

最終報告書

MutaMouse を用いるイソオイゲニルメチルエーテルの遺伝子突然変異試験
【GLP 非適用】

試験番号: [REDACTED]

[REDACTED]

試験委託者
国立医薬品食品衛生研究所

[REDACTED]

試験責任者の署名および日付

表 題： MutaMouse を用いるイソオイゲニルメチルエーテルの遺伝子突然変異試験

試験番号： [REDACTED]

試験責任者：

[REDACTED]

目 次

要 約.....	5
1. 表題.....	6
2. 試験番号.....	6
3. 試験目的.....	6
4. 参照したガイドライン.....	6
5. 遵守した動物実験関連規則および遺伝子組換え生物等関連規則.....	6
6. 試験施設.....	6
7. 試験委託者.....	7
8. 試験責任者.....	7
9. 被験物質等管理責任者.....	7
10. 分担責任者.....	7
11. 試験日程.....	7
12. 被験物質.....	8
13. 対照物質.....	9
14. 試験材料および方法.....	10
15. 試験成立条件.....	22
16. 試験結果.....	22
17. 考察および結論.....	24
18. 参考文献.....	24
19. 試験関係資料の保管.....	24
Tables	
Table 1 Clinical Signs.....	25
Table 2 Clinical Signs.....	27
Table 3 Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with ISOEUGENYL METHYL ETHER [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	31
Table 4 Induction of mutation in glandular stomach of transgenic mice treated with ISOEUGENYL METHYL ETHER [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	32

Appendices

Appendix 1	Clinical Signs.....	33
Appendix 2	Body Weights.....	41
Appendix 3	Clinical Signs.....	49
Appendix 4	Body Weights.....	54
Appendix 5	Gross findings in the gene mutation assay of ISOEUGENYL METHYL ETHER [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	59
Appendix 6	Historical control data (Transgenic rodent gene mutation assay (<i>LacZ</i> assay))	62

Reference data

Reference data 1	被験物質液の安定性結果.....	63
------------------	------------------	----

要 約

イソオイゲニルメチルエーテルの変異原性について、トランスジェニックマウス (MutaMouse) を用いて肝臓および腺胃における遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: *lacZ*) を検討した。

用量設定試験では、ガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とし、公比約 3 で除した 300, 100 および 30.0 mg/kg/day の計 4 用量を設定し、トランスジェニックマウスの親動物である CD2F1 マウス、雌雄に、1 日 1 回、14 日間反復強制経口投与した。その結果を基に最大耐量付近と考えられる 300 mg/kg/day を最高用量とし、以下、150 および 75.0 mg/kg/day の用量で各群雄 6 匹 (300 mg/kg/day 群については 8 匹) に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。いずれの投与群においても一般状態および体重推移に変化は認められなかった。最終投与後 3 日に生存動物全例から肝臓および腺胃を摘出した。すべての投与群において、評価数 5 匹を確保することができたため、300, 150 および 75.0 mg/kg/day の 3 用量の肝臓および腺胃について、*lacZ* assay により遺伝子突然変異体頻度を算出した。

その結果、イソオイゲニルメチルエーテル投与群の肝臓および腺胃のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。ただし、陰性対照群の 1/6 例 (動物番号 3001) のみ、腺胃の遺伝子突然変異体頻度が背景データの基準値から大きく超えていたことから、クローナル変異により偶発的に増加したものではないかと考えられた。

陽性対照の *N*-エチル-*N*-ニトロソウレア (ENU, 投与量 100 mg/kg/day, 腹腔内投与, 1 日 1 回 2 日間) 投与群では、肝臓および腺胃ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、当該試験条件下において、イソオイゲニルメチルエーテルはトランスジェニックマウスの肝臓および腺胃に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの (陰性) と判定された。

1. 表題

MutaMouse を用いるイソオイゲニルメチルエーテルの遺伝子突然変異試験

2. 試験番号

[REDACTED]

3. 試験目的

被験物質による標的器官での遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検討する (レポーター遺伝子: *lacZ*) .

4. 参照したガイドライン

- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 488 (26 June 2020: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)

5. 遵守した動物実験関連規則および遺伝子組換え生物等関連規則

- 「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号, 最終改正: 令和元年 6 月 19 日法律第 39 号)
- 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号, 最終改正: 平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)
- [REDACTED]
- 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号, 最終改正: 平成 29 年 5 月 31 日法律第 41 号)

当該試験は [REDACTED] により試験開始前に審査, 承認されており (動物実験委員会承認番号 [REDACTED], 遺伝子組換え実験承認受付番号 [REDACTED]), 遺伝子組換え生物等は適正に使用した.

6. 試験施設

[REDACTED]

7. 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

[REDACTED] 変異遺伝部)

〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町3丁目25番26号

8. 試験責任者

9. 被験物質等管理責任者

10. 分担責任者

検疫：

飼育管理：

遺伝子突然変異試験：

投与液等調製：

病理学的検査：

11. 試験日程

試験開始日：

【用量設定試験】

動物搬入日 (Day -6)：

群分け日 (Day 1)：

投与液調製日：

投与開始日 (Day 1, 実験開始日)：

投与終了日 (Day 14)：

観察終了日：

【遺伝子突然変異試験（本試験）】

動物搬入日（Day -8）：

投与液調製日：

群分け日（Day 1）：

《陰性対照群，被験物質群》

投与開始日（Day 1）：

投与終了日（Day 28）：

標的器官（臓器）摘出日（Day 31）：

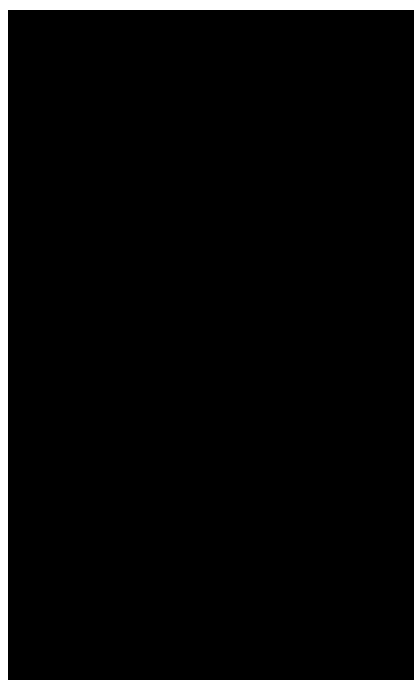
《陽性対照群》

投与日（Day 2, Day 3）：

標的器官（臓器）摘出日（Day 13）：

アッセイ終了日（実験終了日）：

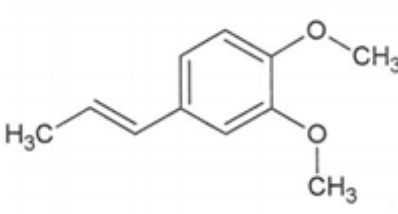
試験終了日：



【Day の定義】

被験物質の投与開始日を Day 1 と定義した。

12. 被験物質

名称	和名：イソオイゲニルメチルエーテル
	英名：ISOEUGENYL METHYL ETHER
別名	METHYL ISOEUGENOL 1,2-ジメトキシ-4-(1-プロペニル)ベンゼン
用途	食品添加物
提供元	[REDACTED]
ロット番号	[REDACTED]
CAS No.	93-16-3
構造式	
化学式	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
分子量	178.23

純度	99.7%
不純物の名称および含有率	不明
安定性	有効期限内指定条件下で安定
蒸気圧	不明
Log P	不明
融点	16～17℃
沸点	262～264℃
密度あるいは比重	1.051～1.057 (20℃/20℃)
物質の状態	外観：無色～淡黄色の透明な液体 臭い：特有の香気を有する
溶媒に対する溶解度等	水に不溶 アルコールに可溶 コーン油に可溶【試験施設データ】
有効期限	[REDACTED]
保管条件	冷所 (1～15℃), 遮光
取り扱い上の注意	手袋, マスクを着用する.
残余被験物質の処理	実験終了後, 廃棄した.

13. 対照物質

13.1. 陰性対照物質

被験物質液調製に媒体として使用するコーン油を陰性対照物質に選択した.

物質名	コーン油
製造元	富士フィルム和光純薬株式会社
規格	生化学用
保管条件	室温 (1～30℃)

13.2. 陽性対照物質

ガイドラインで推奨されている、以下の物質を陽性対照物質に選択した。

物質名	N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU)
製造元	Toronto Research Chemicals Inc.
保管条件	冷凍 (-30~-5°C)

14. 試験材料および方法

本試験では、使用する動物がトランスジェニックマウスであることから、PIA レベルの拡散防止処置をとった。

14.1. 試験動物

14.1.1. 種

用量設定試験：マウス

本試験：マウス (MutaMouse：トランスジェニックマウス)

14.1.2. 系統 [グレード]

用量設定試験：CD2F1/Slc (BALB/c × DBA/2) [SPF]

本試験：CD₂-LacZ80/HazfBR (MutaMouse) [SPF]

14.1.3. 生産所

用量設定試験：日本エスエルシー株式会社

本試験：[REDACTED]

14.1.4. 試験系の選択理由

用量設定試験：本試験の親動物である本系統のマウスを選択した。

本試験：遺伝子導入マウスとして広く利用されており、入手のし易さ等を考慮して本系統のトランスジェニックマウスを選択した。

14.1.5. 週齢

8 週齢の動物を購入し、被験物質の投与は 9 週齢に開始した。

14.1.6. 購入動物数

用量設定試験：雌雄各 14 匹

本試験：雄 36 匹

14.1.7. 使用動物数

用量設定試験：雌雄各 12 匹

本試験：雄 32 匹

14.2. 飼育管理

14.2.1. 飼育環境

バリアシステムの [REDACTED] [陽圧] (W 4.8 × D 10.3 × H 2.6 m) で動物を飼育した。環境調節の基準値は、次のとおりとした。なお、飼育期間中、出入り口にネズミ返しを設置した。

温度 20～26℃

湿度 35～70%RH

換気回数 12 回以上/h

照明 12 時間 (7 時点灯, 19 時消灯)

プラスチック製ケージ (W 18.2 × D 26.0 × H 12.8 cm) に床敷き (ALPHA-dri™, Shepherd Specialty Papers) を入れ、動物を 2～3 匹ずつ収容した。飼育ケージおよび給餌器は、群分け時および週 1 回、給水瓶は 2, 3 日に 1 回の頻度で交換した。床敷き中の汚染物質に関する分析証明書を製造元から入手し、その値が日本実験動物飼料協会/コンタミネント分析基準案の許容基準値内であることを確認した。

14.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業) を自由に摂取させた。

使用した飼料中の汚染物質に関する分析成績書を製造元から入手し、分析値が日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認した。なお、餌の補給は、給餌器の交換と同時に行った。

14.2.3. 給水

水道水を給水瓶から自由に摂取させた。

水道法に基づく水質検査を 6 ヶ月に 1 回、外部機関で行い、検査結果が上水道水質基準の基準値内であることを確認した。また、水質検査を実施しない月には [REDACTED] で細菌検査 (一般細菌および大腸菌検査) を実施し、細菌が検出されていないことを確認した。

14.3. 検疫・馴化

搬入後、動物の一般状態および体重推移を観察した。動物入荷から群分け日までの間動物を検疫・馴化させ、この間一般状態を 1 日 1 回観察した。体重を搬入時および検疫・馴化期間終了時 (Day 1) に測定した。

14.4. 群分け

安全性試験システム (Provantis) を用いて, Day 1 の群分け前に測定した体重を基に層別化し, 無作為割り付け法により各試験群を構成するように割り付けた.

試験に用いる動物の体重範囲は, 平均体重 \pm 20%以内とした.

14.5. 個体識別

動物入荷時に通し番号 (仮動物番号) を付し, 仮動物番号カードを飼育ケージに掲示して識別した. さらに, 動物の耳介に仮動物番号が刻印されたタグ (ら・ピラス, サイテック) を装着した.

群分け後, 仮動物番号と動物番号が記載された動物識別番号カード (ID カード) を飼育ケージに掲示し, 動物を識別した.

14.6. 余剰動物の取り扱い

用量設定試験では, 群分け後, 動物管理部門に移管した.

本試験では, 群分け後, 炭酸ガスを用いて安楽死させた.

14.7. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

使用量に応じて調製量を変更した.

14.7.1. ダウンス緩衝液

約 800 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた.

Na ₂ HPO ₄	1.75	g
KH ₂ PO ₄	0.25	g
NaCl	8	g
KCl	0.2	g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (ニッポンジーン)	20	mL

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 8.0 に調整後, 超純水を用いて 1000 mL に定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌し, 室温保管した.

14.7.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

以下の試薬を混合させた.

ダウンス緩衝液	100	mL
RNase 溶液 (RNase A 10 mg/mL, ニッポンジーン)	2.0	mL

用時調製した.

14.7.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

ショ糖 (MW=342.30) 17.1 g を約 80 mL のダウンス緩衝液に溶解し, ダウンス緩衝液を用いて 100 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μ m) ろ過除菌後, 冷蔵保管した.

14.7.4. 組織破碎用緩衝液

以下の試薬を混合させた.

ダウンス緩衝液	45	mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	45	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	10	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL)	2	mL

用時調製した.

14.7.5. 10 w/v%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液

SDS (富士フィルム和光純薬) 10 g を約 80 mL の遺伝子工学用滅菌水 (ニッポンジーン) に溶解し, 遺伝子工学用滅菌水を用いて 100 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 室温保管した.

14.7.6. プロティナーゼ K 溶液

以下の試薬を混合させた.

プロティナーゼ K (富士フィルム和光純薬)	200	mg
遺伝子工学用滅菌水	60	mL
10 w/v% SDS 溶液	20	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] ^{注1)}	20	mL

注1) pH 8.0 の EDTA 溶液 (ニッポンジーン) を 0.5~2 mol/L の塩酸で pH 7.5 に調整した後に使用した.

用時調製した.

14.7.7. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

以下の試薬を混合させた.

クロロホルム (関東化学)	100	mL
TE 飽和フェノール (ニッポンジーン)	100	mL

用時調製した.

14.7.8. クロロホルム/イソアミルアルコール混液

以下の試薬を混合させた.

クロロホルム (関東化学)	96	mL
イソアミルアルコール (富士フィルム和光純薬)	4	mL

用時調製した.

14.8. 培地および培養液等の調製

使用量に応じて調製量を変更した。

14.8.1. LB 培養液

以下の試薬を混合させた。

Bacto tryptone (Becton, Dickinson and Company)	10	g
Bacto yeast extract (Becton, Dickinson and Company)	5	g
NaCl	5	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵保管した。

14.8.2. LB 寒天培地

以下の試薬を混合させた。

Bacto tryptone	10	g
Bacto yeast extract	5	g
NaCl	5	g
バクトアガー (Becton, Dickinson and Company)	15	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, シャーレ (直径 150 mm) に 20 mL ずつ分注した。分注後のプレートは, 室温保管した。

14.8.3. LB トップアガー

以下の試薬を混合させた。

Bacto tryptone	10	g
Bacto yeast extract	5	g
NaCl	5	g
バクトアガー	7	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 使用時までウォーターバスを用いて 50°C の条件で保温した。用時調製した。

14.8.4. SM 緩衝液

約 800 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた。

NaCl	5.84 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.03 g
1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5] (ニッポンジーン)	50.0 mL
ゼラチン末 (関東化学)	100 mg

超純水を用いて 1000 mL に定容し、オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後、室温保管した。

14.8.5. P-gal 溶液

以下の試薬を混合させた。

Phenyl β-D-galactopyranoside [P-gal]	300 mg
ジメチルスルホキシド [DMSO] (富士フイルム和光純薬)	1 mL

用時調製した。

14.9. 被験物質液等

14.9.1. 被験物質液等の調製

被験物質は水に不溶でコーン油に可溶であることから、被験物質をコーン油に溶解させた。

14.9.1.1. 用量設定試験

各被験物質液を各投与用に小分け (7 日分および予備 1 本) し、投与日まで冷蔵で保管した。

14.9.1.1.1. 100 mg/mL 液

被験物質 3 g をメスシリンダーに秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、30 mL に定容し、100 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.1.2. 30.0 mg/mL 液

被験物質 900 mg をメスシリンダーに秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、30 mL に定容し、30.0 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.1.3. 10.0 mg/mL 液

被験物質 300 mg をメスシリンダーに秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、30 mL に定容し、10.0 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.1.4. 3.00 mg/mL 液

被験物質 90.0 mg をメスシリンダーに秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、30 mL に定容し、3.00 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.2. 本試験

各被験物質液を各投与用に小分け（7日分および予備1本）し、投与日まで冷蔵で保管した。

14.9.1.2.1. 30.0 mg/mL 液

被験物質 900 mg をメスシリンダーに秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、30 mL に定容し、30.0 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.2.2. 15.0 mg/mL 液

被験物質 450 mg をメスシリンダーに秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、30 mL に定容し、15.0 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.2.3. 7.50 mg/mL 液

被験物質 225 mg をメスシリンダーに秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、30 mL に定容し、7.50 mg/mL 液を準備した。

14.9.2. 被験物質液の均一性および安定性

「イソオイゲニルメチルエーテルの濃度測定法バリデーションおよびコーン油中におけるイソオイゲニルメチルエーテルの安定性試験：試験番号 [REDACTED] [1]」において、以下の保管条件で安定性が確認されている。

被験物質液 100 mg/mL, 1 mg/mL (媒体：コーン油)	冷蔵遮光（温度範囲：1～9°C）8日間 + 室温遮光（許容温度：1～30°C）24時間以上
---------------------------------------	--------------------------------------------------

14.9.3. 陽性対照物質液の調製

ENU 50 mg を量り、目盛り付試験管に移した後、1/15 M リン酸緩衝液（pH 6）を加えて5 mL に定容し、10 mg/mL 液を準備した。陽性対照物質液は、用時調製した。

14.9.4. 残余被験物質液および陽性対照物質液の処分

専用の容器に廃棄した。

14.10. 対照群

14.10.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体であるコーン油を使用した。

14.10.2. 陽性対照群

ENU を使用し、用量は 100 mg/kg/day とした。

14.11. 用量設定試験（予備試験）

14.11.1. 試験群の構成

用量 (mg/kg/day)	投与液 の濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
30.0	3.00	10	雄	3	1001～1003
		10	雌	3	2001～2003
100	10.0	10	雄	3	1101～1103
		10	雌	3	2101～2103
300	30.0	10	雄	3	1201～1203
		10	雌	3	2201～2203
1000	100	10	雄	3	1301～1303
		10	雌	3	2301～2303

14.11.2. 用量設定理由

当該試験において、雌雄を使用し、ガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とし、公比約 3 で除した 300, 100 および 30.0 mg/kg/day の計 4 用量を被験物質処理群として設定した。

14.11.3. 投与方法および投与回数

被験物質の投与経路は経口とし、プラスチック製注射筒とテフロン製胃ゾンデを用いて 1 日 1 回、14 日間連続強制投与した。投与容量は体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、14.11.4. 項で測定した最新の体重に基づいて算出した。

14.11.4. 体重測定および一般状態観察

Day 1（群分け日）、8 および 15（最終投与後 1 日）に体重を測定した。

初回投与日から最終投与後 1 日まで最低 1 日 1 回、動物の一般状態を観察した。各用量の最終投与後 1 日での死亡率を求めた。

観察終了後、生存動物は炭酸ガスを用いて速やかに安楽死させた。

14.12. MutaMouse を用いる遺伝子突然変異試験（本試験）

14.12.1. 試験群の構成

用量 (mg/kg/day)	投与液 の濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
0*	0	10	雄	6	3001～3006
75.0	7.50	10	雄	6	3101～3106
150	15.0	10	雄	6	3201～3206
300	30.0	10	雄	8	3301～3308
100**	10	10	雄	6	3401～3406

*：陰性対照（媒体のみを投与した。） **：陽性対照（ENU）

14.12.2. 用量設定根拠

用量設定試験の結果、雌雄の 1000 mg/kg/day 群の全例において自発運動の低下が認められ、雌の 2/3 例で死亡が認められた。300 mg/kg/day 群では、雄の 2/3 例、雌の 2/3 例において自発運動の低下が認められた。

100 mg/kg/day 群以下の用量では、雌雄ともに一般状態の変化および顕著な体重減少は認められなかった。

したがって、遺伝子突然変異試験では、最大耐量付近と考えられる 300 mg/kg/day を最高用量とし、以下、150 および 75.0 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。また、予備試験の結果、明確な性差が認められなかったため、雄のみを使用した。

14.12.3. 投与動物数および評価対象

評価数 5 匹を確保するため、いずれの試験群とも 6 匹（300 mg/kg/day 群については 8 匹）に投与した。すべての投与群において、死亡例が認められなかったため、動物番号の小さい順に 5 匹を評価に使用した。ただし、陰性対照群の動物番号 3001 の腺胃において、突然変異体頻度が高値を示したことから、動物番号 3006 の肝臓および腺胃について追加評価した。評価に使用しない動物については、14.12.7.項に記載する各器官（臓器）を摘出した後保管し、ゲノム DNA の抽出は行わなかった。

14.12.4. 投与方法および投与回数

媒体および被験物質の投与経路は、ヒトへの暴露経路と考えられる経口とした。

プラスチック製注射筒およびテフロン製胃ゾンデを用いて被験物質液を強制経口投与した。

投与容量は、体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、14.12.6.項で測定した最新の体重に基づいて算出した。

ガイドラインに従い、1日1回、28日間連続投与を行った。

陽性対照物質の投与経路は、腹腔内投与とし、25G注射針を装着したプラスチック製注射筒を用いて1日1回、2日間腹腔内投与した。投与容量は、体重10g当たり0.1mLとし、Day1の体重に基づいて算出した。

14.12.5. 投与期間および発現期間

Day1からDay28までを投与期間、Day29からDay31までを発現期間とするとともに、Day1～7をWeek1、Day8～14をWeek2、Day15～21をWeek3、Day22～28をWeek4とした。最終投与後3日（Day31）に器官を摘出した。陽性対照群については、Day2および3に投与し、Day4からDay13までを発現期間とし、最終投与後10日（Day13）に器官を摘出した。

14.12.6. 体重測定および一般状態観察

陰性対照群および被験物質投与群は、Day1（群分け日）、8、15、22、29および31（器官摘出直前）に体重を測定した。陽性対照群については、Day1および13（器官摘出前）に体重を測定した。

器官摘出まで、1日1回以上、動物の一般状態を観察した。

14.12.7. 器官（臓器）摘出、肉眼的観察および保管

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物から肝臓および胃（腺胃）を摘出し、これら器官の肉眼的観察を行った。各器官の摘出・保管は、以下の方法に従った。なお、解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した。

肝臓：外側左葉を生検トレパン（BP-50F、貝印）を用いて2カ所くり抜いた。くり抜いた肝臓は、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、液体窒素（LN₂）で凍結させた。残った左葉およびその他の葉は、ビニール袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。

胃：大弯側を切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出した。前胃と腺胃に分割し、腺胃を保管袋に入れ、LN₂で凍結させた。前胃は、廃棄した。

凍結後は超低温フリーザー（設定値：-80°C、基準値：-90～-60°C）に保管した。すべての摘出器官（臓器）は、最終報告書作成まで保管され、その後廃棄される。

14.12.8. 摘出器官の選択理由

肝臓：主要な代謝器官であり、ガイドラインで推奨されているため。

腺胃：経口投与では初期に被験物質と接触する器官であり、ガイドラインで推奨されているため。

14.12.9. ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに組織破碎用緩衝液 (RNase を含む) 3 mL を分注し、氷中で冷却しておいた。次いで、凍結組織片を入れ、ペッスルを用いてホモジナイズした (組織破碎液)。あらかじめ 0.5 mol/L ショ糖溶液 3 mL を入れて氷冷しておいた 15 mL 容の遠心管に上記の組織破碎液を静かに重層し、3000 rpm (1750 G) で 10 分間遠心した。上清を除去後、冷却した RNase 含有ダウンス緩衝液 3 mL を加え、よく懸濁した (核/細胞懸濁液)。

上記の核/細胞懸濁液にプロテイナーゼ K 溶液 3 mL を加えて静かに転倒混和し、2.5 時間程度 (懸濁液が透明になるまで) 50°C の条件で保温し、消化させた。等量 (約 6 mL) の Ph/Cl 混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 rpm (1220 G) で 10 分間遠心した。上層 (水相) をトランスファーピペットで静かに回収し、新たな 15 mL 容の遠心管に移した。回収した水相と等量の Ph/Cl 混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 rpm (1220 G) で 10 分間遠心し、水相を回収した。回収した水相と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 rpm (1220 G) で 10 分間遠心した。水相を回収し、50 mL 容の遠心管に移した。遠心管にエタノールを徐々に加え、ゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA を 70%エタノールの入ったマイクロチューブに移し、およそ 10 分間浸した。次いで、13000 rpm (13230 G) で 10 分間遠心した。上清をマイクロピペットで可能な限り除いた後、チューブを室温に放置することにより残ったエタノールを蒸散させた。適量 (100 μ L) の TE 緩衝液 (ニッポンジーン) を加え、一晩室温に放置し、残渣の DNA を溶解させた。溶解後は、冷蔵にて保管した。ゲノム DNA 溶液中の DNA 濃度を NanoDrop (AGC TECHNO GLASS) を用いて測定した。DNA 濃度が 200~600 μ g/mL 程度の濃度になるように、適量の TE 緩衝液を用いて希釈した。

14.12.10. 試験菌株の準備

容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに LB 培養液 30 mL、マルトース水溶液 (200 mg/mL) 300 μ L、アンピシリン溶液 (50 mg/mL) 30 μ L およびカナマイシン溶液 (20 mg/mL) 30 μ L を添加した。凍結保管 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌 C 株 (*lacZ⁻*, *gal E⁻*) 懸濁液を融解した後、これに 50 μ L 接種した。37°C、120 回/分の振盪条件で一晩培養し、前培養液とした。

容量 500 mL のバッフル付三角フラスコに新鮮な LB 培養液 100 mL および 200 mg/mL マルトース水溶液 1 mL を添加し、次いで先の前培養液を 1 mL 植菌した後、同様に 2 時間程度 (OD: 約 0.9) 培養を続けた。培養終了後、菌懸濁液を 10 分間遠心分離 (1500 rpm) した。10 mmol/L の硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を用いて再懸濁した (大腸

菌懸濁液).

14.12.11. ゲノム DNA を用いた *in vitro* パッケージング

Transpack (Agilent Technologies) 製品添付の Instruction Manual に従ってパッケージングを実施した. Transpack のチューブ (RED) を解凍した. ゲノム DNA 溶液約 10 μL をチューブ (RED) に加え, ピペッティングにより混合した後, 30°C の条件で 90 分間インキュベートした. 次いで, チューブ (BLUE) を解凍し, その 10 μL をチューブ (RED) に加え, 同様に混合した. さらに, 30°C の条件で 90 分間インキュベートした. 各チューブに SM 緩衝液 700 μL を加え, 十分に攪拌した (パッケージング溶液).

14.12.12. パッケージング溶液のプレーティング

大腸菌懸濁液を総プラーク算出用 (タイター用) に 1 mL, 突然変異算出用 (セクション用) に 2 mL, それぞれのチューブに分注しておいた. パッケージング DNA の全量 (およそ 700 μL) をセクション用チューブに加えた後 (およそ 2700 μL になる) 攪拌し, 室温に 30 分放置してファージを大腸菌に感染させた. 本溶液 30 μL を 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 270 μL に加えて 10 倍希釈した. 本希釈液 30 μL をタイター用チューブに加え攪拌した.

タイター用トッアガーの場合は, LB トッアガー 100 容量に対して, 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液 2 容量を加えた. セクション用トッアガーの場合は, LB トッアガー 100 容量に対して, P-gal 溶液 2 容量を加えた.

タイター用チューブに, タイター用トッアガー 17 mL を加え混和し, LB 寒天培地に全量を重層した. セクション用チューブには, セクション用トッアガー 16 mL を加え, タイター用と同様に LB 寒天培地に重層した. 各プレートを 37°C の条件で一晩培養した.

14.12.13. 総プラーク数の算出

タイター用プレートに出現したプラーク数 (N) を計数し, 下記の式を用いて総プラーク数を求めた.

$$\begin{aligned} \text{総プラーク数} &= \frac{N \times 300 (\mu\text{L}) \times 2700 (\mu\text{L})}{30 (\mu\text{L}) \times 30 (\mu\text{L})} \\ &= 900 \times N \end{aligned}$$

14.12.14. 変異プラーク数の算出

セクション用プレートに出現したプラーク数を計数した. 出現したプラーク数を変異プラーク数とした.

14.12.15. 突然変異体頻度 (Mutant Frequency) の算出

出現した変異プラーク数を総プラーク数で除して、当該組織での突然変異体頻度を求めた。

$$\text{突然変異体頻度} = \frac{\text{変異プラーク数}}{\text{総プラーク数}}$$

14.13. 結果の評価

14.13.1. 統計解析

各被験物質投与群の突然変異体頻度について、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散 (有意差が認められなかった) の場合は、Dunnett の多重比較検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定し、不等分散 (有意差が認められた) の場合は、Steel の検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した。

陰性対照群と陽性対照群での突然変異体頻度の比較は、最初に F 検定を実施し、有意差が認められない場合は、Student の t 検定を実施した。F 検定で有意差が認められる場合は、Aspin-Welch の t 検定を実施した。

各検定の有意水準は両側 5%とした。

14.13.2. 結果の判定

陰性対照群と比較し、被験物質群の突然変異体頻度において統計学的な有意差が認められた場合に、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、用量依存性および試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験成立条件

陽性対照群の突然変異体頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められたため、試験は成立したと判断した。

16. 試験結果

16.1. 用量設定試験

結果を Table 1 ならびに Appendix 1 および 2 に示す。

イソオイゲニルメチルエーテル投与群では、雌雄の 1000 mg/kg/day 群の全例において自発運動の低下が認められ、雌の 2/3 例で死亡が認められた。300 mg/kg/day 群では、雄の 2/3 例、雌の 2/3 例において自発運動の低下が認められた。

100 mg/kg/day 群以下の用量では、雌雄ともに一般状態の変化および顕著な体重減少は認められなかった。

最終投与後 1 日における死亡率は、雌性の 1000 mg/kg/day 群で 66.7%、その他の投与群では 0%であった。

16.2. MutaMouse を用いる遺伝子突然変異試験

16.2.1. *lacZ* assay (肝臓)

結果を Table 3 に示す。

陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $32.8 \pm 7.3 (\times 10^{-6})$ であった。

イソオイゲニルメチルエーテル投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、75.0, 150 および 300 mg/kg/day 群で、それぞれ $30.1 \pm 9.9 (\times 10^{-6})$, $33.5 \pm 10.1 (\times 10^{-6})$ および $46.3 \pm 7.8 (\times 10^{-6})$ であり、陰性対照群と比較し統計学的に有意な差は認められなかった。

陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は、 $112.7 \pm 32.4 (\times 10^{-6})$ であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

16.2.2. *lacZ* assay (腺胃)

結果を Table 4 に示す。

陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $69.2 \pm 83.0 (\times 10^{-6})$ であった。ただし、動物番号 3001 で突然変異体頻度が 236.8×10^{-6} と高値を示し、この個体を除いた突然変異頻度は $35.7 \pm 13.4 \times 10^{-6}$ であった。

イソオイゲニルメチルエーテル投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、75.0, 150 および 300 mg/kg/day 群で、それぞれ $29.1 \pm 9.8 (\times 10^{-6})$, $27.6 \pm 9.3 (\times 10^{-6})$ および $31.4 \pm 10.3 (\times 10^{-6})$ であった。動物番号 3001 を含めた場合、除外した場合のどちらの陰性対照群と比較しても、統計学的に有意な差は認められなかった。

陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は、 $333.3 \pm 19.4 (\times 10^{-6})$ であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

16.2.3. 体重および一般状態観察

結果を Table 2 ならびに Appendix 3 および 4 に示す。

イソオイゲニルメチルエーテル投与群では、いずれの投与群においても一般状態および体重推移に変化は認められなかった。

16.2.4. 解剖時の肉眼観察

結果を Appendix 5 に示す。

いずれの投与群においても被験物質の影響と考えられる肉眼的異常は認められなかった。

17. 考察および結論

イソオイゲニルメチルエーテルの肝臓および腺胃における遺伝子突然変異誘発性を検討するため、トランスジェニックマウス (MutaMouse) を用いた遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: *lacZ*) 試験を実施した。

用量設定試験の結果を基に最大耐量付近と考えられる 300 mg/kg/day を最高用量とし、以下、150 および 75.0 mg/kg/day の用量で各群雄 6 匹 (300 mg/kg/day 群については 8 匹) に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。最終投与後 3 日に生存動物全例から肝臓および腺胃を摘出した。すべての投与群において、評価数 5 匹を確保することができたため、300, 150 および 75.0 mg/kg/day の 3 用量の肝臓および腺胃について、*lacZ* assay による遺伝子突然変異体頻度を算出した。

その結果、イソオイゲニルメチルエーテル投与群の肝臓および腺胃のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。ただし、陰性対照群の 1/6 例 (動物番号 3001) のみ、腺胃の遺伝子突然変異体頻度が背景データの基準値から大きく超えていたことから、クローナル変異により偶発的に増加したものではないかと考えられた。

陽性対照の ENU 投与群では、肝臓および腺胃ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、当該試験条件下において、イソオイゲニルメチルエーテルはトランスジェニックマウスの肝臓および腺胃に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの (陰性) と判定された。

18. 参考文献

- [1] [REDACTED]. イソオイゲニルメチルエーテルの濃度測定法バリデーションおよびコーン油中におけるイソオイゲニルメチルエーテルの安定性試験. 試験番号 [REDACTED] [REDACTED] 最終報告書. [REDACTED]; 2021.

19. 試験関係資料の保管

当該試験の下記資料は、[REDACTED]にて最終報告書作成後 10 年間保管される。その後の保管については、試験委託者と [REDACTED] で協議し、別途定める。なお、DNA 溶液および凍結器官は、最終報告書作成後廃棄する。

- 試験計画書 (原本)
- 被験物質に関する資料
- 試験期間中に発生した生データ一式 (電子記録を含む)
- 最終報告書 (副本)

Table 1. Clinical Signs
 ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay
 (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date														
		1 BF	1 AF	2 AF	3 AF	4 AF	5 AF	6 AF	7 AF	8 AF	9 AF	10 AF	11 AF	12 AF	13 AF	14 AF
30.0 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
100 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
300 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Decrease in locomotor activity	.	2	1
1000 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	.	.	2	1	.	1	2	2	1	3	3	3	3	3
	Decrease in locomotor activity	.	3	3	1	2	3	2	1	1	2

Values = Specific Number of Animals Affected

. = Not Present

BF: Before administration

AF: After administration

BC: Before carrying out

Table 1. Clinical Signs
 ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay
 (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Female	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date														
		1 BF	1 AF	2 AF	3 AF	4 AF	5 AF	6 AF	7 AF	8 AF	9 AF	10 AF	11 AF	12 AF	13 AF	14 AF
30.0 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
100 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
300 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Decrease in locomotor activity	.	1	1
1000 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
	Normal	3	1	1	.	.	1	1	.	1	1	1	1	1	1	1
	Decrease in locomotor activity	.	2	2	3	2	1	.	1

Values = Specific Number of Animals Affected

.=Not Present

BF: Before administration

AF: After administration

BC: Before carrying out

Table 2. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																				
		1 BF	1 AF	2 BF	2 AF	3 BF	3 AF	4 BF	4 AF	5 BF	5 AF	6 BF	6 AF	7 BF	7 AF	8 BF	8 AF	9 BF	9 AF	10 BF	10 AF	11 BF
NC 0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
75.0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
150 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
300 mg/kg/day	Animals Examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	Normal	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Values = Specific Number of Animals Affected

NC: Negative Control

BF: Before administration

AF: After administration

MP: Manifestation period

Table 2. Clinical Signs
 ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																				
		11 AF	12 BF	12 AF	13 BF	13 AF	14 BF	14 AF	15 BF	15 AF	16 BF	16 AF	17 BF	17 AF	18 BF	18 AF	19 BF	19 AF	20 BF	20 AF	21 BF	21 AF
NC 0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
75.0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
150 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
300 mg/kg/day	Animals Examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Normal	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Values = Specific Number of Animals Affected

NC: Negative Control

BF: Before administration

AF: After administration

MP: Manifestation period

Table 2. Clinical Signs
 ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																				
		22 BF	22 AF	23 BF	23 AF	24 BF	24 AF	25 BF	25 AF	26 BF	26 AF	27 BF	27 AF	28 BF	28 AF	29 MP	30 MP	31 MP				
NC 0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6				
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
75.0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6				
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
150 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6				
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
300 mg/kg/day	Animals Examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8				
	Normal	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8			

Values = Specific Number of Animals Affected
 NC: Negative Control
 BF: Before administration
 AF: After administration
 MP: Manifestation period

Table 2. Clinical Signs
 ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date														
		1 BF	2 BF	2 AF	3 BF	3 AF	4 MP	5 MP	6 MP	7 MP	8 MP	9 MP	10 MP	11 MP	12 MP	13 MP
PC 100 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Values = Specific Number of Animals Affected

PC: Positive Control

BF: Before administration

AF: After administration

MP: Manifestation period

Table 3. Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with ISOEUGENYL METHYL ETHER
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	3001	500,400	1	17	34.0	32.8 \pm 7.3
		3002	572,400	1	26	45.4	
		3003	432,000	1	11	25.5	
		3004	487,800	1	17	34.9	
		3005	586,800	1	18	30.7	
		3006	306,000	1	8	26.1	
Test substance	75.0	3101	553,500	2	13	23.5	30.1 \pm 9.9
		3102	452,700	1	19	42.0	
		3103	711,900	1	23	32.3	
		3104	785,700	1	28	35.6	
		3105	468,900	1	8	17.1	
	150	3201	402,300	1	19	47.2	33.5 \pm 10.1
		3202	334,800	1	12	35.8	
		3203	337,500	1	10	29.6	
		3204	533,700	2	19	35.6	
		3205	307,800	1	6	19.5	
	300	3301	409,500	1	24	58.6	46.3 \pm 7.8
		3302	329,400	1	16	48.6	
		3303	309,600	1	13	42.0	
		3304	576,900	1	25	43.3	
		3305	463,500	1	18	38.8	
ENU	100	3401	305,100	1	27	88.5	112.7 \pm 32.4 * (AW)
		3402	618,300	2	50	80.9	
		3403	495,000	1	52	105.1	
		3404	478,800	1	77	160.8	
		3405	319,500	1	41	128.3	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

(AW): Aspin-Welch's *t* test

Table 4. Induction of mutation in glandular stomach of transgenic mice treated with ISOEUGENYL METHYL ETHER
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	3001	1,410,300	2	334	236.8	69.2 \pm 83.0 (35.7 \pm 13.4) #
		3002	572,400	1	20	34.9	
		3003	515,700	1	29	56.2	
		3004	615,600	1	13	21.1	
		3005	588,600	1	23	39.1	
		3006	407,700	1	11	27.0	
Test substance	75.0	3101	300,600	1	8	26.6	29.1 \pm 9.8
		3102	810,900	1	14	17.3	
		3103	832,500	1	23	27.6	
		3104	923,400	1	41	44.4	
		3105	678,600	1	20	29.5	
	150	3201	564,300	1	10	17.7	27.6 \pm 9.3
		3202	957,600	1	17	17.8	
		3203	351,000	1	13	37.0	
		3204	709,200	1	25	35.3	
		3205	663,300	1	20	30.2	
	300	3301	921,600	1	31	33.6	31.4 \pm 10.3
		3302	789,300	1	17	21.5	
		3303	447,300	1	21	46.9	
		3304	664,200	1	15	22.6	
		3305	838,800	1	27	32.2	
ENU	100	3401	479,700	1	158	329.4	333.3 \pm 19.4 * (AW) (S)
		3402	638,100	1	217	340.1	
		3403	943,200	1	332	352.0	
		3404	638,100	1	219	343.2	
		3405	898,200	1	271	301.7	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

(AW): Aspin-Welch's *t* test (When animal ID No.3001 is included)

(S): Student's *t* test (When animal ID No.3001 is excluded)

#: This value was calculated by removing animal ID No.3001

Appendix 1. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

30.0 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 15 (Start Date)
1001	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
1002	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
1003	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]

Values=Clin Obs Range
BF: Before administration
AF: After administration
BC: Before carrying out

Appendix 1. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

100 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 15 (Start Date)
1101	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
1102	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
1103	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]

Values=Clin Obs Range
BF: Before administration
AF: After administration
BC: Before carrying out

Appendix 1. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

300 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 15 (Start Date)
1201	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
1202	Normal Decrease in locomotor activity Euthanasia	1[BF],3[AF] to 14[AF] 1[AF] to 2[AF] 15[BC]
1203	Normal Decrease in locomotor activity Euthanasia	1[BF],2[AF] to 14[AF] 1[AF] 15[BC]

Values=Clin Obs Range
 BF: Before administration
 AF: After administration
 BC: Before carrying out

Appendix 1. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

1000 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 15 (Start Date)
1301	Normal Decrease in locomotor activity Euthanasia	1[BF],10[AF] to 14[AF] 1[AF] to 9[AF] 15[BC]
1302	Normal Decrease in locomotor activity Euthanasia	1[BF],3[AF],6[AF] to 14[AF] 1[AF] to 2[AF],4[AF] to 5[AF] 15[BC]
1303	Normal Decrease in locomotor activity Euthanasia	1[BF],3[AF] to 4[AF],7[AF] to 8[AF],10[AF] to 14[AF] 1[AF] to 2[AF],5[AF] to 6[AF],9[AF] 15[BC]

Values=Clin Obs Range
 BF: Before administration
 AF: After administration
 BC: Before carrying out

Appendix 1. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

30.0 mg/kg/day Sex: Female	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 15 (Start Date)
2001	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
2002	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
2003	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]

Values=Clin Obs Range
BF: Before administration
AF: After administration
BC: Before carrying out

Appendix 1. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

100 mg/kg/day Sex: Female	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 15 (Start Date)
2101	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
2102	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]
2103	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]

Values=Clin Obs Range
 BF: Before administration
 AF: After administration
 BC: Before carrying out

Appendix 1. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

300 mg/kg/day Sex: Female	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 15 (Start Date)
2201	Normal Decrease in locomotor activity Euthanasia	1[BF] to 1[AF],3[AF] to 14[AF] 2[AF] 15[BC]
2202	Normal Decrease in locomotor activity Euthanasia	1[BF],2[AF] to 14[AF] 1[AF] 15[BC]
2203	Normal Euthanasia	1[BF] to 14[AF] 15[BC]

Values=Clin Obs Range

BF: Before administration

AF: After administration

BC: Before carrying out

Appendix 1. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

1000 mg/kg/day Sex: Female	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 15 (Start Date)
2301	Normal Decrease in locomotor activity Euthanasia	1[BF],5[AF] to 6[AF],8[AF] to 14[AF] 1[AF] to 4[AF],7[AF] 15[BC]
2302	Normal Decrease in locomotor activity Dead	1[BF] 1[AF] to 3[AF] 4[BF]
2303	Normal Decrease in locomotor activity Dead	1[BF] to 2[AF] 3[AF] to 5[AF] 6[BF]

Values=Clin Obs Range

BF: Before administration

AF: After administration

BC: Before carrying out

Appendix 2. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

30.0 mg/kg/day	Body weight			Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	1 to 15
1001	25.3	25.3	25.0	-0.3
1002	24.2	23.4	24.1	-0.1
1003	28.4	28.9	29.6	1.2
Mean	26.0	25.9	26.2	0.3
SD	2.2	2.8	3.0	0.8
N	3	3	3	3

Appendix 2. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

100 mg/kg/day	Body weight			Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	1 to 15
1101	24.1	23.8	23.5	-0.6
1102	25.5	24.8	25.3	-0.2
1103	26.7	26.3	27.0	0.3
Mean	25.4	25.0	25.3	-0.2
SD	1.3	1.3	1.8	0.5
N	3	3	3	3

Appendix 2. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

300 mg/kg/day	Body weight			Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	1 to 15
1201	26.1	25.8	26.1	0.0
1202	26.1	26.2	26.5	0.4
1203	24.2	25.1	25.2	1.0
Mean	25.5	25.7	25.9	0.5
SD	1.1	0.6	0.7	0.5
N	3	3	3	3

Appendix 2. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

1000 mg/kg/day	Body weight			Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	1 to 15
1301	26.5	22.5	23.5	-3.0
1302	25.8	23.3	24.3	-1.5
1303	24.3	21.8	21.7	-2.6
Mean	25.5	22.5	23.2	-2.4
SD	1.1	0.8	1.3	0.8
N	3	3	3	3

Appendix 2. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

Sex: Female Day(s) Relative to Start Date

30.0 mg/kg/day	Body weight			Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	1 to 15
2001	23.2	23.0	22.7	-0.5
2002	21.7	21.1	20.9	-0.8
2003	22.1	21.8	22.2	0.1
Mean	22.3	22.0	21.9	-0.4
SD	0.8	1.0	0.9	0.5
N	3	3	3	3

Appendix 2. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

Sex: Female Day(s) Relative to Start Date

100 mg/kg/day	Body weight			Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	1 to 15
2101	21.9	21.2	20.7	-1.2
2102	22.7	22.7	22.5	-0.2
2103	22.1	20.9	20.9	-1.2
Mean	22.2	21.6	21.4	-0.9
SD	0.4	1.0	1.0	0.6
N	3	3	3	3

Appendix 2. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

Sex: Female Day(s) Relative to Start Date

300 mg/kg/day	Body weight			Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	1 to 15
2201	22.1	21.8	21.2	-0.9
2202	23.2	22.5	23.0	-0.2
2203	21.3	20.5	19.7	-1.6
Mean	22.2	21.6	21.3	-0.9
SD	1.0	1.0	1.7	0.7
N	3	3	3	3

Appendix 2. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Dose Range-finding Study for Transgenic Mouse Gene Mutation Assay

(Exp. No. [REDACTED])

Sex: Female Day(s) Relative to Start Date

1000 mg/kg/day	Body weight			Final body weight		Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	4	6	1 to 15
2301	21.6	20.0	22.0	.	.	0.4
2302	22.6	.	.	21.4	.	.
2303	23.5	.	.	.	20.0	.
Mean	22.6	20.0	22.0	21.4	20.0	0.4
SD	1.0
N	3	1	1	1	1	1

Appendix 3. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

NC 0 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 31 (Start Date)
3001	Normal	1[BF] to 31[MP]
	Sacrificed	31[MP]
3002	Normal	1[BF] to 31[MP]
	Sacrificed	31[MP]
3003	Normal	1[BF] to 31[MP]
	Sacrificed	31[MP]
3004	Normal	1[BF] to 31[MP]
	Sacrificed	31[MP]
3005	Normal	1[BF] to 31[MP]
	Sacrificed	31[MP]
3006	Normal	1[BF] to 31[MP]
	Sacrificed	31[MP]

Values=Clin Obs Range

NC: Negative Control

BF: Before administration

MP: Manifestation period

PC: Positive Control

Appendix 3. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

75.0 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 31 (Start Date)
3101	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3102	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3103	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3104	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3105	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3106	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]

Values=Clin Obs Range
 NC: Negative Control
 BF: Before administration
 MP: Manifestation period
 PC: Positive Control

Appendix 3. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

150 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 31 (Start Date)
3201	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3202	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3203	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3204	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3205	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3206	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]

Values=Clin Obs Range
 NC: Negative Control
 BF: Before administration
 MP: Manifestation period
 PC: Positive Control

Appendix 3. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER:Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

300 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 31 (Start Date)
3301	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3302	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3303	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3304	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3305	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3306	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3307	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]
3308	Normal Sacrificed	1[BF] to 31[MP] 31[MP]

Values=Clin Obs Range

NC: Negative Control

BF: Before administration

MP: Manifestation period

PC: Positive Control

Appendix 3. Clinical Signs

ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

PC 100 mg/kg/day Sex: Male	Observation Type: All Types	From Day 1 (Start Date) to 31 (Start Date)
3401	Normal	1[BF] to 13[MP]
	Sacrificed	13[MP]
3402	Normal	1[BF] to 13[MP]
	Sacrificed	13[MP]
3403	Normal	1[BF] to 13[MP]
	Sacrificed	13[MP]
3404	Normal	1[BF] to 13[MP]
	Sacrificed	13[MP]
3405	Normal	1[BF] to 13[MP]
	Sacrificed	13[MP]
3406	Normal	1[BF] to 13[MP]
	Sacrificed	13[MP]

Values=Clin Obs Range

NC: Negative Control

BF: Before administration

MP: Manifestation period

PC: Positive Control

Appendix 4. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

NC 0 mg/kg/day	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	22	29	31	1 to 31
3001	26.8	27.8	27.9	28.6	28.9	28.9	2.1
3002	24.7	25.5	25.2	25.8	25.4	25.9	1.2
3003	27.1	28.0	28.6	30.3	30.5	30.7	3.6
3004	26.1	26.3	27.5	27.4	27.3	27.4	1.3
3005	25.8	24.9	25.5	26.3	26.2	26.6	0.8
3006	28.0	28.7	29.0	30.4	29.7	30.7	2.7
Mean	26.4	26.9	27.3	28.1	28.0	28.4	2.0
SD	1.1	1.5	1.6	2.0	2.0	2.1	1.1
N	6	6	6	6	6	6	6

NC: Negative Control

Appendix 4. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

75.0 mg/kg/day	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	22	29	31	1 to 31
3101	27.3	27.2	28.1	27.6	27.5	28.0	0.7
3102	26.1	27.0	26.6	26.5	27.2	27.3	1.2
3103	26.6	27.5	28.1	28.0	28.5	28.3	1.7
3104	25.2	25.1	24.9	25.7	26.1	25.9	0.7
3105	28.1	29.9	29.6	29.3	29.8	29.5	1.4
3106	25.8	26.3	26.3	27.1	27.2	27.5	1.7
Mean	26.5	27.2	27.3	27.4	27.7	27.8	1.2
SD	1.1	1.6	1.7	1.2	1.3	1.2	0.5
N	6	6	6	6	6	6	6

NC: Negative Control

Appendix 4. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

150 mg/kg/day	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Body weight	Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	22	29	31	1 to 31
3201	27.8	27.4	27.8	28.7	28.4	28.8	1.0
3202	26.1	27.0	27.3	27.7	28.4	29.2	3.1
3203	26.8	27.3	27.9	29.1	28.9	28.4	1.6
3204	27.3	28.4	28.1	28.4	27.8	28.7	1.4
3205	25.7	25.8	26.7	27.0	27.1	27.9	2.2
3206	25.0	25.5	25.8	27.0	26.8	26.6	1.6
Mean	26.5	26.9	27.3	28.0	27.9	28.3	1.8
SD	1.0	1.1	0.9	0.9	0.8	0.9	0.7
N	6	6	6	6	6	6	6

NC: Negative Control

Appendix 4. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

300 mg/kg/day	Body weight						Gain
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
	1	8	15	22	29	31	1 to 31
3301	27.3	27.7	27.5	27.7	27.3	27.8	0.5
3302	26.6	28.1	28.2	28.5	28.7	29.4	2.8
3303	25.5	25.0	26.2	26.6	27.7	28.0	2.5
3304	25.1	25.4	25.5	25.9	25.6	26.3	1.2
3305	27.9	27.4	27.5	27.1	26.9	26.8	-1.1
3306	26.2	26.1	26.6	27.8	27.8	28.3	2.1
3307	26.4	26.1	26.3	27.8	28.0	27.7	1.3
3308	25.8	24.8	24.8	24.8	25.5	25.3	-0.5
Mean	26.4	26.3	26.6	27.0	27.2	27.5	1.1
SD	0.9	1.3	1.1	1.2	1.1	1.3	1.4
N	8	8	8	8	8	8	8

NC: Negative Control

Appendix 4. Body Weights

ISOEUGENYL METHYL ETHER: Transgenic Mice Gene Mutation Assay (Exp. No. [REDACTED])

Sex: Male Day(s) Relative to Start Date

PC 100 mg/kg/day	Body weight	
	(g)	(g)
	1	13
3401	27.0	25.8
3402	26.2	24.3
3403	25.3	24.5
3404	28.6	26.0
3405	26.7	24.8
3406	26.0	25.2
Mean	26.6	25.1
SD	1.1	0.7
N	6	6

PC: Positive Control

Appendix 5. Gross findings in the gene mutation assay of ISOEUGENYL METHYL ETHER
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings
Corn oil	0	3001	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3002	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3003	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
Test substance	75.0	3004	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3005	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3006	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
Test substance	75.0	3101	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3102	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3103	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
Test substance	75.0	3104	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3105	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3106	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

-: No remarkable change

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings
Test substance	150	3201	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3202	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3203	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3204	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3205	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3206	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
	300	3301	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3302	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3303	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3304	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3305	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		3306	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
3307		Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -	
3308		Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -	

-: No remarkable change

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings
ENU	100	3401	Sacrificed	13	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3402	Sacrificed	13	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3403	Sacrificed	13	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3404	Sacrificed	13	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3405	Sacrificed	13	Liver	-
					Glandular stomach	-
		3406	Sacrificed	13	Liver	-
					Glandular stomach	-

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

-: No remarkable change

Appendix 6. Historical control data (Transgenic rodent gene mutation assay (*lacZ* assay))

[MutaMouse: male; liver]

Group	n	Mutant frequency [$\times 10^{-6}$] (Mean \pm S.D.)	Range	
			Lower	Upper
Negative control	123	41.6 \pm 12.7	16.7	66.5
Positive control	107	128.4 \pm 38.5	52.9	203.9

[MutaMouse: male; stomach]

Group	n	Mutant frequency [$\times 10^{-6}$] (Mean \pm S.D.)	Range	
			Lower	Upper
Negative control	133	40.0 \pm 12.3	15.9	64.1
Positive control	123	420.1 \pm 81.0	261.3	578.9

Negative control: Including water for injection, 0.5% methylcellulose, corn oil, *etc.*

Positive control: *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU, 100 mg/kg)

The range of each control is 95% confidence interval.

The above historical control data collection period;

Liver: from [REDACTED]

Stomach: from [REDACTED]

Reference data 1 被験物質液の安定性結果

コーン油中イソオイゲニルメチルエーテルの安定性確認

被験物質液 設定濃度 (mg/mL)	測定濃度 (mg/mL)				残存率 (%)
	調製直後 ¹⁾		保管後 ²⁾		
	平均		平均		
1	1.051		1.065		99.8
	1.041	1.036	1.016	1.034	
	1.015		1.020		
100	102.2		104.6		99.5
	103.1	103.5	101.1	103.0	
	105.1		103.2		

1) 真度および併行精度で測定した値

2) 冷蔵遮光 8 日間 (実測温度 : 4.1~7.6°C) + 室温遮光 24 時間保管後 (実測温度 : 19.8~21.1°C)