7th ed., Iowa State University Press, Iowa (1980)
- 5) Dunnett, C. W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121 (1955)

- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.11, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.195-239 (2004)
- 7) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.5, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.247-273 (1997)
- 8) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.297-322 (1999)

Table 1. Results of micronucleus test in male CD1 (ICR) mice after double oral administrations of benzoic acid, 4-methyl-

Group	Animal No.	% of MNPCEs ^a	% of PCEs in ERYs ^b
Negative control 0.5% CMC Na 10 mL/kg/day	1	0.15	55.0
	2	0.05	41.3
	3	0.25	48.6
	4	0.05	53.3
	5	0.15	49.8
	Total	13 / 10000	2480 / 5000
	Mean $\pm$ S.D.	0.13 $\pm$ 0.08	49.6 $\pm$ 5.3
	Min. - Max.	0.05 - 0.25	41.3 - 55.0
Benzoic acid, 4-methyl- 500 mg/kg/day	6	0.10	41.1
	7	0.00	47.5
	8	0.05	58.7
	9	0.20	57.0
	10	0.05	40.4
	Total	8 / 10000	2447 / 5000
	Mean $\pm$ S.D.	0.08 $\pm$ 0.08	48.9 $\pm$ 8.6
	Min. - Max.	0.00 - 0.20	40.4 - 58.7
Benzoic acid, 4-methyl- 1000 mg/kg/day	11	0.20	58.3
	12	0.15	58.1
	13	0.10	45.2
	14	0.00	42.4
	15	0.10	62.6
	Total	11 / 10000	2666 / 5000
	Mean $\pm$ S.D.	0.11 $\pm$ 0.07	53.3 $\pm$ 8.9
	Min. - Max.	0.00 - 0.20	42.4 - 62.6
Benzoic acid, 4-methyl- 2000 mg/kg/day	16	0.00	41.0
	17	0.20	46.3
	18	0.05	51.5
	19	0.00	48.1
	20	0.00	49.9
	Total	5 / 10000	2368 / 5000
	Mean $\pm$ S.D.	0.05 $\pm$ 0.09	47.4 $\pm$ 4.1
	Min. - Max.	0.00 - 0.20	41.0 - 51.5
Positive control CP 50 mg/kg	21	2.85	57.2
	22	1.70	39.8
	23	1.85	46.4
	24	2.00	54.1
	25	1.25	37.8
	Total	193 / 10000 **	2353 / 5000
	Mean $\pm$ S.D.	1.93 $\pm$ 0.59	47.1 $\pm$ 8.5
	Min. - Max.	1.25 - 2.85	37.8 - 57.2

a, % of micronucleated polychromatic erythrocytes in polychromatic erythrocytes observed

b, % of polychromatic erythrocytes in erythrocytes observed

0.5% CMC Na, 0.5 w/v% Carboxymethyl cellulose sodium salt solution

CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)

**, Significantly higher than the negative control at 1% level.

General condition and mortality in CD1 (ICR) mice after double oral administrations of benzoic acid, 4-methyl- in the preliminary toxicity test

Sex	Dose (mg/kg/day)	Number of mice administered	General condition	Number of mice						Mortality
				Hours after the 1st administration			Hours after the 2nd administration			
				0	6	22-24	0	6	22-24	
Male	250	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	500	3	No abnormality	1	3	3	0	3	3	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	2	0	0	3	0	0	
	1000	3	No abnormality	0	3	3	0	3	3	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	3	0	0	3	0	0	
	2000	3	No abnormality	0	3	3	0	3	3	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	3	0	0	3	0	0	
			Prone position	3	0	0	3	0	0	
Female	250	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	500	3	No abnormality	1	3	3	0	3	3	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	2	0	0	3	0	0	
	1000	3	No abnormality	0	3	3	0	3	3	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	3	0	0	3	0	0	
	2000	3	No abnormality	0	3	3	0	3	3	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	3	0	0	3	0	0	
			Prone position	3	0	0	3	0	0	

General condition and mortality in male CD1 (ICR) mice after double oral administrations of benzoic acid, 4-methyl- in the micronucleus test

Group	Number of mice administered	General condition	Number of mice						Mortality
			Hours after the 1st administration			Hours after the 2nd administration			
			0	6	22-24	0	6	22-24	
Negative control 0.5% CMC Na 10 mL/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
Benzoic acid, 4-methyl- 500 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	3	5	5	0 / 5
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	2	0	0	
Benzoic acid, 4-methyl- 1000 mg/kg/day	5	No abnormality	0	5	5	0	5	5	0 / 5
		Decrease in locomotor activity	5	0	0	5	0	0	
Benzoic acid, 4-methyl- 2000 mg/kg/day	5	No abnormality	0	5	5	0	5	5	0 / 5
		Decrease in locomotor activity	5	0	0	5	0	0	
		Prone position	2	0	0	5	0	0	
Positive control CP 50 mg/kg	5	No abnormality	5	5	5				0 / 5
0.5% CMC Na, 0.5 w/v% Carboxymethyl cellulose sodium salt solution CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)									

Historical data of micronucleus test with male CD1 (ICR) mice in Hatano Research Institute

(from May 23, 1994 to July 27, 2006)

Group	Sampling time (hours)	Number of experiments	Number of animals / group	Percent of MNPCEs / PCEs ^a	Perecent of PCEs / ERYs ^a
Negative control (vehicle ^b)	24, 48, 72	75	5	0.13 ± 0.03 (0.05 ~ 0.24) ^c	53.1 ± 4.1 (45.6 ~ 62.7) ^c
Positive control (CP 50 mg/kg)	24	66	5	1.99 ± 0.41 (1.01 ~ 3.49) ^c	52.3 ± 5.1 (33.7 ~ 64.7) ^c

a, Mean ± S.D. of each experimental means

b, Distilled water for injection JP, methyl cellulose solution (0.5 and 1%), carboxymethyl cellulose sodium salt solution (1%), saline and olive oil were used as vehicles.

c, Range (Min.-Max.)

CP, Cyclophosphamide monohydrate