

T-G056



最 終 報 告 書

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

試験期間：2012年10月18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丁目2番2号

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

T-G056

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-G056

試験表題 : 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

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「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、平成 23・03・29 製局第 6 号、
環保企発第 110331010 号)

2013 年 3 月 22 日

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

2. 目次

1.	GLP陳述書	2
2.	目次	3
3.	試験実施概要	7
3.1	試験番号	7
3.2	試験表題	7
3.3	試験目的	7
3.4	試験委託者	7
3.5	試験受託者	7
3.6	試験実施施設	7
3.7	試験日程	7
3.8	試験責任者	7
3.9	試験担当者	8
3.10	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	8
3.11	資料保存	8
3.12	試験責任者の記名・捺印及びその日付	9
4.	要約	10
5.	緒言	11
6.	試験材料及び方法	12
6.1	被験物質及び溶媒	12
6.1.1	被験物質	12
6.1.2	溶媒	13
6.2	被験液の調製	13
6.2.1	調製方法	13
6.2.2	調製頻度	14
6.3	対照物質	14
6.3.1	陰性対照	14
6.3.2	陽性対照	14
6.4	使用細胞株	15
6.4.1	細胞株	15
6.4.2	細胞の選択理由	15
6.4.3	培養条件	15
6.5	S9 mix及び培養液の調製	15
6.5.1	S9 mix	15
6.5.2	培養液	16
6.6	試験方法	16

6.6.1	識別方法	17
6.6.2	用量の設定	17
6.6.3	細胞増殖抑制試験	18
6.6.4	染色体異常試験	18
6.6.5	標本の観察	20
6.6.6	染色体異常の分類	20
6.6.7	判定基準	21
7.	試験結果	22
7.1	細胞増殖抑制試験	22
7.2	染色体異常試験	22
8.	考察	23
9.	文献	24

添付資料

Attached Data 1	試験成績書[3-ヘキセニルサリチレートの特性].....	25
Attached Data 2	CERTIFICATE OF ANALYSIS (Stability of Test Article) (1/2、2/2)	26



Fig. 1	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Short-term treatment: +S9 mix].....	28
Fig. 2	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Short-term treatment: -S9 mix].....	29
Fig. 3	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Continuous treatment: 24hr]	30
Fig. 4	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Continuous treatment: 48hr]	31

表

Table 1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster
---------	---

	(CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Short-term treatment: +S9 mix].....	32
Table 2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Short-term treatment: –S9 mix].....	33
Table 3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Continuous treatment: 24hr]	34
Table 4	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Continuous treatment: 48hr]	35
 付表		
Appendix 1	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate	36
Appendix 2-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Short-term treatment: +S9 mix].....	37
Appendix 2-2	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Short-term treatment: –S9 mix].....	38
Appendix 2-3	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Continuous treatment: 24hr]	39
Appendix 2-4	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Continuous treatment: 48hr]	40
Appendix 3-1	Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate [Short-term treatment: +S9 mix].....	41
Appendix 3-2	Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with	

T-G056

	<i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate	
	[Short-term treatment: –S9 mix].....	42
Appendix 3-3	Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate	
	[Continuous treatment: 24hr]	43
Appendix 3-4	Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with <i>cis</i> -3-Hexenyl salicylate	
	[Continuous treatment: 48hr]	44
信頼性保証書		45

T-G056

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-G056

3.2 試験表題

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

3.3 試験目的

ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3.4 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丁目2番2号

TEL : 03-3595-2298（課直通） FAX : 03-3593-8913

3.5 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

3.6 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

3.7 試験日程

試験開始日	:	2012年10月18日
被験物質受領日	:	2012年7月20日
実験開始日	:	2012年10月19日
実験終了日	:	2012年12月17日
試験終了日	:	2013年3月22日

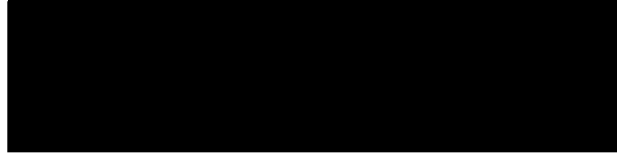
3.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部



3.9 試験担当者

被験物質保存責任者 :
化学分析責任者 :
試験担当者 :



3.10 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

連続処理法の 48 時間処理において細胞増殖抑制率が 50%以上の用量で染色体分析を実施できなかったが、細胞増殖抑制率が 50%付近にあったこと、同様の濃度で評価した 24 時間処理とともに異常細胞の増加はまったく見られなかったことから、試験の総合判定に影響を与えるものでは無いと判断した。

その他、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。

3.11 資料保存

試験計画書原本（変更書含む）、試験に関する記録文書、生データ、染色体標本及び報告書類（最終報告書は原本）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最終報告書提出後 10 年間保存する。期間終了後の保存については、厚生労働省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-G056

3.12 試験責任者の記名・捺印及びその日付

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

4. 要約

3-ヘキセニルサリチレートは染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法では 144 µg/mL 以上の用量で、連続処理法では 71.9 µg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。この結果より、短時間処理法の代謝活性化では 144 µg/mL を最高用量とし、以下公比 1.5 で希釈した 4 用量を、非代謝活性化では 120 µg/mL を最高用量とし、以下公比 1.2 で希釈した 5 用量を、連続処理法では 72.0 µg/mL を最高用量とし、以下公比 1.5 で希釈した 4 用量を設定して染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）及び倍数体の出現率は、いずれの処理法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、3-ヘキセニルサリチレートは本試験条件下において、染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

5. 緒言

厚生労働省の依頼により、3-ヘキセニルサリチレート安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

1) 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」
（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、
環境企発第 110331010 号）

2) 遺伝毒性試験ガイドライン

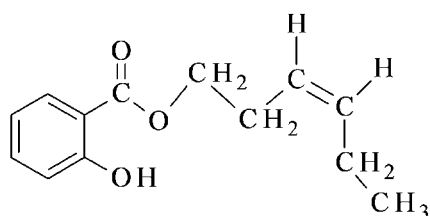
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
（平成 23 年 3 月 31 日：薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環
保企発第 110331009 号）
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」
（OECD 理事会：1997 年 7 月 21 日）

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

購入元	:	三立ケミー株式会社
製造元	:	Atomax Chemicals CO., Ltd
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
官報公示整理番号	:	3-3041
構造式又は示性式	:	



分子式	:	$C_{13}H_{16}O_3$
分子量	:	220.26
常温における性状（概観）	:	無色透明液体
沸点（初留点）	:	125°C(1.52hPa)*
引火点	:	158°C*
ロット番号	:	120707K2-1
純度	:	98.86%
不純物	:	不明
比重	:	1.060(25/25°C)
屈折率	:	1.522(20°C)
試験期間中の安定性	:	実験終了後、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所で被験物質の安定性を確認し、安定であったことを確認した。
入手量	:	25.00 g
保存条件	:	密栓、冷暗所（冷蔵庫内、許容値：1～10°C、実測温度：2～8°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び 東京研究所 被験物質調製保存室
取り扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護

手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。
 取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。

使用後の処理 : 被験物質の残量は安定性を確認後、すべて廃棄した。

* : 製品安全データシート（和光純薬工業株式会社）に基づく

6.1.2 溶媒

名称 : DMSO
 ロット番号 : PEH5762
 規格 : 試薬特級
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 東京研究所 標本作製室
 溶媒の選択理由 : 供試前試験の結果、注射用水（23.0 mg/mL）に不溶、
 DMSO（230 mg/mL）に溶解であったため、溶媒として DMSO を用いた。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.4600 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 230 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2300 µg/mL）を調製した。次いで、230 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、115、57.5、28.8、14.4、7.19、3.59 及び 1.80 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.0720 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 14.4 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：144 µg/mL）を調製した。次いで、14.4 mg/mL 溶液を公比 1.5（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 0.5 mL）で順次 3 段階希釈し、9.60、6.40 及び 4.27 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。更に、14.4 mg/mL 溶液を公比 1.2（各濃度の被験液 2.5 mL：溶媒 0.5 mL）で順次 5 段階希釈し、12.0、10.0、8.33、6.94 及び 5.79 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。

連続処理法では、被験物質 0.0360 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 7.20 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：72.0 µg/mL）を調製した。次いで、7.20 mg/mL 溶液を公比 1.5（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 1 mL）で順次 3 段階希釈し、4.80、3.20 及び 2.13 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。

T-G056

6.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

6.3 対照物質

6.3.1 陰性対照

溶媒として用いる DMSO を陰性対照とした。

6.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

シクロfosファミド (CP)

ロット番号	:	LAR5348
製造元	:	和光純薬工業株式会社
純度	:	生化学用 (97%以上)
保存方法	:	冷蔵、遮光
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

2) 非代謝活性化

マイトマイシン C (MMC)

ロット番号	:	562AAH
製造元	:	協和発酵キリン株式会社
力価	:	2 mg (力価) /瓶
保存方法	:	室温、遮光
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室

3) 調製方法

調製はすべて用時にやり、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

(1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 g を γ 線滅菌済プラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K2G71) を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14 μ g/mL)。

(2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化及び連続処理法

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K2G71) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次に、この溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (短時間処理法では培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液 0.150 mL を、連続処理法では培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度はそれぞれ 0.075 及び 0.050 μ g/mL)。

4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン（前述 5.2）項）に使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

6.4 使用細胞株

6.4.1 細胞株

チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞(CHL/IU)を用いた。ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2010 年 10 月 13 日に入手し、凍結保存した細胞について定期的に細胞の性状検査を実施して、性状が適正であること（培養形態、細胞倍加時間 15~20 時間以内、染色体数の平均が 25 本、マイコプラズマ等の汚染がない）が確認されたものを 30 継代以内で試験に使用した。使用時の細胞継代数は細胞増殖抑制試験では 21 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 4 継代、連続処理法では 10 継代であった。

6.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、背景データも多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞株を選択した。

6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度 5%、温度 37℃、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。

6.5 S9 mix 及び培養液の調製

6.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9/コファクターCセット、ロット番号：C120713041、オリエンタル酵母工業株式会社）を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	12071304
製造日	:	2012 年 7 月 13 日
種・系統	:	ラット・SD 系
性	:	雄
週齢	:	7 週齢
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）
投与法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB 4 日間 30+60+60+60 mg/kg body weight

T-G056

		BF	1 日	80 mg/kg body weight
保存方法	:	冷凍（-70℃ 以下の冷凍庫）		
使用期限	:	2013 年 1 月 12 日		
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室 超低温フリーザー		
2) 補酵素				
名称	:	コファクターC		
ロット番号	:	C12071104		
製造日	:	2012 年 7 月 11 日		
保存方法	:	冷凍（-70℃ 以下の冷凍庫）		
使用期限	:	2013 年 1 月 10 日		
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室 超低温フリーザー		
3) S9mix の組成				
S9	2 mL			
補酵素	4.7 mL	20 mmol/L HEPES 緩衝液（pH 7.2）	1.34 mL	
		50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL	
		330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL	
		50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL	
		40 mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン		
		ジヌクレオチドリン酸（NADP）水溶液	0.67 mL	
		精製水	0.67 mL	

6.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM)(GIBCO™、Cat.No.11095)に非働化 (56°C、30 分) した牛血清(bovine serum、BS) を 10 v/v% 添加した培養液(BS-MEM)を用いた。調製後の培養液は冷蔵保存した。

- 1) 牛血清
 - ロット番号 : 8155322
 - 製造元 : Invitrogen Corporation
 - 保存方法 : 冷凍 (-20°C 以下の冷凍庫)
 - 保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫
- 2) MEM
 - ロット番号 : 1158261、1179276
 - 製造元 : Invitrogen Corporation
 - 保存方法 : 冷蔵
 - 保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

6.6 試験方法¹⁾⁻⁵⁾

試験は以下に示したステージの順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

6.6.1 識別方法

以下のように定めた記号又は数字を記したラベルを、シャーレ及びスライドグラスに貼付して識別を行った。

対象	内容	記号又は数字
シャーレ	短時間処理法 代謝活性化	+
	短時間処理法 非代謝活性化	-
	連続処理法 24 時間処理	24-
	連続処理法 48 時間処理	48-
	陰性対照群	NC
	被験物質処理群	高濃度から 1、2、3・・・n の枝番号
	陽性対照群	PC
同一処理群内での識別		①、②、③、④
染色体標本	盲検法によってランダムにコード化した処理内容	試験番号とコンピュータが無作為に割り振った「01」～「99」までの 2 桁の番号及びスライドの枚数を表す枝番号

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 2300 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 1150、575、288、144、71.9、35.9 及び 18.0 µg/mL の計 8 用量を設定した。これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

短時間処理法の代謝活性化では最高用量を 144 µg/mL とし、以下公比 1.5 で希釈した 96.0、64.0 及び 42.7 µg/mL の計 4 用量を、短時間処理法の非代謝活性化では最高用量を 120 µg/mL とし、以下公比 1.2 で希釈した 100、83.3、69.4 及び 57.9 µg/mL の計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では最高用量を 72.0 µg/mL とし、以下公比 1.5 で希釈した 48.0、32.0 及び 21.3 µg/mL の計 4 用量を設定した。これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。なお、以下の試験操作のうち、無菌性を必要とした場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

- 1) 短時間処理法の代謝活性化と非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに、陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレはプラスチックプレート（直径 60 mm）を用い、各群 2 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。
- 3) 培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	短時間処理法		連続処理法	
	代謝活性化	非代謝活性化	24 時間処理	48 時間処理
培養液除去量	0.883 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL
S9 mix 添加量	0.833 mL			
溶媒・被験液添加量	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL

- 4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、短時間処理法については 6 時間、連続処理法については 24 時間及び 48 時間培養した。
- 5) 短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化については、培養 6 時間後に肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- 6) 培養終了後、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、確認した（短時間処理法の培養終了時の結果は、参考データとした）。次いで、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。
- 7) 単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、それぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

6.6.4 染色体異常試験

以下の試験操作のうち、無菌性を必要とした場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

- 1) 短時間処理法
 - (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに、陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレ（プレート）はプラスチックプレート（直径 60 mm）を用い、プレートは各群 4 枚とした。
 - (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。

- (3) 培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	代謝活性化	非代謝活性化
培養液除去量	0.883 mL (0.933 mL)*	0.050 mL (0.150 mL)*
S9 mix 添加量	0.833 mL	
溶媒・被験液・ 陽性対照物質液 添加量	0.050 mL (CP: 0.100 mL)*	0.050 mL (MMC: 0.150 mL)*

*: () 内は、陽性対照群の培養液除去量及び陽性対照物質液添加量を示す。

- (4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、記録した後に、6時間培養した。
- (5) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に18時間培養を続けた。
- (6) 各群2枚のプレート（枝番号-①及び-②）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約2時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL、Invitrogen Co.）を 0.1 mL 加えた。
- (7) 培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約15分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス1枚につき2箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり2枚作製した。細胞滴下後、約1日空気乾燥し、2%ギムザ液で約15分間染色して染色体標本作製した。
- (8) 残る各群2枚のプレート（枝番号-③及び-④）は、培養6時間後と同様の方法で18時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

- (1) 24時間処理と48時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレ（プレート）はプラスチックプレート（直径 60 mm）を用い、プレートは各群4枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。
- (3) 培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	24 時間処理	48 時間処理
培養液除去量	0.050 mL (0.100 mL)*	0.050 mL (0.100 mL)*
溶媒・被験液・ 陽性対照物質液 添加量	0.050 mL (MMC: 0.100 mL)*	0.050 mL (MMC: 0.100 mL)*

*: () 内は、陽性対照群の培養液除去量及び陽性対照物質液添加量を示す。

- (4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、記録した後に、24 時間及び 48 時間培養した。
- (5) 各群 2 枚のプレート（枝番号-①及び-②）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL、Invitrogen Co.）を 0.1 mL 加えた。
- (6) 培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸＝3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (7) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-③及び-④）は、24 時間及び 48 時間の培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片があるもの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの。

- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)など。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり、倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数性 : polyploidy（核内倍加体：endoreduplicationを含む）

6.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準¹⁾に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率（%）によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5%未満	陰 性 (-)
5%以上 10%未満	疑陽性 (±)
10%以上	陽 性 (+)

構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合（TAG）と含まない場合（TA）とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験の結果を Appendix 1、Appendix 2-1 ~ Appendix 2-4 に示した。

被験液添加直後の観察において、すべての処理法で 144 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。培養液の色調変化は認められなかった。

処理終了時の観察において、すべての処理法で 144 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。

各処理法における 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化で 125 µg/mL、非代謝活性化で 97 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理で 62 µg/mL、48 時間処理で 60 µg/mL と算定された。

7.2 染色体異常試験

染色体異常試験の結果を Fig.1 ~ Fig.4、Table 1 ~ Table 4 及び Appendix 3-1 ~ Appendix 3-4 に示した。

被験液添加直後の観察において、短時間処理法の代謝活性化では 144 µg/mL の用量で、非代謝活性化では 100 µg/mL 以上の用量で析出が認められ、連続処理法ではすべての用量で析出は認められなかった。培養液の色調変化は認められなかった。

処理終了時の観察の際、短時間処理法の代謝活性化では 144 µg/mL の用量で、非代謝活性化では 120 µg/mL の用量で析出が認められ、連続処理法ではすべての用量で析出は認められなかった。

染色体標本の観察の結果、構造異常の出現率（ギャップを含まない場合）及び倍数性異常ともに、いずれの処理法においても増加は認められなかった。

なお、連続処理法の 48 時間処理において、最高用量である 72.0 µg/mL においても、細胞増殖抑制率が 50%を上回らなかったが、72.0 µg/mL での細胞増殖抑制率が 47%と 50%付近にあったこと、同様の濃度で評価した 24 時間処理とともに異常細胞の増加はまったく見られなかったことから、試験の総合判定に影響を与えるものではないと判断した。

8. 考察

3-ヘキセニルサリチレート⁶⁾の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）及び倍数体の出現率は、いずれの処理法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

また、連続処理法の 48 時間処理において細胞増殖抑制率が 50%以上の用量で染色体分析を実施できなかったが、細胞増殖抑制率が 50%付近にあったこと、同様の濃度で評価した 24 時間処理とともに異常細胞の増加はまったく見られなかったことから、試験の総合判定に影響を与えるものではないと判断した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、本被験物質は細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性と報告されている。⁶⁾また、類縁化合物であるシス-3-ヘキセノールでは、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陰性と報告されている⁷⁾。

以上の結果より、3-ヘキセニルサリチレートは本試験条件下において、染色体構造異常及び染色体数値的異常は誘発しないと結論した。

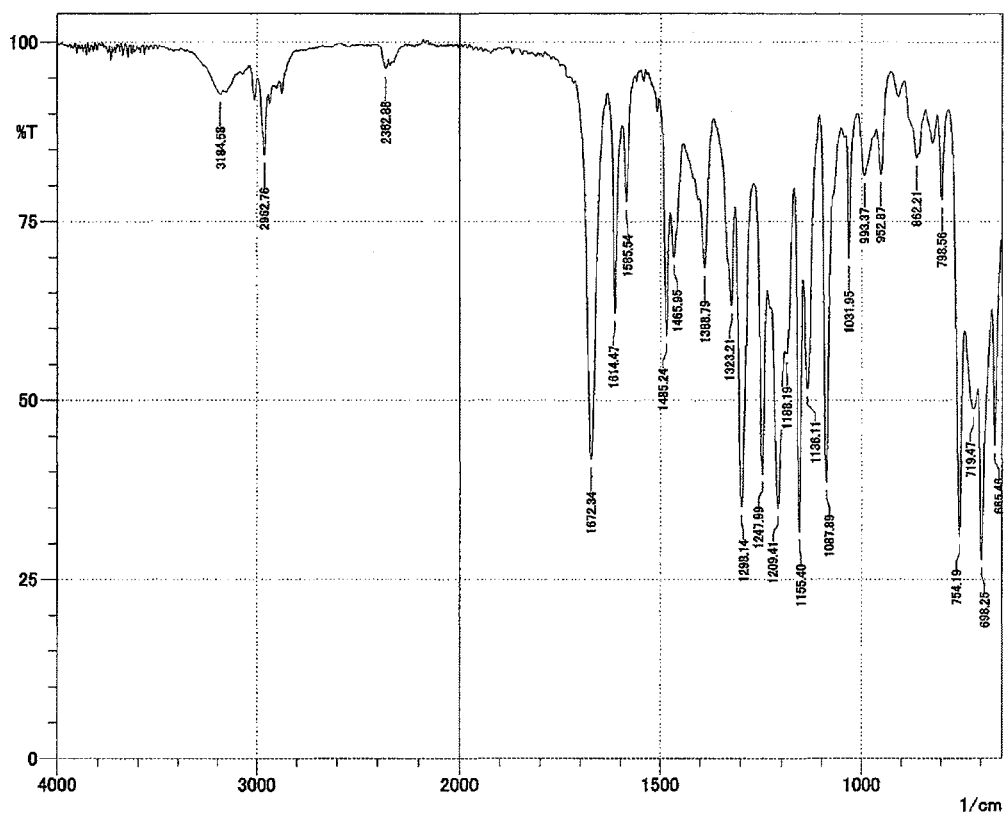
9. 文献

- 1) 石館基監修 (1987) : <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M and Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutat. Res.*, **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, **6**, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
- 6) (2013) : 3-ヘキセニルサリチレート of 細菌を用いる復帰突然変異試験
(試験番号 : T-1108) 、株式会社ボゾリサーチセンター
- 7) (2012) : シス-3-ヘキセノールのほ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

試験番号：A-2512

試験成績書
[3-ヘキセニルサリチレートの特性]

ステージ : 被験物質の使用前
測定日 : 2012 年 8 月 23 日
被験物質 : 3-ヘキセニルサリチレート (ロット番号: 120707K2-1)
試験項目 : 赤外吸収スペクトルの確認 (ATR 法)
結果 : 特性のスペクトルを以下に示す。



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」(平成 23 年 3 月 31 日: 薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)

試験責任者
株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

2012 年 9 月 11 日

CERTIFICATE OF ANALYSIS
(Stability of Test Article)

Stage: After the end of an experiment
Date of Analysis: January 23, 2013
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 Infrared 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

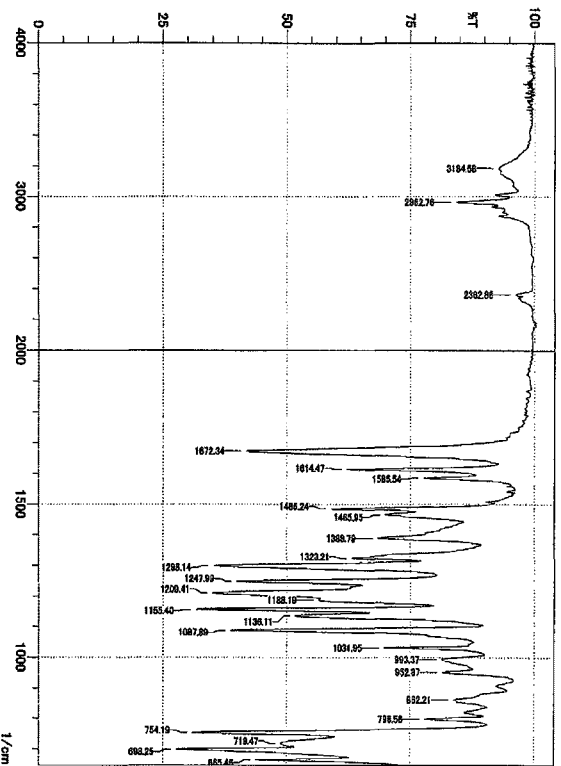
[REDACTED]
[REDACTED]
Person Responsible for Analysis
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

February 5, 2013
Date

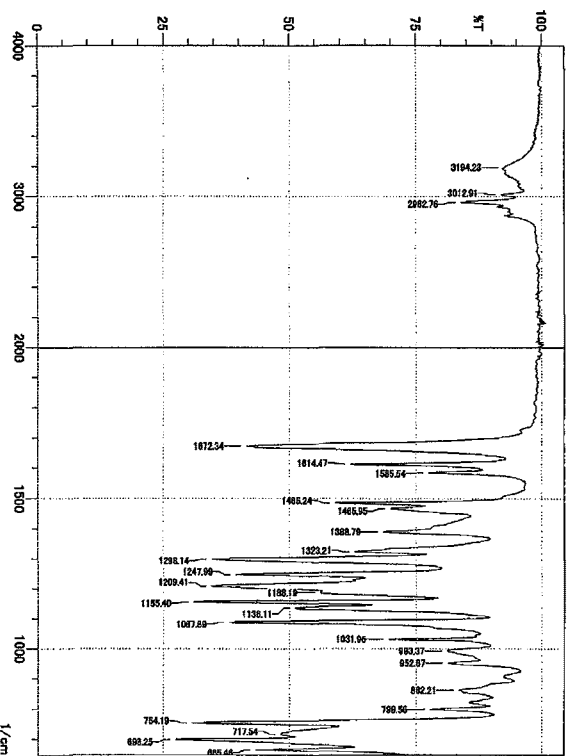
Results:

Infrared spectra

(Characteristics)



(Stability)



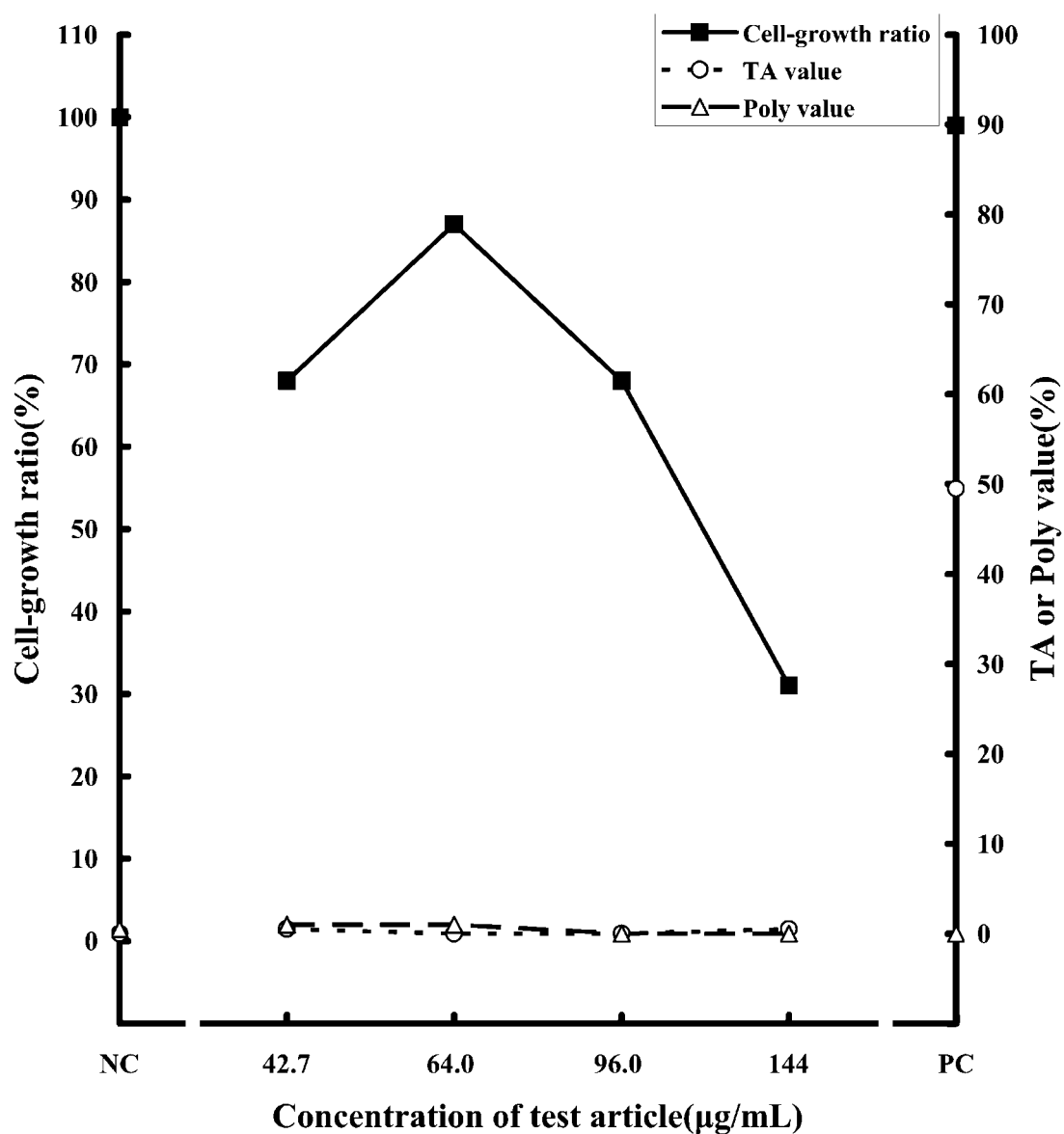


Fig. 1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Short-term treatment : +S9 mix]

NC : Negative Control (DMSO)

PC : Positive control (cyclophosphamide : 14 µg/mL)

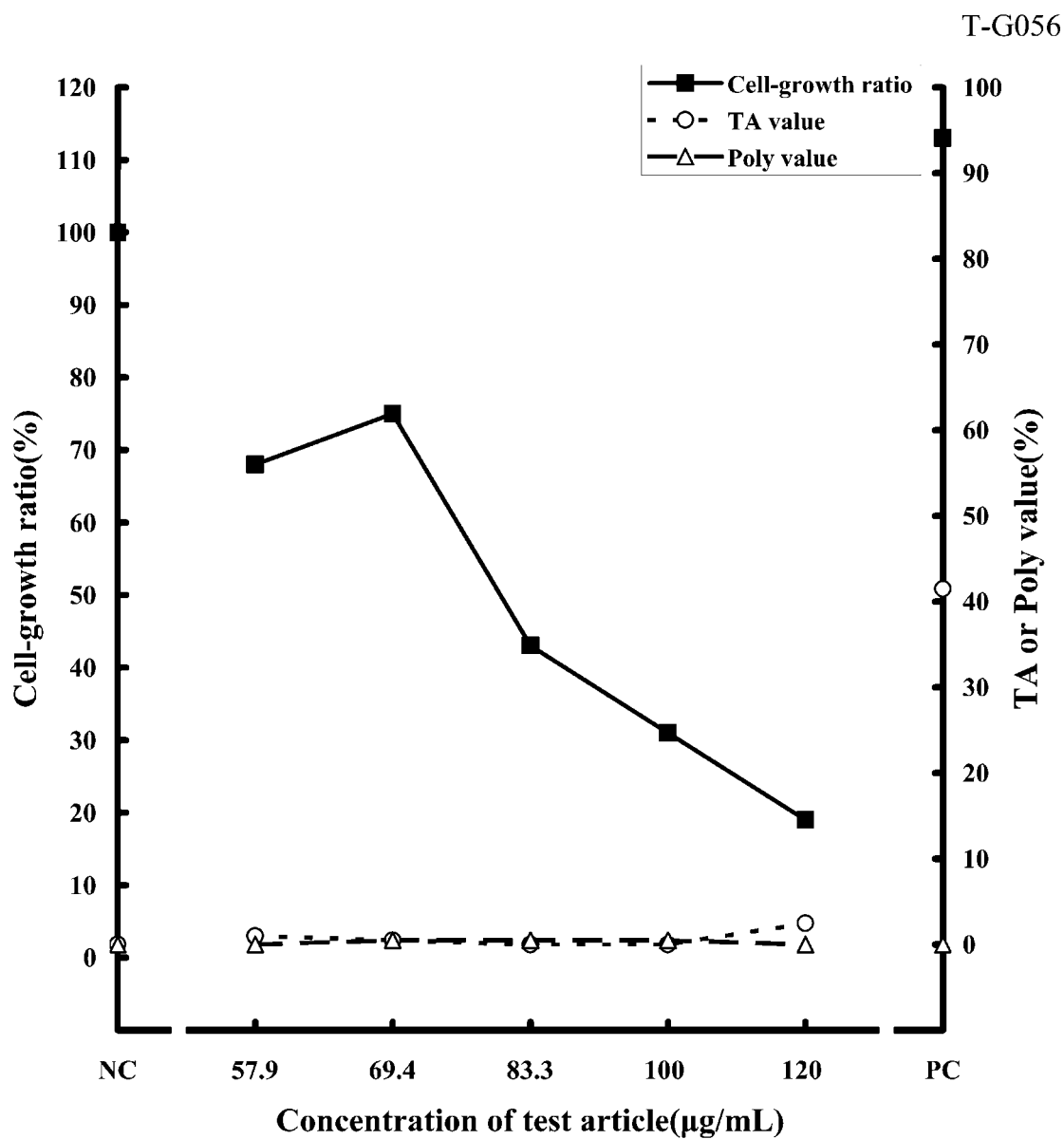


Fig. 2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Short-term treatment : -S9 mix]

NC : Negative Control (DMSO)

PC : Positive control (mitomycin C : 0.075 µg/mL)

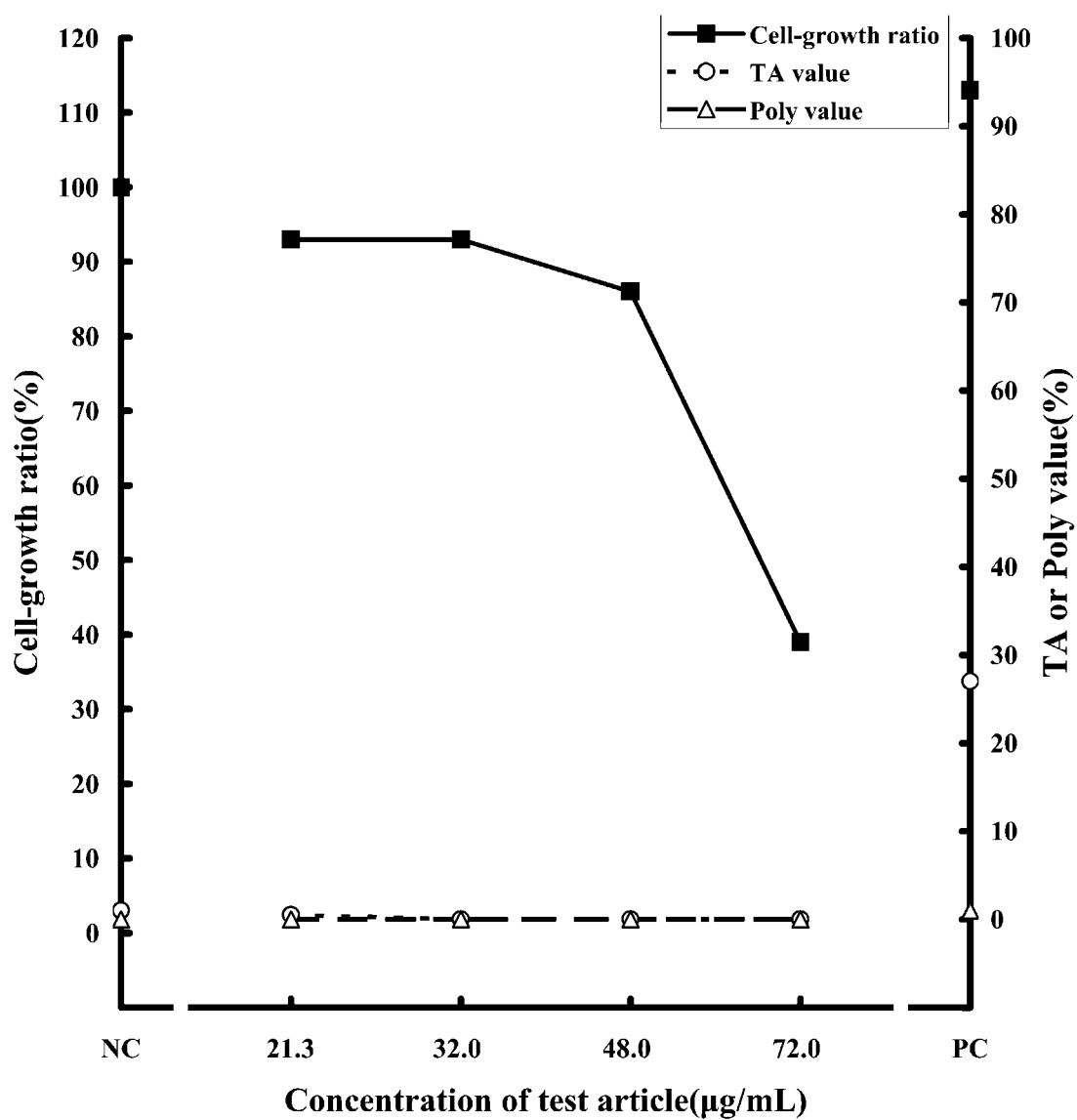


Fig. 3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Continuous treatment : 24hr]

NC : Negative Control (DMSO)

PC : Positive control (mitomycin C : 0.050 μg/mL)

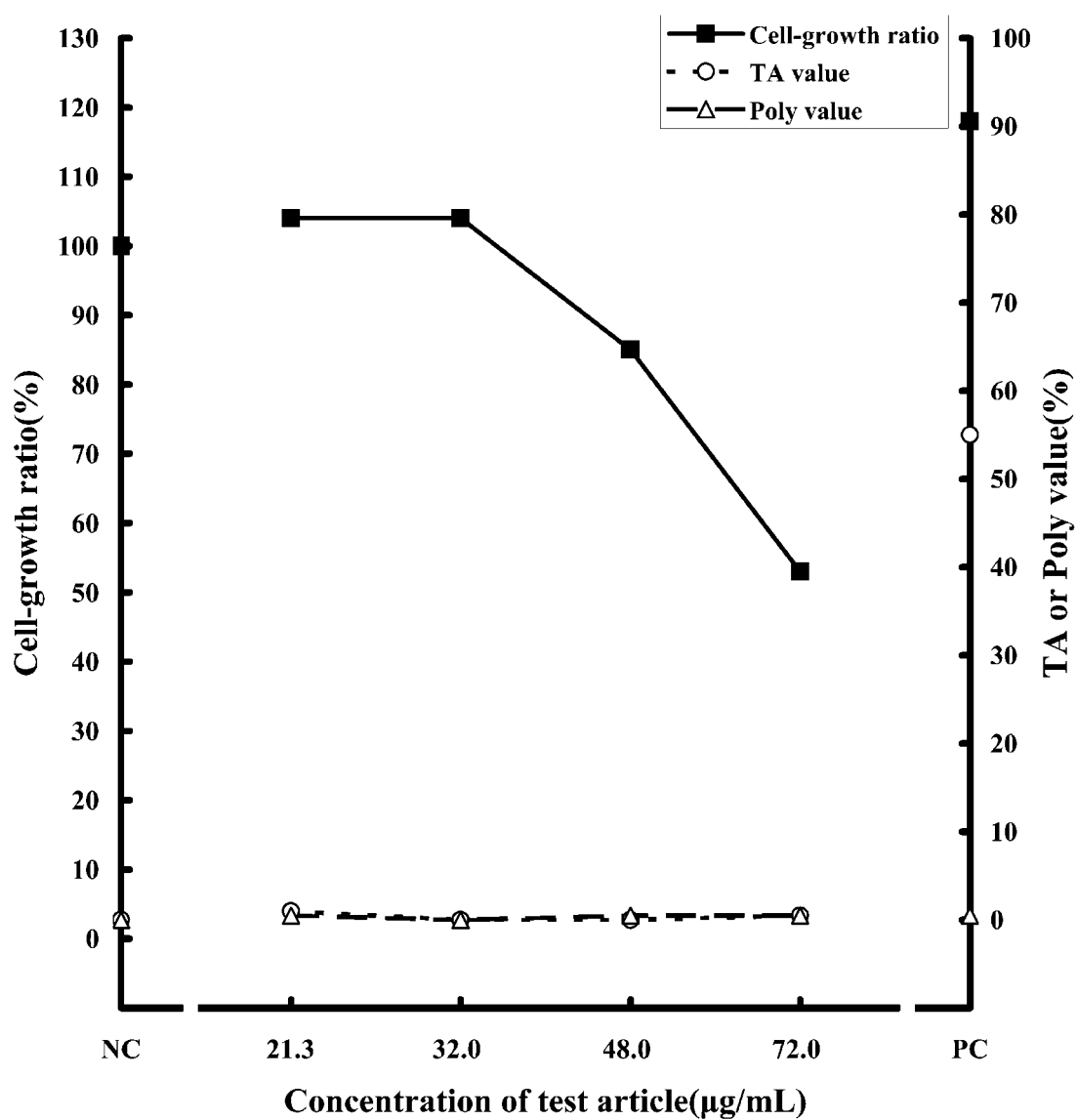


Fig. 4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Continuous treatment : 48hr]

NC : Negative Control (DMSO)

PC : Positive control (mitomycin C : 0.050 µg/mL)

Table 1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge- ment
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1	0	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		42.7	100	0	1	0	0	0	1	0	1	62	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	74	100	2	0	-
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(68)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)
		64.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	87	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	87	100	2	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(87)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)
		96.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	62	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	74	100	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(68)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		144	100	0	0	0	0	0	0	0	0	25	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	37	100	0	0	-
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(31)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		PC	100	5	46	0	0	0	51	0	51	99	100	0	0	0	
			100	3	45	0	0	0	48	0	48	+	99	100	0	0	-
			200	8(4.0)	91(45.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	99(49.5)	0(0.0)	99(49.5)		(99)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 µg/mL)

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment
6-18	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		57.9	100	0	0	0	0	0	0	1	1	-	62	100	0	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	1	3	-	74	100	0	0	-
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	4(2.0)	-	(68)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		69.4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	62	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	87	100	1	0	-
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(75)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		83.3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	49	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	37	100	1	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(43)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	25	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	37	100	1	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(31)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		120	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	12	100	0	0	0
			100	3	1	0	0	0	4	0	4	-	25	100	0	0	-
			200	4(2.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	0(0.0)	5(2.5)	-	(19)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		PC	100	12	33	0	0	0	45	0	45	+	112	100	0	0	0
			100	12	26	0	0	0	38	0	38	+	112	100	0	0	-
			200	24(12.0)	59(29.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	83(41.5)	0(0.0)	83(41.5)	+	(113)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 µg/mL)

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate
[Continuous treatment:24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge- ment
24-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	0	2	-	114	100	0	0	-
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		21.3	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	-
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(93)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		32.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(93)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		48.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	85	100	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(86)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		72.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	42	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	42	100	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(39)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		PC	100	7	20	0	0	0	27	0	27	+	114	100	2	0	2
			100	9	18	0	0	0	27	0	27	+	128	100	0	0	-
			200	16(8.0)	38(19.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	54(27.0)	0(0.0)	54(27.0)	+	(113)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 µg/mL)

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate
[Continuous treatment:48hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge- ment
48-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		21.3	100	0	2	0	0	0	2	0	2	-	100	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	107	100	0	0	-
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(104)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		32.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	107	100	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(104)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		48.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	92	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	78	100	1	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(85)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		72.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	49	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	57	100	1	0	-
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(53)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		PC	100	9	47	0	0	0	56	0	56	+	114	100	0	0	0
			100	11	44	0	0	0	55	0	55	+	121	100	1	0	-
			200	20(10.0)	91(45.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	111(55.5)	0(0.0)	111(55.5)	+	(118)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

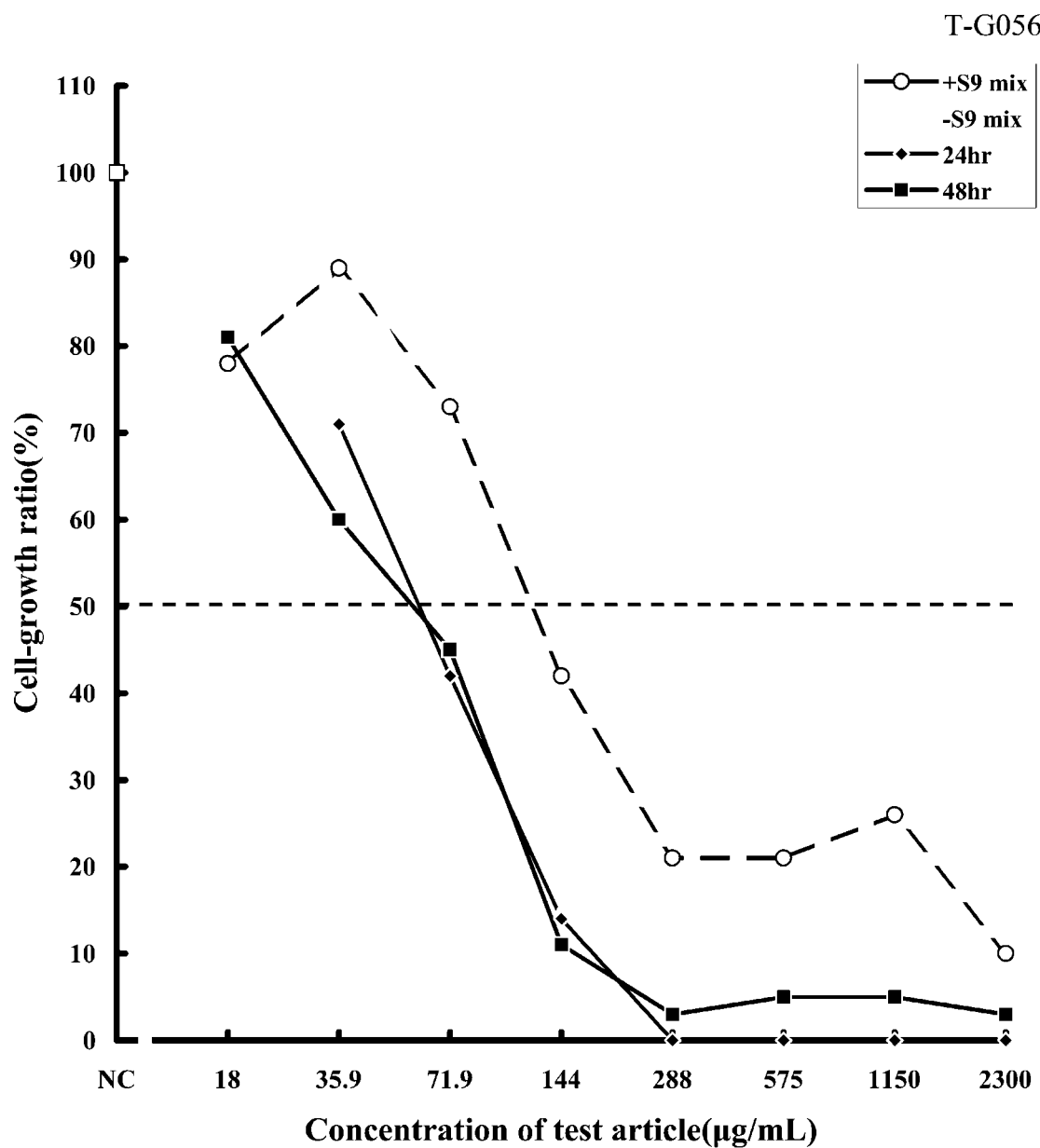
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 µg/mL)

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.



Appendix 1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

NC : Negative Control (DMSO)

Appendix 2-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Short-term treatment : +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)	Concentration (µg/mL)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
								1) 2)	
+	6-18	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				111		-	-	-	-
		18.0	88	78	-	-	-	-	
			77		-	-	-	-	
		35.9	88	89	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		71.9	88	73	+	-	-	-	
			66		+	-	-	-	
		144	44	42	++	-	+	+	
			44		++	-	+	+	
		288	22	21	++	-	+	+	
			22		++	-	+	+	
		575	22	21	+++	-	+	+	
			22		+++	-	+	+	
		1150	22	26	+++	-	+	+	
			33		+++	-	+	+	
		2300	11	10	+++	-	+	+	
			11		+++	-	+	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						125 µg/mL			

NC : Negative Control (DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.

- d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- e) - : No changes of color
- f) - : Absence of precipitates
 + : Presence of precipitates floating in the medium.
 +* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Short-term treatment : -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
								1)	2)
-	6-18	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				85		-	-	-	-
		18.0	71	84	-	-	-	-	
			85		-	-	-	-	
		35.9	85	92	-	-	-	-	
			85		-	-	-	-	
		71.9	71	69	+	-	-	-	
			57		+	-	-	-	
		144	14	15	++	-	+	+	
			14		++	-	+	+	
		288	0	0	+++	-	+	+	
			0		+++	-	+	+	
		575	0	8	+++	-	+	+	
			14		+++	-	+	+	
		1150	14	8	+++	-	+	+	
			0		+++	-	+	+	
		2300	0	0	TOX	-	+	+	
			0		TOX	-	+	+	

Concentration of 50% cell-growth inhibition :

97

µg/mL

NC : Negative Control (DMSO)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed¹⁾ immediately after addition of the test solutions and²⁾ at the end of treatment.
- d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
- + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.
- e) - : No changes of color
- f) - : Absence of precipitates
- + : Presence of precipitates floating in the medium.
- +* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Continuous treatment : 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
		Test article	18.0	85	71	-	-	-	-
				57		-	-	-	-
			35.9	71	71	++	-	-	-
				71		++	-	-	-
			71.9	42	42	++	-	-	-
				42		++	-	-	-
			144	14	14	+++	-	+	+
				14		+++	-	+	+
			288	0	0	TOX	-	+	+
				0		TOX	-	+	+
			575	0	0	TOX	-	+	+
				0		TOX	-	+	+
			1150	0	0	TOX	-	+	+
				0		TOX	-	+	+
			2300	0	0	TOX	-	+	+
				0		TOX	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						62	µg/mL		

NC : Negative Control (DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

+* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Continuous treatment : 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)	Concentration (µg/mL)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
								1) 2)	
-	48-0	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				94		-	-	-	-
		18.0	76	81	-	-	-	-	
			82		-	-	-	-	
		35.9	64	60	++	-	-	-	
			52		++	-	-	-	
		71.9	47	45	++	-	-	-	
			41		++	-	-	-	
		144	11	11	TOX	-	+	+	
			11		TOX	-	+	+	
		288	0	3	TOX	-	+	+	
			5		TOX	-	+	+	
		575	5	5	TOX	-	+	+	
			5		TOX	-	+	+	
		1150	5	5	TOX	-	+	+	
			5		TOX	-	+	+	
2300	5	3	TOX	-	+	+			
	0		TOX	-	+	+			
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						60	µg/mL		

NC : Negative Control (DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

+* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Short-term treatment : +S9 mix]

Chromosome aberration test						
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)		Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
					1)	2)
+	6-18	0 (NC)	-	-	-	-
			-	-	-	-
		Test article	42.7	-	-	-
			-	-	-	-
			64.0	-	-	-
			-	-	-	-
			96.0	+	-	-
			+	-	-	-
			144	+	+	+
			+	-	+	+
		PC	-	-	-	-
			-	-	-	-

NC : Negative Control (DMSO)

PC : Positive control (cyclophosphamide : 14 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates
 + : Presence of precipitates floating in the medium.
 +* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Short-term treatment : -S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
						1)	2)
-	6-18	0 (NC)		-	-	-	-
				-	-	-	-
		Test article	57.9	-	-	-	-
				-	-	-	-
			69.4	+	-	-	-
				+	-	-	-
			83.3	++	-	-	-
				++	-	-	-
			100	++	-	+	-
				++	-	+	-
		120	++	-	+	+	
			++	-	+	+	
		PC		-	-	-	-
				-	-	-	-

NC : Negative Control (DMSO)

PC : Positive control (mitomycin C : 0.075 µg/mL)

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

+* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

Appendix 3-3

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Continuous treatment : 24hr]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
						1)	2)
-	24-0	0 (NC)		-	-	-	-
				-	-	-	-
		Test article	21.3	-	-	-	-
				-	-	-	-
			32.0	-	-	-	-
				-	-	-	-
			48.0	+	-	-	-
				+	-	-	-
		72.0	++	-	-	-	
			++	-	-	-	
		PC		-	-	-	-
				-	-	-	-

NC : Negative Control (DMSO)

PC : Positive control (mitomycin C : 0.050 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed¹⁾ immediately after addition of the test solutions and²⁾ at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates

Appendix 3-4

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with *cis*-3-Hexenyl salicylate

[Continuous treatment : 48hr]

Chromosome aberration test						
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)		Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
					1)	2)
-	48-0	0 (NC)	-	-	-	-
			-	-	-	-
		Test article	21.3	-	-	-
			-	-	-	-
			32.0	-	-	-
			-	-	-	-
			48.0	+	-	-
			+	-	-	-
			72.0	++	-	-
			++	-	-	-
		PC	-	-	-	-
			-	-	-	-

NC : Negative Control (DMSO)

PC : Positive control (mitomycin C : 0.050 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates

T-G056

信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : T-G056

試験表題 : 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

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。

- 「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、平成 23・03・29 製局第 6 号、
環企発第 110331010 号)

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 18 日	2012 年 10 月 18 日
試験計画書変更書 (1)		2012 年 11 月 8 日	2012 年 11 月 8 日
細胞播種		2012 年 11 月 9 日	2012 年 11 月 9 日
調製・保存 (被験物質・陽性 対照物質)、被験物質の処理		2012 年 11 月 12 日	2012 年 11 月 13 日
染色体標本作製 (固定)		2012 年 11 月 13 日	2012 年 11 月 13 日
染色体標本作製 (染色)		2012 年 11 月 14 日	2012 年 11 月 14 日
染色体標本観察		2012 年 11 月 20 日	2012 年 11 月 20 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
染色体標本観察（連続処理法）		2012 年 12 月 12 日	2012 年 12 月 12 日
被験物質の安定性		2013 年 1 月 23 日	2013 年 1 月 24 日
生データ		2013 年 2 月 8 日	2013 年 2 月 8 日
最終報告書草案・図・表・付表		2013 年 2 月 8 日	2013 年 2 月 8 日
改善確認		2013 年 2 月 13 日	2013 年 2 月 13 日
試験計画書変更書（2）		2013 年 3 月 4 日	2013 年 3 月 5 日
生データ（被験物質の安定性・ 被験物質関係）		2013 年 3 月 19 日	2013 年 3 月 19 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
培養細胞の性状検査		2012 年 8 月 31 日	
		2012 年 9 月 3 日	
		2012 年 9 月 5 日	
		2012 年 9 月 6 日	
		2012 年 9 月 10 日	2012 年 9 月 10 日