



最 終 報 告 書

3-ヘキセニルサリチレート
の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-1108

試験期間：2012年10月12日-2013年3月22日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

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
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	5
2.1	試験番号	5
2.2	試験表題	5
2.3	試験目的	5
2.4	試験委託者	5
2.5	試験受託者	5
2.6	試験実施施設	5
2.7	試験日程	5
2.8	試験責任者	6
2.9	試験担当者	6
2.10	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	6
2.11	資料の保存	6
2.12	試験責任者の署名又は記名・なつ印	7
3.	要約	8
4.	緒言	9
5.	被験物質及び被験液の調製	10
5.1	被験物質及び溶媒	10
5.1.1	被験物質	10
5.1.2	溶媒	11
5.1.3	溶媒の選択理由	11
5.2	被験液の調製方法	11
5.2.1	用量設定試験用被験液の調製	11
5.2.2	本試験 1 回日用被験液の調製	11
5.2.3	本試験 2 回日用被験液の調製	12
5.2.4	被験液の保存条件	12
6.	試験材料及び方法	12
6.1	試験菌株 ^{1), 2), 3), 4), 5)}	12
6.1.1	菌株の種類	12
6.1.2	菌株の選択理由	13
6.1.3	菌株の保存及び解凍	13
6.1.4	菌株の特性検査	13
6.2	対照物質 ^{6), 7)}	14
6.2.1	陰性対照物質	14
6.2.2	陽性対照物質	14

6.2.3	調製方法	14
6.3	試薬 ^{5), 6)}	15
6.3.1	S9Mixの調製方法	15
6.3.2	培地	16
6.3.3	ニュートリエントブロスNo.2 培養液	16
6.3.4	0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4)	16
6.3.5	トップアガー	17
6.4	試験方法 ^{6), 7)}	18
6.4.1	前培養	18
6.4.2	プレート数	18
6.4.3	試験操作 (プレインキュベーション法)	18
6.5	判定基準 ^{6), 7), 8)}	19
7.	試験結果	20
7.1	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定	20
7.2	本試験 1 回目及び本試験 2 回日の観察結果	20
7.3	試験系の成立条件	20
8.	考察	21
9.	参考文献	22

Tables

別表 1	試験結果表 (用量設定試験)	23
別表 2	試験結果表 (本試験 1 回目 : TA 株-S9Mix)	24
別表 3	試験結果表 (本試験 1 回目 : TA 株+S9Mix)	25
別表 4	試験結果表 (本試験 1 回目 : WP2uvrA)	26
別表 5	試験結果表 (本試験 2 回目 : TA 株-S9Mix)	27
別表 6	試験結果表 (本試験 2 回目 : TA 株+S9Mix)	28
別表 7	試験結果表 (本試験 2 回目 : WP2uvrA)	29

Figures

図 1	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA100 : -S9Mix)	30
図 2	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA100 : +S9Mix)	30
図 3	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA1535 : -S9Mix)	31
図 4	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA1535 : +S9Mix)	31
図 5	用量反応曲線 (本試験 1 回目 WP2uvrA : -S9Mix)	32
図 6	用量反応曲線 (本試験 1 回目 WP2uvrA : +S9Mix)	32
図 7	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA98 : -S9Mix)	33
図 8	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA98 : +S9Mix)	33
図 9	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA1537 : -S9Mix)	34

T-1108

図 10	用量反応曲線（本試験 1 回目 TA1537 : +S9Mix）	34
------	--	----

Attached Data

Attached Data 1	CERTIFICATE OF ANALYSIS (Stability of Test Article)	35
Attached Data 2	背景データ（121018）	38

信頼性保証書	39
--------------	----

T-1108

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

T-1108

2.2 試験表題

3-ヘキセニルサリチレート細菌を用いる復帰突然変異試験

2.3 試験目的

細菌を用い、3-ヘキセニルサリチレートの遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

2.4 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
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

2.5 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

2.6 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

2.7 試験日程

試験開始日	:	2012 年 10 月 12 日
用量設定試験開始日	:	2012 年 10 月 16 日
用量設定試験終了日	:	2012 年 10 月 19 日
本試験 1 回目開始日	:	2012 年 10 月 30 日
本試験 1 回目終了日	:	2012 年 11 月 2 日
本試験 2 回目開始日	:	2012 年 11 月 8 日
本試験 2 回目終了日	:	2012 年 11 月 12 日
試験終了日	:	2013 年 3 月 22 日

2.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部 第1研究室



2.9 試験担当者

用量設定試験

使用菌株の前培養 :
被験液の調製 :
試験操作 :

コロニーの計数 :

本試験 1 回目

使用菌株の前培養 :
被験液の調製 :
試験操作 :

コロニーの計数 :

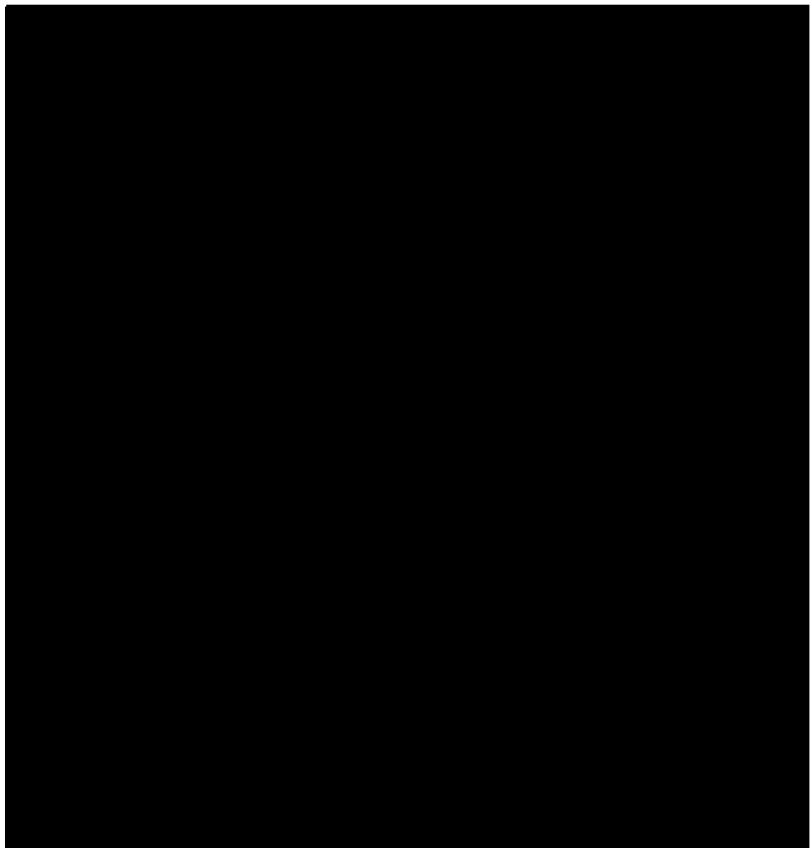
本試験 2 回目

使用菌株の前培養 :
被験液の調製 :
試験操作 :

コロニーの計数 :

被験物質の分析

安定性試験 :



2.10 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

本試験において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はなかった。

2.11 資料の保存

試験計画書、記録文書、生データ及び報告書類（最終報告書の原本を含む）は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

T-1108

2.12 試験責任者の署名又は記名・なつ印

 2013 年 3 月 22 日 
株式会社ポゾリサーチセンター 東京研究所

3. 要約

3-ヘキセニルサリチレート の遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により試験を実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド (以下、DMSO と略す) を用いた。

試験は、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA 株については 0.31~19.5 µg/plate の範囲の 7 用量で実施した。代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* については生育阻害が認められなかったため、313~5000 µg/plate の範囲の 5 用量で実施した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 9.77 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA 株の 19.5 µg/plate 以上の用量で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

2 回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において 3-ヘキセニルサリチレートは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない (陰性) と判定した。

4. 緒言

本試験は、厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室からの委託により、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。なお、試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して行った。

1) GLP

- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（OECD：1997年11月26日）
- 「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」（平成23年3月31日：薬食発0331第8号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知）

2) ガイドライン

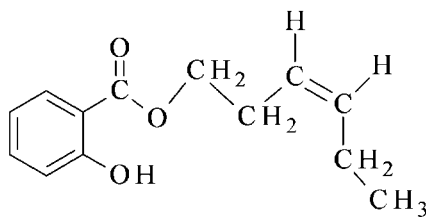
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」（OECD：1997年7月21日）
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成23年3月31日：薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知）

5. 被験物質及び被験液の調製

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

官報公示整理番号	:	(3)-3041
購入元	:	三立ケミー株式会社
製造者	:	Atomax Chemicals Co.,Ltd.
入手日	:	2012 年 7 月 20 日（御殿場研究所）
Ames 試験用入手日	:	2012 年 9 月 25 日（東京研究所）
入手量	:	25.00 g（Ames 試験用）
名称	:	3-ヘキセニルサリチレート
英名	:	<i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate
CAS 番号	:	65405-77-8
ロット番号	:	120707K2-1
分子量	:	220.26
構造式	:	



分子式	:	$C_{13}H_{16}O_3$
純度	:	98.86 %
沸点	:	271°C*
比重	:	1.060 (25/25°C)
常温における性状	:	無色液体
安定性	:	適切な条件下においては安定。なお、本試験終了後に 残余となった被験物質を株式会社ボゾリサーチセンタ ー御殿場研究所において分析した結果、実験期間中の 安定性が確認された（Attached Data 1 参照）。
溶解性	:	水；不溶 DMSO；50 mg/mL で溶解
溶媒中での安定性	:	水、DMSO；発熱、ガスの発生等の反応性なし
保存条件	:	冷暗所（冷蔵庫内、1～10°C）・密栓
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室 御殿場研究所 被験物質保存室
保存温度	:	期間（2012.9.25～2012.11.9）中の実測温度；2.9～5.7°C

残量の処置 : 実験終了後の残量はすべて株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所へ送付し、安定性確認後の残余物質はすべて廃棄した。

上記被験物質情報は、製造者からの情報及び*：独立行政法人製品評価技術基盤機構化学物質総合情報システム（CHRIP）の情報による。なお、溶解性及び溶媒中での安定性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果であり、水については 50 mg/mL で溶解しなかったため不溶とした。

5.1.2 溶媒

名称 : DMSO
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : WEK5750
 規格 : JIS 規格 試薬特級 99.0%以上
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室

5.1.3 溶媒の選択理由

水、DMSO について溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50 mg/mL で溶解せず、DMSO に 50 mg/mL で溶解し、いずれの溶媒においても発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。このため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

5.2 被験液の調製方法

5.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 0.200 mL 分取し、電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ：GR-120）を用いて秤量した。その秤量値 225.6 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.200 mL を差し引いた 4.312 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 0.200 mL 分取し、電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ：GR-120）を用いて秤量した。その秤量値 224.5 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.200 mL を差し引いた 4.290 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL 溶

液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 4 段階希釈し、50、25、12.5、6.25 及び 3.13 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。さらに 3.13 mg/mL の被験液を公比 4 で順次 2 段階希釈し、0.195 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 6 段階希釈し、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122、0.0061 及び 0.0031 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 0.200 mL 分取し、電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ：GR-120）を用いて秤量した。その秤量値 241.9 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.200 mL を差し引いた 4.638 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 4 段階希釈し、50、25、12.5、6.25 及び 3.13 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。さらに 3.13 mg/mL の被験液を公比 4 で順次 2 段階希釈し、0.195 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 6 段階希釈し、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122、0.0061 及び 0.0031 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

5.2.4 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

6. 試験材料及び方法

6.1 試験菌株^{1), 2), 3), 4), 5)}

6.1.1 菌株の種類

次の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

なお、*S. typhimurium* TA 株は国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より 1997 年 10 月 9 日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したものから、2005 年 7 月 21 日に東京研究所に分与された。また、*E. coli* WP2 *uvrA* は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構より 2011 年 10 月 20 日に入手した。

6.1.2 菌株の選択理由

当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる復帰突然変異試験に最も一般的に使用されている。

6.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して DMSO (和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 STG0588) を 0.7 mL の割合で添加した。これを滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注し、ドライアイス-アセトンで急速凍結した後、 -70°C 以下の超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社 : MDF-192) で保存した (保存期間中の実測温度 2012 年 7 月 19 日~2012 年 11 月 8 日 : -87.3°C ~ -79.2°C)。なお、使用する際は室温で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

	使用した菌株の凍結保存日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2012 年 7 月 19 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2012 年 7 月 19 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2012 年 7 月 19 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2012 年 7 月 19 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2012 年 7 月 28 日

6.1.4 菌株の特性検査

6.1.3 の凍結保存菌株を用いて、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、菌増殖率、陰性対照値及び陽性対照値等の特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認して使用した。

	使用した菌株の特性検査実施日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2012 年 7 月 23 日~2012 年 7 月 26 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2012 年 7 月 23 日~2012 年 7 月 26 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2012 年 7 月 23 日~2012 年 7 月 26 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2012 年 7 月 23 日~2012 年 7 月 26 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2012 年 7 月 28 日~2012 年 7 月 30 日

6.2 対照物質^{6), 7)}

6.2.1 陰性対照物質

被験液の調製に用いた DMSO を陰性対照物質とした。

6.2.2 陽性対照物質

以下の変異原物質を陽性対照物質とした。

表 1 陽性対照物質

陽性対照物質（略称）	ロット番号	純度（%）	保存方法	製造元
2-（2-Furyl）-3-（5-nitro-2-furyl）acrylamide（AF-2）	WKK3086	99.6%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Sodium azide（SAZ）	HLP7075	100.2%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-（2-chloroethyl）-aminopropylamino]acridine・2HCl（ICR-191）	562079	—	室温、遮光	Polysciences, Inc.
2-Aminoanthracene（2AA）	KWL1226	95.4%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Benzo[a]pyrene（B[a]P）	20732	99.8%	冷蔵、遮光	AccuStandard, Inc.

保存場所 東京研究所 微生物試験室

6.2.3 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、JIS 規格 試薬特級、ロット番号 WER5408）に溶解し、SAZ は注射用水（株式会社大塚製薬工場、日本薬局方、ロット番号 K2D85）に溶解し、約 1 mL ずつ小分けして-20℃以下で凍結保存した。なお、試験実施時に解凍して使用した。それぞれの調製濃度を表 2 に示した。

表 2 陽性対照物質調製濃度

使用菌株	代謝活性化しない場合		代謝活性化する場合	
	陽性対照物質	調製濃度（μg/mL）	陽性対照物質	調製濃度（μg/mL）
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1 （ 0.01 ）	B[a]P	50 （ 5.0 ）
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5 （ 0.5 ）	2AA	20 （ 2.0 ）
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1 （ 0.01 ）	2AA	100 （ 10.0 ）
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1 （ 0.1 ）	B[a]P	50 （ 5.0 ）
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10 （ 1.0 ）	B[a]P	50 （ 5.0 ）

（ ） 内の数値は、プレートに処理したときの処理用量（μg/plate）を示す。

6.3 試薬^{5), 6)}

6.3.1 S9Mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後ろ過 (NALGENE 0.45 μ m : Lot No.1065305) 滅菌し、Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 Mix とした。調製後、使用時まで冷蔵下で保存し、使用後の残液は廃棄した。

1) S9

名称	:	S9
製造元	:	キッコーマン株式会社
ロット番号	:	RAA-651
製造日	:	2012 年 6 月 15 日
購入日	:	2012 年 7 月 20 日
種・系統	:	ラット・SD 系
週齢・性	:	7 週齢・雄
体重	:	174-247 g
誘導物質	:	フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
投与方法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB 4 日間連続投与 : 30+60+60+60 (mg/kg 体重) PB 投与 3 日目 BF 投与 : 80 (mg/kg 体重)
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室内超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社 : MDF-192)
保存期間中の実測温度	:	2012 年 7 月 20 日~2012 年 11 月 9 日 : -87.3~-79.2°C

2) 補酵素

名称	:	Cofactor-I
製造元	:	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	:	999202
製造日	:	2012 年 6 月 26 日
購入日	:	2012 年 9 月 26 日
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室内冷蔵庫 (冷凍・冷蔵庫 MPR-411FR : 三洋電機バイオメディカ株式会社)
保存期間中の実測温度	:	2012 年 9 月 26 日~2012 年 11 月 9 日 : 1.5~6.3°C

3) S9Mix の組成 (1 mL 中)

水	:	0.9 mL
S9	:	0.1 mL

T-1108

MgCl ₂	:	8 μmol/mL
KCl	:	33 μmol/mL
グルコース-6-リン酸	:	5 μmol/mL
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 μmol/mL
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)	:	4 μmol/mL
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)	:	100 μmol/mL

6.3.2 培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

名称	:	バイタルメディア AMT-O 培地
製造元	:	極東製薬工業株式会社
ロット番号	:	DZLD8M01
製造日	:	2012 年 8 月 22 日
購入日	:	2012 年 10 月 15 日
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 寒天培地保存室

2) 使用寒天

名称	:	OXOID AGAR No.1
製造元	:	OXOID LTD.
ロット番号	:	1199031-02

6.3.3 ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

名称	:	ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)
ロット番号	:	876774
製造元	:	OXOID LTD.
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室

6.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

0.1mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液に、0.1mol/L リン酸二水素ナトリウム二水和物水溶液を加えながら pH 7.4 に調整し、0.1mol/L リン酸緩衝液とした。これをオートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行った。調製後は使用時まで冷蔵で

保存した。

1) リン酸二水素ナトリウム二水和物

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : STJ4879
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

2) リン酸水素二ナトリウム

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : DCK3839
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

6.3.5 トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液（0.6 wt% Agar, 0.6wt% NaCl）をオートクレーブにより滅菌処理（121°C、20 分）した後、0.5 mmol/L D-ビオチン-0.5 mmol/L L-ヒスチジン溶液と 0.5 mmol/L L-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量加えて調製し、*S. typhimurium* TA株と*E. coli* WP2 *uvrA*で共通で使用した。調製後は室温で保存し、使用時は電子レンジで溶解後、固化を防ぐため 45°Cの恒温槽で保温した。

1) 寒天

名称 : Bacto Agar
 製造元 : Becton, Dickinson and Company
 ロット番号 : 1242926
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

2) 塩化ナトリウム

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : TLL2157
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

3) D-ビオチン

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : STG1436
 保存方法 : 冷蔵保存、遮光
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

4) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : STQ4562

保存方法 : 室温保存、遮光
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

5) L-トリプトファン

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : CDG0675
 保存方法 : 室温保存、遮光
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

6.4 試験方法^{6), 7)}

6.4.1 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10 mL を入れた滅菌済み L 字型試験管（容量 48 mL）に、凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を *S. typhimurium* TA 株は各 20 μ L、*E. coli* WP2 *uvrA* は 10 μ L 植菌し、振盪恒温槽（COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社）にセットした。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 2) これをプログラム制御により前培養開始まで 4°C の水浴中に放置（6 時間 30 分）した後、振盪（100 回/分）しながら 37°C に上昇後 9 時間前培養した。
- 3) 前培養終了時に培養液の吸光度をデジタル比色計（Mini photo 518R、タイテック株式会社）で測定し、生菌数が 1×10^9 個/mL 以上あることを確認した。なお、培養液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数 (個/mL)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.39×10^9	4.79×10^9	5.45×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	4.92×10^9	4.92×10^9	5.13×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	6.51×10^9	7.91×10^9	9.06×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.71×10^9	6.10×10^9	6.63×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	4.44×10^9	4.05×10^9	5.19×10^9

6.4.2 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では各用量につき 2 枚、2 回の本試験では各用量につき 3 枚のプレートを用いた。

6.4.3 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL を、代謝活性化す

- る場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 攪拌後 37°C で 20 分間振盪（80 回/分）しながらプレインキュベーションした。
 - 3) プレインキュベーション終了後、あらかじめ電子レンジを用いて溶解し、ユニット恒温槽で 45°C に保温されたトッパガーを小試験管に 2.0 mL 加えて攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
 - 4) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトッパガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1) ~4) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
 - 5) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトッパガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験では 50 時間、本試験 1 回目では 49.5 時間、本試験 2 回目では 48 時間培養した。
 - 6) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色の有無を確認した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかったため、自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザー CA-11D systems、システムサイエンス株式会社）を用いて計数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

6.5 判定基準^{6), 7), 8)}

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して 2 倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の 2 倍以上となる増加を示し、2 回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

7. 試験結果

用量設定試験の結果を別表 1、本試験 1 回目の結果を別表 2~4、本試験 2 回目の結果を別表 5~7 に示した。なお、図 1~10 は別表 2~4 より作成した。

7.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量（19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate）を用い、用量設定試験を実施した。

その結果、本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA 株において、試験したすべての用量の 19.5 µg/plate 以上で認められた。本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA 株については 19.5 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 6 段階希釈した計 7 用量を設定した。また、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* については生育阻害が認められなかったため 5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 用量を設定した。

7.2 本試験 1 回目及び本試験 2 回目の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 9.77 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA 株の 19.5 µg/plate の用量で認められた。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

7.3 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値（Attached Data 2）内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

8. 考察

2 回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

なお、本被験物質は *S. typhimurium* TA 株に対してやや強い生育阻害を示し、*E. coli* WP2 *uvrA* に対しては全く生育阻害を示さなかった。これは *S. typhimurium* TA 株が細胞外膜を欠損 (*rfa* 変異) しているために本被験物質が細胞膜を通過することができ、細胞外膜の欠損のない *E. coli* WP2 *uvrA* では細胞膜を通過することができなかったためと考えられる。

本被験物質はほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性と報告されている⁹⁾。また、類縁化合物であるシス-3-ヘキセノールでは、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性と報告されている¹⁰⁾。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下において 3-ヘキセニルサリチレートは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

9. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp + Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編) : 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館 基 (監修) : 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.
- 9) (2013) : 3-ヘキセニルサリチレートのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 (試験番号: T-G056) 、株式会社ボゾリサーチセンター
- 10) (2012) : シス-3-ヘキセノールのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 (試験番号: T-G032) 、株式会社ボゾリサーチセンター

T-1108

(別表1)

試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: 3-ヘキセニルサリチレート

No. T-1108

試験実施期間		2012年10月16日 より 2012年10月19日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	105 119 (112)	11 11 (11)	39 40 (40)	24 19 (22)	11 9 (10)
	19.5	64 * 59 * (62)	7 * 6 * (7)	50 38 (44)	14 * 13 * (14)	3 * 4 * (4)
	78.1	71 * 62 * (67)	9 * 7 * (8)	35 34 (35)	11 * 13 * (12)	2 * 3 * (3)
	313	61 * 60 * (61)	5 * 4 * (5)	41 47 (44)	9 * 5 * (7)	5 * 4 * (5)
	1250	54 * 57 * (56)	0 * 0 * (0)	34 39 (37)	5 * 8 * (7)	2 * 2 * (2)
	5000	40 * 27 * (34)	0 * 0 * (0)	39 45 (42)	7 * 9 * (8)	2 * 1 * (2)
	5000	27 * (34)	0 * (0)	45 (42)	9 * (8)	1 * (2)
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	104 105 (105)	10 10 (10)	46 36 (41)	21 28 (25)	8 12 (10)
	19.5	99 * 116 * (108)	9 * 8 * (9)	34 36 (35)	25 * 32 * (29)	8 * 13 * (11)
	78.1	78 * 95 * (87)	3 * 5 * (4)	51 41 (46)	26 * 24 * (25)	7 * 8 * (8)
	313	93 * 76 * (85)	0 * 0 * (0)	35 30 (33)	11 * 8 * (10)	5 * 4 * (5)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	41 40 (41)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	40 38 (39)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * (0)	0 * (0)	38 (39)	0 * (0)	0 * (0)
陽性対照	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	608 575 (592)	329 359 (344)	132 134 (133)	387 325 (356)	1673 1690 (1682)
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	822 826 (824)	391 408 (400)	752 759 (756)	262 298 (280)	91 90 (91)

(備考)

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

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

T-1108

(別表2)

試験結果表 (本試験1回目:TA株-S9Mix)

被験物質の名称: 3-ヘキセニルサリチレート

No. T-1108

試験実施期間		2012年10月30日 より 2012年11月2日			
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)			
		塩基置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA1535	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	106	8	14	11
		110	9	19	9
		106 (107 ± 2.3)	11 (9 ± 1.5)	15 (16 ± 2.6)	8 (9 ± 1.5)
	0.31	130	7	15	8
		112	8	11	5
		104 (115 ± 13.3)	7 (7 ± 0.6)	13 (13 ± 2.0)	5 (6 ± 1.7)
	0.61	99	5	16	8
		104	5	10	6
		106 (103 ± 3.6)	11 (7 ± 3.5)	12 (13 ± 3.1)	11 (8 ± 2.5)
	1.22	96	5	15	8
		114	6	13	4
		108 (106 ± 9.2)	10 (7 ± 2.6)	18 (15 ± 2.5)	4 (5 ± 2.3)
	2.44	100	8	11	5
		99	8	16	5
		87 (95 ± 7.2)	11 (9 ± 1.7)	13 (13 ± 2.5)	4 (5 ± 0.6)
	4.88	101	7	10	6
		89	8	11	4
		97 (96 ± 6.1)	8 (8 ± 0.6)	16 (12 ± 3.2)	5 (5 ± 1.0)
	9.77	92	5 *	10	4 *
		93	6 *	16	5 *
		89 (91 ± 2.1)	8 * (6 ± 1.5)	11 (12 ± 3.2)	3 * (4 ± 1.0)
	19.5	59 *	5 *	8 *	3 *
		57 *	6 *	10 *	4 *
		70 * (62 ± 7.0)	6 * (6 ± 0.6)	9 * (9 ± 1.0)	2 * (3 ± 1.0)
陽性対照	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	ICR-191
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	616 676 595 (629 ± 42.0)	341 358 374 (358 ± 16.5)	411 396 370 (392 ± 20.7)	1602 1330 1237 (1390 ± 189.7)

(備考)

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

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

T-1108

(別表3)

試験結果表 (本試験1回目:TA株+S9Mix)

被験物質の名称: 3-ヘキセニルサリチレート

No. T-1108

試験実施期間		2012年10月30日 より 2012年11月2日			
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)			
		塩基対置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA1535	TA98	TA1537
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	111	14	21	6
		117	7	24	5
		108 (112 ± 4.6)	10 (10 ± 3.5)	25 (23 ± 2.1)	7 (6 ± 1.0)
	0.31	117	7	33	8
		123	5	21	5
		118 (119 ± 3.2)	10 (7 ± 2.5)	25 (26 ± 6.1)	4 (6 ± 2.1)
	0.61	122	10	25	8
		128	10	35	4
		113 (121 ± 7.5)	8 (9 ± 1.2)	27 (29 ± 5.3)	4 (5 ± 2.3)
	1.22	125	8	29	10
		132	11	29	6
		105 (121 ± 14.0)	12 (10 ± 2.1)	30 (29 ± 0.6)	7 (8 ± 2.1)
	2.44	120	8	33	7
		137	15	32	6
		105 (121 ± 16.0)	5 (9 ± 5.1)	30 (32 ± 1.5)	7 (7 ± 0.6)
	4.88	126	13	27	6
		111	7	21	8
		100 (112 ± 13.1)	6 (9 ± 3.8)	28 (25 ± 3.8)	5 (6 ± 1.5)
	9.77	106	10	25	7
		114	7	27	4
		98 (106 ± 8.0)	8 (8 ± 1.5)	21 (24 ± 3.1)	9 (7 ± 2.5)
	19.5	106 *	8 *	27 *	7 *
		94 *	13 *	19 *	5 *
		118 * (106 ± 12.0)	10 * (10 ± 2.5)	24 * (23 ± 4.0)	10 * (7 ± 2.5)
陽性対照	名 称	B[a]P	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	843 911 948 (901 ± 53.3)	451 345 384 (393 ± 53.6)	286 333 321 (313 ± 24.4)	98 112 93 (101 ± 9.8)

(備考)

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン
 2AA : 2-アミノアントラセン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 ()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験1回目: WP2uvrA)

被験物質の名称: 3-ヘキセニルサリチレート

No. T-1108

試験実施期間			
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2012年10月30日 より 2012年11月2日	
		復帰変異数 (コロニー数/プレート)	
		WP2uvrA	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	37 23 23 (28 $\pm$ 8.1)	
	313	23 24 26 (24 $\pm$ 1.5)	
	625	28 22 30 (27 $\pm$ 4.2)	
	1250	21 18 24 (21 $\pm$ 3.0)	
	2500	33 24 28 (28 $\pm$ 4.5)	
	5000	32 29 25 (29 $\pm$ 3.5)	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	39 26 28 (31 $\pm$ 7.0)	
	313	35 35 25 (32 $\pm$ 5.8)	
	625	28 31 27 (29 $\pm$ 2.1)	
	1250	33 32 36 (34 $\pm$ 2.1)	
	2500	27 25 32 (28 $\pm$ 3.6)	
	5000	23 24 25 (24 $\pm$ 1.0)	
陽性対照	名 称	AF-2	
	S9Mixを必要としないもの 用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	
	コロニー数/プレート	92 128 128 (116 $\pm$ 20.8)	
	名 称	2AA	
	S9Mixを必要とするもの 用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	10.0	
	コロニー数/プレート	808 792 803 (801 $\pm$ 8.2)	

(備考)

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

2AA : 2-アミノアントラセン

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

T-1108

(別表5)

試験結果表 (本試験2回目:TA株-S9Mix)

被験物質の名称: 3-ヘキセニルサリチレート

No. T-1108

試験実施期間		2012年11月8日 より 2012年11月12日			
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)			
		塩基対置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA1535	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	106 94 102 (101 $\pm$ 6.1)	8 13 11 (11 $\pm$ 2.5)	18 22 19 (20 $\pm$ 2.1)	9 8 6 (8 $\pm$ 1.5)
		102 98 99 (100 $\pm$ 2.1)	8 13 12 (11 $\pm$ 2.6)	18 23 20 (20 $\pm$ 2.5)	7 13 9 (10 $\pm$ 3.1)
		110 91 102 (101 $\pm$ 9.5)	8 6 8 (7 $\pm$ 1.2)	19 23 25 (22 $\pm$ 3.1)	10 10 8 (9 $\pm$ 1.2)
	0.31	81 99 100 (93 $\pm$ 10.7)	13 9 8 (10 $\pm$ 2.6)	25 24 22 (24 $\pm$ 1.5)	7 11 13 (10 $\pm$ 3.1)
		119 92 106 (106 $\pm$ 13.5)	12 10 13 (12 $\pm$ 1.5)	20 21 18 (20 $\pm$ 1.5)	10 13 9 (11 $\pm$ 2.1)
		101 100 91 (97 $\pm$ 5.5)	7 13 7 (9 $\pm$ 3.5)	20 18 15 (18 $\pm$ 2.5)	6 11 13 (10 $\pm$ 3.6)
	0.61	93 97 94 (95 $\pm$ 2.1)	9 * 10 * 9 * (9 $\pm$ 0.6)	16 23 21 (20 $\pm$ 3.6)	4 * 8 * 5 * (6 $\pm$ 2.1)
		65 * 56 * 61 * (61 $\pm$ 4.5)	11 * 15 * 13 * (13 $\pm$ 2.0)	13 * 22 * 13 * (16 $\pm$ 5.2)	6 * 4 * 7 * (6 $\pm$ 1.5)
		19.5			
	1.22	名 称	AF-2	SAZ	AF-2
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.1
		コロニー数/プレート	627 545 597 (590 $\pm$ 41.5)	450 445 408 (434 $\pm$ 22.9)	419 402 402 (408 $\pm$ 9.8)
	2.44				1228 1226 1181 (1212 $\pm$ 26.6)

(備考)

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

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

T-1108

(別表6)

試験結果表 (本試験2回目:TA株+S9Mix)

被験物質の名称: 3-ヘキセニルサリチレート

No. T-1108

試験実施期間		2012年11月8日 より 2012年11月12日			
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)			
		塩基対置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA1535	TA98	TA1537
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	101 129 112 (114 $\pm$ 14.1)	13 11 11 (12 $\pm$ 1.2)	33 35 34 (34 $\pm$ 1.0)	13 13 12 (13 $\pm$ 0.6)
		90 89 96 (92 $\pm$ 3.8)	6 10 8 (8 $\pm$ 2.0)	30 25 21 (25 $\pm$ 4.5)	9 10 7 (9 $\pm$ 1.5)
		0.31			
	0.61	114 114 97 (108 $\pm$ 9.8)	8 12 8 (9 $\pm$ 2.3)	24 27 34 (28 $\pm$ 5.1)	10 7 6 (8 $\pm$ 2.1)
		1.22			
		119 128 120 (122 $\pm$ 4.9)	13 10 8 (10 $\pm$ 2.5)	22 30 28 (27 $\pm$ 4.2)	8 13 10 (10 $\pm$ 2.5)
	2.44	109 114 104 (109 $\pm$ 5.0)	11 10 15 (12 $\pm$ 2.6)	33 31 29 (31 $\pm$ 2.0)	7 8 6 (7 $\pm$ 1.0)
		4.88			
		117 99 117 (111 $\pm$ 10.4)	8 10 10 (9 $\pm$ 1.2)	32 22 28 (27 $\pm$ 5.0)	8 13 7 (9 $\pm$ 3.2)
	9.77	91 98 106 (98 $\pm$ 7.5)	14 10 12 (12 $\pm$ 2.0)	25 24 33 (27 $\pm$ 4.9)	10 10 11 (10 $\pm$ 0.6)
		19.5			
		96 * 109 * 113 * (106 $\pm$ 8.9)	11 * 8 * 15 * (11 $\pm$ 3.5)	26 * 31 * 27 * (28 $\pm$ 2.6)	9 * 7 * 10 * (9 $\pm$ 1.5)
陽性対照	名 称	B[a]P	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	848 827 879 (851 $\pm$ 26.2)	424 370 381 (392 $\pm$ 28.5)	252 303 271 (275 $\pm$ 25.8)	99 81 98 (93 $\pm$ 10.1)

(備考)

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン
2AA : 2-アミノアントラセン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表7)

試験結果表 (本試験2回目: WP2uvrA)

被験物質の名称: 3-ヘキセニルサリチレート

No. T-1108

試験実施期間			
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2012年11月8日 より 2012年11月12日	
		復帰変異数 (コロニー数/プレート)	
		WP2uvrA	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	44 39 44	(42 $\pm$ 2.9)
	313	31 34 40	(35 $\pm$ 4.6)
	625	40 37 29	(35 $\pm$ 5.7)
	1250	34 30 25	(30 $\pm$ 4.5)
	2500	30 34 32	(32 $\pm$ 2.0)
	5000	43 42 37	(41 $\pm$ 3.2)
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	41 39 33	(38 $\pm$ 4.2)
	313	34 44 42	(40 $\pm$ 5.3)
	625	42 34 37	(38 $\pm$ 4.0)
	1250	36 41 33	(37 $\pm$ 4.0)
	2500	40 33 33	(35 $\pm$ 4.0)
	5000	36 32 31	(33 $\pm$ 2.6)
陽性対照	名 称	AF-2	
	S9Mixを必要としないもの 用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	
	コロニー数/プレート	114 123 132	(123 $\pm$ 9.0)
	名 称	2AA	
	S9Mixを必要とするもの 用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	10.0	
	コロニー数/プレート	799 781 813	(798 $\pm$ 16.0)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド
 2AA : 2-アミノアントラセン

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1

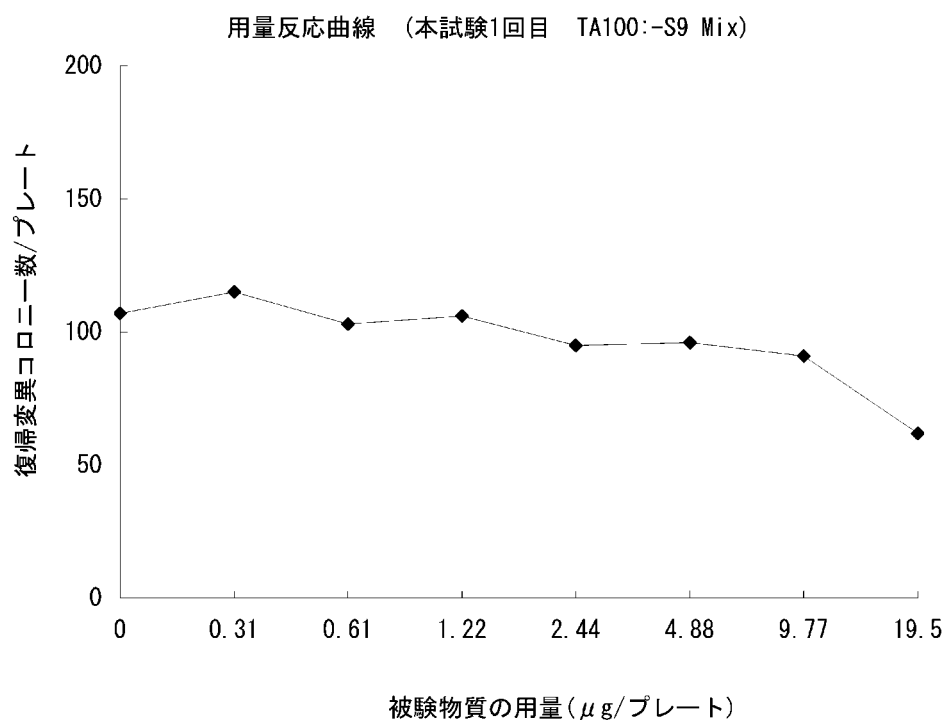


図 2

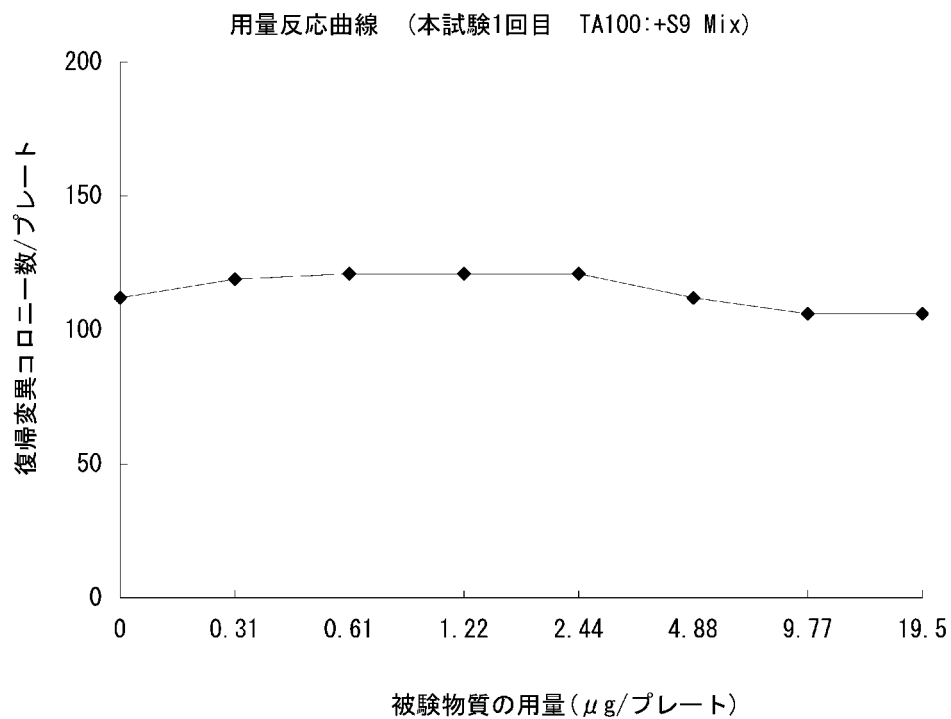


図 3

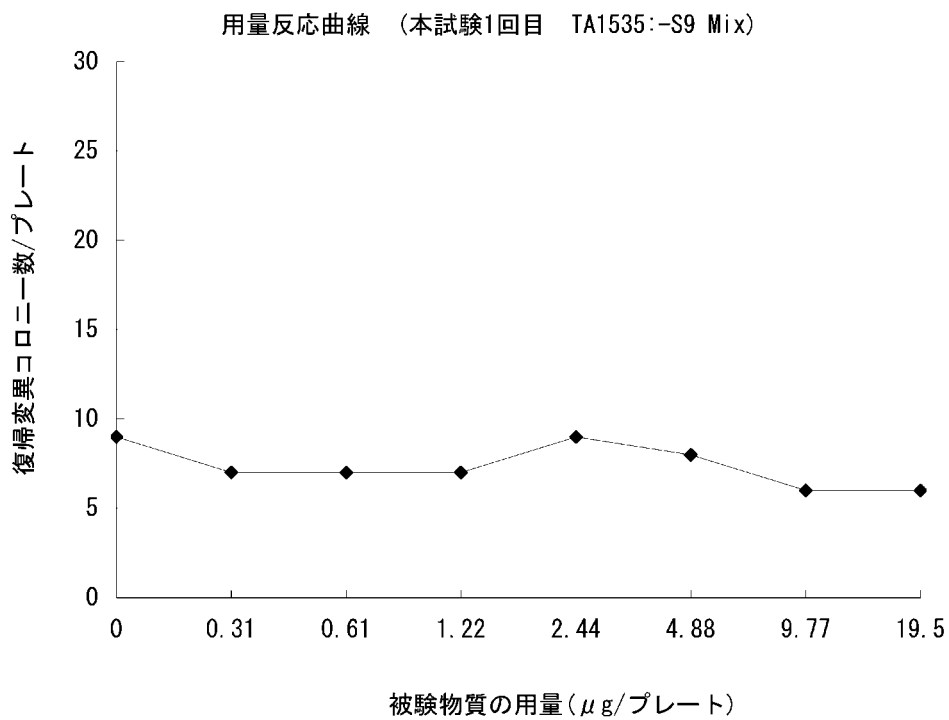


図 4

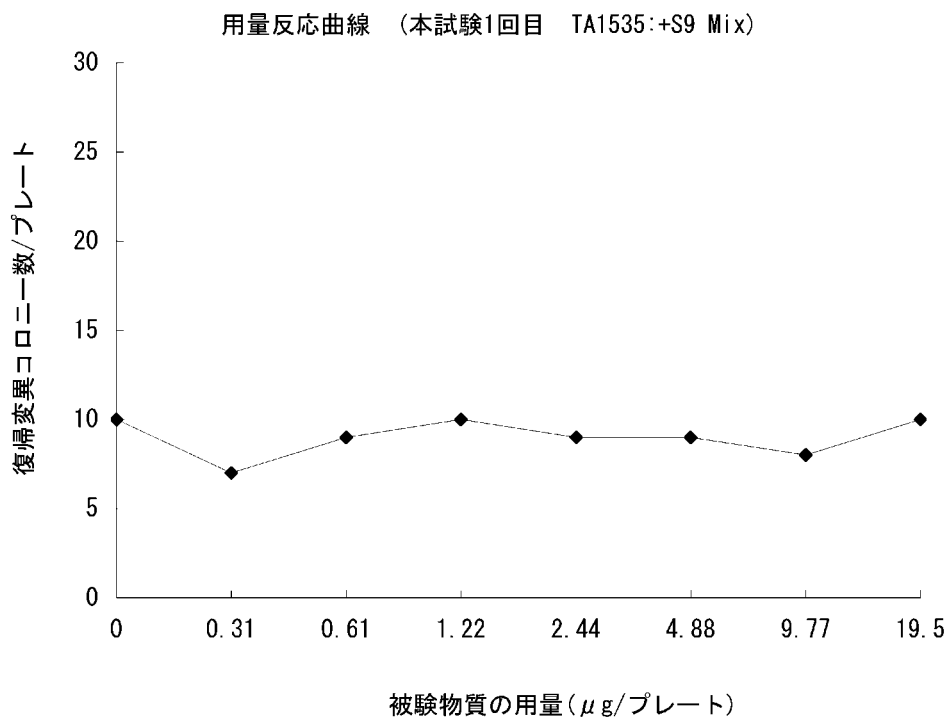


図 5

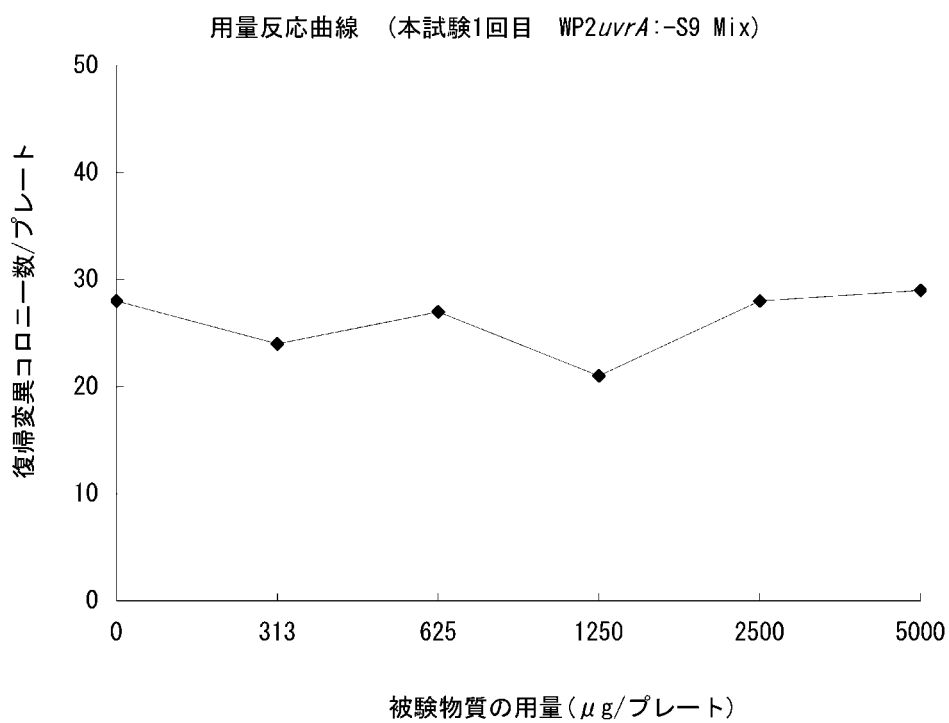


図 6

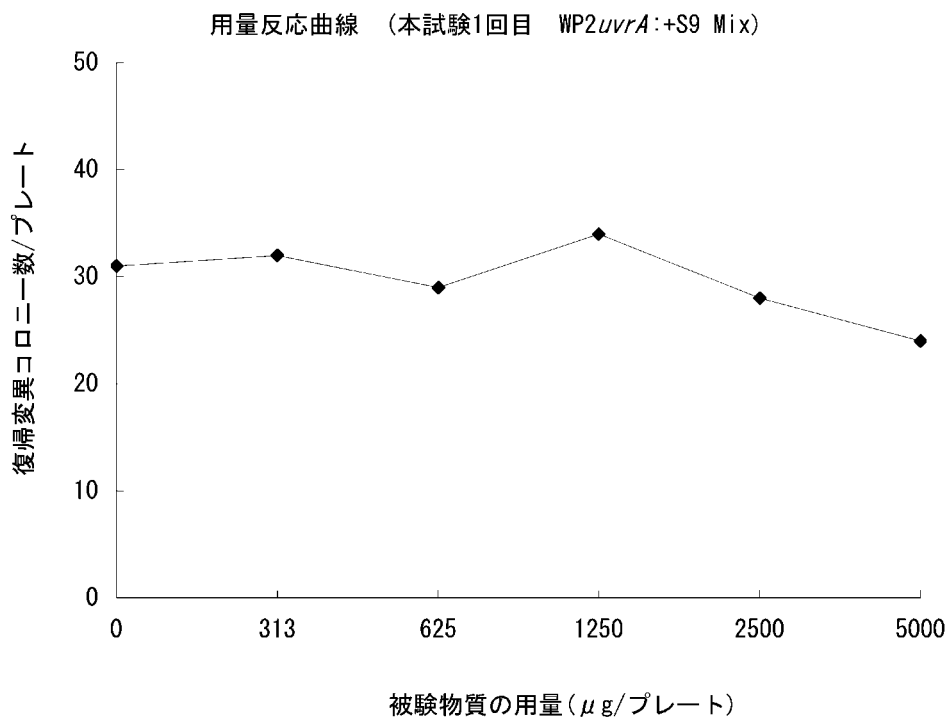


図 7

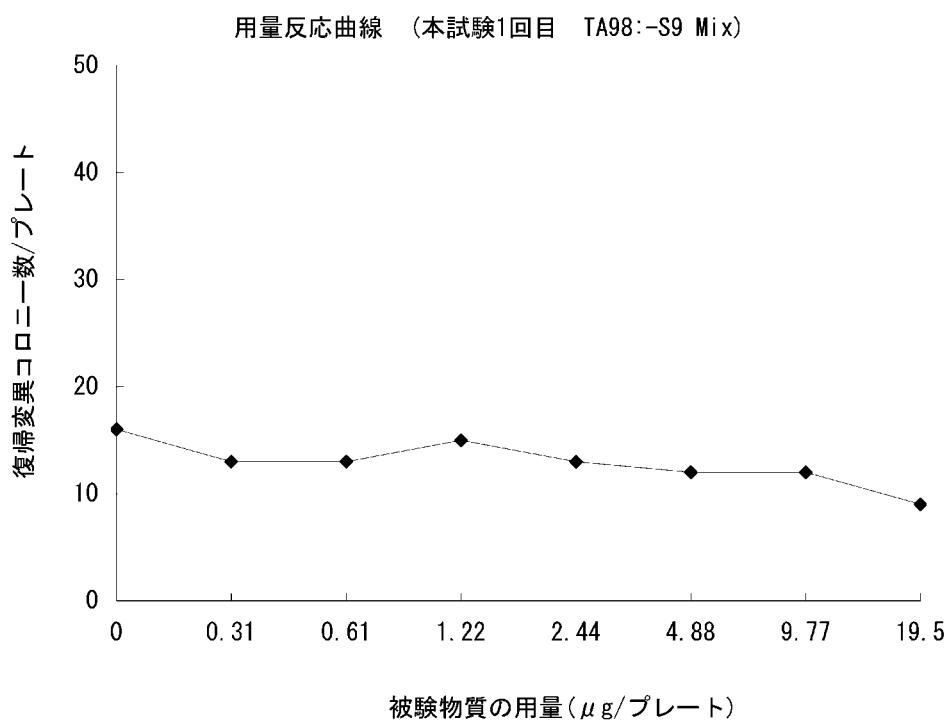


図 8

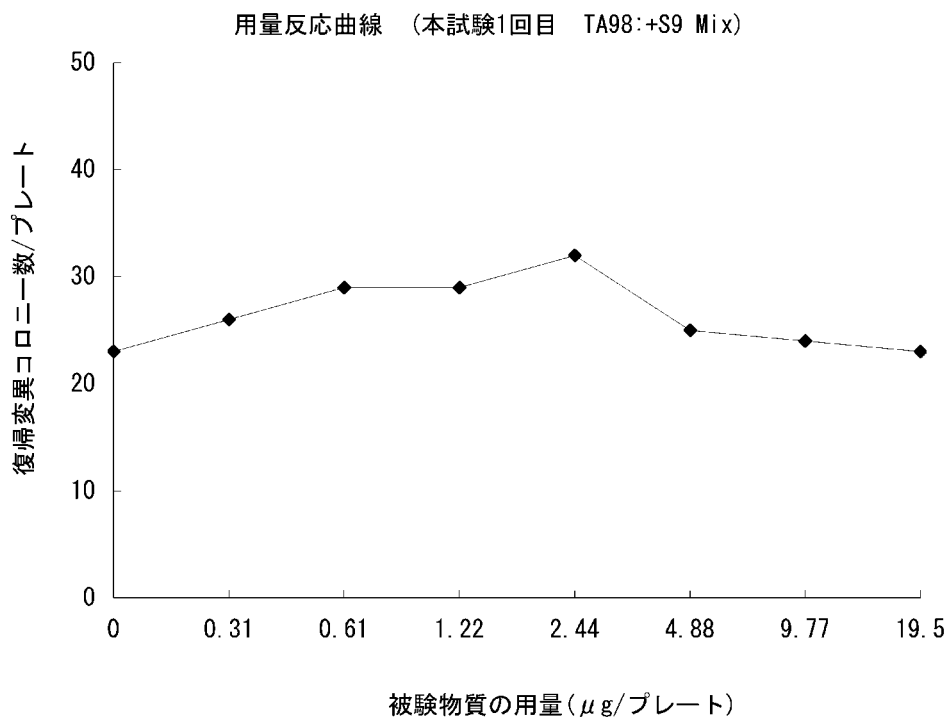


図 9

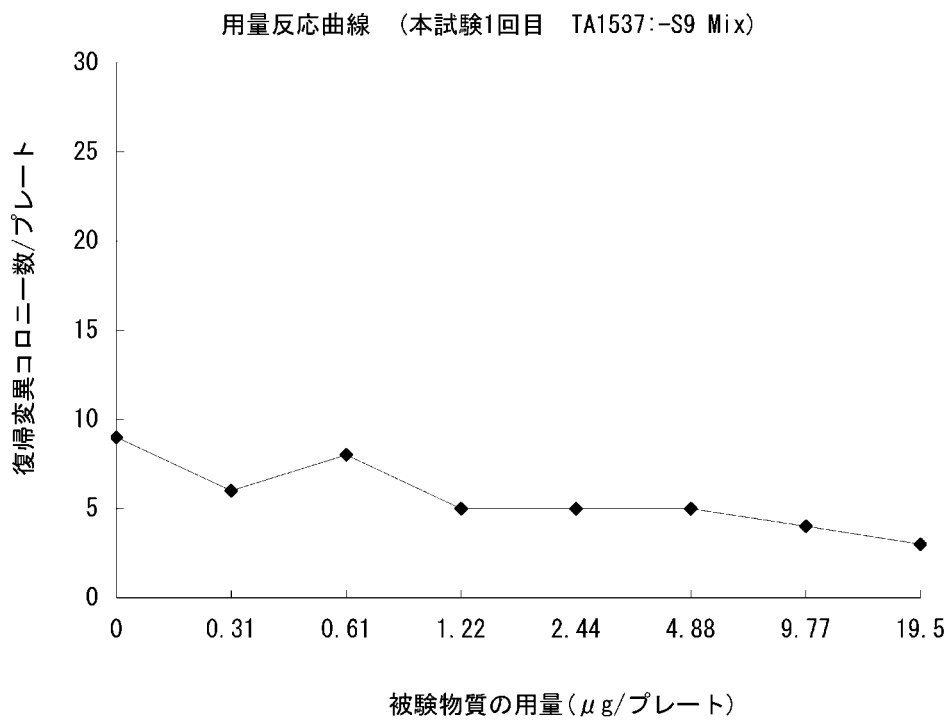
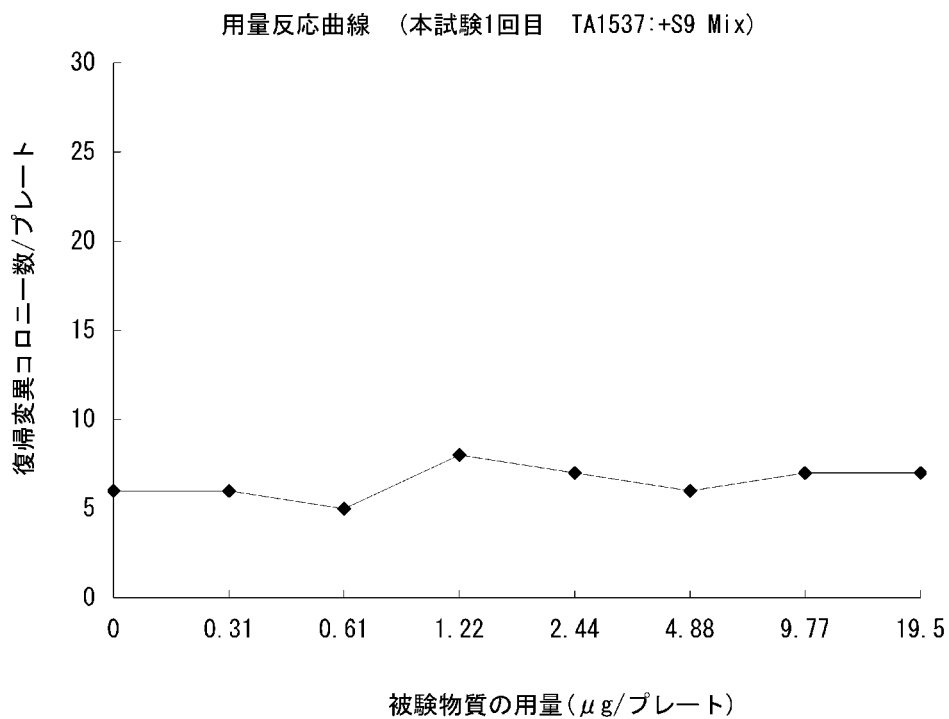


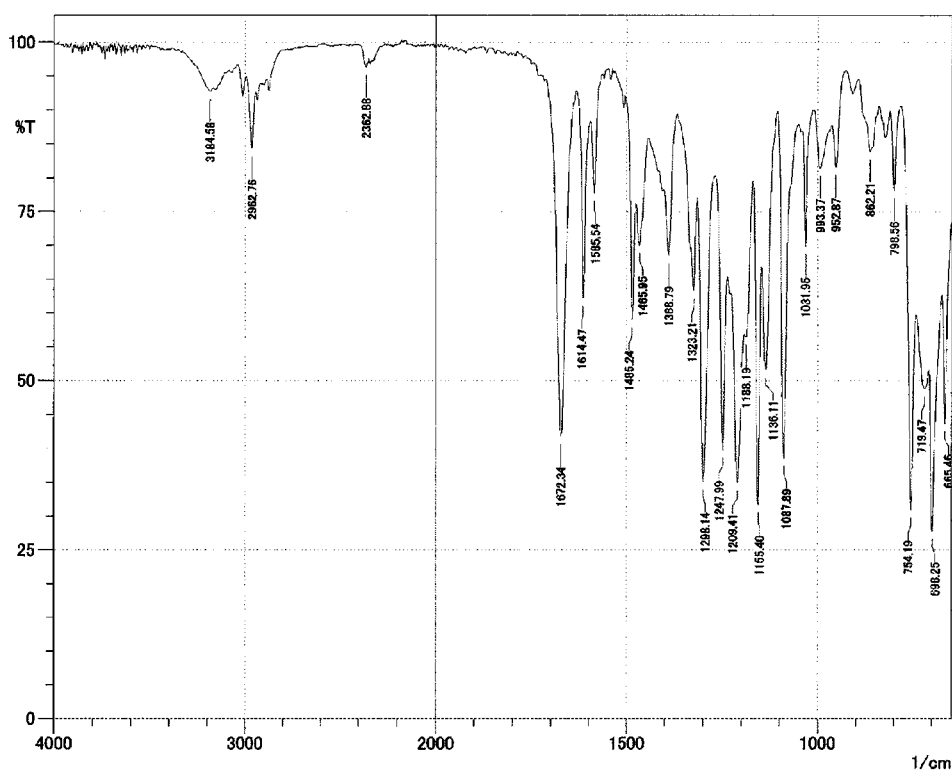
図 10



Study number: A-2512
(Translated version)

CERTIFICATE OF ANALYSIS
(Characteristics of *cis*-3-Hexenyl salicylate)

Stage: Before the start of an experiment
Date of Analysis: August 23, 2012
Test Article: *cis*-3-Hexenyl salicylate (Lot Number: 120707K2-1)
Test Item: Infrared spectrophotometry (Attenuated total reflection method)
Results: The IR spectra are shown below.



Regulation: "Regulations of Testing Facilities for Studies on New Chemical Substances etc.", March 31, 2011, YakuShokuHatsu 0331 No. 8, Heisei 23-03-29 SeiKyoku No. 6, KanHoKiHatsu No. 110331010

(Sealed in the original)

September 11, 2012

Date

Person Responsible for Analysis
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

Study number: T-1108

CERTIFICATE OF ANALYSIS
(Stability of Test Article)

Stage: After the end of main study
Date of Analysis: December 17, 2012
Test Article: *cis*-3-Hexenyl salicylate
(Lot Number: 120707K2-1)
Test Item: Infrared spectrophotometry
(Attenuated total reflection method)
Acceptance Criteria: The spectrum for stability is comparable with that for characteristics¹⁾.
1) [REDACTED]: Validation of an analytical method for the determination of *cis*-3-Hexenyl salicylate and its stability study (vehicle: corn oil) by HPLC, and characteristic test and stability study by IR (Study number: A-2512, Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.)
Results: The spectrum for stability was comparable with that for characteristics.
The IR spectra are shown on the next page.
Judgment: Passed
Regulation: "Regulations of Testing Facilities for Studies on New Chemical Substances etc.", March 31, 2011, YakuShokuHatsu 0331 No. 8, Heisei 23-03-29 SeiKyoku No. 6, KanHoKiHatsu No. 110331010

[REDACTED]

January 8, 2013

[REDACTED]

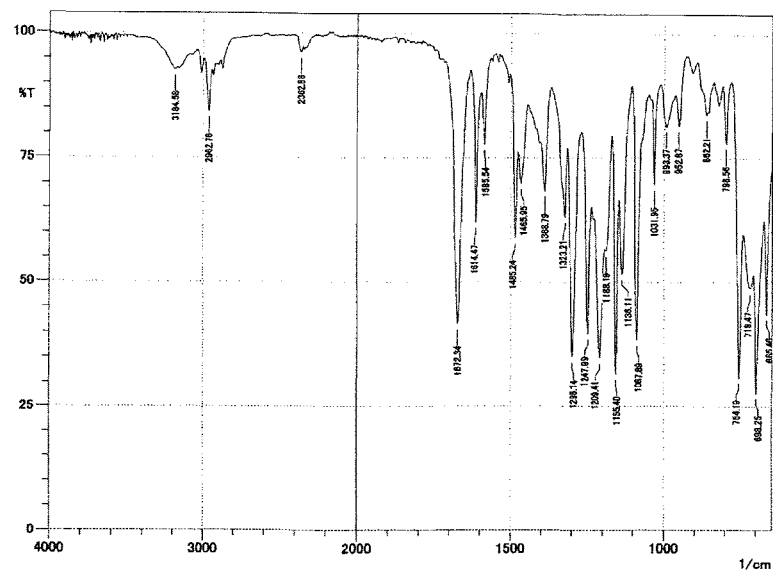
Date

Person Responsible for Analysis
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

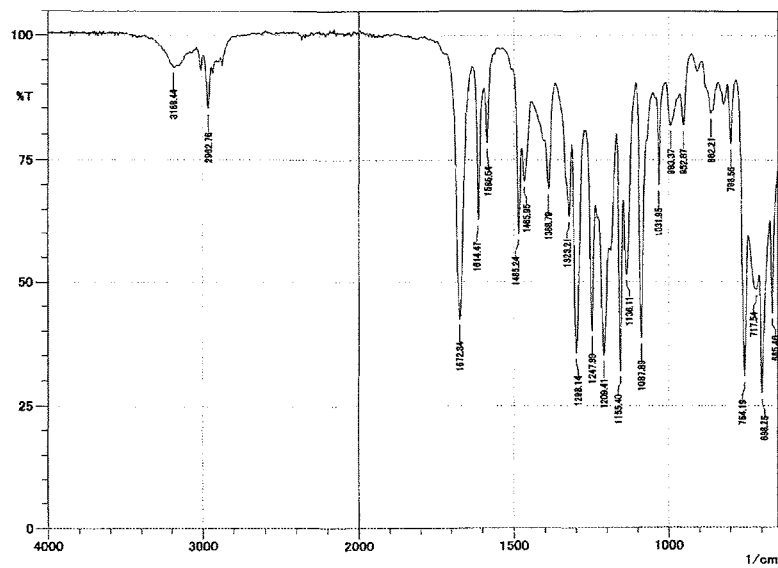
Study number: T-1108

Results: Infrared spectra

(Characteristics)



(Stability)



**Background Data of the reverse mutation tests in bacteria
at the Tokyo Laboratory of the Bozo Research Center Inc.**

CODE No. :121018

Period : From July 5, 2012 to August 15, 2012

(Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	104	12.6	67	142	237
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	647	64.6	453	841	237
	+	Solvent control	122	14.4	85	158	237
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	853	83	623	1084	237
TA1535	-	Solvent control	9	2.91	2	17	237
		Positive control SAZ(0.5µg/plate)	345	57.4	190	500	237
	+	Solvent control	10	2.80	3	18	237
		Positive control 2AA(2.0µg/plate)	409	51.4	262	556	237
WP2uvrA	-	Solvent control	30	6.32	12	48	237
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	112	9.5	85	139	237
	+	Solvent control	32	5.39	17	48	237
		Positive control 2AA(10.0µg/plate)	824	103	527	1120	237
TA98	-	Solvent control	18	4.46	7	29	237
		Positive control AF-2(0.1µg/plate)	420	41.1	307	534	237
	+	Solvent control	31	5.82	17	44	237
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	311	35.6	218	405	237
TA1537	-	Solvent control	8	2.41	2	15	237
		Positive control ICR-191(1.0µg/plate)	1714	335	737	2691	237
	+	Solvent control	10	2.87	3	18	237
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	87	14.8	45	129	237

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO) or Acetone

Positive controls AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-aminoanthracene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation

T-1108

信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : T-1108

試験表題 : 3-ヘキセニルサリチレート細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD:1997年11月26日)
- ・「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」(平成23年3月31日:薬食発0331第8号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2013年3月22日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門

試験における調査

項 目	担当者	調 査 日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
試験計画書		2012年10月12日	2012年10月12日
調製・保存(被験物質)、 被験物質の処理		2012年10月31日	2012年10月31日
計数		2012年11月2日	2012年11月2日
生データ		2012年11月15日	2012年11月15日
改善確認		2012年11月20日	2012年11月20日
最終報告書草案・図・表		2012年11月15日	2012年11月15日
被験物質の安定性測定		2012年12月17日	2012年12月19日

信頼性保証書 (2/2)

項 目	担当者	調 査 日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
生データ (被験物質の安定性測定)		2013 年 1 月 11 日	2013 年 1 月 11 日
最終報告書		2013 年 3 月 22 日	2013 年 3 月 22 日

施設調査

項 目	担当者	調 査 日	部門責任者及び 運営管理者への 報告日
菌株の特性検査		2012 年 7 月 24 日	
		2012 年 7 月 26 日	
		2012 年 7 月 27 日	2012 年 7 月 27 日
		2012 年 8 月 22 日	2012 年 8 月 23 日
陽性対照物質の管理		2012 年 7 月 18 日	2012 年 7 月 19 日
		2012 年 7 月 23 日	2012 年 7 月 24 日
		2012 年 7 月 26 日	2012 年 7 月 26 日
		2012 年 8 月 6 日	2012 年 8 月 7 日
		2012 年 9 月 5 日	2012 年 9 月 5 日