

最終報告書

表 題：N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ
[2,2,2]オクタ-5-エン-2,3-ジカルボキシミドの細菌を用いる
復帰突然変異試験

試験番号：S R 0 5 3 5 3

株式会社 化合物安全性研究所

陳 述 書

表題：N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ[2,2,2]オクタ-5-エン-2,3-ジカルボキシミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：S R O 5 3 5 3

1. 本試験は GLP 基準「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(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 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および『「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」の一部改正について』(平成 17 年 4 月 1 日薬食発第 0401003 号・平成 17・03・04 製局第 1 号・環保企発第 050401003 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)に従い、試験方法は「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 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)、『「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について』(平成 18 年 11 月 20 日薬食発第 1120001 号・平成 18・11・13 製局第 2 号・環保企発第 061120001 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および OECD 試験法ガイドライン(OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)に基づいて実施したものであります。
2. 本試験は、試験計画書に従って実施し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因は認められませんでした。

株式会社 化合物安全性研究所

試験責任者

2010 年 2 月 25 日

信 頼 性 保 証 書

表題：N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ[2,2,2]オクタ-5-エン-2,3-ジカルボキシミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：S R 0 5 3 5 3

本試験は、株式会社 化合物安全性研究所 QAUによって、下記のとおり査察された。

査 察 段 階	査 察 日	試 験 責 任 者 への 報 告 日	運 営 管 理 者 への 報 告 日
試験計画書	2006 年 9 月 14 日	2006 年 9 月 18 日	2006 年 9 月 21 日
試験計画書変更書(No. 1)	2006 年 9 月 22 日	2006 年 9 月 22 日	2006 年 9 月 22 日
被験物質の受入・表示・保存	2006 年 9 月 14 日	2006 年 9 月 18 日	2006 年 9 月 21 日
被験物質の調製	2006 年 9 月 20 日	2006 年 9 月 21 日	2006 年 9 月 21 日
試験の実施	2006 年 9 月 20 日	2006 年 9 月 21 日	2006 年 9 月 21 日
観察・コロニー計測	2006 年 9 月 28 日	2006 年 9 月 28 日	2006 年 9 月 28 日
生データ	2008 年 4 月 22 日	2008 年 4 月 22 日	2008 年 4 月 22 日
最終報告書(草案)：図表	2008 年 4 月 22 日	2008 年 4 月 22 日	2008 年 4 月 22 日
最終報告書(草案)：本文	2008 年 4 月 22 日	2008 年 4 月 22 日	2008 年 4 月 22 日
最終報告書	2010 年 2 月 25 日	2010 年 2 月 25 日	2010 年 2 月 25 日

1. 本試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（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 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知）、『「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」の一部改正について』（平成17年4月1日薬食発第0401003号・平成17・03・04製局第1号・環保企発第050401003号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知）、「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 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知）、『「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について』（平成18年11月20日薬食発第1120001号・平成18・11・13製局第2号・環保企発第061120001号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知）およびOECD試験法ガイドライン（OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997）に従い実施された。
2. 本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社 化合物安全性研究所

QAU責任者

2010 年 2 月 25 日

目 次

表紙	1
陳述書	2
信頼性保証書	3
目次	4
表題・試験番号・試験目的・試験実施基準および試験法ガイドライン・試験委託者	6
試験施設・試験責任者・試験従事者およびその業務分担・試験期間	7
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	17
考察	18
試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	19
資料の保存	19
試験責任者の記名なつ印	19

Tables

Table 1	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-finding test)	20
Table 2	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-finding test)	21
Table 3	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (main test)	22
Table 4	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (main test)	23

Figures

Figure 1-1	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 without metabolic activation (dose-response curves).....	24
Figure 1-2	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 with metabolic activation (dose-response curves).....	25
Figure 2-1	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 without metabolic activation (dose-response curves).....	26
Figure 2-2	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 with metabolic activation (dose-response curves).....	27
Figure 3-1	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-response curves).....	28
Figure 3-2	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-response curves).....	29
Figure 4-1	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (dose-response curves).....	30
Figure 4-2	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 with metabolic activation (dose-response curves).....	31
Figure 5-1	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 without metabolic activation (dose-response curves).....	32
Figure 5-2	Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 with metabolic activation (dose-response curves).....	33

Appendices

Appendix 1	試験成績書 (2006 年 8 月 16 日)	34
Appendix 2	Historical control data for reverse mutation test	35

表題 : N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ
[2, 2, 2]オクタ-5-エン-2, 3-ジカルボキシミドの細菌を用いる復
帰突然変異試験

試験番号 : S R O 5 3 5 3

試験目的 : *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いて、
N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ
[2, 2, 2]オクタ-5-エン-2, 3-ジカルボキシミドの細菌における遺
伝子突然変異誘発性を検討することを目的とした。

試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準(GLP) : 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準に
ついて」(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 厚生労働省医薬食品局
長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)
および『「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関す
る基準について」の一部改正について』(平成 17 年 4 月 1 日薬食
発第 0401003 号・平成 17・03・04 製局第 1 号・環保企発第 050401003
号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省
総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン : 「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 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局
長・環境省総合環境政策局長連名通知)、『「新規化学物質等に係
る試験の方法について」の一部改正について』(平成 18 年 11 月
20 日薬食発第 1120001 号・平成 18・11・13 製局第 2 号・環保企発
第 061120001 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局
長・環境省総合環境政策局長連名通知)および OECD 試験法ガイド
ライン(OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial
Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)

試験委託者

名称 : 厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

所在地 : 東京都千代田区霞が関 1-2-2(〒100-8916)
(TEL 03-3595-2298、FAX 03-3593-8913)

試験施設

名称 : 株式会社 化合物安全性研究所
所在地 : 札幌市清田区真栄 363 番 24(〒004-0839)
運営管理者 

試験責任者

氏名 
所属 : 株式会社 化合物安全性研究所 安全性研究部門

試験従事者およびその業務分担

被験物質管理

試験操作



試験期間

試験開始日 : 2006 年 9 月 14 日

実験開始日 : 2006 年 9 月 20 日

用量設定試験

前培養開始日 : 2006 年 9 月 19 日

被験物質処理日 : 2006 年 9 月 20 日

コロニー計数日 : 2006 年 9 月 22 日

本試験

前培養開始日 : 2006 年 9 月 25 日

被験物質処理日 : 2006 年 9 月 26 日

コロニー計数日 : 2006 年 9 月 28 日

実験終了日 : 2006 年 9 月 28 日

試験終了日 : 2010 年 2 月 25 日

要 約

N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ[2, 2, 2]オクタ-5-エン-2, 3-ジカルボキシミドの細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験では、直接法および代謝活性化法ともに、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で低下させた計 7 用量(5~5000 µg/plate)の試験群を設定した。試験の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。被験物質の析出が、各菌株とも 500 µg/plate 以上の用量において観察された。生育阻害は、すべての試験条件下において観察されなかった。

本試験では、直接法および代謝活性化法ともに、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 8 用量(39.1~5000 µg/plate)の試験群を設定した。試験の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。被験物質の析出が、各菌株とも 625 µg/plate 以上の用量において観察された。生育阻害は、すべての試験条件下において観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、それぞれにおける陰性対照群の値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ[2, 2, 2]オクタ-5-エン-2, 3-ジカルボキシミドは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

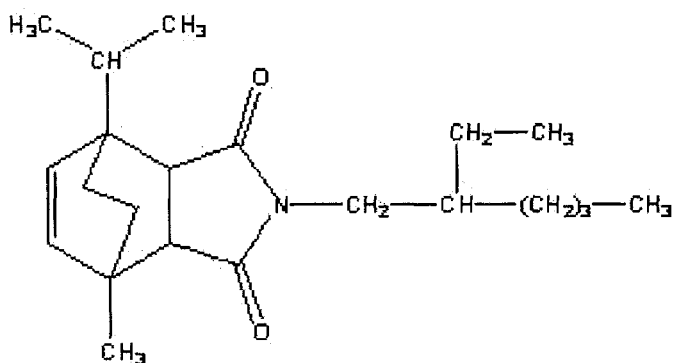
緒 言

N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルビスクロ[2,2,2]オクタ-5-エン-2,3-ジカルボキシミドの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルビスクロ[2,2,2]オクタ-5-エン-2,3-ジカルボキシミド
英名	: N-(2-Ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide
CAS No.	: 13358-11-7
化学物質番号	: 化審法 ; 4-302
構造式	:



分子式 : $C_{22}H_{35}NO_2$

分子量 : 345.54

物理化学的性質 : 外観 ; 黄色の澄明な粘性の液体
 におい ; かすかににおいがある
 屈折率 ; 1.500 (D, 20)
 比重 ; 1.019 (20, 20)
 沸点 ; 約 175°C (13.3Pa)
 遊離酸・アルカリ ; 中性
 溶解性 ; データなし。

試験施設での溶解性の検討において、被験物質はジメチルスルホキシドに約 170 mg/mL の濃度まで溶解し、500 mg/mL の濃度では均一に懸濁することが確認された。

ロット番号 : Y225

定量値 : 99.7% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度 : 不明(データなし)

提供者 : 名称 ; 株式会社エーピーアイコーポレーション

所在地 ; 大阪府中央区平野町 2 丁目 4 番 9 号 大和平野町ビル

担当者 ; ファインケミカル事業部 音野 篤史

(TEL 06-6201-1902、FAX 06-6229-0258)

入手量 : 18 kg (関連試験と共通)

安定性 : 被験物質の製品標準書における使用期限は室温条件下 3 年である (提供者からの情報)。当該被験物質は冷蔵保存にてその使用期限内 (製造年月日 : 2006 年 5 月 25 日) に使用しており、試験期間中安定であったと判断される。

保存条件 : 冷所 (実測範囲 : 1~10°C)

取扱上の注意 : 使用に際しては、手袋、マスク等を着用し、吸入または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。

残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、被験物質提供者へ返却した。

2. 被験物質の調製

被験物質の調製媒体として、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)を使用した。

用量設定試験では、50 mg/mL 調製液から公比約 3 で段階希釈し、15、5、1.5、0.5、0.15 および 0.05 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、50 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈し、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781 および 0.391mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、用量設定試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体の反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、用量設定試験では調製後 2.4 時間以内に、本試験では調製後 2.6 時間以内に試験に使用した。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体であるジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)を、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、次表の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は、遮光および冷所(2~8℃設定)で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、分注後-20℃以下で凍結保存したものを解凍後 2.2 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 7 ヶ月以内(使用期限：調製後 1 年)に使用した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド(含量 100.2%) ロット番号 WAP0369 和光純薬工業株式会社	0.1 および 1 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 SL045 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度 99.8%) ロット番号 SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 µg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号 5D73 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩水和物 (含量 98.8%) ロット番号 03024JR Sigma-Aldrich Corporation	800 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 SL045 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン (含量 97.4%) ロット番号 TCG4316 和光純薬工業株式会社	5、10、20 およ び 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 SL045 株式会社同仁化学研究所

5. 試験菌株

試験には、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 ならびに *Escherichia coli* WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991 年 10 月 18 日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受け入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド（ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所）0.7 mL を加え、試験チューブに分注後-80℃以下で凍結保存した。各菌株の培養液の一部を用いて、菌株の特性（アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、紫外線感受性および薬剤耐性）ならびに陰性対照物質および陽性対照物質に対する感受性の検査を行い、これらの特性および感受性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した。

6. 培地

(1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス (OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 298714、OXOID LTD.) を日本薬局方注射用水（ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場）を用いて 25 g/L に調製した。*S. typhimurium* TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム（ロット番号 M3F9025、ナカライテスク株式会社）を 25 µg/mL となるように添加した。

(2) 試験用培地（最少グルコース寒天培地）

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地（バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZL78I01、2006 年 8 月 18 日製造、極東製薬工業株式会社）1000 mL 中の組成は次表の通りである。

試験用培地 1000 mL 中の組成	
硫酸マグネシウム・7 水塩	0.2 g
クエン酸・1 水塩	2.0 g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20.0 g
寒天末 (OXOID AGAR No. 1、ロット番号 911885-02)	15.0 g

(3) 重層用培地

次表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水を用いて調製し、使用時に (A) : (B) = 10:1 の容量比で混合した。 *S. typhimurium* には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、 *E. coli* には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。これらの重層用培地は、使用時まで 47℃ に保温した。

重層用培地の組成	
(A) ソフトアガー	
Bacto™ Agar	0.6 %
(ロット番号 5123150、Becton, Dickinson and Company)	
塩化ナトリウム	0.5 %
(ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)	
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液	各々 0.5 mmol/L
(L-ヒスチジン、ロット番号 DWN1024、和光純薬工業株式会社)	
(D-ビオチン、ロット番号 ASM1069*、SDE1914**、和光純薬工業株式会社)	
または	
L-トリプトファン溶液	0.5 mmol/L
(L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)	

* 用量設定試験で使用 ** 用量設定試験および本試験で使用

7. S9 mix

S9 mix は、S9 (ロット番号 RAA-544、2006 年 5 月 26 日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor (Cofactor-I、ロット番号 999601、オリエンタル酵母工業株式会社) および日本薬局方注射用水 (ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場) を用いて用時調製した。

S9 は、購入後 -80℃ 以下で保存し、製造日より 5 ヶ月以内 (使用期限：製造後 6 ヶ月) に使用した。この S9 は、フェノバルビタールおよび 5, 6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット (雄、7 週齢) の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

S9 mix 1 mL 中の組成	
S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)	4 μ mol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)	4 μ mol
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100 μ mol

8. 試験群

(1) 用量設定試験

各菌株につき代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)および存在下(代謝活性化法)で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 試験群(5000、1500、500、150、50、15 および 5 µg/plate)を設定した。

(2) 本試験

各菌株につき直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

用量設定試験の結果に基づき、析出のみられない用量が 4 用量以上となるよう、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 8 試験群(5000、2500、1250、625、313、156、78.1 および 39.1 µg/plate)を設定した。

(3) 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験いずれにおいても、試験系列毎に陰性対照群(ジメチルスルホキシド)および次表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量: µg/plate)	
	直接法	代謝活性化法
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN ₃ (0.5)	2-AA (2)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	AF-2 (0.01)	2-AA (10)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃: アジ化ナトリウム、9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

2-AA: 2-アミノアントラセン

(4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに 3 枚とした。

プレートには、識別のための試験番号および試験群を記載したラベルを貼付した。

9. 試験方法

(1) 試験菌株の前培養

容量約 40 mL の L 字管に前培養用培地(ニュートリエントブロス培地)12 mL を入れ、これに解凍した保存菌を 12 µL 接種し、L 字管を氷冷後、37℃、振幅 40 mm、振盪速

度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX、タイテック株式会社) で 10 時間の往復振盪培養を行った。培養終了時に、得られた菌培養液の OD_{660nm} を比色計 (mini photo 518、タイテック株式会社) で測定し、各菌株の生菌数-OD_{660nm} 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10^9 cells/mL より多く、十分に菌が生育していることが確認された菌培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数 (計算値) は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数 (計算値) ($\times 10^9$ cells/mL)	
	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	2.78	2.78
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.41	3.41
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4.14	4.14
<i>S. typhimurium</i> TA98	2.72	2.72
<i>S. typhimurium</i> TA1537	1.71	1.71

(2) 被験物質調製液および対照物質調製液の処理

被験物質調製液および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

蓋付きのポリエチレン製チューブ (5 mL 容量) を使用して、被験物質調製液あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37℃、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX、タイテック株式会社) で 20 分間振盪培養 (プレインキュベーション) した。プレインキュベーション終了後、*S. typhimurium* には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、*E. coli* には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、最少グルコース寒天培地に重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを 37℃ に設定したインキュベータ (MIR-262 : 三洋電機株式会社) で 48~49 時間静置培養した。

用量設定試験および本試験それぞれにおいて、試験に使用した被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液について雑菌の混入の有無を確認した。

(3) プレーートの観察

各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群について、プレートでの生育阻害の有無を実体顕微鏡 (SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社) で確認するとともに、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した。次に、各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、

コロニーアナライザー(CA-11D、システムサイエンス株式会社)を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準(0~4)で行い、基準1以上を生育阻害有りとした。

0：生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50倍程度の倍率で観察可能)が培地一面に観察され、対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認められない。

1：わずかな生育阻害が認められる。

対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている。

2：中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している。

3：強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である。

4：生存菌が全く認められない。

(4) 観察結果の集計方法

各試験群の復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

10. 試験結果の評価

(1) 試験系の感度確認

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の2倍以上である場合に、試験系が適切な感度を有しているものと判断した。

(2) 試験結果の判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の2倍以上となり、かつ用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、用量設定試験と本試験で再現性を持って認められた場合に、被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陽性であるとした。試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

成 績

用量設定試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 1 および 2 に、本試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 3 および 4 にそれぞれ示す。また、用量設定試験および本試験における被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1~5-2 に示す。

用量設定試験 (5~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株における直接法および代謝活性化法の 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で観察された。生育阻害は、すべての試験条件下において観察されなかった。

本試験 (39.1~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株における直接法および代謝活性化法の 625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で観察された。生育阻害は、すべての試験条件下において観察されなかった。

用量設定試験および本試験いずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値 (Appendix 2) の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て陰性対照群の値の 2 倍以上であった。

用量設定試験および本試験いずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix に雑菌の混入はみられなかった。

考 察

N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ[2,2,2]オクタ-5-エン-2,3-ジカルボキシミドの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 8 用量の試験群で実施した。

試験の結果、用量設定試験および本試験ともに、各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。被験物質処理による析出が、用量設定試験では 500 µg/plate 以上の用量で、本試験では 625 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害は、用量設定試験および本試験ともにいずれの菌株にも観察されなかった。このように、用量設定試験および本試験の結果には再現性が確認された。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、N-(2-エチルヘキシル)-1-イソプロピル-4-メチルピシクロ[2,2,2]オクタ-5-エン-2,3-ジカルボキシミドは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

資料の保存

1. 資料保存施設および保存資料

以下の資料を、株式会社 化合物安全性研究所の資料保存室に保存する。

- (1) 試験計画書、試験計画書変更書
- (2) 生データその他の記録文書
- (3) 最終報告書

2. 保存期間

試験終了後 10 年間保存し、その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

試験責任者の記名なつ印

  2010 年 2 月 25 日

Table 1 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3 dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (dose-finding test) (SR05353)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		123 , 115 136 (125 $\pm$ 11)	8 , 10 9 (9 $\pm$ 1)	17 , 17 13 (16 $\pm$ 2)	18 , 17 20 (18 $\pm$ 2)	11 , 15 16 (14 $\pm$ 3)
Test substance ^b	5	123 , 143 114 (127 $\pm$ 15)	14 , 16 8 (13 $\pm$ 4)	17 , 18 17 (17 $\pm$ 1)	27 , 16 22 (22 $\pm$ 6)	8 , 12 14 (11 $\pm$ 3)
	15	116 , 112 138 (122 $\pm$ 14)	9 , 9 15 (11 $\pm$ 3)	16 , 8 13 (12 $\pm$ 4)	15 , 18 8 (14 $\pm$ 5)	13 , 13 10 (12 $\pm$ 2)
	50	112 , 104 145 (120 $\pm$ 22)	10 , 16 4 (10 $\pm$ 6)	16 , 16 11 (14 $\pm$ 3)	19 , 8 13 (13 $\pm$ 6)	10 , 12 7 (10 $\pm$ 3)
	150	116 , 118 115 (116 $\pm$ 2)	11 , 12 6 (10 $\pm$ 3)	11 , 15 10 (12 $\pm$ 3)	17 , 18 16 (17 $\pm$ 1)	13 , 10 13 (12 $\pm$ 2)
	500	94 [#] , 114 [#] 119 [#] (109 $\pm$ 13)	7 [#] , 7 [#] 9 [#] (8 $\pm$ 1)	8 [#] , 13 [#] 11 [#] (11 $\pm$ 3)	16 [#] , 20 [#] 26 [#] (21 $\pm$ 5)	16 [#] , 15 [#] 9 [#] (13 $\pm$ 4)
	1500	115 [#] , 102 [#] 116 [#] (111 $\pm$ 8)	11 [#] , 5 [#] 13 [#] (10 $\pm$ 4)	21 [#] , 12 [#] 18 [#] (17 $\pm$ 5)	17 [#] , 22 [#] 22 [#] (20 $\pm$ 3)	11 [#] , 11 [#] 10 [#] (11 $\pm$ 1)
	5000	130 [#] , 116 [#] 123 [#] (123 $\pm$ 7)	7 [#] , 10 [#] 8 [#] (8 $\pm$ 2)	13 [#] , 9 [#] 14 [#] (12 $\pm$ 3)	8 [#] , 20 [#] 16 [#] (15 $\pm$ 6)	10 [#] , 12 [#] 15 [#] (12 $\pm$ 3)
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	1012 , 949 933	351 , 348 317	104 , 160 130	540 , 461 478	292 , 389 320
	(Mean $\pm$ S.D.)	(965 $\pm$ 42)	(339 $\pm$ 19)	(131 $\pm$ 28)	(493 $\pm$ 42)	(334 $\pm$ 50)

a : Dimethyl sulfoxide

b : n-(2-Ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

Table 2 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (dose-finding test) (SR05353)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		124 , 126 152 (134 $\pm$ 16)	9 , 7 8 (8 $\pm$ 1)	17 , 13 22 (17 $\pm$ 5)	37 , 28 40 (35 $\pm$ 6)	17 , 19 29 (22 $\pm$ 6)
Test substance ^b	5	159 , 140 152 (150 $\pm$ 10)	14 , 7 11 (11 $\pm$ 4)	11 , 23 33 (22 $\pm$ 11)	26 , 29 31 (29 $\pm$ 3)	23 , 17 17 (19 $\pm$ 3)
	15	137 , 152 143 (144 $\pm$ 8)	8 , 12 3 (8 $\pm$ 5)	17 , 12 18 (16 $\pm$ 3)	34 , 36 26 (32 $\pm$ 5)	21 , 20 16 (19 $\pm$ 3)
	50	182 , 141 130 (151 $\pm$ 27)	8 , 10 11 (10 $\pm$ 2)	21 , 24 19 (21 $\pm$ 3)	32 , 37 33 (34 $\pm$ 3)	29 , 23 17 (23 $\pm$ 6)
	150	142 , 137 149 (143 $\pm$ 6)	10 , 12 9 (10 $\pm$ 2)	10 , 22 21 (18 $\pm$ 7)	31 , 33 34 (33 $\pm$ 2)	16 , 18 14 (16 $\pm$ 2)
	500	115 [#] , 153 [#] 143 [#] (137 $\pm$ 20)	10 [#] , 9 [#] 7 [#] (9 $\pm$ 2)	21 [#] , 18 [#] 24 [#] (21 $\pm$ 3)	40 [#] , 35 [#] 43 [#] (39 $\pm$ 4)	27 [#] , 25 [#] 27 [#] (26 $\pm$ 1)
	1500	153 [#] , 132 [#] 127 [#] (137 $\pm$ 14)	12 [#] , 8 [#] 8 [#] (9 $\pm$ 2)	5 [#] , 19 [#] 15 [#] (13 $\pm$ 7)	43 [#] , 37 [#] 20 [#] (33 $\pm$ 12)	26 [#] , 14 [#] 14 [#] (18 $\pm$ 7)
	5000	159 [#] , 163 [#] 155 [#] (159 $\pm$ 4)	6 [#] , 14 [#] 12 [#] (11 $\pm$ 4)	16 [#] , 19 [#] 19 [#] (18 $\pm$ 2)	29 [#] , 26 [#] 31 [#] (29 $\pm$ 3)	17 [#] , 10 [#] 12 [#] (13 $\pm$ 4)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1007 , 1040 1185	305 , 318 281	1040 , 1030 1000	248 , 253 263	181 , 200 185
	(Mean $\pm$ S.D.)	(1077 $\pm$ 95)	(301 $\pm$ 19)	(1023 $\pm$ 21)	(255 $\pm$ 8)	(189 $\pm$ 10)

a : Dimethyl sulfoxide

b : n-(2-Ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

Table 3 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (main test) (SR05353)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		126 , 138 112 (125±13)	10 , 6 10 (9±2)	13 , 16 11 (13±3)	16 , 18 14 (16±2)	17 , 21 16 (18±3)
Test substance ^b	39.1	132 , 113 145 (130±16)	8 , 5 13 (9±4)	11 , 12 8 (10±2)	24 , 16 12 (17±6)	16 , 20 16 (17±2)
	78.1	120 , 127 122 (123±4)	10 , 5 6 (7±3)	8 , 18 12 (13±5)	14 , 13 17 (15±2)	18 , 17 21 (19±2)
	156	127 , 125 119 (124±4)	5 , 11 6 (7±3)	13 , 16 16 (15±2)	19 , 13 12 (15±4)	17 , 20 17 (18±2)
	313	142 , 121 128 (130±11)	8 , 8 6 (7±1)	12 , 11 11 (11±1)	22 , 22 10 (18±7)	18 , 25 12 (18±7)
	625	138 [#] , 127 [#] 124 [#] (130±7)	14 [#] , 7 [#] 8 [#] (10±4)	16 [#] , 13 [#] 10 [#] (13±3)	16 [#] , 12 [#] 13 [#] (14±2)	14 [#] , 19 [#] 16 [#] (16±3)
	1250	126 [#] , 124 [#] 138 [#] (129±8)	5 [#] , 5 [#] 10 [#] (7±3)	15 [#] , 15 [#] 10 [#] (13±3)	15 [#] , 12 [#] 11 [#] (13±2)	21 [#] , 21 [#] 18 [#] (20±2)
	2500	128 [#] , 126 [#] 142 [#] (132±9)	8 [#] , 8 [#] 5 [#] (7±2)	12 [#] , 11 [#] 13 [#] (12±1)	19 [#] , 18 [#] 19 [#] (19±1)	19 [#] , 16 [#] 12 [#] (16±4)
	5000	121 [#] , 109 [#] 125 [#] (118±8)	9 [#] , 11 [#] 7 [#] (9±2)	12 [#] , 9 [#] 13 [#] (11±2)	14 [#] , 13 [#] 16 [#] (14±2)	17 [#] , 25 [#] 16 [#] (19±5)
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	1122 , 1202 1151	263 , 244 293	144 , 153 132	565 , 623 593	327 , 319 266
	(Mean±S.D.)	(1158±41)	(267±25)	(143±11)	(594±29)	(304±33)

a : Dimethyl sulfoxide

b : n-(2-Ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

Table 4 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (main test) (SR05353)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		132 , 135 140 (136±4)	10 , 12 8 (10±2)	19 , 15 19 (18±2)	25 , 33 27 (28±4)	16 , 24 24 (21±5)
Test substance ^b	39.1	128 , 116 113 (119±8)	11 , 13 14 (13±2)	15 , 13 12 (13±2)	25 , 22 21 (23±2)	27 , 13 20 (20±7)
	78.1	125 , 137 130 (131±6)	12 , 12 10 (11±1)	11 , 12 21 (15±6)	25 , 32 34 (30±5)	18 , 17 23 (19±3)
	156	129 , 137 130 (132±4)	12 , 13 11 (12±1)	15 , 16 19 (17±2)	37 , 20 24 (27±9)	15 , 23 13 (17±5)
	313	138 , 143 114 (132±16)	6 , 7 7 (7±1)	15 , 16 16 (16±1)	34 , 19 19 (24±9)	23 , 17 16 (19±4)
	625	133 # , 119 # 123 # (125±7)	7 # , 11 # 5 # (8±3)	12 # , 16 # 10 # (13±3)	32 # , 22 # 25 # (26±5)	24 # , 17 # 17 # (19±4)
	1250	134 # , 130 # 138 # (134±4)	8 # , 13 # 8 # (10±3)	11 # , 17 # 12 # (13±3)	36 # , 23 # 35 # (31±7)	19 # , 24 # 20 # (21±3)
	2500	149 # , 151 # 138 # (146±7)	14 # , 11 # 7 # (11±4)	20 # , 18 # 16 # (18±2)	27 # , 38 # 25 # (30±7)	20 # , 21 # 18 # (20±2)
	5000	148 # , 140 # 142 # (143±4)	14 # , 11 # 7 # (11±4)	16 # , 20 # 8 # (15±6)	23 # , 23 # 37 # (28±8)	20 # , 20 # 21 # (20±1)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1027 , 955 980	200 , 213 196	1046 , 850 972	208 , 269 250	165 , 138 138
	(Mean±S.D.)	(987±37)	(203±9)	(956±99)	(242±31)	(147±16)

a : Dimethyl sulfoxide

b : n-(2-Ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

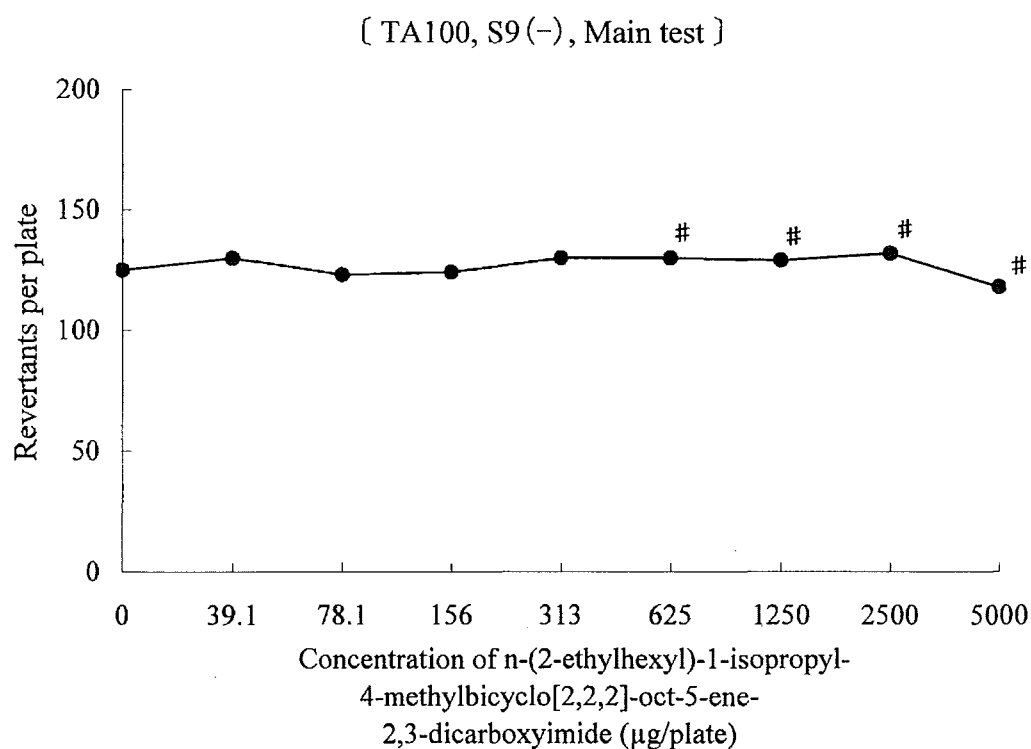
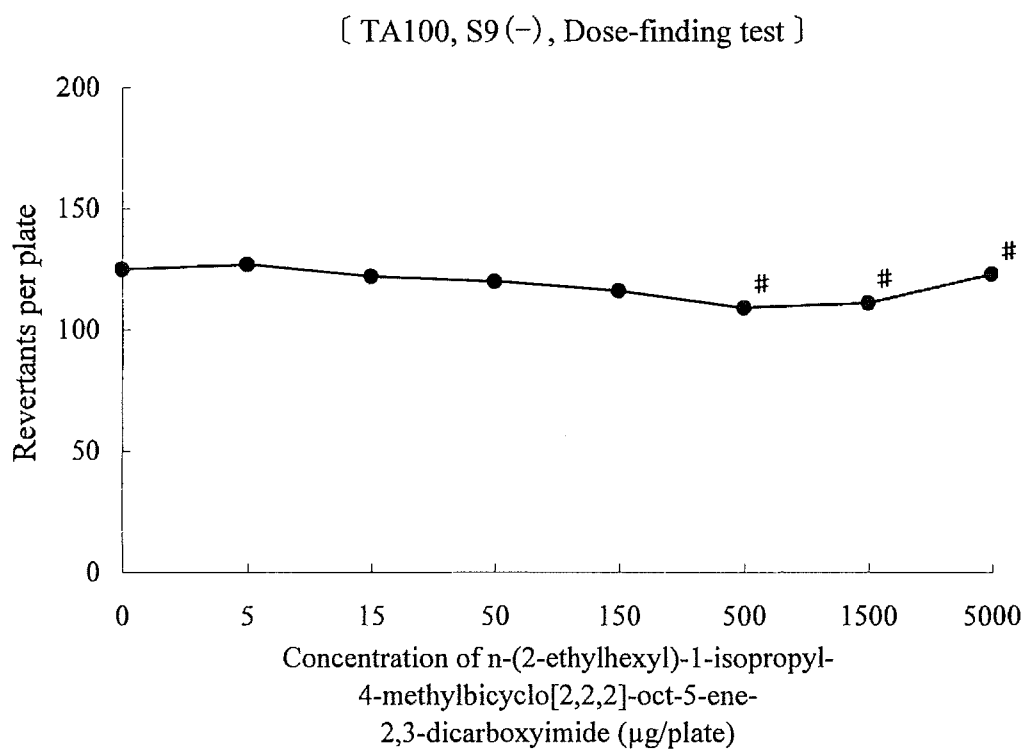


Figure 1-1 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

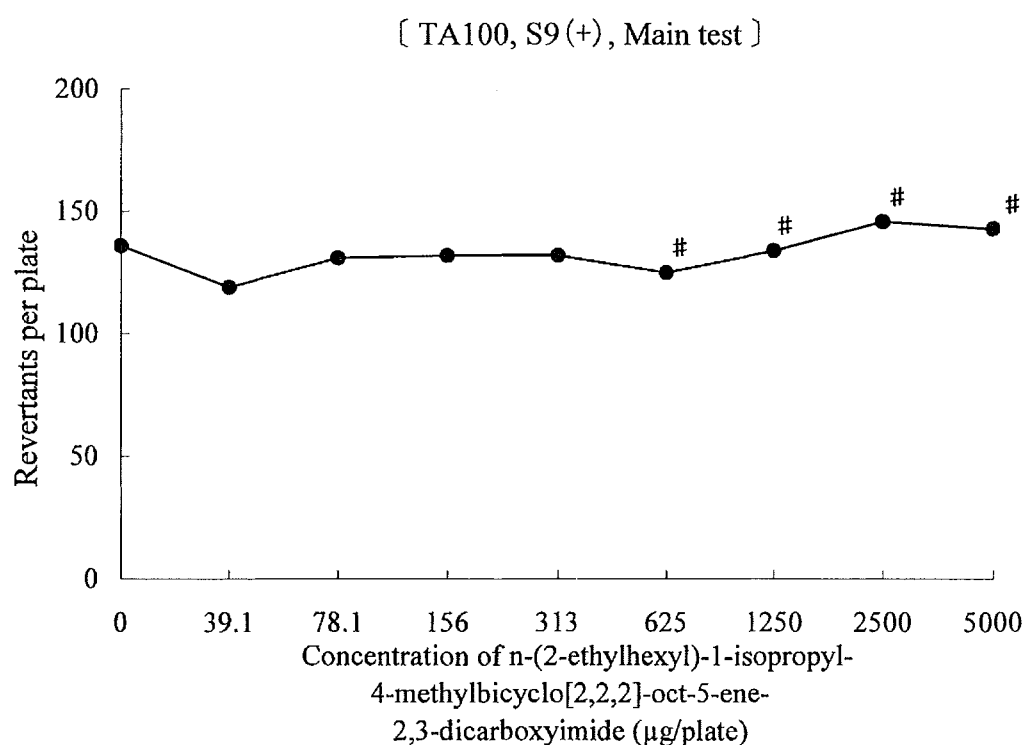
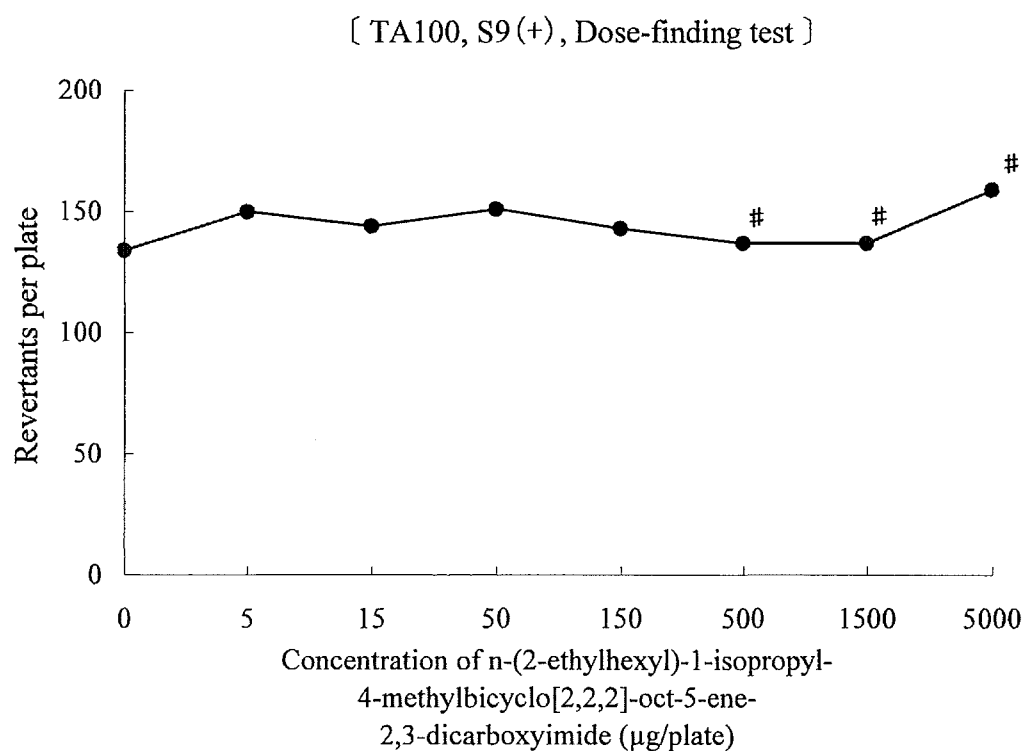


Figure 1-2 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

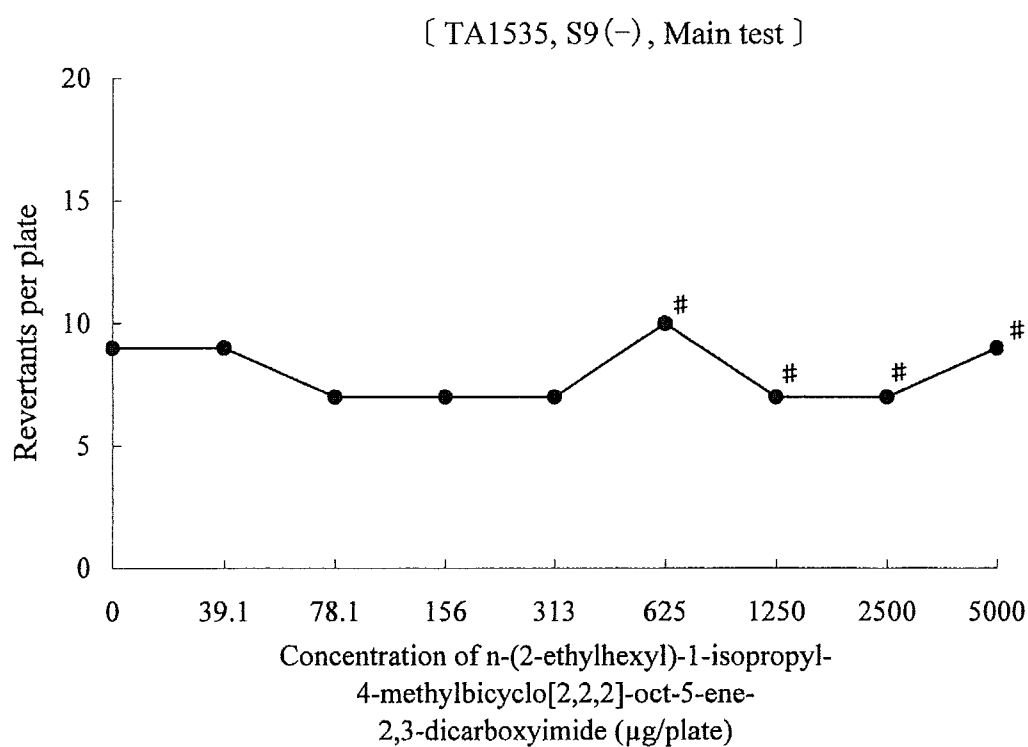
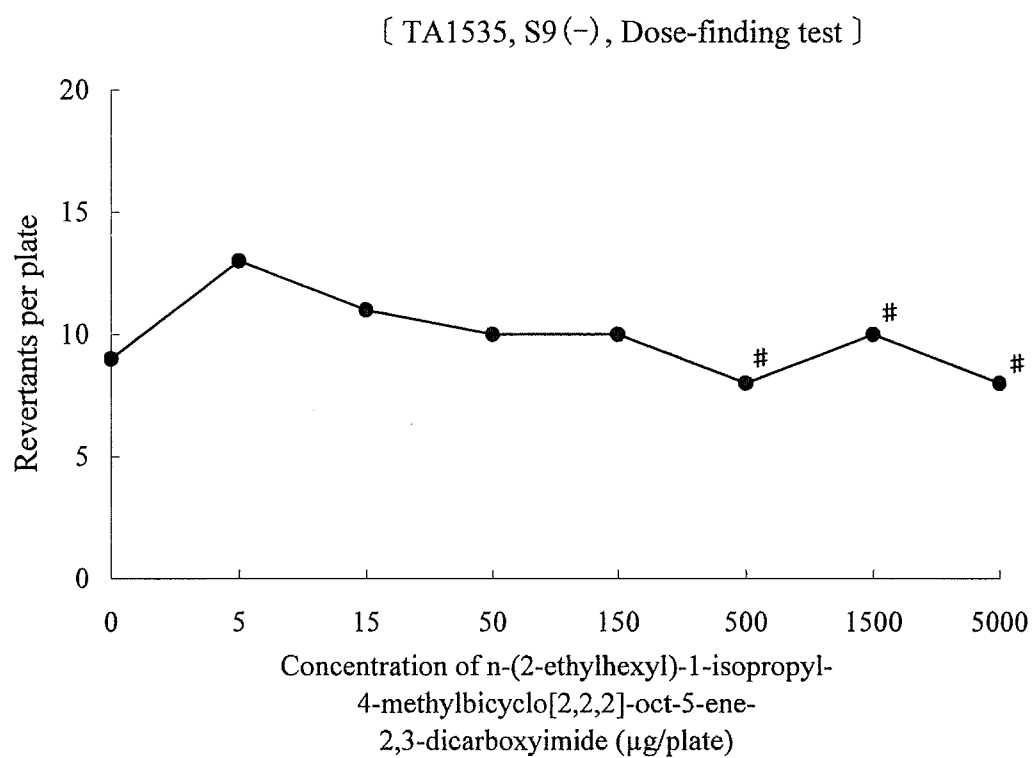


Figure 2-1 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

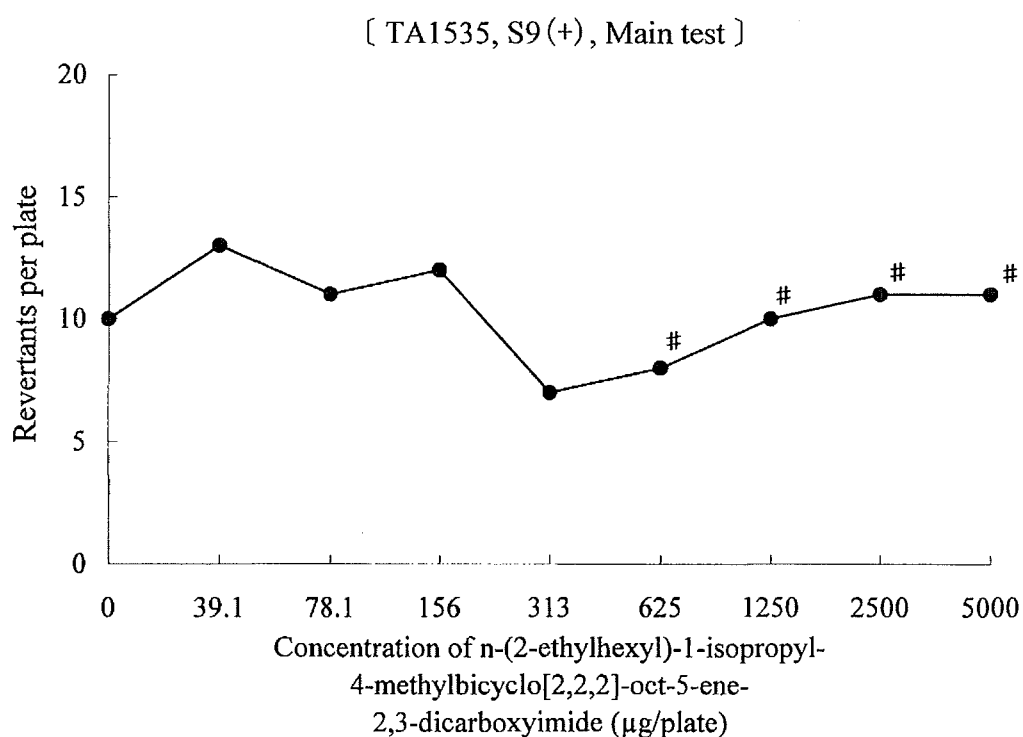
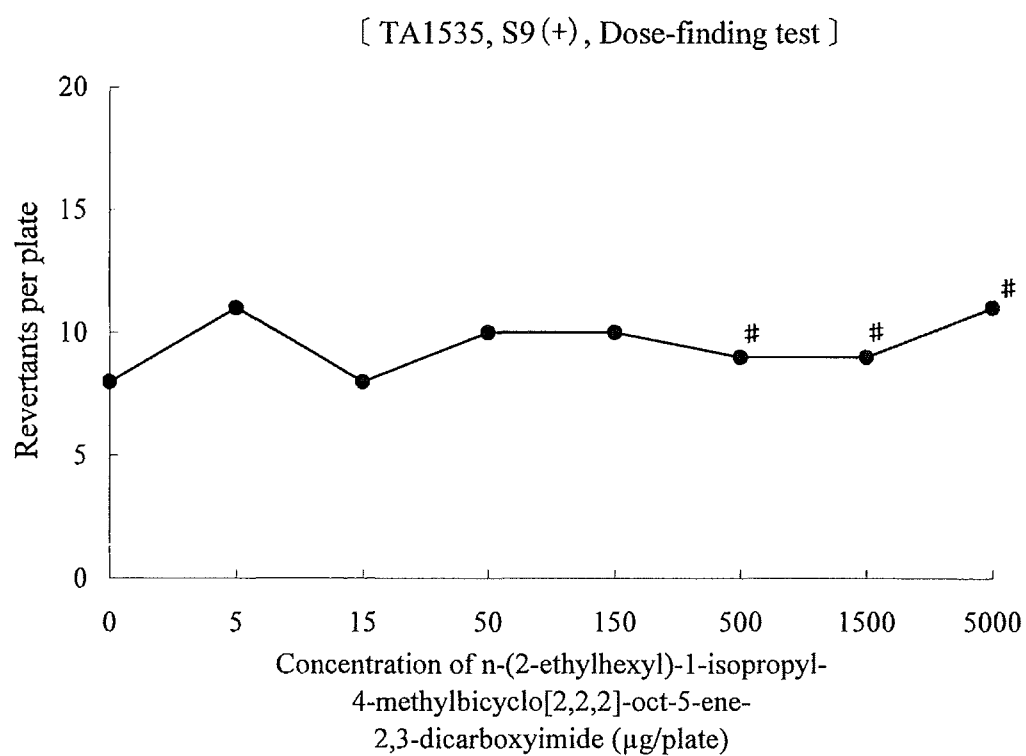


Figure 2-2 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

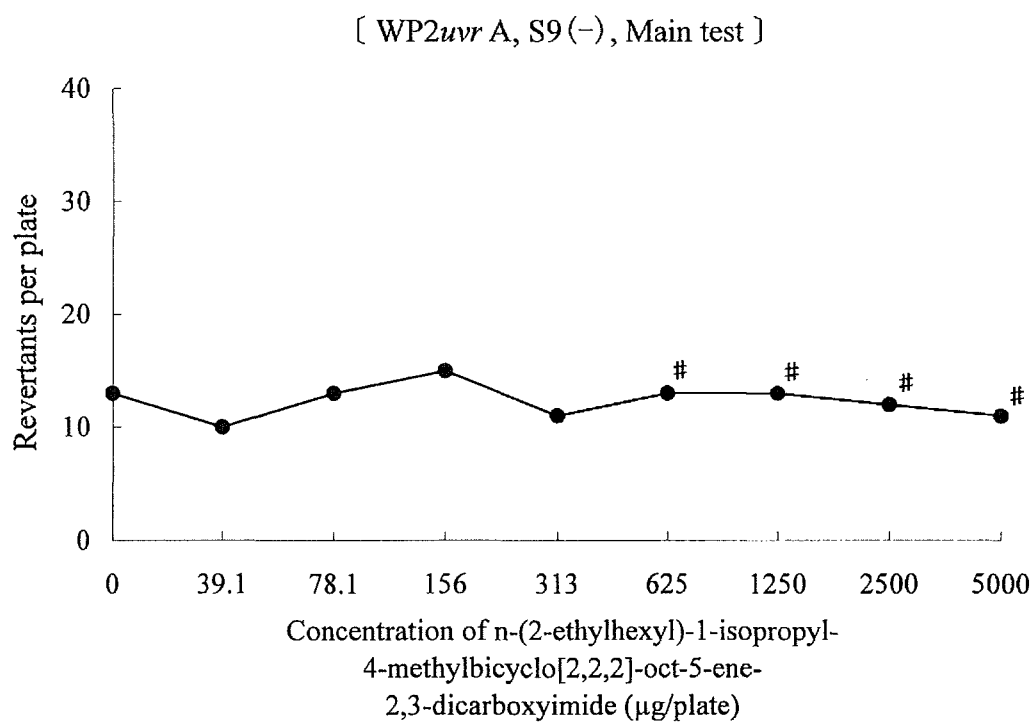
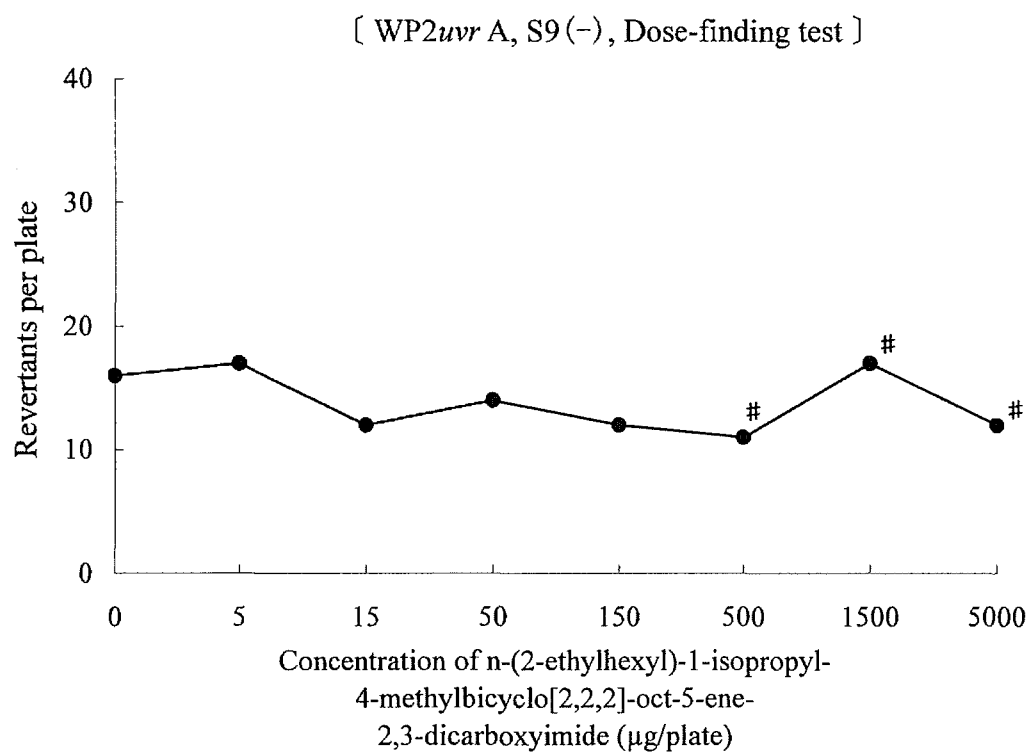


Figure 3-1 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

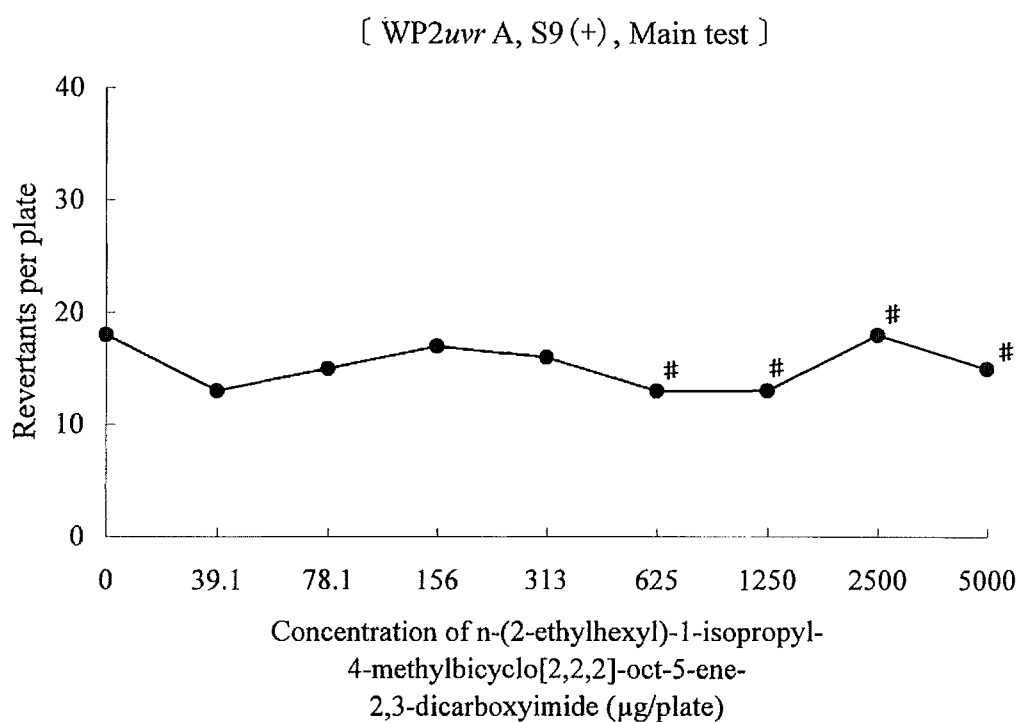
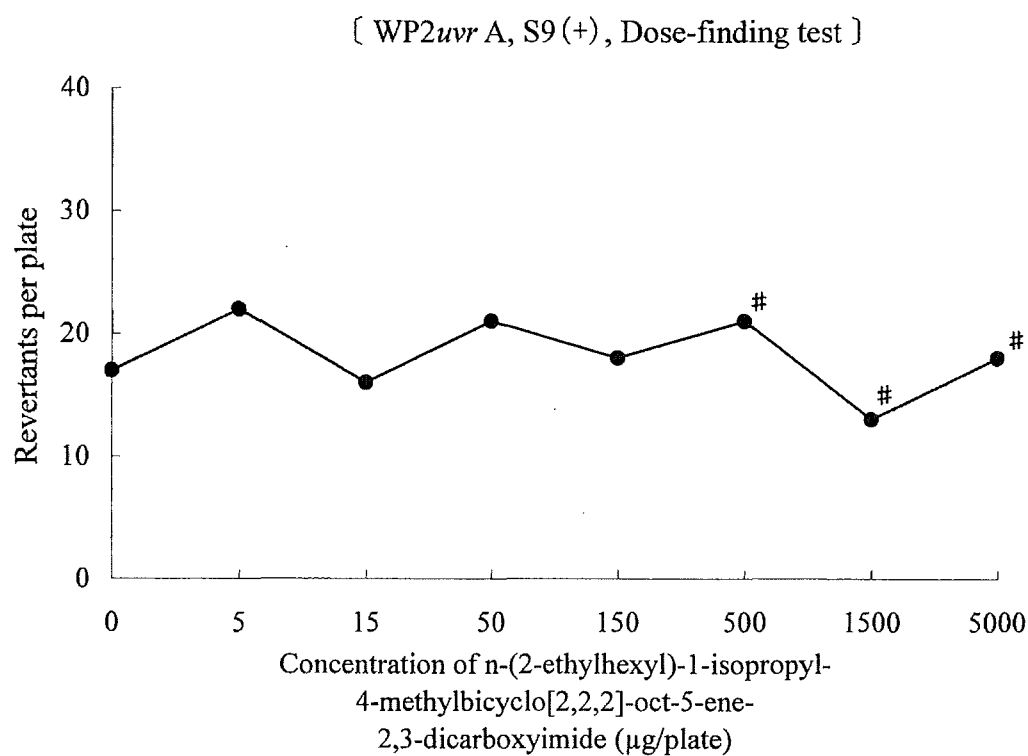


Figure 3-2 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

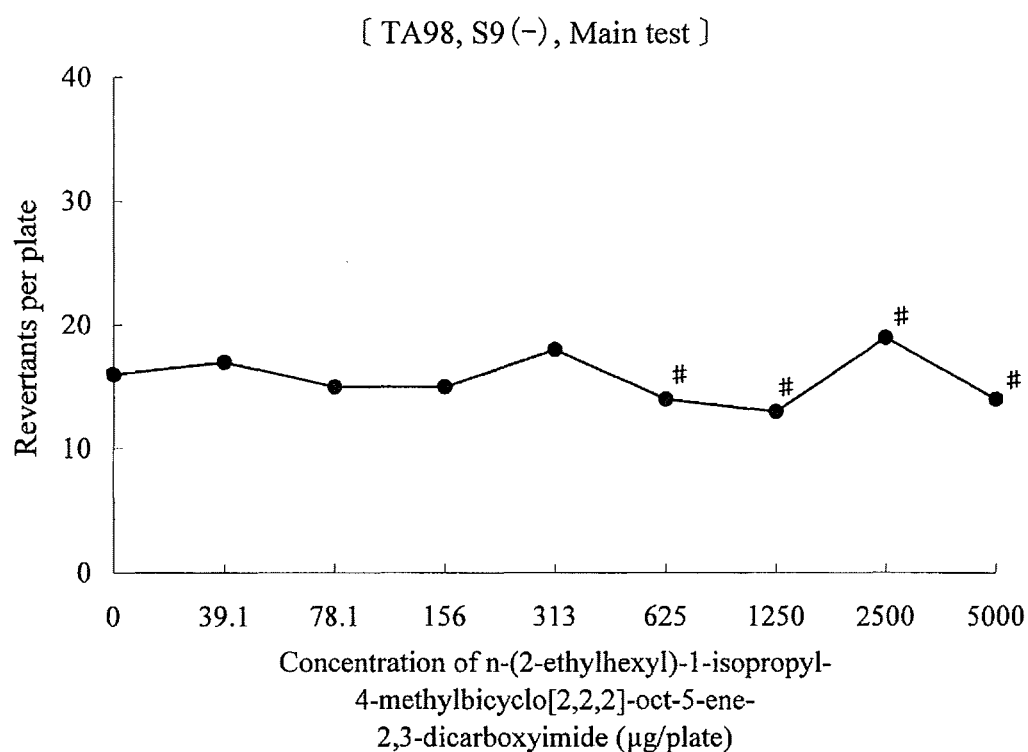
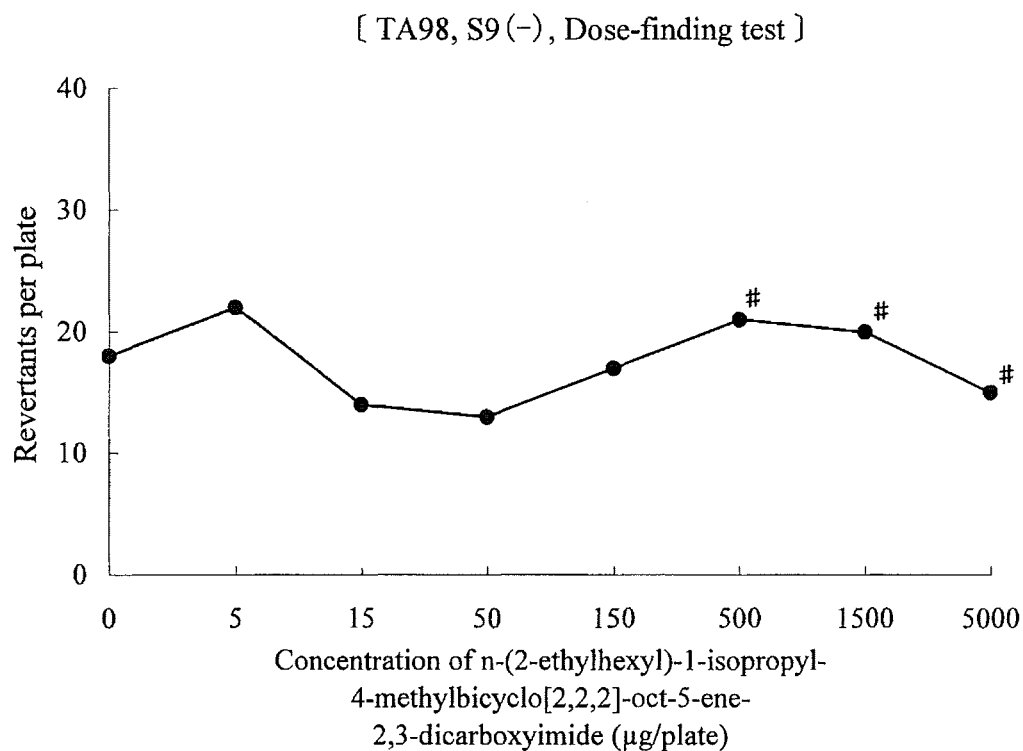


Figure 4-1 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

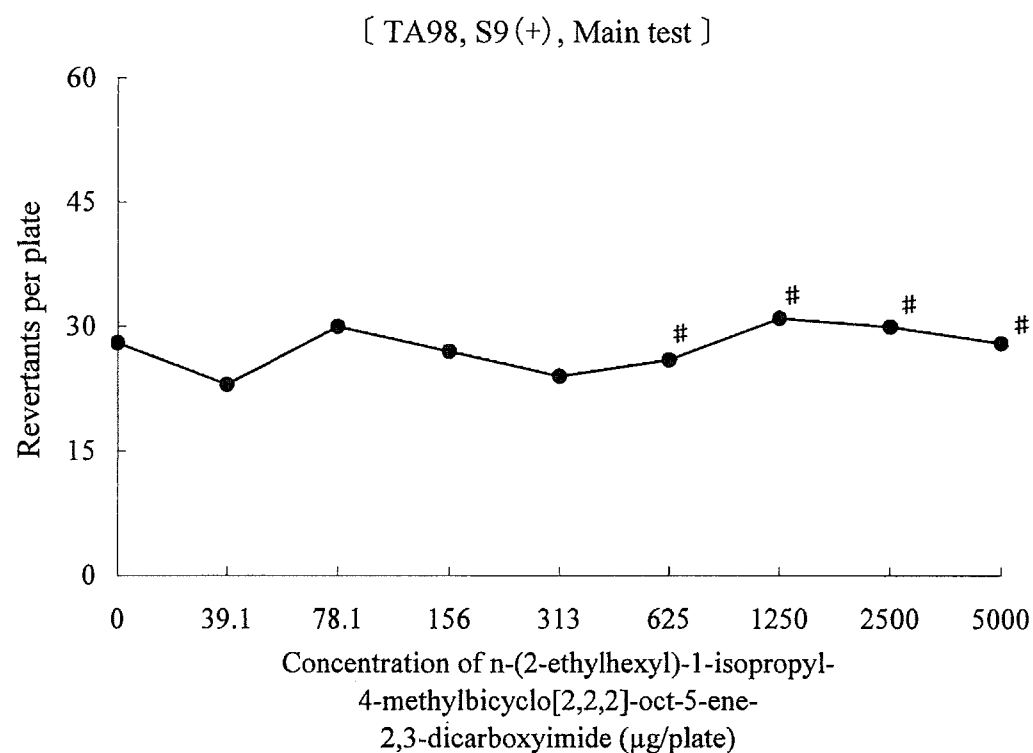
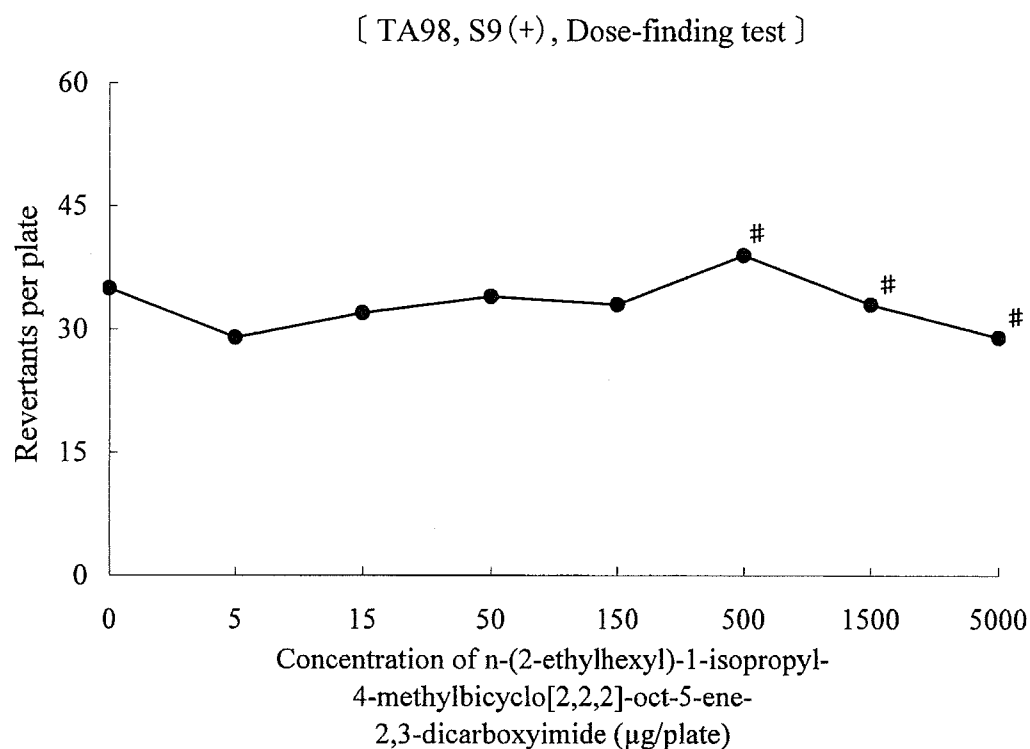


Figure 4-2 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

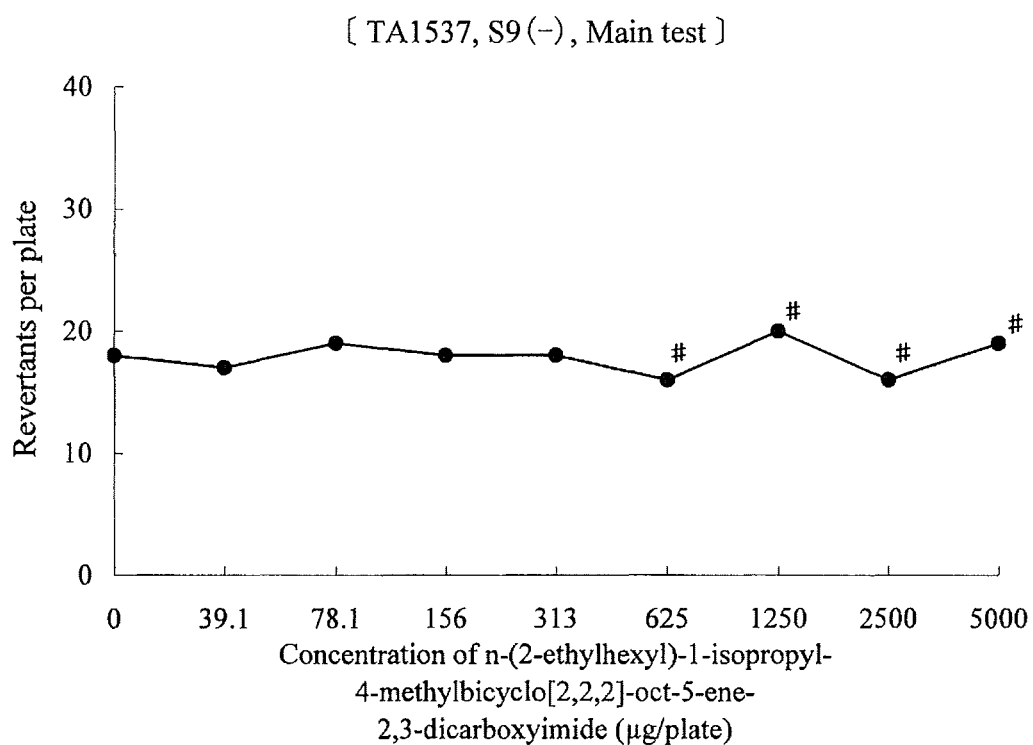
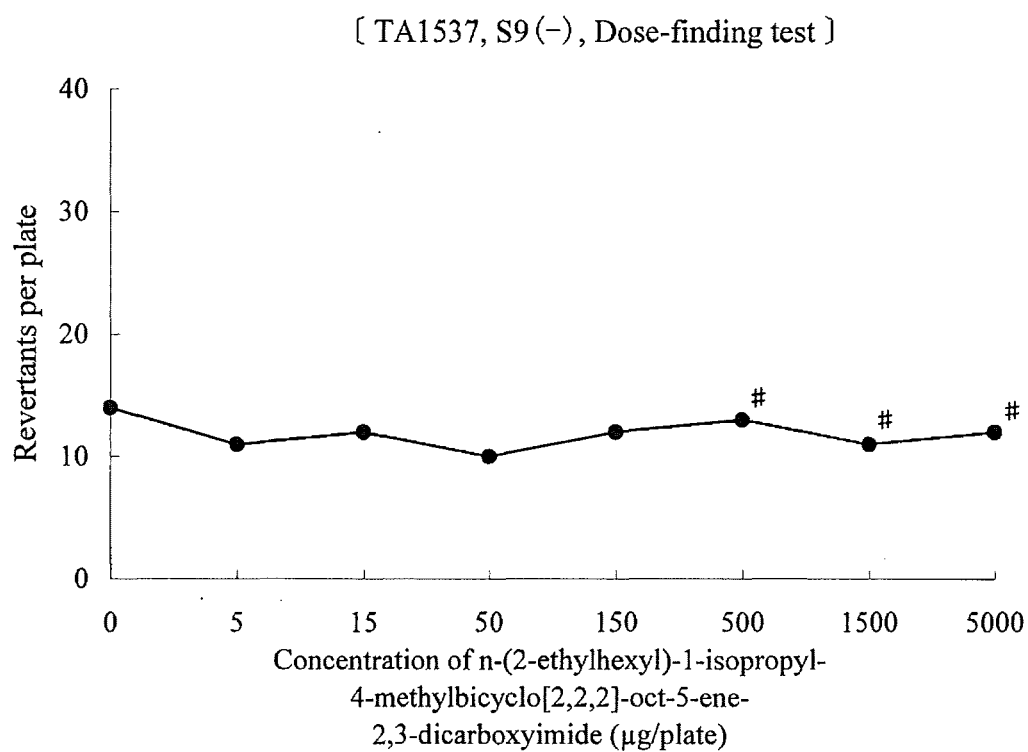


Figure 5-1 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

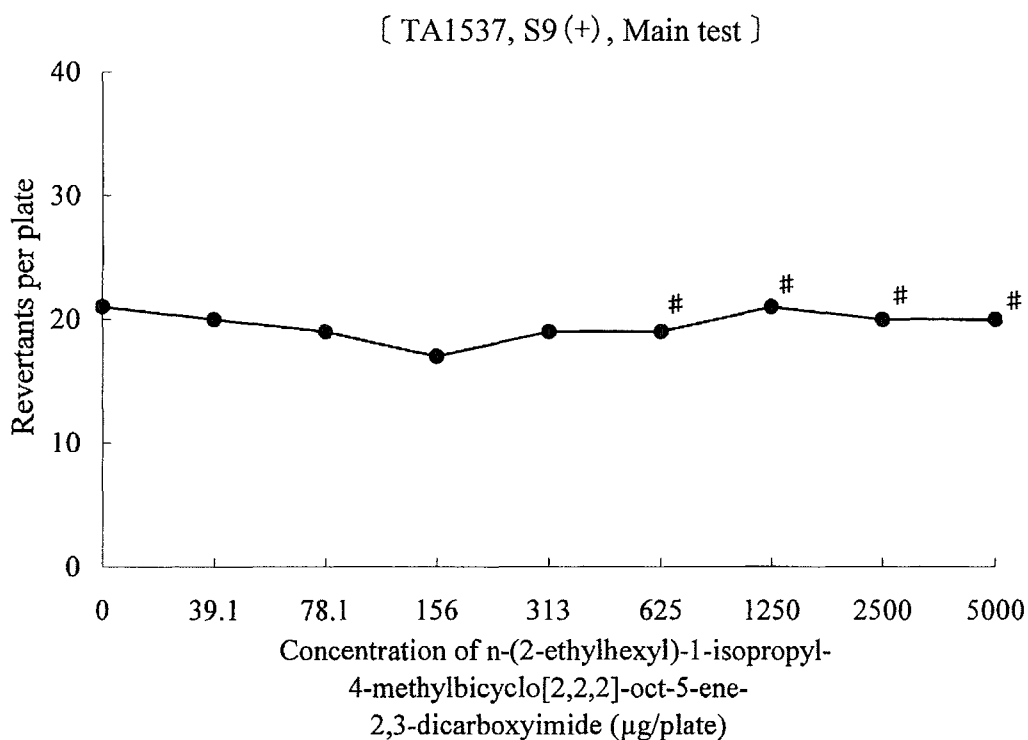
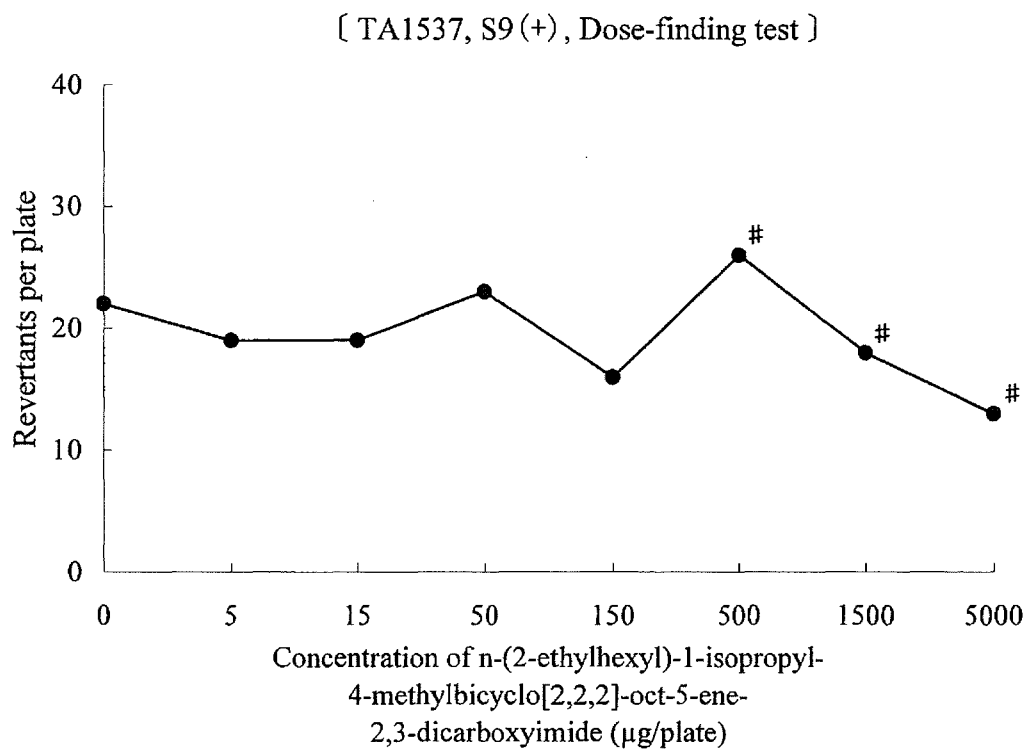


Figure 5-2 Reverse mutation test of n-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]-oct-5-ene-2,3-dicarboxyimide in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

試 験 成 績 書

No 0000023156

2006年 8月16日

~~北海道~~見(株)化合物安全性研究所 御中

株式会社 エーピーアイ コーポレーション

吉 富 事 業 所

〒871-0801 福岡県築上郡吉富町大字小祝955

TEL(0979)23-8911

品 名： サ社*リン500 18KG

ロット番号： Y225

数 量： 18 KG × 18 C/S (324 KG)

品質管理責任者

毎々格別のお引立て預り厚くお礼申し上げます。

この度御納品させて頂きます製品の試験結果は下記の通りですので御査収下さい。

試 験 項 目	規 格 値	試 験 結 果
外 観	黄色～黄褐色の澄明な粘性の液体	黄色の澄明な粘性の液体
におい	かすかににおいがある	かすかににおいがある
確認試験	陽性	陽性
屈折率	(D, 20) 1.498 - 1.502	1. 5 0 0
比 重	(20, 20) 1.016 - 1.020	1. 0 1 9
純度試験		
遊離酸・アルカリ	中性	中性
強熱残分	0. 1 %以下	0. 0 %
定量値	98. 0 %以上	99. 7 %
判 定 年 月 日		平成18年 5月25日
判 定		適

株式会社 エーピーアイ コーポレーション

(1 / 1)

Historical control data for reverse mutation test

Control data (Date : 2003.4~2006.8)										
Strain	TA100		TA1535		WP2 _{uvr} A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
No. of data	n = 172	n = 173	n = 156	n = 156	n = 156	n = 156	n = 178	n = 177	n = 157	n = 157
Mean $\pm$ S.D.	116 $\pm$ 14	135 $\pm$ 14	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3	16 $\pm$ 4	29 $\pm$ 4	12 $\pm$ 4	16 $\pm$ 5
Maximum	147	177	17	21	27	31	27	42	20	26
Minimum	94	111	5	6	11	15	10	20	5	2
X-R-Rs ^a	89 ~ 143	103 ~ 167	4 ~ 14	5 ~ 15	6 ~ 28	12 ~ 28	8 ~ 24	18 ~ 40	4 ~ 20	5 ~ 27
Positive control data (Date : 2003.4~2006.8)										
Strain	TA100		TA1535		WP2 _{uvr} A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
Compound	AF-2	2-AA	NaN ₃	2-AA	AF-2	2-AA	AF-2	2-AA	9-AA	2-AA
Concentration (μ g/plate)	0.01	1	0.5	2	0.01	10	0.1	0.5	80	2
No. of data	n = 172	n = 173	n = 156	n = 156	n = 156	n = 156	n = 178	n = 177	n = 157	n = 157
Mean $\pm$ S.D.	758 $\pm$ 141	1217 $\pm$ 217	243 $\pm$ 49	252 $\pm$ 48	111 $\pm$ 12	811 $\pm$ 117	330 $\pm$ 81	263 $\pm$ 54	257 $\pm$ 50	227 $\pm$ 53
Maximum	1258	1934	379	390	143	1130	524	416	466	426
Minimum	509	773	156	167	88	474	214	171	175	140
X-R-Rs ^a	495 ~ 1021	741 ~ 1693	142 ~ 344	180 ~ 324	87 ~ 135	564 ~ 1058	192 ~ 468	167 ~ 359	135 ~ 379	137 ~ 317

^a X-R-Rs = $X \pm 2.66Rs$

X = Mean

Rs = Mean of ($X_i - X_{i-1}$)