

パラアセトアルデヒドの
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

目次

要約	1
試験目的	1
試験ガイドラインと GLP	1
材料と方法	2
1. 被験物質	2
2. 陽性対照物質	2
3. 検定菌	3
4. 試験材料	3
5. 被験物質調製液の調製	5
6. 試験操作	5
7. 結果の表示	8
8. 判定	8
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び 試験計画書に従わなかったこと	8
結果と考察	8
1. 用量設定試験	8
2. 本試験	9
参考文献	9
Tables	11
Figures	14

要約

パラアセトアルデヒドの遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

用量設定試験を 50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 5 用量に設定して行ったところ、S9 mix 非存在下および存在下とも、用いたいずれの検定菌においても生育障害は認められなかった。変異コロニー数は、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

これらの結果に基づき、すべての検定菌で最高用量を 5000 µg/plate とし公比 2 で 5 用量(313～5000 µg/plate)を設定して本試験 I および本試験 II を行った。その結果、用いたすべての検定菌において、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、パラアセトアルデヒドは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

試験目的

パラアセトアルデヒドの遺伝子突然変異誘発性(変異原性)の有無を検討し、安全性評価の資料とするために、パラアセトアルデヒドについて細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、一部改正 平成 17 年 4 月 1 日)および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997 年 7 月 21 日採択)に準拠し、「化学物質 GLP」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、最終改正 平成 17 年 4 月 1 日)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるパラアセトアルデヒド [別名: 2,4,6-トリメチル-1,3,5-トリオキサン、英名: 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane、略称:PAA、分子式: $C_8H_{12}O_3$ 、ロット番号: 含量: 88.5% (毛管カラム GC)、不純物: アセトアルデヒド 11.2%、製造:]は、特異臭(芳香)のある無色澄明の液体である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は使用時まで密閉容器に入れ、遮光条件下で室温保管した。

被験物質原体の安定性については、和光純薬工業株式会社において、実験終了後に返却した被験物質の含量を分析した結果、被験物質は実験期間中安定であったことが確認された (Appendix 2、GLP 基準外)。なお、被験物質原体の安定性については GLP 基準下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、当該試験の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれを結果の各 Table 中に示した。

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド*	AF-2	CKQ1402 (2001年9月13日)	和光純薬工業	99.0%
アジ化ナトリウム	SA	ELE2329 (2001年5月15日)	和光純薬工業	99.2%
9-アミノアクリジン	9AA	106F06681 (2001年5月15日)	Sigma Chemical	97%以上
ベンゾ[a]ピレン	B[a]P	EWJ5277 (2005年12月16日)	和光純薬工業	100.1%
2-アミノアントラセン	2AA	DWK5667 (2001年9月13日)	和光純薬工業	97.4%

AF-2、9AA、B[a]P および 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: LTQ5318、和光純薬工業) に、SA は日局注射用水 (製造番号: K6A81、大塚製薬工場) に溶解し、所定の濃度に調製した後、冷凍保存 (設定温度: -20°C) し、調製後 6 か月以内に用時に解凍して用いた。各陽性対照物質調製液の調製濃度および添加量を以下に示す。

菌 株	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
	物質名 (添加量:μL/plate)	調製濃度 (μg/mL)	物質名 (添加量:μL/plate)	調製濃度 (μg/mL)
<i>Salmonella typhimurium</i>				
TA100	AF-2(100)	0.1	B[a]P(100)	50
TA1535	SA (100)	5	2AA(20)	100
TA98	AF-2(100)	1	B[a]P(100)	50
TA1537	9AA(100)	800	B[a]P(100)	50
<i>Escherichia coli</i>				
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2(100)	0.1	2AA(100)	100

3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の 4 菌株は 1997 年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は 1997 年 4 月 9 日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターのより分与された。*S. typhimurium* の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異²⁾、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異³⁾ を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は凍結保存(設定温度:-80℃)したものを用いた。凍結保存菌は、液体培地にて 37℃で静止期の初期まで培養した菌液 0.8 mL に対し、滅菌 DMSO を 0.07 mL の割合で加え、急速凍結して調製した。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異 (*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が維持されていることを確認し、試験に用いた。

4. 試験材料

1) 最少グルコース寒天平板培地

極東製薬工業で製造した最少グルコース寒天平板培地(ロット番号:DZA76901、2006年6月9日製造)を購入して用いた。なお、培地 1 L あたりの組成は以下のとおりで、径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

硫酸マグネシウム・七水和物	0.2 g
クエン酸・一水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	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
大洋寒天(清水食品)	15 g

2) トップアガー

水溶液(A)をオートクレーブ滅菌した後、フィルター滅菌した(B)または(C)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) ラット肝臓から調製した S9

キッコーマンで製造した S9(ロット番号:RAA-545、2006年6月9日製造)を購入して用いた。

- ①動物 Sprague-Dawley 系ラット、雄:7 週齢
- ②誘導方法 フェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)を、1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg 腹腔内投与した。
- ③S9 調製 5 日目に致死させて摘出した肝臓を生理食塩液で灌流したのち、3 倍量の 0.15 mol/L 塩化カリウム溶液を加えてホモジナイズし、9000×g で 10 分間遠沈して得た上清画分。
- ④保存条件 凍結保存(設定温度:-80℃)し、製造後 6 か月以内に使用した。

4) S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成分	S9 mix 1 mL 中の量	調製濃度
S9	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 mL	100 µmol/mL
Cofactor*	0.38 mL	—
<ul style="list-style-type: none"> ┌ 塩化カルウム ├ グルコース-6-リン酸 ├ NADH └ NADPH 	—	33 µmol/mL
	—	5 µmol/mL
	—	4 µmol/mL
	—	4 µmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 µmol/mL

NADH: Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt

NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt

*: Cofactor は、上記の成分を混合してフィルター滅菌した後、凍結保存(設定温度: -80°C)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

5. 被験物質調製液の調製

被験物質は 50.0 mg/mL の濃度で水に溶解するため、試験に際しては、被験物質を日局注射用水(製造番号: K6A81、大塚製薬工場)に溶解して最高用量の被験物質調製液(50.0 mg/mL)を調製し、以下同溶媒で段階希釈して速やかに試験に用いた。なお、被験物質調製液の調製においては、被験物質の秤量値に 0.885 を乗じた値を被験物質量とすることにより純度換算を行った。被験物質調製液は用時調製した。調製濃度を以下に示す。なお、当該試験における表示濃度は、純度換算した濃度とした。

用量設定試験: 0.500、1.50、5.00、15.0、50.0 mg/mL

本試験 I、II: 3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 mg/mL

なお、被験物質調製液(原液)の調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。また、調製後すみやかに試験に供すること、および変異原性試験の特徴[GLP ガイドブック(1997)、薬事日報社]から、溶媒中での安定性および含量試験は実施しなかった。

6. 試験操作

1) 試験菌液の作製

凍結保存菌を解凍後、速やかにニュートリエントプロス No. 2(ロット番号: 255164、Oxoid)を 12 mL

入れた L 字型試験管に 12 μ L (TA100, TA1535 および TA98)あるいは 6 μ L (TA1537 および WP2 *uvrA*) 接種し、4°Cで保冷後、37°Cで 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには DOUBLE SHAKER NR-3 (大洋科学工業)を用い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。試験菌液の増殖の確認のため、分光光度計 (型式:UV-120-02、島津製作所)により、試験菌液の 660 nm の吸光度を測定した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。660 nm の吸光度の測定値および生菌数を以下に示す。

試験の種類		検定菌				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	OD ₆₆₀	1.859	1.978	1.973	1.926	1.831
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.42	3.04	3.73	2.20	1.14
本試験 I	OD ₆₆₀	1.900	2.01	1.997	1.945	1.815
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.33	2.91	3.55	2.38	1.09
本試験 II	OD ₆₆₀	1.885	1.991	1.995	1.948	1.826
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.67	3.48	4.35	2.47	1.19

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2005 年度の背景データの平均値の 90%以上であった。また、各試験菌液の生菌数は 1×10^9 cells/mL 以上であった。

2) 試験法

試験は、プレインキュベーション法により、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下および哺乳動物 (ラット) のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37°Cで 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液の代わりに使用溶媒 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37°Cで 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11、システムサイエンス) または目視により計測した。被験物質に由来する沈澱の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。

用いた平板は、用量設定試験においては陰性および陽性対照では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照および各用量につき3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

上記の方法により、用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

3) 試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、最高用量を5000 µg/plateとし、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の5段階の用量を設定した。

本試験においては、用量設定試験で生育阻害が認められなかったことから、最高用量をすべての検定菌で5000 µg/plateとし、313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の5段階の用量を設定した。

4) 無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL および 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、あるいは S9 mix 0.5 mL を入れ、37°C で 20 分間ブレインキューベーションした後、2 mL のトッパアガー (*Salmonella typhimurium* 用) を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。平板を 37°C で 48 時間培養後、雑菌の混入の有無を調べた。

5) 識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 非存在下は黒、S9 mix 存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 *uvrA* は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、… と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々 0 および P と記入して識別した。試験の識別は、通し番号 (1、2、3、…) を設けて菌の識別番号の左に記入した。生菌数測定における平板の識別は、菌の識別番号の左に VC と記入した。無菌試験における平板の識別は、被験物質については試験の識別で設けた通し番号 (1、2、3、…) のみを記入し、S9 mix については S9 と記入した。

6) 背景データによる管理

陰性対照および陽性対照の結果が、背景データの変動範囲内 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) から外れた場合には、該当する検定菌について再度、同一用量を用いて試験を実施し、再試験のデータを採

用することとした。なお、背景データは、2005 年度に実施した各試験の陰性対照値および陽性対照値とした (Appendix 3)。

7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値および標準偏差を示した。また、平均値を用いて用量-反応曲線を作成した。また、被験物質に由来する沈澱および生育阻害が認められた場合は、その旨表示することとした。

8. 判定

用いた 5 種の検定菌のうち、1 種以上の検定菌の S9 mix 非存在下あるいは S9 mix 存在下において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、本試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定することとした。なお、結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

結果と考察

1. 用量設定試験

パラアセトアルデヒドについて、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 5 段階の用量を設定して用量設定試験を行った (Table 1)。その結果、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、用いたいずれの用量においても認められなかった。

変異コロニー数は、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量を、すべての検定菌で 5000 µg/plate とした。

2. 本試験

最高用量を5000 µg/plateとし、公比2で5用量(313~5000 µg/plate)を設定して2回の本試験(本試験 I および本試験 II)を行った(Tables 2, 3 および Figures 1, 2)。その結果、2回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、用いたいずれの用量においても認められなかった。

変異コロニー数は、2回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の2倍以上となる増加は認められなかった。

すべての試験において、最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内(平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差)であったことから、本試験系の有効性が確認された。

パラアセトアルデヒドについては、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号:G-05-087)で、構造異常陽性の結果が得られている。また、関連物質である1,3,5-trimethylbenzeneについては復帰突然変異試験、染色体異常試験共に陰性の結果が報告されている⁴⁾。

以上の結果に基づき、パラアセトアルデヒドは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

参考文献

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K. H., Garner, R. C. eds., Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D. M., Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. In "Handbook of

Mutagenicity Test Procedures.” Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds., Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187

- 4) 祖父尼俊雄 監修:染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p.517(1999)

Table 1 Cytotoxicity of 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane in bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	148	126	124	9	10	6	21	32	38	17	27	15	9	4	8
		(133 ± 13)			(8 ± 2)			(30 ± 9)			(20 ± 6)			(7 ± 3)		
	50.0	156			14			25			17			9		
	150	133			5			19			19			3		
	500	149			7			24			22			5		
	1500	160			14			18			20			7		
5000	146			12			31			13			3			
S9 mix (+)	0	152	121	127	9	12	10	36	43	43	23	22	20	17	19	11
		(133 ± 16)			(10 ± 2)			(41 ± 4)			(22 ± 2)			(16 ± 4)		
	50.0	157			11			36			34			20		
	150	167			10			26			26			10		
	500	156			11			32			27			20		
	1500	143			10			38			24			13		
5000	155			18			45			27			16			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (µg/plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	B[a]P			2AA			2AA			B[a]P			B[a]P		
	Dose (µg/plate)	5			2			10			5			5		
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	437	439	417	561	598	561	130	102	127	317	401	400	542	449	309
		(431 ± 12)			(573 ± 21)			(120 ± 15)			(373 ± 48)			(433 ± 117)		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1281	1086	1099	277	289	306	562	573	551	294	284	276	170	170	132
		(1155 ± 109)			(291 ± 15)			(562 ± 11)			(285 ± 9)			(157 ± 22)		

Negative control, Water for injection JP

As the purity of the test substance was 88.5%, dose levels were adjusted for purity.

This test substance contained 11.2% acetaldehyde as impurity.

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

Table 2 Mutagenicity of 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane in bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substances dose (µg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	114	131	126	9	12	12	28	28	24	35	22	24	7	5	5
		(124 ± 9)			(11 ± 2)			(27 ± 2)			(27 ± 7)			(6 ± 1)		
	313	118	100	110	14	8	14	29	19	29	23	21	27	14	5	8
		(109 ± 9)			(12 ± 3)			(26 ± 6)			(24 ± 3)			(9 ± 5)		
	625	94	109	118	12	11	16	27	24	24	33	22	30	10	7	5
		(107 ± 12)			(13 ± 3)			(25 ± 2)			(28 ± 6)			(7 ± 3)		
S9 mix (+)	1250	108	105	92	13	13	15	30	26	24	33	30	19	7	11	8
		(102 ± 9)			(14 ± 1)			(27 ± 3)			(27 ± 7)			(9 ± 2)		
	2500	123	121	129	8	13	13	30	24	24	28	28	29	4	7	4
		(124 ± 4)			(11 ± 3)			(26 ± 3)			(28 ± 1)			(5 ± 2)		
	5000	127	132	130	14	13	16	23	29	27	18	20	27	10	6	5
		(130 ± 3)			(14 ± 2)			(26 ± 3)			(22 ± 5)			(7 ± 3)		
S9 mix (-)	0	134	122	107	12	15	8	31	38	28	30	27	30	15	13	9
		(121 ± 14)			(12 ± 4)			(32 ± 5)			(29 ± 2)			(12 ± 3)		
	313	152	135	139	9	13	14	30	29	26	29	28	33	14	6	10
		(142 ± 9)			(12 ± 3)			(28 ± 2)			(30 ± 3)			(10 ± 4)		
	625	134	150	146	8	8	9	19	25	29	30	39	26	13	19	14
		(143 ± 8)			(8 ± 1)			(24 ± 5)			(32 ± 7)			(15 ± 3)		
S9 mix (+)	1250	138	160	125	7	7	10	35	26	33	34	33	34	13	14	12
		(141 ± 18)			(8 ± 2)			(31 ± 5)			(34 ± 1)			(13 ± 1)		
	2500	139	123	127	9	11	8	27	49	45	25	31	35	14	11	13
		(130 ± 8)			(9 ± 2)			(40 ± 12)			(30 ± 5)			(13 ± 2)		
	5000	127	117	152	5	8	15	33	33	34	29	31	33	10	16	14
		(132 ± 18)			(9 ± 5)			(33 ± 1)			(31 ± 2)			(13 ± 3)		
Positive control	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (µg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	443	449	457	443	445	451	95	91	84	468	453	495	226	314	266
		(450 ± 7)			(446 ± 4)			(90 ± 6)			(472 ± 21)			(269 ± 44)		
Positive control	Chemical	B[a]P			2AA			2AA			B[a]P			B[a]P		
	Dose (µg / plate)	5			2			10			5			5		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1148	1083	1069	297	300	259	510	573	529	296	321	298	116	137	136
		(1100 ± 42)			(285 ± 23)			(537 ± 32)			(305 ± 14)			(130 ± 12)		

Negative control, Water for injection JP

As the purity of the test substance was 88.5%, dose levels were adjusted for purity.

This test substance contained 11.2% acetaldehyde as impurity.

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

Table 3 Mutagenicity of 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane in bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	137	134	138	5	15	8	40	37	39	22	16	27	8	7	6
		(136 ± 2)			(9 ± 5)			(39 ± 2)			(22 ± 6)			(7 ± 1)		
	313	123	150	123	10	12	12	33	22	34	20	25	22	7	7	10
		(132 ± 16)			(11 ± 1)			(30 ± 7)			(22 ± 3)			(8 ± 2)		
	625	145	134	145	8	8	17	36	42	44	28	17	32	6	6	11
		(141 ± 6)			(11 ± 5)			(41 ± 4)			(26 ± 8)			(8 ± 3)		
S9 mix (+)	1250	140	107	118	11	7	5	43	36	36	22	20	27	6	9	6
		(122 ± 17)			(8 ± 3)			(38 ± 4)			(23 ± 4)			(7 ± 2)		
	2500	134	120	108	16	12	10	38	43	36	23	16	22	2	4	8
		(121 ± 13)			(13 ± 3)			(39 ± 4)			(20 ± 4)			(5 ± 3)		
	5000	122	121	123	9	11	10	47	49	45	30	27	26	11	9	11
		(122 ± 1)			(10 ± 1)			(47 ± 2)			(28 ± 2)			(10 ± 1)		
S9 mix (-)	0	137	148	148	16	13	8	47	36	38	28	32	25	15	14	14
		(144 ± 6)			(12 ± 4)			(40 ± 6)			(28 ± 4)			(14 ± 1)		
	313	165	141	142	5	12	21	36	24	39	34	32	34	8	18	20
		(149 ± 14)			(13 ± 8)			(33 ± 8)			(33 ± 1)			(15 ± 6)		
	625	130	139	126	8	9	7	37	31	46	18	25	32	12	12	13
		(132 ± 7)			(8 ± 1)			(38 ± 8)			(25 ± 7)			(12 ± 1)		
S9 mix (+)	1250	126	163	124	15	14	14	32	30	44	34	22	32	8	16	12
		(138 ± 22)			(14 ± 1)			(35 ± 8)			(29 ± 6)			(12 ± 4)		
	2500	141	153	128	4	10	10	43	39	42	33	22	33	10	14	17
		(141 ± 13)			(8 ± 3)			(41 ± 2)			(29 ± 6)			(14 ± 4)		
	5000	152	118	112	11	12	18	49	33	36	28	26	31	16	16	13
		(127 ± 22)			(14 ± 4)			(39 ± 9)			(28 ± 3)			(15 ± 2)		
Positive control	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (µg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	438	432	470	477	466	498	113	110	116	484	504	582	486	480	446
		(447 ± 20)			(480 ± 16)			(113 ± 3)			(523 ± 52)			(471 ± 22)		
Positive control	Chemical	B[a]P			2AA			2AA			B[a]P			B[a]P		
	Dose (µg / plate)	5			2			10			5			5		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1132	1099	1114	364	323	290	576	538	574	317	275	281	153	150	184
		(1115 ± 17)			(326 ± 37)			(563 ± 21)			(291 ± 23)			(162 ± 19)		

Negative control, Water for injection JP

As the purity of the test substance was 88.5%, dose levels were adjusted for purity.

This test substance contained 11.2% acetaldehyde as impurity.

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

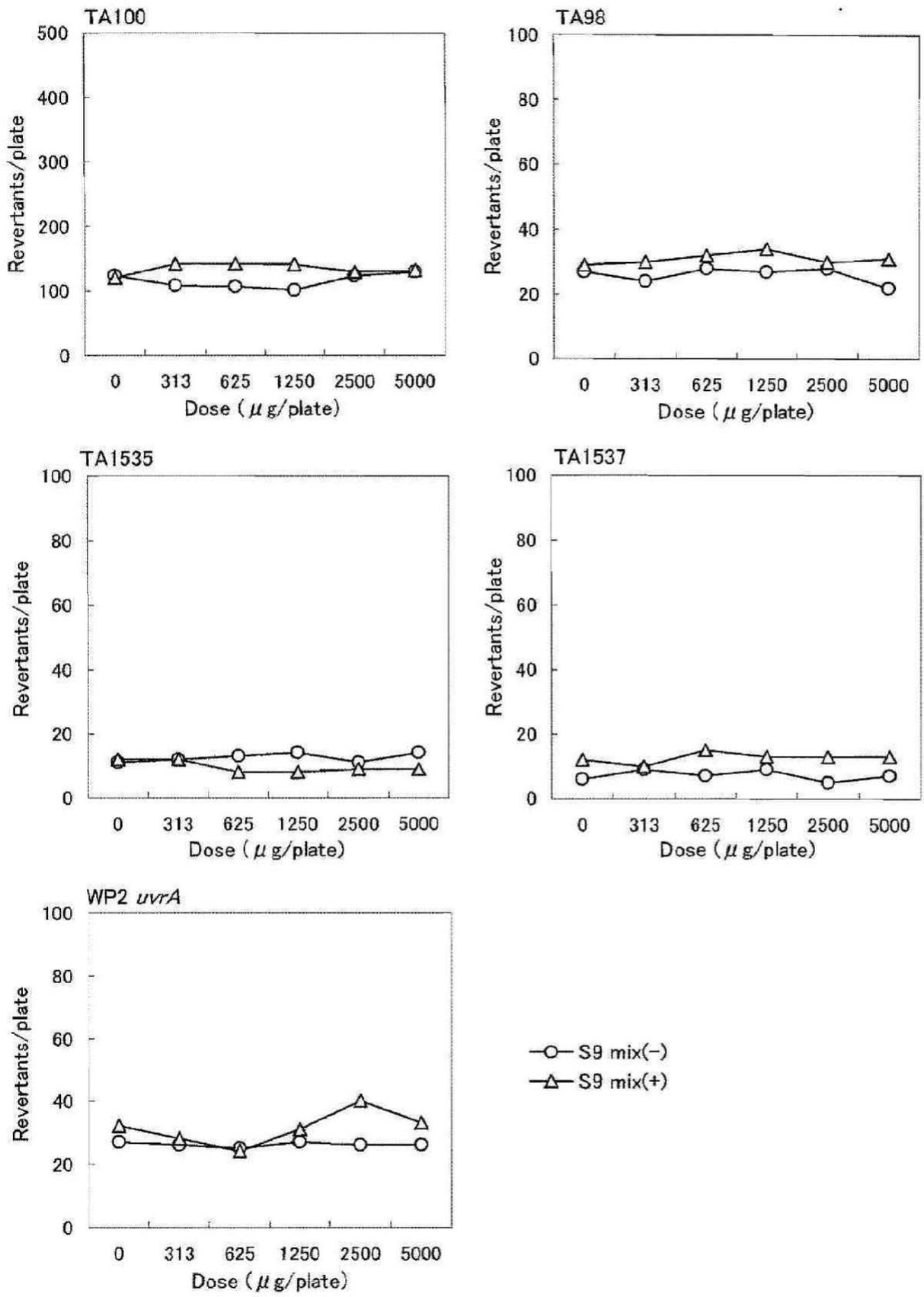


Figure 1 Dose response curves in mutagenicity test (I) of 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane in bacteria

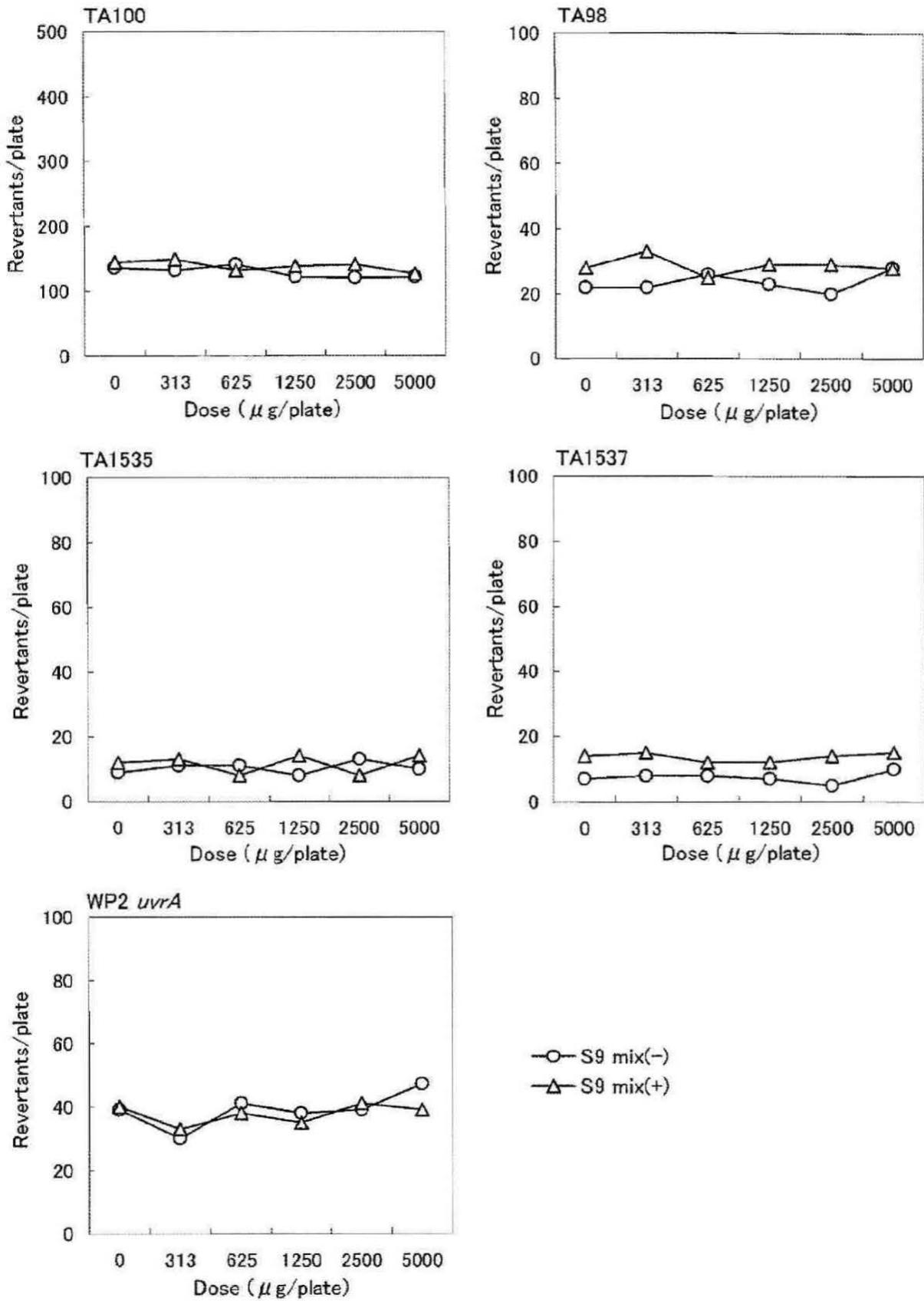


Figure 2 Dose response curves in mutagenicity test (II) of 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane in bacteria