

木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験
報告書

目 次

	頁
1 クヌギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験	1
報告書（表紙）	
陳述書	2
試験施設、毒性試験指針（ガイドライン）の適用、記録等の保管、	3
試験従事者	
目次	4
1. 要約	6
2. 試験目的	7
3. 被験物質	7
4. 試験材料および方法	7
5. 試験成績	13
6. 考察	14
7. 試験の有効性	15
8. 結論	15
9. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑い のある事態および試験計画書に従わなかつたこと	15
10. 参考文献	15
試験結果表	16
附表	19
2 スギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験	21
報告書（表紙）	
陳述書	22
試験施設、毒性試験指針（ガイドライン）の適用、記録等の保管、	23
試験従事者	
目次	24
1. 要約	26
2. 試験目的	27
3. 被験物質	27
4. 試験材料および方法	27
5. 試験成績	32
6. 試験の有効性	32
7. 考察	33
8. 結論	34
9. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑い のある事態および試験計画書に従わなかつたこと	34
10. 参考文献	34
試験結果表	36
比活性	38
図	39
附表	42

3	ベイツガ・スギ・ヒノキを原料とする木酢液の細菌を用いた	44
	復帰突然変異試験報告書（表紙）	
	陳述書	45
	試験施設、毒性試験指針（ガイドライン）の適用、記録等の保管、	46
	試験従事者	
	目次	47
	1. 要約	49
	2. 試験目的	50
	3. 被験物質	50
	4. 試験材料および方法	50
	5. 試験成績	55
	6. 試験の有効性	56
	7. 考察	56
	8. 結論	57
	9. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑い のある事態および試験計画書に従わなかつたこと	57
	10. 参考文献	57
	試験結果表	59
	比活性	61
	図	62
	付表	66

平成 15 年度農林水産省補助事業 環境負荷低減農業技術確立実証事業

クヌギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験

(試験番号 IET 03-0088)

最終報告書

平成 16 年 3 月 3 1 日

茨城県水海道市内守谷町 4321
財団法人 残留農業研究所

陳述書

試験名称：クヌギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験

当該試験は、変異原性試験の実施能力に関して、次に示す試験の適正実施に係る基準（GLP）に適合することが確認された試験施設で実施された。

農林水産省、農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準，11 農産第 6283 号，
1999 年

本報告書の試験方法には当該試験で使用した方法・手順が忠実に記述され、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されている。

試験施設

名称： 財団法人 残留農薬研究所
所在地： 茨城県水海道市内守谷町 4321 (〒303-0043)
運営管理者： 理事長 岩本 毅

毒性試験指針（ガイドライン）の適用

農林水産省（12 農産第 8147 号，2-1-19-1，2000 年）

記録等の保管

当該試験中に作出されたすべての生データ，試験計画書，被験物質のサンプル，最終報告書および記録は，財団法人残留農薬研究所の資料保管施設で保管する。

試験従事者

試験責任者 松元郷六

試験担当者

変異原性試験： 和田邦生，竹澤祐造，阿部美咲樹

目次

	頁
表紙	1
陳述書	2
試験施設	3
毒性試験指針（ガイドライン）の適用	3
試験期間	3
記録等の保管	3
試験従事者	3
目次	4
1. 要約	6
2. 試験目的	7
3. 被験物質	7
4. 試験材料および方法	7
4.1. テスト菌株	7
4.2. テスト菌株の検査	7
4.3. テスト菌株の保存と前培養	8
4.4. S9 Mix の調製	8
4.5. 被験物質溶液の調製	9
4.6. 陰性対照および陽性対照	9
4.7. アミノ酸添加軟寒天液の調製	9
4.8. 用量設定試験	10
4.9. 本試験	10
4.10. 確認試験	10
4.11. 処理方法	10
4.12. 無菌テスト	11
4.13. 試験の有効性	11
4.14. 結果の判定	11
5. 試験成績	13
5.1. 用量設定試験	13
5.2. 本試験	13
5.3. 確認試験	13
6. 考察	14
7. 試験の有効性	15
8. 結論	15

目次 (続き)

	頁
9. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および 試験計画書に従わなかつたこと	15
10. 参考文献	15

表

1. 試験結果表 (用量設定試験)	16
2. 試験結果表 (本試験)	17
3. 試験結果表 (確認試験)	18

付表

1. S-9 品質保証書	19
2. 復帰突然変異試験における対照群の背景データ	20

1. 要約

クヌギを原料とする木酢液の突然変異誘発性を検索するため、ネズミチフス菌 4 株 (TA100, TA1535, TA98, TA1537) と大腸菌 WP2 *uvrA*/pKM101 株を用いて、ラット肝臓の薬物代謝酵素系による代謝活性化を含む場合と含まない場合でプレインキュベーション法により復帰突然変異試験を行った。

用量設定試験では 5000 μg /プレート を最高用量として公比 4 で 5 用量を設定した。その結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株・用量において生育阻害や被験物質の析出は観察されなかった。しかし、代謝活性化による場合の TA1535 株において、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が 313 および 1250 μg /プレートの用量で認められた。

この結果を基に、本試験は代謝活性化系の有無にかかわらず 5000 μg /プレート を最高用量として公比 2 で 5 用量を設定した。その結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株において、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

代謝活性化による場合の TA1535 株において、用量設定試験と本試験の結果が異なったため代謝活性化による場合の TA1535 株を用いて確認試験を行った。その結果、復帰変異コロニー数は溶媒対照群に比べて 2 倍以上に増加しないことが確認された。

以上の結果から、本実験条件下におけるクヌギを原料とする木酢液の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論した。

2. 試験目的

クヌギを原料とする木酢液の細菌に対する突然変異誘発性の有無を検索した。

3. 被験物質

名称： クヌギを原料とする木酢液（クヌギ木酢液）
供給元： 林野庁
ロット番号： W15020
採取日： 2002年12月1日
性状： 液体
安定性： 不明であるが、室温で数年安定と考えられている。
保管条件： 冷暗所
参照用標本： 試験終了後、約1 mLの参照用標本を採取し、試験施設にて保管する。

4. 試験材料および方法^{1,2)}

4.1. テスト菌株

試験にはネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA1535, TA98, TA1537株と大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA*/pKM101株を用いた。これらの菌株を選定した理由は、毒性ガイドラインでこれらの菌株の使用を推奨しており、また、当研究所でも多くの背景データを所有しているためである。

TA100株は2000年9月5日に、日本バイオアッセイ研究センター（秦野市）より入手した。TA98株は1975年3月6日に、TA1535株とTA1537株は1973年3月26日に国立遺伝学研究所変異遺伝部（三島市）より入手した。WP2 *uvrA*/pKM101株は1973年3月26日に国立遺伝学研究所変異遺伝部より入手した大腸菌 WP2 *uvrA*株に、当研究所において1993年3月31日にプラスミド pKM101を導入し、作製した。

4.2. テスト菌株の検査

テスト菌株は遺伝的特性およびその他の諸性質について TA100株は2003年7月30日および12月2日、TA1535およびTA1537株は2003年7月9日、TA98株は2003年10月15日、WP2 *uvrA*/pKM101株は2003年11月5日に以下の検査を行い、これらの特性を有することを確認した。

- ① ネズミチフス菌におけるヒスチジン要求性
大腸菌におけるトリプトファン要求性
- ② 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- ③ ネズミチフス菌におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- ④ TA100, TA98 および WP2 *uvrA*/pKM101 株におけるアンピシリン耐性 (pKM101)

- ⑤ 自然突然変異体数
- ⑥ 陽性対照の既知変異原物質に対する反応性

4.3. テスト菌株の保存と前培養

菌液 0.8 mL にジメチルスルホキシド (DMSO, ガスクロマトグラフ用, 無水, 和光純薬工業株式会社) を 0.07 mL の割合で加えて -80°C 超低温槽 (CL-422, 日本フリーザー株式会社) で保存した。前培養にあたっては, 8 mL のニュートリエントブロス液体培地 (Oxoid nutrient broth No.2, Oxoid Ltd., Lot No. 218041) を L 字管 (容量 22 mL) に分取し, そこへ保存菌液 10 μL を接種した。菌は 37°C で 8 時間振とう培養した。前培養終了時の生菌数は分光光度計 (SPECTRONIC 21, BAUSCH & LOMB) を用いて吸光度 (OD_{660}) を測定することにより求めた。各試験の菌株ごとの生菌数は以下の通りであった。

試験名	生菌数 ($\times 10^9/\text{mL}$)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537
用量設定試験	2.2	1.5	2.2	2.1	1.3
本試験	1.9	2.1	3.4	2.7	1.3
確認試験	—	1.7	—	—	—

4.4. S9 Mix の調製

代謝活性化系として S9 Mix を用いた。代謝酵素誘導物質であるフェノバルビタール (PB) と 5,6-ベンゾフラボン (BF) を投与されたラット (投与スケジュールは 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) の肝臓ホモジネート 9000 \times g 上清分画 (S9) をキッコーマン株式会社より購入した。購入後, -80°C 超低温槽に保存した。製造後 6 カ月以内の S9 分画 (Lot No. RAA-491) を試験直前に解凍し, 直ちにコファクター (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, Lot No. 731) を加えて, 以下の組成になるように S9 Mix を調製した。S9 分画の特性を付表 1 に示す。

塩化マグネシウム	8 mM
塩化カリウム	33 mM
グルコース-6-リン酸	5 mM
NADH	4 mM
NADPH	4 mM
ナトリウム-リン酸緩衝液 pH 7.4	100 mM
S9 分画	10%

4.5. 被験物質溶液の調製

クヌギ木酢液は水溶性であるため、滅菌水 (Simpli Lab, 日本ミリポア・リミテッドを用いて製造した純水を滅菌したもの) を溶媒として用いた。被験物質溶液は試験の直前に最高濃度 (50 mg/mL, 原液の約 20 倍希釈に相当) を調製し、ろ過滅菌を行った。その他の濃度は段階希釈法により調製した。溶解後、色、臭いおよび発熱等の変化は認められなかった。なお、純度換算は行わなかった。

4.6. 陰性対照および陽性対照

陰性対照 (溶媒対照) 物質として滅菌水を用いた。また、陽性対照物質として以下の既知変異原物質を用いた。

菌 株	代謝活性化を必要としないもの (μg/プレート)	代謝活性化を必要とするもの (μg/プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	NaN ₃ (0.5)	2-AA (2)
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	AF-2 (0.005)	2-AA (2)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

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, 99.0%, Lot No. SEL1402)

2-AA: 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社, 92.1%, Lot No. DWH6744)

NaN₃: アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 100.7%, Lot No. DWG5550)

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩 (Aldrich Chemical Co., Inc., 98%, Lot No. 16322JR)

AF-2, 9-AA および 2-AA は DMSO (東京化成工業株式会社, 特級, >99.0%, Lot No. FGI01) に、また NaN₃ は滅菌水に溶解した。調製した陽性対照物質溶液は小分けして冷凍保存 (-80°C) し、試験ごとに解凍して使用した。

4.7. アミノ酸添加軟寒天液の調製

0.6%寒天粉末 (和光純薬工業株式会社, Lot No. SEE7704) および 0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天液に、ネズミチフス菌株用には滅菌した 0.5 mM D-ビオチンおよび 0.5 mM L-ヒスチジン溶液, 大腸菌株用には 0.5 mM L-トリプトファン溶液を 1/10 容加え、アミノ酸添加軟寒天液を調製した。

4.8. 用量設定試験

被験物質の適切な用量を設定するために、代謝活性化による場合とよらない場合で用量設定試験を行った。用量設定試験では、ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレート を最高用量として公比 4 で 5 用量 (19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/プレート) を設定した。試験は被験物質処理群、溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について 2 枚のプレートで実施した。

4.9. 本試験

代謝活性化による場合とよらない場合で本試験を行った。用量設定試験の結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株において生育阻害は認められなかった。また、いずれの用量においても被験物質の析出は観察されなかった。したがって、本試験は 5000 µg/プレート を最高用量として公比 2 で 5 用量 (313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/プレート) を設定した。試験は被験物質処理群、溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について 2 枚のプレートで実施した。

4.10. 確認試験

代謝活性化による場合の TA1535 株において、用量設定試験と本試験の結果に再現性が得られなかった。よって、TA1535 株の代謝活性化による場合で確認試験を行った。用量は、5000 µg/プレート を最高用量として公比 2 で 5 用量 (313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/プレート) を設定した。試験は被験物質処理群、溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について 2 枚のプレートで実施した。

4.11. 処理方法

プレインキュベーション法を実施した^{3,4)}。本法は細菌を用いた復帰突然変異試験で通常いられる方法である。

4.11.1. プレインキュベーション法 (代謝活性化によらない場合)

滅菌小試験管に 100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL, 前培養した菌懸濁液 0.1 mL および被験物質溶液 0.1 mL を分注し、恒温振盪培養器で 37°C, 20 分間振盪した。振盪回数は毎分 85 往復とした。45°C で保温したアミノ酸添加軟寒天液 2 mL を加え良く混合した後、最少グルコース寒天平板培地 [クリメディア AM-N 培地, オリエンタル酵母工業株式会社, Lot No. ANI690IS (2003 年 9 月 4 日製造)] に広げた。最少グルコース寒天平板培地は塩類溶液 (0.2%クエン酸・1 水塩, 1%リン酸 2 カリウム, 0.192%リン酸 1 アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム, 0.02%硫酸マグネシウム・7 水塩) に 1.5%寒天粉末 (伊那寒天 BA-30A, 伊那食品工業株式会社, Lot No. 30325), 2%グルコースを加え、30 mL ずつ分注したものであった。

37°Cで48時間培養後、コロニーアナライザー (MODEL CA-7II, 東洋測器株式会社, またはPCA-11DA, システムサイエンス株式会社) を用いて復帰変異コロニーを計測した。同時に、被験物質の析出を肉眼で、菌に対する生育阻害を実体顕微鏡下で観察した。

なお、生育阻害は、バックグラウンドのアミノ酸要求性菌の生育状態を指標にして判定した。

4.11.2. プレインキュベーション法 (代謝活性化による場合)

滅菌小試験管にS9 Mix 0.5 mL, 前培養した菌懸濁液 0.1 mL および被験物質溶液 0.1 mL を分注し、恒温振盪培養器で37°C, 20分間振盪した。振盪回数は毎分85往復とした。45°Cで保温したアミノ酸添加軟寒天液2 mLを加え良く混合した後、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。使用した最少グルコース寒天平板培地は、代謝活性化によらない場合と同じものであった。37°Cで48時間培養後、コロニーアナライザーを用いて復帰変異コロニー数を計測した。同時に、被験物質の析出を肉眼で、菌に対する生育阻害を実体顕微鏡下で観察した。

なお、生育阻害は、バックグラウンドのアミノ酸要求性菌の生育状態を指標にして判定した。

4.12. 無菌テスト

すべての試験において、最高用量の被験物質溶液およびS9 Mixについて、試験に用いた容量をニュートリエントブロス寒天平板培地 (Oxoid nutrient broth No.2) に滴下した。また、各菌懸濁液を最少グルコース寒天平板培地に100 µL滴下した。それらを37°Cで48時間培養し、雑菌混入の有無を確認した。

4.13. 試験の有効性

被験物質の突然変異誘発性の判定を行う前に、試験の有効性の確認を行った。以下の3基準をすべて満たす場合にその試験を有効とした。

- ① 試験に用いた菌液、被験物質溶液、S9 Mixに雑菌の汚染がない。
- ② 溶媒対照群および陽性対照群における復帰変異コロニー数の平均値が、背景値に基づく管理範囲内である。
- ③ 陽性対照群は溶媒対照群の2倍以上の復帰変異コロニー数 (平均値) を示す。

4.14. 結果の判定

結果の判定にあたっては統計学的解析を行わず、各用量におけるプレートでのコロニー数の平均値を基に、以下の3基準をすべて満たす場合を陽性とした。

- ① 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニーが出現する。
- ② 被験物質の濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する (用量-反応効果)。

③ 用量設定試験と本試験で、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

一方、用量設定試験と本試験のいずれの用量においても、復帰変異コロニー数が溶媒対照群のコロニー数の2倍より少ない場合は陰性とした。

当該試験では用量設定試験と本試験で結果が異なったため確認試験を行った。確認試験の結果、被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニーが出現した場合を最終的に陽性と判定し、2倍より少ない場合を最終的に陰性とすることにした。

5. 試験成績

5.1. 用量設定試験

用量設定試験の結果を表 1 に示した。

5.1.1. 菌株の生育阻害と被験物質の析出

クヌギ木酢液処理群は、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株において生育阻害は観察されなかった。また、いずれの用量においても被験物質の析出は観察されなかった。

5.1.2. 復帰変異コロニー数

代謝活性化による場合の TA1535 株において、313 および 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、溶媒対照群に比べて約 2.2~2.4 倍の復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の菌株および代謝活性化によらない場合の TA1535 株では、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

5.2. 本試験

本試験の結果を表 2 に示した。

5.2.1. 菌株の生育阻害と被験物質の析出

クヌギ木酢液処理群は、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株において生育阻害は観察されなかった。また、いずれの用量においても被験物質の析出は観察されなかった。

5.2.2. 復帰変異コロニー数

代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

5.3. 確認試験

代謝活性化による場合の TA1535 株を用いた確認試験の結果を表 3 に示した。

5.3.1. 菌株の生育阻害と被験物質の析出

クヌギ木酢液処理群は、いずれの用量においても生育阻害および被験物質の析出は観察されなかった。

5.3.2. 復帰変異コロニー数

すべての用量で、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められ

なかった。よって、本試験と確認試験の間で結果の再現性が確認された。

6. 考察

用量設定試験において、代謝活性化による場合の TA1535 株で復帰変異コロニー数が溶媒対照群に比べて 2 倍以上を示したが、これは比較される溶媒対照群の変異コロニー数がやや低かったこと（平均コロニー数=5）が原因であると考えられる。事実、本試験および確認試験においては、代謝活性化による場合の TA1535 株で復帰変異コロニー数が溶媒対照群に比べて 2 倍を超えることはなかった。

木酢液には多種の化学物質が含まれていることが知られているが、その中には変異原物質・発ガン物質も含まれる。被験物質のクヌギ木酢液 1 g 中に含まれる主要な変異原物質の含有量は以下の通りである（データは林野庁特用林産対策室より提供された）。

3, 4-ベンツピレン	0.2 ng/g
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	0.1 ng/g 未満
3-メチルコランスレン	0.1 ng/g 未満
ホルムアルデヒド	68 µg/g

よって、当試験で実施した最高用量群（被験物質 5000 µg/プレート）では、各変異原物質が以下の用量で含まれていた計算になる。

3, 4-ベンツピレン	1.0 pg/プレート
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	0.5 pg/プレート未満
3-メチルコランスレン	0.5 pg/プレート未満
ホルムアルデヒド	0.34 µg/プレート

それに対して、各変異原物質が陽性反応を示す最低用量は以下の通りである^{5,6,7)}。

3, 4-ベンツピレン	0.25 µg/プレート
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	25 µg/プレート
3-メチルコランスレン	10 µg/プレート
ホルムアルデヒド	7.4 µg/プレート

以上の数値を比較すると、最高用量群における 3, 4-ベンツピレン、1,2,5,6-ジベンゾアントラセンおよび 3-メチルコランスレンの含有量は、それらの物質が陽性反応を示す最低用量より遥かに少ないことが分かる（約 10⁶ 倍程度）。それに対してホルムアルデヒドの含有量は比較的多い（0.34 µg/プレート）。しかし、陽性反応を示す最低用量（7.4 µg/プレ

ト) の約 20 分の 1 程度であったことから、ホルムアルデヒドによる突然変異の有意な誘発は起こらなかったと考えられる。

7. 試験の有効性

用量設定試験、本試験および確認試験に用いた菌液、被験物質溶液、S9 Mix に雑菌の汚染がないことを確認した。各菌株の溶媒対照群および陽性対照群における復帰変異コロニー数は、当研究所の背景値に基づく管理範囲内であった(付表 2)。また、陽性対照群は溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、用量設定試験、本試験および確認試験は有効であると判断された。

8. 結論

クヌギ木酢液は、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示さないと考えられ、本実験条件下におけるクヌギ木酢液の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論した。

9. 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および計画書に従わなかったこと

試験期間中にコロニーアナライザーの機器更新を行ったため、確認試験は試験計画書に記載した機種(MODEL CA-7II)とは異なる機種(PCA-11DA)で測定を行った。しかし、両者の測定結果に差はなく、試験結果に全く影響はなかった。その他、試験の信頼性に悪影響を及ぼした疑いのある諸要因(環境要因、予期しえなかった事態等)は認められなかった。

10. 参考文献

- 1) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki : Mutation Res., 31, 347-364, 1975.
- 2) 安衛法における変異原性試験(労働省安全衛生部化学物質調査課編), 中央労働災害防止協会, 1991.
- 3) Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, S. Venitt and E. Zeiger : Mutation Res., 312, 217-233, 1994.
- 4) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura: Factors Modulating Mutagenicity in Microbial Tests, in: K.H. Norpoth and R.C. Garner (Eds.), Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Springer-Verlag, pp. 273-285, 1980.
- 5) 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー, 監修: 石館基, 1991
- 6) 環境変異原データ集 1, サイエンティスト社, 監修: 賀田恒夫・石館基, 1980
- 7) Andrews, A.W., L. H. Thibault and W. Lijinsky : Mutation Res., 51, 311-318, 1978.

表1

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: クヌギ木酢液

試験実施期間		2003年 11月 12日より			2003年 11月 14日		
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (H ₂ O)	138 143 (141)	10 5 (8)	110 104 (107)	13 14 (14)	7 13 (10)	
	19.5	129 129 (129)	6 7 (7)	84 116 (100)	19 16 (18)	15 9 (12)	
	78.1	143 144 (144)	7 2 (5)	99 98 (99)	12 15 (14)	1 7 (4)	
	313	140 135 (138)	12 8 (10)	112 106 (109)	15 26 (21)	5 8 (7)	
	1250	147 180 (164)	8 3 (6)	113 122 (118)	20 20 (20)	7 12 (10)	
	5000	148 124 (136)	5 5 (5)	94 126 (110)	18 7 (13)	8 7 (8)	
+S9 Mix	陰性対照 (H ₂ O)	148 131 (140)	3 7 (5)	119 104 (112)	32 31 (32)	11 12 (12)	
	19.5	171 125 (148)	10 8 (9)	129 154 (142)	24 28 (26)	15 15 (15)	
	78.1	130 121 (126)	8 3 (6)	142 115 (129)	20 23 (22)	10 15 (13)	
	313	130 148 (139)	11 12 (12)	140 139 (140)	30 34 (32)	23 8 (16)	
	1250	162 153 (158)	14 7 (11)	149 119 (134)	20 34 (27)	21 8 (15)	
	5000	144 133 (139)	8 10 (9)	167 147 (157)	20 30 (25)	12 21 (17)	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	524 509 (517)	513 512 (513)	1295 1271 (1283)	415 402 (409)	838 642 (740)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	820 761 (791)	74 75 (75)	409 444 (427)	276 257 (267)	115 94 (105)

AF-2: 2-(2-フル)-3-(5-ニトロ-2-フル)アクリルアミド

2-AA: 2-アミノアントラセン

NaN₃: ナイ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

(): 内の数値は平均値

表2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称：クヌギ木酢液

試験実施期間		2003年 12月 16日より			2003年 12月 18日		
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (H ₂ O)	135 147 (141)	9 10 (10)	109 107 (108)	25 11 (18)	15 3 (9)	
	313	152 158 (155)	10 5 (8)	110 103 (107)	21 20 (21)	5 14 (10)	
	625	124 166 (145)	12 8 (10)	98 127 (113)	16 19 (18)	6 11 (9)	
	1250	155 171 (163)	7 6 (7)	108 114 (111)	11 18 (15)	13 6 (10)	
	2500	167 149 (158)	3 8 (6)	122 120 (121)	16 17 (17)	7 8 (8)	
	5000	172 157 (165)	6 6 (6)	148 117 (133)	17 16 (17)	3 7 (5)	
+S9 Mix	陰性対照 (H ₂ O)	170 154 (162)	8 12 (10)	145 162 (154)	30 35 (33)	8 12 (10)	
	313	168 132 (150)	6 10 (8)	166 162 (164)	21 34 (28)	16 15 (16)	
	625	176 166 (171)	10 9 (10)	159 154 (157)	19 36 (28)	11 11 (11)	
	1250	157 168 (163)	5 10 (8)	151 167 (159)	29 19 (24)	14 6 (10)	
	2500	194 179 (187)	5 7 (6)	157 140 (149)	24 27 (26)	16 10 (13)	
	5000	171 168 (170)	6 6 (6)	143 179 (161)	30 18 (24)	11 16 (14)	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	574 582 (578)	591 566 (579)	970 956 (963)	473 461 (467)	594 617 (606)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	868 796 (832)	134 139 (137)	549 523 (536)	328 345 (337)	83 88 (86)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニコロ-2-フリル)アクリルアミド

2-AA : 2-アミノアントレン

NaN₃ : ナジ 化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

() : 内の数値は平均値

表3

試験結果表 (確認試験)

被験物質の名称：クヌギ木酢液

試験実施期間		2003年12月24日より 2003年12月26日	
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)	
		塩基対置換型	
		TA1535	
+S9 Mix	陰性対照 (H_2O)	10 6	(8)
	313	5 9	(7)
	625	14 5	(10)
	1250	6 10	(8)
	2500	11 10	(11)
	5000	12 8	(10)
陽性対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	2-AA
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2
		コロニー数/プレート	105 114 (110)

2-AA : 2-アミノアントラセン

() : 内の数値は平均値

付表 1

キッコーマン株式会社
研究本部 第2研究部〒278-0037 千葉県野田市野田399
04(7123)5574

S-9 品質保証書

製造番号 RAA-491
製造年月日 2003年10月10日

ラット肝ホモジネート 9,000×g 上清

使用動物 : Sprague-Dawley Rat (Slc:SD)
 性別 : 雄
 週令 : 7週令
 体重 : 211-260g
 誘導物質 : フェノール (PB: 和光純薬工業(株)製) & 5,6-ベンゾフラボン (BF: アルドリッチ社製) 腹腔内投与
 投与用量 : 1日目PB30mg/kg、2日目PB60mg/kg、3日目PB60mg/kg+BF80mg/kg、
 4日目PB60mg/kg、5日目S-9調製
 S-9調製法 : 断頭 → 灌流 (生理食塩水) → 灌流肝10gに0.15M KCl溶液を30ml加え
 ホジナイズ → 9,000Gで10分間遠沈 → 上清分画 → 直ちに凍結

生化学活性:

S-9 画分

- | | |
|------------------------|---|
| 1) 蛋白含量 | 25.56 mg/ml |
| 2) 升加-L P-450含量 | 1.19 nmol/mg protein |
| 3) ジメチルニトロソアミン脱メチル酵素活性 | 5.09 nmol HCHO formed/mg protein/min |
| 4) アリル水酸化酵素活性 | 25.03 nmol p-aminophenol formed/mg protein/hour |
| 5) ベンゾ [a] ピレン酵素活性 | 18.14 無誘導の活性を1.00とした相対活性 |

マイクロソーム (105,000×g) 画分

- | | |
|-----------------|----------------------|
| 1) 蛋白含量 | 14.23 mg/ml |
| 2) 升加-L P-450含量 | 3.39 nmol/mg protein |

生物学活性: 最少グルコース寒天平板培地にはクリメディアAM-N (三光純薬(株)) を使用し、
 プレインキュベーション法 (37℃、20分) にて試験。

変異原物質	濃度 (* ¹ : μg, * ² : μl/plate)	菌株	Hist/plate
ベンゾ [a] ピレン (和光純薬製)	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	1,044 ± 65
	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	224 ± 9
	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	104 ± 11
2-アミノアントラセン (和光純薬製)	1.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	589 ± 47
	0.5 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	243 ± 52
	2.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	113 ± 12
9,10-ジメチルアントラセン (アルドリッチ社製)	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA100	1,005 ± 24
	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA98	502 ± 44
	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA1537	231 ± 24
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	722 ± 141
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	282 ± 23
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	159 ± 17
ジメチルニトロソアミン (和光純薬製)	10.0 * ² (50 μl S-9/p)	TA100	1,250 ± 125
溶媒: DMSO	プレインキュベーション → 30℃、35分		
自然復帰コロニー	(50 μl S-9/p)	TA100	115 ± 16
	(50 μl S-9/p)	TA98	28 ± 3
	(50 μl S-9/p)	TA1537	17 ± 1

無菌試験 (500 μl S-9/plate): 合格

保存上の注意: 直ちに-80℃で保存して下さい。

使用期限: 製造日より6ヵ月以内にご使用下さい。

担当者: 永野、斉藤

付表 2

復帰突然変異試験における対照群の背景データ

1. 陰性対照群（溶媒対照群）の背景データ

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート（平均±S.D.）				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	TA98	TA1537
-	117±16	8±3	103±20	18±6	7±2
+	119±16	8±3	144±21	25±6	13±4

データ蓄積期間：2002年1月～2002年12月

2. 陰性対照群（溶媒対照群）の管理範囲

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	TA98	TA1537
-	69～165	4～17	43～163	10～36	4～13
+	71～167	4～17	81～207	10～43	6～25

3. 陽性対照群の背景データ

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート（平均±S.D.）				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	TA98	TA1537
-	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	0.01 µg/プレート	0.5 µg/プレート	0.005 µg/プレート	0.1 µg/プレート	80 µg/プレート
	449±59	508±54	1402±477	393±109	685±257
+	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	1 µg/プレート	2 µg/プレート	2 µg/プレート	0.5 µg/プレート	2 µg/プレート
	852±162	166±31	549±63	260±54	111±32

データ蓄積期間：2002年1月～2002年12月

陽性対照物質の略名は報告書本文を参照

4. 陽性対照群の管理範囲

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	TA98	TA1537
-	340～630	340～670	440～2830	80～720	170～1460
+	360～1340	70～260	420～740	90～420	50～210

平成 16 年度 農林水産省 農薬的資材リスク情報収集委託事業
(農薬的資材安全性検討試験)
スギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験

(試験番号 IET 04-0081)

最終報告書

2005 年 3 月 18 日

茨城県水海道市内守谷町 4321
財団法人 残留農薬研究所

この写しは原本と相違ないことを証明します。

財団法人 残留農薬研究所

試験責任者： 松元 郷六

日付： 2005 年 3 月 18 日

陳述書

試験名称：スギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験

当該試験は、変異原性試験の実施能力に関して、次に示す試験の適正実施に係る基準（GLP）に適合することが確認された試験施設で実施された。

農林水産省，農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準，11 農産第 6283 号，1999 年

本報告書の試験方法には当該試験で使用した方法・手順が忠実に記述され、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されている。

試験責任者

財団法人 残留農薬研究所

毒性部遺伝毒性研究室長 松元 郷六



2005 年 3 月 18 日

試験施設

名称： 財団法人 残留農薬研究所
所在地： 茨城県水海道市内守谷町 4321 (〒303-0043)
運営管理者： 理事長 岩本 毅

毒性試験指針（ガイドライン）の適用

農林水産省（12 農産第 8147 号，2-1-19-1，2000 年）

試験期間

試験開始日： 2004 年 10 月 1 日
実験開始日： 2004 年 10 月 19 日
用量設定試験実施期間： 2004 年 10 月 19 日～ 10 月 21 日
本試験実施期間： 2004 年 11 月 16 日～ 11 月 18 日
実験完了日： 2004 年 11 月 18 日
試験終了日： 2005 年 3 月 18 日

記録等の保管

当該試験中に作出されたすべての生データ，試験計画書，参照用標本，最終報告書，および記録は，財団法人残留農薬研究所の資料保管施設で保管する。

試験従事者

試験責任者 松元郷六

試験担当者

変異原性試験： 和田邦生，竹澤祐造，阿部美咲樹

目次

	頁
表紙	1
陳述書	2
試験施設	3
毒性試験指針（ガイドライン）の適用	3
試験期間	3
記録等の保管	3
試験従事者	3
目次	4
1. 要約	6
2. 試験目的	7
3. 被験物質	7
4. 試験材料および方法	7
4.1. テスト菌株	7
4.2. テスト菌株の検査	7
4.3. テスト菌株の保存と前培養	8
4.4. S9 Mix の調製	8
4.5. 被験物質溶液の調製	9
4.6. 陰性対照および陽性対照	9
4.7. アミノ酸添加軟寒天液の調製	9
4.8. 用量設定試験	10
4.9. 本試験	10
4.10. 処理方法	10
4.11. 無菌テスト	11
4.12. 試験の有効性	11
4.13. 結果の判定	11
5. 試験成績	12
5.1. 用量設定試験	12
5.2. 本試験	12
6. 試験の有効性	12
7. 考察	13
8. 結論	14

目次 (続き)

	頁
9. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 および試験計画書に従わなかつたこと	14
10. 参考文献	14

表

1. 試験結果表 (用量設定試験)	16
2. 試験結果表 (本試験)	17
3. 比活性	18

図

1. 用量-反応曲線 (本試験, TA100 株および TA1535 株)	19
2. 用量-反応曲線 (本試験, TA98 株および TA1537 株)	20
3. 用量-反応曲線 (本試験, WP2 <i>uvrA/pKM101</i> 株)	21

付表

1. S-9 品質保証書	22
2. 復帰変異突然試験における対照群の背景データ	23

1. 要約

スギを原料とする木酢液（スギ木酢液）の突然変異誘発性を検索するため、ネズミチフス菌 4 株（TA100, TA1535, TA98, TA1537）と大腸菌 1 株（WP2 *uvrA/pKM101*）を用いて、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験を行った。

用量設定試験では原液（100000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ）を最高用量として公比 4 で 7 用量を設定した。原液の希釈には滅菌水を用いた。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、TA100, TA1535, 大腸菌, および TA98 株で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。また生育阻害に関しては、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において 100000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で生育阻害が観察された。また、代謝活性化による場合の最高用量（100000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ）において被験物質中の成分の析出が観察された。よって、本試験の最高用量は代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において 100000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比 2 で 6 用量を設定した。

本試験の結果、用量設定試験の結果と同様、代謝活性化の有無にかかわらず TA100, TA1535, 大腸菌, および TA98 株で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、その増加には用量相関性および再現性が確認された。

以上の結果から、本実験条件下におけるスギ木酢液の細菌に対する突然変異誘発性は、100000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量とした場合、陽性であると結論した。

2. 試験目的

スギを原料とする木酢液の細菌に対する突然変異誘発性の有無を検索した。

3. 被験物質

名称： スギを原料とする木酢液（スギ木酢液）
 ロット番号： W15081
 採取日： 2003年6月6日
 性状： 液体
 安定性： 不明であるが、室温で数年安定と考えられている。
 保管条件： 冷蔵暗所（設定値4℃，許容範囲1～10℃の被験物質保管庫）
 参照用標本： 受領した被験物質より参照用サンプルとして約5gを採取し，財団法人残留農薬研究所資料保管施設に保管した。

4. 試験材料および方法^{1,2)}

4.1. テスト菌株

試験にはネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA1535, TA98, TA1537 株と大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA*/pKM101 株を用いた。これらの菌株を選定した理由は、毒性ガイドラインでこれらの菌株の使用を推奨しており、また、当研究所でも多くの背景データを所有しているためである。

TA100 株は2000年9月5日に、日本バイオアッセイ研究センター（神奈川県）より入手した。TA98 株は1975年3月6日に、TA1535 株と TA1537 株は1973年3月26日に国立遺伝学研究所（静岡県）より入手した。WP2 *uvrA*/pKM101 株は1973年3月26日に国立遺伝学研究所より入手した大腸菌 WP2 *uvrA* 株に、当研究所において1993年3月31日にプラスミド pKM101 を導入し、作製した。

4.2. テスト菌株の検査

テスト菌株は遺伝的特性およびその他の諸性質について2004年6月9日～2004年9月15日に以下の検査を行い、これらの特性を有することを確認した。

- ① ネズミチフス菌におけるヒスチジン要求性
大腸菌におけるトリプトファン要求性
- ② 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- ③ ネズミチフス菌におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- ④ TA100, TA98 および WP2 *uvrA*/pKM101 株におけるアンピシリン耐性 (pKM101)
- ⑤ 自然突然変異体数
- ⑥ 陽性対照の既知変異原物質に対する反応性

4.3. テスト菌株の保存と前培養

菌液 0.8 mL にジメチルスルホキシド (DMSO, ガスクロマトグラフ用, 無水, 和光純薬工業株式会社, 大阪府) を 0.07 mL の割合で加えて -80°C 超低温槽 (CL-422, 日本フリーズ株式会社, 東京都) で保存した。前培養にあたっては, 8 mL のニュートリエントプロス液体培地 (Lot No. 218041, Oxoid nutrient broth No.2, Oxoid Ltd., Hampshire, U.K.) を L 字管 (容量 22 mL) に分取し, そこへ保存菌液 10 μL を接種した。菌は 37°C で 8 時間振とう培養した。前培養終了時の生菌数は分光光度計 (SPECTRONIC 21, BAUSCH & LOMB., New York, U.S.A.) を用いて吸光度 (OD_{660}) を測定することにより求めた。各試験の菌株ごとの生菌数は以下の通りであった。

試験名	生菌数 ($\times 10^9/\text{mL}$)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537
用量設定試験	1.9	1.7	3.0	2.7	1.3
本試験	1.6	1.9	2.2	2.1	1.3

4.4. S9 Mix の調製

代謝活性化系として S9 Mix を用いた。代謝酵素誘導物質であるフェノバルビタール (PB) と 5,6-ベンゾフラボン (BF) を投与されたラット (投与スケジュールは 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) の肝臓ホモジネート 9000 \times g 上清分画 (S9) をキッコーマン株式会社 (千葉県) より購入した。購入後, -80°C 超低温槽に保存した。製造後 6 カ月以内の S9 分画 (Lot No. RAA-508) を試験直前に解凍し, 直ちにコファクター (Lot No. 732, ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京都) を加えて, 以下の組成になるように S9 Mix を調製した。S9 分画の特性を付表 1 に示す。

塩化マグネシウム	8 mM
塩化カリウム	33 mM
グルコース-6-リン酸	5 mM
NADH	4 mM
NADPH	4 mM
ナトリウム-リン酸緩衝液 pH 7.4	100 mM
S9 分画	10%

4.5. 被験物質溶液の調製

スギ木酢液は水と自由に混和するため、滅菌水 (Simpli Lab, 日本ミリポア・リミテッド (東京都)) を用いて製造した純水を滅菌したものを溶媒として用いた。試験の直前に原液 (1000 mg/mL) をろ過滅菌した後, その他の濃度を段階希釈法により調製した。溶解後, 色, 臭いおよび発熱等の変化は認められなかった。なお, 純度換算は行わなかった。

4.6. 陰性対照および陽性対照

陰性対照 (溶媒対照) 物質として滅菌水を用いた。また, 陽性対照物質として以下の既知変異原物質を用いた。

菌 株	代謝活性化を必要としないもの (μg/プレート)	代謝活性化を必要とするもの (μg/プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	NaN ₃ (0.5)	2-AA (2)
WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	AF-2 (0.005)	2-AA (2)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (99.0%, Lot No. SEL1402, 和光純薬工業株式会社)

2-AA : 2-アミノアントラセン (92.1%, Lot No. DWH6744, 和光純薬工業株式会社)

NaN₃ : アジ化ナトリウム (100.7%, Lot No. DWG5550, 和光純薬工業株式会社)

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩 (98%, Lot No. 16322JR, Aldrich Chemical Co., Inc., Wisconsin, U.S.A.)

AF-2, 9-AA, および 2-AA は DMSO (特級, >99.0%, 東京化成工業株式会社, 東京都) に溶解し, NaN₃ は滅菌水に溶解した。調製した陽性対照物質溶液は小分けして冷凍保存 (-80°C) し, 試験ごとに解凍して使用した。

4.7. アミノ酸添加軟寒天液の調製

0.6%寒天粉末 (細菌培地用, Lot No. SEE7704, 和光純薬工業株式会社) および 0.5% 塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天液に, ネズミチフス菌株用には滅菌した 0.5 mM D-ビオチンおよび 0.5 mM L-ヒスチジン溶液, 大腸菌株用には 0.5 mM L-トリプトファン溶液を 1/10 容加え, アミノ酸添加軟寒天液を調製した。

4.8. 用量設定試験

被験物質の適切な用量を設定するために、代謝活性化による場合とよらない場合で用量設定試験を行った。用量設定試験では、原液（100000 µg/プレート）を最高用量として公比4で7用量（24.4, 97.7, 391, 1563, 6250, 25000, 100000 µg/プレート）を設定した。試験は被験物質処理群、溶媒対照群、および陽性対照群のすべての用量について2枚のプレートで実施した。

4.9. 本試験

代謝活性化による場合とよらない場合で本試験を行った。用量設定試験の結果より（5.1. 用量設定試験 参照）、本試験の最高用量は代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において100000 µg/プレートに設定した。公比は2で6用量（3125, 6250, 12500, 25000, 50000, 100000 µg/プレート）を設定した。試験は被験物質処理群、溶媒対照群、および陽性対照群のすべての用量について2枚のプレートで実施した。

4.10. 処理方法

プレインキュベーション法を実施した^{3,4}。本法は細菌を用いた復帰突然変異試験で通常用いられる方法である。

代謝活性化によらない系では、滅菌小試験管に100 mM ナトリウムーリン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL、前培養した菌懸濁液0.1 mL、および被験物質溶液0.1 mLを分注した。代謝活性化による系では、滅菌小試験管にS9 Mix 0.5 mL、菌懸濁液0.1 mL、および被験物質溶液0.1 mLを分注した。いずれも恒温振盪培養器で37°C、20分間振盪した。振盪回数は毎分85往復とした。45°Cで保温したアミノ酸添加軟寒天液2 mLを加え良く混合した後、最少グルコース寒天平板培地（Lot No. ANI800IT（2004年9月16日製造）、クリメディア AM-N 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、東京都）上に広げた。最少グルコース寒天平板培地は塩類溶液（0.2%クエン酸・1水塩、1%リン酸2カリウム、0.192%リン酸1アンモニウム、0.066%水酸化ナトリウム、0.02%硫酸マグネシウム・7水塩）に1.5%寒天粉末（Lot No. 40127、伊那寒天 BA-30A、伊那食品工業株式会社、長野県）、2%グルコースを加え、30 mLずつ分注したものであった。

37°Cで48時間培養後、コロニーアナライザー（PCA-11DA、システムサイエンス株式会社、東京都）を用いて復帰変異コロニー数を計測した。同時に、被験物質の析出を肉眼で、菌に対する生育阻害を実体顕微鏡下で観察した。代謝活性化による場合の最高用量（100000 µg/プレート）で被験物質中の成分と思われる析出が認められたが、コロニーアナライザーによる計測に支障はなかった。

なお、生育阻害は、バックグラウンドのアミノ酸要求性菌の生育状態を指標にして判定した。

4.11. 無菌テスト

試験に用いた被験物質および S9 Mix の無菌性を調べるために、最高容量の被験物質溶液および S9 Mix をニュートリエントブロス寒天平板培地 (Oxoid nutrient broth No.2) にそれぞれ 100 μ L 滴下した。また、各菌懸濁液を最少グルコース寒天平板培地に 100 μ L 滴下した。それらを 37°C で 48 時間培養し、雑菌混入の有無を確認した。

4.12. 試験の有効性

被験物質の突然変異誘発性の判定を行う前に、試験の有効性の確認を行った。以下の 3 基準をすべて満たす場合にその試験を有効とした。

- ① 試験に用いた菌液、被験物質溶液、S9 Mix に雑菌の汚染がない。
- ② 溶媒対照群および陽性対照群における復帰変異コロニー数の平均値が、背景値に基づく管理範囲内である。
- ③ 陽性対照群は溶媒対照群の 2 倍以上の復帰変異コロニー数 (平均値) を示す。

4.13. 結果の判定

結果の判定にあたっては統計学的解析を行わず、各用量におけるコロニー数の平均値を基に、以下の 3 基準をすべて満たす場合を陽性とした。

- ① 被験物質処理群において溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニーが出現する。
- ② 被験物質の濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する (用量-反応効果)。
- ③ 用量設定試験と本試験で、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

一方、用量設定試験と本試験のいずれの用量においても、復帰変異コロニー数が溶媒対照群のコロニー数の 2 倍より少ない場合は陰性とした。

5. 試験成績

5.1. 用量設定試験

用量設定試験の結果を表 1 に示し、また、比活性を表 3 に示す。

5.1.1. 菌株の生育阻害と被験物質の析出

代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株の最高用量（100000 µg/プレート）に生育阻害が観察された。また、代謝活性化による場合の最高用量において被験物質中の成分の析出が観察された。

5.1.2. 復帰変異コロニー数

スギ木酢液は代謝活性化の有無にかかわらず、TA100 株、TA1535 株、大腸菌、および TA98 株の 6250、25000、または 100000 µg/プレートの用量で、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。一方、TA1537 株では代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

5.2. 本試験

本試験の結果を表 2 に示し、用量-反応曲線を図 1-(1)~(3)に示す。また、比活性を表 3 に示す。

5.2.1. 菌株の生育阻害と被験物質の析出

代謝活性化によらない場合において、TA100 株、TA1535 株と大腸菌では最高用量（100000 µg/プレート）で生育阻害が観察され、TA98 株と TA1537 株では 50000 µg/プレート以上の用量で生育阻害が観察された。代謝活性化による場合においては、すべての菌株で最高用量に生育阻害が観察された。また、代謝活性化による場合の最高用量において被験物質中の成分の析出が観察された。

5.2.2. 復帰変異コロニー数

スギ木酢液は代謝活性化の有無にかかわらず、TA100、TA1535、大腸菌、および TA98 株の 6250、12500、または 25000 µg/プレート以上の用量において、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、その増加には用量相関性が認められた。一方、TA1537 株では代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

6. 試験の有効性

用量設定試験および本試験に用いた菌液、被験物質溶液、S9 Mix に雑菌の汚染がない

ことを確認した。各菌株の溶媒対照群および陽性対照群における復帰変異コロニー数は、当研究所の背景値に基づく管理範囲内であった（付表 2）。また、陽性対照群は溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、用量設定試験および本試験は有効であると判断された。

7. 考察

用量設定試験および本試験の結果において、代謝活性化の有無にかかわらず TA100, TA1535, 大腸菌, および TA98 株で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、結果の再現性が確認された。また、その増加には用量相関性がみられた。したがって、陽性と判定する 3 つの基準をすべて満たしていた。

昨年度、今回用いた被験物質と同一の被験物質を用いて、毒性試験ガイドラインで定められた 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量に復帰突然変異試験を行った。その結果、復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたものの、溶媒対照群に対して 2 倍以上の増加には至らなかった。しかし、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を超える用量を設定すれば、陽性反応を示す可能性を示唆した⁵⁾。実際に今回の試験で、例えば代謝活性化系によらない場合の大腸菌では、6250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で 2 倍以上の復帰変異コロニー数が現れた。このように、今回の試験結果は前回の推測を裏付ける結果となった。

被験物質であるスギ木酢液に含まれる主要な変異原物質の含有量は以下の通りであった（財団法人日本食品油脂検査協会にて測定）。

3, 4-ベンツピレン	0.1 ng/g 未満
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	0.1 ng/g 未満
3-メチルコランスレン	0.1 ng/g 未満
ホルムアルデヒド	1300 $\mu\text{g}/\text{g}$

この数値に基づくと、例えば、ここで実施した 50000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ では、各変異原物質がプレートあたり以下の用量で含まれていた計算になる。

3, 4-ベンツピレン	5 pg/プレート未満
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	5 pg/プレート未満
3-メチルコランスレン	5 pg/プレート未満
ホルムアルデヒド	65 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

それに対して、各変異原物質が陽性反応を示す最低用量は以下の通りである^{6, 7, 8)}。

3, 4-ベンツピレン	0.25 µg/プレート
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	25 µg/プレート
3-メチルコランスレン	10 µg/プレート
ホルムアルデヒド	7.4 µg/プレート

以上の数値を比較すると、50000 µg/プレートにおける3, 4-ベンツピレン、1,2,5,6-ジベンゾアントラセンおよび3-メチルコランスレンの含有量は、それらの物質が陽性反応を示す最低量より遥かに少ない。それに対して、ホルムアルデヒドの含有量は十分に陽性反応を示す量である。

また、本実験では、代謝活性化系非存在下でも陽性反応がみられた。しかし、3, 4-ベンツピレン、1,2,5,6-ジベンゾアントラセン、および3-メチルコランスレンの変異原活性には代謝活性化系を必要とする。一方、ホルムアルデヒドは代謝活性化系非存在下でも変異原性を示す。このことから、陽性反応を示す原因成分は多環式芳香族炭化水素類ではなく、ホルムアルデヒドであることが強く示唆される。

なお、スギ木酢液の比活性の最大値は27.3 (TA100株)であった(表3)。これは3,4-ベンツピレンの比活性(471600)の1/17300であり、変異原性レベルとしては極めて低いものであると言える。

8. 結論

以上の結果から、本実験条件下におけるスギ木酢液の細菌に対する突然変異誘発性は、100000 µg/プレートを最高用量とした場合、陽性であると結論した。

9. 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および計画書に従わなかったこと

試験期間を通じ、試験計画書からの逸脱は認められなかった。さらに、試験の信頼性に悪影響を及ぼした疑いのある諸要因(環境要因、予期しえなかった事態等)は認められなかった。

10. 参考文献

- 1) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki : Mutation Res., 31, 347-364, 1975.
- 2) 安衛法における変異原性試験(労働省安全衛生部化学物質調査課編), 中央労働災害防止協会, 1991.
- 3) Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, S. Venitt and E. Zeiger : Mutation Res., 312, 217-233, 1994.
- 4) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura: Factors Modulating Mutagenicity in Microbial Tests, in: K.H. Norpoth and R.C.

Garner (Eds.), Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Springer-Verlag, pp. 273-285, 1980.

- 5) 平成 15 年度農林水産省補助事業 環境負荷低減農業技術確立実証事業, スギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験 (IET 03-0089), 財団法人残留農薬研究所, 2004.
- 6) 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー, 監修: 石館基, 1991.
- 7) 環境変異原データ集 1, サイエンティスト社, 監修: 賀田恒夫・石館基, 1980.
- 8) Andrews, A.W., L. H. Thibault and W. Lijinsky: Mutation Res., 51, 311-318, 1978.

表1

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: スギ木酢液

試験実施期間		2004年 10月 19日より			2004年 10月 21日		
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	136 145 (141)	12 5 (9)	103 95 (99)	20 20 (20)	6 14 (10)	
	24.4	145 125 (135)	5 4 (5)	111 118 (115)	13 9 (11)	7 9 (8)	
	97.7	103 118 (111)	8 13 (11)	117 104 (111)	15 13 (14)	10 15 (13)	
	391	88 123 (106)	13 10 (12)	135 125 (130)	16 19 (18)	10 8 (9)	
	1563	132 137 (135)	2 9 (6)	142 113 (128)	26 20 (23)	6 8 (7)	
	6250	213 187 (200)	11 11 (11)	188 209 (199)	25 24 (25)	11 6 (9)	
	25000	747 668 (708)	26 23 (25)	744 779 (762)	48 76 (62)	7 11 (9)	
	100000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	22* 25* (24)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
+S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	116 133 (125)	6 4 (5)	146 153 (150)	28 22 (25)	10 11 (11)	
	24.4	132 128 (130)	7 9 (8)	145 152 (149)	20 32 (26)	13 15 (14)	
	97.7	128 124 (126)	9 8 (9)	157 169 (163)	19 33 (26)	9 17 (13)	
	391	113 131 (122)	4 6 (5)	178 182 (180)	26 18 (22)	10 10 (10)	
	1563	121 137 (129)	8 10 (9)	168 161 (165)	23 20 (22)	17 22 (20)	
	6250	163 191 (177)	16 6 (11)	236 263 (250)	32 36 (34)	14 8 (11)	
	25000	368 382 (375)	7 19 (13)	793 769 (781)	70 68 (69)	19 13 (16)	
	100000†	130* 100* (115)	12* 4* (8)	803* 839* (821)	9* 5* (7)	4* 5* (5)	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	455 498 (477)	439 469 (454)	1205 1165 (1185)	379 396 (388)	824 688 (756)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	596 615 (606)	124 98 (111)	527 508 (518)	246 238 (242)	105 117 (111)

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

2-AA: 2-アミノアントレン

NaN₃: 7ジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

(): 内の数値は平均値

*: 菌株の生育阻害を認める

†: 被験物質の析出を認める

表2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称：スギ木酢液

試験実施期間		2004年 11月 16日より			2004年 11月 18日		
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	119 121 (120)	8 8 (8)	79 89 (84)	19 14 (17)	10 7 (9)	
	3125	167 164 (166)	11 16 (14)	126 120 (123)	14 20 (17)	9 5 (7)	
	6250	197 203 (200)	14 13 (14)	215 211 (213)	26 28 (27)	4 9 (7)	
	12500	340 367 (354)	14 13 (14)	370 332 (351)	43 44 (44)	16 16 (16)	
	25000	785 819 (802)	22 26 (24)	556 657 (607)	46 52 (49)	11 14 (13)	
	50000	1117 967 (1042)	19 20 (20)	1034 1073 (1054)	19* 12* (16)	7* 7* (7)	
	100000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	7* 16* (12)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
+S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	138 134 (136)	10 3 (7)	121 142 (132)	19 26 (23)	12 14 (13)	
	3125	140 170 (155)	8 7 (8)	195 175 (185)	23 20 (22)	13 16 (15)	
	6250	184 181 (183)	7 7 (7)	220 229 (225)	30 29 (30)	14 17 (16)	
	12500	221 210 (216)	12 6 (9)	375 401 (388)	28 27 (28)	14 20 (17)	
	25000	316 385 (351)	22 22 (22)	640 655 (648)	43 52 (48)	18 14 (16)	
	50000	742 679 (711)	22 29 (26)	1001 1043 (1022)	52 55 (54)	12 19 (16)	
	100000†	151* 147* (149)	6* 11* (9)	727* 815* (771)	14* 10* (12)	3* 7* (5)	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	515 520 (518)	497 474 (486)	1061 983 (1022)	400 404 (402)	770 640 (705)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	586 523 (555)	124 114 (119)	584 542 (563)	169 195 (182)	112 109 (111)

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

2-AA : 2-アミノアントレン

NaN₃ : 7ジ 化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

() : 内の数値は平均値

* : 菌株の生育阻害を認める

† : 被験物質の析出を認める

表 3

比 活 性

被験物質名：スギ木酢液

	菌 株 名	-S9 Mix		+S9 Mix	
		比活性	計算に用いた 用量 (μg /プレート)	比活性	計算に用いた 用量 (μg /プレート)
用 量 設 定 試 験	TA100	22.7	25000	10.0	25000
	TA1535	0.6	25000	1.0	6250
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	26.5	25000	25.2	25000
	TA98	1.7	25000	1.7	25000
	TA1537	—	—	—	—
本 試 験	TA100	27.3	25000	11.5	50000
	TA1535	0.6	25000	0.6	25000
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	21.4	12500	20.6	25000
	TA98	2.2	12500	1.0	25000
	TA1537	—	—	—	—

比活性：被験物質 1mg 当たりの誘発復帰変異コロニー数。すなわち溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示す用量において、下式より計算して得た値の最大値。

$$\frac{(\text{被験物質群の復帰変異コロニー数}) - (\text{溶媒対照群の復帰変異コロニー数})}{\text{用量 (mg/プレート)}}$$

用量 (mg/プレート)

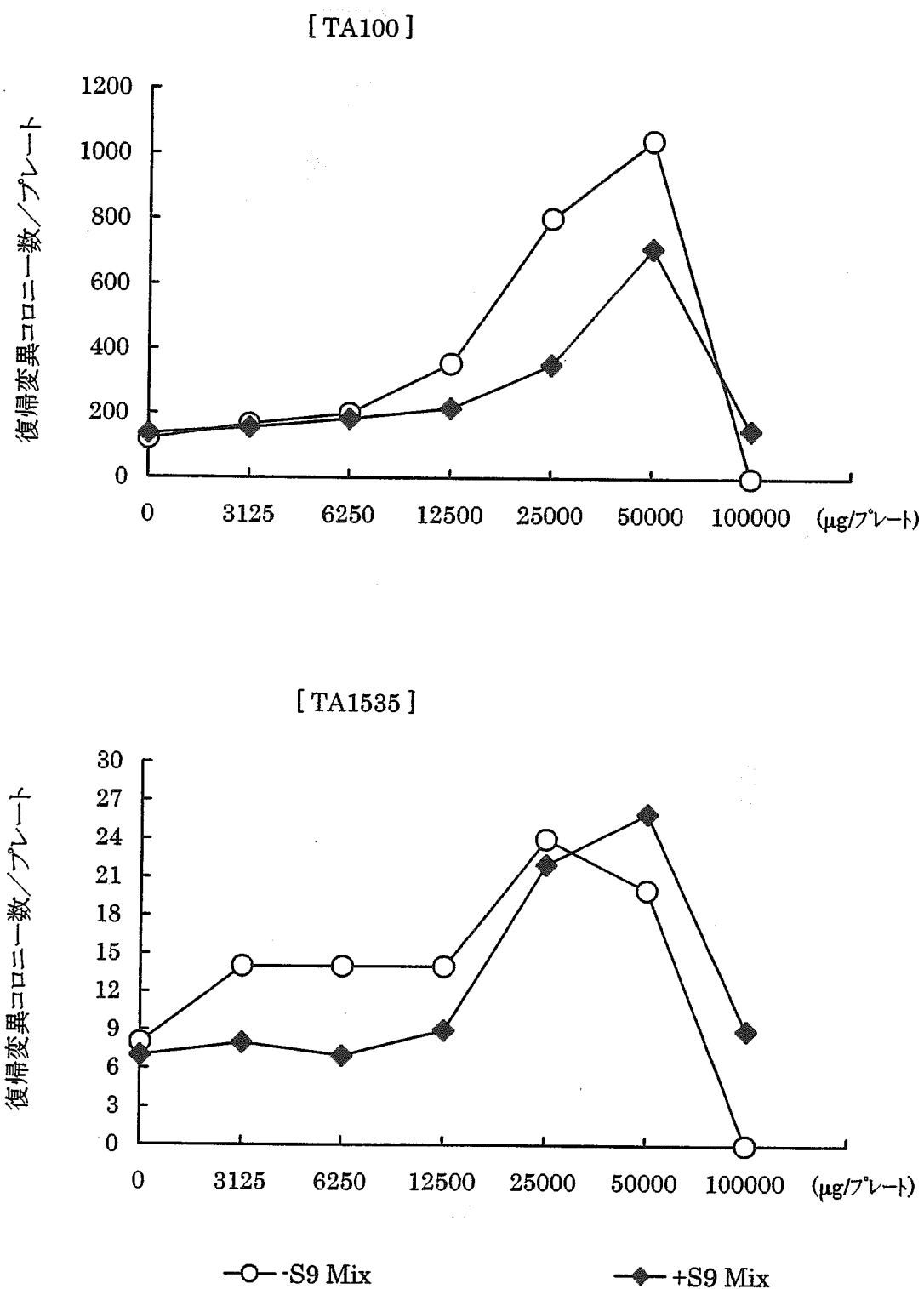


図1 用量-反応曲線 (本試験, TA100およびTA1535株)

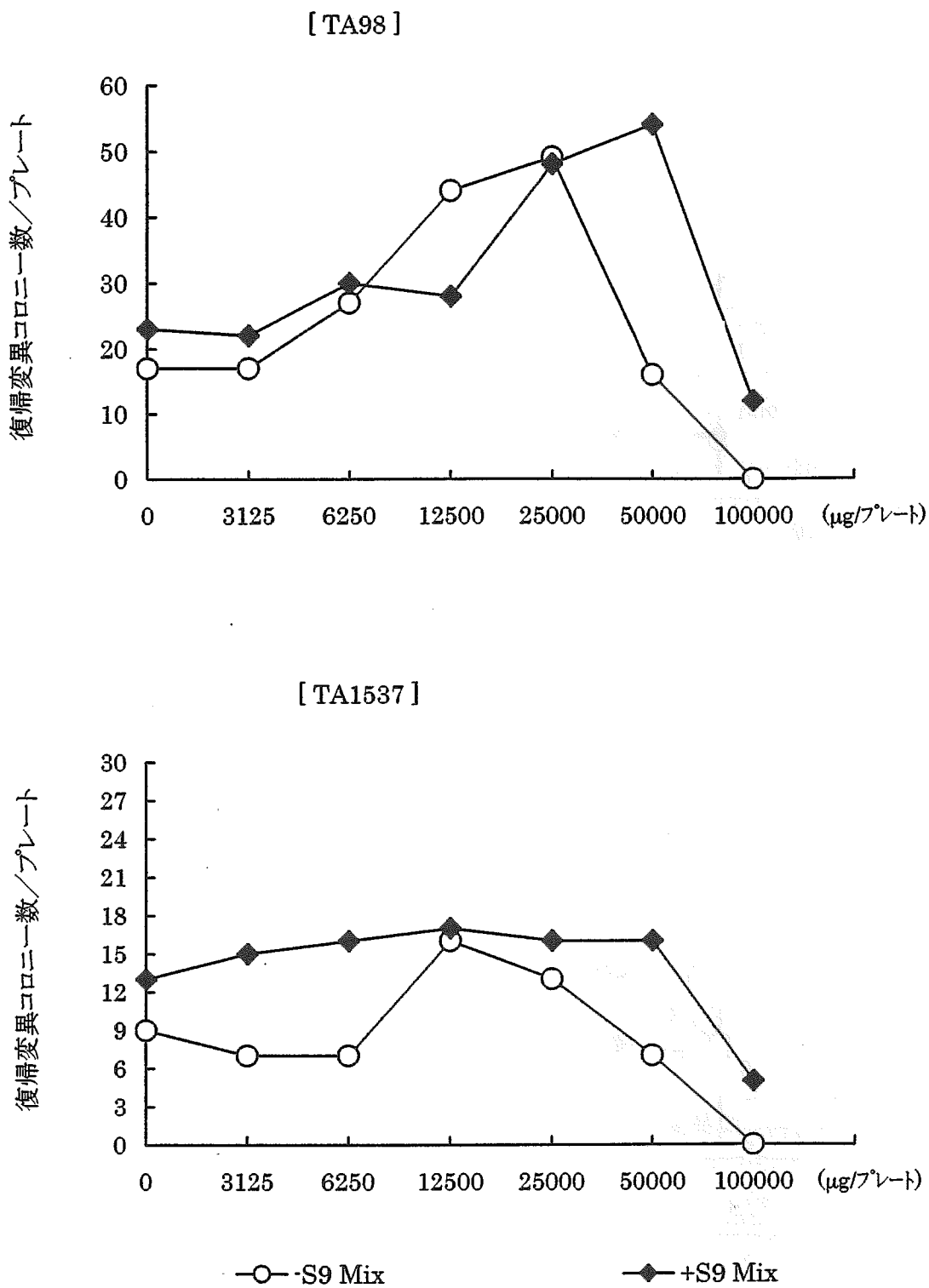


図2 用量-反応曲線 (本試験, TA98およびTA1537株)

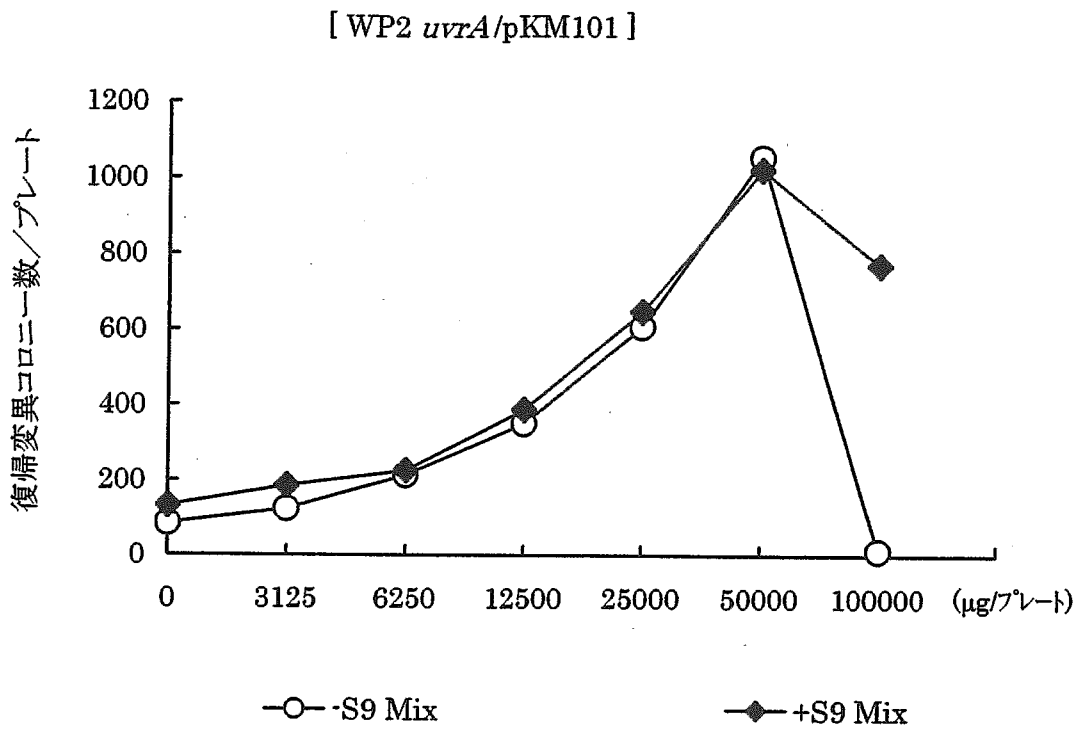


図3 用量-反応曲線 (本試験, WP2 *uvrA*/pKM101株)

付表 1

キッコーマン株式会社
 研究本部 第2研究部
 〒278-0037 千葉県野田市野田399
 04(7123)5574

S-9 品質保証書

製造番号 RAA-508
 製造年月日 2004年08月26日

ラット肝ホモジネート 9,000×g 上清

使用動物 : Sprague-Dawley Rat (Slc:SD)
 性別 : 雄
 週令 : 7週令
 体重 : 196-232g
 誘導物質 : フェバルピタール (PB: 和光純薬工業(株)製) & 5,6-ベンゾフラボン (BF: 和光純薬工業(株)製) 腹腔内投与
 投与用量 : 1日目PB30mg/kg, 2日目PB60mg/kg, 3日目PB60mg/kg+BF80mg/kg, 4日目PB60mg/kg, 5日目S-9調製
 S-9調製法 : 断頭 → 灌流 (生理食塩水) → 灌流肝10gに0.15M KCl溶液を30ml加え
 ホモジナイズ → 9,000Gで10分間遠沈 → 上清分画 → 直ちに凍結

生化学活性:

S-9 画分

1) 蛋白含量 27.24 mg/ml
 2) フトケ-ム P-450含量 1.14 nmol/mg protein
 3) シメチルニトロソアミン脱メチル酵素活性 5.33 nmol HCHO formed/mg protein/min
 4) アニン水酸化酵素活性 24.33 nmol p-aminophenol formed/mg protein/hour
 5) ベンゾ [a] ピレン酵素活性 23.78 無誘導の活性を1.00とした相対活性

ミクロソーム (105,000×g) 画分

1) 蛋白含量 16.78 mg/ml
 2) フトケ-ム P-450含量 3.46 nmol/mg protein

生物学活性: 最少グルコース寒天平板培地にはクリメディアAM-N (三光純薬(株)) を使用し、
 プレインキュベーション法 (37℃、20分) にて試験。

変異原物質	濃度 (* ¹ : μg, * ² : μl/plate)	菌株	Hist+/plate
ベンゾ [a] ピレン (和光純薬製) 溶媒: DMSO	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	1,050 ± 101
	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	272 ± 21
	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	84 ± 3
2-アミノアントラセン (和光純薬製) 溶媒: DMSO	1.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	496 ± 50
	0.5 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	194 ± 4
	2.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	77 ± 4
9,10-ジメチルアントラセン (アルドリッチ社製) 溶媒: DMSO	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA100	1,172 ± 71
	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA98	468 ± 10
	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA1537	230 ± 3
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	742 ± 57
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	184 ± 18
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	110 ± 7
ジメチルニトロソアミン (和光純薬製) 溶媒: リン酸緩衝液 (pH5.5)	10.0 * ² (50 μl S-9/p)	TA100	1,622 ± 64
自然復帰コロニー	プレインキュベーション → 30℃、35分		
	(50 μl S-9/p)	TA100	99 ± 2
	(50 μl S-9/p)	TA98	22 ± 1
	(50 μl S-9/p)	TA1537	10 ± 1

無菌試験 (500 μl S-9/plate): 合格

保存上の注意: 直ちに-80℃で保存して下さい。

使用期限: 製造日より6ヵ月以内にご使用下さい。

担当者: 永野、斉藤

付表 2

復帰突然変異試験における対照群の背景データ

1. 陰性対照群（溶媒対照群）の背景データ

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート（平均±S.D.）				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	TA98	TA1537
-	124±18	8±3	109±18	17±5	8±3
+	130±22	8±3	135±22	24±6	14±5

データ蓄積期間：2003年1月～2003年12月

2. 陰性対照群（溶媒対照群）の管理範囲

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	TA98	TA1537
-	70～178	4～17	55～163	10～32	4～17
+	64～196	4～17	69～201	10～42	6～29

3. 陽性対照群の背景データ

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート（平均±S.D.）				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	TA98	TA1537
-	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	0.01 µg/7°レ-ト	0.5 µg/7°レ-ト	0.005 µg/7°レ-ト	0.1 µg/7°レ-ト	80 µg/7°レ-ト
	434±75	510±69	1094±121	342±81	590±218
+	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	1 µg/7°レ-ト	2 µg/7°レ-ト	2 µg/7°レ-ト	0.5 µg/7°レ-ト	2 µg/7°レ-ト
	755±109	139±35	478±96	258±54	104±27

データ蓄積期間：2003年1月～2003年12月

陽性対照物質の略名は報告書本文を参照

4. 陽性対照群の管理範囲

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA/pKM101</i>	TA98	TA1537
-	360～660	300～720	730～1460	90～590	150～1240
+	420～1080	40～240	410～770	90～420	60～190

平成 16 年度 農林水産省 農薬的資材リスク情報収集委託事業
(農薬的資材安全性検討試験)
ベイツガ・スギ・ヒノキを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験

(試験番号 IET 04-0082)

最終報告書

2005 年 3 月 18 日

茨城県水海道市内守谷町 4321
財団法人 残留農薬研究所

この写しは原本と相違ないことを証明します。

財団法人 残留農薬研究所

試験責任者： 松元 郷六

日付： 2005 年 3 月 18 日

陳述書

試験名称：ベイツガ・スギ・ヒノキを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験

当該試験は、変異原性試験の実施能力に関して、次に示す試験の適正実施に係る基準（GLP）に適合することが確認された試験施設で実施された。

農林水産省，農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準，11 農産第 6283 号，
1999 年

本報告書の試験方法には当該試験で使用した方法・手順が忠実に記述され，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されている。

試験責任者

財団法人 残留農薬研究所

毒性部遺伝毒性研究室長 松元 郷六



2005 年 3 月 18 日

試験施設

名称： 財団法人 残留農薬研究所
所在地： 茨城県水海道市内守谷町 4321 (〒303-0043)
運営管理者： 理事長 岩本 毅

毒性試験指針（ガイドライン）の適用

農林水産省（12 農産第 8147 号，2-1-19-1，2000 年）

試験期間

試験開始日： 2004 年 10 月 1 日
実験開始日： 2004 年 11 月 24 日
用量設定試験実施期間： 2004 年 11 月 24 日～ 11 月 26 日
本試験実施期間： 2004 年 11 月 30 日～ 12 月 2 日
実験完了日： 2004 年 12 月 2 日
試験終了日： 2005 年 3 月 18 日

記録等の保管

当該試験中に作出されたすべての生データ，試験計画書，参照用標本，最終報告書，および記録は，財団法人残留農薬研究所の資料保管施設で保管する。

試験従事者

試験責任者 松元郷六

試験担当者

変異原性試験： 和田邦生，竹澤祐造，阿部美咲樹

目次

	頁
表紙	1
陳述書	2
試験施設	3
毒性試験指針（ガイドライン）の適用	3
試験期間	3
記録等の保管	3
試験従事者	3
目次	4
1. 要約	6
2. 試験目的	7
3. 被験物質	7
4. 試験材料および方法	7
4.1. テスト菌株	7
4.2. テスト菌株の検査	7
4.3. テスト菌株の保存と前培養	8
4.4. S9 Mix の調製	8
4.5. 被験物質溶液の調製	9
4.6. 陰性対照および陽性対照	9
4.7. アミノ酸添加軟寒天液の調製	9
4.8. 用量設定試験	10
4.9. 本試験	10
4.10. 処理方法	10
4.11. 無菌テスト	11
4.12. 試験の有効性	11
4.13. 結果の判定	11
5. 試験成績	12
5.1. 用量設定試験	12
5.2. 本試験	12
6. 試験の有効性	13
7. 考察	13
8. 結論	14

目次 (続き)

	頁
9. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 および試験計画書に従わなかつたこと	14
10. 参考文献	14

表

1. 試験結果表 (用量設定試験)	16
2. 試験結果表 (本試験)	17
3. 比活性	18

図

1. 用量-反応曲線 (本試験, TA100 株および WP2 <i>uvrA</i> /pKM101 株)	19
2. 用量-反応曲線 (本試験, TA1535 株)	20
3. 用量-反応曲線 (本試験, TA98 株)	21
4. 用量-反応曲線 (本試験, TA1537 株)	22

附表

1. S-9 品質保証書	23
2. 復帰変異突然試験における対照群の背景データ	24

1. 要約

ベイツガ・スギ・ヒノキを原料とする木酢液（ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液）の突然変異誘発性を検索するため、ネズミチフス菌 4 株（TA100, TA1535, TA98, TA1537）と大腸菌 1 株（WP2 *uvrA/pKM101*）を用いて、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験を行った。

用量設定試験では原液（100000 µg/プレート）を最高用量として公比 4 で 7 用量を設定した。原液の希釈には滅菌水を用いた。その結果、代謝活性化によらない場合では TA100, TA1535, および大腸菌で、代謝活性化による場合では TA100, TA1535, 大腸菌, および TA98 株で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。また生育阻害に関しては、代謝活性化によらない場合の TA1535, TA98, および TA1537 株で、6250 µg/プレート以上の用量に生育阻害が観察された。TA100 株と大腸菌では、25000 µg/プレート以上の用量に生育阻害が観察された。代謝活性化による場合では、すべての菌株において 25000 µg/プレート以上の用量に生育阻害が観察された。また、代謝活性化による場合の最高用量（100000 µg/プレート）において被験物質中の成分の析出が観察された。

よって、本試験の最高用量は代謝活性化によらない場合において、TA1535, TA98, および TA1537 株は 6250 µg/プレート, TA100 株と大腸菌は 25000 µg/プレートに設定した。代謝活性化による場合は、すべての菌株において 25000 µg/プレートに設定した。公比は 2 で 6 用量を用いた。

本試験の結果、代謝活性化の有無にかかわらず TA100, TA1535, 大腸菌, および TA98 株で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、その増加には用量相関性および再現性が確認された。

以上の結果から、本実験条件下におけるベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液の細菌に対する突然変異誘発性は陽性であると結論した。

2. 試験目的

ベイツガ・スギ・ヒノキを原料とする木酢液の細菌に対する突然変異誘発性の有無を検索した。

3. 被験物質

名称： ベイツガ・スギ・ヒノキを原料とする木酢液（ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液）

ロット番号： W16300

採取日： 2004年4月10日

性状： 液体

安定性： 不明であるが、室温で数年安定と考えられている。

保管条件： 冷蔵暗所（設定値 4℃，許容範囲 1～10℃の被験物質保管庫）

参照用標本： 受領した被験物質より参照用サンプルとして約 5 g を採取し，財団法人残留農薬研究所資料保管施設に保管した。

4. 試験材料および方法 ^{1,2)}

4.1. テスト菌株

試験にはネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA1535, TA98, TA1537 株と大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA*/pKM101 株を用いた。これらの菌株を選定した理由は、毒性ガイドラインでこれらの菌株の使用を推奨しており、また、当研究所でも多くの背景データを所有しているためである。

TA100 株は 2000 年 9 月 5 日に、日本バイオアッセイ研究センター（神奈川県）より入手した。TA98 株は 1975 年 3 月 6 日に、TA1535 株と TA1537 株は 1973 年 3 月 26 日に国立遺伝学研究所（静岡県）より入手した。WP2 *uvrA*/pKM101 株は 1973 年 3 月 26 日に国立遺伝学研究所より入手した大腸菌 WP2 *uvrA* 株に、当研究所において 1993 年 3 月 31 日にプラスミド pKM101 を導入し、作製した。

4.2. テスト菌株の検査

テスト菌株は遺伝的特性およびその他の諸性質について 2004 年 6 月 30 日～2004 年 10 月 6 日に以下の検査を行い、これらの特性を有することを確認した。

- ① ネズミチフス菌におけるヒスチジン要求性
大腸菌におけるトリプトファン要求性
- ② 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- ③ ネズミチフス菌におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- ④ TA100, TA98 および WP2 *uvrA*/pKM101 株におけるアンピシリン耐性 (pKM101)
- ⑤ 自然突然変異体数

⑥ 陽性対照の既知変異原物質に対する反応性

4.3. テスト菌株の保存と前培養

菌液 0.8 mL にジメチルスルホキシド (DMSO, ガスクロマトグラフ用, 無水, 和光純薬工業株式会社, 大阪府) を 0.07 mL の割合で加えて -80°C 超低温槽 (CL-422, 日本フリーザー株式会社, 東京都) で保存した。前培養にあたっては, 8 mL のニュートリエントブロス液体培地 (Lot No. 218041, Oxoid nutrient broth No.2, Oxoid Ltd., Hampshire, U.K.) を L 字管 (容量 22 mL) に分取し, そこへ保存菌液 10 μL を接種した。菌は 37°C で 8 時間振とう培養した。前培養終了時の生菌数は分光光度計 (SPECTRONIC 21, BAUSCH & LOMB., New York, U.S.A.) を用いて吸光度 (OD_{660}) を測定することにより求めた。各試験の菌株ごとの生菌数は以下の通りであった。

試験名	生菌数 ($\times 10^9/\text{mL}$)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537
用量設定試験	1.9	1.7	3.0	2.4	1.3
本試験	1.9	1.7	2.2	1.8	1.3

4.4. S9 Mix の調製

代謝活性化系として S9 Mix を用いた。代謝酵素誘導物質であるフェノバルビタール (PB) と 5,6-ベンゾフラボン (BF) を投与されたラット (投与スケジュールは 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) の肝臓ホモジネート 9000 \times g 上清分画 (S9) をキッコーマン株式会社 (千葉県) より購入した。購入後, -80°C 超低温槽に保存した。製造後 6 カ月以内の S9 分画 (Lot No. RAA-512) を試験直前に解凍し, 直ちにコファクター (Lot No. 732, ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京都) を加えて, 以下の組成になるように S9 Mix を調製した。S9 分画の特性を付表 1 に示す。

塩化マグネシウム	8 mM
塩化カリウム	33 mM
グルコース-6-リン酸	5 mM
NADH	4 mM
NADPH	4 mM
ナトリウム-リン酸緩衝液 pH 7.4	100 mM
S9 分画	10%

4.5. 被験物質溶液の調製

ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液は水と自由に混和するため、滅菌水 (Simpli Lab, 日本ミリポア・リミテッド (東京都)) を用いて製造した純水を滅菌したものを溶媒として用いた。試験の直前に原液 (1000 mg/mL) をろ過滅菌した後、その他の濃度を段階希釈法により調製した。溶解後、色、臭いおよび発熱等の変化は認められなかった。なお、純度換算は行わなかった。

4.6. 陰性対照および陽性対照

陰性対照 (溶媒対照) 物質として滅菌水を用いた。また、陽性対照物質として以下の既知変異原物質を用いた。

菌 株	代謝活性化を必要としないもの ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	代謝活性化を必要とするもの ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	NaN_3 (0.5)	2-AA (2)
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	AF-2 (0.005)	2-AA (2)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (99.0%, Lot No. SEL1402, 和光純薬工業株式会社)

2-AA: 2-アミノアントラセン (92.1%, Lot No. DWH6744, 和光純薬工業株式会社)

NaN_3 : アジ化ナトリウム (100.7%, Lot No. DWG5550, 和光純薬工業株式会社)

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩 (98%, Lot No. 16322JR, Aldrich Chemical Co., Inc., Wisconsin, U.S.A.)

AF-2, 9-AA, および 2-AA は DMSO (特級, >99.0%, 東京化成工業株式会社, 東京都) に溶解し, NaN_3 は滅菌水に溶解した。調製した陽性対照物質溶液は小分けして冷凍保存 (-80°C) し, 試験ごとに解凍して使用した。

4.7. アミノ酸添加軟寒天液の調製

0.6%寒天粉末 (和光純薬工業株式会社, Lot No. SEE7704) および 0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天液に, ネズミチフス菌株用には滅菌した 0.5 mM D-ビオチンおよび 0.5 mM L-ヒスチジン溶液, 大腸菌株用には 0.5 mM L-トリプトファン溶液を 1/10 容加え, アミノ酸添加軟寒天液を調製した。

4.8. 用量設定試験

被験物質の適切な用量を設定するために、代謝活性化による場合とよらない場合で用量設定試験を行った。用量設定試験では、原液（100000 µg/プレート）を最高用量として公比4で7用量（24.4, 97.7, 391, 1563, 6250, 25000, 100000 µg/プレート）を設定した。試験は被験物質処理群、溶媒対照群、および陽性対照群のすべての用量について2枚のプレートで実施した。

4.9. 本試験

代謝活性化による場合とよらない場合で本試験を行った。用量設定試験の結果より（5.1. 用量設定試験 参照）、本試験の最高用量は代謝活性化によらない場合のTA1535, TA98, およびTA1537株は6250 µg/プレート, TA100株と大腸菌は25000 µg/プレートに設定した。代謝活性化による場合は、すべての菌株において25000 µg/プレートに設定した。すべての菌株について、代謝活性化の有無にかかわらず公比2で6用量を設定した。試験は被験物質処理群、溶媒対照群、および陽性対照群のすべての用量について2枚のプレートで実施した。

4.10. 処理方法

プレインキュベーション法を実施した^{3,4)}。本法は細菌を用いた復帰突然変異試験で通常用いられる方法である。

代謝活性化によらない系では、滅菌小試験管に100 mM ナトリウムーリン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL, 前培養した菌懸濁液 0.1 mL, および被験物質溶液 0.1 mL を分注した。代謝活性化による系では、滅菌小試験管にS9 Mix 0.5 mL, 菌懸濁液 0.1 mL, および被験物質溶液 0.1 mL を分注した。いずれも恒温振盪培養器で37°C, 20分間振盪した。振盪回数は毎分85往復とした。45°Cで保温したアミノ酸添加軟寒天液2 mLを加え良く混合した後、最少グルコース寒天平板培地（Lot No. ANI800IT（2004年9月16日製造）、クリメディア AM-N 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、東京都）上に広げた。最少グルコース寒天平板培地は塩類溶液（0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸2カリウム, 0.192%リン酸1アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム, 0.02%硫酸マグネシウム・7水塩）に1.5%寒天粉末（Lot No. 40127, 伊那寒天 BA-30A, 伊那食品工業株式会社、長野県）、2%グルコースを加え、30 mLずつ分注したものであった。

37°Cで48時間培養後、コロニーアナライザー（PCA-11DA, システムサイエンス株式会社、東京都）を用いて復帰変異コロニー数を計測した。同時に、被験物質の析出を肉眼で、菌に対する生育阻害を実体顕微鏡下で観察した。代謝活性化による場合の最高用量（100000 µg/プレート）で被験物質中の成分と思われる析出が認められたが、コロニーアナライザーによる計測に支障はなかった。

なお、生育阻害は、バックグラウンドのアミノ酸要求性菌の生育状態を指標にして判定

した。

4.11. 無菌テスト

試験に用いた被験物質および S9 Mix の無菌性を調べるために、最高容量の被験物質溶液および S9 Mix をニュートリエントブロス寒天平板培地 (Oxoid nutrient broth No.2) にそれぞれ 100 μ L 滴下した。また、各菌懸濁液を最少グルコース寒天平板培地に 100 μ L 滴下した。それらを 37°C で 48 時間培養し、雑菌混入の有無を確認した。

4.12. 試験の有効性

被験物質の突然変異誘発性の判定を行う前に、試験の有効性の確認を行った。以下の 3 基準をすべて満たす場合にその試験を有効とした。

- ① 試験に用いた菌液、被験物質溶液、S9 Mix に雑菌の汚染がない。
- ② 溶媒対照群および陽性対照群における復帰変異コロニー数の平均値が、背景値に基づく管理範囲内である。
- ③ 陽性対照群は溶媒対照群の 2 倍以上の復帰変異コロニー数 (平均値) を示す。

4.13. 結果の判定

結果の判定にあたっては統計学的解析を行わず、各用量におけるコロニー数の平均値を基に、以下の 3 基準をすべて満たす場合を陽性とした。

- ① 被験物質処理群において溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニーが出現する。
- ② 被験物質の濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する (用量-反応効果)。
- ③ 用量設定試験と本試験で、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

一方、用量設定試験と本試験のいずれの用量においても、復帰変異コロニー数が溶媒対照群のコロニー数の 2 倍より少ない場合は陰性とした。

5. 試験成績

5.1. 用量設定試験

用量設定試験の結果を表 1 に示し、また、比活性を表 3 に示す。

5.1.1. 菌株の生育阻害と被験物質の析出

代謝活性化によらない場合の TA1535, TA98, および TA1537 株で、6250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量に生育阻害が観察された。TA100 株と大腸菌では、25000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量に生育阻害が観察された。代謝活性化による場合では、すべての菌株で 25000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量に生育阻害が観察された。また、代謝活性化による場合の最高用量 (100000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) において被験物質中の成分の析出が観察された。

5.1.2. 復帰変異コロニー数

ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液は代謝活性化によらない場合では、TA100, TA1535 株 および大腸菌の 1563 または 6250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。代謝活性化による場合では TA100, TA1535, 大腸菌, および TA98 株の 1563 または 6250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。一方、TA1537 株では代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

5.2. 本試験

本試験の結果を表 2 に示し、用量-反応曲線を図 1-(1)~(4)に示す。また、比活性を表 3 に示す。

5.2.1. 菌株の生育阻害と被験物質の析出

代謝活性化によらない場合において、TA1535, TA98, および TA1537 株では 6250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で生育阻害が観察され、TA100 株と大腸菌では 12500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で生育阻害が観察された。代謝活性化による場合においては、すべての菌株で 25000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に生育阻害が観察された。なお、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての用量において被験物質の析出は観察されなかった。

5.2.2. 復帰変異コロニー数

ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液は代謝活性化の有無にかかわらず、TA100, TA1535, 大腸菌, および TA98 株の 1563, 3125, または 6250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量において、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、その増加には用量相関性が認められた。一方、TA1537 株では代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

6. 試験の有効性

用量設定試験および本試験に用いた菌液、被験物質溶液、S9 Mix に雑菌の汚染がないことを確認した。各菌株の溶媒対照群および陽性対照群における復帰変異コロニー数は、当研究所の背景値に基づく管理範囲内であった（付表 2）。また、陽性対照群は溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、用量設定試験および本試験は有効であると判断された。

7. 考察

用量設定試験および本試験の結果において、代謝活性化の有無にかかわらず TA100, TA1535, および大腸菌で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化の TA98 株においても 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。それぞれの菌株で、用量設定試験と本試験に対する結果の再現性が確認された。また、その増加には用量相関性がみられた。したがって、陽性と判定する 3 つの基準をすべて満たしていた。

代謝活性化によらない場合の TA98 株においては、用量設定試験において、2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められていない。しかし、復帰変異コロニー数は増加する傾向にあり、1563 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ では溶媒対照の 1.9 倍の変異コロニー数の増加を示した。用量を細かく設定することにより、2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められる可能性が示唆された。公比 2 と設定した本試験において、3125 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められたことから、用量設定試験と本試験で結果の再現性があると判断でき、代謝活性化によらない場合の TA98 株も陽性と考えられる。

被験物質であるベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液に含まれる主要な変異原物質の含有量は以下の通りであった（財団法人日本食品油脂検査協会にて測定）。

3, 4-ベンツピレン	0.1 ng/g 未満
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	0.1 ng/g 未満
3-メチルコランスレン	0.1 ng/g 未満
ホルムアルデヒド	3000 $\mu\text{g}/\text{g}$

この数値に基づくと、例えば毒性試験ガイドラインで定められた最高用量である 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ では、各変異原物質がプレートあたり以下の用量で含まれる計算になる。

3, 4-ベンツピレン	0.5 pg/プレート未満
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	0.5 pg/プレート未満
3-メチルコランスレン	0.5 pg/プレート未満
ホルムアルデヒド	15.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

それに対して、各変異原物質が陽性反応を示す最低用量は以下の通りである^{5,6,7}。

3, 4-ベンツピレン	0.25 µg/プレート
1,2,5,6-ジベンゾアントラセン	25 µg/プレート
3-メチルコランスレン	10 µg/プレート
ホルムアルデヒド	7.4 µg/プレート

以上の数値を比較すると、5000 µg/プレートにおける3, 4-ベンツピレン、1,2,5,6-ジベンゾアントラセンおよび3-メチルコランスレンの含有量は、それらの物質が陽性反応を示す最低量より遥かに少ない。それに対して、ホルムアルデヒドの含有量は陽性反応を示す最低量の約2倍である。したがって、本実験を5000 µg/プレートを最高用量に設定した場合であっても陽性結果が得られる計算になり、実際に1563 µg/プレート以上から陽性反応が認められた。

また、本実験では、代謝活性化系非存在下でも陽性反応がみられた。3, 4-ベンツピレン、1,2,5,6-ジベンゾアントラセン、および3-メチルコランスレンの変異原活性には代謝活性化系を必要とする。一方、ホルムアルデヒドは代謝活性化系を必要としない。このことから、陽性反応を示す原因成分は多環式芳香族炭化水素類ではなく、ホルムアルデヒドであることが強く示唆される。

なお、ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液の比活性の最大値は138.2（大腸菌）であった（表3）。これは3,4-ベンツピレンの比活性（471600）の1/3400であり、変異原性レベルとしては低いものであると言える。

8. 結論

以上の結果から、本実験条件下におけるベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液の細菌に対する突然変異誘発性は陽性であると結論した。

9. 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および計画書に従わなかったこと

試験期間を通じ、試験計画書からの逸脱は認められなかった。さらに、試験の信頼性に悪影響を及ぼした疑いのある諸要因（環境要因、予期しえなかった事態等）は認められなかった。

10. 参考文献

- 1) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki : Mutation Res., 31, 347-364, 1975.
- 2) 安衛法における変異原性試験（労働省安全衛生部化学物質調査課編）、中央労働災害防

- 止協会, 1991.
- 3) Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, S. Venitt and E. Zeiger : Mutation Res., 312, 217-233, 1994.
 - 4) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura: Factors Modulating Mutagenicity in Microbial Tests, in: K.H. Norpoth and R.C. Garner (Eds.), Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Springer-Verlag, pp. 273-285, 1980.
 - 5) 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー, 監修.: 石館基, 1991.
 - 6) 環境変異原データ集 1, サイエンティスト社, 監修: 賀田恒夫・石館基, 1980.
 - 7) Andrews, A.W., L. H. Thibault and W. Lijinsky : Mutation Res., 51, 311-318, 1978.

表1

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液

試験実施期間		2004年 11月 24日より			2004年 11月 26日		
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	117 109 (113)	11 6 (9)	70 89 (80)	14 8 (11)	13 2 (8)	
	24.4	112 100 (106)	12 11 (12)	89 96 (93)	21 14 (18)	7 8 (8)	
	97.7	119 116 (118)	9 12 (11)	70 102 (86)	19 11 (15)	4 8 (6)	
	391	114 122 (118)	11 14 (13)	102 124 (113)	22 12 (17)	5 10 (8)	
	1563	263 259 (261)	11 11 (11)	253 230 (242)	19 23 (21)	7 5 (6)	
	6250	536 484 (510)	17* 20* (19)	795 754 (775)	8* 5* (7)	8* 5* (7)	
	25000	0* 0* (0)	3* 0* (2)	58* 52* (55)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	100000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
+S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	124 118 (121)	8 3 (6)	99 119 (109)	28 37 (33)	12 17 (15)	
	24.4	113 107 (110)	6 9 (8)	148 132 (140)	31 27 (29)	19 19 (19)	
	97.7	106 121 (114)	6 8 (7)	131 115 (123)	23 27 (25)	12 21 (17)	
	391	115 121 (118)	13 4 (9)	152 152 (152)	16 19 (18)	18 18 (18)	
	1563	225 185 (205)	17 11 (14)	241 235 (238)	31 40 (36)	14 18 (16)	
	6250	438 452 (445)	19 24 (22)	575 613 (594)	58 74 (66)	21 20 (21)	
	25000	2* 0* (1)	1* 0* (1)	68* 84* (76)	1* 0* (1)	0* 2* (1)	
	100000†	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	440 417 (429)	417 418 (418)	933 875 (904)	406 409 (408)	778 833 (806)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	560 611 (586)	94 134 (114)	481 464 (473)	233 269 (251)	124 119 (122)

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

2-AA: 2-アミノアントセン

NaN₃: ナジ 化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

(): 内の数値は平均値

*: 菌株の生育阻害を認める

†: 被験物質の析出を認める

表2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称: ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液

試験実施期間		2004年 11月 30日より			2004年 12月 2日		
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	136 120 (128)	12 13 (13)	93 94 (94)	17 14 (16)	11 7 (9)	
	195	/	14 11 (13)	/	22 20 (21)	7 8 (8)	
	391	/	12 13 (13)	/	13 22 (18)	11 11 (11)	
	781	155 148 (152)	14 17 (16)	159 179 (169)	17 22 (20)	13 6 (10)	
	1563	245 278 (262)	17 19 (18)	314 306 (310)	27 27 (27)	12 16 (14)	
	3125	419 394 (407)	17 24 (21)	524 517 (521)	46 41 (44)	17 12 (15)	
	6250	596 532 (564)	34* 22* (28)	877 890 (884)	15* 7* (11)	7* 6* (7)	
	12500	41* 94* (68)	/	577* 605* (591)	/	/	
	25000	0* 0* (0)	/	0* 0* (0)	/	/	
+S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	124 136 (130)	10 10 (10)	115 113 (114)	18 17 (18)	16 17 (17)	
	781	161 164 (163)	7 10 (9)	151 197 (174)	26 31 (29)	8 16 (12)	
	1536	199 209 (204)	25 10 (18)	285 275 (280)	20 29 (25)	13 20 (17)	
	3125	345 315 (330)	17 22 (20)	466 411 (439)	40 51 (46)	10 17 (14)	
	6250	488 526 (507)	22 20 (21)	658 731 (695)	47 59 (53)	28 16 (22)	
	12500	664 676 (670)	31 29 (30)	1075 1132 (1104)	47 53 (50)	15 23 (19)	
	25000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	85* 13* (49)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
		コロニー数/プレート	479 473 (476)	439 471 (455)	1042 1040 (1041)	328 304 (316)	511 561 (536)
	S9 Mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (µg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	652 641 (647)	130 132 (131)	553 585 (569)	195 160 (178)	124 111 (118)

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

2-AA: 2-アミノアントレン

NaN₃: アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

(): 内の数値は平均値

*: 菌株の生育阻害を認める

表 3

比 活 性

	菌 株 名	-S9 Mix		+S9 Mix	
		比活性	計算に用いた 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	比活性	計算に用いた 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
用 量 設 定 試 験	TA100	94.7	1563	51.8	6250
	TA1535	1.6	6250	5.1	1563
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	111.2	6250	82.5	1563
	TA98	—	—	5.3	6250
	TA1537	—	—	—	—
本 試 験	TA100	89.3	3125	64.0	3125
	TA1535	2.4	6250	3.2	3125
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	138.2	1563	106.2	1563
	TA98	9.0	6250	9.0	3125
	TA1537	—	—	—	—

比活性：被験物質 1mg 当たりの誘発復帰変異コロニー数。すなわち溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示す用量において、下式より計算して得た値の最大値。

$$\frac{(\text{被験物質群の復帰変異コロニー数}) - (\text{溶媒対照群の復帰変異コロニー数})}{\text{用量 (mg/プレート)}}$$

用量 (mg/プレート)

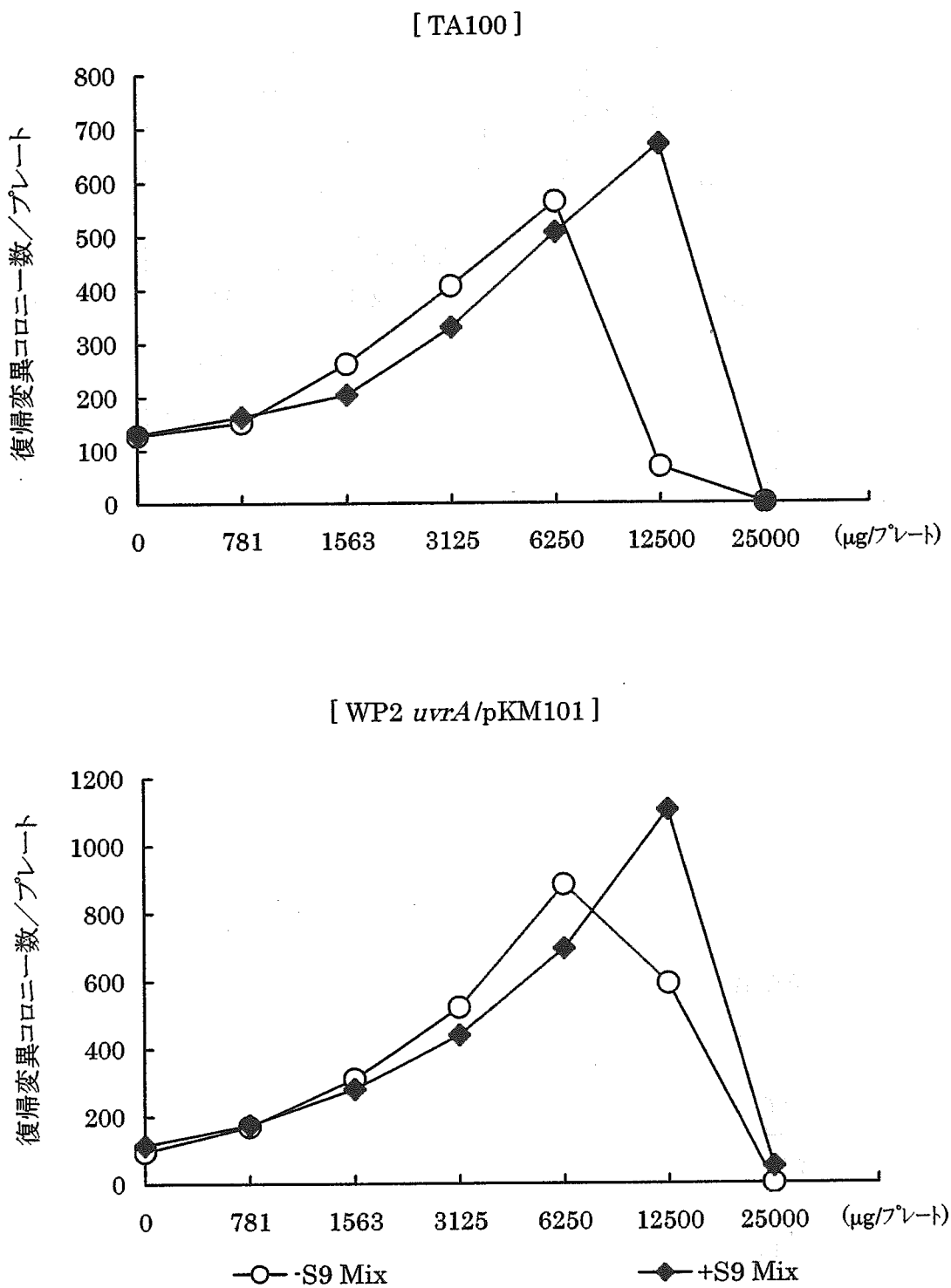


図1 用量-反応曲線 (本試験, TA100株およびWP2 *uvrA*/pKM101株)

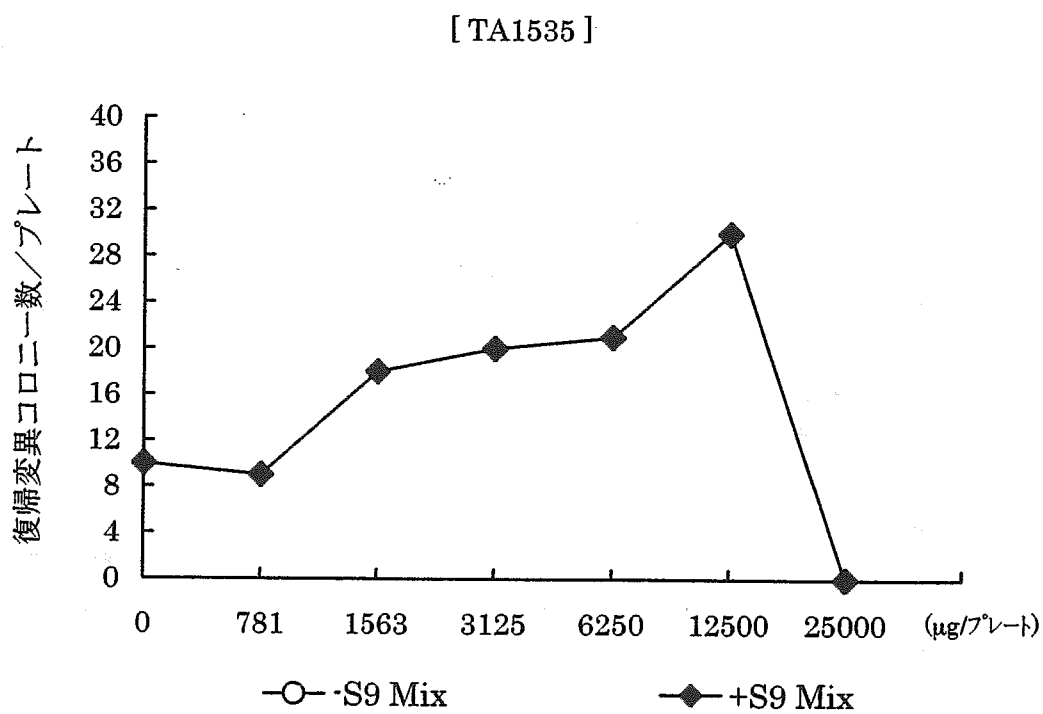
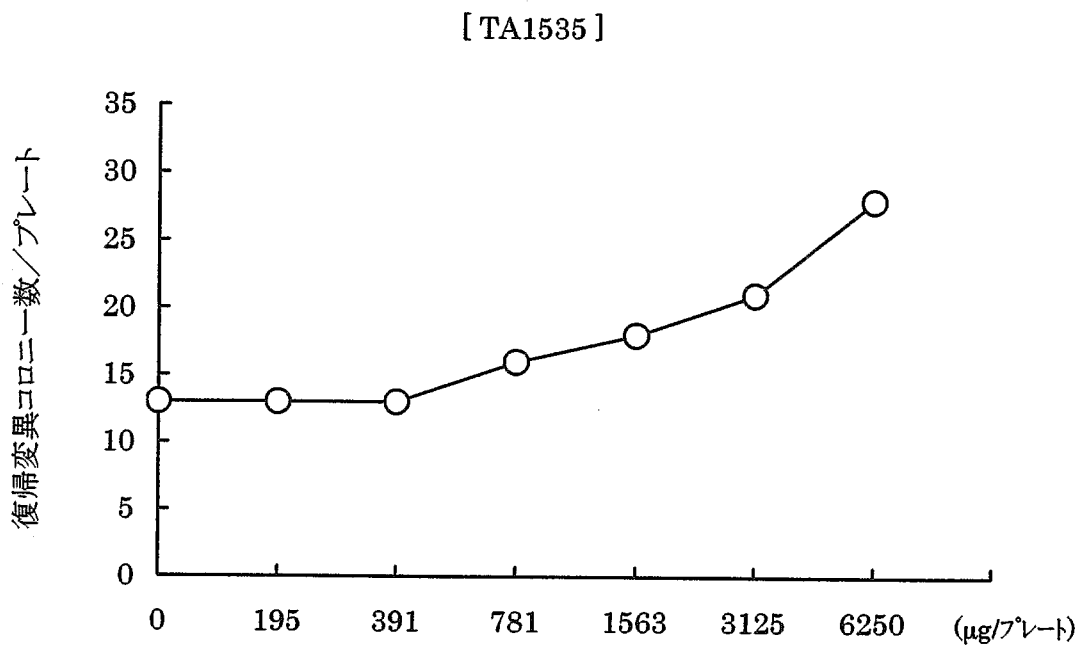


図2 用量-反応曲線 (本試験, TA1535株)

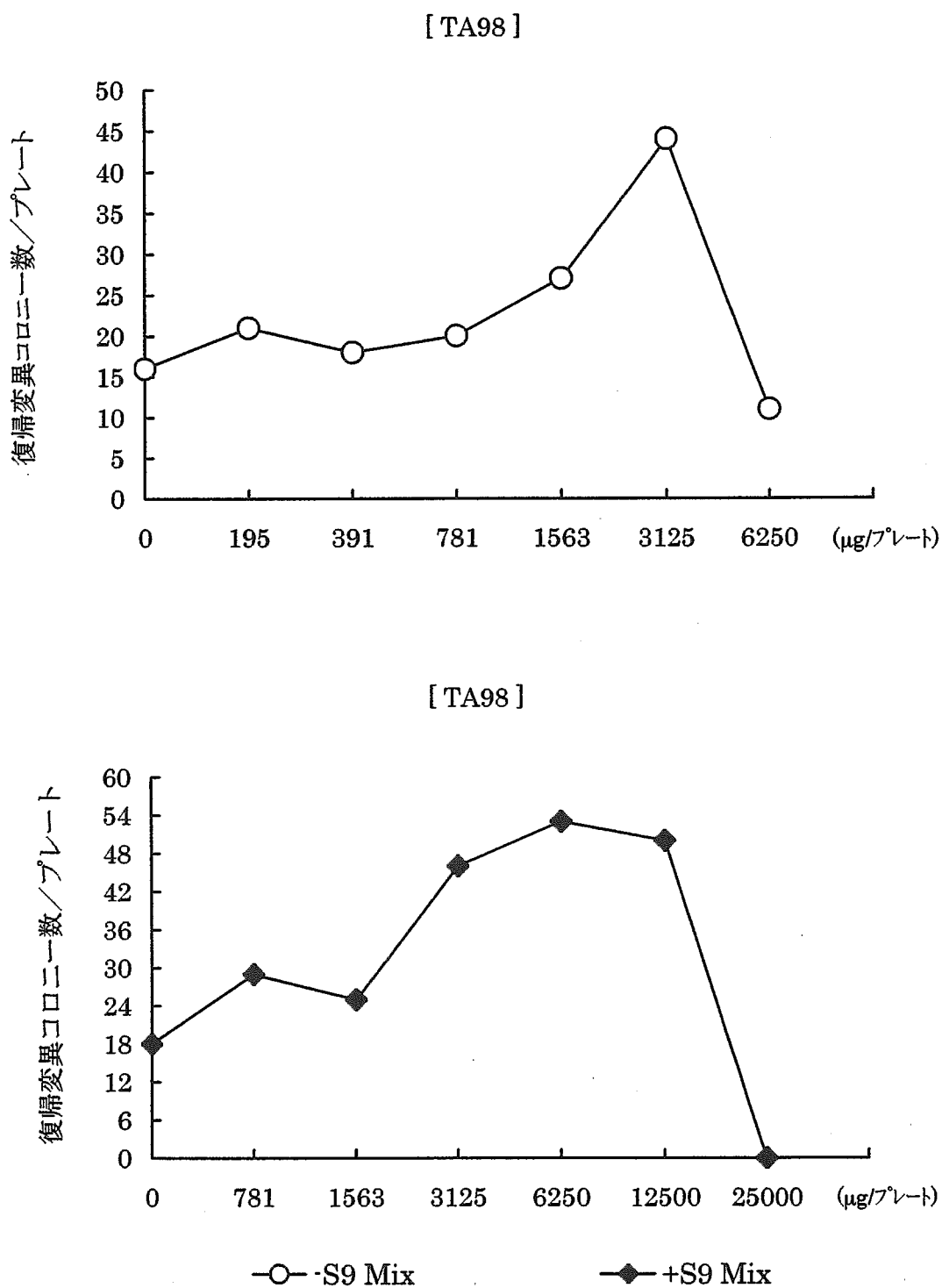


図3 用量-反応曲線 (本試験, TA98株)

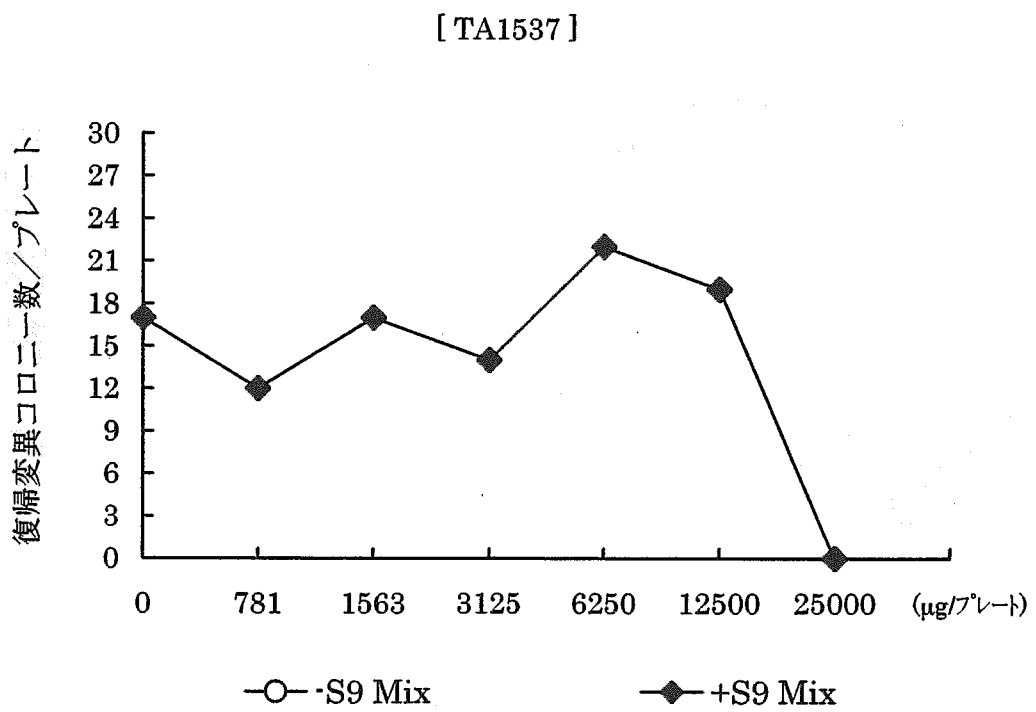
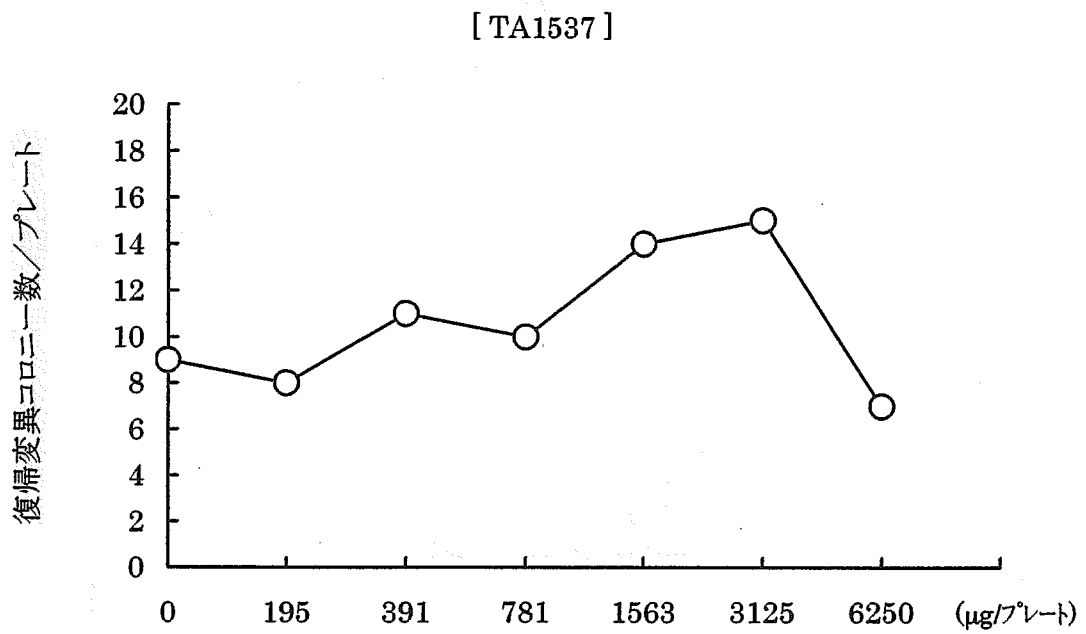


図4 用量-反応曲線 (本試験, TA1537株)

付表 1

キッコーマン株式会社
 研究本部 第2研究部
 〒278-0037 千葉県野田市野田399
 04(7123)5574

S-9 品質保証書

製造番号 RAA-512
 製造年月日 2004年11月05日

ラット肝ホモジネート 9,000×g 上清

使用動物 : Sprague-Dawley Rat (Slc:SD)
 性別 : 雄
 週令 : 7週令
 体重 : 212-244g
 誘導物質 : フェノール (PB: 和光純薬工業(株)製) & 5,6-ベンゾフラボン (BF: 和光純薬工業(株)製) 腹腔内投与
 投与用量 : 1日目PB30mg/kg、2日目PB60mg/kg、3日目PB60mg/kg+BF80mg/kg、4日目PB60mg/kg、5日目S-9調製
 S-9調製法 : 断頭 → 灌流 (生理食塩水) → 灌流肝10gに0.15M KCl溶液を30ml加え 絞汁 → 9,000Gで10分間遠沈 → 上清分画 → 直ちに凍結

生化学活性:

S-9 画分

1) 蛋白含量	26.72 mg/ml
2) フクロム P-450含量	1.03 nmol/mg protein
3) ジメチルニトロソアミン脱メチル酵素活性	4.66 nmol HCHO formed/mg protein/min
4) アリル水酸化酵素活性	26.41 nmol p-aminophenol formed/mg protein/hour
5) ベンゾ [a] ピレン酵素活性	20.72 無誘導の活性を1.00とした相対活性

ミクロソーム (105,000×g) 画分

1) 蛋白含量	15.30 mg/ml
2) フクロム P-450含量	2.95 nmol/mg protein

生物学活性: 最少グルコース寒天平板培地にはクリメディアAM-N (三光純薬(株)) を使用し、プレインキュベーション法 (37℃、20分) にて試験。

変異原物質	濃度 (* ¹ : μg, * ² : μl/plate)	菌株	Hist+/plate
ベンゾ [a] ピレン (和光純薬製) 溶媒: DMSO	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	942 ± 23
	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	297 ± 13
	5.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	96 ± 3
2-アミノアントラセン (和光純薬製) 溶媒: DMSO	1.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	561 ± 39
	0.5 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	289 ± 16
	2.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	118 ± 4
9,10-ジメチルアントラセン (アルリッチ社製) 溶媒: DMSO	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA100	906 ± 23
	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA98	365 ± 21
	50.0 * ¹ (100 μl S-9/p)	TA1537	184 ± 7
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA100	575 ± 13
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA98	197 ± 18
	50.0 * ¹ (50 μl S-9/p)	TA1537	155 ± 22
ジメチルニトロソアミン (和光純薬製) 溶媒: リン酸緩衝液 (pH5.5)	10.0 * ² (50 μl S-9/p)	TA100	1,672 ± 86
自然復帰コロニー	プレインキュベーション → 30℃、35分		
	(50 μl S-9/p)	TA100	92 ± 3
	(50 μl S-9/p)	TA98	27 ± 3
	(50 μl S-9/p)	TA1537	14 ± 0

無菌試験 (500 μl S-9/plate): 合格

保存上の注意: 直ちに-80℃で保存して下さい。

使用期限: 製造日より6ヵ月以内にご使用下さい。

担当者: 永野、斉藤

付表 2

復帰突然変異試験における対照群の背景データ

1. 陰性対照群（溶媒対照群）の背景データ

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート（平均±S.D.）				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
-	124±18	8±3	109±18	17±5	8±3
+	130±22	8±3	135±22	24±6	14±5

データ蓄積期間：2003年1月～2003年12月

2. 陰性対照群（溶媒対照群）の管理範囲

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
-	70～178	4～17	55～163	10～32	4～17
+	64～196	4～17	69～201	10～42	6～29

3. 陽性対照群の背景データ

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート（平均±S.D.）				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
-	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	0.01 µg/プレート	0.5 µg/プレート	0.005 µg/プレート	0.1 µg/プレート	80 µg/プレート
	434±75	510±69	1094±121	342±81	590±218
+	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	1 µg/プレート	2 µg/プレート	2 µg/プレート	0.5 µg/プレート	2 µg/プレート
	755±109	139±35	478±96	258±54	104±27

データ蓄積期間：2003年1月～2003年12月

陽性対照物質の略名は報告書本文を参照

4. 陽性対照群の管理範囲

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
-	360～660	300～720	730～1460	90～590	150～1240
+	420～1080	40～240	410～770	90～420	60～190