

# 最終報告書

細菌を用いるペリルアルデヒドの復帰突然変異試験  
【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： 細菌を用いるペリルアルデヒドの復帰突然変異試験

試験番号： [REDACTED]

試験責任者：

[REDACTED] [REDACTED]  
[REDACTED]

目 次

要 約.....	5
1. 表題.....	6
2. 試験目的.....	6
3. 参照したガイドライン.....	6
4. 試験番号.....	6
5. 試験施設.....	6
6. 試験委託者.....	6
7. 試験責任者.....	6
8. 分担責任者.....	6
9. 試験日程.....	7
10. 被験物質.....	7
11. 試験材料および方法.....	9
12. 試験結果.....	16
13. 考察および結論.....	17
14. 試験関係資料の保管.....	18
15. 予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および 試験計画書に従わなかつたこと.....	18

Figures

Figure 1	Dose-finding study of Perillaldehyde [Non-activation method: -S9].....	19
Figure 2	Dose-finding study of Perillaldehyde [Activation method: +S9].....	20
Figure 3	Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA 100.....	21
Figure 4	Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA 1535.....	22
Figure 5	Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain WP2 <i>uvrA</i> .....	23
Figure 6	Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA98.....	24
Figure 7	Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA 1537.....	25
Figure 8	Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA 100 (Additional study).....	26
Figure 9	Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA 1535 (Additional study).....	27
Figure 10	Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain WP2 <i>uvrA</i> (Additional study).....	28

Tables

Table 1	Results of dose-finding study of Perillaldehyde [Non-activation method: -S9].....	29
Table 2	Results of dose-finding study of Perillaldehyde [Activation method: +S9].....	30
Table 3	Results of bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde [Non-activation method: -S9].....	31

Table 4	Results of bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde [Activation method: +S9].....	32
Table 5	Results of bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde (Additional study) [Non-activation method: -S9].....	33
Table 6	Results of bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde (Additional study) [Activation method: +S9].....	34
Appendices		
Appendix 1	Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde (Dose-finding study) [Non-activation method: -S9].....	35
Appendix 2	Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde (Dose-finding study) [Activation method: +S9].....	36
Appendix 3	Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde (Bacterial reverse mutation test) [Non-activation method: -S9].....	37
Appendix 4	Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde (Bacterial reverse mutation test) [Activation method: +S9].....	38
Appendix 5	Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde (Bacterial reverse mutation test: additional study) [Non-activation method: -S9].....	39
Appendix 6	Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde (Bacterial reverse mutation test: additional study) [Activation method: +S9].....	40
Appendix 7	Historical control data (Bacterial reverse mutation test) .....	41

## 要 約

ペリルアルデヒドの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA1535, TA98 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用い復帰突然変異試験を行った。試験は、ラット肝 S9 による代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) および代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の両処理のプレインキュベーション法により行った。

ペリルアルデヒド処理群では、ガイドラインに規定されている最高用量を含む用量 (用量設定試験 : 1.22~5000 µg/プレート, 本試験 : 9.77~1250 µg/プレート, 追加試験 : 2.44~1250 µg/プレート) で試験を実施した。その結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照群の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照物質は、各試験菌株に対し、明確な突然変異誘発作用を示した。

なお、陰性対照群および陽性対照群の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 7) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切に実施されたものと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、ペリルアルデヒドは細菌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

細菌を用いるペリルアルデヒドの復帰突然変異試験

2. 試験目的

被験物質の遺伝子突然変異誘発性を細菌を用いる復帰突然変異試験にて検討する。

3. 参照したガイドライン

- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

4. 試験番号

[REDACTED]

5. 試験施設

[REDACTED]

6. 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

[REDACTED]

7. 試験責任者

[REDACTED]

8. 分担責任者

[REDACTED]

## 9. 試験日程

試験開始日：  
【用量設定試験】  
被験物質処理日：  
コロニー計数日：  
【本試験】  
被験物質処理日：  
コロニー計数日：  
【追加試験】  
被験物質処理日：  
コロニー計数日：  
試験終了日：



## 10. 被験物質

### 10.1. 名称

和名：ペリルアルデヒド

英名：Perillaldehyde

### 10.2. 別名（化学名，一般名等）

4-prop-1-en-2-ylcyclohexene-1-carbaldehyde

### 10.3. 提供元

[REDACTED]

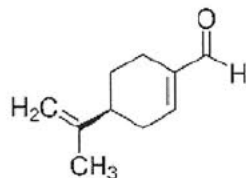
### 10.4. ロット番号

[REDACTED]

### 10.5. CAS No.

2111-75-3

### 10.6. 構造式



### 10.7. 分子式

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O

10.8. 分子量

150.2

10.9. 純度

93.7%

10.10. 比重

0.9679

10.11. 沸点

237°C

10.12. 物質の状態

10.12.1. 外観

無色または僅かに黄色を帯びた透明な液体

10.12.2. 臭い

強いシソのような香気

10.13. 溶解性

水：不溶（試験施設データ）

ジメチルスルホキシド（DMSO）：50 mg/mL 以上で溶解（試験施設データ）

10.14. 保管条件

室温，密閉

10.15. 取り扱い上の注意

火気厳禁

マスク，手袋，保護メガネを着用する。

10.16. 残余被験物質の処理

関連する試験が終了した後，被験物質等管理責任者へ返却する。

## 11. 試験材料および方法

### 11.1. 試験菌株

試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100 株	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1535 株	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i> 株	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98 株	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1537 株	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)

### 11.2. 培地の調製

#### 11.2.1. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

テスメディア AN 培地 ([REDACTED] 製造, Lot No. [REDACTED] [用量設定試験], [REDACTED] 製造, Lot No. [REDACTED] [本試験], [REDACTED] 製造, Lot No. [REDACTED] [追加試験], オリエンタル酵母工業) を試験に使用した。

#### 11.2.2. トップアガー

0.5 w/v%塩化ナトリウム/0.6 w/v%寒天水溶液をオートクレーブで滅菌した。この寒天水溶液 10 容量に、ネズミチフス菌を用いる試験の場合は、0.5 mmol/L L-ヒスチジン/0.5 mmol/L D-ビオチン水溶液 1 容量を加え、大腸菌を用いる試験の場合は、0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液 1 容量を加えた。

### 11.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. [REDACTED] Oxoid) 培養液 25 mL を分注し、これに融解した菌懸濁液 50  $\mu$ L を接種した。フラスコをクールバスシェーカーに設置し、培養開始までの間、設定温度 4°C で静置した。その後、37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験ごとに菌株を培養し、培養終了後、使用まで室温にて保管した。

分光光度計を用いて 600 nm の濁度 (OD) を測定し、試験菌株の生菌数が  $1.0 \times 10^9$  細胞/mL 以上であることを確認した。生菌数を次の表に示す。

試験	生菌数 ( $\times 10^9$ 細胞/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.32	3.04	5.65	3.80	2.20
本試験	3.11	2.84	5.24	3.75	2.07
追加試験	3.20	3.00	5.65	-	-

11.4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のS9 mix (エームテスト用S9/コファクターAセット:オリエンタル酵母工業)を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー(設定値:-80°C)中に保管した。

11.4.1. S9の調製方法

S9調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示す。

S9ロット番号	[REDACTED]	
製造年月日	[REDACTED]	
	(誘導物質投与開始後5日目)	
使用動物	ラット: Sprague-Dawley系	
性/週齢	雄/7週齢	
体重 (Mean±S.D.)	209.7±9.3 g	216.6±8.8 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量および投与回数	PB :      30 mg/kg    1回 (1日目) 60 mg/kg    3回 (2~4日目) BF :      80 mg/kg    1回 (3日目)	
投与経路	腹腔内投与	
蛋白含量	19.1 mg/mL	18.8 mg/mL

11.4.2. S9 mixの調製および組成

補酵素液(コファクターA, Lot No. [REDACTED]) 9 mL に対し S9 1 mL の割合で混合した。

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

S9	0.1	mL
MgCl <sub>2</sub>	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

## 11.5. 被験物質液

### 11.5.1. 被験物質液の調製

被験物質は水に不溶で DMSO に可溶であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (スペクトル用, Lot No. [REDACTED] ナカライテスク) に溶解させた。調製時に純度補正を実施し、以降の被験物質液の濃度および用量は、補正後の値とした。

用量設定試験では、被験物質 320 mg (純度補正量 300 mg, 純度 93.7%) を量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO を適量加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 6 mL に定容し、調製原液 (50.0 mg/mL 液) を準備した。DMSO 4.5 mL に、この 50.0 mg/mL 調製原液 1.5 mL を加えることにより、12.5 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、3.13, 0.781, 0.195, 0.0488 および 0.0122 mg/mL 液を調製した。

本試験では、被験物質 107 mg (純度補正量 100 mg, 純度 93.7%) を量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO を適量加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 8 mL に定容し、調製原液 (12.5 mg/mL 液) を準備した。DMSO 4 mL に、この 12.5 mg/mL 調製原液 4 mL を加えることにより、6.25 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195 および 0.0977 mg/mL 液を調製した。

追加試験では、被験物質 107 mg (純度補正量 100 mg, 純度 93.7%) を量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO を適量加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 8 mL に定容し、調製原液 (12.5 mg/mL 液) を準備した。DMSO 4 mL に、この 12.5 mg/mL 調製原液 4 mL を加えることにより、6.25 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488 および 0.0244 mg/mL 液を調製した。

被験物質液は、それぞれ用時調製された。

### 11.5.2. 残余被験物質液の処分

専用の容器に廃棄した。

## 11.6. 対照群

### 11.6.1. 陰性対照

被験物質液調製に用いた溶媒である DMSO を使用した。

### 11.6.2. 陽性対照

あらかじめ [REDACTED] で調製された以下に示す陽性対照物質溶液を試験に使用した。調製後、各調製液を凍結 (設定値:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) 保管し、有効性が確認されている期間 (1年7ヵ月) 以内のものを試験に用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド  
NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム  
9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩  
2-AA : 2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

AF-2	0.01	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
NaN <sub>3</sub>	0.5	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA1535)
AF-2	0.01	μg/プレート	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i> )
AF-2	0.1	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA98)
9-AA	80	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA1537)

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

2-AA	1	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
2-AA	2	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA1535)
2-AA	10	μg/プレート	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i> )
2-AA	0.5	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA98)
2-AA	2	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA1537)

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

## 11.7. 無菌試験

被験物質液(調製原液)ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトッパアガー 2 mL を添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

ペリルアルデヒド調製原液および S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

## 11.8. 用量設定試験(予備試験)

### 11.8.1. 用量

用量設定試験における被験物質の用量として、1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250 および 5000 μg/プレートの 7 用量を設定した。

#### 11.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

試験菌株ごとに色分けした油性インクを用いて、蓋に S9 mix の有無、用量等を明記することにより各プレートを識別した。

#### 11.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100  $\mu$ L、次いで、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合は、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500  $\mu$ L を、代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合は、S9 mix 500  $\mu$ L を分注した。さらに、前培養した試験菌株懸濁液 100  $\mu$ L を加えた後、ウォーターバスシェーカーを用いて、37°C、120 回/分の条件で、20 分間振盪した (プレインキュベーション)。振盪終了後、トップアガー 2 mL を添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ、一様に広げた。恒温器を用い、各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した。培養終了後、コロニー数計測時まで各プレートを冷蔵保管した。

#### 11.8.4. 被験物質の沈殿等の観察

各処理法において、処理開始時およびコロニー数計測時に沈殿等の有無を肉眼で観察した。

#### 11.8.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 (40 倍) を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニー数を計測した。計測に際しては、コロニーアナライザーを用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。ただし、両処理の TA98 および TA1537 株の 313  $\mu$ g/プレート以上ならびにその他の 3 菌株の 1250  $\mu$ g/プレート以上では、強度の生育阻害作用によりコロニーアナライザーの使用が不適切であったため、目視でコロニー数を計数した。

### 11.9. 本試験

#### 11.9.1. 用量

用量設定試験の結果、いずれの菌株においても、陰性対照群と比較して、2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌株に対する生育阻害作用は、両処理の TA100, TA1535 および WP2uvrA 株の 1250  $\mu$ g/プレート以上ならびに TA98 および TA1537 株の 313  $\mu$ g/プレート以上で観察された。

コロニー数計測時、両処理の 1250  $\mu$ g/プレート以上において被験物質の沈殿が認められた。したがって、本試験における被験物質の用量として、生育阻害作用が認められると考えられる用量を最高用量として、以下に示す 6 用量を設定した。

## 《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA1535	39.1	78.1	156	313	625	1250
WP2 <i>uvrA</i>	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA98	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313

## 《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA1535	39.1	78.1	156	313	625	1250
WP2 <i>uvrA</i>	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA98	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313

## 11.9.2. 使用プレート数および識別方法

11.8.2.に記載した方法に準じた。

## 11.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

11.8.3.に記載した方法に準じた。ただし、培養終了後、各プレートの冷蔵保管は実施しなかった。

## 11.9.4. 被験物質の沈殿等の観察

11.8.4.に記載した方法に準じた。

## 11.9.5. コロニー数計測

11.8.5.に記載した方法に準じた。ただし、-S9 処理、TA100、TA1535 および WP2*uvrA* 株の 313 μg/プレート以上、TA98 および TA1537 株の 313 μg/プレートならびに+S9 処理、TA100 および TA1535 株の 313 μg/プレート以上、TA98 および TA1537 株の 313 μg/プレート、WP2*uvrA* 株の 625 μg/プレート以上では、強度の生育阻害作用によりコロニーアナライザーの使用が不適切であったため、目視でコロニー数を計数した。

## 11.10. 追加試験

本試験の結果、-S9 および+S9 処理の TA100、TA1535 および WP2*uvrA* 株において、低用量まで菌株に対する生育阻害作用が認められ、評価に必要な用量が確保できなかったことから、当該菌株についてのみ追加試験を実施した。

## 11.10.1. 用量

用量設定試験および本試験の結果を基に、生育阻害を示すと考えられる用量を最高用量とし、以下に示す 10 用量を設定した。

## 《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)									
TA100	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA1535	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250
WP2 <sub>uvrA</sub>	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250

## 《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)									
TA100	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA1535	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250
WP2 <sub>uvrA</sub>	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250

## 11.10.2. 使用プレート数および識別方法

11.8.2.に記載した方法に準じた。

## 11.10.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

11.8.3.に記載した方法に準じた。

## 11.10.4. 被験物質の析出等の観察

11.8.4.に記載した方法に準じた。

## 11.10.5. コロニー数計測

11.8.5.に記載した方法に準じた。ただし、-S9 処理、TA100、TA1535 および WP2<sub>uvrA</sub> 株の 313 μg/プレート以上ならびに+S9 処理、TA100 および TA1535 株の 313 μg/プレート以上、WP2<sub>uvrA</sub> 株の 625 μg/プレート以上では、強度の生育阻害作用によりコロニーアナライザーの使用が不適切であったため、目視でコロニー数を計数した。

## 11.11. 試験成立条件

- a) 陰性対照群および陽性対照群の平均復帰変異コロニー数は、背景データから求めた基準値内であること。
- b) 陽性対照群の平均復帰変異コロニー数は、陰性対照群の平均復帰変異コロニー数の 2 倍を超えること。

上記の条件を満たした場合に、試験は成立したと判断した。

## 11.12. 結果の解析

復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

## 12. 試験結果

### 12.1. 用量設定試験（予備試験）

#### 12.1.1. 試験結果

試験結果を Figure 1, 2, Table 1, 2 および Appendix 1, 2 に示す。

ペリルアルデヒド処理群では、いずれの菌株においても、陰性対照群と比較して、2倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

菌株に対する生育阻害作用は、両処理の TA100, TA1535 および WP2 $uvrA$  株の 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上ならびに TA98 および TA1537 株の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で観察された。

陽性対照物質は、各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

#### 12.1.2. 被験物質の沈殿等

処理開始およびコロニー数計測時、両処理の 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上において被験物質の沈殿が認められた。

### 12.2. 本試験

#### 12.2.1. 試験結果

試験結果を Figure 3~7, Table 3, 4 および Appendix 3, 4 に示す。

ペリルアルデヒド処理群では、いずれの菌株においても、陰性対照群と比較して、2倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

菌株に対する生育阻害作用は、両処理の TA100, TA1535 および WP2 $uvrA$  株の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上ならびに TA98 および TA1537 株の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で観察された。

陽性対照物質は、各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

#### 12.2.2. 被験物質の沈殿等

処理開始およびコロニー数計測時、両処理の 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ において被験物質の沈殿が認められた。

### 12.3. 追加試験

#### 12.3.1. 試験結果

試験結果を Figure 8~10, Table 5, 6 および Appendix 5, 6 に示す.

ペリルアルデヒド処理群では、いずれの菌株においても、陰性対照群と比較して、2倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった.

菌株に対する生育阻害作用は、両処理の TA100, TA1535 および WP2*uvrA* 株の 313 µg/プレート以上で観察された.

陽性対照物質は、各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した.

#### 12.3.2. 被験物質の沈殿等

処理開始およびコロニー数計測時、両処理の 1250 µg/プレートにおいて被験物質の沈殿が認められた.

### 13. 考察および結論

ペリルアルデヒドの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA1535, TA98 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2*uvrA* 株を用いてプレインキュベーション法により代謝活性化系 (ラット肝 S9) の存在下および非存在下の両条件下で復帰突然変異試験を実施した.

ペリルアルデヒド処理群では、ガイドラインに規定されている最高用量を含む用量 (用量設定試験: 1.22~5000 µg/プレート, 本試験: 9.77~1250 µg/プレート, 追加試験: 2.44~1250 µg/プレート) で試験を実施した. その結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照群の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった.

陽性対照物質は、各試験菌株に対し、明確な突然変異誘発作用を示した.

なお、陰性対照群および陽性対照群の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 7) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切に実施されたものと判断された.

以上の結果から、当該試験条件下において、ペリルアルデヒドの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定された.

14. 試験関係資料の保管

当該試験の試験関係資料は、[REDACTED] 資料保存施設にて Muta™ Mouse を用いるペリルアルデヒドの遺伝子突然変異試験 [試験番号 [REDACTED]] の最終報告書作成後 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。

15. 予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかつたこと

該当する事項はなかつた。

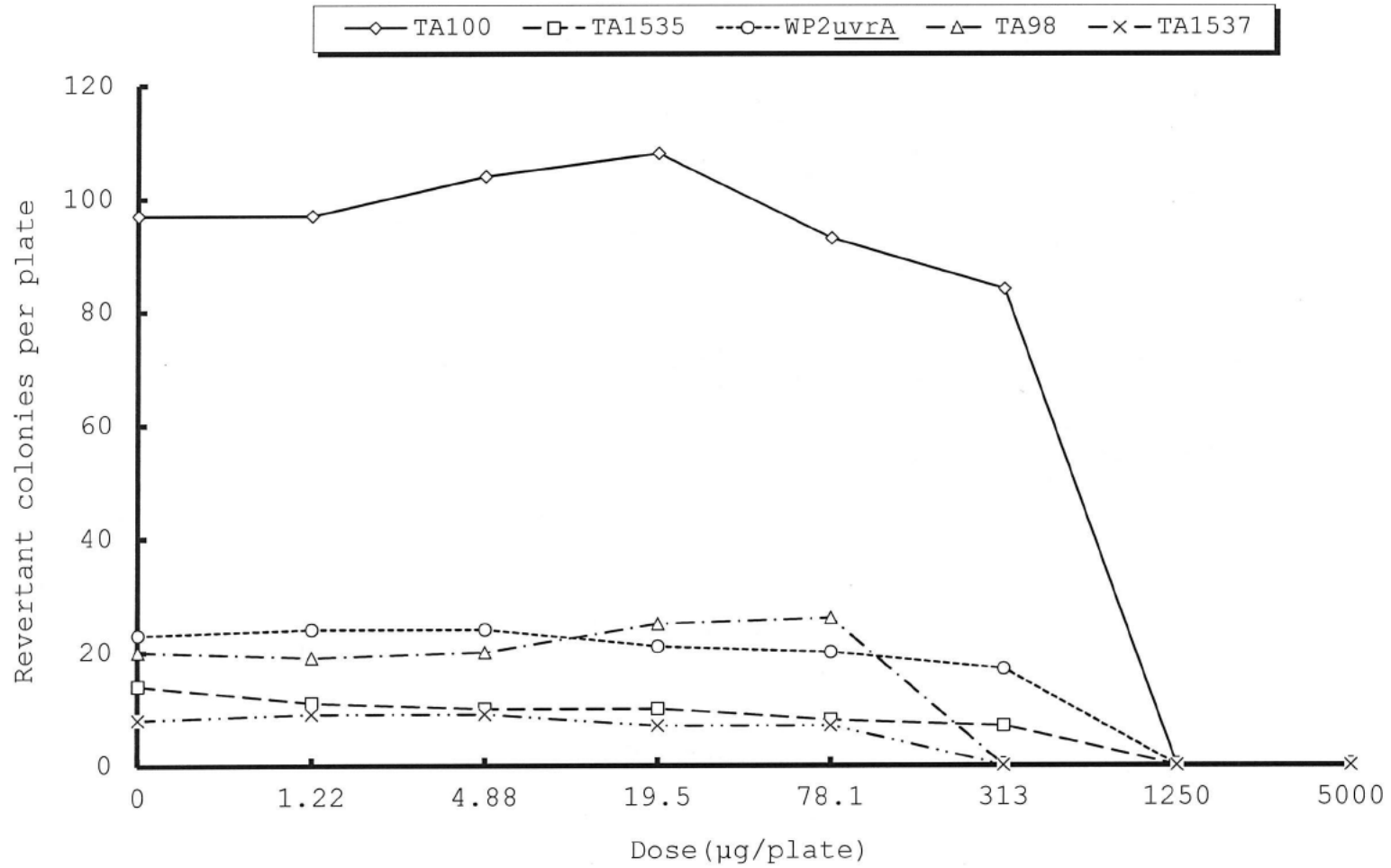


Figure 1. Dose-finding study of Perillaldehyde [Non-activation method: -S9]

Exp. No. [REDACTED]

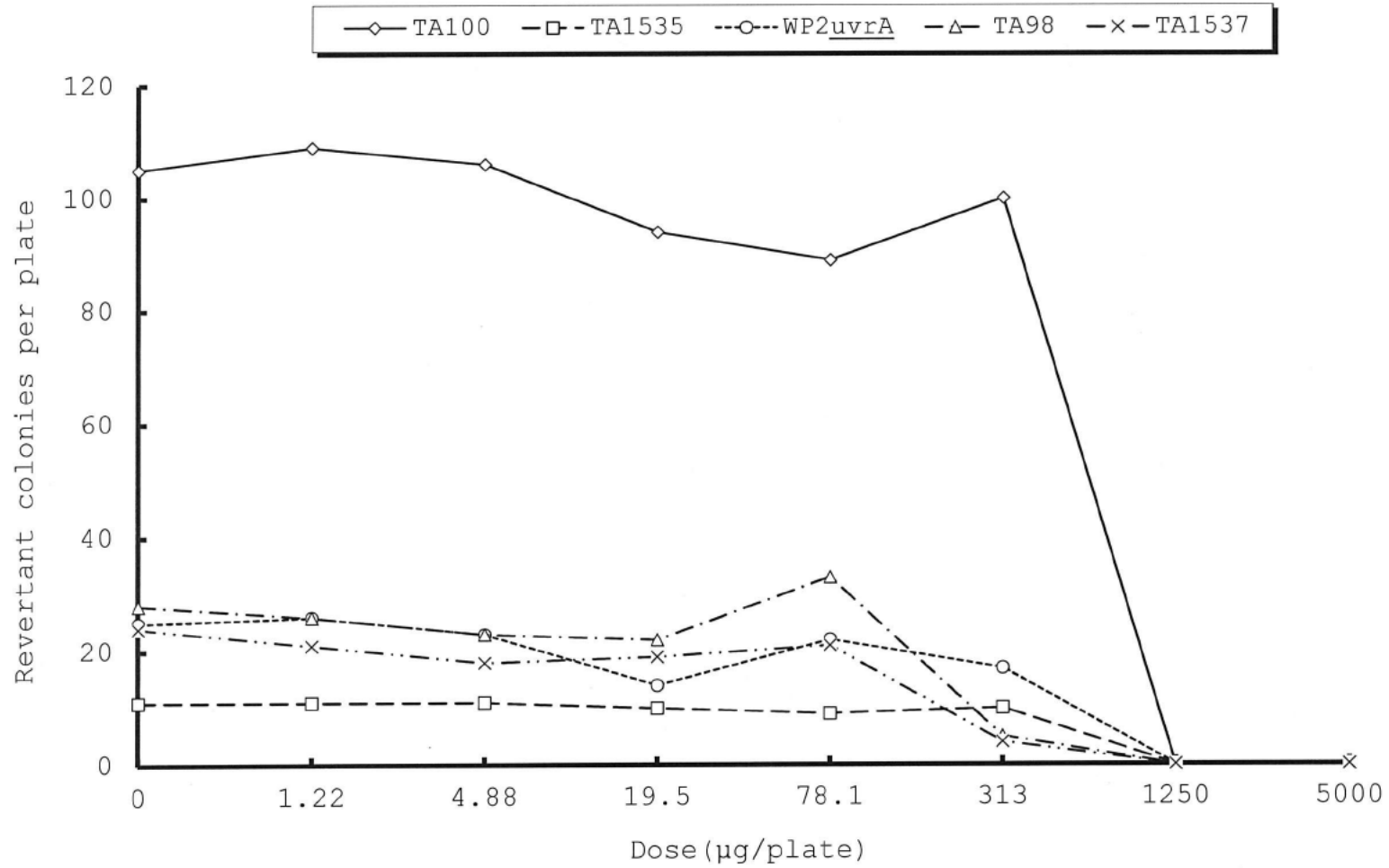


Figure 2. Dose-finding study of Perillaldehyde [Activation method: +S9]

Exp. No. [REDACTED]

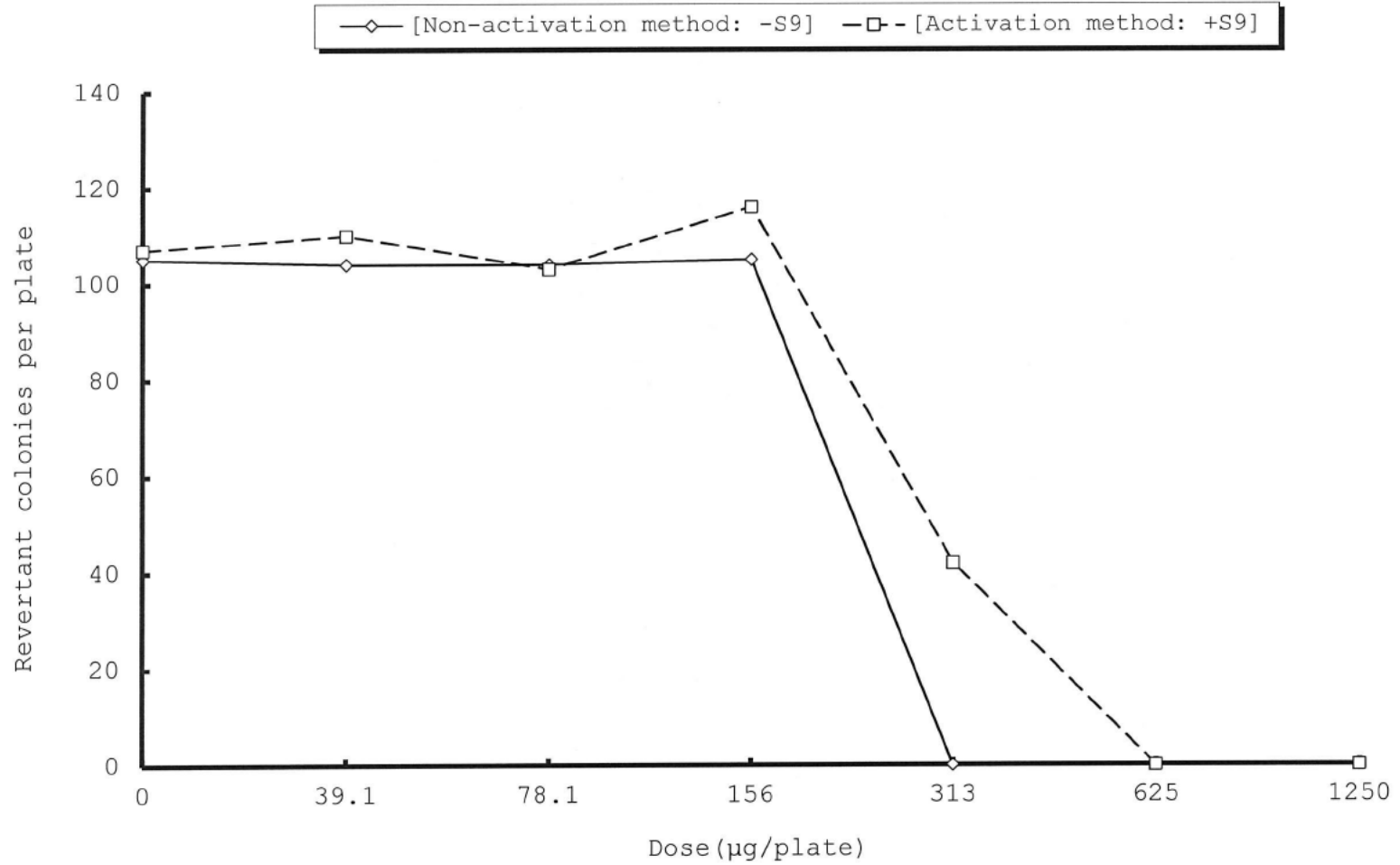


Figure 3. Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA100

Exp. No. [REDACTED]

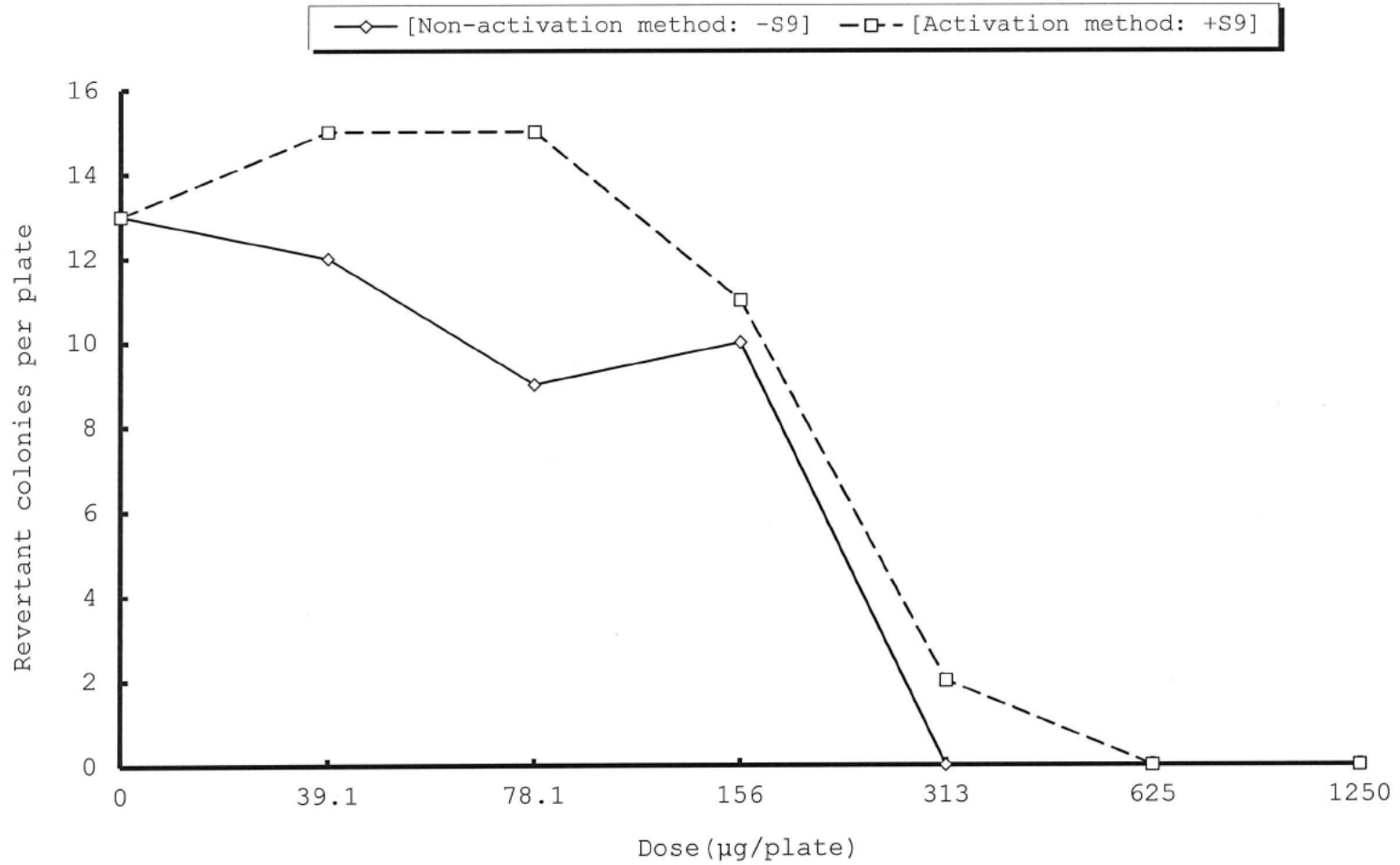


Figure 4. Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA1535

Exp. No. [REDACTED]

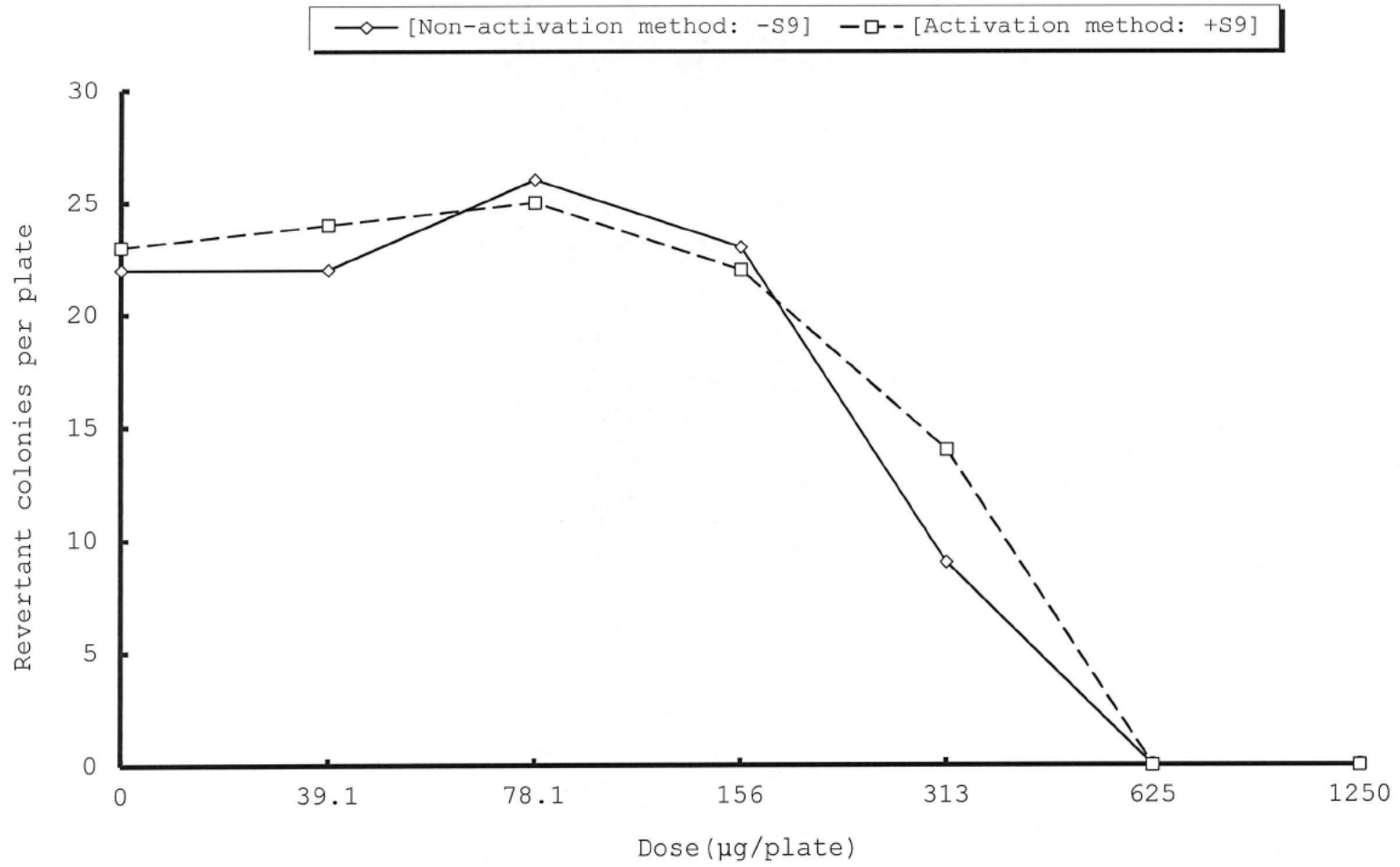


Figure 5. Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain WP2uvrA

Exp. No. [REDACTED]

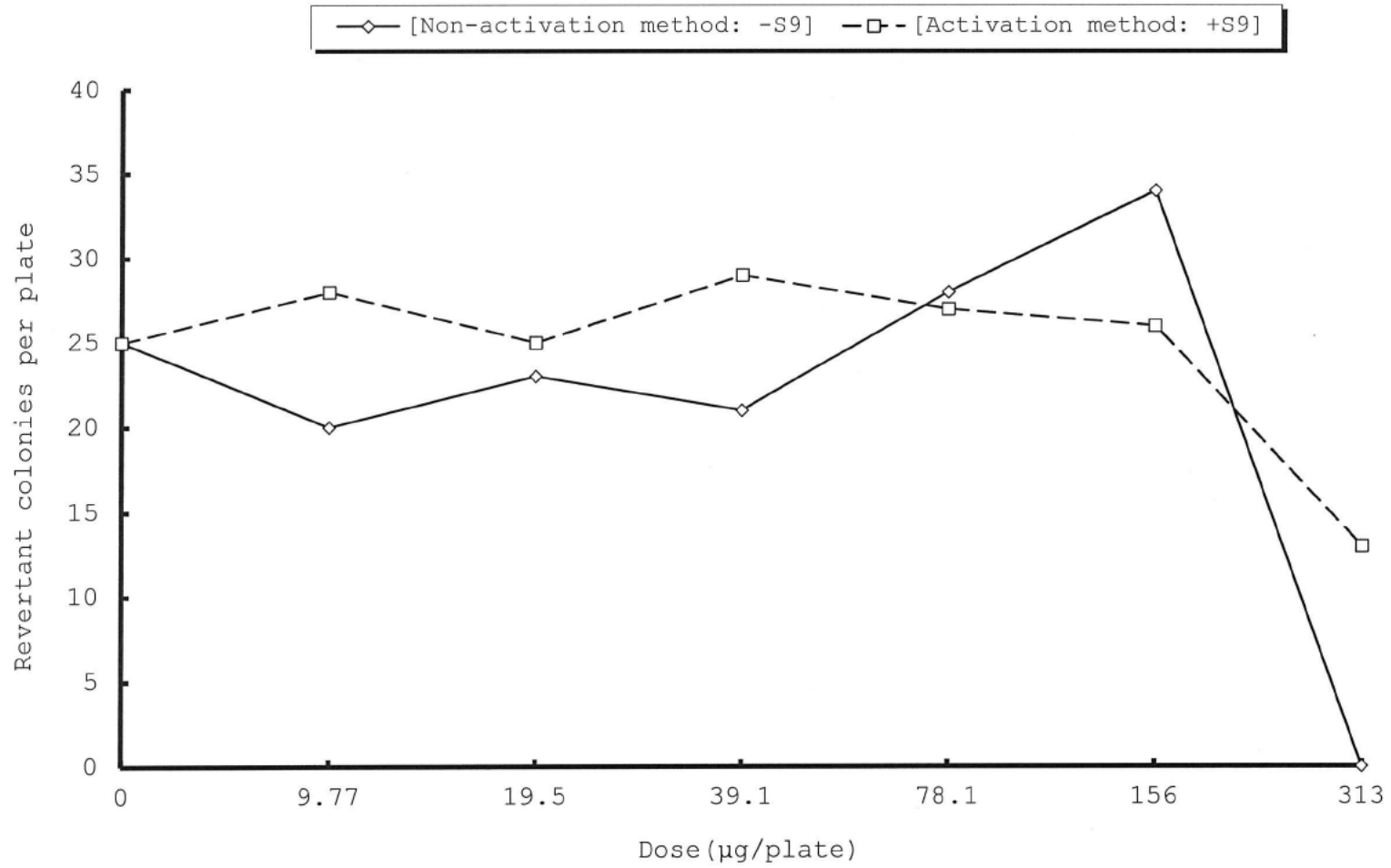


Figure 6. Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA98

Exp. No. [REDACTED]

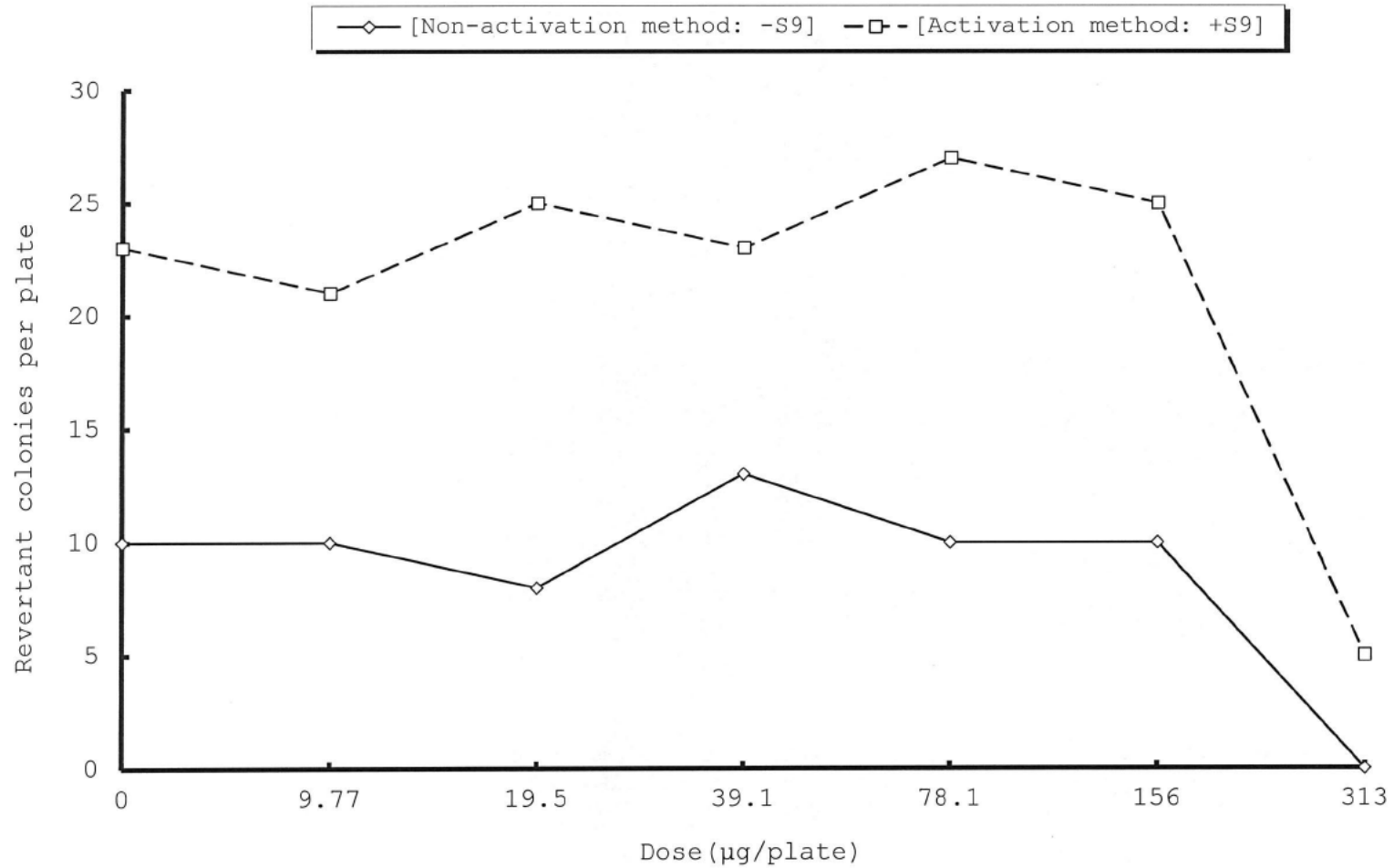


Figure 7. Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA1537

Exp. No. [REDACTED]

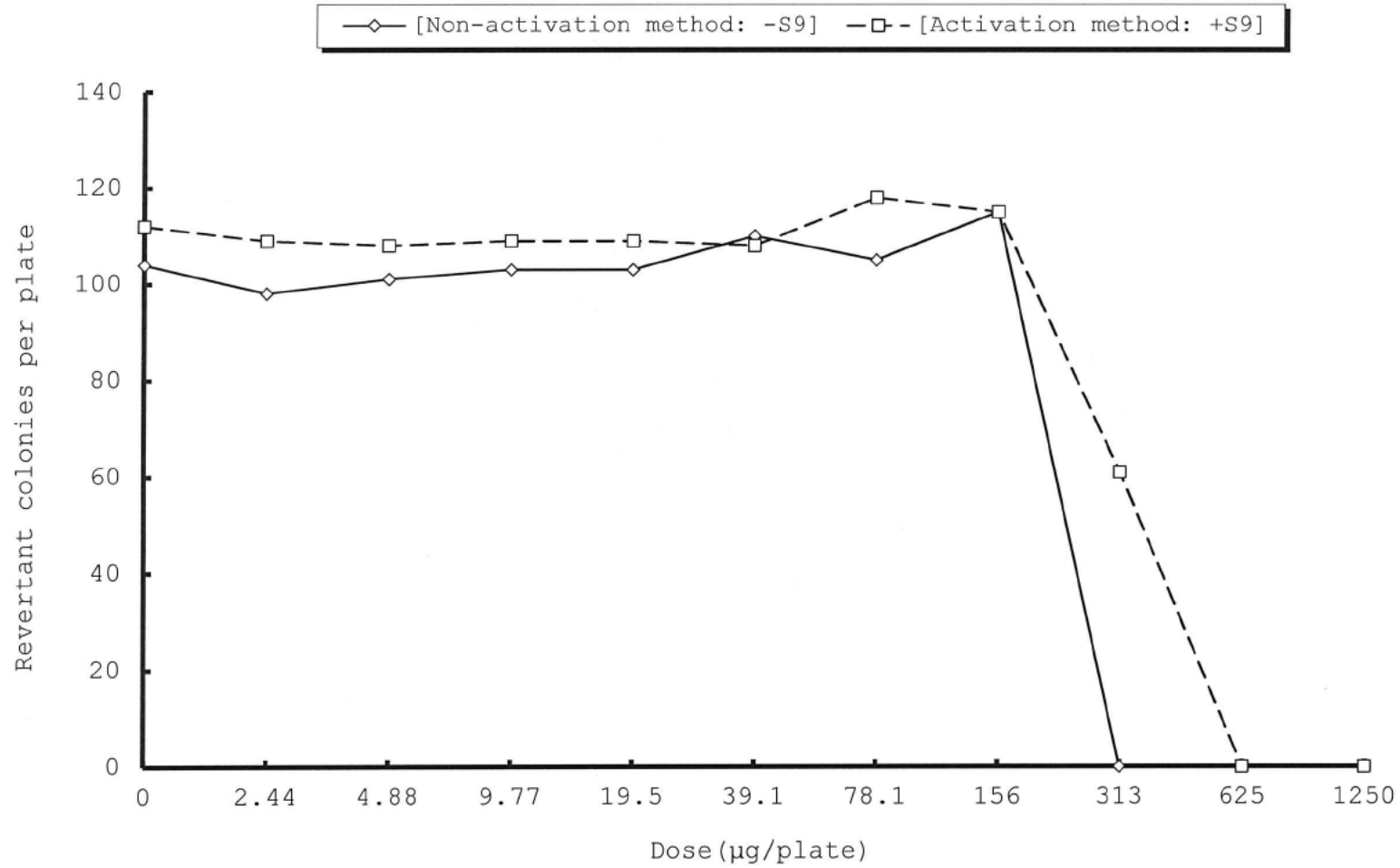


Figure 8. Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA100 (Additional study)

Exp. No. [REDACTED]

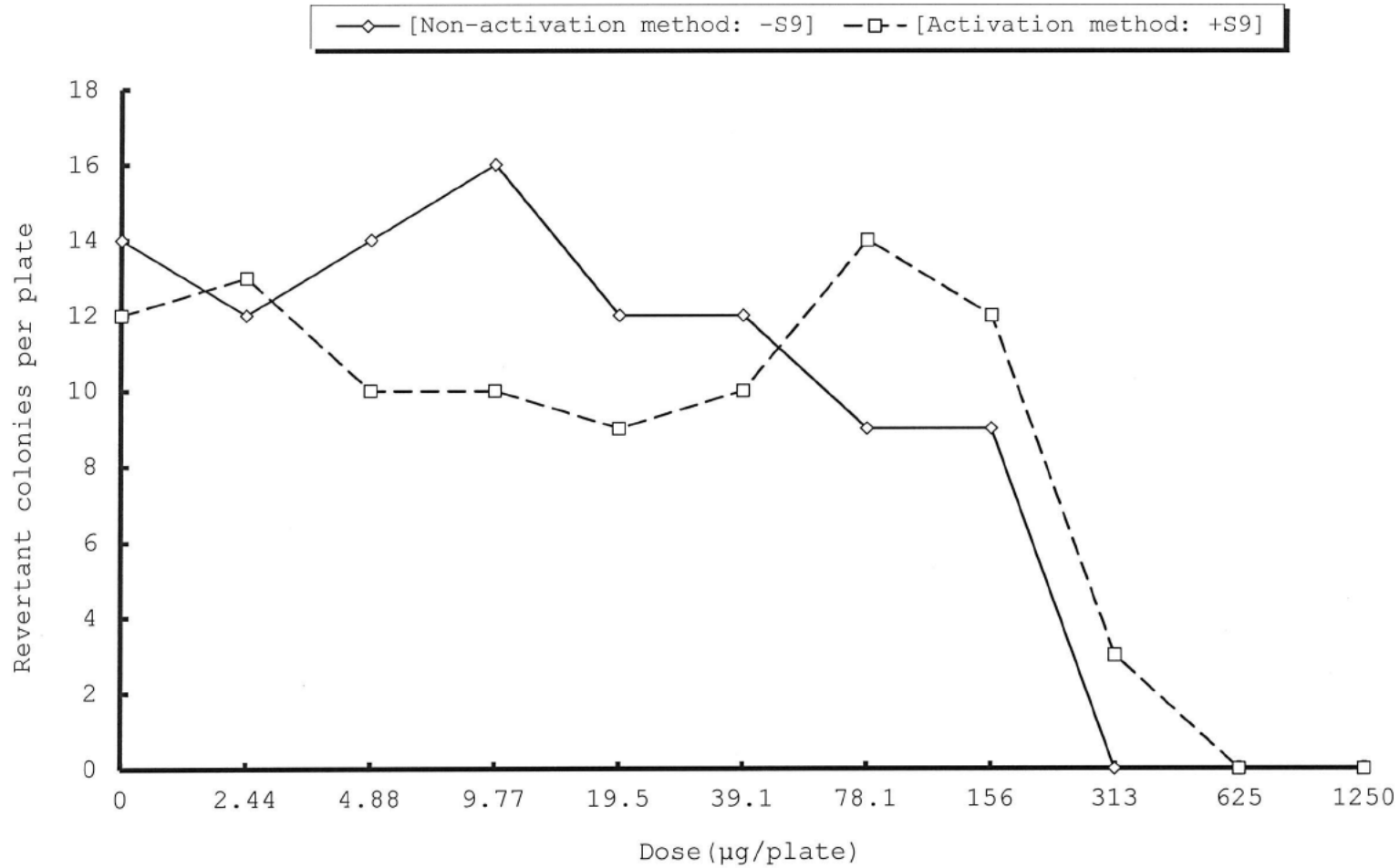


Figure 9. Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain TA1535 (Additional study)

Exp. No. [REDACTED]

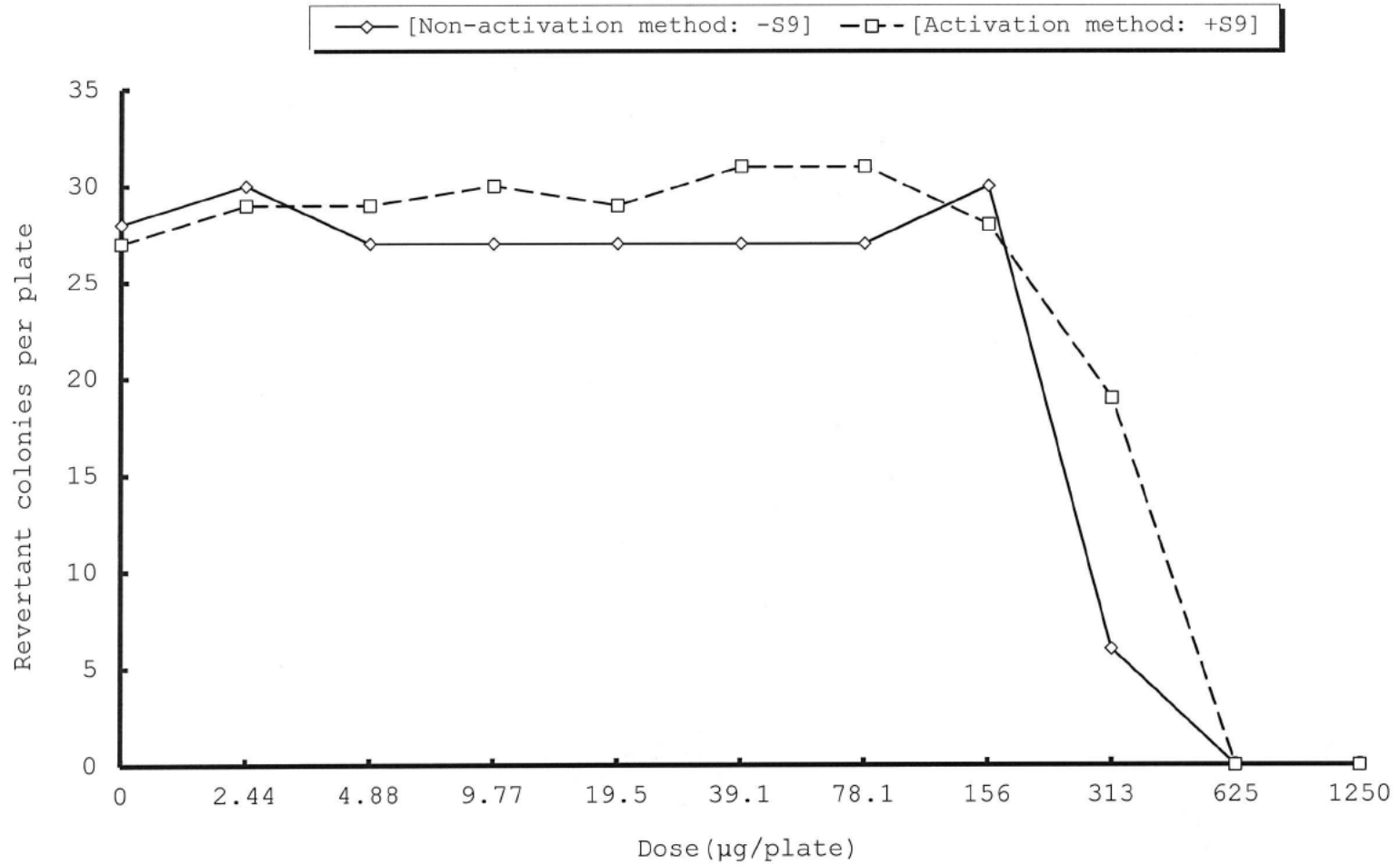


Figure 10. Bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde in strain WP2uvrA (Additional study)

Exp. No. [REDACTED]

Table 1. Results of dose-finding study of Perillaldehyde  
[Non-activation method: -S9]

Substance	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
DMSO	0	97 $\pm$ 7	14 $\pm$ 1	23 $\pm$ 4	20 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1
Perillaldehyde	1.22	97 $\pm$ 6	11 $\pm$ 3	24 $\pm$ 3	19 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2
	4.88	104 $\pm$ 12	10 $\pm$ 2	24 $\pm$ 5	20 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2
	19.5	108 $\pm$ 12	10 $\pm$ 3	21 $\pm$ 4	25 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3
	78.1	93 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	20 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4	7 $\pm$ 1
	313	84 $\pm$ 9	7 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
	1250 +	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
	5000 +	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
Positive control substance		AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0.01	0.5	0.01	0.1	80
Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate		538 $\pm$ 4	469 $\pm$ 25	91 $\pm$ 4	646 $\pm$ 6	195 $\pm$ 13

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

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

NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Exp. No. XXXXXXXXXXTable 2. Results of dose-finding study of Perillaldehyde  
[Activation method: +S9]

Substance	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
DMSO	0	105 $\pm$ 5	11 $\pm$ 2	25 $\pm$ 4	28 $\pm$ 5	24 $\pm$ 6
Perillaldehyde	1.22	109 $\pm$ 11	11 $\pm$ 2	26 $\pm$ 5	26 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3
	4.88	106 $\pm$ 6	11 $\pm$ 4	23 $\pm$ 2	23 $\pm$ 6	18 $\pm$ 4
	19.5	94 $\pm$ 13	10 $\pm$ 0	14 $\pm$ 3	22 $\pm$ 5	19 $\pm$ 5
	78.1	89 $\pm$ 17	9 $\pm$ 1	22 $\pm$ 3	33 $\pm$ 4	21 $\pm$ 2
	313	100 $\pm$ 11	10 $\pm$ 2	17 $\pm$ 5	5 $\pm$ 2 *	4 $\pm$ 2 *
	1250 +	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
	5000 +	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
Positive control substance		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1	2	10	0.5	2
Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate		893 $\pm$ 61	316 $\pm$ 9	678 $\pm$ 36	358 $\pm$ 22	185 $\pm$ 5

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

2-AA: 2-Aminoanthracene

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde  
 [Non-activation method: -S9]

Substance	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
DMSO	0	105 $\pm$ 9	13 $\pm$ 2	22 $\pm$ 0	25 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2
Perillaldehyde	9.77	-	-	-	20 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2
	19.5	-	-	-	23 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3
	39.1	104 $\pm$ 7	12 $\pm$ 2	22 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3	13 $\pm$ 1
	78.1	104 $\pm$ 11	9 $\pm$ 2	26 $\pm$ 5	28 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2
	156	105 $\pm$ 8	10 $\pm$ 3	23 $\pm$ 4	34 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1
	313	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	9 $\pm$ 3 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
	625	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	-	-
	1250 +	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	-	-
Positive control substance		AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0.01	0.5	0.01	0.1	80
Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate		576 $\pm$ 14	476 $\pm$ 17	114 $\pm$ 3	631 $\pm$ 32	199 $\pm$ 2

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

-: Not tested

Table 4. Results of bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde  
[Activation method: +S9]

Substance	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
DMSO	0	107 $\pm$ 12	13 $\pm$ 2	23 $\pm$ 1	25 $\pm$ 4	23 $\pm$ 2
Perillaldehyde	9.77	-	-	-	28 $\pm$ 4	21 $\pm$ 1
	19.5	-	-	-	25 $\pm$ 3	25 $\pm$ 3
	39.1	110 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2	24 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1	23 $\pm$ 4
	78.1	103 $\pm$ 8	15 $\pm$ 2	25 $\pm$ 3	27 $\pm$ 5	27 $\pm$ 1
	156	116 $\pm$ 12	11 $\pm$ 0	22 $\pm$ 2	26 $\pm$ 3	25 $\pm$ 2
	313	42 $\pm$ 6 *	2 $\pm$ 2 *	14 $\pm$ 1 *	13 $\pm$ 3 *	5 $\pm$ 2 *
	625	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	-	-
	1250 +	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	-	-
Positive control substance		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1	2	10	0.5	2
Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate		873 $\pm$ 30	266 $\pm$ 18	763 $\pm$ 30	381 $\pm$ 11	207 $\pm$ 10

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

2-AA: 2-Aminoanthracene

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

-: Not tested

Exp. No. XXXXXXXXXXTable 5. Results of bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde(Additional study)  
[Non-activation method: -S9]

Substance	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate		
		TA100	TA1535	WP2uvrA
DMSO	0	104 $\pm$ 7	14 $\pm$ 1	28 $\pm$ 2
Perillaldehyde	2.44	98 $\pm$ 7	12 $\pm$ 5	30 $\pm$ 6
	4.88	101 $\pm$ 10	14 $\pm$ 2	27 $\pm$ 3
	9.77	103 $\pm$ 10	16 $\pm$ 3	27 $\pm$ 5
	19.5	103 $\pm$ 6	12 $\pm$ 4	27 $\pm$ 3
	39.1	110 $\pm$ 9	12 $\pm$ 1	27 $\pm$ 3
	78.1	105 $\pm$ 13	9 $\pm$ 3	27 $\pm$ 6
	156	115 $\pm$ 5	9 $\pm$ 3	30 $\pm$ 2
	313	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	6 $\pm$ 3 *
	625	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
	1250 +	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
Positive control substance		AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2
Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0.01	0.5	0.01
Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate		594 $\pm$ 38	552 $\pm$ 11	108 $\pm$ 7

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 6. Results of bacterial reverse mutation test of Perillaldehyde(Additional study)  
[Activation method: +S9]

Substance	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate		
		TA100	TA1535	WP2uvrA
DMSO	0	112 $\pm$ 5	12 $\pm$ 2	27 $\pm$ 3
Perillaldehyde	2.44	109 $\pm$ 9	13 $\pm$ 1	29 $\pm$ 2
	4.88	108 $\pm$ 11	10 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1
	9.77	109 $\pm$ 11	10 $\pm$ 4	30 $\pm$ 8
	19.5	109 $\pm$ 12	9 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3
	39.1	108 $\pm$ 9	10 $\pm$ 1	31 $\pm$ 2
	78.1	118 $\pm$ 3	14 $\pm$ 2	31 $\pm$ 4
	156	115 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	28 $\pm$ 1
	313	61 $\pm$ 7 *	3 $\pm$ 2 *	19 $\pm$ 2 *
	625	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
	1250 +	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 *
Positive control substance		2-AA	2-AA	2-AA
Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1	2	10
Mean $\pm$ S.D. revertant colonies per plate		1105 $\pm$ 39	234 $\pm$ 24	759 $\pm$ 22

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

2-AA: 2-Aminoanthracene

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Exp. No. [REDACTED]

Appendix 1. Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde  
(Dose-finding study) [Non-activation method: -S9]

Substance	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate									
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
DMSO	0	98	89	15	13	26	19	22	20	7	9
		103		13		23		19		7	
Perillaldehyde	1.22	93	93	8	10	27	24	18	18	8	11
		104		14		22		21		7	
	4.88	118	96	10	9	20	22	21	18	11	8
		98		12		29		22		9	
	19.5	99	104	13	10	25	21	21	24	7	4
		122		7		18		29		10	
	78.1	89	94	8	10	17	18	30	26	7	8
		95		6		25		22		6	
	313	74	86	7	5	14	16	0*	0*	0*	0*
		91		8		20		0*		0*	
	1250 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		0*		0*		0*	
	5000 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		0*		0*		0*	
Positive control substance		AF-2		NaN <sub>3</sub>		AF-2		AF-2		9-AA	
Dose (µg/plate)		0.01		0.5		0.01		0.1		80	
Revertant colonies per plate		534	538	443	471	93	94	644	642	190	185
		542		492		86		653		210	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Exp. No. XXXXXXXXXX

Appendix 2. Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde  
(Dose-finding study) [Activation method: +S9]

Substance	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate									
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
DMSO	0	99	108	9	11	28	27	32	22	29	27
		108		12		20		30		17	
Perillaldehyde	1.22	113	117	12	9	24	31	24	26	17	22
		97		12		22		28		23	
	4.88	102	103	8	15	20	24	26	17	22	14
		112		11		24		27		19	
	19.5	109	85	10	10	17	11	28	20	22	13
		88		10		15		19		22	
	78.1	103	70	9	8	24	23	33	37	20	23
		95		9		18		30		19	
	313	108	88	12	10	15	14	8*	4*	5*	2*
		104		9		23		4*		5*	
	1250 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		0*		0*		0*	
	5000 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		0*		0*		0*	
Positive control substance		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA	
Dose (µg/plate)		1		2		10		0.5		2	
Revertant colonies per plate		831	894	327	309	691	638	354	382	181	190
		953		313		706		339		184	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

2-AA: 2-Aminoanthracene

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Exp. No. [REDACTED]

Appendix 3. Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde  
(Bacterial reverse mutation test) [Non-activation method: -S9]

Substance	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate									
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
DMSO	0	115	101	16	12	22	22	24	24	8	12
		99		12		22		27		9	
Perillaldehyde	9.77	-	-	-	-	-	-	20	19	9	12
		-	-	-	-	-	-	22		9	
	19.5	-	-	-	-	-	-	27	21	11	9
		-	-	-	-	-	-	22		5	
	39.1	112	99	12	14	24	20	17	23	14	13
		100		11		23		23		13	
	78.1	116	99	8	8	20	28	30	30	12	11
		96		11		29		25		8	
	156	97	105	8	8	26	25	36	31	11	9
		112		13		19		35		9	
	313	0*	0*	0*	0*	6*	10*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		11*		0*		0*	
	625	0*	0*	0*	0*	0*	0*	-	-	-	-
		0*		0*		0*		-		-	
	1250 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	-	-	-	-
		0*		0*		0*		-		-	
Positive control substance		AF-2		NaN <sub>3</sub>		AF-2		AF-2		9-AA	
Dose (µg/plate)		0.01		0.5		0.01		0.1		80	
Revertant colonies per plate		564	591	463	495	115	110	595	645	197	198
		573		471		116		654		201	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

-: Not tested

Exp. No. XXXXXXXXXX

Appendix 4. Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde  
(Bacterial reverse mutation test) [Activation method: +S9]

Substance	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate									
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
DMSO	0	119	96	11	13	22	24	27	28	21	25
		107		15		23		21		24	
Perillaldehyde	9.77	-	-	-	-	-	-	31	29	22	20
		-	-	-	-	-	-	24		20	
	19.5	-	-	-	-	-	-	23	24	22	25
		-	-	-	-	-	-	28		28	
	39.1	109	108	14	17	22	26	28	29	28	21
		113		14		23		29		21	
	78.1	94	105	15	16	22	26	33	24	26	28
		110		13		28		24		28	
	156	103	125	11	11	20	24	27	23	24	24
		120		11		22		29		28	
	313	36*	42*	1*	2*	13*	15*	10*	13*	3*	5*
		48*		4*		15*		16*		7*	
	625	0*	0*	0*	0*	0*	0*	-	-	-	-
		0*		0*		0*		-		-	
	1250 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	-	-	-	-
		0*		0*		0*		-		-	
Positive control substance		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA	
Dose(µg/plate)		1		2		10		0.5		2	
Revertant colonies per plate		845	869	258	287	776	784	375	374	216	207
		904		254		729		394		197	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

2-AA: 2-Aminoanthracene

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

-: Not tested

Appendix 5. Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde  
(Bacterial reverse mutation test: additional study) [Non-activation method: -S9]

Substance	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate					
		TA100		TA1535		WP2uvrA	
DMSO	0	97	105	15	14	30	27
		110		14		26	
Perillaldehyde	2.44	102	103	6	14	34	24
		90		15		33	
	4.88	108	105	12	13	25	25
		90		16		31	
	9.77	98	115	13	17	24	25
		96		18		33	
	19.5	108	97	12	8	27	29
		105		16		24	
	39.1	100	111	11	13	23	29
		118		12		29	
	78.1	116	108	12	8	30	21
		91		7		31	
	156	120	112	8	7	28	31
		112		12		30	
	313	0*	0*	0*	0*	3*	6*
		0*		0*		9*	
	625	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		0*	
	1250 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		0*	
Positive control substance		AF-2		NaN <sub>3</sub>		AF-2	
Dose (µg/plate)		0.01		0.5		0.01	
Revertant colonies per plate		636	564	549	565	101	109
		581		543		114	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Appendix 6. Individual count of revertant colonies in plates treated with Perillaldehyde  
(Bacterial reverse mutation test: additional study) [Activation method: +S9]

Substance	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate					
		TA100		TA1535		WP2uvrA	
DMSO	0	107	117	14	12	23	28
		112		10		29	
Perillaldehyde	2.44	105	119	12	14	29	27
		102		12		30	
	4.88	120	100	11	11	28	29
		104		8		30	
	9.77	107	99	14	9	28	23
		120		6		38	
	19.5	102	102	6	9	28	27
		123		12		32	
	39.1	97	112	10	9	33	29
		114		11		30	
	78.1	118	116	12	15	34	26
		121		16		32	
	156	117	112	14	13	29	29
		117		10		27	
	313	53*	63*	1*	3*	20*	16*
		67*		4*		20*	
	625	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		0*	
	1250 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		0*		0*		0*	
Positive control substance		2-AA		2-AA		2-AA	
Dose (µg/plate)		1		2		10	
Revertant colonies per plate		1132	1122	254	241	773	770
		1060		207		734	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

2-AA: 2-Aminoanthracene

\*: Growth inhibition was observed.

+: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

## Appendix 7. Historical control data (Bacterial reverse mutation test)

Historical negative control values of revertant colonies							
Strain	S9 mix	n	Mean	±	S.D.	Range	
						Lower	Upper
TA100	-	207	117.6	±	10.3	93.3	141.9
	+	207	126.0	±	12.5	101.2	150.9
TA1535	-	52	12.3	±	4.3	3.8	20.8
	+	52	10.3	±	2.8	5.6	14.9
WP2 <sub>uvrA</sub>	-	207	24.3	±	4.7	13.4	35.1
	+	207	25.7	±	4.8	16.1	35.4
TA98	-	207	22.7	±	4.0	14.5	31.0
	+	207	29.8	±	4.7	20.2	39.3
TA1537	-	207	8.1	±	2.2	3.2	13.1
	+	210	18.7	±	5.9	7.3	30.0
Historical positive control values of revertant colonies							
TA100	- <sup>a</sup>	162	576.2	±	68.1	406.8	745.5
	+ <sup>e</sup>	162	850.4	±	156.8	549.8	1151.1
TA1535	- <sup>b</sup>	50	500.3	±	42.4	401.9	598.6
	+ <sup>f</sup>	50	250.8	±	49.3	162.6	339.0
WP2 <sub>uvrA</sub>	- <sup>a</sup>	162	99.7	±	12.4	69.6	129.9
	+ <sup>g</sup>	162	782.6	±	109.7	575.3	990.0
TA98	- <sup>c</sup>	162	618.3	±	35.0	536.4	700.2
	+ <sup>h</sup>	162	365.7	±	40.8	270.8	460.6
TA1537	- <sup>d</sup>	162	186.6	±	28.3	134.1	239.2
	+ <sup>f</sup>	165	161.7	±	35.9	93.4	230.1

Negative control: Including water for injection, dimethyl sulfoxide, *etc.*

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

Sodium azide: NaN<sub>3</sub>

9-Aminoacridine hydrochloride: 9-AA

2-Aminoanthracene: 2-AA

a: AF-2, 0.01 µg/plate

b: NaN<sub>3</sub>, 0.5 µg/plate

c: AF-2, 0.1 µg/plate

d: 9-AA, 80 µg/plate

e: 2-AA, 1.0 µg/plate

f: 2-AA, 2.0 µg/plate

g: 2-AA, 10 µg/plate

h: 2-AA, 0.5 µg/plate

The above historical control data consist of those pooled [REDACTED]

[REDACTED] (TA100, WP2<sub>uvrA</sub>, TA98, TA1537) or [REDACTED]

(TA1535).

The range is calculated by the control limit of  $\bar{X}$  derived from  $\bar{X}-R_s-R$  value.