

---

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

---

最 終 報 告 書

作成日 2004年 6月 21日

株式会社日本バイオリサーチセンター  
羽島研究所

## 目 次

要 約	.....	8
緒 言	.....	9
方 法	.....	9
1. 被験物質，陽性対照物質および陰性対照物質	.....	9
2. 検体液	.....	9
3. 試験細胞	.....	10
4. 培養液	.....	10
5. S9 mix	.....	11
6. 細胞数の調整および細胞播種	.....	11
7. 細胞増殖抑制試験	.....	11
8. 染色体異常試験	.....	12
9. 標本観察	.....	14
10. 試験の成立条件	.....	14
11. 統計学的方法	.....	14
12. 判定基準	.....	14
試験成績	.....	15
1. 短時間処理法	.....	15
2. 連続処理法	.....	15
考 察	.....	16
文 献	.....	16

## Attachment, Table, Figure, AppendixおよびPhotographの目次

Table 1	Cell Growth Inhibition Test of bis(2-ethylhexyl)azelate in Cultured Chinese Hamster Cells The short treatment method	.....	21
Table 2	Cell Growth Inhibition Test of bis(2-ethylhexyl)azelate in Cultured Chinese Hamster Cells The continuous treatment method	.....	22
Table 3	Chromosomal Aberration Test of bis(2-ethylhexyl)azelate in Cultured Chinese Hamster Cells The short treatment method	.....	23
Table 4	Chromosomal Aberration Test of bis(2-ethylhexyl)azelate in Cultured Chinese Hamster Cells The continuous treatment method	.....	24
Figure 1	Cell Growth Inhibition Test of bis(2-ethylhexyl)azelate in Cultured Chinese Hamster Cells	.....	25

## 要 約

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の染色体異常誘発性の有無を、哺乳類の培養細胞(CHL/IU細胞)を用い、短時間処理法(6時間処理のS9 mix添加および無添加)と連続処理法(24時間処理)で検討した。

## 1. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施した。

50%細胞増殖抑制濃度(以下 $IC_{50}$ )は、短時間処理法のS9 mix添加では1859.0  $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix無添加では1555.5  $\mu\text{g/mL}$ であった。一方、連続処理法の24時間処理では534.2  $\mu\text{g/mL}$ であった。

## 2. 染色体異常試験

染色体異常試験は、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、 $IC_{50}$ および細胞の生存率を指標に、短時間処理法のS9 mix添加および無添加では150, 300, 600, 1200および2400  $\mu\text{g/mL}$ に、連続処理法の24時間処理では37.5, 75, 150, 300および600  $\mu\text{g/mL}$ に設定した。

試験の結果、短時間処理法および連続処理法とも、染色体異常を有する細胞の出現率は5%未満の陰性であった。

## 3. 対照物質

各試験で用いた陽性対照物質は、明らかな陽性結果を示し、陰性対照および陽性対照における染色体異常誘発率は、当試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

陰性対照(無水エタノール)について、無処置対照を設け、細胞に対する無水エタノールの影響を検討した。その結果、無処置対照および陰性対照における生細胞数および染色体異常誘発率は、短時間処理法、連続処理法とも同様な値を示し、細胞に対する無水エタノールの影響は認められなかった。

以上の結果、当試験の条件下において、アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)に染色体異常誘発性はないと判定する。

## 緒 言

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の安全性に関する非臨床試験の一環として、哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

## 方 法

### 1. 被験物質、陽性対照物質および陰性対照物質

#### 1.1 被験物質

被験物質のアゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)(CAS No.103-24-2)は、分子量：412.66、水、ジメチルスルホキシドに不溶、アセトン、メタノール、エタノールに可溶、通常取り扱いにおいては安定な淡黄色透明液体である。当試験には、厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室から提供されたものを用いた(製造元： ，ロット番号： ，純度：77.2 wt%)。

入手後は、試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温の条件下で保管した。なお、試験操作終了後の残余被験物質は、 にすべて返却した。その後、

において、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はないことが確認された。

#### 1.2 陽性対照物質

試験には、マイトマイシンC(以下MMC)とジメチルニトロサミン(以下DMN)を用いた。

MMC [商品名：マイトマイシン協和S, 1バイアル中に、日局マイトマイシンC 2 mg(力価)と日局塩化ナトリウム48 mgを含有, ロット番号：349AJH, 使用期限：2004年8月, 協和醗酵工業株式会社]は2002年4月5日に、DMN [純度：99.4%, ロット番号：DWP3368, 使用期限：2007年2月21日(自社規定), 和光純薬工業株式会社]は2002年2月22日にいずれも市販品を購入した。購入後は、いずれも使用時まで当試験施設の被験物質保管室の保管庫内に、冷所(1~10℃)の条件下で保管した。

#### 1.3 陰性対照物質

被験物質の媒体である無水エタノール(局方品, ロット番号：LF5585, 株式会社ワコーケミカル, 入手日：2000年5月12日, 保管条件：室温)を用いた。

### 2. 検体液

#### 2.1 被験物質

細胞増殖抑制試験では、被験物質4242 mgを媒体(無水エタノール) 10.0 mLに溶解して最高濃度液(424.2 mg/mL)を調製した。

また、染色体異常試験の短時間処理法では、被験物質2424 mgを媒体10.0 mLに溶解して最高濃度液(242.4 mg/mL)を、連続処理法では、被験物質606 mgを媒体10.0 mLに溶解して最高濃度液

(60.6 mg/mL) を調製した。

最高濃度液より低い濃度液は、最高濃度液から無水エタノールで段階希釈して調製した。調製は用時に行い、使用後の残液は廃棄処分した。なお、当試験における表示濃度は培養液に添加したときの最終濃度であるため、各調製液はあらかじめ表示濃度の101倍の濃度を調製した。

なお、アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の純度は77.2 wt%であるが、製法上、pureなものがないことから、純度換算は行わずに試験を実施した。

## 2.2 陽性対照物質

MMCおよびDMNとも、生理食塩液(局方品, ロット番号: K1E90, 株式会社大塚製薬工場)に溶解して必要濃度(表示濃度の11倍)を調製した。調製は用時に行い、使用後の残液は廃棄処分した。

	物質名	調製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	試験濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
連続処理法	MMC	0.55	0.05
短時間処理法	DMN	5500	500
	MMC	1.1	0.1

## 3. 試験細胞

試験には、2000年11月28日に大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクツ部から入手したチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を用いた。細胞は液体窒素中に凍結保存(-196 °C)した。試験に際し、凍結保存してある細胞(継代数15回)を融解して増殖させ、染色体数および倍化時間を検査した[検査日: 2002年10月21日~2002年10月25日]。

試験には、当試験施設の基準に適合した細胞(倍化時間: 15~18時間, 染色体数: 23~27本の染色体を有する細胞が80%以上)を用いた。検査の結果をAttachment 1に示した。

細胞の継代は、培養ビン(Nunc製)を用いて3~4日ごとに行った。以下に各試験における再培養からの継代数を示した。

細胞増殖抑制試験	.....	4回
染色体異常試験(短時間処理法)	.....	8回
染色体異常試験(連続処理法)	.....	9回

なお、実験操作は空調設備を備えた染色体異常試験室(A棟)で行った。

## 4. 培養液

Eagleの最少必須培養液(Eagle's minimum essential medium, 以下Eagle's MEM)の組成を、Attachment 2に示した。

培養液は、Eagle's MEM粉末(ロット番号: 1121758, GIBCO, リストNo.61100-061)と炭酸水素ナトリウムを注射用水に溶解し、1Nの塩酸でpHを7.0~7.1に調整した。メンブランフィ

ルター（ $\phi$  0.22  $\mu$ m）で濾過した後、非働化（56 °C, 30分）した仔牛血清（ロット番号：364570, GIBCO）を最終調製量の10%となるように加えて調製した。なお、調製した培養液は用時に37 °Cに加温して使用した。

## 5. S9 mix

S9は、Attachment 3の方法により2002年6月7日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの（ロット番号：02060703）を用いた。S9は2002年6月28日に購入し、調製時まで-80 °C設定の冷凍庫〔型式：BFV-130（LR），エスベック株式会社〕内に凍結保存した。

S9 mixは、S9以外の各物質を調製混合して溶液とし、これをメンブランフィルター（ $\phi$  0.2  $\mu$ m）で濾過した後、使用直前にS9を加えて調製した。S9 mixの組成をAttachment 4に示した。

## 6. 細胞数の調整および細胞播種

培養ビンに0.25%トリプシン液を加えて細胞を剥離し、遠心分離〔4 °C, 1000 r.p.m., 5分間, 小形冷却遠心器（型式：05PR-22形, 日立工機株式会社）, 以下同様〕により細胞を回収した後、新鮮な培養液を加えて細胞浮遊液を作製した。この浮遊液中の細胞数を血球計算盤を用いて計測し、細胞数が $2 \times 10^4$ 個/5 mLになるように培養液を加えて調整した。調整した細胞浮遊液5 mLは、直径60 mmの滅菌シャーレ（CORNING）に播種し、温度を37 °C, CO<sub>2</sub>濃度を5%に設定した炭酸ガスインキュベーター（型式：BNA-121D, エスベック株式会社, 以下CO<sub>2</sub>インキュベーター）内で3日間培養したものを試験に用いた。

シャーレは、細胞増殖抑制試験では1濃度につき1枚を、染色体異常試験では1濃度につき細胞数の計測用に1枚、染色体標本作製用に2枚を用いた。また、シャーレには試験番号、被験物質名または対照物質名、濃度を記入し、さらに短時間処理法の場合はS9 mixの有無を、連続処理法の場合は培養時間を記入することにより識別した。

## 7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験におけるアゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の試験濃度を設定するために、細胞増殖抑制試験を行った。試験は、短時間処理法のS9 mix添加および無添加と連続処理法の24時間処理の3系列で実施した。

短時間処理法では、S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後、ここにS9 mix 0.5 mLと検体液30  $\mu$ Lを添加した。S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後、検体液をS9 mix添加の場合と同様に添加した。いずれのシャーレもCO<sub>2</sub>インキュベーター内で6時間培養した後、新鮮な培養液5.0 mLに取り替え、さらに18時間培養した。一方、連続処理法では、シャーレに検体液50  $\mu$ Lを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した。

短時間処理法および連続処理法とも、培養終了後、各シャーレに0.25%トリプシン液を約3 mL

添加して細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、生細胞数を計測した。計測は1枚のシャーレ当たり3回行い、その平均を用いて陰性対照群の生細胞数を100%として各濃度における細胞の生存率を求めた。

試験濃度は、短時間処理法および連続処理法とも「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成9年10月31日）に基づき、10 mMの4200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、以下公比2により2100, 1050, 525, 262.5, 131.3, 65.6, 32.8, 16.4および8.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の計10濃度を設定し、その他に陰性対照、無処置対照を設けた。

試験結果をTable 1, 2およびFigure 1に示した。

短時間処理法、S9 mix添加における細胞の生存率は、8.2~131.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では90%以上を示したが、262.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の4200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では38%であった。同様に、S9 mix無添加における細胞の生存率も、8.2~131.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では90%以上を示したが、262.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の4200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では33%であった。

Probit法により算出した50%細胞増殖抑制濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、S9 mix添加では1859.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix無添加では1555.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

なお、検体液添加時、処理終了時とも1050  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において透明油状の析出物が認められた。

連続処理法（24時間処理）の細胞の生存率は、8.2~131.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では90%以上を示したが、262.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の4200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では6%であった。

Probit法により算出した $\text{IC}_{50}$ は534.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

なお、検体液添加時、処理終了時とも1050  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において、透明油状の析出物が認められた。

また、陰性対照（無水エタノール）のほか、無処置対照を設け、細胞に対する無水エタノールの影響を検討した。その結果、無処置対照および陰性対照における生細胞数は、短時間処理法、連続処理法とも同様な値を示し、細胞に対する無水エタノールの影響は認められなかった。

## 8. 染色体異常試験

試験は、短時間処理法のS9 mix添加および無添加と連続処理法の24時間処理の3系列で実施した。

### 8.1 試験濃度および処理群

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、 $\text{IC}_{50}$ および細胞の生存率を指標に、短時間処理法のS9 mix添加および無添加では150, 300, 600, 1200および2400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に、連続処理法の24時間処理では37.5, 75, 150, 300および600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。



処理群は、各試験系列ごとに被験物質、無処置対照、陰性対照および陽性対照群を設けた。陽性対照として短時間処理法のS9 mix添加にはDMN (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を、S9 mix無添加にはMMC (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を、連続処理法にはMMC (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いた。

## 8.2 検体液の処理

### 8.2.1 短時間処理法

S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後に、S9 mix 0.5 mLと被験物質および陰性対照物質の場合は30  $\mu\text{L}$ を、陽性対照物質の場合は0.3 mLを添加した。S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後に、検体液をS9 mix添加の場合と同様に添加した。いずれのシャーレもCO<sub>2</sub>インキュベーター内で6時間培養した後、新鮮な培養液5.0 mLに取り替え、さらに18時間培養してから染色体標本の作製および生細胞数の計測をした。

### 8.2.2 連続処理法

シャーレに、被験物質および陰性対照物質の場合は50  $\mu\text{L}$ を、陽性対照物質の場合は0.5 mLを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した後に染色体標本の作製および生細胞数の計測をした。

### 8.2.3 標本作製

短時間処理法および連続処理法とも、培養終了2時間前に10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度のコルセミド液を各シャーレに0.1 mL添加して、分裂中期細胞を得た。培養終了後、各シャーレに0.25 %トリプシン液を約3 mL加えて細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後、75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理 (37 °C, 15分間) をした。低張処理が終了した後、再び遠心分離し、メタノールと酢酸を3:1の割合で混合して氷冷した固定液で脱水固定を行い、同固定液で細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液をスライドガラス上の2カ所に一滴ずつ滴下して細胞を広げ、乾燥後、2 %のGiemsa染色液で約15分間染色した。

スライド標本は1シャーレ当たり3枚作製し、乱数を用いてコード番号を割り付けた。なお、観察終了後にスライド標本はカバーガラスで封入し、試験番号、被験物質名または対照物質名、濃度、試験法、S9 mixの有無 (短時間処理法) または培養時間 (連続処理法)、標本作製日を記入したラベルを貼付した。

### 8.2.4 細胞数の計測

短時間処理法および連続処理法とも、培養終了後、各シャーレに0.25 %トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、生細胞数を計測した。計測は1枚のシャーレ当たり3回行い、その平均を用いて陰性対照群の生細胞数を100 %として各濃度における細胞の生存率を求めた。

## 9. 標本観察

石館の方法<sup>1)</sup>を参考にして、染色体がよく広がった分裂中期像の細胞を1シャーレ当たり100個、1濃度当たり200個観察した。標本の観察はコード番号順に行い、観察結果と観察濃度との照合は、各処理法の標本観察終了後に行った。

染色体異常は、数的異常と構造的異常に分類した。数的異常は倍数体 (polyploid) のみを観察対象とし、構造的異常は①染色分体型ギャップ (chromatid gap, 以下ctg), ②染色体型ギャップ (chromosome gap, 以下csg), ③染色分体型切断 (chromatid break, 以下ctb), ④染色体型切断 (chromosome break, 以下csb), ⑤染色分体型交換 (chromatid exchange, 以下cte), ⑥染色体型交換 (chromosome exchange, 以下cse), ⑦断片化 (fragmentation, 以下frg) に分類し、これらの染色体異常を有する細胞を陽性細胞1個として記録した。なお、ギャップと切断の判別は、染色体または染色分体の断片が軸の同一線上にあるものをギャップとし、同一線上からはずれているものを切断としたが、断片が同一線上にあっても非染色性部分が染色分体幅より大きいものは切断とした。染色体異常の総数は、ギャップを含めた場合と含めない場合とに分けて記録した。

当試験で認められた染色体異常を、型別に代表例について写真撮影した (Photograph 1~4)。

## 10. 試験の成立条件

陰性対照群において、染色体異常を有する細胞の出現率が5%未満で、陽性対照群においてギャップ以外の染色体異常を有する細胞の出現率が10%以上を示し、さらに陰性および陽性対照群の染色体異常の出現率が、ほぼ当試験施設のバックグランドデータ (Attachment 5) の範囲内を示し、試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

## 11. 統計学的方法

染色体異常を有する細胞の出現率は、下記の判定基準に従ったため有意差検定は行わなかった。

## 12. 判定基準

試験の結果は、数的異常または構造的異常を有する細胞の出現率が5%未満の場合を陰性、5%以上10%未満の場合を疑陽性とした。さらにその出現率が10%以上を示し、濃度の増加に伴って増加した場合を陽性とした。なお、構造的異常の染色体を有する細胞の出現率は、ギャップを含めた場合と含めない場合で算出し、ギャップを含めない場合の出現率により判定した。

## 試験成績

## 1. 短時間処理法

試験結果をTable 3 (Appendix 1-1~1-2) に示した。

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)処理群の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加の有無にかかわらず、すべての濃度で1.0 %以下であった。同様に、構造的異常細胞の出現率も、S9 mix添加の有無にかかわらず、すべての濃度で1.0 %以下で陰性であった。

S9 mix添加における細胞の生存率は、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では90 %以上を示したが、300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の2400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では35 %であった。同様に、S9 mix無添加における細胞の生存率も、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では90 %以上を示したが、300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の2400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では39 %であった。

検体液添加時と処理終了時に、S9 mix添加の有無にかかわらず、1200および2400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、透明油状の析出物が認められた。

陰性対照(無水エタノール)における数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では0 %、S9 mix無添加では0.5 %であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では0 %、S9 mix無添加では1.0 %であった。また、陽性対照(S9 mix添加: DMN; 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , S9 mix無添加: MMC; 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加および無添加とも0 %であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では65.5 %、S9 mix無添加では55.5 %であった。

陰性対照および陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験条件を満たすものであった。

## 2. 連続処理法

試験結果をTable 4 (Appendix 2-1) に示した。

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)処理群の数的異常細胞の出現率は、すべての濃度で2.0 %以下であった。同様に、構造的異常細胞の出現率も、すべての濃度で1.5 %以下で陰性であった。

細胞生存率は、37.5および75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では90 %以上を示したが、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では35 %であった。

検体液添加時と処理終了時の析出物は、すべての濃度において認められなかった。

陰性対照(無水エタノール)における数的異常細胞の出現率は1.0 %、構造的異常細胞の出現率は1.0 %であった。また、陽性対照(MMC: 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )における数的異常細胞の出現率は0 %、構造的異常細胞の出現率は44.5 %であった。

陰性対照および陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験条件を満たすものであった。

## 考 察

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の染色体異常誘発性の有無を、哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験により検討した。

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)処理群の数的異常細胞の出現率は、いずれの試験系列においても、5%に満たなかったため、アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)は数的異常を誘発しないものと思われる。

同じく、構造的異常細胞の出現率も、いずれの試験系列においても、5%に満たなかったため、アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)は構造的異常を誘発しないものと思われる。

短時間処理法および連続処理法の各試験系において、陰性対照および陽性対照群の異常細胞出現率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験の成立条件を満たすものであった。

また、陰性対照(無水エタノール)について、無処置対照を設け、細胞に対する無水エタノールの影響を検討した。その結果、無処置対照および陰性対照における生細胞数および異常細胞出現率は、短時間処理法、連続処理法とも同様な値を示し、細胞に対する無水エタノールの影響は認められなかった。

以上の結果、当試験の条件下において、アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)に染色体異常誘発性はないと判定する。

## 文 献

- 1) 石館 基監修：染色体異常試験データ集(改訂増補)，株式会社エル・アイ・シー(東京，1987)

Table 1. Cell Growth Inhibition Test of bis(2-ethylhexyl)azelate in Cultured Chinese Hamster Cells  
-The short treatment method-

Test Substance	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Treated for 6 hr with S9 mix			Treated for 6 hr without S9 mix		
		No. of cells ( $\times 10^4/\text{plate}$ )	Survival ratio <sup>a)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	No. of cells ( $\times 10^4/\text{plate}$ )	Survival ratio <sup>a)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Non-treatment control	—	68	100	—	70	101	—
Negative control (Absolute ethanol)	—	68	100	—	69	100	—
bis(2-ethylhexyl)azelate	8.2	67	99	1859.0	69	100	1555.5
	16.4	68	100		68	99	
	32.8	68	100		68	99	
	65.6	67	99		65	94	
	131.3	66	97		65	94	
	262.5	60	88		56	81	
	525	48	71		47	68	
	1050 <sup>#</sup>	41	60		41	59	
	2100 <sup>#</sup>	30	44		29	42	
4200 <sup>#</sup>	26	38	23	33			

a):  $[\text{bis(2-ethylhexyl)azelate treated group or non-treatment control} / \text{negative control}] \times 100$ .

#: Colorless clear fine oil drop-like precipitations were noted in the culture fluid in petri plate.

Table 2. Cell Growth Inhibition Test of bis(2-ethylhexyl)azellate in Cultured Chinese Hamster Cells  
-The continuous treatment method-

Test Substance	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Treated for 24 hr		
		No. of cells ( $\times 10^4/\text{plate}$ )	Survival ratio <sup>a)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Non-treatment control	—	69	101	—
Negative control (Absolute ethanol)	—	68	100	—
bis(2-ethylhexyl)azellate	8.2	68	100	534.2
	16.4	68	100	
	32.8	69	101	
	65.6	67	99	
	131.3	61	90	
	262.5	42	62	
	525	31	46	
	1050 <sup>#</sup>	20	29	
	2100 <sup>#</sup>	10	15	
4200 <sup>#</sup>	4	6		

a): [bis(2-ethylhexyl)azellate treated group or non-treatment control / negative control]  $\times 100$ .

#: Colorless clear fine oil drop-like precipitations were noted in the culture fluid in petri plate.

Table 3. Chromosomal Aberration Test of bis(2-ethylhexyl)azelaate in Cultured Chinese Hamster Cells  
— The short treatment method —

Test substance	Concentration (µg/mL)	With(+) or without(-) S9 mix	No. of metaphase examined	No. of polyploid cells	Incidence <sup>a)</sup> (%)	Judgement <sup>b)</sup>	Structural aberrations										Survival ratio (%)	
							Types <sup>c)</sup> and numbers (cumulative)		No. of cells with chromosome aberration		Incidence <sup>d)</sup> (%)		Judgement <sup>b)</sup>					
							ctg	csg	ctb	csb	cte	cse		fig	(+g)	(-g)		(+g)
Non-treatment control	—	+	200	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Negative control	—	+	200	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
bis(2-ethylhexyl) azelaate	150	+	200	0	0	—	0	0	0	2	0	2	2	1.0	1.0	0	0	99
	300	+	200	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80
	600	+	200	1	0.5	—	0	0	0	1	0	1	1	0.5	0.5	0	0	64
	1200 <sup>#</sup>	+	200	2	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48
	2400 <sup>#</sup>	+	200	1	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35
Dimethylnitrosamine	500	+	200	0	0	—	0	0	42	0	122	0	131	65.5	65.5	0	0	78
Non-treatment control	—	—	200	0	0	—	0	0	1	0	0	0	1	0.5	0.5	0	0	99
Negative control	—	—	200	1	0.5	—	0	0	2	0	0	0	2	1.0	1.0	0	0	100
bis(2-ethylhexyl) azelaate	150	—	200	1	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
	300	—	200	2	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88
	600	—	200	0	0	—	0	0	0	1	0	1	1	0.5	0.5	0	0	70
	1200 <sup>#</sup>	—	200	0	0	—	0	0	2	0	0	0	2	1.0	1.0	0	0	51
	2400 <sup>#</sup>	—	200	0	0	—	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	0	0	39
Mitomycin C	0.1	—	200	0	0	—	0	0	63	0	71	0	111	55.5	55.5	0	0	83

Negative control: Absolute ethanol.

a): (Polyploid cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctg: chromatid gap; csg: chromosome gap; ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): {bis(2-ethylhexyl)azelaate treated group or non-treatment control or positive control / negative control} × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

#: Colorless clear fine oil drop-like precipitations were noted in the culture fluid in petri plate.

Table 4. Chromosomal Aberration Test of bis(2-ethylhexyl)azelaate in Cultured Chinese Hamster Cells  
 — The continuous treatment method —

Test substance	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	No. of polyploid cells	Incidence <sup>a)</sup> (%)	Judgement <sup>b)</sup>	Structural aberrations										Survival ratio <sup>e)</sup> (%)		
							Types <sup>c)</sup> and numbers (cumulative)			No. of cells with chromosome aberration		Incidence <sup>d)</sup> (%)	Judgement <sup>b)</sup>						
							ctg	csg	ctb	csb	cte			cse	fig	(+g)		(-g)	(+g)
Non-treatment control	—	24	200	0	0	—	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	97
Negative control	—	24	200	2	1.0	—	0	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	100
bis(2-ethylhexyl) azelate	37.5	24	200	1	0.5	—	0	0	2	0	1	0	0	3	3	1.5	1.5	—	97
	75	24	200	4	2.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98
	150	24	200	1	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	87
	300	24	200	1	0.5	—	0	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	56
	600	24	200	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	35
Mitomycin C	0.05	24	200	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	86

Negative control: Absolute ethanol.

a): (Polyploid cells / observed metaphase cells)  $\times$  100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%);  $\pm$ : equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctg: chromatid gap; csg: chromosome gap; ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells)  $\times$  100.

e): {bis(2-ethylhexyl)azelaate treated group or non-treatment control or positive control / negative control}  $\times$  100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

#: Colorless clear fine oil drop-like precipitations were noted in the culture fluid in petri plate.



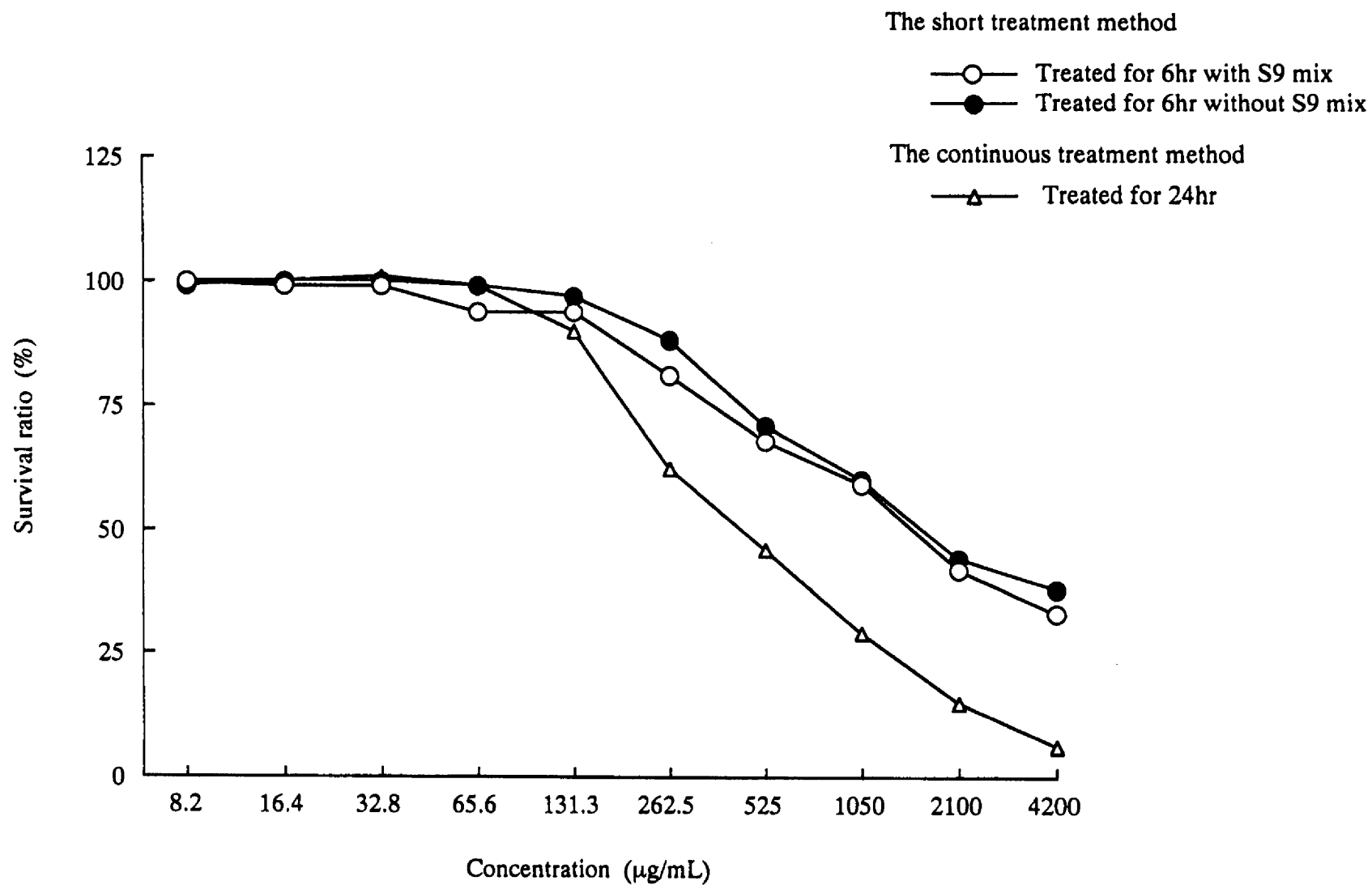


Figure 1. Cell Growth Inhibition Test of Bis-(2-Ethylhexyl)nonanedioate in Cultured Chinese Hamster Cells