

最終報告書

4-メチルベンズアルデヒドのマウスを用いる小核試験

試験番号： [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

目次

目次.....	2
試験情報.....	4
最終報告書の作成.....	6
試験責任者及び試験従事者.....	7
1 要約.....	8
2 緒言.....	9
3 試験材料及び方法.....	9
3.1 被験物質.....	9
3.2 陽性対照物質.....	9
3.3 媒体.....	10
3.3.1 被験物質の調製に用いた媒体.....	10
3.3.2 陽性対照物質の調製に用いた媒体.....	10
3.4 供試動物.....	11
3.5 試験系選択理由.....	11
3.6 動物管理.....	11
3.6.1 飼育条件.....	11
3.6.2 収容ケージ及び床敷.....	12
3.6.3 飼料及び給餌方法.....	12
3.6.4 飲料水及び給水方法.....	12
3.6.5 個体識別法.....	12
3.7 投与方法.....	13
3.8 投与経路及び投与方法の選択理由.....	13
3.9 投与量及び群構成.....	13
3.9.1 用量設定試験.....	13
3.9.2 本試験.....	14
3.10 投与量の設定理由.....	14
3.11 投与回数及び標本採取時期とその選択理由.....	14
3.12 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度.....	14
3.12.1 用量設定試験の投与液濃度及び調製量.....	15
3.12.2 本試験の投与液濃度及び調製量.....	15

3.13	陽性対照物質の投与液の調製方法	15
3.14	測定項目及び観察	15
3.14.1	一般状態	15
3.14.2	体重	15
3.14.3	用量設定試験の観察終了動物の処置	15
3.14.4	標本作製	15
3.14.5	標本観察	16
3.14.6	試験の成立条件	16
3.15	統計処理	16
3.16	判定基準	16
3.17	資料の保管	17
3.18	予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び 試験計画書に従わなかつたこと	17
4	試験結果	17
4.1	生存率及び一般状態	17
4.2	体重	17
4.3	小核標本観察結果	17
5	考察	18
6	総括表	20
TABLE 1	: 生存率	21
TABLE 2	: 一般状態	22
TABLE 3	: 体重	23
TABLE 4	: 小核標本観察結果	24
7	個体別表	25
APPENDIX A	: 一般状態	26
APPENDIX B	: 体重	27
APPENDIX C	: 小核標本観察結果	28
8	添付資料	
8.1	: 床敷中汚染物質分析試験成績書	29
8.2	: 飼料中汚染物質分析試験成績書	32
8.3	: 飲料水試験検査成績書	35
8.4	: Background Data for Micronucleus Tests	38
8.5	: 用量設定試験 総括表及び個体別表	40

試験情報

- 試験表題 : 4-メチルベンズアルデヒドのマウスを用いる小核試験
- 試験番号 : [REDACTED]
- 試験目的 : 4-メチルベンズアルデヒドの安全性に関する試験の一環として、4-メチルベンズアルデヒドのマウスを用いる小核試験を行い、生体内での染色体異常誘発性の有無について検討することを目的とした。
- 実施基準 : 本試験は、GLP の対象外として取り扱うが、種々の操作、データの取り扱いなどは試験実施施設の標準操作手順書(SOP)に則って実施した。
- ガイドライン : 本試験は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成 8 年 3 月 22 日付衛化第 29 号生活衛生局長通知）及び「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS」に定める 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (29 July, 2016)に準じて実施した。
- 動物愛護 : 「動物の愛護及び管理に関する法律」（令和元年 6 月 法律第 39 号）、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成 25 年 9 月 環境省告示第 84 号）、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（平成 18 年 6 月 日本学術会議）並びに厚生労働省及び農林水産省の定める動物実験等の実施に関する基本指針に基づいた [REDACTED] 指針（令和元年 10 月 1 日）に従って実施した。
- 試験委託者 : [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- 試験実施施設 : [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- 試験開始日 : [REDACTED]

試験日程

用量設定試験

動物入荷日

:

群分け日

:

被験物質投与日

:

観察終了日

:

本試験

動物入荷日

:

群分け日

:

被験物質投与日

:

:

観察終了及び

:

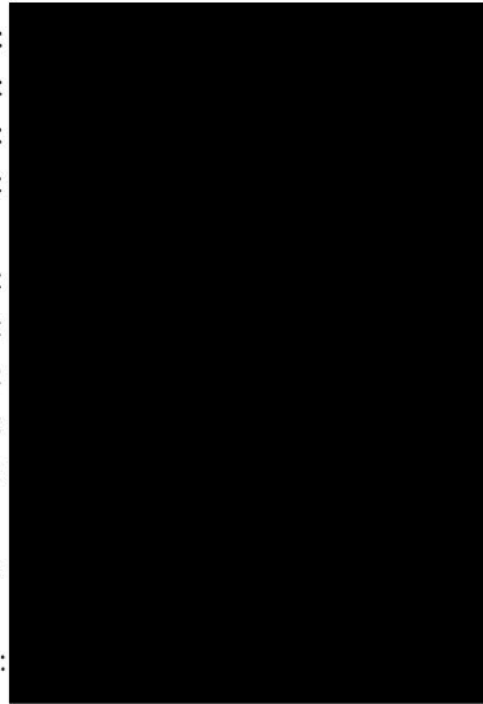
標本作製日

標本観察結果報告日

:

試験終了日

:



試験番号： [REDACTED]

最終報告書の作成

試験表題 : 4-メチルベンズアルデヒドのマウスを用いる小核試験

試験番号 : [REDACTED]

試験責任者 : [REDACTED]

[REDACTED]

試験責任者及び試験従事者

試験責任者 : [REDACTED]

試験主担当者 : [REDACTED]

動物飼育管理 : [REDACTED]

動物入荷・群分け : [REDACTED]

投与液の調製・投与 : [REDACTED]

一般状態観察 : [REDACTED]

体重測定 : [REDACTED]

標本作製 : [REDACTED]

標本観察 : [REDACTED]

集計処理 : [REDACTED]

被験物質管理責任者 : [REDACTED]

検疫管理責任者 : [REDACTED]

[REDACTED]

1 要約

4-メチルベンズアルデヒドの安全性に関する試験の一環として、生体内での染色体異常誘発性の有無を、4-メチルベンズアルデヒドのマウス (CrI:CD1(ICR)系の雄) を用いる小核試験において検討した。

小核試験の用量設定及び性別を設定するために雄雌マウス各 3 匹を割り付け、4-メチルベンズアルデヒドをオリブ油に混合し 2000、1000、500 及び 0 mg/kg (オリブ油) の投与量で、1 日 1 回の 2 日間強制経口投与を行い、最終投与の翌日まで一般状態の観察及び体重測定を実施した。結果、死亡例が 2000 mg/kg 投与群の雄雌で各々 3 例、1000 mg/kg 投与群の雌で 1 例にみられた。一般状態では 1000 mg/kg 投与群の雄で立毛が 1 例、雌では自発運動の低下が 2 例みられた。体重推移では、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に減少がみられた。

したがって本試験では 1000 mg/kg 投与群の雌で死亡例が 1 例みられたものの、雄では体重の減少が 1 例みられたこと、死亡例以外の一般状態では雄雌ともに各々数例に毒性徴候がみられたが継続した症状では無かったことから、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」及び OECD ガイドラインを参考に、片性の雄を用いて 1000 mg/kg を最高投与量とし、以下公比 2 で 500 及び 250 mg/kg を設定した。投与回数は、4-メチルベンズアルデヒド投与群及び陰性対照群とも 24 時間間隔で 2 回投与を実施した。また、陰性対照には媒体のオリブ油を投与し、陽性対照にはマイトマイシン C を用い、1 回投与の 2 mg/kg を設定した。骨髓細胞塗抹標本 (以下、標本) は、最終投与の投与後 24 時間に採取した骨髓について標本作製を行った。標本観察では、多染性赤血球 (PCE) を個体あたり 4000 個観察し、小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) を分別し、その出現率を求めた。また、PCE と正染性赤血球 (NCE) を合わせて個体あたり 1000 個観察し、PCE の割合 $[PCE/(PCE+NCE)]$ を求めた。

本試験の結果、一般状態では、4-メチルベンズアルデヒド投与の 1000 mg/kg 群に立毛及び自発運動の低下が、500 mg/kg 投与群に立毛が観察され毒性徴候がみられた。

体重では、各群の平均値の体重推移に大きな変化はみられなかった。

標本観察では、いずれの 4-メチルベンズアルデヒド投与群においても MNPCE の出現率 (0.122 ~ 0.150%) は陰性対照背景データの上限 (0.25%) を超えず、出現頻度 (24 ~ 30) に関しても Kastenbaum と Bowman の判定表に基づく条件付き二項検定において陰性対照群の出現頻度 (24) との間に有意差は認められなかった。陽性対照群では、MNPCE の出現率 (2.988%) は陰性対照背景データの上限 (0.25%) を超え、MNPCE の出現頻度 (597) についても陰性対照群との間に有意な差が認められた。また、陰性対照群及び各 4-メチルベンズアルデヒド投与群の MNPCE の出現頻度について、コ克蘭・アーミテッジの傾向検定を行い、用量相関関係が無いことを確認した。

同時に観察した PCE の割合において、各 4-メチルベンズアルデヒド投与群に有意な差は認められなかった。しかし、陽性対照群の PCE の割合は陰性対照群に対して統計学的に有意な減少が認められた。

以上の結果より ICR 系 (CrI:CD1) マウスを用いた本試験条件下において、4-メチルベンズアルデヒドの染色体異常誘発性は陰性であると判定した。

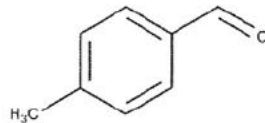
2 緒言

4-メチルベンズアルデヒドの安全性に関する試験の一環として、4-メチルベンズアルデヒドのマウスを用いる小核試験を行い、生体内での染色体異常誘発性の有無について検討した。

3 試験材料及び方法

3.1 被験物質

化学名	: 4-メチルベンズアルデヒド
別名	: パラ-トリルアルデヒド
英語化学名	: 4-methylbenzaldehyde
CAS 番号	: 104-87-0
化学式	: 4-(CH ₃)C ₆ H ₄ CHO
分子量	: 120.15
構造式	:



沸点	: 204℃
融点	: -6℃
ロット番号	: [REDACTED]
純度	: 98.5% (GC 法)
不純物情報	: 情報なし
製造元	: [REDACTED]
入手先	: [REDACTED]
外観及び性状	: 無色～淡黄色の液体
試験責任者入手日	: [REDACTED]
保管条件	: 冷蔵
保管場所	: [REDACTED] (2～10℃)
品質保証期限	: [REDACTED]
保管温度	: 被験物質管理責任者管理：実測値 5 ～ 7℃ ([REDACTED]) 試験責任者管理：実測値 3 ～ 7℃ ([REDACTED])
取り扱い上の注意	: 着火源を生じない。蒸気の吸入、皮膚への接触を避け、 保護具（手袋、マスク等）を使用した。

3.2 陽性対照物質

名称（略称）	: 注射用マイトマイシン C [Mitomycin C (MMC)]
--------	------------------------------------

ロット番号	: [REDACTED]
外観及び性状	: 青紫色の結晶又は結晶性の粉末で、 <i>N,N</i> -ジメチルアセトアミドに溶けやすく、水又はメタノールに溶けにくく、エタノールに極めて溶けにくい。
安定性	: 結晶の状態では常温で安定である。水溶液の状態では pH8.0 では安定であるが、pH7.0 以下では安定性が低下する。
試験責任者入手日	: [REDACTED]
使用期限	: [REDACTED]
規格（製造発売元）	: 抗悪性腫瘍剤（協和キリン株式会社）
純度	: 1 バイアル中に日局マイトマイシン C 2 mg（力価）含有
保管条件	: 室温
保管場所	: [REDACTED]（許容範囲 1~30℃）
保管温度	: 被験物質管理責任者管理：実測値 17.0~22.5℃ [REDACTED] 試験責任者管理：実測値 17.5~22.5℃ [REDACTED]
取り扱い上の注意	: 変異原性物質につき取り扱いに注意し、マスク、ゴム手袋を着用し、吸飲や直接接触を避けた。

3.3 媒体

3.3.1 被験物質の調製に用いた媒体

媒体の選択は、4-メチルベンズアルデヒドの参考情報及び安全データシートを参考に行った。非水溶性であることから、オリーブ油を媒体に選択した。

用量設定試験の最高投与量で用いた 20% (w/v) での調製検討を行い、発泡、発熱、変色、沈殿、懸濁等の物理変化が無いこと、また、肉眼的に均一に溶解されていることを確認した。したがって、安定性及び均一性の確認は行っていないが、投与液として問題が無いと判断した。

名称	: オリーブ油
製造元	: ナカライテスク株式会社
ロット番号	: [REDACTED]
保管条件	: 室温
保管場所	: [REDACTED]

3.3.2 陽性対照物質の調製に用いた媒体

名称	: 日本薬局方注射用水（以下、注射用水）
製造元	: 株式会社大塚製薬工場
製造番号	: [REDACTED]
保管条件	: 室温

保管場所 : [REDACTED]

名称 : 日本薬局方生理食塩液 (以下、生理食塩液)

製造元 : 株式会社大塚製薬工場

製造番号 : [REDACTED]

保管条件 : 室温

保管場所 : [REDACTED]

3.4 供試動物

動物種 : マウス

系統 : Crl: CD1(ICR) (SPF 動物)

性 : 用量設定試験、雄雌
本試験、雄

入荷時週齢 : 用量設定試験及び本試験共に 7 週齢

投与開始時週齢 : 用量設定試験及び本試験共に 8 週齢

購入 (使用) 匹数 : 用量設定 雄、注文数 18 匹、購入数 19 匹 (12 匹)
雌、注文数 18 匹、購入数 19 匹 (12 匹)
本試験 雄、注文数 32 匹、購入数 33 匹 (28 匹)

供給源 : 日本チャールス・リバー(株) 日野飼育センター

所在地 : 〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735 番地

検疫・馴化期間 : 用量設定試験及び本試験共に 6 日間

検疫・馴化期間中の検査 : 体重測定 (入手翌日、群分け体重)
一般状態の観察 (1 日 1 回)

初回投与時の動物の体重範囲 : 平均体重の $\pm 20\%$ 以内であった。

群分け後の余剰動物の処置 : 試験系から除外した。

3.5 試験系選択理由

マウスは、小核試験に多用されている動物種であり、また、本系統は微生物学的に統御され、遺伝的に安定であり、累積データが豊富であることから選択した。

3.6 動物管理

3.6.1 飼育条件

飼育室 : [REDACTED] (検疫及び馴化期間も同様に [REDACTED] で飼育)

温度 : 実測値 ; 用量設定試験 21.8~23.0℃ (設定温度 ; 22 \pm 3℃)
本試験 21.1~22.8℃ (設定温度 ; 22 \pm 3℃)

相対湿度 : 実測値 ; 用量設定試験 46~53% (設定範囲 ; 55 \pm 15%)
本試験 46~52% (設定範囲 ; 55 \pm 15%)

照明時間 : 12 時間 / 日 (7:00~19:00)

換気回数	: 10 回以上/時間
飼育匹数	: 1 匹/ケージ (検疫・馴化期間中も 1 匹/ケージ)
ケージ (床敷) 交換頻度	: 1 回/週
給水瓶交換頻度	: 1 回/週

3.6.2 収容ケージ及び床敷

ケージ	: プラスチック製ケージ (W143×D293×H148 mm)
ケージ蓋	: ステンレス製
消毒方法	: プラスチック製ケージは常圧蒸気殺菌 ケージ蓋は高圧蒸気滅菌
床敷	: ソフトチップ (有限会社 原商店)
消毒方法	: 高圧蒸気滅菌
床敷中の環境汚染物質	: 中部科学資材(株)(有限会社 原商店の代理店) より分析値を入手し、当研究所で定める最大許容濃度以下であり、試験への影響がないことを確認した (8 添付資料 8.1)。

3.6.3 飼料及び給餌方法

飼料	: オリエンタル酵母工業(株)製固型飼料 MF
ロット番号	: XXXXXXXXXX
給餌方法	: ケージ蓋に取り付けられている給餌器に入れ、自由摂取させた。
給餌器の消毒方法	: 高圧蒸気滅菌
飼料中の汚染物質	: オリエンタル酵母工業(株)より分析値を入手し、当研究所における最大許容濃度以下であり、試験への影響がないことを確認した (8 添付資料 8.2)。

3.6.4 飲料水及び給水方法

飲料水	: XXXXXXXXXX 上水道水
給水方法	: 透明な給水瓶を用いて自由摂取
給水瓶の消毒方法	: 給水瓶は常圧蒸気殺菌 給水栓はピューラックス (株)オーヤラックス) 消毒
飲料水中の汚染物質	: 下記の分析機関に分析を依頼し、分析値が当研究所における水質基準に適合していることを定期的 (年 2 回) に判定し、試験への影響がないことを確認した (8 添付資料 8.3)。 株式会社 環境科学研究所 XXXXXXXXXX

3.6.5 個体識別法

検疫及び馴化期間中	: ケージラベルに試験番号 (用量設定試験、本試験)、性別、仮動物番号及び検疫管理責任者名を明記した。動物の個体識別は、ケージ
-----------	---

群分け後 ラベル及び油性インク法（尾部）により識別した。
 : ケージラベルに試験番号（用量設定試験、本試験）、性別、群番号、被験物質名及び投与濃度（投与濃度ごとに異なった色で表示を行い識別した）、動物番号、投与開始日、標本作製日（ただし用量設定試験は観察終了日）、試験責任者名を明記した。動物の個体識別は、ケージラベル及び油性インク法（尾部）により識別した。

3.7 投与方法

被験物質投与群及び陰性対照（媒体）群は、ディスポーザブル注射筒（テルモ株、1 mL）にディスポーザブルマウス用経口ゾンデ（有）フチガミ器械）を装着して、強制経口投与を行った。投与間隔は24時間（用量設定試験-1分、本試験±0分）とし、1日1回、2日間投与を行った。

陽性対照群は、ディスポーザブル注射筒（テルモ株、1 mL）にディスポーザブル注射針（ニプロ株、25G）を装着して腹腔内に単回投与を行った。また、投与前日から標本作製までの間は、ディスポーザブルのインナーケージをプラスチック製ゲージに重ねて使用した。

投与量については投与日の体重に基づいて算出した。

3.8 投与経路及び投与方法の選択理由

投与経路は、ヒトが被験物質に暴露される可能性の高い経路である経口投与とし、強制経口投与方法を選択した。また、陽性対照物質は、通常小核試験で実施される腹腔内投与を選択した。

これらの投与方法は、規定量を確実に投与可能な投与方法であるため選択した。

3.9 投与量及び群構成

3.9.1 用量設定試験

投与前日に、雄雌マウス各19匹より各々12匹の動物をコンピューターによる体重を基にした体重層別法により選び、次表の通り片性4群（3匹/群）にそれぞれ群分けした。各群の体重の分散が均一であることをBartlett法による等分散検定（5%水準）で確認した。投与開始時におけるマウスの体重範囲は、雄33.6g～37.5g、雌で26.8g～29.1g、平均体重の±20%以内であった。

被験物質の投与量、投与容量、1群当たりの匹数及び動物番号は、次表の通りである。

性別	群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	匹数	動物番号
雄	11M	オリブ油（媒体）	0	10	3	11M01~11M03
	12M	4-メチルベンズアルデヒド	500	10	3	12M01~12M03
	13M	4-メチルベンズアルデヒド	1000	10	3	13M01~13M03
	14M	4-メチルベンズアルデヒド	2000	10	3	14M01~14M03
雌	11F	オリブ油（媒体）	0	10	3	11F01~11F03
	12F	4-メチルベンズアルデヒド	500	10	3	12F01~12F03
	13F	4-メチルベンズアルデヒド	1000	10	3	13F01~13F03
	14F	4-メチルベンズアルデヒド	2000	10	3	14F01~14F03

3.9.2 本試験

投与前日に、雄マウス 33 匹より 28 匹の動物をコンピューターによる体重を基にした体重層別法により選び、次表の通りに群分けし、各群の体重の分散が均一であることを Bartlett 法による等分散検定（5%水準）で確認した。投与開始時におけるマウスの体重範囲は、33.0~37.5 g で、平均体重の±20%以内であった。

被験物質の投与量、投与容量、1 群当たりの匹数及び動物番号は、次表の通とした。

性別	群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	匹数	動物番号
雄	01M	オリブ油（媒体）	0	10	5	01M01~01M05
	02M	4-メチルベンズアルデヒド	250	10	5	02M01~02M05
	03M	4-メチルベンズアルデヒド	500	10	5	03M01~03M05
	04M	4-メチルベンズアルデヒド	1000	10	8	04M01~04M08
	05M	Mitomycin C	2	10	5	05M01~05M05

3.10 投与量の設定理由

用量設定試験の投与量は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」及び「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS」を参考に最高投与量として 2000 mg/kg を設定し、以下公比 2 で 1000 及び 500 mg/kg を設定した。陰性対照として媒体のオリブ油を投与した。

用量設定試験の結果、2000 mg/kg 群の雄雌で各々 3 例（3/3）の死亡がみられ、1000 mg/kg 群の雌で 1 例（1/3）死亡がみられた。一般状態において、1000 mg/kg 群の雄では立毛が 1 例、雌では自発運動の低下 2 例（2/3）観察された。体重推移では、1000 mg/kg 群の雄 1 例（1/3）に 2 回投与後に減少がみられた。したがって、1000 mg/kg 群では雌のみ死亡例が認められたものの、雄で体重の減少が 1 例みられたこと、症状観察では、雄雌ともに安楽死を必要とする症状は観察されず、数例に軽度な毒性徴候が観察されたが継続して観察されなかったことから、本試験では片性の雄を用いて 1000 mg/kg を最高用量とし、以下公比 2 で 500 及び 250 mg/kg を設定した。ただし、1000 mg/kg 投与群については標本作製時に 5 匹の動物を確保するため動物数を増やし、1 群 8 匹とした。

陰性対照として媒体のオリブ油を投与し、陽性対照には Mitomycin C を用い、陽性反応の得られる用量として 2 mg/kg を投与した。

3.11 投与回数及び標本採取時期とその選択理由

投与回数は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」及び OECD のガイドラインを参考に、被験物質投与群と陰性対照群とも 24 時間間隔で 2 回とし、標本採取は最終投与から 24 時間後に行った。陽性対照群は単回投与で、標本採取は投与 24 時間後に行った。

3.12 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度

次表に従い必要量の被験物質を電子天秤 CPA124S 型（ザルトリウス㈱）を用いて、メスシリンダーに量り取り、オリブ油を加え所定量にメスアップ後、転倒混和を繰り返し均一にした。なお、投与液は用時調製とし、投与液の濃度確認は実施しなかった。

3.12.1 用量設定試験の投与液濃度及び調製量

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (%)	被験物質量 (mg)	調製量 (mL)
12M,12F	4-メチルベンズアルデヒド	500	5	250	5
13M,13F	4-メチルベンズアルデヒド	1000	10	500	5
14M,14F	4-メチルベンズアルデヒド	2000	20	1000	5

3.12.2 本試験の投与液濃度及び調製量

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (%)	被験物質量 (mg)	調製量 (mL)
02M	4-メチルベンズアルデヒド	250	2.5	250	10
03M	4-メチルベンズアルデヒド	500	5	500	10
04M	4-メチルベンズアルデヒド	1000	10	1000	10

3.13 陽性対照物質の投与液の調製方法

マイトマイシン C、1 バイアル(2 mg)を注射用水 5 mL で溶解後、生理食塩液で 10 mL にメスアップした。調製は用時調製とし、投与液の安定性については、陽性結果が得られたことをもって確認した。

3.14 測定項目及び観察

3.14.1 一般状態

投与日は、投与前 1 回、投与後 2 回（1-3 時間後・5-6 時間後）の計 3 回、投与終了日の翌日は 1 回（午前）、投与された動物について一般行動、中毒症状、生死などについて観察し、個体別に記録した。

3.14.2 体重

生存動物について、本試験では投与開始日から標本作製日まで毎日、用量設定試験では、最終投与の翌日まで、電子天秤 LA4200 型（ザルトリウス株）を用いて個体別に体重を測定した。

3.14.3 用量設定試験の観察終了動物の処置

最終観察終了後の生存動物は、試験系から除外した。

3.14.4 標本作製

最高投与量の 1000 mg/kg 投与群（04M）については、8 匹（8/8）の生存動物の若い番号から順に 5 匹（04M01～04M05）を標本作製に用いた。

本試験の最終投与の 24 時間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、大腿骨の両端を骨剪刀で切断し、骨髓細胞を牛胎仔血清（CORNING、FBS、ロット：XXXXXXXXXX）約 1.0 mL で遠心管に洗い出し攪拌した。骨髓細胞を含む FBS を遠心分離した（日立小型冷却遠心機、CF7D2；日立工機株

式会社) (1000 rpm[207.9×g], 5 min)。パスツールピペットを用いて上清を除去した後、残液を攪拌することにより骨髓細胞を再浮遊させ、この浮遊液より塗抹標本を2枚作製した。

乾燥させた塗抹標本をメタノール(富士フイルム和光純薬株式会社、ロット番号：[REDACTED])で5分間固定後、リン酸緩衝液(株)LSIメディエンス、ロット番号：[REDACTED])で3%に希釈したギムザ液(和光純薬工業(株)、ロット番号：[REDACTED])で30分間染色し、リン酸緩衝液で洗浄した後、0.004%クエン酸水溶液(富士フイルム和光純薬株式会、ロット番号：[REDACTED])に数秒間浸し、純水で洗浄を行い自然乾燥させた。

3.14.5 標本観察

標本観察は、仮動物番号にてブラインド化した標本について10倍の接眼レンズと100倍の油浸対物レンズのセットされた顕微鏡を用いて観察した。

赤芽球増殖抑制の程度の有無を判定するために個体あたり、多染性赤血球(PCE: polychromatic erythrocyte)と正染性赤血球(NCE: normochromatic erythrocyte)をあわせて1000個観察し、PCEの割合[PCE/(PCE+NCE)]を求めた。また、PCEを個体あたり4000個観察し、その内で小核を有する多染性赤血球(MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte)が出現した数をカウントした。

3.14.6 試験の成立条件

陰性対照群のMNPCE出現率(0.122±0.052%)を試験施設の陰性対照群の背景データ(8添付資料8.4)と比較した。その結果、陰性対照群のMNPCE出現率は背景データの平均±2×標準偏差(0.01~0.25%)の範囲内であり、また陽性対照群のMNPCE出現率(2.988±0.581%)はこれを超え、試験系に影響した要因が無かったことより試験は成立したと判断した。

3.15 統計処理

体重については、統計処理は実施せず集計のみ行った。

小核標本におけるいずれの測定値[MNPCEの出現率、PCE/(PCE+NCE)]とも、各群の平均値及び標準偏差を算出した。MNPCEの出現頻度についての有意差判定は、KastenbaumとBowman(Mutation Res., 9, pp 527-549, 1970)の判定表を用い、条件付き二項検定を危険率5%(P<0.05)で行なった。陰性対照群及び被験物質投与群のMNPCEの出現頻度について、コ克蘭・アーミテッジの傾向検定を行い、用量相関関係の有無を検定した(有意水準片側5%(P<0.05))。

同時に観察した多染性赤血球の割合[PCE/(PCE+NCE)]を、陰性対照群と被験物質投与群(01M群と02M、03M、04M)及び陰性対照群と陽性対照群(01M群と05M群)との統計学的な有意差検定を行い、危険率5%(P<0.05)又は1%(P<0.01)のレベルで判定した。被験物質投与群(02M、03M、04M)との有意差検定は5%有意水準でBartlett法による等分散検定を行い、不等分散であったため、ノンパラメトリックのSteel法による両側検定を行った。陽性対照群(05M)との有意差検定はF検定を行い、等分散でないため、Welch検定(両側)を行った。

3.16 判定基準

被験物質について、少なくとも1つの被験物質投与群で小核出現頻度が有意に増加し、さらに、傾向検定により用量相関性が認められた場合に陽性と判定した。一方、いずれの被験物質投与群

においても小核出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。

3.17 資料の保管

本試験で発生した試験計画書及び試験計画変更書（原本）、最終報告書（原本）、動物、被験物質、飼育環境及び試験成績に係る記録類、標本類、その他本試験に係る記録文書は、最終報告書提出後 5 年間、XXXXXXXXXX の資料保管室にて保管する。保管期間満了後は、試験委託者と協議の上、決定する。

3.18 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

特記すべき事項は無かった。

4 試験結果

4.1 生存率及び一般状態

各群の生存動物数を Table 1 に、一般状態を Table 2 に、個体別の一般状態を Appendix 1 に示した。また、用量設定試験の生存動物数及び一般状態は添付資料（8 添付資料 8.5）にまとめた。

用量設定試験では、4-メチルベンズアルデヒド投与群の 2000 mg/kg の雄雌で各々 3 例（3/3）、1000 mg/kg の雌で 1 例（1/3）に死亡例がみられた。一般状態においては、雄で 4-メチルベンズアルデヒドの 2000 mg/kg 投与群に立毛 1 例（1/3）、自発運動の低下 3 例（3/3）、1000 mg/kg 投与群では立毛が 1 例（1/3）観察された。雌では、2000 mg/kg 投与群に立毛 1 例（1/3）、自発運動の低下 3 例（3/3）、緩徐呼吸 1 例（1/3）、腹臥位が 1 例（1/3）、1000 mg/kg 投与群では自発運動の低下が 2 例（2/3）観察された。他は特記すべき症状は観察されなかった。

本試験では、4-メチルベンズアルデヒドの最高投与量の 1000 mg/kg 投与群に立毛 4 例（4/8）、自発運動の低下 1 例（1/8）、500 mg/kg 投与群に立毛が 1 例（1/5）観察された。

4.2 体重

各群の平均体重及び標準偏差を Table 3 に、個体別の値を Appendix 2 に示した。また、用量設定試験の体重は添付資料（8 添付資料 8.5）にまとめた。

用量設定試験では、4-メチルベンズアルデヒド投与群の 1000 mg/kg の雄の 1 例（1/3）に 4-メチルベンズアルデヒド 2 回投与後に体重の減少がみられた。

本試験では、4-メチルベンズアルデヒド投与群の 500 mg/kg の 2 例（2/5）に体重の減少傾向がみられたが、各群の平均値では、体重推移に大きな変化はみられなかった。

4.3 小核標本観察結果

小核標本観察結果を Table 4 に、個体別の値を Appendix 3 に示した。

MNPCE の出現率は Table 4 に示す様に、陰性対照群では $0.122 \pm 0.052\%$ で、被験物質投与群では 2000、1000 及び 500 mg/kg 群においてそれぞれ $0.122 \pm 0.041\%$ 、 $0.142 \pm 0.029\%$ 及び $0.150 \pm 0.071\%$ 、であった。これらの MNPCE の出現率は、陰性対照背景データの分布から推定した MNPCE の上限（0.25%）を超えなかった。陽性対照群では、MNPCE の出現率は $2.988 \pm 0.581\%$ であり、陰性対照背景データの分布から推定した MNPCE の上限（0.25%）を超えた。

MNPCE の出現頻度は、Kastenbaum と Bowman の判定表に基づく条件付き二項検定において、被験物質投与群 (MNPCE:24~30) では陰性対照群 (MNPCE:24) と比較して有意差は認められなかったが、陽性対照群 (MNPCE:597) においては陰性対照群との間に有意差が認められた。また、陰性対照群及び被験物質投与群のデータについて、コ克蘭・アーミテッジの傾向検定を行い、用量相関関係の無いことを確認した。

同時に観察した PCE の割合においては、陰性対照群の 50.46% に対して被験物質投与群では 49.90 ~ 50.08% であり、統計学的に有意差は認められなかった。また、陰性対照背景データの範囲内 (45.01 ~ 53.25%) であった。しかし、陽性対照群の PCE の割合は 43.00% で陰性対照群に対して統計学的に有意な減少が認められた。

5 考察

4-メチルベンズアルデヒドのマウスを用いる小核試験を行い、生体内での染色体異常誘発性の有無について検討した。

小核試験の投与量及び性別を求めるため用量設定試験として、4-メチルベンズアルデヒドをオリブ油に混合して 2000、1000、500 及び 0 mg/kg (オリブ油) の投与量で各々の群の雄雌マウス各 3 匹に 1 日 1 回の 2 日間 (投与間隔は 24 時間) 強制経口投与を行った。

最終投与後の翌日 (午前) まで一般状態及び体重測定を行った結果、死亡例が 2000 mg/kg 投与群の雄雌で各々 3 例、1000 mg/kg 投与群の雌で 1 例にみられた。一般状態においては、雄で 4-メチルベンズアルデヒドの 2000 mg/kg 投与群に立毛 1 例、自発運動の低下 3 例、1000 mg/kg 投与群では立毛が 1 例観察された。雌では、2000 mg/kg 投与群に立毛 1 例、自発運動の低下 3 例、緩徐呼吸 1 例、腹臥位が 1 例、1000 mg/kg 投与群では自発運動の低下が 2 例観察された。体重推移では、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に減少がみられた。

したがって本試験では 1000 mg/kg 投与群の雌で死亡例が 1 例みられたものの、雄では体重の減少が 1 例みられたこと、死亡例以外の一般状態では雄雌ともに各々数例に軽度な毒性徴候がみられたが継続した症状では無かったことから、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」及び OECD ガイドラインを参考に、片性の雄を用いて 1000 mg/kg を最高投与量とし、以下公比 2 で 500 及び 250 mg/kg を設定した。投与回数は、用量設定試験と同様に 4-メチルベンズアルデヒド投与群及び陰性対照群とも 24 時間間隔で 2 回投与を実施した。また、陰性対照には媒体のオリブ油を投与し、陽性対照にはマイトマイシン C を用い、明確な陽性反応の得られる用量として、1 回投与の 2 mg/kg を設定した。骨髄細胞塗抹標本 (以下、標本) は、最終投与の投与後 24 時間に採取した骨髄について作製を行った。標本観察では、多染性赤血球 (PCE) を個体あたり 4000 個観察し、小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) を分別し、その出現率を求めた。また、PCE と正染性赤血球 (NCE) を合わせて個体あたり 1000 個観察し、PCE の割合 $[PCE/(PCE+NCE)]$ を求めた。

本試験の結果、一般状態では、4-メチルベンズアルデヒド投与の 1000 mg/kg 群に立毛及び自発運動の低下が、500 mg/kg 投与群に立毛が観察され若干の毒性徴候がみられた。

本試験では、4-メチルベンズアルデヒド投与群の 500 mg/kg の 2 例に体重の減少傾向がみられたが、各群の平均値では、体重推移に大きな変化はみられなかった。

標本観察では、いずれの 4-メチルベンズアルデヒド投与群においても MNPCE の出現率 (0.122

～0.150%)は陰性対照背景データの上限(0.25%)を超えず、出現頻度(24～30)に関してもKastenbaumとBowmanの判定表に基づく条件付き二項検定において陰性対照群(24)との間に有意差は認められなかった。陽性対照群では、MNPCEの出現率(2.988%)は陰性対照背景データの上限(0.25%)を超え、MNPCEの出現頻度(597)についても陰性対照群との間に有意な差が認められた。また、陰性対照群及び各4-メチルベンズアルデヒド投与群のMNPCEの出現頻度について、コクラン・アーミテッジの傾向検定を行い、用量相関関係が無いことを確認した。

同時に観察したPCEの割合において、各4-メチルベンズアルデヒド投与群に有意な差は認められなかった。しかし、陽性対照群のPCEの割合は陰性対照群に対して統計学的に有意な減少が認められた。

以上の結果よりICR系(Crl:CD1)マウスを用いた本試験条件下において、4-メチルベンズアルデヒドの染色体異常誘発性は陰性であると判定した。

6 総括表



Table 1 Survival rate - Daily

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Day		
				1	2	3
Male	01M	Olive oil	0	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	02M	4-methylbenzaldehyde	250	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	03M	4-methylbenzaldehyde	500	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	04M	4-methylbenzaldehyde	1000	8 / 8 (100.0)	8 / 8 (100.0)	8 / 8 (100.0)
	05M	Mitomycin C	2	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	

Number of surviving / Total number of animals (Survival rate)

Table 2 General clinical observation

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Findings	(Frequency or time)	Day						
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	01M	Olive oil	0	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
				Normal		5	5	5	5	5	5	5
	02M	4-methylbenzaldehyde	250	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
				Normal		5	5	5	5	5	5	5
	03M	4-methylbenzaldehyde	500	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
				Normal		5	5	5	4	4	4	5
				Piloerection		0	0	0	1	1	1	0
	04M	4-methylbenzaldehyde	1000	No. of animals		8	8	8	8	8	8	8
				Normal		8	7	8	8	5	5	8
				Decrease in locomotor activity		0	0	0	0	1	0	0
				Piloerection		0	1	0	0	2	3	0
	05M	Mitomycin C	2	No. of animals		5	5	5	5			
Normal					5	5	5	5				

Table 3 Body weights (g) - Group mean values (mean \pm S.D.)

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	Initial B.W.	Day	
						2	3
Male	01M	Olive oil	0	5	34.5 \pm 1.5	34.6 \pm 1.6	34.9 \pm 1.7
	02M	4-methylbenzaldehyde	250	5	35.2 \pm 1.3	35.0 \pm 1.3	35.1 \pm 1.1
	03M	4-methylbenzaldehyde	500	5	34.7 \pm 1.7	33.8 \pm 1.0	33.4 \pm 0.9
	04M	4-methylbenzaldehyde	1000	8	34.8 \pm 1.4	34.6 \pm 1.9	34.8 \pm 1.6
	05M	Mitomycin C	2	5	35.2 \pm 0.6	34.8 \pm 0.9	

Table 4 Results of micronucleus observation

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	MNPCE ^{a)}	Incidence of MNPCE ^{a)} (%)	Judgement	PCE/(PCE+NCE) (%)
Male	01M	Olive oil	0	5	24	0.122 ± 0.052	-	50.46 ± 1.15
	02M	4-methylbenzaldehyde	250	5	30	0.150 ± 0.071	-	49.90 ± 0.65
	03M	4-methylbenzaldehyde	500	5	28	0.142 ± 0.029	-	50.08 ± 1.99
	04M	4-methylbenzaldehyde	1000	5	24	0.122 ± 0.041	-	49.96 ± 0.40
	05M	Mitomycin C	2	5	597 [#]	2.988 ± 0.581	+	43.00 ± 4.08 *

MNPCE : micronucleated polychromatic erythrocyte

a) : Based on 4000 polychromatic erythrocytes per animal.

PCE/(PCE+NCE) : polychromatic erythrocytes/(polychromatic erythrocytes + normochromatic erythrocytes)

- : Negative

+ : Positive

: Significantly different from control group at P<0.05. (Kastenbaum and Bowman)

* : Significantly different from control group at P<0.05. (Welch test)

7 個体別表

Appendix 1 General clinical observation - Individual values

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day							
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)	
Male	Olive oil	0	01M01			-	-	-	-	-	-	-	
			01M02			-	-	-	-	-	-	-	
			01M03			-	-	-	-	-	-	-	
			01M04			-	-	-	-	-	-	-	
			01M05			-	-	-	-	-	-	-	
	4-methylbenzaldehyde	250	02M01			-	-	-	-	-	-	-	
			02M02			-	-	-	-	-	-	-	
			02M03			-	-	-	-	-	-	-	
			02M04			-	-	-	-	-	-	-	
			02M05			-	-	-	-	-	-	-	
	4-methylbenzaldehyde	500	03M01			-	-	-	-	b	b	b	-
			03M02			-	-	-	-	-	-	-	-
			03M03			-	-	-	-	-	-	-	-
			03M04			-	-	-	-	-	-	-	-
			03M05			-	-	-	-	-	-	-	-
	4-methylbenzaldehyde	1000	04M01			-	-	-	-	-	-	-	-
			04M02			-	-	-	-	-	b	-	-
			04M03			-	-	-	-	-	-	-	-
			04M04			-	b	-	-	-	-	b	-
			04M05			-	-	-	-	-	-	-	-
			04M06			-	-	-	-	-	b	b	-
			04M07			-	-	-	-	-	-	b	-
			04M08			-	-	-	-	-	a	-	-
	Mitomycin C	2	05M01			-	-	-	-	-	-	-	
			05M02			-	-	-	-	-	-	-	
05M03					-	-	-	-	-	-	-		
05M04					-	-	-	-	-	-	-		
05M05					-	-	-	-	-	-	-		

a : Decrease in locomotor activity; b : Piloerection
 - : Normal

Appendix 2 Body weights (g) - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	Initial B.W.	Day	
							2	3
Male	01M	Olive oil	0	01M01		35.4	34.9	35.0
				01M02		36.6	37.0	37.6
				01M03		34.1	34.5	35.1
				01M04		33.4	33.6	33.7
				01M05		33.0	32.8	33.2
				Mean		34.5	34.6	34.9
	S.D.		1.5	1.6	1.7			
	02M	4-methylbenzaldehyde	250	02M01		33.5	34.6	34.4
				02M02		35.8	35.9	35.9
				02M03		34.6	34.3	34.5
				02M04		36.9	36.7	36.7
				02M05		35.0	33.6	34.0
				Mean		35.2	35.0	35.1
	S.D.		1.3	1.3	1.1			
	03M	4-methylbenzaldehyde	500	03M01		37.4	33.3	33.6
				03M02		35.3	35.5	33.7
				03M03		33.7	33.9	34.3
				03M04		34.0	32.8	31.8
				03M05		33.1	33.4	33.6
				Mean		34.7	33.8	33.4
	S.D.		1.7	1.0	0.9			
04M	4-methylbenzaldehyde	1000	04M01		37.5	38.5	37.8	
			04M02		35.4	34.3	35.7	
			04M03		34.0	33.2	33.2	
			04M04		34.8	35.2	35.3	
			04M05		35.3	35.0	34.7	
			04M06		33.9	32.5	34.5	
			04M07		35.1	35.0	34.9	
			04M08		32.6	33.3	32.5	
			Mean		34.8	34.6	34.8	
			S.D.		1.4	1.9	1.6	
05M	Mitomycin C	2	05M01		34.4	34.2		
			05M02		35.6	35.6		
			05M03		35.6	34.7		
			05M04		35.6	35.7		
			05M05		34.6	33.7		
			Mean		35.2	34.8		
S.D.		0.6	0.9					

Appendix 3 Results of micronucleus observation - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	MNPCE ^{a)}	Incidence of MNPCE ^{a)} (%)	PCE/(PCE+NCE) (%)	
Male	01M	Olive oil	0	01M01	6	0.15	51.0	
				01M02	3	0.08	49.2	
				01M03	4	0.10	49.3	
				01M04	8	0.20	51.8	
				01M05	3	0.08	51.0	
				Total	24			
				N		5	5	
				Mean		0.122	50.46	
				S.D.		0.052	1.15	
		02M	4-methylbenzaldehyde	250	02M01	4	0.10	49.6
	02M02				4	0.10	49.7	
	02M03				8	0.20	49.3	
	02M04				4	0.10	51.0	
	02M05				10	0.25	49.9	
	Total				30			
				N		5	5	
				Mean		0.150	49.90	
				S.D.		0.071	0.65	
		03M	4-methylbenzaldehyde	500	03M01	6	0.15	49.5
	03M02				4	0.10	47.5	
	03M03				7	0.18	51.6	
	03M04				5	0.13	49.3	
	03M05				6	0.15	52.5	
	Total				28			
			N		5	5		
			Mean		0.142	50.08		
			S.D.		0.029	1.99		
	04M	4-methylbenzaldehyde	1000	04M01	4	0.10	50.4	
04M02				4	0.10	50.3		
04M03				7	0.18	49.6		
04M04				3	0.08	49.5		
04M05				6	0.15	50.0		
Total				24				
			N		5	5		
			Mean		0.122	49.96		
			S.D.		0.041	0.40		
	05M	Mitomycin C	2	05M01	142	3.55	40.5	
05M02				133	3.33	40.6		
05M03				99	2.48	42.0		
05M04				133	3.33	41.7		
05M05				90	2.25	50.2		
Total				597				
			N		5	5		
			Mean		2.988	43.00		
			S.D.		0.581	4.08		

MNPCE : micronucleated polychromatic erythrocyte

a) : Based on 4000 polychromatic erythrocytes per animal.

PCE/(PCE+NCE) : polychromatic erythrocytes/(polychromatic erythrocytes + normochromatic erythrocytes)



8 添付資料

8.1 床敷中汚染物質分析試験成績書



8 添付資料

8.2 飼料中汚染物質分析試験成績書

8 添付資料

8.3 飲料水試験検査成績書

8 添付資料

8.4 Background Data for Micronucleus Tests

Background Data for Micronucleus Tests

Animal used: Mouse (SPF), CD1 (ICR), male, 7-8 week old.

Supplier of animal : Charles River Japan Inc.

Accumulation of data : 2013~2018

Group	Item	MNPCE (%)	PCE / (PCE+NCE) (%)
Negative control (n = 109)	MEAN ± S.D.	0.13 ± 0.06	49.13 ± 2.06
	min / max	0.03 / 0.35	44.8 / 53.2
	Control limits (MEAN ± 2×S.D.)	0.01 ~ 0.25	45.01 ~ 53.25
Positive control Mitomycin C 2 mg/kg i.p. (n = 109)	MEAN ± S.D.	3.57 ± 1.07	46.68 ± 3.05
	min / max	0.95 / 6.95	39.8 / 54.5
	Control limits (MEAN ± 2×S.D.)	1.43 ~ 5.71	40.58 ~ 52.78

8 添付資料

8.5 用量設定試験 総括表及び個別別表

Attachment table 1 Survival rate - Daily

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Day		
				1	2	3
Male	11M	Olive oil	0	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	12M	4-methylbenzaldehyde	500	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	13M	4-methylbenzaldehyde	1000	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	14M	4-methylbenzaldehyde	2000	3 / 3 (100.0)	1 / 3 (33.3)	0 / 3 (0.0)
Female	11F	Olive oil	0	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	12F	4-methylbenzaldehyde	500	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	13F	4-methylbenzaldehyde	1000	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	2 / 3 (66.7)
	14F	4-methylbenzaldehyde	2000	3 / 3 (100.0)	1 / 3 (33.3)	0 / 3 (0.0)

Number of surviving / Total number of animals (Survival rate)

Attachment table 2 General clinical observation

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Findings	(Frequency or time)	Day						
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	11M	Olive oil	0	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
				Normal		3	3	3	3	3	3	3
	12M	4-methylbenzaldehyde	500	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
				Normal		3	3	3	3	3	3	3
	13M	4-methylbenzaldehyde	1000	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
				Normal		3	2	3	3	3	3	3
				Found dead		0	0	0	0	0	0	0
				Decrease in locomotor activity		0	0	0	0	0	0	0
				Piloerection		0	1	0	0	0	0	0
	14M	4-methylbenzaldehyde	2000	No. of animals		3	3	3	3	1	1	1
				Normal		3	2	0	1	1	0	0
				Found dead		0	0	0	2	0	0	1
				Prone position		0	0	0	0	0	0	0
				Decrease in locomotor activity		0	0	3	0	0	1	0
				Bradypnea		0	0	0	0	0	0	0
				Piloerection		0	1	0	0	0	0	0

Attachment table 2 General clinical observation (Continued)

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Findings	(Frequency or time)	Day						
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Female	11F	Olive oil	0	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
				Normal		3	3	3	3	3	3	3
	12F	4-methylbenzaldehyde	500	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
				Normal		3	3	3	3	3	3	3
	13F	4-methylbenzaldehyde	1000	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
				Normal		3	3	2	3	3	2	2
				Found dead		0	0	0	0	0	0	1
				Decrease in locomotor activity		0	0	1	0	0	1	0
				Piloerection		0	0	0	0	0	0	0
	14F	4-methylbenzaldehyde	2000	No. of animals		3	3	3	3	2	2	1
				Normal		3	3	0	1	0	0	0
				Found dead		0	0	0	1	0	1	1
				Prone position		0	0	0	0	0	1	0
				Decrease in locomotor activity		0	0	3	0	2	0	0
Bradypnea					0	0	1	0	0	0	0	
Piloerection					0	0	0	1	1	0	0	

Attachment table 3 Body weights (g) - Group mean values (mean ± S.D.)

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	Initial B.W.	Day	
						2	3
Male	11M	Olive oil	0	3	35.6 ± 1.4	35.4 ± 1.0	35.4 ± 0.7
	12M	4-methylbenzaldehyde	500	3	35.7 ± 0.9	36.1 ± 1.0	36.3 ± 0.5
	13M	4-methylbenzaldehyde	1000	3	36.1 ± 1.4	35.8 ± 0.9	34.9 ± 2.4
	14M	4-methylbenzaldehyde	2000	3	35.2 ± 1.6	35.8	(1)
Female	11F	Olive oil	0	3	28.0 ± 1.0	28.1 ± 0.6	28.4 ± 1.1
	12F	4-methylbenzaldehyde	500	3	27.5 ± 0.2	26.8 ± 0.8	27.0 ± 1.0
	13F	4-methylbenzaldehyde	1000	3	27.8 ± 0.8	27.4 ± 0.7	27.9 ± 1.3 (2)
	14F	4-methylbenzaldehyde	2000	3	27.1 ± 0.5	26.2 ± 0.8	(2)

Number in parentheses indicates the number of animals examined.

Attachment appendix 1 General clinical observation - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day							
							1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)	
Male	11M	Olive oil	0	11M01			-	-	-	-	-	-	-	
				11M02			-	-	-	-	-	-	-	-
				11M03			-	-	-	-	-	-	-	-
	12M	4-methylbenzaldehyde	500	12M01			-	-	-	-	-	-	-	-
				12M02			-	-	-	-	-	-	-	-
				12M03			-	-	-	-	-	-	-	-
	13M	4-methylbenzaldehyde	1000	13M01			-	-	-	-	-	-	-	-
				13M02			-	e	-	-	-	-	-	-
				13M03			-	-	-	-	-	-	-	-
	14M	4-methylbenzaldehyde	2000	14M01	FD (3)		-	-	c	-	-	-	c	a
				14M02	FD (2)		-	e	c	a	-	-	-	-
				14M03	FD (2)		-	-	c	a	-	-	-	-

a : Found dead; c : Decrease in locomotor activity; e : Piloerection

FD : Found dead

- : Normal

Attachment appendix 1 General clinical observation - Individual values (Continued)



Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day							
							1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)	
Female	11F	Olive oil	0	11F01			-	-	-	-	-	-	-	
				11F02			-	-	-	-	-	-	-	-
				11F03			-	-	-	-	-	-	-	-
	12F	4-methylbenzaldehyde	500	12F01			-	-	-	-	-	-	-	-
				12F02			-	-	-	-	-	-	-	-
				12F03			-	-	-	-	-	-	-	-
	13F	4-methylbenzaldehyde	1000	13F01			-	-	-	-	-	-	-	-
				13F02			-	-	c	-	-	-	-	-
				13F03	FD (3)		-	-	-	-	-	-	c	a
	14F	4-methylbenzaldehyde	2000	14F01	FD (2)		-	-	c	-	c	a	-	-
				14F02	FD (2)		-	-	cd	a	-	-	-	-
				14F03	FD (3)		-	-	c	e	ce	b	a	-

a : Found dead; b : Prone position; c : Decrease in locomotor activity; d : Bradypnea; e : Piloerection
 FD : Found dead
 - : Normal

Attachment appendix 2 Body weights (g) - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	Initial B.W.	Day	
							2	3
Male	11M	Olive oil	0	11M01		35.7	35.4	35.7
				11M02		36.9	36.3	35.9
				11M03		34.2	34.4	34.6
				Mean		35.6	35.4	35.4
				S.D.		1.4	1.0	0.7
	12M	4-methylbenzaldehyde	500	12M01		35.6	35.7	36.1
				12M02		34.9	35.4	35.9
				12M03		36.7	37.2	36.8
				Mean		35.7	36.1	36.3
				S.D.		0.9	1.0	0.5
	13M	4-methylbenzaldehyde	1000	13M01		34.8	34.8	34.7
				13M02		37.5	36.5	37.4
				13M03		35.9	36.0	32.6
				Mean		36.1	35.8	34.9
S.D.					1.4	0.9	2.4	
14M	4-methylbenzaldehyde	2000	14M01	FD (3)	36.8	35.8		
			14M02	FD (2)	33.6			
			14M03	FD (2)	35.2			
			Mean		35.2	35.8		
			S.D.		1.6			
Female	11F	Olive oil	0	11F01		27.3	27.9	28.5
				11F02		29.1	28.8	29.4
				11F03		27.6	27.6	27.2
				Mean		28.0	28.1	28.4
				S.D.		1.0	0.6	1.1
	12F	4-methylbenzaldehyde	500	12F01		27.4	26.0	26.4
				12F02		27.7	26.8	26.4
				12F03		27.5	27.5	28.1
				Mean		27.5	26.8	27.0
				S.D.		0.2	0.8	1.0
	13F	4-methylbenzaldehyde	1000	13F01		28.6	28.0	28.8
				13F02		27.0	26.7	27.0
				13F03	FD (3)	27.7	27.4	
				Mean		27.8	27.4	27.9
S.D.					0.8	0.7	1.3	
14F	4-methylbenzaldehyde	2000	14F01	FD (2)	26.8	26.8		
			14F02	FD (2)	27.6			
			14F03	FD (3)	26.8	25.6		
			Mean		27.1	26.2		
			S.D.		0.5	0.8		

FD : Found dead