

## 最終報告書

表 題：2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR21139

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者の署名

表 題：2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR21139

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者



2021 年 12 月 27 日

## 陳 述 書

表 題：2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR21139

本試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号・平成 23・03・29 製局第 6 号・環保企発第 110331010 号 厚生労働省 医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知) を遵守して実施した (ただし、被験物質の安定性を除く)。

本試験に用いた試験方法は、試験法ガイドライン「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 7 号・平成 23・03・29 製局第 5 号・環保企発第 110331009 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知) および「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について (令和 2 年 11 月 5 日薬生発 1105 第 2 号・20201015 製局第 1 号・環保企発第 2011055 号 厚生労働省医薬・生活衛生局長・経済産業省製造産業局長・環境省大臣官房環境保健部長連名通知) に準拠した。

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者



2021 年 12 月 27 日

## 信頼性保証書

表題 : 2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : SR21139

本試験は、株式会社化合物安全性研究所 QAU によって、下記のとおり査察された。

| 査察段階            | 査察日              | 試験責任者<br>への報告日   | 運営管理者<br>への報告日   |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| 試験計画書           | 2021 年 8 月 25 日  | 2021 年 8 月 25 日  | 2021 年 8 月 25 日  |
| 試験計画書*          | 2021 年 8 月 27 日  | 2021 年 8 月 27 日  | 2021 年 8 月 27 日  |
| 被験物質の管理         | 2021 年 9 月 3 日   | 2021 年 9 月 3 日   | 2021 年 9 月 3 日   |
| 被験物質の調製         | 2021 年 9 月 3 日   | 2021 年 9 月 3 日   | 2021 年 9 月 3 日   |
| 被験物質処理          | 2021 年 9 月 3 日   | 2021 年 9 月 3 日   | 2021 年 9 月 3 日   |
| 観察および計測         | 2021 年 9 月 6 日   | 2021 年 9 月 6 日   | 2021 年 9 月 6 日   |
| 生データ            | 2021 年 11 月 15 日 | 2021 年 11 月 15 日 | 2021 年 11 月 15 日 |
| 最終報告書 (草案) : 図表 | 2021 年 11 月 15 日 | 2021 年 11 月 15 日 | 2021 年 11 月 15 日 |
| 最終報告書 (草案) : 本文 | 2021 年 11 月 15 日 | 2021 年 11 月 15 日 | 2021 年 11 月 15 日 |
| 最終報告書           | 2021 年 12 月 27 日 | 2021 年 12 月 27 日 | 2021 年 12 月 27 日 |

\* : 改善内容の確認

本試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号・平成 23・03・29 製局第 6 号・環境企発第 110331010 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知) に従い実施された。

本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社化合物安全性研究所

QAU 責任者



2021 年 12 月 27 日

| 目次                                                                                                                                                                            | 頁  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 表紙 .....                                                                                                                                                                      | 1  |
| 試験責任者の署名 .....                                                                                                                                                                | 2  |
| 陳述書 .....                                                                                                                                                                     | 3  |
| 信頼性保証書 .....                                                                                                                                                                  | 4  |
| 目次 .....                                                                                                                                                                      | 5  |
| 表題 .....                                                                                                                                                                      | 7  |
| 試験番号 .....                                                                                                                                                                    | 7  |
| 試験目的 .....                                                                                                                                                                    | 7  |
| 試験実施基準および試験法ガイドライン .....                                                                                                                                                      | 7  |
| 試験委託者 .....                                                                                                                                                                   | 7  |
| 試験施設 .....                                                                                                                                                                    | 7  |
| 試験責任者 .....                                                                                                                                                                   | 8  |
| 試験従事者およびその業務分担 .....                                                                                                                                                          | 8  |
| 試験日程 .....                                                                                                                                                                    | 8  |
| 1 要約 .....                                                                                                                                                                    | 9  |
| 2 緒言 .....                                                                                                                                                                    | 10 |
| 3 材料および方法 .....                                                                                                                                                               | 10 |
| 4 成績 .....                                                                                                                                                                    | 19 |
| 5 考察 .....                                                                                                                                                                    | 20 |
| 6 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 .....                                                                                                                                             | 20 |
| 7 資料の保存 .....                                                                                                                                                                 | 20 |
| Tables                                                                                                                                                                        |    |
| 1 Results of dose-finding test in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....                                                                             | 21 |
| 2 Results of main test in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....                                                                                     | 22 |
| Figures                                                                                                                                                                       |    |
| 1-1 Dose-response curves of revertants on <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 without metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate ..... | 23 |
| 1-2 Dose-response curves of revertants on <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....    | 24 |

|       |                                                                                                                                                                            |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2-1   | Dose-response curves of revertants on <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 without metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate ..... | 25 |
| 2-2   | Dose-response curves of revertants on <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....    | 26 |
| 3-1   | Dose-response curves of revertants on <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....      | 27 |
| 3-2   | Dose-response curves of revertants on <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....         | 28 |
| 4-1   | Dose-response curves of revertants on <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....   | 29 |
| 4-2   | Dose-response curves of revertants on <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....      | 30 |
| 5-1   | Dose-response curves of revertants on <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 without metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate ..... | 31 |
| 5-2   | Dose-response curves of revertants on <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate .....    | 32 |
| Annex |                                                                                                                                                                            |    |
| 1     | Historical control data for bacterial reverse mutation test .....                                                                                                          | 33 |

## 表題

2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌を用いる復帰突然変異試験

## 試験番号

SR21139

## 試験目的

*Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いて、2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を検討した。

## 試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準 (GLP) : 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号・平成 23・03・29 製局第 6 号・環保企発第 110331010 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン : 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 7 号・平成 23・03・29 製局第 5 号・環保企発第 110331009 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について (令和 2 年 11 月 5 日薬生発 1105 第 2 号・20201015 製局第 1 号・環保企発第 2011055 号 厚生労働省医薬・生活衛生局長・経済産業省製造産業局長・環境省大臣官房環境保健部長連名通知)

## 試験委託者

名称 : 厚生労働省医薬・生活衛生局  
所在地 : 東京都千代田区霞が関 1-2-2 (〒100-8916)  
担当者 : XXXXXXXXXX

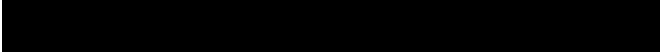
## 試験施設

名称 : 株式会社化合物安全性研究所  
所在地 : 札幌市清田区真栄 363 番 24 (〒004-0839)  
運営管理者 : XXXXXXXXXX

## 試験責任者

氏名 :   
所属 : 株式会社化合物安全性研究所 安全性研究部

## 試験従事者およびその業務分担

被験物質調製 :   
試験操作 : 

## 試験日程

試験開始日 : 2021 年 8 月 25 日  
実験開始日 : 2021 年 9 月 3 日  
用量設定試験  
前培養開始 : 2021 年 9 月 2 日  
被験物質処理 : 2021 年 9 月 3 日  
コロニー計数 : 2021 年 9 月 6 日  
本試験  
前培養開始 : 2021 年 9 月 9 日  
被験物質処理 : 2021 年 9 月 10 日  
コロニー計数 : 2021 年 9 月 13 日  
実験終了日 : 2021 年 9 月 13 日  
試験終了日 : 2021 年 12 月 27 日



## 1 要約

2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、被験物質の調製媒体にアセトンを使用し、直接法 (S9 代謝活性化系の非存在下) および代謝活性化法 (S9 代謝活性化系の存在下) で、プレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 3 で 6 段階の計 7 用量 (6.86 ~ 5000 µg/plate) を設定した。本試験では、用量設定試験の結果から、直接法は被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量 (156 ~ 5000 µg/plate), 代謝活性化法は被験物質の最高用量を 625 µg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量 (19.5 ~ 625 µg/plate) を設定した。

試験の結果、用量設定試験および本試験での各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。

全菌株の代謝活性化法において、用量設定試験では 556 µg/plate 以上、本試験では 625 µg/plate の濃度で析出が確認され、生育障害はいずれの菌株においても観察されなかった。用量設定試験および本試験の結果には再現性が確認された。

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、それぞれの陰性対照群の平均値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。

以上のことから、2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートは、当該試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

## 2 緒言

*Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いて、2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を検討した。

## 3 材料および方法

## 3.1 被験物質

名称 : 2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタート

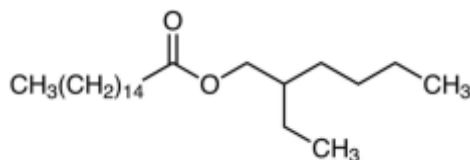
別名<sup>1)</sup> : パルミチン酸 2-エチルヘキシル

2-Ethylhexyl Palmitate

CAS 番号 : 29806-73-3

官報公示整理番号<sup>1)</sup> : (2)-798

構造式<sup>2)</sup> :



化学式<sup>1)2)</sup> : C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>

分子量<sup>2)</sup> : 368.65

物理化学的性質<sup>1)2)3)</sup> : 外観 ; 無色透明液体

比重 ; 0.8597

引火点 ; 204°C

純度<sup>3)</sup> : 98.8% (GC)

ロット番号<sup>3)</sup> :

製造者・供給者 :

試験施設受領日 : 2021 年 7 月 30 日

保存場所および保存期間 : 被験物質保存室 [2021 年 7 月 30 日 (試験施設受領) ~ 2021 年 9 月 10 日 (本試験 処理)]

保存条件 : 冷蔵 (実測範囲 3.1 ~ 3.6°C), 気密, 遮光, 不活性ガス充填

安定性<sup>1)</sup> (非 GLP) : 適切な条件下においては安定

被験物質管理責任者からの移管量 : 15.0014 g

使用量 : 4.9999 g

取扱上の注意 : ゴム手袋, マスク, 保護メガネ着用

参考資料 : 1) 安全データシート : 2-Ethylhexyl Palmitate, [REDACTED]  
 2) [REDACTED] 試薬ウェブサイト, 2-Ethylhexyl Palmitate  
 3) 試験成績書 : 2-Ethylhexyl Palmitate, [REDACTED]

### 3.2 被験物質の調製

媒体 : アセトン (3.3.1 陰性対照物質と同一のものを使用)

調製方法 : 被験物質は媒体を用いて溶解ならびに希釈し, 所定の濃度に調製した.  
 調製方法は以下に記載する.

- a 被験物質必要量をメスフラスコに精秤した.
- b メスフラスコに媒体を少量ずつ混和しながら加え, メスアップした.
- c メスフラスコに栓をし, よく混和した後, プラスチック製試験管に移し入れ, 最高濃度調製液を調製した.

用量設定試験では, 最高濃度調製液として 500 mg/mL 調製液を調製し, 以下公比3でタッチミキサーで混和しながら希釈し, 166.7, 55.6, 18.5, 6.17, 2.06, 0.686 mg/mL 調製液を調製した.

本試験では, 500 mg/mL の濃度を調製し, 以下公比2でタッチミキサーで混和しながら希釈し, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.81, 3.91, 1.95 mg/mL 調製液を調製した.

媒体の選択理由 : 試験施設において蒸留水, ジメチルスルホキシド, アセトンを用いて調製確認 (SR21139 検討) を行った. その結果, 被験物質は 50 mg/mL の濃度では蒸留水およびジメチルスルホキシドに不溶, 500 mg/mL のアセトンには溶解することが確認され, 反応性 (発熱, 変色, 発泡等) はみられなかった. このことから, 当該試験の媒体としてアセトンを使用した.

調製頻度 : 用時調製

調製上の注意 : ゴム手袋, マスク, 保護メガネ着用.

残余調製液の処理 : 残余調製液は, 産業廃棄物として回収した.

### 3.3 対照物質

#### 3.3.1 陰性対照物質

名称 : アセトン (試薬特級, Acetone)  
製造者 : 和光純薬工業株式会社  
ロット番号 : APP0694  
保存場所 : 被験物質保存室  
保存条件 : 冷所, 遮光  
使用量 : 100 mL

モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い, 原液のまま使用した.

陰性対照物質の選択理由: 被験物質の調製媒体を陰性対照物質として使用した.

#### 3.3.2 陽性対照物質

以下に示す陽性対照物質調製液を事前に調製し, その調製液を試験に使用した.

##### 3.3.2.1 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)

製造者 : 富士フイルム和光純薬株式会社  
ロット番号 : CAH4001  
含量 : 98.8%  
保存条件 : 室温  
調製方法 : ジメチルスルホキシド (ロット番号 KCP6773, 富士フイルム和光純薬株式会社) に 0.1 および 1 µg/mL の濃度で溶解.

##### 3.3.2.2 アジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub>)

製造者 : 富士フイルム和光純薬株式会社  
ロット番号 : YLN7517  
純度 : 100.5%  
保存条件 : 室温  
調製方法 : 蒸留水 (日本薬局方注射用水, ロット番号 K0E82, 株式会社大塚製薬工場) に 5 µg/mL の濃度で溶解.

##### 3.3.2.3 9-アミノアクリジン塩酸塩 (9-AA)

製造者 : Fluorochem Ltd.  
バッチ番号 : FCC34329  
純度 : 99.94%  
保存条件 : 冷蔵

調製方法 : ジメチルスルホキシド (ロット番号 KCP6773, 富士フイルム和光純薬株式会社) に 800 µg/mL の濃度で溶解.

### 3.3.2.4 2-アミノアントラセン (2-AA)

製造者 : 富士フイルム和光純薬株式会社  
 ロット番号 : CAM6587  
 含量 : 96.6%  
 保存条件 : 室温  
 調製方法 : ジメチルスルホキシド (ロット番号 KCP6773, 富士フイルム和光純薬株式会社) に 5, 10, 20 および 100 µg/mL の濃度で溶解.

### 3.3.3 陽性対照物質調製液の取扱い

保存条件 : 分注後, -20°C 以下で凍結保存.  
 使用期限 : 2021 年 11 月 3 日 (調製後 1 年)  
 取扱上の注意 : ゴム手袋, マスクおよび保護メガネ着用.  
 残余調製液の処理 : 産業廃棄物として回収した.

## 3.4 試験系

菌株 : 以下の 5 菌株を使用した.  
 塩基対置換型  
*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2uvrA  
 フレームシフト型  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

菌株の入手先 :   
 菌株の入手年月日 : 1991 年 10 月 18 日  
 菌株の保存条件 : 培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシドを 0.7 mL の割合で加え, 分注後, -80°C 以下で凍結保存.  
 菌株の選択理由 : 遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受入れられていることから選択した.  
 菌株の特性検査 : アミノ酸要求性, 膜変異 *rfa* 特性, 紫外線感受性, 薬剤耐性ならびに陰性対照値および陽性対照値について検査し, 規定の特性が保持され

ていることが確認された菌株を試験に使用した。

### 3.5 培地

#### 3.5.1 前培養用培地

名称および製造者 : ニュートリエントブロス培地 (NUTRIENT BROTH No.2, Oxoid Ltd.)  
 ロット番号 : 2202237  
 調製方法 : 蒸留水 (日本薬局方注射用水, ロット番号 0B81, 株式会社大塚製薬工場) を用いて 25 g/L に調製した。 *Salmonella typhimurium* TA98 および TA100 の培地には, 使用時にアンピシリンナトリウム (ロット番号 M7H8514, ナカライテスク株式会社) を 25 µg/mL となるように添加した。

#### 3.5.2 試験用培地 (最少グルコース寒天培地: 以下プレートと称する)

名称および製造者 : バイタルメディア AMT 培地 (極東製薬工業株式会社)  
 ロット番号 : DZAM7902  
 製造日 : 2021 年 7 月 9 日  
 有効期限 : 2022 年 1 月 5 日  
 組成 : 調製された組成を次表に示す。

| 培地 1000 mL 中の組成                       |      |   |
|---------------------------------------|------|---|
| 硫酸マグネシウム七水和物                          | 0.2  | g |
| クエン酸一水和物                              | 2.0  | g |
| リン酸水素二カリウム                            | 10.0 | g |
| リン酸二水素アンモニウム                          | 1.92 | g |
| 水酸化ナトリウム                              | 0.66 | g |
| ブドウ糖                                  | 20.0 | g |
| 寒天末 (SSK セールス: 大洋寒天, ロット番号 BM-M5-281) | 15.0 | g |

#### 3.5.3 重層用培地

調製方法 : 次表の組成の (A) ソフトアガーおよび (B) アミノ酸溶液を蒸留水 (日本薬局方注射用水, ロット番号 0H87, 株式会社大塚製薬工場) を用いて調製し, 使用時に (A):(B) = 10:1 の容量比で混合した。

*Salmonella typhimurium* には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を, *Escherichia coli* には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。これらの重層用培地は使用時まで 47°C に保温した。

| 組 成                                            |               |
|------------------------------------------------|---------------|
| (A) ソフトアガー                                     |               |
| Bacto <sup>TM</sup> Agar                       | 0.6%          |
| (ロット番号 0063461, Becton, Dickinson and Company) |               |
| 塩化ナトリウム                                        | 0.5%          |
| (ロット番号 KCJ4743, 富士フイルム和光純薬株式会社)                |               |
| (B) アミノ酸溶液                                     |               |
| L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液                            | 各々 0.5 mmol/L |
| (L-ヒスチジン, ロット番号 LKE0405, 和光純薬工業株式会社)           |               |
| (D-ビオチン, ロット番号 LKH4528, 和光純薬工業株式会社)            |               |
| または                                            |               |
| L-トリプトファン溶液                                    | 0.5 mmol/L    |
| (L-トリプトファン, ロット番号 WDN5663, 和光純薬工業株式会社)         |               |

## 3.6 S9 mix

S9 の製造者 : 家田貿易株式会社

ロット番号 : RAA202103A

製造日 : 2021 年 3 月 19 日

S9 の製造方法 : フェノバルビタール (PB) および 5,6-ベンゾフラボン (BF) の腹腔内投与で酵素誘導 (1 日目 PB 30 mg/kg, 2 日目 PB 60 mg/kg, 3 日目 PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg, 4 日目 PB 60 mg/kg を, 各々腹腔内投与) した Slc:SD 系ラット (雄, 7 週齢, 体重範囲 183 ~ 234 g) の 5 日目に肝ホモジネートより調製された.

S9 の保存条件 : -80°C で凍結保存

S9 の使用期限 : 製造後 6 ヶ月 (製造日より 6 ヶ月以内に使用)

S9 mix の調製方法 : S9, S9 mix 用 Cofactor (ロット番号 999101, Cofactor-I, オリエンタル酵母工業株式会社) および蒸留水 (日本薬局方注射用水, ロット番号 0H87, 株式会社大塚製薬工場) を用いて, 用時調製した. なお, S9 および S9 mix 用 Cofactor の使用ロットは, それぞれベンゾ[a]ピレンを用いた復帰突然変異試験により, 生物学的活性が確認されている. 調製した S9 mix 1.0 mL 中の組成は次表の通りである.

| S9 mix 1.0 mL 中の組成               |     |      |
|----------------------------------|-----|------|
| S9                               | 0.1 | mL   |
| 塩化マグネシウム 6 水和物                   | 8   | μmol |
| 塩化カリウム                           | 33  | μmol |
| グルコース-6-リン酸                      | 5   | μmol |
| 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) | 4   | μmol |
| 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)     | 4   | μmol |
| リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4              | 100 | μmol |

### 3.7 試験方法

#### 3.7.1 試験群

##### 3.7.1.1 用量設定試験

各菌株につき、直接法（代謝活性化系の非存在下）および代謝活性化法（代謝活性化系の存在下）で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに、被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比 3 で 6 段階の計 7 用量の試験群 (5000, 1667, 556, 185, 61.7, 20.6 および 6.86 μg/plate, 各々プレート当たり 0.01 mL を添加) を設定した。

##### 3.7.1.2 本試験

各菌株につき、直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

用量設定試験の結果、各菌株の直接法および代謝活性化法ともに、復帰変異コロニー数の増加は認められず、被験物質による生育阻害はいずれの菌株においても確認されなかったが、析出がすべての菌株の代謝活性化法において、556 μg/plate 以上の用量で確認された。

以上のことから、本試験は各菌株の直接法につき、被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量の試験群 (5000, 2500, 1250, 625, 313 および 156 μg/plate, 各々プレート当たり 0.01 mL を添加)、代謝活性化法につき、被験物質の最高用量を 625 μg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量の試験群 (625, 313, 156, 78.1, 39.1 および 19.5 μg/plate, 各々プレート当たり 0.01 mL を添加)を設定した。

##### 3.7.1.3 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、陰性対照群および次表の陽性対照群を設定した。

| 試験菌株                                 | 陽性対照物質 (用量: μg/plate) |        |        |       |
|--------------------------------------|-----------------------|--------|--------|-------|
|                                      | 直接法                   |        | 代謝活性化法 |       |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100  | AF-2                  | (0.01) | 2-AA   | (1)   |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 | NaN <sub>3</sub>      | (0.5)  | 2-AA   | (2)   |
| <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA      | AF-2                  | (0.01) | 2-AA   | (10)  |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA98   | AF-2                  | (0.1)  | 2-AA   | (0.5) |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 | 9-AA                  | (80)   | 2-AA   | (2)   |



### 3.7.2 プレート数およびプレートの識別

プレート数は、陰性対照群および被験物質群ならびに陽性対照群ともに、各 3 枚とした。

なお、無菌試験のプレート数は、最高濃度調製液および S9 mix とともに各 2 枚とした。プレートには、試験番号および試験群を特定できるようにラベルを貼付した。

## 3.8 操作方法

### 3.8.1 試験菌株の前培養

容量約 40 mL の L 字管に前培養用培地 (ニュートリエントブロス培地) 12 mL を入れ、解凍した保存菌を 12  $\mu$ L 接種し、37°C、振とう速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX, タイテック株式会社) で 10 時間の往復振とう培養を行った。なお、菌株の接種後、L 字管を振とう培養開始まで、用量設定試験、本試験ともに 7 時間、各々冷却 (氷冷) を行った。培養終了時に、得られた菌培養液の OD<sub>660nm</sub> を濁度計 (可視光度計 CO7500, フナコシ株式会社) で測定し、各菌株の生菌数-OD<sub>660nm</sub> 相関式より生菌数を算出した。生菌数が  $1 \times 10^9$  cells/mL より多いことが確認された培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数 (計算値) は次表の通りであった。

| 試験菌株                                 | 生菌数 (計算値) ( $\times 10^9$ cells/mL) |      |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------|
|                                      | 用量設定試験                              | 本試験  |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100  | 2.84                                | 2.84 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 | 3.24                                | 3.21 |
| <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA      | 4.71                                | 4.66 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA98   | 3.07                                | 3.04 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 | 1.84                                | 1.91 |

### 3.8.2 試験液および対照物質調製液の処理

試験液および対照物質調製液の処理は、プレインキュベーション法で行った。蓋付きのチューブを使用して、試験液 0.01 mL あるいは対照物質調製液 0.1 mL に、0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (直接法) または S9 mix 0.5 mL (代謝活性化法) を加えて混合した。さらに菌培養液 0.1 mL を加え、37°C、振とう速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX, タイテック株式会社) で 20 分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション終了後、0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチン (*Salmonella typhimurium*) あるいは、0.05 mmol/L L-トリプトファン (*Escherichia coli*) を含む重層用培地 2 mL を混和し、プレートに重層した。重層用培地を固化させた後、37°C に設定したインキュベーター (MIR-254S-PJ, パナソニックヘルスケア株式会社) 内で、49 時間の静置培養後、自動切り替えで 8°C の設定でコロニーの観察および計測まで冷蔵保存した。

試験液の最高濃度および S9 mix について無菌試験を実施し、雑菌の混入の有無を確認した。

結果、いずれも雑菌の混入は認められなかった。

### 3.8.3 観察および計測

実体顕微鏡 (SZ6045TR, オリンパス光学工業株式会社) を用いて菌株の生育阻害の有無を確認した。さらに被験物質群については目視で析出の有無を確認した。次に、コロニーアナライザー (CA-11D, システムサイエンス株式会社) を用い、面積補正を実施して復帰変異コロニー数の計測を行った。なお、析出がコロニーアナライザー計数に影響すると考えられるプレートについては、実体顕微鏡を用いて復帰変異コロニー数の目視計測を行った。

生育阻害の有無の判定は以下の基準で行い、1 以上を生育阻害有とした。なお、生育阻害 3 および 4 の復帰変異コロニー数は 0 として扱うこととした。

0 : 生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドローン (50 倍程度の倍率で観察可能) が培地一面に観察され、陰性対照群のバックグラウンドローンとの差が認められない場合。

1 : わずかな生育阻害が認められる。

陰性対照群に比べ、バックグラウンドローンが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている場合。

2 : 中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している場合。

3 : 強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である場合。

4 : 生存菌が全く認められない。

### 3.8.4 観察結果の集計方法

各菌株の陰性対照群、被験物質群 (用量毎) および陽性対照群について、復帰変異コロニー数の平均値  $\pm$  標準偏差を求めた。なお、いずれの値も小数点以下を四捨五入し整数で表示した。

### 3.8.5 観察および計測終了後のプレートの処理

産業廃棄物として回収した。

## 3.9 試験結果の評価

### 3.9.1 菌株の感度確認

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が試験施設の背景データに基づく管理

値の範囲内であり、かつ、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の平均値の2倍以上である場合に、菌株が適切な感度を有しているものと判断した。

### 3.9.2 試験結果の判定基準

少なくとも1つの菌株において、被験物質群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の平均値の2倍以上となり、かつ、被験物質の濃度の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が再現性を持って認められた場合に陽性と判定することとした。試験結果に再現性が認められない場合には、確認試験等を実施して再現性を確認することとした。

### 3.9.3 統計処理

試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

### 3.9.4 変異原比活性の算出

当該試験において陽性結果は得られなかったことから、変異原比活性の算出は実施しなかった。

## 4 成績

用量設定試験の結果を Table 1 に、本試験の結果を Table 2 に、被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1 ~ 5-2 に示す。

### 4.1 用量設定試験

各菌株の直接法および代謝活性化法ともに、被験物質群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の2倍未満であり、被験物質の用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。また、生育阻害はいずれの菌株においても確認されず、析出はすべての菌株の代謝活性化法において、556 µg/plate 以上の用量で確認された。

### 4.2 本試験

各菌株の直接法および代謝活性化法ともに、被験物質群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の2倍未満であり、被験物質の用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。また、生育阻害はいずれの菌株においても確認されず、析出はすべての菌株の代謝活性化法において、625 µg/plate の用量で確認された。

### 4.3 菌株の感度確認

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値 (Annex 1) の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて陰性対照群の平均値の2倍以上であった。

これらの結果から、各菌株が変異原性物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

## 5 考察

2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 3 で 6 段階の計 7 用量 (6.86 ~ 5000 µg/plate) を設定した。本試験では、用量設定試験の結果から、直接法は被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量 (156 ~ 5000 µg/plate)、代謝活性化法は被験物質の最高用量を 625 µg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量 (19.5 ~ 625 µg/plate) を設定した。

試験の結果、用量設定試験および本試験での各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。

全菌株の代謝活性化法において、用量設定試験では 556 µg/plate 以上、本試験では 625 µg/plate の濃度で析出が確認され、生育障害はいずれの菌株においても観察されなかった。用量設定試験および本試験の結果には再現性が確認された。

以上のことから、2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートは、当該試験条件下において、試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

## 6 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

## 7 資料の保存

### 7.1 資料の種類

以下の資料を試験施設の資料保存室に保存する。

1. 試験計画書
2. 生データその他の記録文書
3. 最終報告書

### 7.2 保存期間

試験終了後 5 年間保存し、その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

Table 1 Results of dose-finding test in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

| With(+) or without(-) S9 mix | Test article dose (µg/plate) | Number of revertants/plate (Mean ± S.D.) |       |       |                  |      |      |             |      |      |                 |      |      |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|-------|-------|------------------|------|------|-------------|------|------|-----------------|------|------|
|                              |                              | Base-pair substitution type              |       |       |                  |      |      |             |      |      | Frameshift type |      |      |
|                              |                              | TA100                                    |       |       | TA1535           |      |      | WP2uvrA     |      |      | TA98            |      |      |
| S9 mix (-)                   | Negative control             | 127                                      | 135   | 131   | 5                | 15   | 13   | 27          | 20   | 26   | 12              | 13   | 16   |
|                              |                              | ( 131 ± 4 )                              |       |       | ( 11 ± 5 )       |      |      | ( 24 ± 4 )  |      |      | ( 14 ± 2 )      |      |      |
|                              | 6.86                         | 140                                      | 141   | 138   | 11               | 15   | 11   | 29          | 22   | 26   | 21              | 16   | 16   |
|                              |                              | ( 140 ± 2 )                              |       |       | ( 12 ± 2 )       |      |      | ( 26 ± 4 )  |      |      | ( 18 ± 3 )      |      |      |
|                              | 20.6                         | 116                                      | 137   | 110   | 12               | 16   | 11   | 25          | 36   | 25   | 15              | 20   | 12   |
|                              |                              | ( 121 ± 14 )                             |       |       | ( 13 ± 3 )       |      |      | ( 29 ± 6 )  |      |      | ( 16 ± 4 )      |      |      |
|                              | 61.7                         | 134                                      | 119   | 120   | 17               | 8    | 19   | 22          | 26   | 23   | 26              | 19   | 20   |
|                              |                              | ( 124 ± 8 )                              |       |       | ( 15 ± 6 )       |      |      | ( 24 ± 2 )  |      |      | ( 22 ± 4 )      |      |      |
| S9 mix (+)                   | 185                          | 148                                      | 158   | 138   | 12               | 16   | 18   | 18          | 24   | 19   | 27              | 7    | 16   |
|                              |                              | ( 148 ± 10 )                             |       |       | ( 15 ± 3 )       |      |      | ( 20 ± 3 )  |      |      | ( 17 ± 10 )     |      |      |
|                              | 556                          | 139                                      | 129   | 139   | 16               | 12   | 15   | 26          | 22   | 28   | 17              | 18   | 10   |
|                              |                              | ( 136 ± 6 )                              |       |       | ( 14 ± 2 )       |      |      | ( 25 ± 3 )  |      |      | ( 15 ± 4 )      |      |      |
|                              | 1667                         | 126                                      | 134   | 116   | 7                | 11   | 12   | 22          | 27   | 31   | 15              | 12   | 16   |
|                              |                              | ( 125 ± 9 )                              |       |       | ( 10 ± 3 )       |      |      | ( 27 ± 5 )  |      |      | ( 14 ± 2 )      |      |      |
|                              | 5000                         | 152                                      | 136   | 125   | 19               | 15   | 16   | 27          | 23   | 23   | 18              | 19   | 18   |
|                              |                              | ( 138 ± 14 )                             |       |       | ( 17 ± 2 )       |      |      | ( 24 ± 2 )  |      |      | ( 18 ± 1 )      |      |      |
| S9 mix (+)                   | Negative control             | 150                                      | 130   | 139   | 10               | 12   | 9    | 31          | 26   | 22   | 17              | 27   | 29   |
|                              |                              | ( 140 ± 10 )                             |       |       | ( 10 ± 2 )       |      |      | ( 26 ± 5 )  |      |      | ( 24 ± 6 )      |      |      |
|                              | 6.86                         | 126                                      | 150   | 166   | 9                | 12   | 7    | 26          | 30   | 19   | 23              | 27   | 26   |
|                              |                              | ( 147 ± 20 )                             |       |       | ( 9 ± 3 )        |      |      | ( 25 ± 6 )  |      |      | ( 25 ± 2 )      |      |      |
|                              | 20.6                         | 129                                      | 152   | 145   | 11               | 9    | 18   | 29          | 37   | 29   | 28              | 27   | 36   |
|                              |                              | ( 142 ± 12 )                             |       |       | ( 13 ± 5 )       |      |      | ( 32 ± 5 )  |      |      | ( 30 ± 5 )      |      |      |
|                              | 61.7                         | 164                                      | 127   | 143   | 11               | 12   | 15   | 15          | 33   | 14   | 40              | 27   | 32   |
|                              |                              | ( 145 ± 19 )                             |       |       | ( 13 ± 2 )       |      |      | ( 21 ± 11 ) |      |      | ( 33 ± 7 )      |      |      |
| S9 mix (+)                   | 185                          | 134                                      | 140   | 135   | 17               | 14   | 8    | 25          | 42   | 34   | 19              | 32   | 40   |
|                              |                              | ( 136 ± 3 )                              |       |       | ( 13 ± 5 )       |      |      | ( 34 ± 9 )  |      |      | ( 30 ± 11 )     |      |      |
|                              | 556                          | 133 #                                    | 127 # | 113 # | 12 #             | 12 # | 10 # | 24 #        | 27 # | 23 # | 19 #            | 18 # | 26 # |
|                              |                              | ( 124 ± 10 )                             |       |       | ( 11 ± 1 )       |      |      | ( 25 ± 2 )  |      |      | ( 21 ± 4 )      |      |      |
|                              | 1667                         | 119 #                                    | 130 # | 155 # | 12 #             | 15 # | 15 # | 24 #        | 24 # | 27 # | 19 #            | 26 # | 25 # |
|                              |                              | ( 135 ± 18 )                             |       |       | ( 14 ± 2 )       |      |      | ( 25 ± 2 )  |      |      | ( 23 ± 4 )      |      |      |
|                              | 5000                         | 116 #                                    | 124 # | 117 # | 14 #             | 8 #  | 10 # | 22 #        | 24 # | 30 # | 27 #            | 31 # | 17 # |
|                              |                              | ( 119 ± 4 )                              |       |       | ( 11 ± 3 )       |      |      | ( 25 ± 4 )  |      |      | ( 25 ± 7 )      |      |      |
| Positive control S9 mix (-)  | Chemical                     | AF-2                                     |       |       | NaN <sub>3</sub> |      |      | AF-2        |      |      | AF-2            |      |      |
|                              | Dose(µg/plate)               | 0.01                                     |       |       | 0.5              |      |      | 0.01        |      |      | 0.1             |      |      |
|                              | Number of revertants/plate   | 685                                      | 687   | 711   | 302              | 328  | 349  | 97          | 116  | 95   | 396             | 423  | 459  |
| Positive control S9 mix (+)  | Chemical                     | 2-AA                                     |       |       | 2-AA             |      |      | 2-AA        |      |      | 2-AA            |      |      |
|                              | Dose(µg/plate)               | 1                                        |       |       | 2                |      |      | 10          |      |      | 0.5             |      |      |
|                              | Number of revertants/plate   | 995                                      | 1009  | 1048  | 208              | 303  | 263  | 805         | 805  | 812  | 363             | 374  | 344  |

Negative control : Acetone

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

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

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

# : Precipitation of test article

Table 2 Results of main test in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

| With(+) or without(-) S9 mix | Test article dose (µg/plate) | Number of revertants/plate (Mean ± S.D.) |       |       |                  |     |     |                 |      |      |            |      |      |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|-------|-------|------------------|-----|-----|-----------------|------|------|------------|------|------|
|                              |                              | Base-pair substitution type              |       |       |                  |     |     | Frameshift type |      |      |            |      |      |
|                              |                              | TA100                                    |       |       | TA1535           |     |     | WP2uvrA         |      |      | TA98       |      |      |
| S9 mix (-)                   | Negative control             | 127                                      | 134   | 98    | 8                | 13  | 6   | 22              | 23   | 29   | 26         | 16   | 22   |
|                              |                              | (120 ± 19)                               |       |       | (9 ± 4)          |     |     | (25 ± 4)        |      |      | (21 ± 5)   |      |      |
|                              | 156                          | 131                                      | 133   | 114   | 10               | 16  | 13  | 18              | 22   | 17   | 17         | 18   | 24   |
|                              |                              | (126 ± 10)                               |       |       | (13 ± 3)         |     |     | (19 ± 3)        |      |      | (20 ± 4)   |      |      |
|                              | 313                          | 146                                      | 117   | 144   | 11               | 11  | 25  | 27              | 24   | 18   | 17         | 17   | 25   |
|                              |                              | (136 ± 16)                               |       |       | (16 ± 8)         |     |     | (23 ± 5)        |      |      | (20 ± 5)   |      |      |
|                              | 625                          | 120                                      | 128   | 117   | 11               | 12  | 19  | 19              | 24   | 25   | 18         | 13   | 10   |
|                              |                              | (122 ± 6)                                |       |       | (14 ± 4)         |     |     | (23 ± 3)        |      |      | (14 ± 4)   |      |      |
| S9 mix (+)                   | 1250                         | 117                                      | 134   | 132   | 15               | 14  | 13  | 26              | 23   | 22   | 16         | 21   | 20   |
|                              |                              | (128 ± 9)                                |       |       | (14 ± 1)         |     |     | (24 ± 2)        |      |      | (19 ± 3)   |      |      |
|                              | 2500                         | 134                                      | 118   | 143   | 14               | 11  | 16  | 21              | 34   | 23   | 18         | 12   | 18   |
|                              |                              | (132 ± 13)                               |       |       | (14 ± 3)         |     |     | (26 ± 7)        |      |      | (16 ± 3)   |      |      |
|                              | 5000                         | 144                                      | 154   | 134   | 11               | 17  | 12  | 27              | 27   | 35   | 18         | 20   | 16   |
|                              |                              | (144 ± 10)                               |       |       | (13 ± 3)         |     |     | (30 ± 5)        |      |      | (18 ± 2)   |      |      |
|                              |                              | (144 ± 10)                               |       |       | (13 ± 3)         |     |     | (30 ± 5)        |      |      | (18 ± 2)   |      |      |
| S9 mix (+)                   | Negative control             | 132                                      | 120   | 125   | 12               | 11  | 13  | 20              | 32   | 27   | 19         | 35   | 36   |
|                              |                              | (126 ± 6)                                |       |       | (12 ± 1)         |     |     | (26 ± 6)        |      |      | (30 ± 10)  |      |      |
|                              | 19.5                         | 136                                      | 143   | 145   | 15               | 13  | 13  | 26              | 34   | 28   | 33         | 29   | 42   |
|                              |                              | (141 ± 5)                                |       |       | (14 ± 1)         |     |     | (29 ± 4)        |      |      | (35 ± 7)   |      |      |
|                              | 39.1                         | 139                                      | 129   | 123   | 15               | 16  | 10  | 22              | 21   | 21   | 22         | 28   | 36   |
|                              |                              | (130 ± 8)                                |       |       | (14 ± 3)         |     |     | (21 ± 1)        |      |      | (29 ± 7)   |      |      |
|                              | 78.1                         | 158                                      | 130   | 137   | 13               | 13  | 5   | 28              | 17   | 22   | 41         | 22   | 26   |
|                              |                              | (142 ± 15)                               |       |       | (10 ± 5)         |     |     | (22 ± 6)        |      |      | (30 ± 10)  |      |      |
| S9 mix (+)                   | 156                          | 144                                      | 126   | 131   | 6                | 6   | 13  | 27              | 11   | 26   | 32         | 35   | 35   |
|                              |                              | (134 ± 9)                                |       |       | (8 ± 4)          |     |     | (21 ± 9)        |      |      | (34 ± 2)   |      |      |
|                              | 313                          | 148                                      | 129   | 113   | 13               | 15  | 10  | 40              | 30   | 36   | 31         | 25   | 36   |
|                              |                              | (130 ± 18)                               |       |       | (13 ± 3)         |     |     | (35 ± 5)        |      |      | (31 ± 6)   |      |      |
|                              | 625                          | 138 #                                    | 138 # | 114 # | 9 #              | 9 # | 9 # | 24 #            | 24 # | 29 # | 27 #       | 26 # | 26 # |
|                              |                              | (130 ± 14)                               |       |       | (9 ± 0)          |     |     | (26 ± 3)        |      |      | (26 ± 1)   |      |      |
|                              |                              | (130 ± 14)                               |       |       | (9 ± 0)          |     |     | (26 ± 3)        |      |      | (26 ± 1)   |      |      |
| Positive control S9 mix (-)  | Chemical                     | AF-2                                     |       |       | NaN <sub>3</sub> |     |     | AF-2            |      |      | AF-2       |      |      |
|                              | Dose(µg/plate)               | 0.01                                     |       |       | 0.5              |     |     | 0.01            |      |      | 0.1        |      |      |
|                              | Number of revertants/plate   | 673                                      | 707   | 716   | 335              | 332 | 304 | 86              | 118  | 90   | 415        | 390  | 449  |
| Positive control S9 mix (+)  |                              | (699 ± 23)                               |       |       | (324 ± 17)       |     |     | (98 ± 17)       |      |      | (418 ± 30) |      |      |
|                              | Chemical                     | 2-AA                                     |       |       | 2-AA             |     |     | 2-AA            |      |      | 2-AA       |      |      |
|                              | Dose(µg/plate)               | 1                                        |       |       | 2                |     |     | 10              |      |      | 0.5        |      |      |
|                              | Number of revertants/plate   | 1076                                     | 1066  | 1093  | 249              | 286 | 288 | 1001            | 937  | 948  | 314        | 304  | 343  |
|                              |                              | (1078 ± 14)                              |       |       | (274 ± 22)       |     |     | (962 ± 34)      |      |      | (320 ± 20) |      |      |

Negative control : Acetone

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

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

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

# : Precipitation of test article

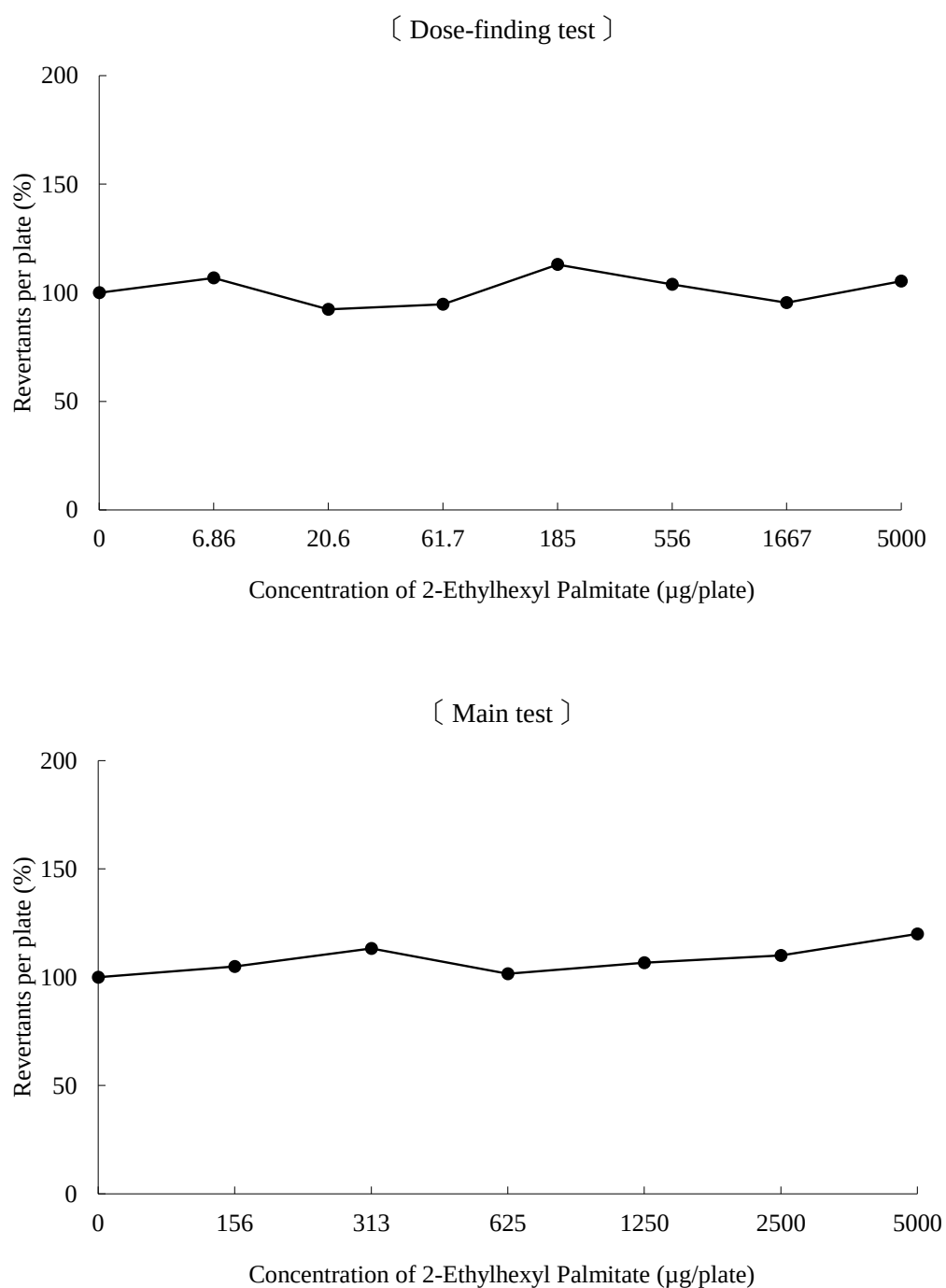


Figure 1-1 Dose-response curves of revertants on  
*Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation  
 in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

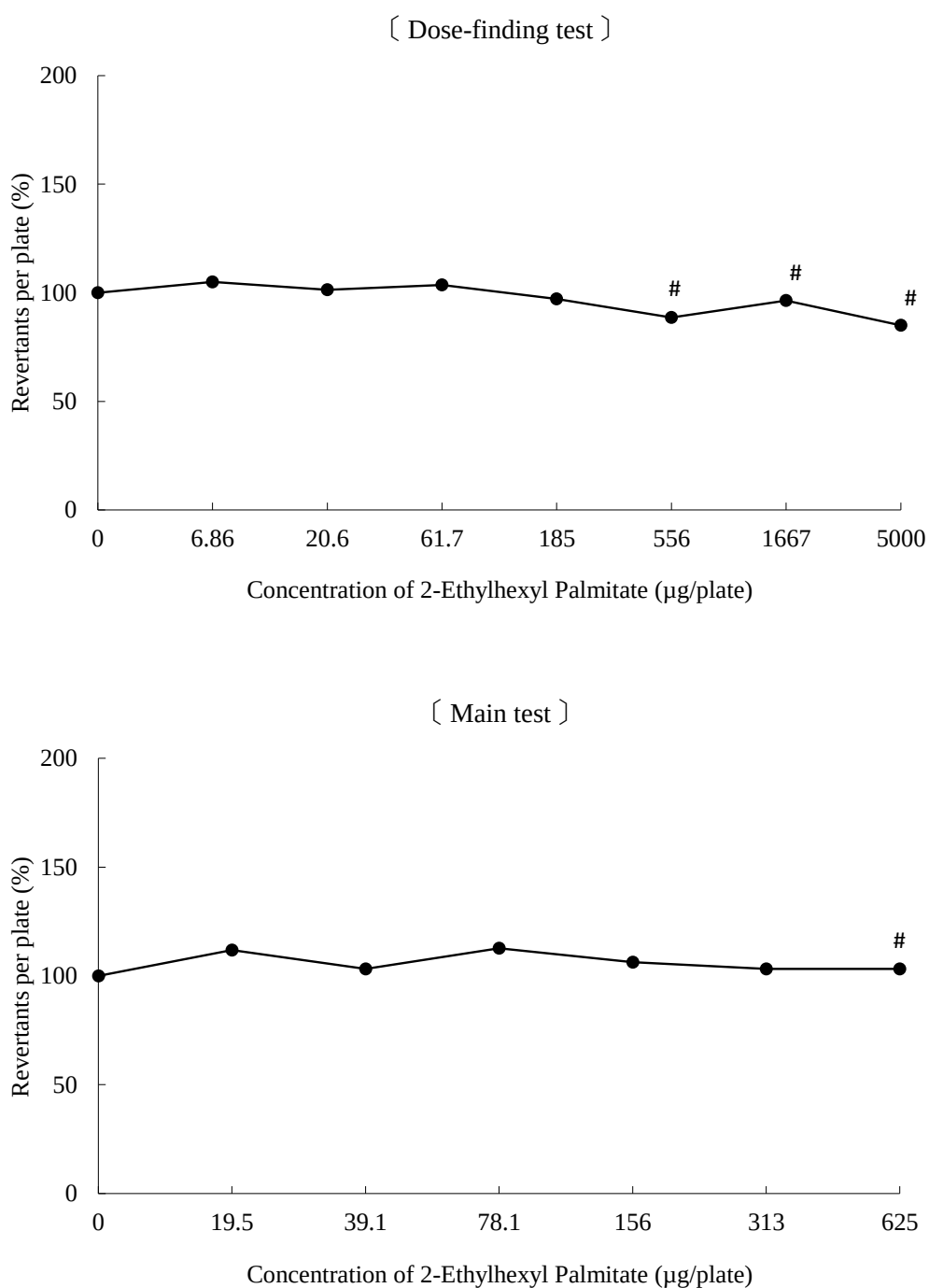


Figure 1-2 Dose-response curves of revertants on *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

# : Precipitation of test article



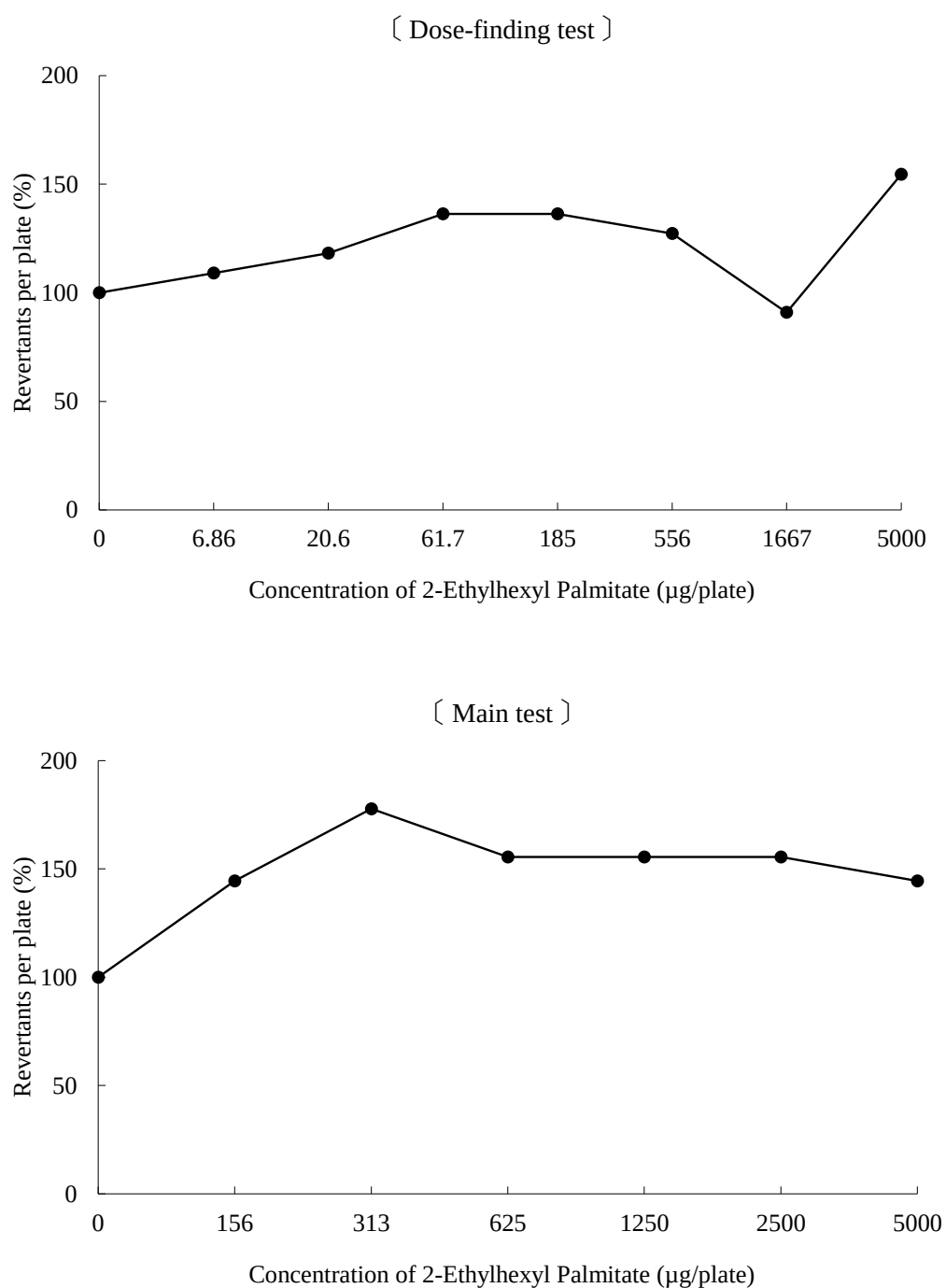


Figure 2-1 Dose-response curves of revertants on *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

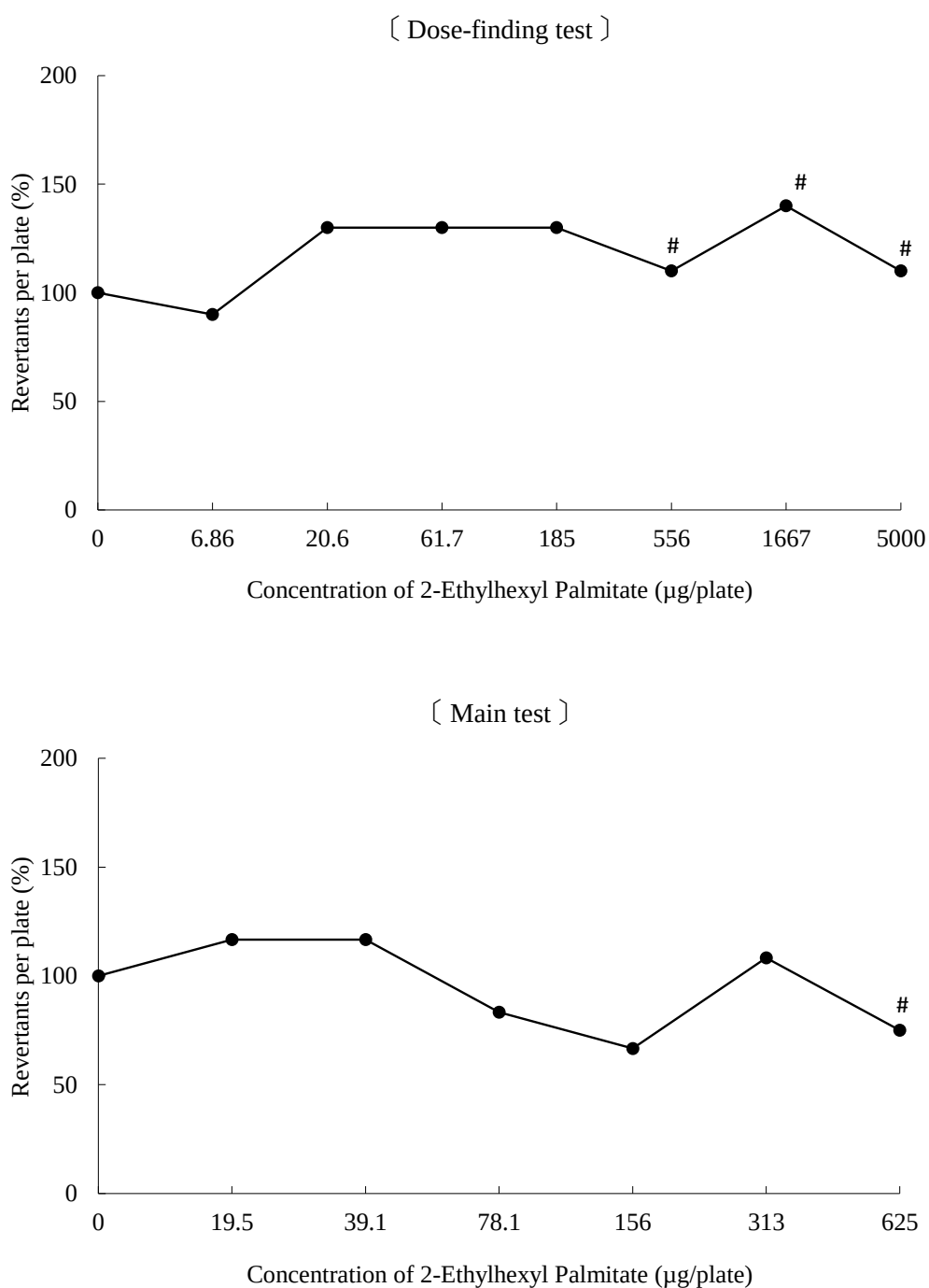


Figure 2-2 Dose-response curves of revertants on *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

# : Precipitation of test article

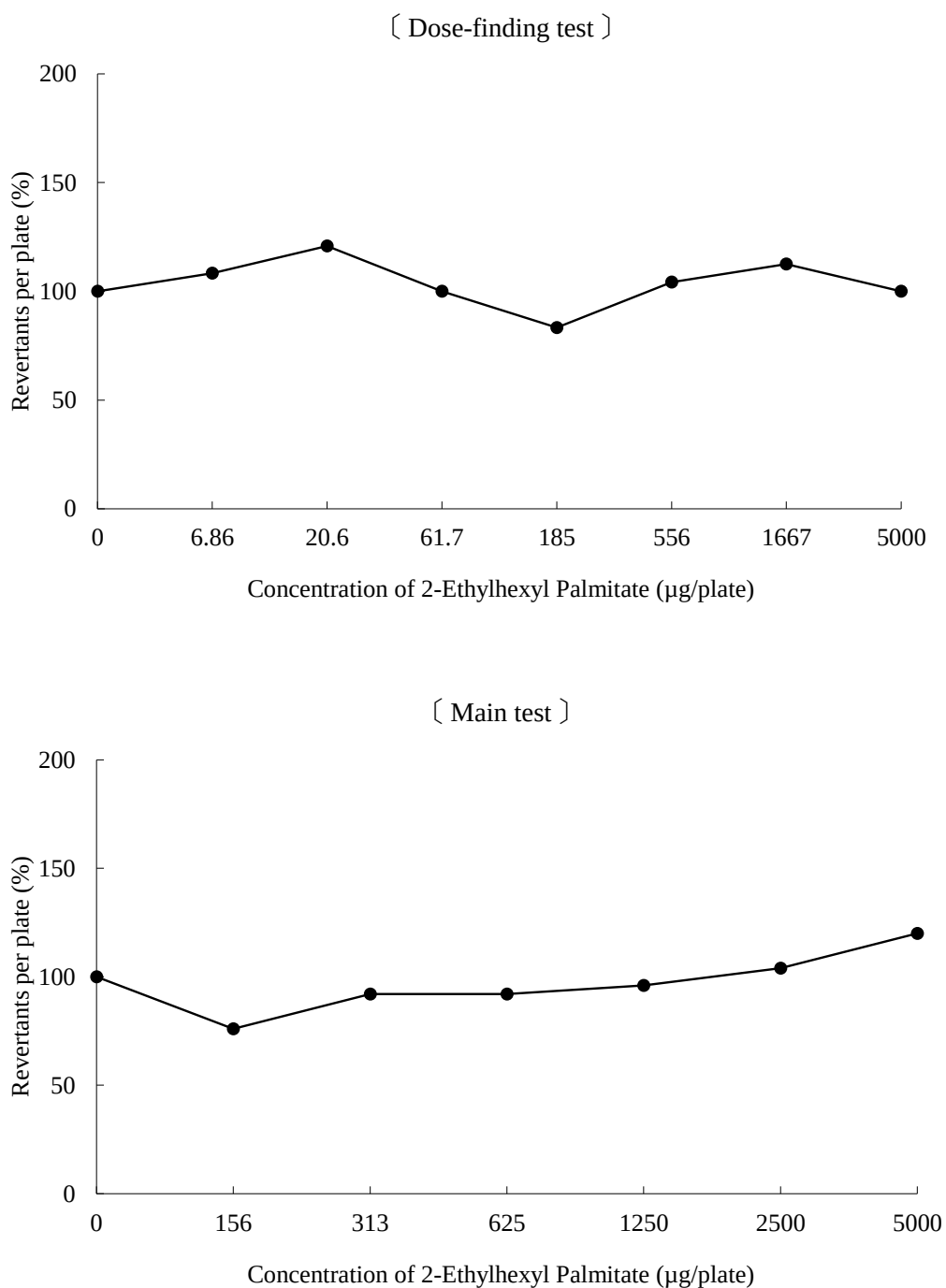


Figure 3-1 Dose-response curves of revertants on  
*Escherichia coli* WP2uvrA without metabolic activation  
in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

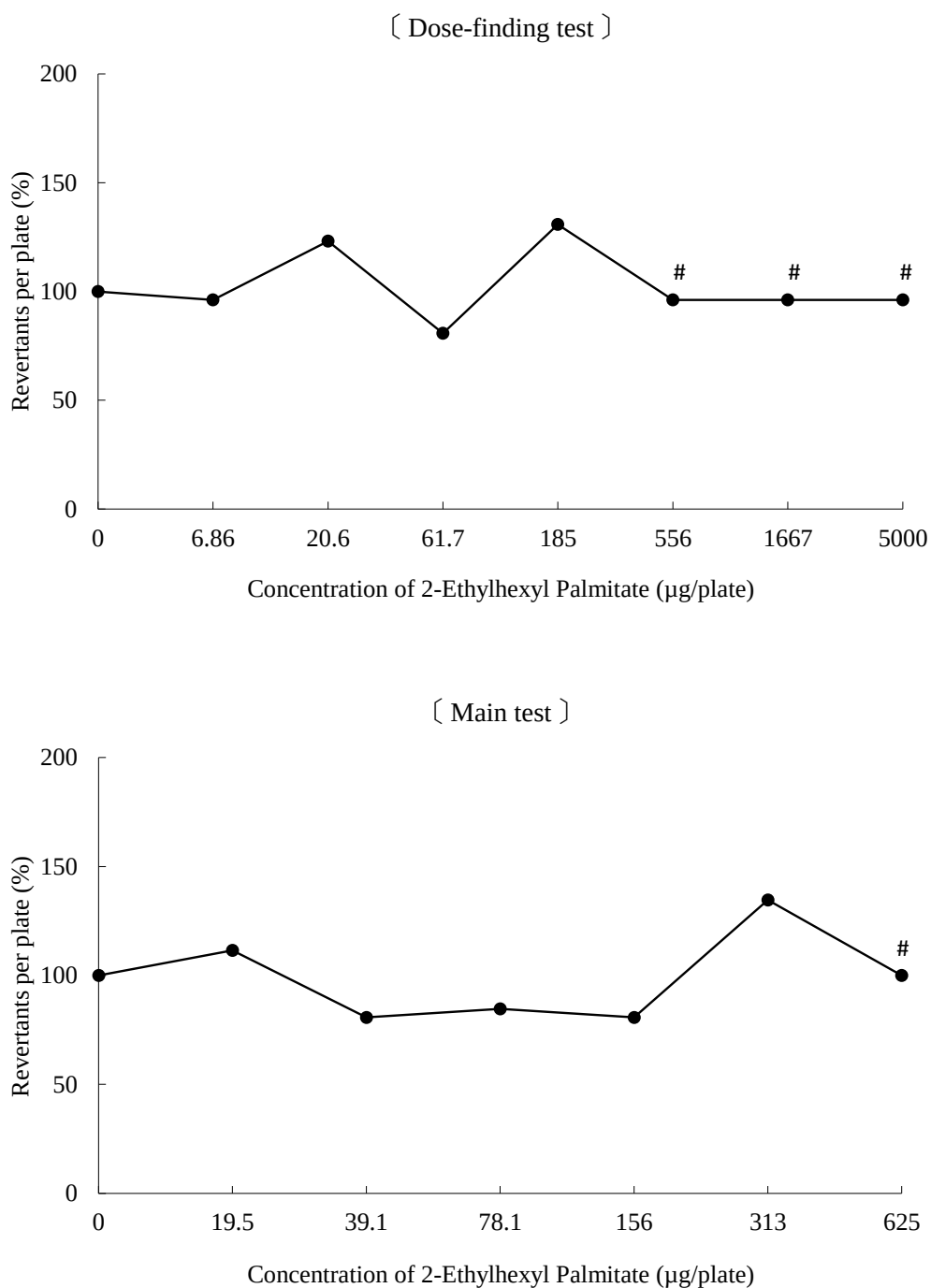


Figure 3-2 Dose-response curves of revertants on  
*Escherichia coli* WP2uvrA with metabolic activation  
 in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

# : Precipitation of test article

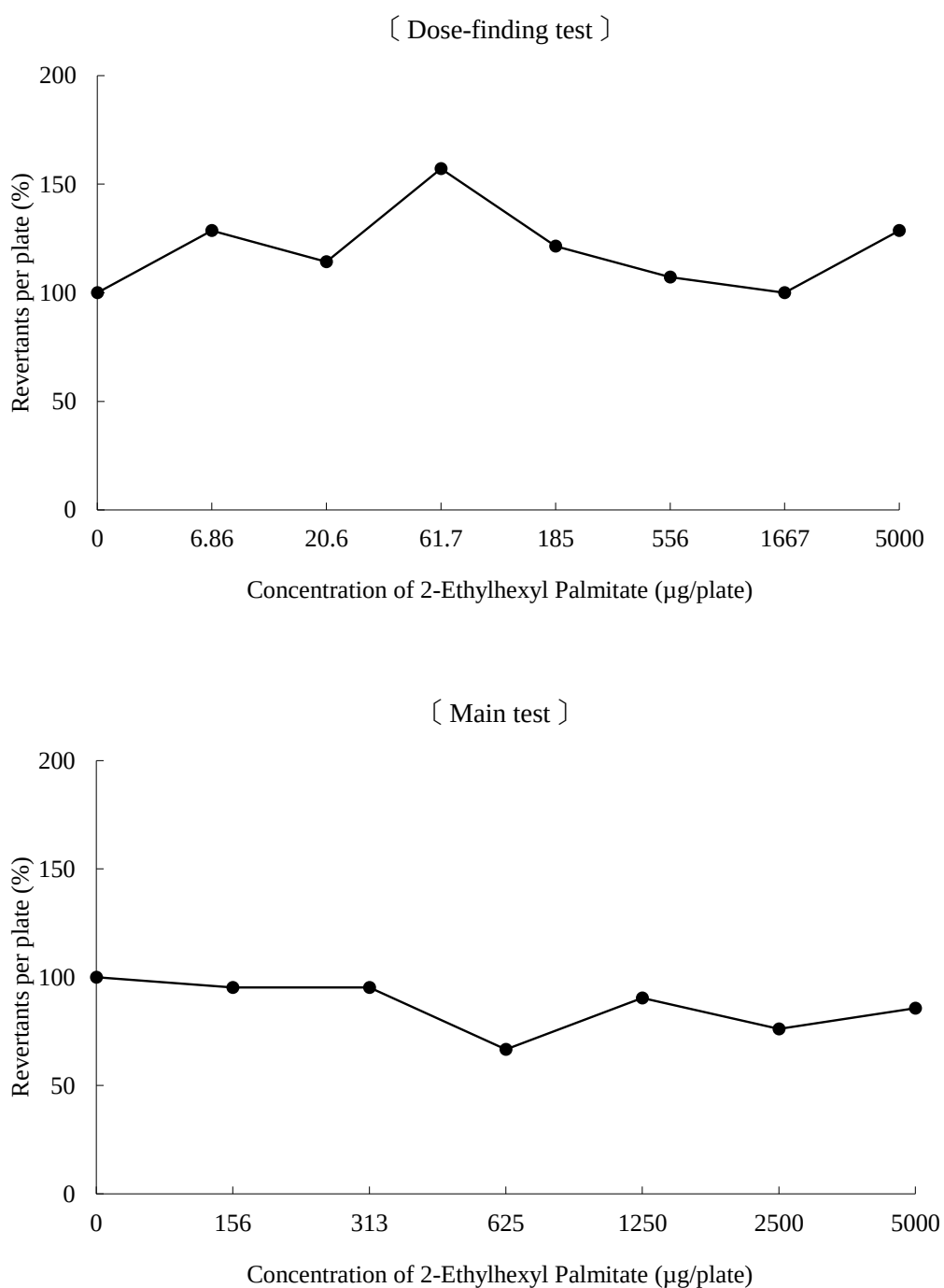


Figure 4-1 Dose-response curves of revertants on *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

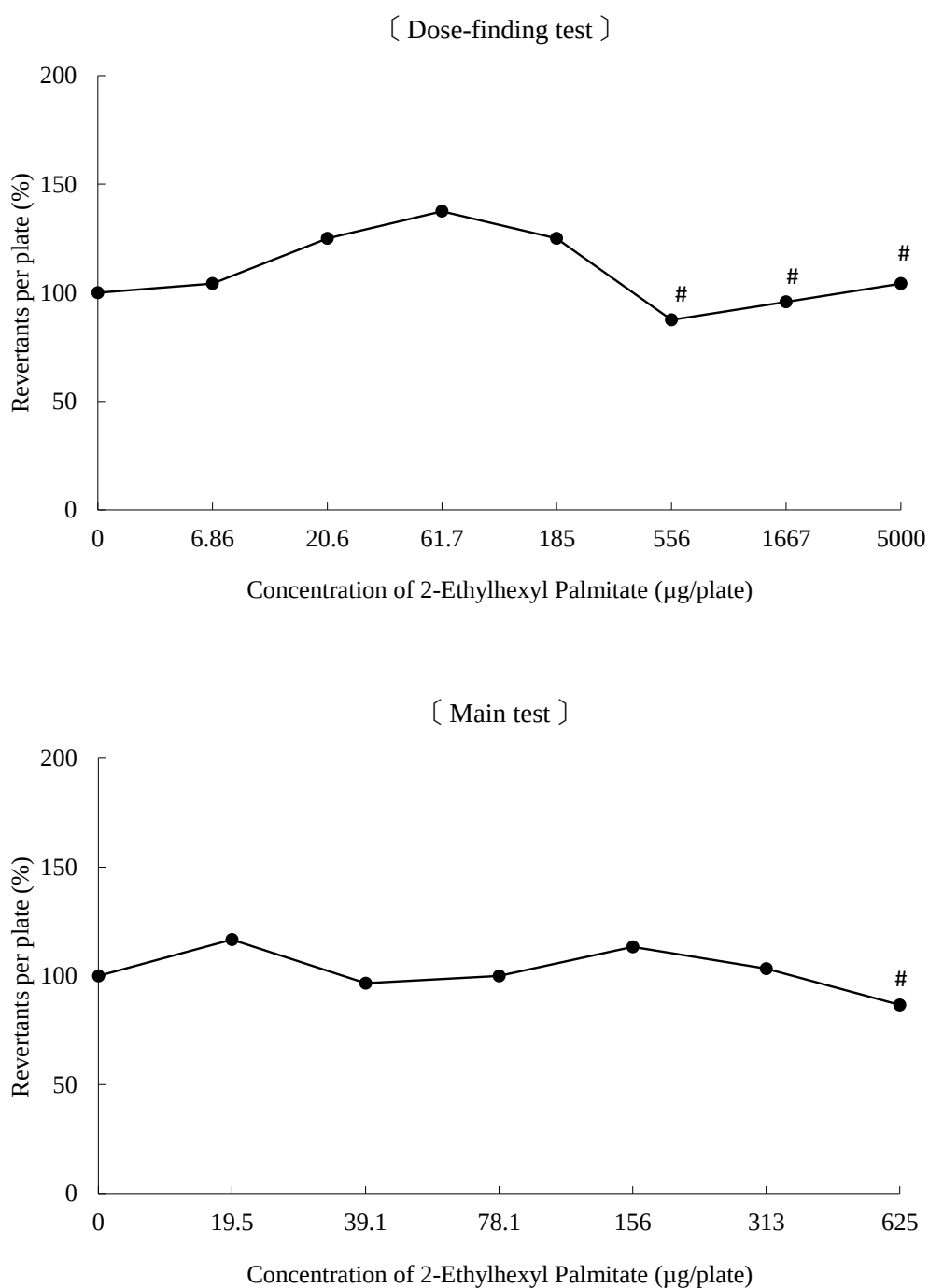


Figure 4-2 Dose-response curves of revertants on *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

# : Precipitation of test article

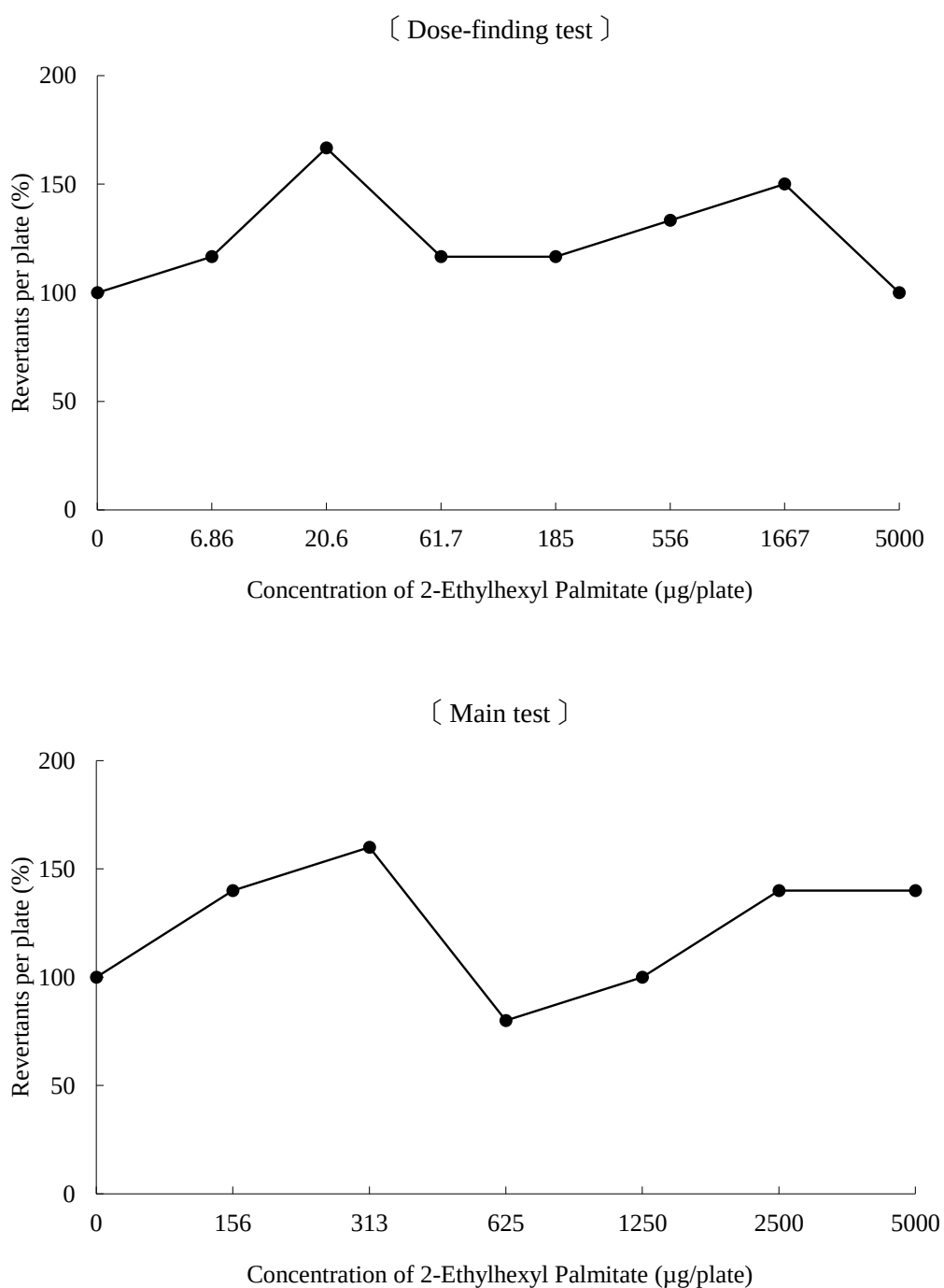


Figure 5-1 Dose-response curves of revertants on *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

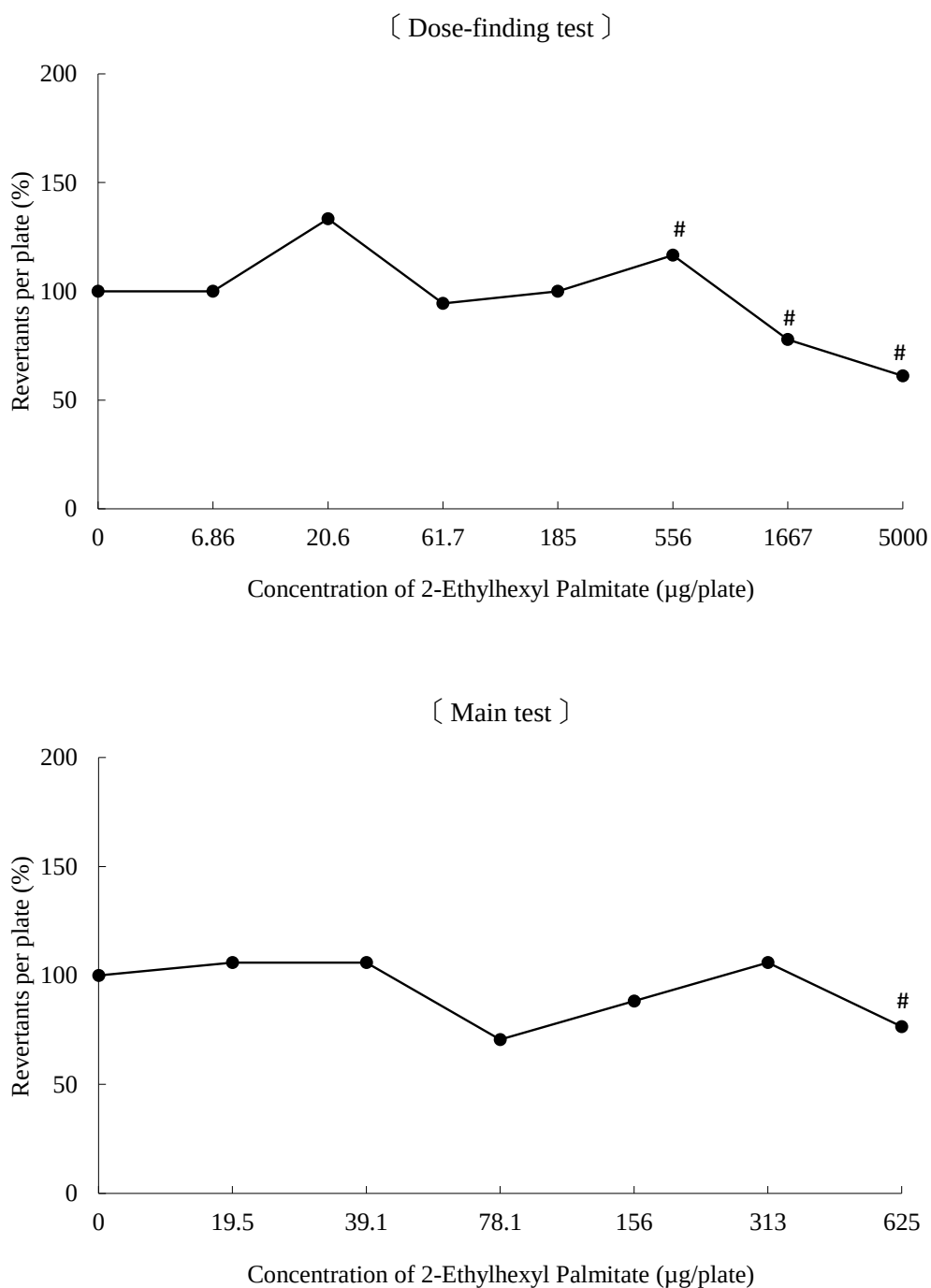


Figure 5-2 Dose-response curves of revertants on *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation in bacterial reverse mutation test of 2-Ethylhexyl Palmitate

# : Precipitation of test article



## Historical control data for bacterial reverse mutation test

(2021)

| Reference : Control data (Date : 2016.4~2021.3)          |               |                |                  |              |             |                |              |              |               |               |
|----------------------------------------------------------|---------------|----------------|------------------|--------------|-------------|----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Strain                                                   | TA100         |                | TA1535           |              | WP2uvrA     |                | TA98         |              | TA1537        |               |
| Metabolic activation                                     | S9(-)         | S9(+)          | S9(-)            | S9(+)        | S9(-)       | S9(+)          | S9(-)        | S9(+)        | S9(-)         | S9(+)         |
| No. of data                                              | 342           | 341            | 336              | 335          | 335         | 334            | 338          | 336          | 335           | 334           |
| Mean $\pm$ S.D.                                          | 109 $\pm$ 16  | 120 $\pm$ 13   | 11 $\pm$ 3       | 11 $\pm$ 3   | 23 $\pm$ 6  | 26 $\pm$ 6     | 16 $\pm$ 4   | 31 $\pm$ 5   | 13 $\pm$ 4    | 17 $\pm$ 5    |
| Maximum                                                  | 169           | 157            | 30               | 21           | 51          | 58             | 37           | 48           | 25            | 34            |
| Minimum                                                  | 83            | 92             | 6                | 6            | 11          | 13             | 8            | 19           | 5             | 10            |
| X-R-Rs <sup>a</sup>                                      | 85 ~ 133      | 88 ~ 152       | 6 ~ 16           | 6 ~ 16       | 7 ~ 39      | 10 ~ 42        | 5 ~ 27       | 18 ~ 44      | 2 ~ 24        | 6 ~ 28        |
| Reference : Positive control data (Date : 2016.4~2021.3) |               |                |                  |              |             |                |              |              |               |               |
| Strain                                                   | TA100         |                | TA1535           |              | WP2uvrA     |                | TA98         |              | TA1537        |               |
| Metabolic activation                                     | S9(-)         | S9(+)          | S9(-)            | S9(+)        | S9(-)       | S9(+)          | S9(-)        | S9(+)        | S9(-)         | S9(+)         |
| Compound                                                 | AF-2          | 2-AA           | NaN <sub>3</sub> | 2-AA         | AF-2        | 2-AA           | AF-2         | 2-AA         | 9-AA          | 2-AA          |
| Concentration (μg/plate)                                 | 0.01          | 1              | 0.5              | 2            | 0.01        | 10             | 0.1          | 0.5          | 80            | 2             |
| No. of data                                              | 326           | 326            | 320              | 320          | 319         | 319            | 322          | 321          | 319           | 319           |
| Mean $\pm$ S.D.                                          | 691 $\pm$ 105 | 1478 $\pm$ 330 | 333 $\pm$ 73     | 366 $\pm$ 98 | 95 $\pm$ 15 | 1194 $\pm$ 109 | 293 $\pm$ 34 | 355 $\pm$ 46 | 356 $\pm$ 242 | 263 $\pm$ 123 |
| Maximum                                                  | 951           | 2344           | 510              | 630          | 141         | 1489           | 393          | 531          | 1145          | 782           |
| Minimum                                                  | 398           | 969            | 206              | 231          | 58          | 949            | 169          | 253          | 73            | 112           |
| X-R-Rs <sup>a</sup>                                      | 547 ~ 835     | 1193 ~ 1763    | 259 ~ 407        | 273 ~ 459    | 74 ~ 116    | 1008 ~ 1380    | 227 ~ 360    | 278 ~ 432    | 98 ~ 614      | 178 ~ 348     |

<sup>a</sup> X-R-Rs =  $X \pm 2.66Rs$  ; X = Mean , Rs = Mean of (Xi - Xi-1)

Culture medium : OXOID Nutrient Broth No.2

Subculture : Tester strain suspension (12 μL) was inoculated into an L-shaped tube (capacity of approximately 40 mL) containing 12 mL of the culture medium for subculture. Then, the mixture was incubated for 10 hr.

Mimimum glucose agar medium : Vitalmedia AMT, Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.