

Exp. No.

FINAL REPORT

最終報告書

Muta™ Mouse を用いるペリルアルデヒドの遺伝子突然変異試験

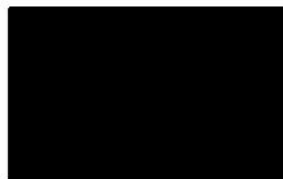
【GLP 非適用】

試験番号



試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所



試験責任者の署名および日付

表 題 : 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]

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. 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
5. 試験番号.....	6
6. 試験施設.....	6
7. 試験委託者.....	6
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.....	21
16. 試験結果.....	21
17. 考察および結論.....	22
18. 試験関係資料の保管.....	23

Tables

Table 1	Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with Perillaldehyde [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	24
Table 2	Induction of mutation in glandular stomach of transgenic mice treated with Perillaldehyde [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	25

Appendices

Appendix 1	Body weight in the gene mutation assay of Perillaldehyde [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	26
------------	--	----

Appendix 2	Clinical observations in the gene mutation assay of Perillaldehyde [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	28
Appendix 3	Gross findings in the gene mutation assay of Perillaldehyde [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	35
Appendix 4	Historical control data (Transgenic rodent gene mutation assay (<i>LacZ</i> assay))	38
Reference data		
Reference data 1	被験物質液の安定性結果.....	39

要 約

ペリルアルデヒドの変異原性について、トランスジェニックマウス (Muta™ Mouse) 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。

用量設定試験の結果を基にガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とし、500, 250 および 125 mg/kg/day 用量で各群雄 6 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、1000, 500 および 250 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、ペリルアルデヒド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。

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、ペリルアルデヒド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

Muta™ Mouse を用いるペリルアルデヒドの遺伝子突然変異試験

2. 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*) .

3. 参照したガイドライン

- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 488 (26 July 2013: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)

4. 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:平成26年5月30日法律第46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)
- 「動物実験に関する指針」(██████████, 2018年6月14日)
- 「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██████████の動物実験委員会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 18-0144A, 遺伝子組換え実験承認受付番号 18-4), 遺伝子組換え生物等は適正に使用した.

5. 試験番号

██████████

6. 試験施設

██████████
██████████

7. 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

██████████

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：
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, 実験開始日)：
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)：
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、その前日を Day -1 とした。

12. 被験物質

12.1. 名称

和名：ペリルアルデヒド

英名：Perillaldehyde

12.2. 別名（化学名，一般名等）

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

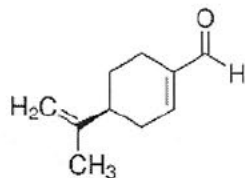
12.3. 提供元

12.4. ロット番号

12.5. CAS No.

2111-75-3

12.6. 構造式



12.7. 分子式

 $C_{10}H_{14}O$

12.8. 分子量

150.2

12.9. 純度

93.7%

12.10. 比重

0.9679

12.11. 沸点

237°C

12.12. 物質の状態

12.12.1. 外観

無色または僅かに黄色を帯びた透明な液体

12.12.2. 臭い

強いシソのような香気

12.13. 溶解性

コーン油に溶解

12.14. 保管条件

室温, 密閉

12.15. 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.

12.16. 残余被験物質の処理

実験終了後, 被験物質等管理責任者へ返却した.

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.

13.1.1. 物質名

コーン油

13.1.2. 製造元

富士フイルム和光純薬株式会社

13.1.3. 保管条件

室温

13.2. 陽性対照物質

ガイドラインで推奨されている, 下記の物質を陽性対照物質に選択した.

13.2.1. 物質名

N-エチル-*N*-ニトロソウレア (ENU)

13.2.2. 製造元

Toronto Research Chemicals Inc.

13.2.3. 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

マウス (Muta™ Mouse : トランスジェニックマウス)

14.1.2. 系統 [グレード]

CD₂-LacZ80/HazfBR (Muta™ Mouse) [SPF]

14.1.3. 生産者

株式会社日本医科学動物資材研究所

14.1.4. 試験系の選択理由

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

雄 40 匹

14.1.7. 使用動物数

雄 36 匹

14.2. 飼育管理

14.2.1. 飼育環境

バリアシステムの [REDACTED] (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ヵ月に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。Day -8～1の間、動物を検疫・馴化させ、この間一般状態を1日1回以上観察した。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（LATOX-F/V5）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・ピアス、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

余剰動物は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

14.7.1. ダウンス緩衝液

約 1440 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた.

Na ₂ HPO ₄	3.15	g
KH ₂ PO ₄	0.45	g
NaCl	14.4	g
KCl	0.36	g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (ニッポンジーン)	36	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 1800 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

下記の試薬を混合させた.

ダウンス緩衝液	166.6	mL
RNase 溶液 (RNase A 10 mg/mL, ニッポンジーン)	3.332	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) 68.4 g を約 320 mL のダウンス緩衝液に溶解し, ダウンス緩衝液を用いて 400 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷蔵保管した.

14.7.4. 組織破碎用緩衝液

下記の試薬を混合させた.

ダウンス緩衝液	74.97	mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	74.97	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	16.66	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL)	3.332	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

下記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)	340	mg
遺伝子工学用滅菌水	102	mL
10 w/v% SDS 溶液	34	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] ^{注1)}	34	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

下記の試薬を混合させた.

クロロホルム (関東化学)	375	mL
TE 飽和フェノール (ニッポンジーン)	375	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

下記の試薬を混合させた.

クロロホルム (関東化学)	288	mL
イソアミルアルコール (富士フィルム和光純薬)	12	mL

用時調製した.

14.8. 培地および培養液等の調製

14.8.1. LB 培養液

下記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

下記の試薬を混合させた.

Bacto tryptone	11	g	14	g
Bacto yeast extract	5.5	g	7	g
NaCl	5.5	g	7	g
バクトアガー (Becton, Dickinson and Company)	16.5	g	21	g
超純水	1100	mL	1400	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

下記の試薬を混合させた.

Bacto tryptone	12	g	11	g	10	g	9	g
Bacto yeast extract	6	g	5.5	g	5	g	4.5	g
NaCl	6	g	5.5	g	5	g	4.5	g
バクトアガー	8.4	g	7.7	g	7	g	6.3	g
超純水	1200	mL	1100	mL	1000	mL	900	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. 200 mg/mL マルトース水溶液

[調製例]

マルトース水和物 (富士フィルム和光純薬) 21.1 g を約 80 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 100 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷蔵保管した.

14.8.5. 50 mg/mL アンピシリン水溶液

アンピシリンナトリウム (注射用ビクシリン, Meiji Seika ファルマ) 250 mg (力価) に注射用水 5 mL を加えて溶解させ, 冷凍保管した.

14.8.6. 20 mg/mL カナマイシン水溶液

カナマイシン硫酸塩 48 mg を約 1.6 mL の注射用水に溶解し, 注射用水を用いて 2 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷凍保管した.

14.8.7. 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液

硫酸マグネシウム七水和物 49.2 g を約 160 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 200 mL に定容した. オートクレーブ (121°C, 20分) で滅菌した後, 室温保管した.

14.8.8. SM 緩衝液

約 800 mL の超純水に下記の試薬を溶解させる。

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。

14.8.9. P-gal 溶液

下記の試薬を混合させる。

Phenyl β-D-galactoside [P-gal]	6600	mg	5400	mg
ジメチルスルホキシド [DMSO] (富士フィルム和光純薬)	22	mL	18	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

被験物質をコーン油に溶解させた。各被験物質液を各投与用にガラス製褐色気密容器に小分け (7 日分および予備 1 本) し、投与日まで室温、遮光で保管した。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。被験物質液は、週 1 回調製した。

14.9.1.1. 200 mg/mL 被験物質液

被験物質 4.27 g (純度補正量 4.00 g, 純度 93.7%) を 20 mL 容メスフラスコに正確に秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、20 mL に定容し、200 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.2. 100 mg/mL 被験物質液

被験物質 2.13 g (純度補正量 2.00 g, 純度 93.7%) を 20 mL 容メスフラスコに正確に秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、20 mL に定容し、100 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.3. 50.0 mg/mL 被験物質液

被験物質 1.07 g (純度補正量 1.00 g, 純度 93.7%) を 20 mL 容メスフラスコに正確に秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、20 mL に定容し、50.0 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.4. 25.0 mg/mL 被験物質液

被験物質 0.534 g (純度補正量 0.500 g, 純度 93.7%) を 20 mL 容メスフラスコに正確に秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、20 mL に定容し、25.0 mg/mL 液を準備した。

14.9.2. 被験物質液の安定性 (試験施設データ)

被験物質液 (媒体: コーン油) 中のペリルアルデヒドは、2.00~200 mg/mL の濃度範囲において、室温 (1~30°C)、遮光条件下でガラス製褐色気密容器中に窒素充填して 168 時間まで安定であることが確認されている (Reference data 1)。

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 とした。

14.11. Muta™ Mouse を用いる遺伝子突然変異試験

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
0*	0	5	雄	6	1001~1006
125	25.0	5	雄	6	1101~1106
250	50.0	5	雄	6	1201~1206
500	100	5	雄	6	1301~1306
1000	200	5	雄	6	1401~1406
100**	10	10	雄	6	1501~1506

* : 陰性対照 (媒体のみを投与した.) ** : 陽性対照 (ENU)

14.11.2. 用量設定根拠

「Muta™ Mouse を用いるペリルアルデヒドの遺伝子突然変異試験のための予備試験：試験番号 [REDACTED]」において、被験物質を雄雌マウスに 30.0, 100, 300 および 1000 mg/kg/day の用量で各群 3 匹に 1 日 1 回、14 日間連続強制経口投与した。その結果、雄では、1000 mg/kg/day 群で投与 3 日目の投与後以降に自発運動の低下が 1/3 例で認められたが、全例において顕著な体重減少は認められなかった。雌では、1000 mg/kg/day 群で、投与 2 日目の投与後以降に自発運動の低下が 2/3 例で認められたが、全例において顕著な体重減少は認められなかった。300 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、当該試験においては、ガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とし、以下、500, 250 および 125 mg/kg の計 4 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。

14.11.3. 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 匹に投与した。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、1000, 500 および 250 mg/kg/day の 3 用量について遺伝子突然変異解析を実施する。評価に使用しない動物については、14.11.7. の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。

14.11.4. 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 0.05 mL とし、14.11.6. の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 10 g 当たり 0.1 mL とし、Day 1 の体重に基づいて算出した。

14.11.5. 投与期間および発現期間

Day 1 から Day 28 までを投与期間、Day 29 から Day 31 までを発現期間とするとともに、Day 1～7 を Week 1, Day 8～14 を Week 2, Day 15～21 を Week 3, Day 22～28 を Week 4 とした。最終投与後 3 日 (Day 31) に器官を摘出した。陽性対照群については、Day 2 および 3 に投与し、最終投与後 10 日 (Day 13) に器官を摘出した。

14.11.6. 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、Day 1 (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、Day 1 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。

14.11.7. 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。

14.11.8. 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。

14.11.9. 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 (1710 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、3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 (1190 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 (1190 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 (1190 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 (13240 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、一晚室温に放置し、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 100~600 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。

14.11.10. 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 $^{\circ}\text{C}$ 、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 0.8~0.9) 培養を続けた。培養終了後、菌懸濁液を 10 分間遠心分離 (1000 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)。

14.11.11. 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 μ L 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μ L をチューブ (RED) に加え、同様に混合した。さらに、30 $^{\circ}\text{C}$ 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 μ L を加え、十分に攪拌した (パッケージング溶液)。

14.11.12. 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 μ L）をセクション用チューブに加えた後（およそ 2700 μ L 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 μ L を 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 270 μ L に加えて 10 倍希釈した。本希釈液 30 μ L をタイター用チューブに加え攪拌した。

タイター用トップアガーの場合は，LB トップアガー 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。セクション用トップアガーの場合は，LB トップアガー 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，タイター用トップアガー 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，セクション用トップアガー 16 mL を加え，タイター用と同様に LB 寒天培地に重層した。各プレートに 37°C の条件で一晩培養した。

総プラーク数が 30 万に達するまで上記のパッケージング操作を繰り返した。

14.11.13. 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。

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

14.11.14. 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。

14.11.15. 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。

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

14.12. 結果の評価

14.12.1. 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い）であったため、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。

14.12.2. 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. Muta™ Mouse を用いる遺伝子突然変異試験

16.1.1. lacZ assay (肝臓)

結果を Table 1 に示す。

陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $43.8 \pm 11.8 (\times 10^{-6})$ であった。

ペリルアルデヒド投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、250, 500 および 1000 mg/kg/day 群で、それぞれ $45.3 \pm 17.9 (\times 10^{-6})$, $36.6 \pm 12.0 (\times 10^{-6})$ および $40.4 \pm 14.2 (\times 10^{-6})$ 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、 $128.5 \pm 21.5 (\times 10^{-6})$ 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。

16.1.2. lacZ assay (腺胃)

結果を Table 2 に示す。

陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $39.6 \pm 10.3 (\times 10^{-6})$ であった。

ペリルアルデヒド投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、250, 500 および 1000 mg/kg/day 群で、それぞれ $48.4 \pm 25.1 (\times 10^{-6})$, $38.0 \pm 10.1 (\times 10^{-6})$ および $39.8 \pm 8.8 (\times 10^{-6})$

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 \pm SD は、 $368.3\pm 37.4 (\times 10^{-6})$ 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。

16.1.3. 体重および一般状態観察

結果を Appendix 1 および 2 に示す。

ペリルアルデヒド投与群では、1000 mg/kg/day 群で、投与 3 および 4 日目の投与後に自発運動の低下が 3/6 例、呼吸不整が 2/6 例で認められ、投与 5 日目の投与前に 1 例の死亡が認められた。ただし、死亡動物を除く全例において顕著な体重減少は認められなかった。

16.1.4. 解剖時の肉眼観察

結果を Appendix 3 に示す。

すべての投与群において、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

ペリルアルデヒド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 (MutaTM mouse) 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ガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とし、500, 250 および 125 mg/kg/day 用量で各群雄 6 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、1000, 500 および 250 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、ペリルアルデヒド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。

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、ペリルアルデヒド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. 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、最終報告書作成後、DNA 溶液および凍結器官の保管については試験委託者と[REDACTED]で協議し、別途定める。

Table 1. Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with Perillaldehyde
 [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	1001	757,800	1	23	30.4	43.8 \pm 11.8
		1002	438,300	1	19	43.3	
		1003	495,000	2	18	36.4	
		1004	355,500	1	17	47.8	
		1005	375,300	2	23	61.3	
Perillaldehyde	250	1201	422,100	2	11	26.1	45.3 \pm 17.9
		1202	333,000	1	21	63.1	
		1203	373,500	2	16	42.8	
		1204	622,800	2	40	64.2	
		1205	498,600	2	15	30.1	
	500	1301	507,600	2	13	25.6	36.6 \pm 12.0
		1302	648,900	2	21	32.4	
		1303	604,800	2	18	29.8	
		1304	515,700	2	29	56.2	
		1305	463,500	1	18	38.8	
	1000	1401	512,100	2	16	31.2	40.4 \pm 14.2
		1403	647,100	2	20	30.9	
		1404	314,100	1	14	44.6	
		1405	693,900	2	22	31.7	
		1406	424,800	2	27	63.6	
ENU	100	1501	621,900	2	82	131.9	128.5 \pm 21.5 * (S)
		1502	343,800	1	54	157.1	
		1503	684,000	2	90	131.6	
		1504	412,200	2	40	97.0	
		1505	624,600	2	78	124.9	

Corn oil: Negative control (5 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 ($p \leq 0.05$)

(S): Student's *t* test

Table 2. Induction of mutation in glandular stomach of transgenic mice treated with Perillaldehyde
 [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	1001	711,000	2	28	39.4	39.6 \pm 10.3
		1002	752,400	2	22	29.2	
		1003	423,000	2	17	40.2	
		1004	393,300	2	13	33.1	
		1005	552,600	2	31	56.1	
Perillaldehyde	250	1201	855,000	2	34	39.8	48.4 \pm 25.1
		1202	741,600	2	17	22.9	
		1203	793,800	3	70	88.2	
		1204	609,300	2	34	55.8	
		1205	394,200	2	14	35.5	
	500	1301	400,500	1	12	30.0	38.0 \pm 10.1
		1302	548,100	2	20	36.5	
		1303	569,700	2	16	28.1	
		1304	306,900	1	13	42.4	
		1305	566,100	2	30	53.0	
	1000	1401	509,400	2	18	35.3	39.8 \pm 8.8
		1403	473,400	2	15	31.7	
		1404	309,600	1	11	35.5	
		1405	501,300	2	27	53.9	
		1406	306,000	2	13	42.5	
ENU	100	1501	460,800	1	181	392.8	368.3 \pm 37.4 * (AW)
		1502	790,200	2	322	407.5	
		1503	824,400	2	276	334.8	
		1504	613,800	3	198	322.6	
		1505	555,300	2	213	383.6	

Corn oil: Negative control (5 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

Appendix 1. Body weight in the gene mutation assay of Perillaldehyde
 [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.	Body weight (g)								Gain (g)
			Day -8 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 5	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	
Corn oil	0	1001	24.2	25.4		25.9	25.8	26.2	26.9	27.2	1.8
		1002	24.5	26.7		27.0	26.3	26.2	26.0	26.1	-0.6
		1003	23.2	25.6		25.9	25.7	26.4	26.7	26.7	1.1
		1004	24.5	27.2		26.1	26.0	26.4	26.6	27.6	0.4
		1005	24.2	26.7		26.7	27.4	27.5	27.8	28.1	1.4
		1006	25.2	28.1		28.5	28.8	28.8	28.4	28.9	0.8
		Mean±S.D.	24.3±0.7	26.6±1.0		26.7±1.0	26.7±1.2	26.9±1.0	27.1±0.9	27.4±1.0	0.8±0.8
Perillaldehyde	125	1101	23.9	26.5		26.7	27.5	27.4	27.8	28.1	1.6
		1102	23.3	25.8		26.5	27.1	27.6	27.5	27.5	1.7
		1103	22.9	25.2		25.2	25.7	25.3	26.1	25.9	0.7
		1104	24.9	28.2		28.6	28.8	28.8	29.2	29.3	1.1
		1105	23.7	26.8		27.1	27.5	26.9	27.3	27.0	0.2
		1106	25.5	27.2		28.3	30.9	30.4	30.6	30.8	3.6
		Mean±S.D.	24.0±1.0	26.6±1.1		27.1±1.3	27.9±1.8	27.7±1.7	28.1±1.6	28.1±1.7	1.5±1.2
	250	1201	24.7	25.8		27.3	27.7	27.8	28.1	28.3	2.5
		1202	25.4	27.6		27.7	27.9	28.3	29.2	28.5	0.9
		1203	23.6	27.5		27.1	28.0	28.9	28.8	28.8	1.3
		1204	23.0	26.9		26.8	26.8	27.4	28.0	28.1	1.2
		1205	23.3	25.3		26.3	26.1	26.2	26.4	26.4	1.1
		1206	23.9	26.5		26.0	25.8	26.7	27.2	27.2	0.7
		Mean±S.D.	24.0±0.9	26.6±0.9		26.9±0.6	27.1±1.0	27.6±1.0	28.0±1.0	27.9±0.9	1.3±0.6
	500	1301	24.4	27.2		28.0	28.4	27.9	27.9	28.1	0.9
		1302	24.0	26.4		27.2	27.9	27.9	28.6	29.0	2.6
		1303	25.0	26.8		27.1	28.1	28.2	29.1	28.7	1.9
		1304	23.2	25.1		25.7	26.4	26.9	26.5	26.5	1.4
		1305	22.9	25.9		26.4	26.3	26.1	25.6	25.1	-0.8
1306		25.0	27.5		27.7	28.1	28.5	28.4	28.2	0.7	
Mean±S.D.		24.1±0.9	26.5±0.9		27.0±0.8	27.5±0.9	27.6±0.9	27.7±1.4	27.6±1.5	1.1±1.2	
1000	1401	25.0	27.1		27.8	27.9	28.3	29.0	28.8	1.7	
	1402	22.7	25.5	23.0D							
	1403	23.0	25.4		25.5	25.8	26.3	26.9	26.6	1.2	
	1404	25.1	26.9		27.0	27.8	27.8	28.3	28.1	1.2	
	1405	24.1	26.1		25.6	26.3	26.7	26.8	26.8	0.7	
	1406	24.7	28.1		27.7	29.2	29.5	29.7	29.3	1.2	
	Mean±S.D.	24.1±1.0	26.5±1.0		26.7±1.1	27.4±1.4	27.7±1.3	28.1±1.3	27.9±1.2	1.2±0.4	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg) Gain= Day 31(Sacrificed) - Day 1(Allocated) D: Dead

Appendix 1. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Body weight (g)			Gain (g)
			Day -8 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 13 (Sacrificed)	
ENU	100	1501	24.8	26.2	26.6	1.8
		1502	22.8	24.7	24.6	1.8
		1503	25.2	28.1	27.7	2.5
		1504	24.0	27.0	26.0	2.0
		1505	22.1	25.5	25.4	3.3
		1506	22.7	27.3	25.7	3.0
		Mean±S.D.		23.6±1.3	26.5±1.2	26.0±1.1

ENU: Positive control (N-ethyl-N-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
Gain= Day 13(Sacrificed) - Day 1(Allocated)

Appendix 2. Clinical observations in the gene mutation assay of Perillaldehyde
 [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.	Day of experiment														
			1		2		3		4		5		6		7		
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Perillaldehyde	125	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1000	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1402	N	N	N	N	N	DLA	N	DLA, I	D							
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	DLA	N	DLA	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	DLA, I	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal, DLA: Decrease in locomotor activity, I: Irregular respiration, D:Dead

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment									
			1	2		3		4	5	6	7	
				1st	2nd	1st	2nd					
ENU	100	1501	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

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

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			8		9		10		11		12		13		14	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Perillaldehyde	125	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1000	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment					13 (Sacrificed)
			8	9	10	11	12	
ENU	100	1501	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N

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

N: Normal

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			15		16		17		18		19		20		21	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Perillaldehyde	125	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1000	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			22		23		24		25		26		27		28	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Perillaldehyde	125	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1000	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31 (Sacrificed)
Corn oil	0	1001	N	N	N
		1002	N	N	N
		1003	N	N	N
		1004	N	N	N
		1005	N	N	N
		1006	N	N	N
Perillaldehyde	125	1101	N	N	N
		1102	N	N	N
		1103	N	N	N
		1104	N	N	N
		1105	N	N	N
		1106	N	N	N
	250	1201	N	N	N
		1202	N	N	N
		1203	N	N	N
		1204	N	N	N
		1205	N	N	N
		1206	N	N	N
	500	1301	N	N	N
		1302	N	N	N
		1303	N	N	N
		1304	N	N	N
		1305	N	N	N
		1306	N	N	N
1000	1401	N	N	N	
	1403	N	N	N	
	1404	N	N	N	
	1405	N	N	N	
	1406	N	N	N	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

N: Normal

Appendix 3. Gross findings in the gene mutation assay of Perillaldehyde
 [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 and comments
Corn oil	0	1001	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1002	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1003	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
Perillaldehyde	125	1101	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1102	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1103	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
Perillaldehyde	125	1104	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1105	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1106	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

-: No remarkable change

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings and comments
Perillaldehyde	250	1201	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1202	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1203	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1204	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1205	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1206	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
	500	1301	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1302	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1303	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1304	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1305	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1306	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -

-: No remarkable change

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings and comments
Perillaldehyde	1000	1401	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1403	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1404	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1405	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		1406	Sacrificed	31	Liver Glandular stomach	- -
		ENU	100	1501	Sacrificed	13
1502	Sacrificed			13	Liver Glandular stomach	- -
1503	Sacrificed			13	Liver Glandular stomach	- -
1504	Sacrificed			13	Liver Glandular stomach	- -
1505	Sacrificed			13	Liver Glandular stomach	- -
1506	Sacrificed			13	Liver Glandular stomach	- -

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
 -: No remarkable change

Appendix 4. Historical control data (Transgenic rodent gene mutation assay (*lacZ* assay))

[Muta™ Mouse: male; liver]

Group	n	Mutant frequency [$\times 10^{-6}$] (Mean \pm S.D.)	Acceptable range	
			Lower	Upper
Negative control	121	47.1 \pm 16.1	15.5	78.7

[Muta™ Mouse: male; stomach]

Group	n	Mutant frequency [$\times 10^{-6}$] (Mean \pm S.D.)	Acceptable range	
			Lower	Upper
Negative control	99	45.1 \pm 12.1	21.4	68.8

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

The range of negative control is 95% confidence interval.

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

Reference data 1

Exp. No. XXXXXXXXXX

被験物質液の安定性結果

結果報告書

表 題： ベリルアルデヒド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ベリルアルデヒドの安定性の検討

試験番号： XXXXXXXXXX

要 約： コーン油中ベリルアルデヒドの高速液体クロマトグラフシステム（HPLC）を用いる濃度測定法バリデーションとして、特異性、直線性、真度および併行精度を検討した。その結果、すべての項目で判定基準を満たしていたため、HPLC を用いた本測定法は、ベリルアルデヒドの濃度測定法として適用可能と判断した。また、オートサンプラー上での標準溶液および試料溶液の安定性を確認した結果、ともに判定基準を満たしていたため、標準溶液および試料溶液はオートサンプラー上（設定温度 10℃）にセット後、24 時間まで安定して測定に供することが可能であると判断した。

また、コーン油中ベリルアルデヒド（設定濃度 2 および 200 mg/mL）の安定性を検討した。被験物質液をガラス製褐色気密容器に入れ、窒素ガス充填後、室温条件下で 168 時間保管し測定した結果、残存率は、それぞれ 102.3 および 99.1%であった。したがって、コーン油を媒体としたベリルアルデヒドは、2~200 mg/mL の濃度範囲において、室温 168 時間まで窒素充填したガラス製褐色気密容器中で安定であると判断した。

《濃度測定法概要》

適用検体	2~200 mg/mL 被験物質液（媒体：コーン油）
QC 用標準溶液	被験物質を、アセトンを用いて 0.01 mg/mL となるように希釈する。
測定機器	島津 LC-2010CHT 高速液体クロマトグラフシステム
HPLC に供する試料溶液	被験物質液を、0.0003~0.03 mg/mL の濃度になるようアセトンを用いて希釈する。

《HPLC 条件》

カラム	XBridge™ C18 (粒子径 5 μm, 4.6 mm I.D. × 150 mm, Waters)	
カラム温度	40°C	
移動相	水/アセトニトリル混液 (13:7, v/v)	
流量	2.5 mL/min	
測定波長	UV 230 nm	
注入量	10 μL	
分析時間	15 分	
オートサンプラー	設定温度	10°C
	洗浄液	水/アセトニトリル混液 (13:7, v/v)

《結果》

項目	判定基準	結果	適否
特異性	被験物質のピークと重なる夾雑ピークがない	被験物質のピークと重なる夾雑ピークは検出されなかった。	適
直線性	相関係数：0.99 以上	0.9999	適
真度および併行精度	相対誤差：±10.0%以内	0.6% (2 mg/mL 被験物質液) 1.8% (200 mg/mL 被験物質液)	適
	相対標準偏差：10.0%以下	3.6% (2 mg/mL 被験物質液) 1.2% (200 mg/mL 被験物質液)	
標準溶液および試料溶液の安定性	残存率：100.0±5.0%以内	103.4% (0.0003 mg/mL 標準溶液) 100.8% (0.03 mg/mL 標準溶液) 100.9% (2 mg/mL 被験物質液) 100.9% (200 mg/mL 被験物質液)	適
媒体中被験物質の安定性 ¹⁾	残存率：100.0±15.0%以内	102.3% (2 mg/mL 被験物質液) 99.1% (200 mg/mL 被験物質液)	適

1) 室温 (1~30°C) 条件下でガラス製褐色気密容器中に窒素ガスを充填して 168 時間以上保管後

試験責任者： XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX