

# 最終報告書

2-tert-ブトキシエタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：4792 ( 115-134 )

平成13年6月4日

試験委託者  
厚生労働省 医薬局

財団法人  
食品農医薬品安全性評価センター

## 目 次

1. 要約.....	3
2. 表題.....	4
3. 試験目的.....	4

12. 被験物質.....	6
13. 試験材料および方法.....	8
14. 試験結果.....	15
15. 考察および結論.....	16
16. 参考文献.....	17
17. 参考とした資料.....	17

Figures		F-01~10
Figure 1	Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA100	F-01
Figure 2	Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA1535	F-02
Figure 3	Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-03
Figure 4	Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA98	F-04
Figure 5	Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA1537	F-05
Figure 6	Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA100	F-06
Figure 7	Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA1535	F-07
Figure 8	Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-08
Figure 9	Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA98	F-09
Figure 10	Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA1537	F-10

Tables		T-1~4
Table 1	Summary data of dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- [non-activation method : -S9]	T-1
Table 2	Summary data of dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- [non-activation method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- [activation method : +S9]	T-4

## 1. 要約

本試験条件下において、2-tert-ブトキシエタノールには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

2-tert-ブトキシエタノールの変異原性について、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, TA98, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、2-tert-ブトキシエタノール処理では 2.29~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  のいずれの試験用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

一方、代謝活性化系非存在下 (-S9 mix 処理) および代謝活性化系存在下 (+S9 mix 処理) での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

以上の試験結果には再現性が認められた。

2. 表題

2-tert-ブトキシエタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討した.

## 12. 被験物質

## 12.1. 被験物質名

2-tert-ブトキシエタノール

## 12.2. ロット番号

## 12.3. 純度／含量

99.98 wt%

## 12.4. 不純物の名称／純度

水分 0.2 wt%以下

遊離酸 (酢酸換算) 0.01 wt%以下

## 12.5. 提供元

## 12.6. 製造年月日

平成 12 年 1 月 12 日 (採取)

## 12.7. 一般名

スワソルブ ETB (エチレングリコールモノターシャリーブチルエーテル)

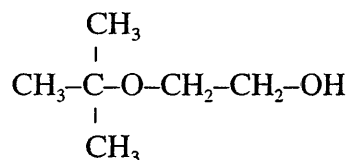
## 12.8. 化学名

Ethanol, 2-tert-butoxy-(Ethylene glycol mono-tert-butyl ether)

## 12.9. CAS No.

7580-85-0

## 12.10. 化学構造



## 12.11. 分子式

 $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2$ 

## 12.12. 分子量

118.18

## 12.13. 物質の状態

無色透明液体

- 12.14. 融点／沸点  
-120℃以下／152℃
- 12.15. 溶解性  
水およびアルコールに溶解
- 12.16. 安定性 (水, 熱, 光等)  
通常の取り扱いでは安定
- 12.17. 分配係数  
Log Pow 0.36
- 12.18. 蒸気圧 (20℃)  
213.3 Pa
- 12.19. 取り扱い上の注意  
引火性液体であり, 皮膚, 眼に刺激性があるため, 取り扱いには充分注意した。  
廃棄する際には, ケイソウ土等に吸収させ, 焼却炉で少量ずつ焼却した。
- 12.20. 残余被験物質の処理  
被験物質の一部を保管した後, 残りは被験物質提供元に返却した。

### 13. 試験材料および方法

#### 13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、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	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学

から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。

平成12年6月20日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO:GC用;Merck KGaA;純度99.7%以上, Lot No. K24605778 830)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-U71V;三洋電機メディカシステム株式会社)に保存(-80℃)した。

#### 13.2. 培地の調製

##### 13.2.1. 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(オリエンタル酵母工業株式会社:平成12年5月25日製造, Lot No. ANI330EP)を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地Eを含む組成の溶液30 mLを無菌的にシャーレに分注したものである。



最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示す。

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸・1水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	10	g
リン酸一アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
グルコース	20	g
寒天（伊那寒天 BA-30A；Lot No. 90705）	15	g
精製水	1000	mL

### 13.2.2. トップアガー（軟寒天）

塩化ナトリウム 0.5 w/v% および寒天（Bacto-agar；Difco Laboratories；Lot No. 120535JD）0.6 w/v% を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した後、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン（関東化学株式会社；Lot No. 911S1877）-0.5 mmol/L D-ビオチン（関東化学株式会社；Lot No. 811S2086）水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン（関東化学株式会社；Lot No. 608E1385）水溶液を同じく 1 容量加えた。

### 13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバッ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；Oxoid Limited；Lot No. 028 59365）培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50  $\mu$ L 接種した。培養開始までの間冷却ユニット（ECS-1；東京理化工業株式会社）を用いて 4°C に保存し、その後ウォーターバスシェーカー（MM-10；タイテック株式会社）を用い、37°C で 8 時間振盪（100 回/分）培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATP フォトメーター (ルミテスター K-100: キッコーマン株式会社) を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試験	試験生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.67	3.42	3.87	3.57	1.98
本試験	3.42	3.23	3.29	3.12	1.79

#### 13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社; Lot No. FSM-427) を試験に使用した。

##### 13.4.1. 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した。

ロット番号	RAA-427
製造年月日	平成 12 年 5 月 26 日 (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	205~246 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)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	26.76 mg/mL

## 13.4.2. S9 mix の組成

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

## 13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に易溶であり、かつ水溶液中で安定であるため、被験物質を注射用水 (株式会社大塚製薬工場; Lot No. K9G83) に溶解し、調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて順次希釈した後、速やかに処理を行った。

## 13.6. 対照群

## 13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒で試験した。

## 13.6.2. 陽性対照

陽性対照として以下の物質を使用した。各陽性対照物質は DMSO (Lot No. K24605778 909) を用いて溶解し、小分けした後凍結保存 (-20°C) したものを試験に使用した。

AF-2	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (和光純薬工業株式会社; 純度 98.0~102.0%; Lot No. PAN0050)
NaN <sub>3</sub>	アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社; 純度 99.0%以上; Lot No. TPR1596)
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩 (Aldrich Chemical Co., Inc.; 純度 98.0%; Lot No. 03024JR)
2-AA	2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社; 純度 90.0%以上; Lot No. DLH6052)

## 《代謝活性化系非存在下》

AF-2	0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA100)
AF-2	0.1           〃	(ネズミチフス菌：TA98)
$\text{NaN}_3$	0.5           〃	(ネズミチフス菌：TA1535)
9-AA	80           〃	(ネズミチフス菌：TA1537)
AF-2	0.01       〃	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i> )

## 《代謝活性化系存在下》

2-AA	1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA100)
2-AA	0.5       〃	(ネズミチフス菌：TA98)
2-AA	2       〃	(ネズミチフス菌：TA1535)
2-AA	2       〃	(ネズミチフス菌：TA1537)
2-AA	10       〃	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i> )

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

## 13.6.3. 無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100  $\mu\text{L}$  あるいは S9 mix 500  $\mu\text{L}$  にトッパアガーをそれぞれ 2 mL 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。

2-tert-ブトキシエタノール調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

### 13.7. 用量設定試験 (予備試験)

#### 13.7.1. 試験用量

5000, 1667, 556, 185, 61.7, 20.6, 6.86 および 2.29  $\mu\text{g}$ /プレートの 8 用量 (公比 3) を設定した。

#### 13.7.2. 使用プレート数および識別

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

試験菌株の別, S9 mix の有無および試験用量を明記することにより各プレートを識別した。

#### 13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

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  $\mu\text{L}$ , 次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 mix) の場合, 0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500  $\mu\text{L}$ , 代謝活性化系存在下 (+S9 mix) の場合, S9 mix を 500  $\mu\text{L}$  分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100  $\mu\text{L}$  を加えた後, 振盪恒温器 (M-100<sup>N</sup>: タイテック株式会社) を用いて 37°C で 20 分間振盪 (プレインキュベーション) した。振盪終了後, トップアガーを 2 mL 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。恒温器を用いて 37°C の条件で 48 時間各プレートを培養した。

#### 13.7.4. 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 ( $\times 60$ ) を用いて観察した。さらに被験物質の沈殿状態を肉眼で観察した。次いで, 復帰突然変異により生じたコロニーを計測した。計測に際しては, コロニーアナライザー (CA-11; システムサイエンス株式会社) 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。

**13.8. 復帰突然変異試験****13.8.1. 試験用量**

用量設定試験結果を基に、本試験においては以下に示した用量を最高用量とし、それぞれ6用量（公比2）を設定した。

試験系	最高用量 (μg/プレート)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
代謝活性化系 非存在下	5000	5000	5000	5000	5000
代謝活性化系 存在下	5000	5000	5000	5000	5000

**13.8.2. 使用プレート数および識別**

13.7.2.に準じた。

**13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間**

13.7.3.に準じた。

**13.8.4. コロニー数計測**

13.7.4.に準じた。

**13.9. 結果の解析**

復帰突然変異コロニー数が陰性対照のほぼ2倍以上の増加を示し、かつ再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

## 14. 試験結果

### 14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

2-tert-ブトキシエタノール処理での復帰突然変異コロニー数は、代謝活性化系非存在下ならびに代謝活性化系存在下で各試験菌株のいずれの用量においても明確な増加傾向は認められなかった。また、各試験菌株のいずれの処理群においても、生育阻害作用は観察されなかった。

一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、陰性対照の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。

### 14.2. 被験物質の析出等（用量設定試験）

コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

### 14.3. 復帰突然変異試験

試験結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示した。

被験物質処理群の場合、代謝活性化系非存在下、代謝活性化系存在下ともいずれの菌株においても復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。また、各試験菌株のいずれの処理群においても、試験菌株に対する生育阻害作用が観察されなかった。

一方、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。

### 14.4. 被験物質の析出等（復帰突然変異試験）

コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

## 15. 考察および結論

2-tert-ブトキシエタノールの変異原性、すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、微生物（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

最高用量として5000 µg/プレートの用量まで検討した。その結果、2-tert-ブトキシエタノール処理群では代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照と比較し復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

本被験物質 2-tert-ブトキシエタノールの変異原性に関する報告はなかった。類縁体である n-ブトキシエタノールは細胞を用いる遺伝子突然変異試験で陰性<sup>1)</sup>との報告がある。また、n-ブトキシエタノールは TA97a 株を用いた Ames 試験<sup>2)</sup>、V79 細胞を用いた HPRT 試験<sup>3)</sup>、ヒトリンパ球を用いた姉妹染色分体交換試験 (SCE)<sup>4)</sup>、SHE 細胞を用いた細胞形質転換試験<sup>5)</sup>ならびに V79 細胞を用いた代謝共同阻害試験<sup>3)</sup>でいずれも陽性との報告があるが、陰性報告も多数ある。Barry M. Elliott および John Ashby によるレビューで報告された各種のデータによれば n-ブトキシエタノールには遺伝毒性はないと結論している<sup>6)</sup>。

これら両試験系での試験結果は、用量設定試験および本試験において再現性が確認された。

なお、陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数はいずれも当施設での背景データ (Appendix 1) の範囲内であり、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、本試験条件下において 2-tert-ブトキシエタノールの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。



16. 参考文献

- 1) Chiewchanwit T., Au W.W. : Mutat. Res, 334(4) : 341-346, (1995).
- 2) Hoflack J.C., Lambolez L., Elias Z., Vasseur P. : Mutat. Res., 341 : 281-287, (1995).
- 3) Elias Z., Daniere M.C., Marande, A.M., Poirot O., Terzetti F., Schneider O. : Occup. Hyg., 2 : 187-212, (1996).
- 4) Villalobos-Pietrini R., Gomez-Arroyo S., Altamirano-Lozano M., Orozco R., Rios P. : Res. Int. Contam. Ambient : 5 : 41-78, (1989).
- 5) Kerckaert G.A., Brauninger, R., Le Boeuf R.A., Isfort R.J. : Environ. Health Perspect, 104 : 1075-1084, (1996).
- 6) Elliott B.M., Ashby J. : Mutat. Res., 387 : 89-96, (1997).

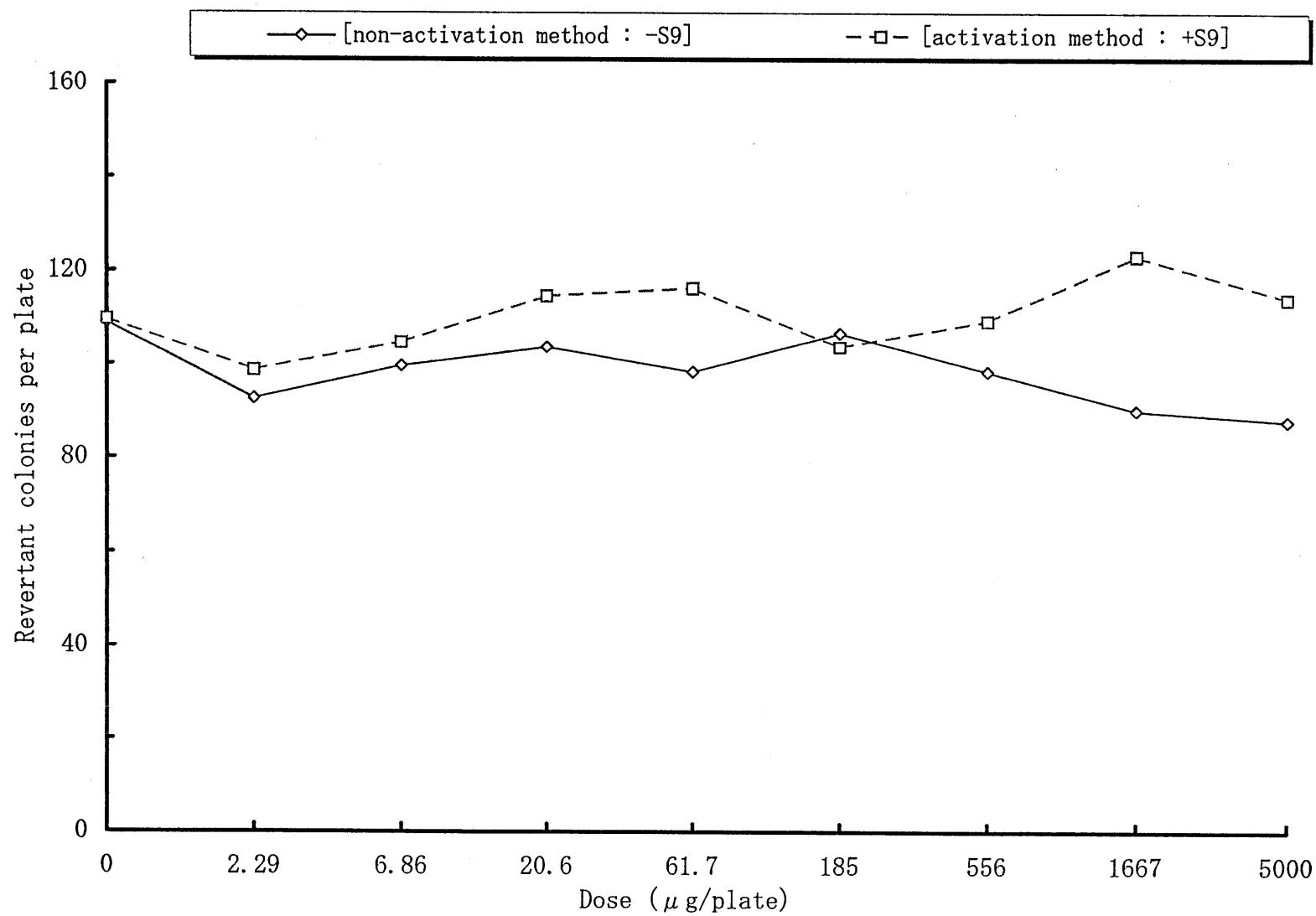


Figure 1. Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA100

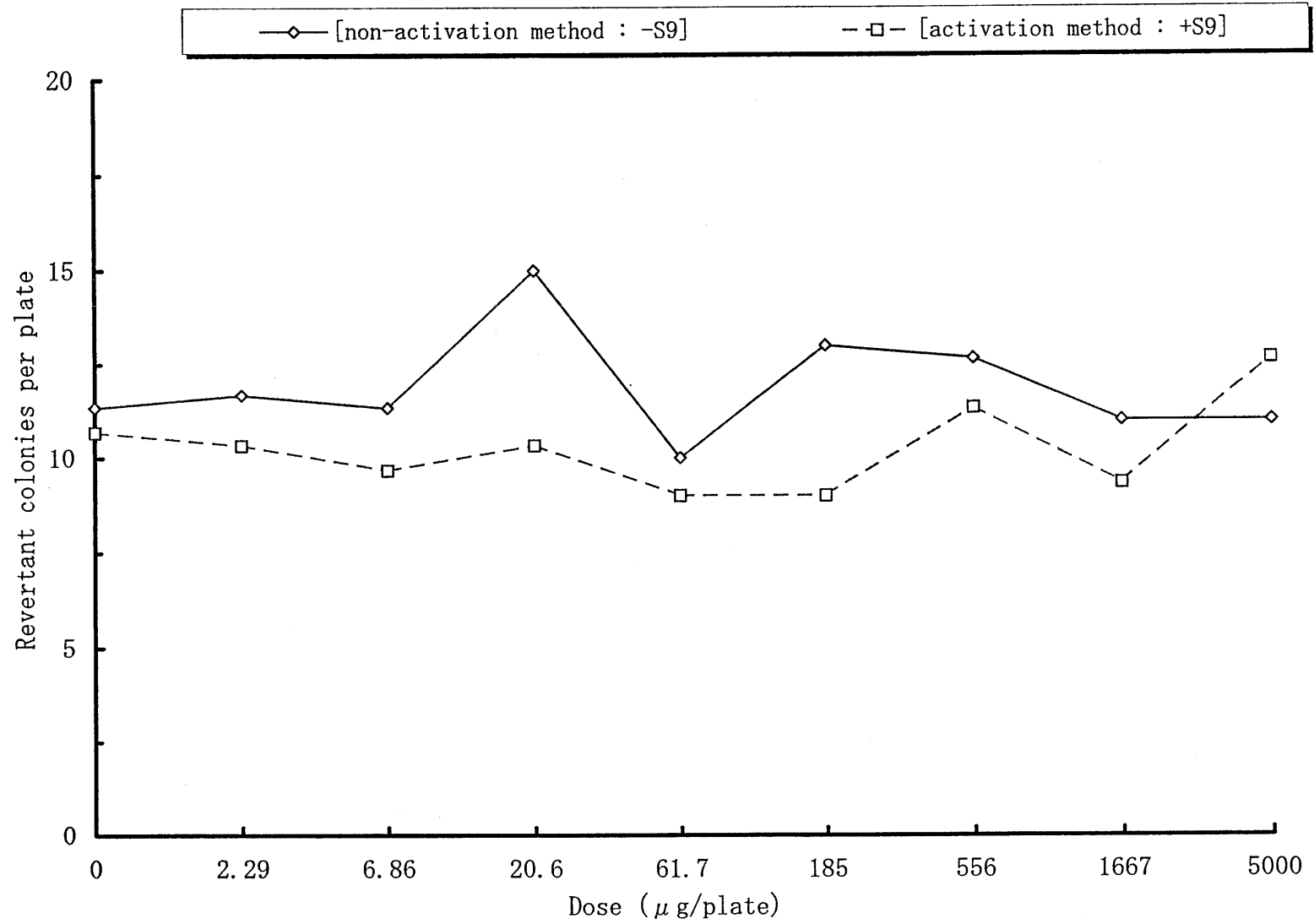


Figure 2. Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA1535

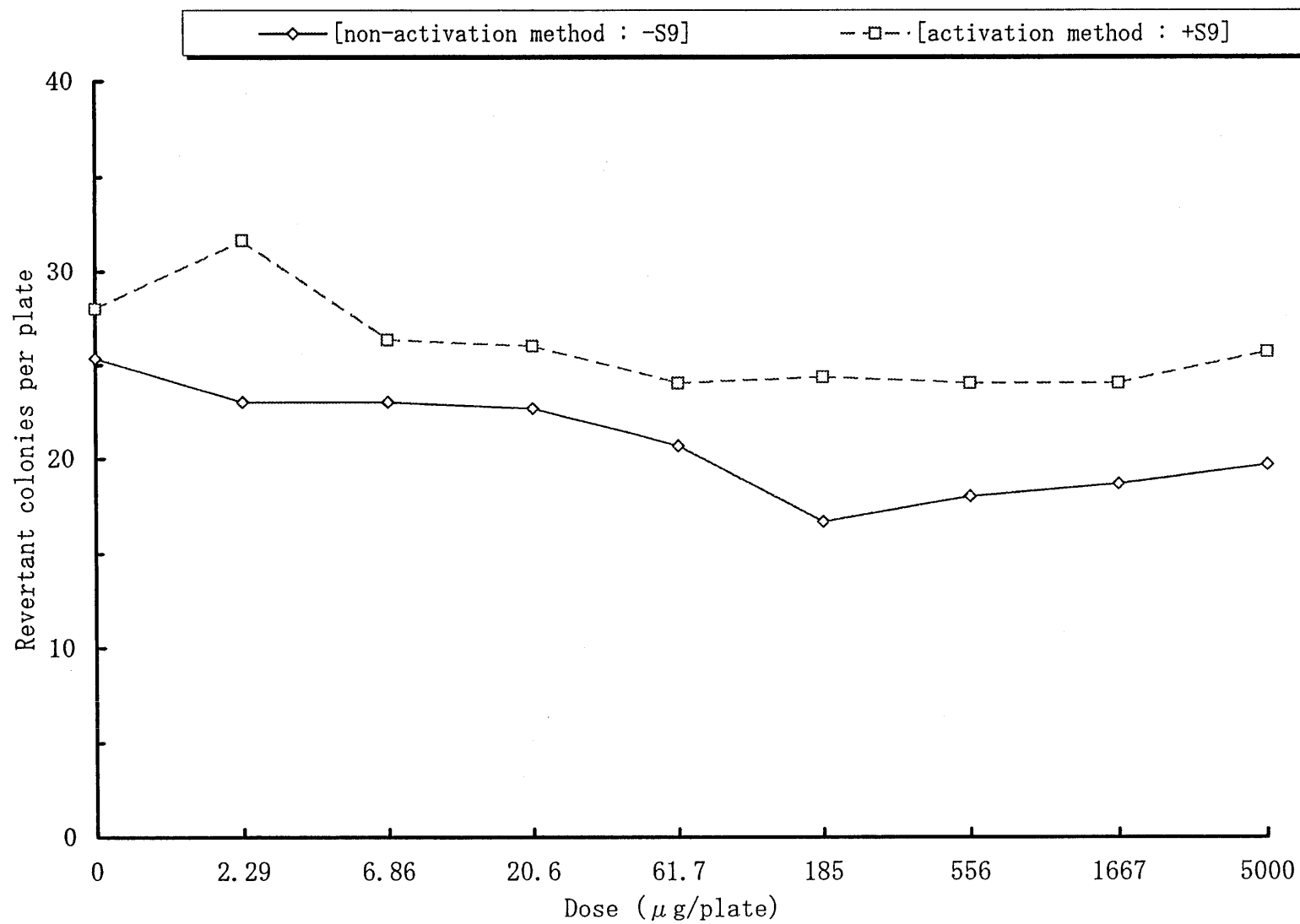


Figure 3. Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- strain WP2uvrA

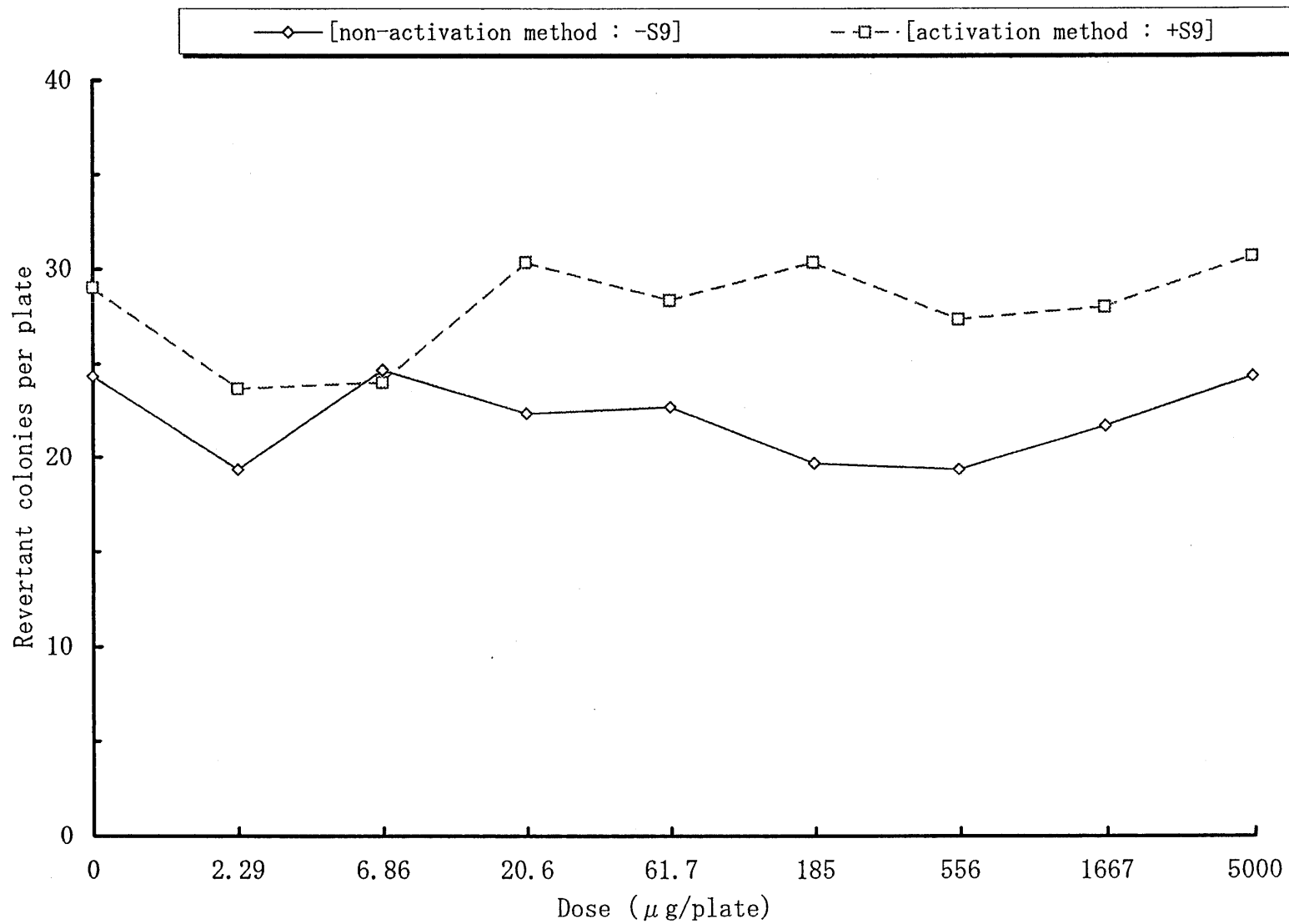


Figure 4. Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA98

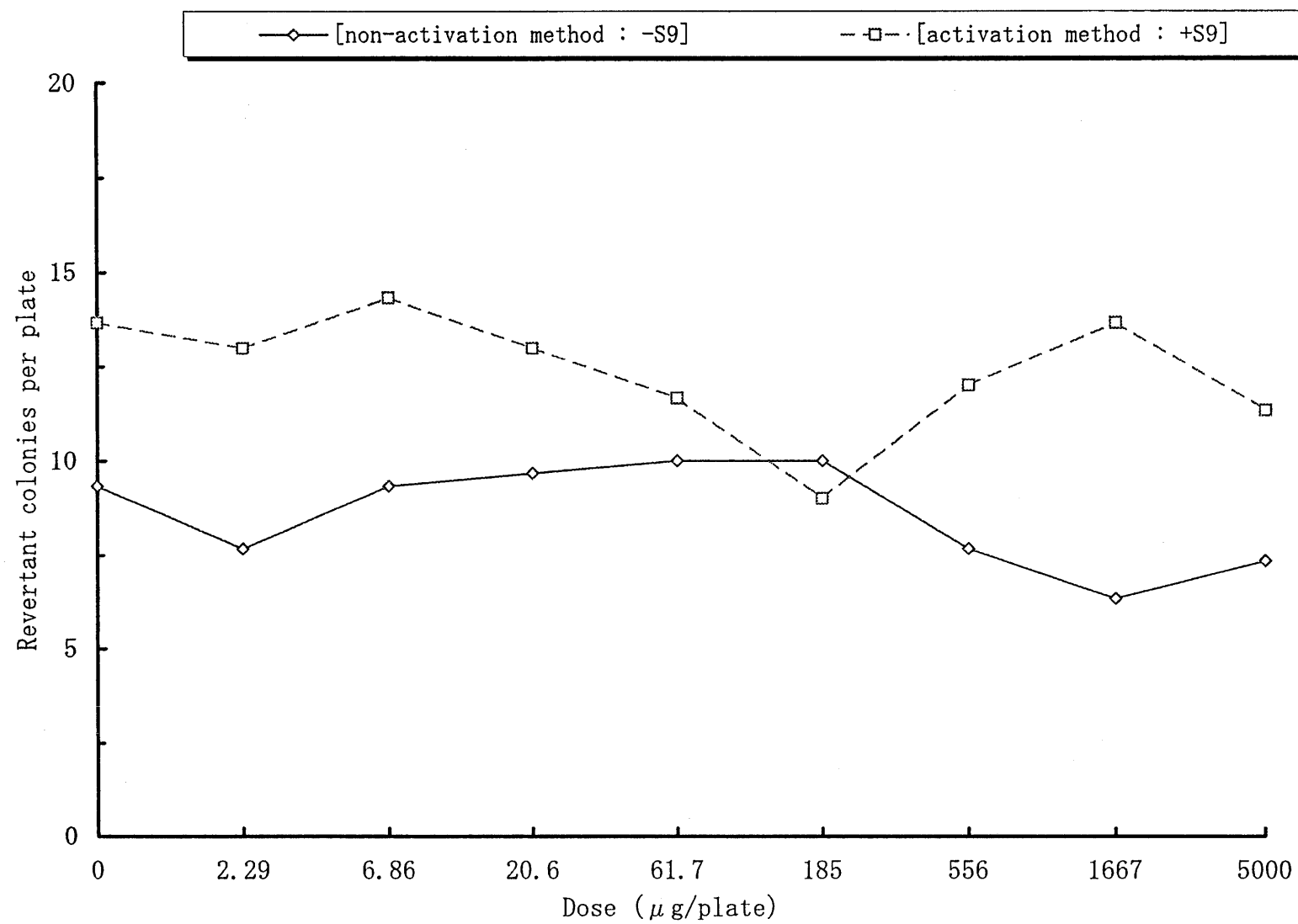


Figure 5. Dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA1537

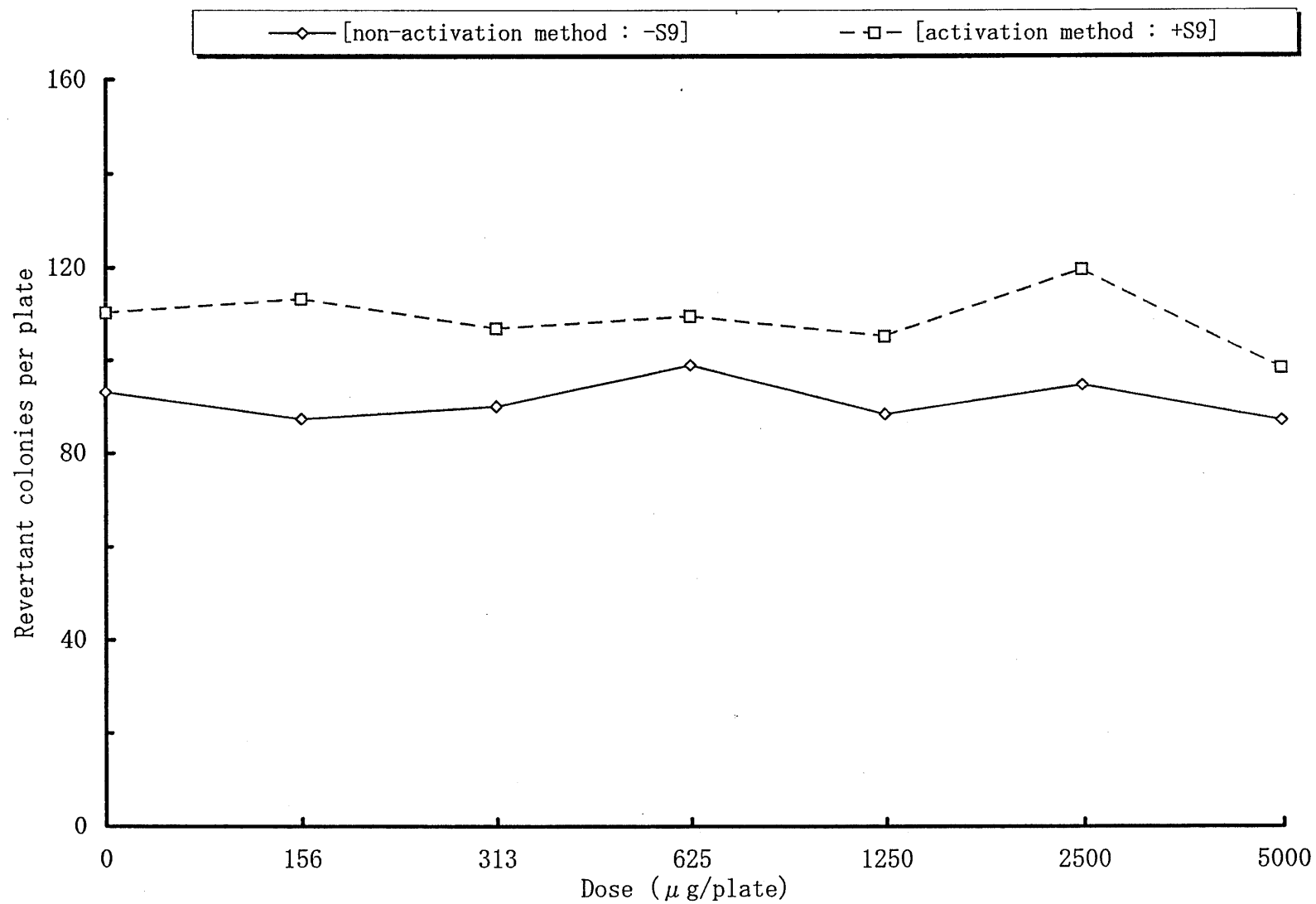


Figure 6. Bacterial reversion test of Ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA100

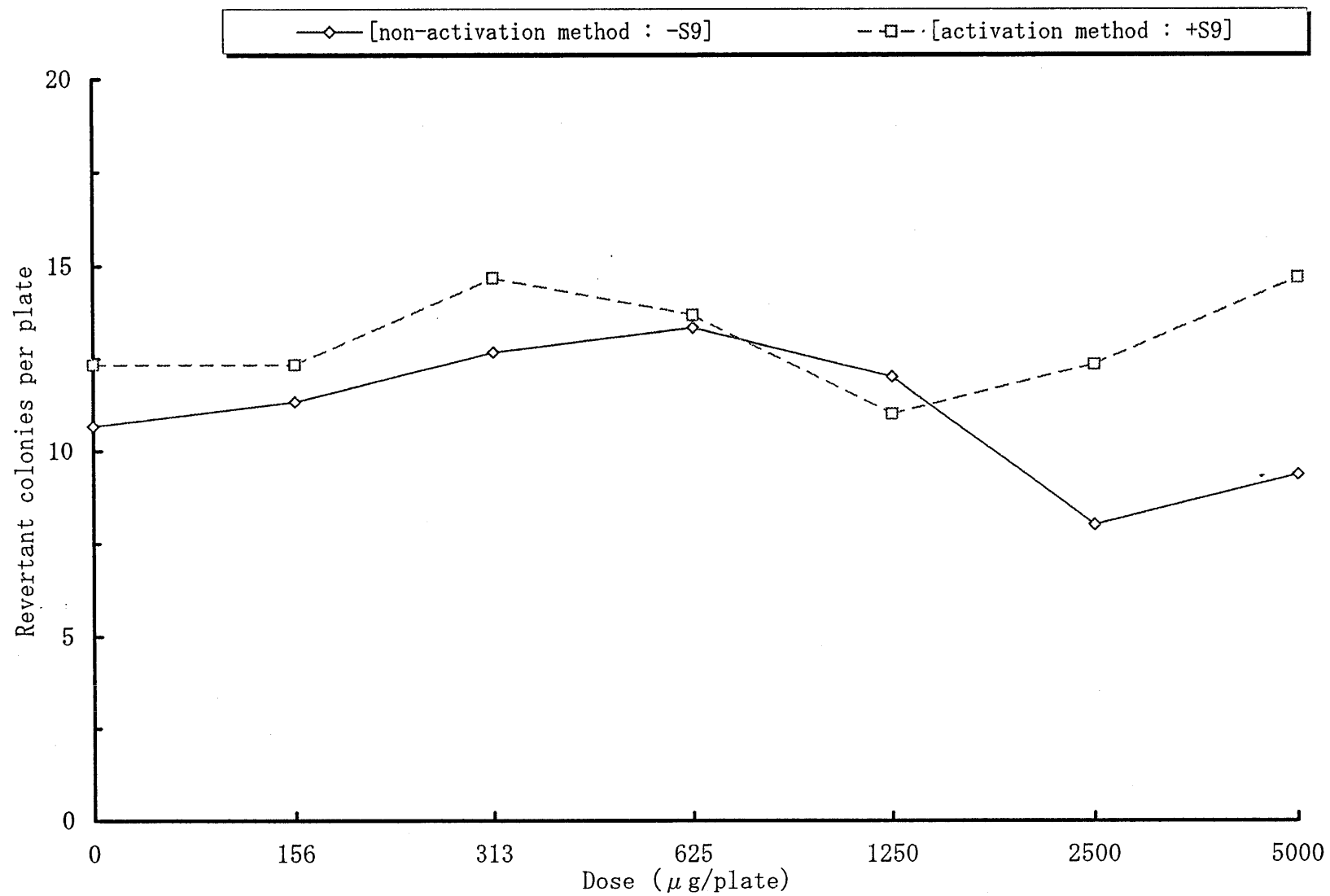


Figure 7. Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA1535



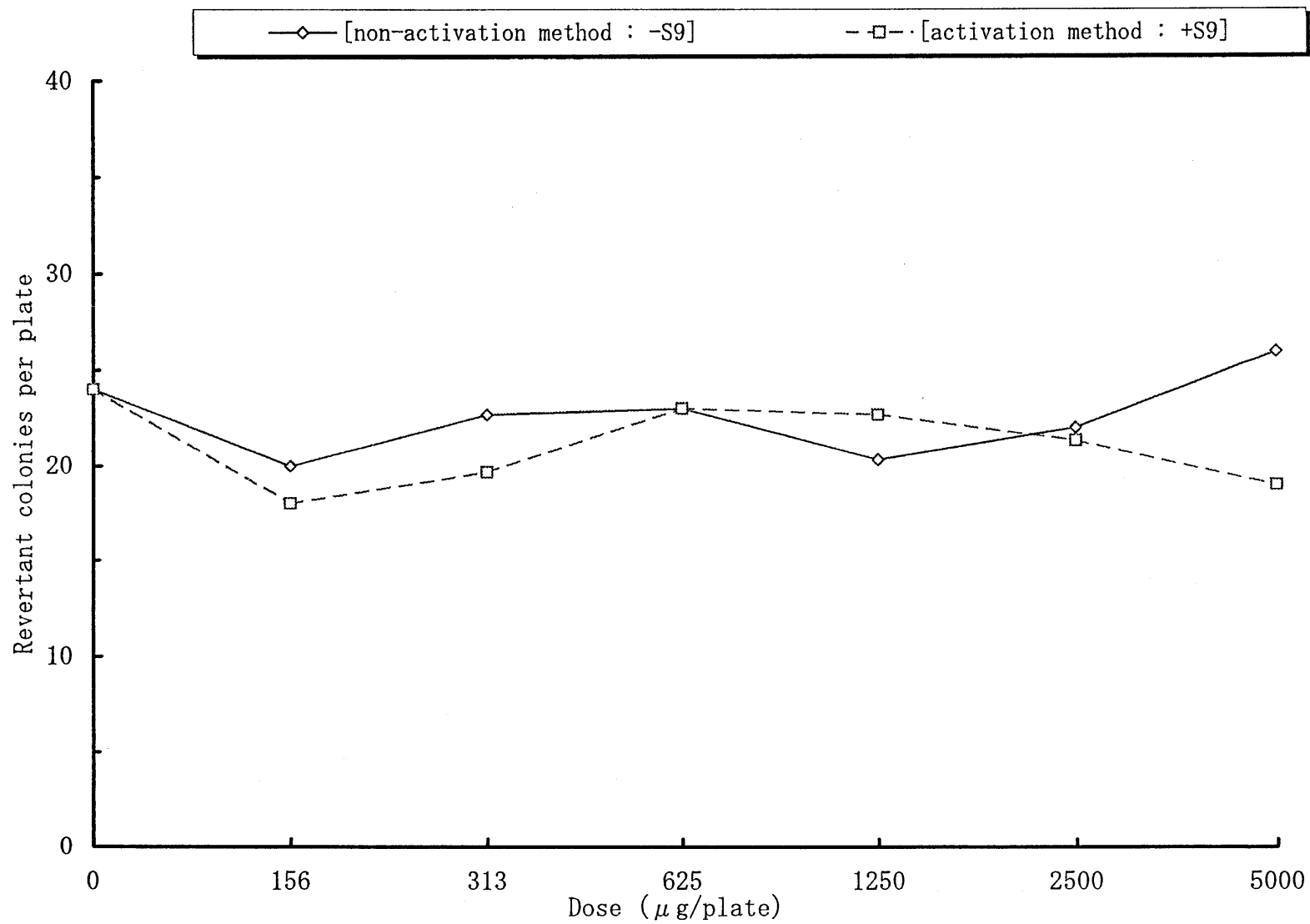


Figure 8. Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain WP2uvrA

F-09

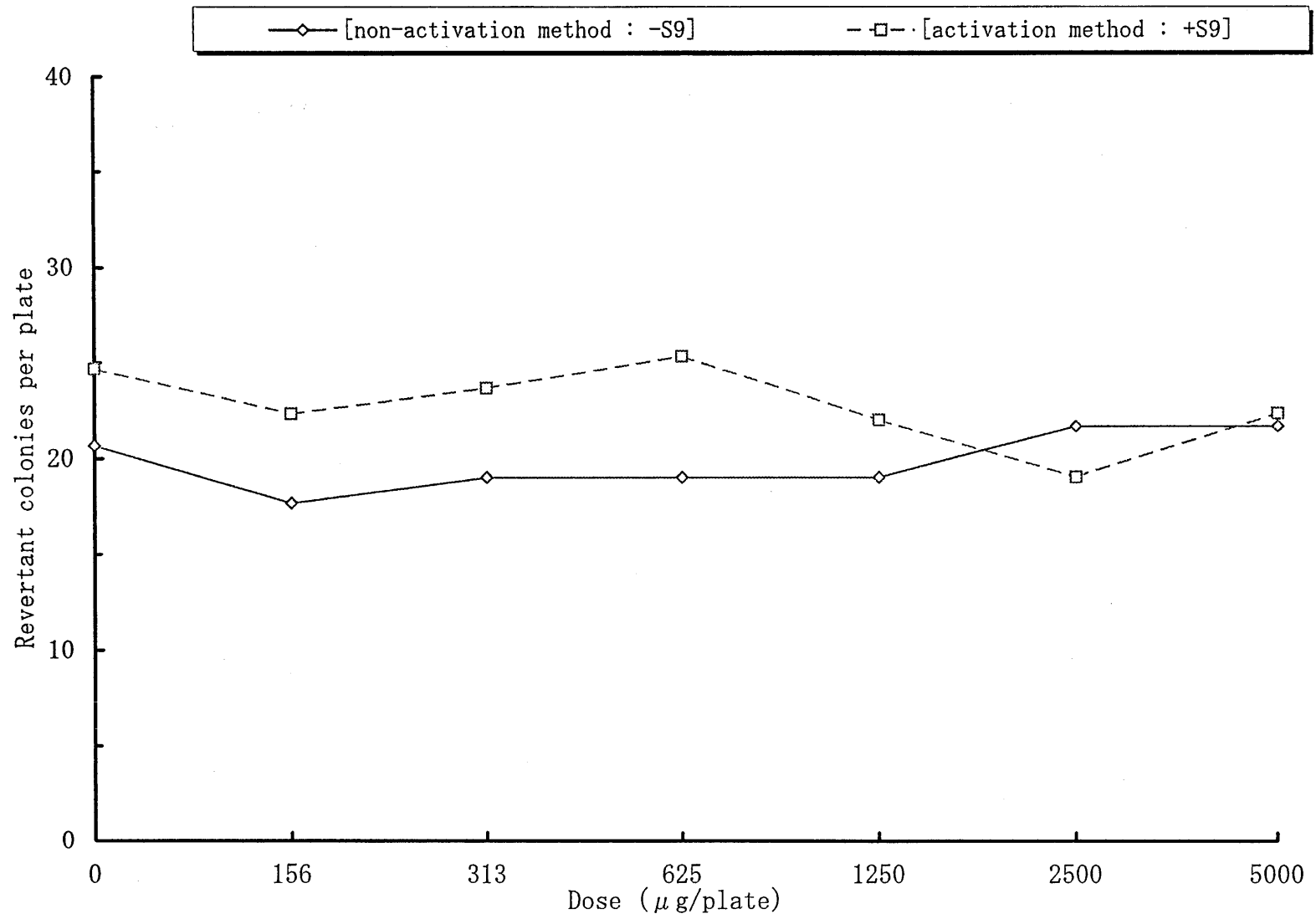


Figure 9. Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA98

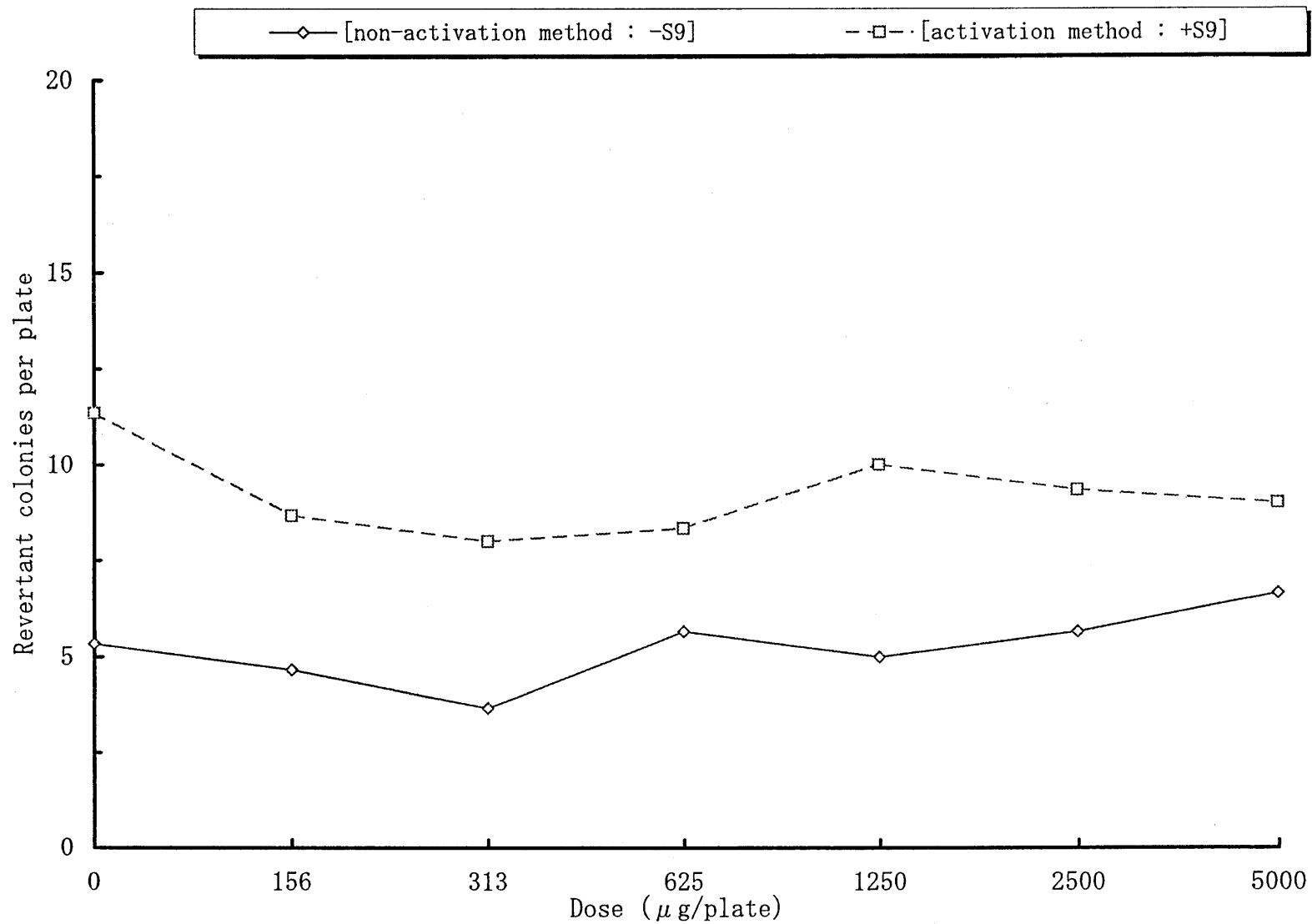


Figure 10. Bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy- in strain TA1537

Table 1. Summary data of dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy-  
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	106	113	108	10	9	15	20	28	28	26	22	25	8	10	10
		[109 $\pm$	4]		[11 $\pm$	3]		[25 $\pm$	5]		[24 $\pm$	2]		[9 $\pm$	1]	
	2.29	92	98	88	15	11	9	21	22	26	16	20	22	8	9	6
		[93 $\pm$	5]		[12 $\pm$	3]		[23 $\pm$	3]		[19 $\pm$	3]		[8 $\pm$	2]	
	6.86	107	98	94	11	13	10	20	26	23	21	30	23	12	8	8
		[100 $\pm$	7]		[11 $\pm$	2]		[23 $\pm$	3]		[25 $\pm$	5]		[9 $\pm$	2]	
	20.6	99	105	107	16	15	14	25	20	23	24	23	20	9	9	11
		[104 $\pm$	4]		[15 $\pm$	1]		[23 $\pm$	3]		[22 $\pm$	2]		[10 $\pm$	1]	
	61.7	92	116	87	10	12	8	17	21	24	27	23	18	9	8	13
		[98 $\pm$	16]		[10 $\pm$	2]		[21 $\pm$	4]		[23 $\pm$	5]		[10 $\pm$	3]	
	185	96	120	104	14	13	12	17	18	15	19	21	19	9	12	9
		[107 $\pm$	12]		[13 $\pm$	1]		[17 $\pm$	2]		[20 $\pm$	1]		[10 $\pm$	2]	
	556	88	98	109	14	9	15	25	15	14	18	22	18	9	5	9
		[98 $\pm$	11]		[13 $\pm$	3]		[18 $\pm$	6]		[19 $\pm$	2]		[8 $\pm$	2]	
	1667	95	90	85	12	12	9	18	17	21	24	18	23	6	4	9
		[90 $\pm$	5]		[11 $\pm$	2]		[19 $\pm$	2]		[22 $\pm$	3]		[6 $\pm$	3]	
	5000	93	93	77	12	9	12	24	18	17	31	22	20	8	6	8
		[88 $\pm$	9]		[11 $\pm$	2]		[20 $\pm$	4]		[24 $\pm$	6]		[7 $\pm$	1]	
Positive control		459	521	508 <sup>a)</sup>	509	485	444 <sup>b)</sup>	152	173	161 <sup>a)</sup>	702	682	613 <sup>c)</sup>	327	342	433 <sup>d)</sup>
		[496 $\pm$	33]		[479 $\pm$	33]		[162 $\pm$	11]		[666 $\pm$	47]		[367 $\pm$	57]	

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b): NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
c): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2. Summary data of dose-finding study with ethanol, 2-tert-butoxy-  
[activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	117	111	101	8	12	12	26	31	27	30	30	27	14	15	12
		[110 $\pm$		8]	[ 11 $\pm$		2]	[ 28 $\pm$		3]	[ 29 $\pm$		2]	[ 14 $\pm$		2]
	2.29	102	99	95	11	14	6	30	26	39	27	25	19	13	14	12
		[ 99 $\pm$		4]	[ 10 $\pm$		4]	[ 32 $\pm$		7]	[ 24 $\pm$		4]	[ 13 $\pm$		1]
	6.86	110	103	101	13	6	10	29	28	22	20	30	22	13	11	19
		[105 $\pm$		5]	[ 10 $\pm$		4]	[ 26 $\pm$		4]	[ 24 $\pm$		5]	[ 14 $\pm$		4]
	20.6	118	108	118	10	10	11	23	24	31	32	29	30	18	9	12
		[115 $\pm$		6]	[ 10 $\pm$		1]	[ 26 $\pm$		4]	[ 30 $\pm$		2]	[ 13 $\pm$		5]
	61.7	133	102	114	9	10	8	23	25	24	33	25	27	8	16	11
	[116 $\pm$		16]	[ 9 $\pm$		1]	[ 24 $\pm$		1]	[ 28 $\pm$		4]	[ 12 $\pm$		4]	
185	113	86	112	11	8	8	29	22	22	28	35	28	10	8	9	
	[104 $\pm$		15]	[ 9 $\pm$		2]	[ 24 $\pm$		4]	[ 30 $\pm$		4]	[ 9 $\pm$		1]	
556	123	91	114	11	13	10	21	26	25	21	32	29	15	9	12	
	[109 $\pm$		17]	[ 11 $\pm$		2]	[ 24 $\pm$		3]	[ 27 $\pm$		6]	[ 12 $\pm$		3]	
1667	129	133	107	7	10	11	28	25	19	27	30	27	15	15	11	
	[123 $\pm$		14]	[ 9 $\pm$		2]	[ 24 $\pm$		5]	[ 28 $\pm$		2]	[ 14 $\pm$		2]	
5000	128	103	111	13	15	10	21	26	30	28	32	32	14	9	11	
	[114 $\pm$		13]	[ 13 $\pm$		3]	[ 26 $\pm$		5]	[ 31 $\pm$		2]	[ 11 $\pm$		3]	
Positive control		802	798	849 <sup>a)</sup>	408	427	415 <sup>b)</sup>	738	702	635 <sup>c)</sup>	416	449	530 <sup>d)</sup>	173	151	139 <sup>b)</sup>
		[816 $\pm$		28]	[417 $\pm$		10]	[692 $\pm$		52]	[465 $\pm$		59]	[154 $\pm$		17]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu$ g/plate    b) : 2-AA, 2  $\mu$ g/plate    c) : 2-AA, 10  $\mu$ g/plate    d) : 2-AA, 0.5  $\mu$ g/plate

Table 3. Results of the bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy-  
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	96	94	89	10	11	11	22	22	28	22	24	16	5	6	5
		[ 93 $\pm$	4]	[ 11 $\pm$	1]	[ 24 $\pm$	3]	[ 21 $\pm$	4]	[ 5 $\pm$	1]					
	156	89	81	92	13	9	12	23	15	22	17	16	20	7	4	3
		[ 87 $\pm$	6]	[ 11 $\pm$	2]	[ 20 $\pm$	4]	[ 18 $\pm$	2]	[ 5 $\pm$	2]					
	313	83	92	95	14	10	14	21	25	22	22	16	19	3	3	5
		[ 90 $\pm$	6]	[ 13 $\pm$	2]	[ 23 $\pm$	2]	[ 19 $\pm$	3]	[ 4 $\pm$	1]					
	625	104	102	91	14	13	13	17	28	24	14	20	23	7	7	3
	[ 99 $\pm$	7]	[ 13 $\pm$	1]	[ 23 $\pm$	6]	[ 19 $\pm$	5]	[ 6 $\pm$	2]						
1250	88	91	86	15	10	11	22	21	18	19	19	19	4	8	3	
	[ 88 $\pm$	3]	[ 12 $\pm$	3]	[ 20 $\pm$	2]	[ 19 $\pm$	0]	[ 5 $\pm$	3]						
2500	85	109	90	9	7	8	20	26	20	22	18	25	6	4	7	
	[ 95 $\pm$	13]	[ 8 $\pm$	1]	[ 22 $\pm$	3]	[ 22 $\pm$	4]	[ 6 $\pm$	2]						
5000	87	86	88	9	10	9	24	28	26	19	24	22	9	7	4	
	[ 87 $\pm$	1]	[ 9 $\pm$	1]	[ 26 $\pm$	2]	[ 22 $\pm$	3]	[ 7 $\pm$	3]						
Positive control		424	373	390 <sup>a)</sup>	423	377	472 <sup>b)</sup>	115	127	118 <sup>a)</sup>	563	552	524 <sup>c)</sup>	448	510	452 <sup>d)</sup>
		[396 $\pm$	26]	[424 $\pm$	48]	[120 $\pm$	6]	[546 $\pm$	20]	[470 $\pm$	35]					

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu$ g/plate    b): NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu$ g/plate

c): AF-2, 0.1  $\mu$ g/plate    d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu$ g/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of ethanol, 2-tert-butoxy-  
[activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	116	103	112	12	12	13	26	20	26	25	25	24	12	11	11
		[110 $\pm$		7]	[12 $\pm$		1]	[24 $\pm$		3]	[25 $\pm$		1]	[11 $\pm$		1]
	156	126	112	102	15	10	12	16	21	17	19	28	20	8	10	8
		[113 $\pm$		12]	[12 $\pm$		3]	[18 $\pm$		3]	[22 $\pm$		5]	[9 $\pm$		1]
	313	102	109	110	15	17	12	18	24	17	22	27	22	10	7	7
		[107 $\pm$		4]	[15 $\pm$		3]	[20 $\pm$		4]	[24 $\pm$		3]	[8 $\pm$		2]
	625	108	102	119	12	12	17	25	19	25	25	28	23	11	7	7
	[110 $\pm$		9]	[14 $\pm$		3]	[23 $\pm$		3]	[25 $\pm$		3]	[8 $\pm$		2]	
1250	94	116	106	7	15	11	20	19	29	18	23	25	6	14	10	
	[105 $\pm$		11]	[11 $\pm$		4]	[23 $\pm$		6]	[22 $\pm$		4]	[10 $\pm$		4]	
2500	118	124	117	16	13	8	21	21	22	16	20	21	10	7	11	
	[120 $\pm$		4]	[12 $\pm$		4]	[21 $\pm$		1]	[19 $\pm$		3]	[9 $\pm$		2]	
5000	81	120	94	13	16	15	21	18	18	23	22	22	10	9	8	
	[98 $\pm$		20]	[15 $\pm$		2]	[19 $\pm$		2]	[22 $\pm$		1]	[9 $\pm$		1]	
Positive control		878	881	855 <sup>a)</sup>	399	389	393 <sup>b)</sup>	786	706	777 <sup>c)</sup>	450	406	434 <sup>d)</sup>	183	164	173 <sup>b)</sup>
		[871 $\pm$		14]	[394 $\pm$		5]	[756 $\pm$		44]	[430 $\pm$		22]	[173 $\pm$		10]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu$ g/plate    b) : 2-AA, 2  $\mu$ g/plate    c) : 2-AA, 10  $\mu$ g/plate    d) : 2-AA, 0.5  $\mu$ g/plate