

---

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の細菌を用いる復帰突然変異試験

---

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	.....	10
方 法	.....	10
1. 被験物質，陽性対照物質，媒体対照物質および陰性対照物質	.....	10
2. 検体液	.....	11
3. 試験菌株	.....	12
4. S9 mix	.....	13
5. 培地	.....	13
6. 無菌試験	.....	13
7. 試験方法	.....	14
8. 試験の成立条件	.....	15
9. 統計学的方法	.....	15
10. 判定基準	.....	15
試験成績	.....	16
1. 用量設定試験	.....	16
2. 本試験( I )および本試験( II )	.....	16
考 察	.....	17
文 献	.....	17

## Attachment, TableおよびFigureの目次

Table 1	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (dose-finding test)	.....	22
Table 2-1	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity test I )	.....	23
Table 2-2	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity test I )	.....	24
Table 3-1	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity test II )	.....	25
Table 3-2	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity test II )	.....	26
Figure 1-1	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (dose-finding test :without S9 mix ).	.....	27
Figure 1-2	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (dose-finding test :with S9 mix ).	.....	27
Figure 2-1	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity test I :without S9 mix ).	.....	28
Figure 2-2	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity test I :with S9 mix ).	.....	28
Figure 3-1	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity test II :without S9 mix ).	.....	29
Figure 3-2	Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity test II :with S9 mix ).	.....	29

## 要 約

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の遺伝子突然変異誘発性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した。

試験菌株には*Salmonella typhimurium*のTA100, TA98, TA1535およびTA1537ならびに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用いた。試験は、プレインキュベーション法により、S9 mix無添加とS9 mix添加の場合について実施した。

1. 本試験(I)および本試験(II)の試験濃度を設定するために用量設定試験を行った。試験濃度は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、全菌株1.22~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比4, 計7濃度)とした。

## 1.1 プレート上の析出物

S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、培養開始時および培養終了時に、78.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、無色透明の微細な油滴状の析出物および油膜状の析出物が認められた。

## 1.2 菌の生育阻害

S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

## 1.3 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても媒体対照の2倍未満であった。

2. 用量設定試験の結果から本試験の濃度は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株も312.5~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2, 計5濃度)とした。

## 2.1 プレート上の析出物

S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、培養開始時および培養終了時に、すべての濃度において、無色透明の微細な油滴状の析出物および油膜状の析出物が認められた。

## 2.2 菌の生育阻害

S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

### 2.3 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても媒体対照の2倍未満であった。

3. 媒体対照における復帰変異コロニー数は、用量設定試験、本試験(I)および本試験(II)とも陰性対照(注射用水)における値と同程度であった。
4. 用量設定試験、本試験(I)および本試験(II)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復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。
5. 本試験(I)および本試験(II)の結果には再現性が認められた。

以上の結果、アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)はいずれの濃度においても、復帰変異コロニー数が媒体対照の2倍以上に増加しなかったことから、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)に遺伝子突然変異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、細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異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、媒体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 (以下、DMSOと略) 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

試験には下記の物質を使用した。

##### 1.2.1 2-アミノアントラセン (2-aminoanthracene, 略名：2AA)

黄色から緑色の粉末、純度：97.4 %、ロット番号：90K3670、購入源：SIGMA、購入日：2002年1月8日、使用期限：2007年1月7日 (自社規定)、保管条件：防湿、冷所 (2~8 °C)。

##### 1.2.2 アジ化ナトリウム (sodium azide, 略名：NaN<sub>3</sub>)

白色~ほとんど白色の結晶 (特級、単品)、純度：99.7 %、ロット番号：M8K9848、購入源：ナカライテスク株式会社、購入日：1998年11月19日、使用期限：2003年11月18日 (自社規定)、保管条件：冷所 (1~10 °C)。

##### 1.2.3 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine hydrochloride, 略名：9AA)

黄色の粉末 (特級、単品)、純度：98.3 %、ロット番号：M8F1294、購入源：ナカライテスク株式会社、購入日：1998年11月19日、使用期限：2003年11月18日 (自社規定)、保管条件：冷所 (1~10 °C)。

#### 1.2.4 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 略名: AF-2]

黄みの赤色結晶性粉末（特級，単品），純度：99.0%，ロット番号：SEL1402，購入源：和光純薬工業株式会社，購入日：2002年2月5日，使用期限：2007年2月4日（自社規定），保管条件：冷所（1～10℃），遮光。

#### 1.3 媒体対照物質

媒体対照物質には，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。

#### 1.4 陰性対照物質

陰性対照物質には，注射用水（局方品，ロット番号：K1180，株式会社大塚製薬工場）を用いた。

### 2. 検体液

#### 2.1 被験物質

用量設定試験，本試験（I）および本試験（II）とも，被験物質 500 mgを秤量し，無水エタノール 5.0 mLに溶解して最高濃度液（100 mg/mL）を調製した。以下の濃度液は，最高濃度液を無水エタノールで順次希釈して調製した。調製は用時に行い，使用後の残液は廃棄処分した。

なお，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なものできないことから，純度換算は行わずに試験を実施した。

#### 2.2 陽性対照物質

2AA，9AAおよびAF-2はDMSO（紫外部吸収スペクトル用，ロット番号：KC066，株式会社同仁化学研究所）に，NaN<sub>3</sub>は注射用水（局方品，ロット番号：K0J73，株式会社大塚製薬工場）に溶解して，次頁に示す濃度液を調製した（2AAの調製日：2002年1月24日，9AAおよびNaN<sub>3</sub>の調製日：2001年11月13日，AF-2の調製日：2002年3月25日，各調製液の使用期限は調製後1年以内とした）。

各調製液は，チューブ（2 mL容セラムチューブ，住友ベークライト株式会社）に0.5 mLずつ分注し，-80℃設定の冷凍庫〔型式：MDF-291AT（被験物質保管庫 No.8），三洋電機株式会社〕内に凍結保管した。

試験の際には各調製液を融解して使用し，使用後の残液は廃棄処分した。

	菌株名	物質名	調製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	試験濃度 ( $\mu\text{g/plate}$ )
S9 mix (+)	TA100	2AA	10	1
	TA1535	2AA	20	2
	WP2 <i>uvrA</i>	2AA	100	10
	TA98	2AA	5	0.5
	TA1537	2AA	20	2
S9 mix (-)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	NaN <sub>3</sub>	5	0.5
	WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	TA1537	9AA	800	80

なお、いずれの物質も安定性ならびに媒体中での安定性に関して、現在正確な情報はないことから、これらの陽性対照物質の反応性が、試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内にある場合に、生物学的に十分な活性を有していたと判断した。

### 3. 試験菌株

試験菌株には、国内各GLP準拠毒性試験ガイドラインにおいて規定されており、変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている *S.typhimurium* の TA100, TA98, TA1535 および TA1537 ならびに *E.coli* の WP2*uvrA* を使用した。TA100 および TA98 は 1996 年 10 月 18 日に、TA1535, TA1537 および WP2*uvrA* は 1995 年 2 月 25 日に、いずれも中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センターから入手した。

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」<sup>1)</sup>に従い、アミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異 *rfa* 特性および薬剤耐性因子 R-factor プラスミドの有無を検査し (TA100 および TA98 の検査日: 2002 年 2 月 26 日~2 月 28 日, TA1535, TA1537 および WP2*uvrA* の検査日: 2001 年 11 月 6 日~11 月 8 日), 試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した (Attachment 1)。

菌株の保存は、特性検査の結果から選択したコロニーを培養した菌懸濁液 0.8 mL に対して DMSO を 0.07 mL の割合で加えたものを、チューブ (2 mL 容セラムチューブ, 住友ベークライト株式会社) に 200  $\mu\text{L}$  ずつ分注し, -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 (TA100 および TA98 の分注日: 2002 年 4 月 10 日, TA1535, TA1537 および WP2*uvrA* の分注日: 2001 年 12 月 26 日, 使用期限: 分注後 2 年以内)。



菌の前培養には、OXOID NUTRIENT BROTH No.2 (ロット番号：219916, OXOID Ltd.) 2.0 g に注射用水80 mLの割合で加えて高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15分) した培養液を使用した。乾熱滅菌 (180 °C, 1時間, 以下同様) したモルトン栓付きのL字管 (容量：約40 mL) に先の培養液を10 mL分注し, ここへ融解した菌液を20  $\mu$ L接種した。これを往復振盪型式 (振盪数：90回/分, 振幅：4 cm) の振盪器 (型式：M-100<sup>N</sup>, タイテック株式会社) を用いて, 37 °Cで8時間振盪培養した。培養終了後, 菌懸濁液の濁度を測定し, そのO.D.値から生菌数を求めた (Attachment 2)。また, 菌懸濁液は使用時まで室温で保存した。

なお, 実験操作は空調設備を有したAmes試験室 (A棟) において行った。

#### 4. S9 mix

S9は, Attachment 3の条件により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) を使用した。S9は, 2002年6月28日に購入し, 使用時まで-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 mix用のCofactor (商品名：Cofactor-I, ロット番号：999203, オリエンタル酵母工業株式会社) を注射用水で溶解し, メンブランフィルター ( $\phi$ 0.2  $\mu$ m, Nalge) 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。

#### 5. 培地

最少グルコース寒天平板培地は, テスメディアAN培地 (ロット番号：ANI390FR, 製造日：2002年6月20日, オリエンタル酵母工業株式会社) を使用した。テスメディアAN培地の組成をAttachment 5に示した。

トップアガーは, 注射用水にBacto Agar (ロット番号：142311, DIFCO) が0.6%, 塩化ナトリウムが0.5%の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌 (121 °C, 20分, 以下同様) した。この水溶液に*S. typhimurium*の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を, *E. coli*の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を, それぞれ容量比10:1の割合で加えて調製した。なお, 各アミノ酸溶液はフィルターシステム ( $\phi$ 0.22  $\mu$ m, コーニング) で濾過したものを使用した。

#### 6. 無菌試験

被験物質の最高濃度液およびS9 mixの無菌試験は, 用量設定試験, 本試験 (I) および本試験 (II) 実施の際に, それぞれ2枚のプレートを用いて実施した。

試験は、被験物質の最高濃度液0.05 mLまたはS9 mix 0.5 mLに、45 °Cに保温したトッブアガー2 mLを加えて最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ、プレートを転倒して37 °C設定の恒温器（型式：IA-81、ヤマト科学株式会社）内で約48時間培養した後、コロニーの出現を調べた。被験物質の最高濃度液の無菌試験には、用量設定試験、本試験（I）および本試験（II）とも100 mg/mL濃度液を用いた。

## 7. 試験方法

### 7.1 試験操作

試験条件をAttachment 6に示した。

試験は、プレインキュベーション法により、代謝活性化によらない場合（S9 mix無添加）と代謝活性化による場合（S9 mix添加）で行った。すなわち、乾熱滅菌した試験管（15.5×100 mm、清浄試験管ラルボ、テルモ株式会社）に、①被験物質検体液、媒体対照液および陰性対照液0.05 mL、陽性対照液0.1 mL、②高圧蒸気滅菌した0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.5 mL（代謝活性化によらない場合）またはS9 mix 0.5 mL（代謝活性化による場合）、③菌懸濁液0.1 mLの順に加え、往復振盪型式の振盪器を用いて37 °Cで20分間インキュベーションした。その後、45 °Cに保温したトッブアガーを2 mL加えて混合した後、最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ、プレートを転倒して37 °C設定の恒温器内で約48時間培養した。

培養終了後、プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後、復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー（CA-11D エームステストシステム）により計測し、その後、菌の生育阻害の有無を100倍の顕微鏡下で観察した。プレート上での析出物の有無は、培養開始時にも肉眼で観察した。

プレートは、菌株、代謝活性化の有無および濃度の組み合わせごとに用量設定試験では1枚、本試験（I）および本試験（II）では各3枚使用した。また、試験管およびプレートは、菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した。

### 7.2 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験方法について」（平成9年10月31日）に従い、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株も5000 µg/plateを最高として、以下公比4で1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88および1.22 µg/plateの計7濃度を設定した。対照として、全菌株に対し媒体対照、陰性対照および陽性対照を設けた。

### 7.3 本試験( I )および本試験( II )

用量設定試験の結果に基づき本試験( I )および本試験( II )を行った。試験濃度は、S9 mix 無添加およびS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株も312.5~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2, 計5濃度) とした。対照として、全菌株に対し媒体対照、陰性対照および陽性対照を設けた。

### 8. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入がなく、媒体対照の復帰変異コロニー数が陰性対照の復帰変異コロニー数と同程度であり、また、陰性対照および陽性対照の復帰変異コロニー数が試験施設のバックグラウンドデータ (Attachment 7) の範囲内にあり、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験が成立するものとした。

### 9. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は濃度ごとに平均値と標準偏差を算出した。なお、有意差検定は実施しなかった。

### 10. 判定基準

試験の結果は、被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が媒体対照の2倍以上の値を示し、さらに濃度に依存して増加した場合を陽性とした。

## 試験成績

## 1. 用量設定試験

用量設定試験の結果をTable 1およびFigure 1-1~1-2に示した。

被験物質を処理したプレート上の析出物は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、培養開始時および培養終了時に、78.1 $\mu$ g/plate以上の濃度において、無色透明の微細な油滴状の析出物および油膜状の析出物が認められた。

被験物質を処理したプレートにおける菌の生育阻害は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合ともいずれの菌株においても認められなかった。

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても媒体対照の2倍未満であった。

媒体対照における復帰変異コロニー数は、いずれの菌株も陰性対照における値と同程度であった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照および陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

## 2. 本試験(I)および本試験(II)

本試験(I)の結果をTable 2-1~2-2およびFigure 2-1~2-2に、本試験(II)の結果をTable 3-1~3-2およびFigure 3-1~3-2に示した。

被験物質を処理したプレート上の析出物は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、培養開始時および培養終了時に、すべての濃度において、無色透明の微細な油滴状の析出物および油膜状の析出物が認められた。

被験物質を処理したプレートにおける菌の生育阻害は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合ともいずれの菌株においても認められなかった。

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても媒体対照の2倍未満であった。

媒体対照における復帰変異コロニー数は、いずれの菌株も陰性対照における値と同程度であった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照および陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

## 考 察

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の遺伝子突然変異誘発性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異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)は、S9 mix無添加およびS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株のすべての濃度において、復帰変異コロニー数は媒体対照の2倍以上に増加しなかった。

各試験における無菌試験では、被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

各試験における媒体対照の復帰変異コロニー数は、陰性対照における値と同程度であった。また、陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照および陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

本試験(I)および本試験(II)には再現性が認められた。

以上の結果、アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)はいずれの濃度においても、復帰変異コロニー数が媒体対照の2倍以上に増加しなかったことから、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)に遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

## 文 献

- 1) 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—, 中央労働災害防止協会, 平成3年3月

Table 1. Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (dose-finding test)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	116	10	26	18	19
	Vehicle control	101	10	24	24	18
	1.22	94	11	31	27	7
	4.88	97	6	18	21	14
	19.5	91	16	20	28	13
	78.1#	91	12	36	40	11
	312.5#	89	6	28	39	18
	1250#	90	6	31	30	12
	5000#	104	12	25	17	23
S9 mix (+)	Negative control	118	14	21	24	20
	Vehicle control	110	11	26	35	19
	1.22	131	6	33	34	22
	4.88	114	11	34	35	19
	19.5	110	7	29	30	13
	78.1#	115	9	26	31	15
	312.5#	101	11	28	32	13
	1250#	104	4	26	37	16
	5000#	106	14	38	26	24
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	614	531	172	454	587
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1228	382	983	457	220

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN<sub>3</sub>: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride;

2AA: 2-Aminoanthracene.

# :Colorless clear fine oil drop-like precipitations and oil membrane-like precipitations were seen on the surface of agar plate.

Table 2-1. Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity Test I)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	95 101 111 (102 $\pm$ 8.1)	6 10 11 (9 $\pm$ 2.6)	33 34 38 (35 $\pm$ 2.6)	18 18 24 (20 $\pm$ 3.5)	5 5 6 (5 $\pm$ 0.6)
	Vehicle control	94 116 120 (110 $\pm$ 14.0)	6 15 18 (13 $\pm$ 6.2)	25 28 29 (27 $\pm$ 2.1)	24 30 32 (29 $\pm$ 4.2)	6 6 10 (7 $\pm$ 2.3)
	312.5#	89 104 106 (100 $\pm$ 9.3)	6 9 10 (8 $\pm$ 2.1)	18 26 32 (25 $\pm$ 7.0)	23 23 24 (23 $\pm$ 0.6)	10 12 16 (13 $\pm$ 3.1)
	625#	103 107 108 (106 $\pm$ 2.6)	8 12 13 (11 $\pm$ 2.6)	24 31 37 (31 $\pm$ 6.5)	18 24 26 (23 $\pm$ 4.2)	11 11 12 (11 $\pm$ 0.6)
	1250#	99 114 123 (112 $\pm$ 12.1)	9 11 11 (10 $\pm$ 1.2)	21 26 32 (26 $\pm$ 5.5)	27 30 31 (29 $\pm$ 2.1)	5 6 6 (6 $\pm$ 0.6)
	2500#	91 94 96 (94 $\pm$ 2.5)	7 9 12 (9 $\pm$ 2.5)	26 28 33 (29 $\pm$ 3.6)	25 25 32 (27 $\pm$ 4.0)	6 10 13 (10 $\pm$ 3.5)
	5000#	80 93 103 (92 $\pm$ 11.5)	6 7 8 (7 $\pm$ 1.0)	23 24 26 (24 $\pm$ 1.5)	18 22 28 (23 $\pm$ 5.0)	3 4 4 (4 $\pm$ 0.6)
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	542 546 557 (548 $\pm$ 7.8)	517 526 531 (525 $\pm$ 7.1)	125 132 138 (132 $\pm$ 6.5)	408 425 429 (421 $\pm$ 11.2)	266 303 433 (334 $\pm$ 87.7)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

( ) : Mean $\pm$ S.D.

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN<sub>3</sub>: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.

# :Colorless clear fine oil drop-like precipitations and oil membrane-like precipitations were seen on the surface of agar plate.

Table 2-2. Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity Test I)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	95 105 119 (106 $\pm$ 12.1)	10 11 11 (11 $\pm$ 0.6)	22 22 28 (24 $\pm$ 3.5)	27 30 33 (30 $\pm$ 3.0)	12 13 14 (13 $\pm$ 1.0)
	Vehicle control	93 106 117 (105 $\pm$ 12.0)	6 9 14 (10 $\pm$ 4.0)	25 37 38 (33 $\pm$ 7.2)	25 25 31 (27 $\pm$ 3.5)	13 14 20 (16 $\pm$ 3.8)
	312.5#	94 104 110 (103 $\pm$ 8.1)	4 5 12 (7 $\pm$ 4.4)	23 33 34 (30 $\pm$ 6.1)	20 26 29 (25 $\pm$ 4.6)	11 14 14 (13 $\pm$ 1.7)
	625#	89 95 105 (96 $\pm$ 8.1)	5 6 10 (7 $\pm$ 2.6)	28 28 36 (31 $\pm$ 4.6)	23 31 39 (31 $\pm$ 8.0)	9 11 12 (11 $\pm$ 1.5)
	1250#	88 88 115 (97 $\pm$ 15.6)	6 10 11 (9 $\pm$ 2.6)	26 30 36 (31 $\pm$ 5.0)	24 35 35 (31 $\pm$ 6.4)	13 14 16 (14 $\pm$ 1.5)
	2500#	88 94 107 (96 $\pm$ 9.7)	4 5 10 (6 $\pm$ 3.2)	30 34 35 (33 $\pm$ 2.6)	17 26 32 (25 $\pm$ 7.5)	9 11 13 (11 $\pm$ 2.0)
	5000#	86 91 92 (90 $\pm$ 3.2)	4 6 12 (7 $\pm$ 4.2)	29 29 39 (32 $\pm$ 5.8)	27 32 38 (32 $\pm$ 5.5)	10 10 15 (12 $\pm$ 2.9)
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	982 1060 1066 (1036 $\pm$ 46.9)	306 335 340 (327 $\pm$ 18.4)	849 931 1126 (969 $\pm$ 142.3)	405 442 465 (437 $\pm$ 30.3)	147 197 199 (181 $\pm$ 29.5)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

( ) : Mean  $\pm$  S.D.

2AA: 2-Aminoanthracene.

# : Colorless clear fine oil drop-like precipitations and oil membrane-like precipitations were seen on the surface of agar plate.



Table 3-1. Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity Test II)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	121 126 150 (132 $\pm$ 15.5)	7 8 9 (8 $\pm$ 1.0)	37 39 42 (39 $\pm$ 2.5)	14 27 29 (23 $\pm$ 8.1)	3 12 13 (9 $\pm$ 5.5)
	Vehicle control	117 131 146 (131 $\pm$ 14.5)	6 8 12 (9 $\pm$ 3.1)	34 44 45 (41 $\pm$ 6.1)	27 27 39 (31 $\pm$ 6.9)	6 9 12 (9 $\pm$ 3.0)
	312.5#	111 131 145 (129 $\pm$ 17.1)	5 6 9 (7 $\pm$ 2.1)	31 39 45 (38 $\pm$ 7.0)	24 26 32 (27 $\pm$ 4.2)	8 10 11 (10 $\pm$ 1.5)
	625#	118 127 127 (124 $\pm$ 5.2)	6 8 8 (7 $\pm$ 1.2)	24 37 38 (33 $\pm$ 7.8)	18 34 39 (30 $\pm$ 11.0)	11 11 20 (14 $\pm$ 5.2)
	1250#	119 124 139 (127 $\pm$ 10.4)	7 8 10 (8 $\pm$ 1.5)	32 32 39 (34 $\pm$ 4.0)	28 31 32 (30 $\pm$ 2.1)	12 13 14 (13 $\pm$ 1.0)
	2500#	110 132 143 (128 $\pm$ 16.8)	5 6 12 (8 $\pm$ 3.8)	34 39 40 (38 $\pm$ 3.2)	24 25 26 (25 $\pm$ 1.0)	10 12 17 (13 $\pm$ 3.6)
	5000#	120 123 128 (124 $\pm$ 4.0)	7 10 12 (10 $\pm$ 2.5)	38 38 38 (38 $\pm$ 0.0)	23 27 31 (27 $\pm$ 4.0)	7 10 12 (10 $\pm$ 2.5)
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	537 583 586 (569 $\pm$ 27.5)	547 607 613 (589 $\pm$ 36.5)	117 147 148 (137 $\pm$ 17.6)	428 444 466 (446 $\pm$ 19.1)	301 434 497 (411 $\pm$ 100.1)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

( ) : Mean  $\pm$  S.D.

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN<sub>3</sub>: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.

# : Colorless clear fine oil drop-like precipitations and oil membrane-like precipitations were seen on the surface of agar plate.

Table 3-2. Reverse mutation test of bis(2-ethylhexyl)azelate in bacteria (mutagenicity Test II)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	119 142 150 (137 $\pm$ 16.1)	5 7 10 (7 $\pm$ 2.5)	31 32 37 (33 $\pm$ 3.2)	25 29 40 (31 $\pm$ 7.8)	9 12 15 (12 $\pm$ 3.0)
	Vehicle control	126 135 135 (132 $\pm$ 5.2)	5 6 11 (7 $\pm$ 3.2)	38 50 51 (46 $\pm$ 7.2)	26 30 38 (31 $\pm$ 6.1)	14 17 18 (16 $\pm$ 2.1)
	312.5#	101 130 145 (125 $\pm$ 22.4)	6 7 9 (7 $\pm$ 1.5)	37 38 42 (39 $\pm$ 2.6)	22 22 24 (23 $\pm$ 1.2)	10 12 13 (12 $\pm$ 1.5)
	625#	113 124 133 (123 $\pm$ 10.0)	6 7 10 (8 $\pm$ 2.1)	37 40 47 (41 $\pm$ 5.1)	28 31 33 (31 $\pm$ 2.5)	7 14 20 (14 $\pm$ 6.5)
	1250#	111 125 139 (125 $\pm$ 14.0)	7 8 13 (9 $\pm$ 3.2)	35 38 46 (40 $\pm$ 5.7)	18 23 27 (23 $\pm$ 4.5)	11 13 19 (14 $\pm$ 4.2)
	2500#	114 114 120 (116 $\pm$ 3.5)	6 9 10 (8 $\pm$ 2.1)	30 33 53 (39 $\pm$ 12.5)	30 30 32 (31 $\pm$ 1.2)	11 18 21 (17 $\pm$ 5.1)
	5000#	113 123 128 (121 $\pm$ 7.6)	7 13 14 (11 $\pm$ 3.8)	42 45 50 (46 $\pm$ 4.0)	32 35 37 (35 $\pm$ 2.5)	11 12 15 (13 $\pm$ 2.1)
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	866 1039 1091 (999 $\pm$ 117.8)	285 286 296 (289 $\pm$ 6.1)	911 1009 1065 (995 $\pm$ 77.9)	395 406 458 (420 $\pm$ 33.7)	125 131 150 (135 $\pm$ 13.1)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

( ) : Mean $\pm$ S.D.

2AA: 2-Aminoanthracene.

# :Colorless clear fine oil drop-like precipitations and oil membrane-like precipitations were seen on the surface of agar plate.

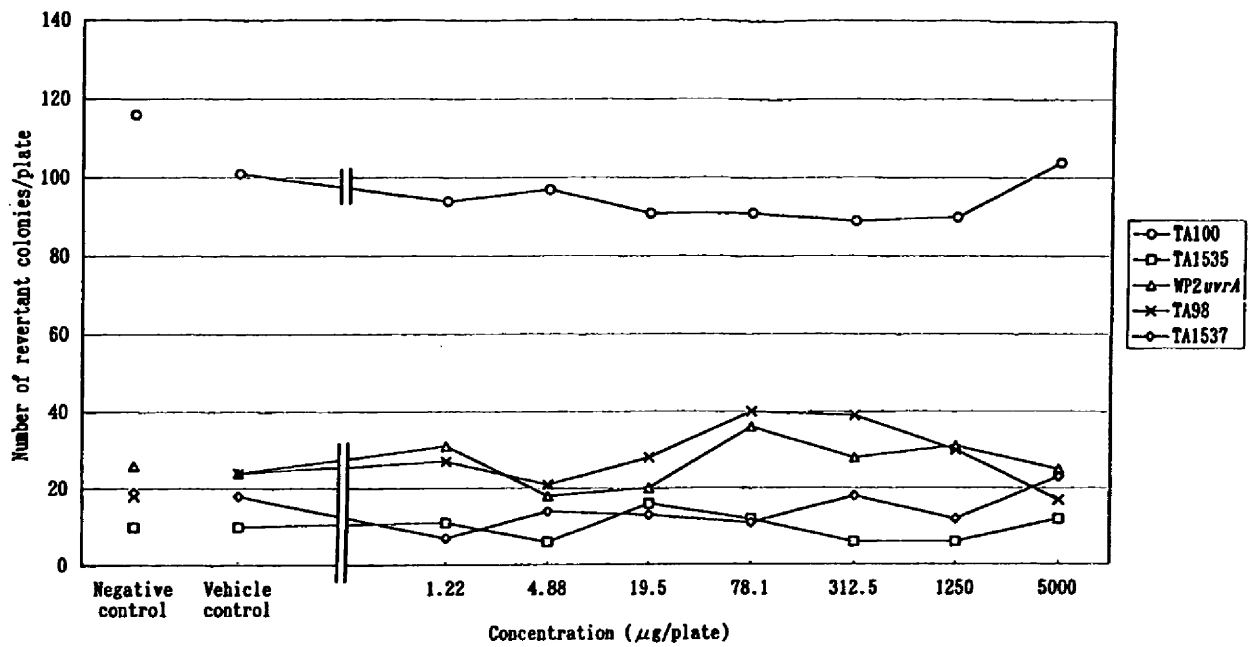


Figure 1-1. Reverse mutation test of Bis-(2-Ethylhexyl)nonanedioate in bacteria (dose-finding test: without S9 mix).

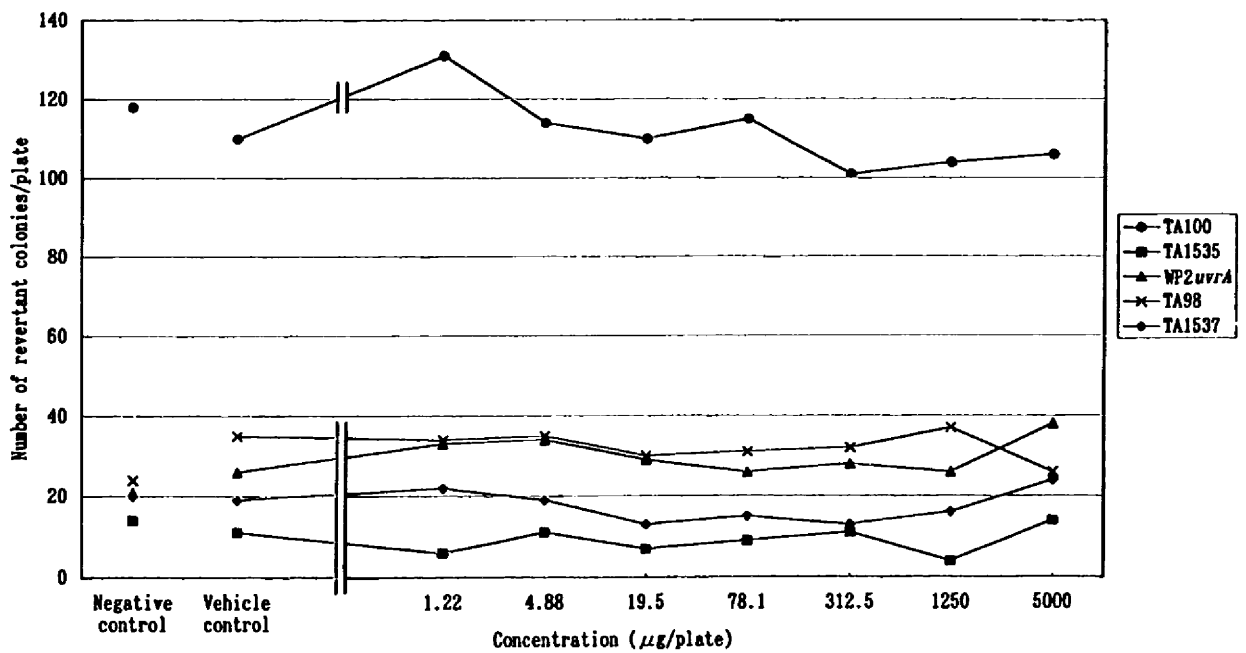


Figure 1-2. Reverse mutation test of Bis-(2-Ethylhexyl)nonanedioate in bacteria (dose-finding test: with S9 mix).

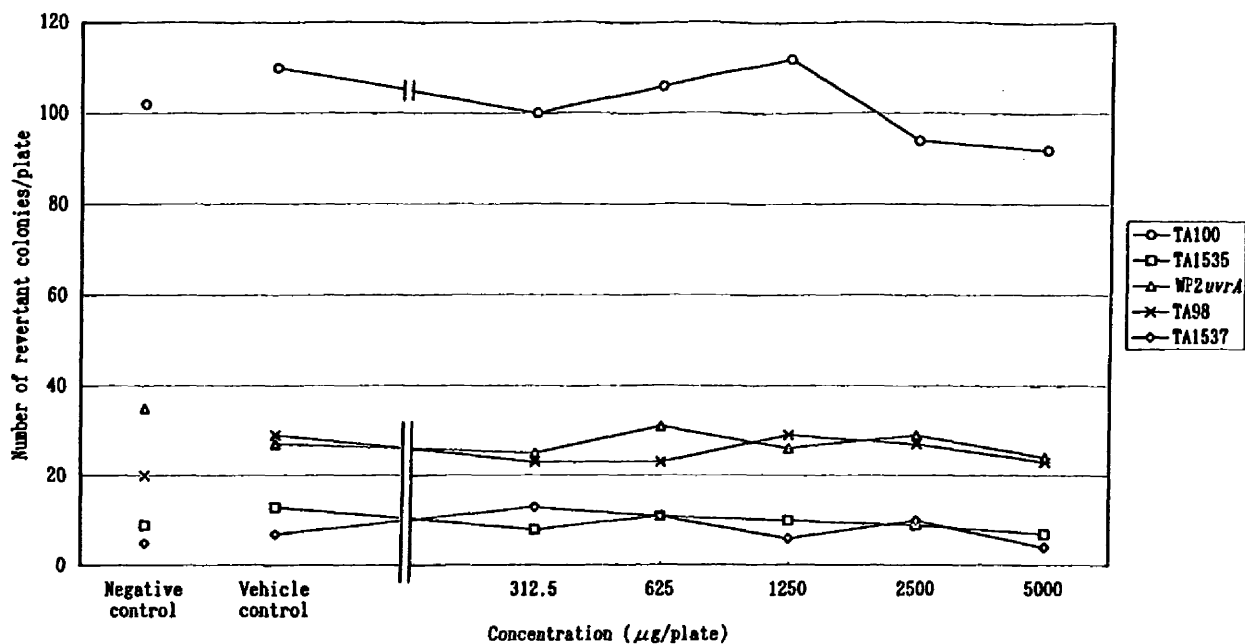


Figure 2-1. Reverse mutation test of Bis-(2-Ethylhexyl)nonanedioate in bacteria (mutagenicity test I: without S9 mix).

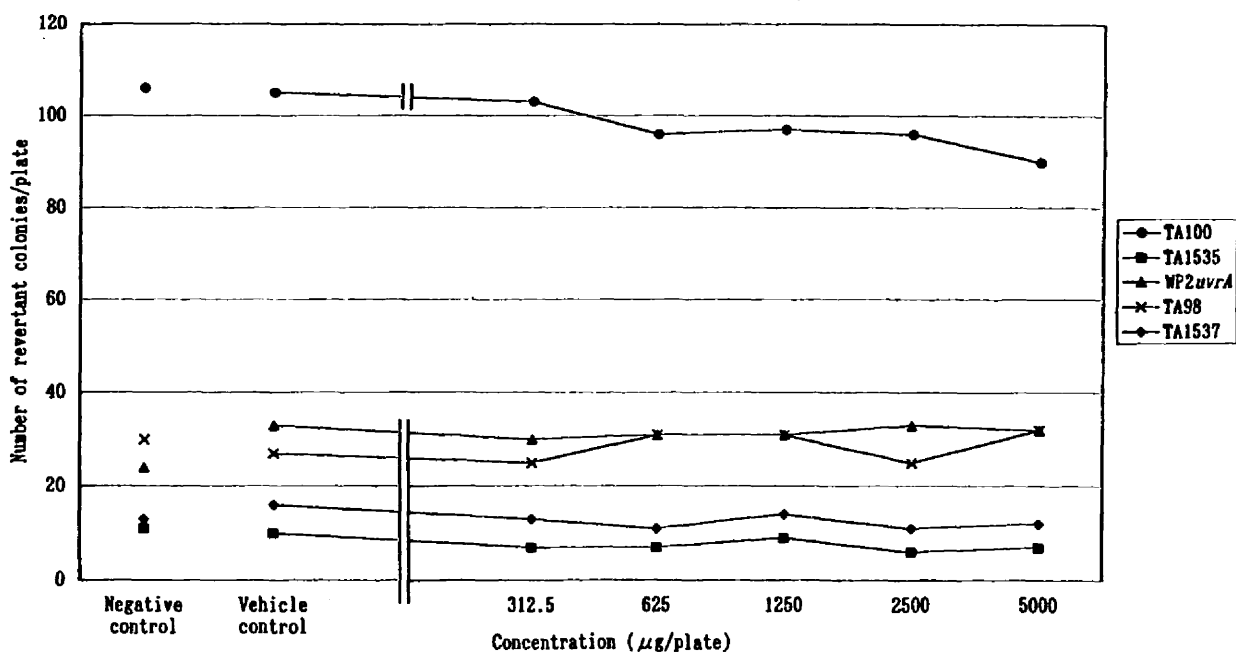


Figure 2-2. Reverse mutation test of Bis-(2-Ethylhexyl)nonanedioate in bacteria (mutagenicity test I: with S9 mix).

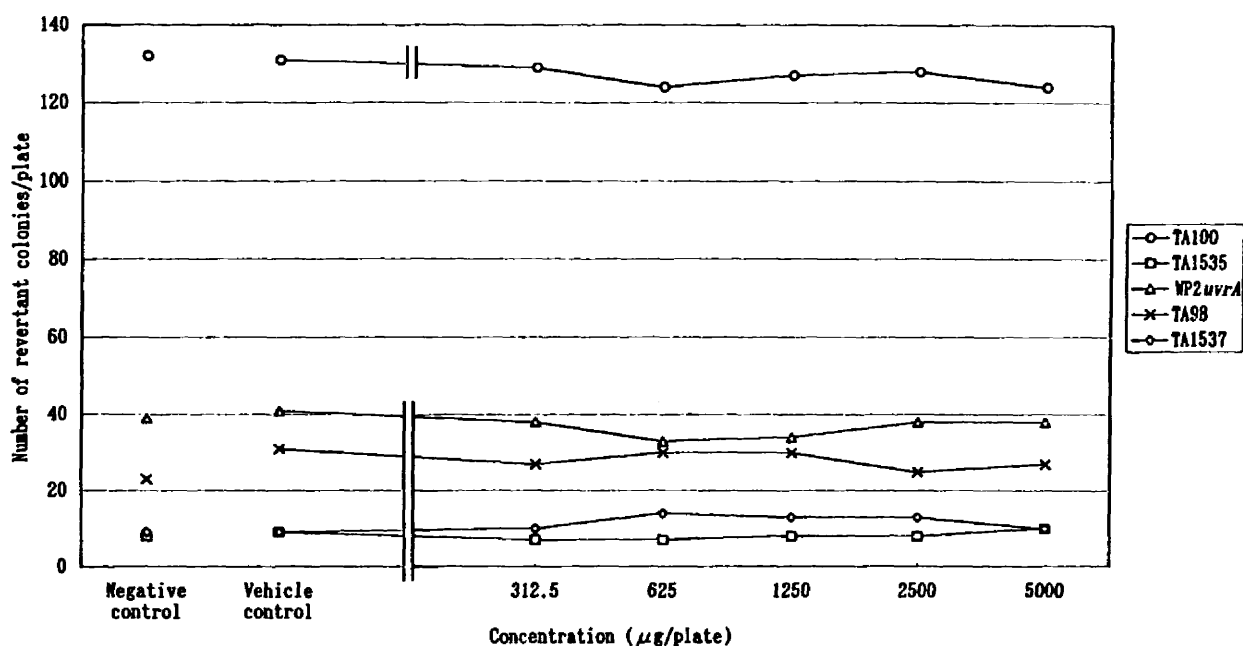


Figure 3-1. Reverse mutation test of Bis-(2-Ethylhexyl)nonanedioate in bacteria (mutagenicity test II: without S9 mix).

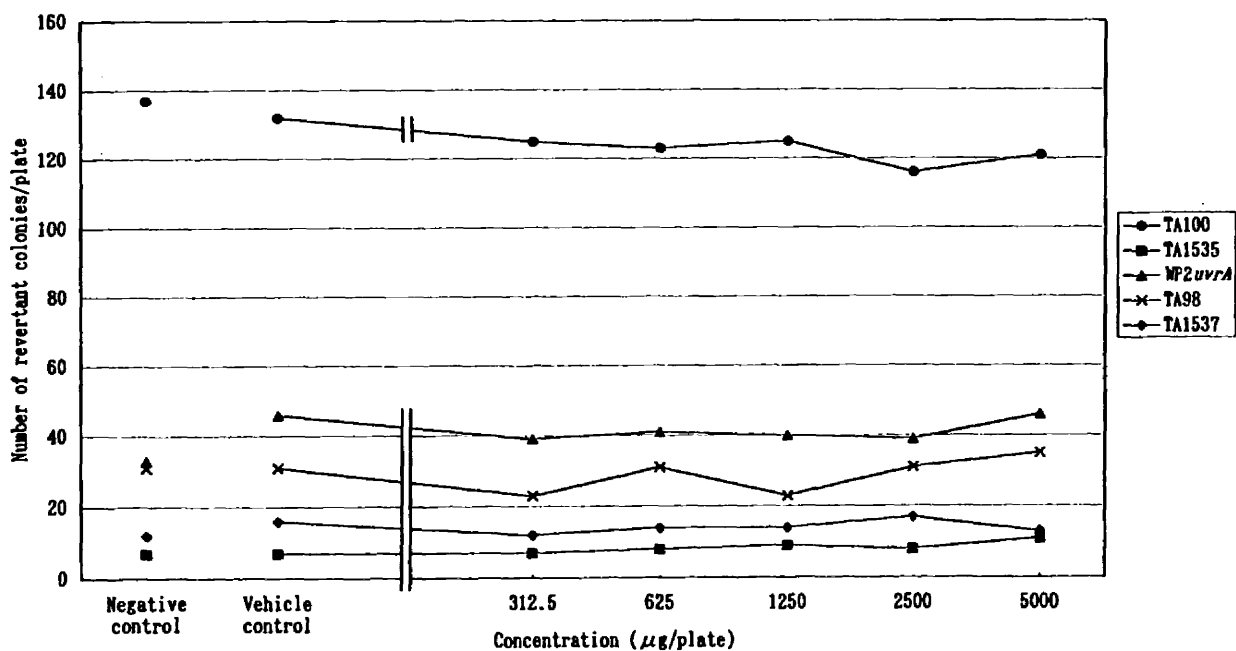


Figure 3-2. Reverse mutation test of Bis-(2-Ethylhexyl)nonanedioate in bacteria (mutagenicity test II: with S9 mix).