

## 木酢液小核試験 資料目次

|                                    | 頁  |
|------------------------------------|----|
| 1 ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液：マウスを用いる小核試験 …………… | 1  |
| 2 スギ木酢液：マウスを用いる小核試験 ……………          | 22 |
| 3 蒸留木酢液：マウスを用いる小核試験 ……………          | 43 |



平成18年度 農林水産省 農薬的資材安全性評価情報整備事業  
(農薬的資材安全性確認試験)

ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液：マウスを用いる小核試験

(試験番号 IET 06-0117)

最終報告書

試験終了日：2007年3月12日

茨城県常総市内守谷町 4321 番地  
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： 2007年3月12日

陳述書

ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液：マウスを用いる小核試験

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において実施された。

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、試験結果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



2007年3月12日

**試験委託者（代行）**

名称： 財団法人 残留農薬研究所 試験事業部  
所在地： 茨城県常総市内守谷町4321番地（〒303-0043）

**試験施設**

名称： 財団法人 残留農薬研究所  
所在地： 茨城県常総市内守谷町 4321 番地（〒303-0043）  
運営管理者： 理事長 寺本 昭二

**試験指針（テストガイドライン）の適用**

農林水産省、農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針  
（12 農産第 8147 号 2-1-1, 2000 年）

**記録等の保管**

当該試験の試験計画書、生データ、塗抹標本、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。保管期間は、塗抹標本や被験物質のサンプルについては5年間、その他の資料については15年間とする。なお、塗抹標本については、それによる試験成績の再評価が妥当性を失うとの理由からこの期間より前に処分する場合は、その理由を付し、文書で記録する。

**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**動物飼育管理：**

竹澤 祐造

## 目次

|   | 頁  |
|---|----|
| 表紙 -----  | 1  |
| 陳述書 -----   | 2  |
| 試験委託者 -----   | 3  |
| 試験施設 -----  | 3  |
| 試験指針（テストガイドライン）の適用 -----  | 3  |
| 記録等の保管 -----  | 4  |
| 試験従事者 -----   | 4  |
| 目次 -----  | 5  |
| <br>  |    |
| 1. 要約 -----   | 7  |
| 2. 試験目的 -----   | 8  |
| 3. 被験物質 -----   | 8  |
| 4. 試験材料および方法 -----  | 8  |
| 4.1. 供試動物 -----   | 8  |
| 4.2. 動物飼育管理 -----   | 9  |
| 4.3. 投与液の調製 -----   | 10 |
| 4.4. 投与方法および投与回数 -----  | 10 |
| 4.5. 毒性試験 -----   | 10 |
| 4.6. 小核試験 -----   | 10 |
| 4.7. 小核の観察 -----  | 11 |
| 4.8. 統計学的解析 -----   | 12 |
| 4.9. 試験の有効性 -----   | 12 |
| 4.10. 結果の判定 -----   | 13 |
| 5. 試験結果および考察 -----  | 14 |
| 5.1. 毒性試験結果 -----   | 14 |
| 5.2. 小核試験結果 -----   | 14 |
| 6. 試験の有効性 -----   | 14 |
| 7. 結論 -----   | 15 |
| 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<br>事象および試験計画書に従わなかったこと ----- | 15 |
| 9. 参考文献 -----   | 15 |

目次 (続き)

|   | 頁  |
|---|----|
| <b>TABLES</b>   |    |
| 1. Summary of results – micronucleus test .....                   | 16 |
| <b>APPENDICES</b>   |    |
| 1. Mortality in toxicity and micronucleus tests .....             | 17 |
| 2. Individual values of micronucleus test .....                   | 18 |
| 3. Individual clinical observation in toxicity test .....         | 19 |
| 4. Individual clinical observation in micronucleus test .....     | 20 |
| 5. Laboratory historical control data in micronucleus tests ..... | 21 |



## 1. 要約

雄の ICR 系 (CrIj:CD1) マウスを用い、骨髓細胞におけるベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液の小核試験を実施した。被験物質投与群は 1250, 2500, および 5000 mg/kg の 3 用量を設定し、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回の強制経口投与を行った。陰性対照群には被験物質投与液の調製に用いた純水を 2 回強制経口投与し、陽性対照群にはマイトマイシン C を 10 mg/kg で 1 回強制経口投与した。1 用量群あたり 5 匹の動物に投与し、最終投与 24 時間後にすべての動物から骨髓塗抹標本作製した。

標本観察の結果、ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液のいずれの用量群でも陰性対照群と比べて小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に明らかな増加が認められた。

以上の結果より、本実験条件下では、ICR 系 (CrIj:CD1) マウスの骨髓細胞において、ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液の小核誘発性は陰性であると結論した。

## 2. 試験目的

ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液のマウス骨髄細胞における小核誘発性の有無を検索した。

## 3. 被験物質

試験委託者により提供された被験物質に関する情報を次に示す。

名称： ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液  
ロット番号： W19010  
性状： 液体  
保管条件： 財団法人残留農薬研究所第 3 実験棟被験物質保管庫，保管庫番号 REF-3-M5，冷蔵暗所（実測温度範囲：1.4～10.1°C）

## 4. 試験材料および方法<sup>1), 2)</sup>

### 4.1. 供試動物

#### 4.1.1. 動物種および選定理由

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県）で生産された ICR 系 SPF マウス（Crj:CD1）を用いた。マウスは小核試験に汎用されている動物種であり，当研究所は本系統について豊富な背景データを蓄積している。

#### 4.1.2. 性

雄の動物を用いた。

#### 4.1.3. 入荷時の週齢，購入数，および体重範囲

毒性試験用の購入動物数は 31 匹（IET 06-0118 と 06-0119 の試験と併せて購入）とした。小核試験用の購入動物数も 31 匹とした。生産者による出荷時の体重の範囲は，28～34 g であった。

#### 4.1.4. 検疫・馴化期間

入荷後 7 日間の検疫・馴化期間をおいた。入荷時および馴化終了時に触診を含む観察を行った。また，検疫・馴化期間中，ケージサイドから 1 日 1 回（週末および祝日を除く）動物の一般状態を観察した。

#### 4.1.5. 投与時の週齢および体重

7 週齢で試験に供した。毒性試験および小核試験において試験に供したマウスの投与日投与初日における平均体重（最小値～最大値）は以下に示す通りであった。毒性試験の余剰動物は 4 匹（ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液，スギ木酢液および蒸留木酢液の 3 検体で使

用する予定だった動物)であり、投与終了後試験系より除外した後に安楽死させた。また、小核試験の余剰動物は6匹であり、投与終了後試験系より除外した後に安楽死させた。

#### 供試動物の体重

| 試 験  | 性 | 動物数<br>(匹) | 体 重 (g)          |
|------|---|------------|------------------|
|      |   |            | 平均値 (最小値～最大値)    |
| 毒性試験 | 雄 | 9          | 35.5 (34.1～37.0) |
| 小核試験 | 雄 | 25         | 33.5 (30.3～36.6) |

## 4.2. 動物飼育管理

### 4.2.1. 飼育環境

温度  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエア方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室 (動物室 115) で動物を飼育した。飼育期間中の動物飼育室の実測温湿度は、 $21.1 \sim 23.1^{\circ}\text{C}$  および  $43.2 \sim 67.2\%$  の範囲であった。

### 4.2.2. ラックおよび飼育ケージ

動物は、金網床付アルミニウム製ケージ (215 W × 330 D × 180 H mm) に 5 匹以内で収容した。各ケージはステンレス鋼製可動ラックに収容した。用いるラックには被験物質名および試験番号を記入したテープを貼り、各ケージにはケージ番号、被験物質名、試験番号、用量、性別、試験の種類、解剖日、動物番号、および個体識別を記した標識を付けた。

### 4.2.3. 動物の群分けおよび個体識別

入荷時に動物を無作為に各ケージに分配することで群分けを行った。投与初日に各動物の体重が平均体重の  $\pm 20\%$  を超えていないことを確認した。

ケージ内での各個体の識別は、ピクリン酸飽和 70% エタノール溶液を用いて被毛の一部を染色することで行った。

### 4.2.4. 飼料

保証飼料である MF 固型 (Lot No. 060907A4 (毒性試験), 061204A3 (小核試験), オリエンタル酵母工業株式会社, 東京都) を、ステンレス鋼製バスケット型給餌器により自由に摂取させた。飼料中の汚染物質の分析結果を確認したところ、残留農薬研究所が定めた許容基準値以下または範囲内であった。

#### 4.2.5. 飲水

市上水（茨城県常総市）をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。飲水中の汚染物質の分析結果を確認したところ、残留農薬研究所が定めた許容基準値以下であった。

#### 4.3. 投与液の調製

##### 4.3.1. 被験物質投与液の調製

被験物質は水に自由に混和するため、純水（Simpli Lab, 日本ミリポア・リミテッドを用いて製造）を溶媒として用いた。被験物質溶液は原液または最高濃度を調製した後、段階希釈により低濃度の被験物質溶液を調製した。被験物質溶液は投与日ごとに調製し、残余はそのつど廃棄した。

##### 4.3.2. 陽性対照物質投与液の調製

陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC) を用いた。マイトマイシン注用 2 mg (2 mg (方価) MMC/瓶, Lot No. 480AEL, 協和醗酵工業株式会社, 東京都) に純水を 2 mL/瓶加えて溶解させ、1 mg/mL の MMC 溶液を投与直前に調製した。

#### 4.4. 投与方法および投与回数

被験物質投与群のすべての動物に対し、胃ゾンデを用いて 10 mL/kg の容量で 1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回の強制経口投与を行った。この投与方法は、マウス小核試験で通常用いられている方法である。個々の動物に対する投与容量は、被験物質投与開始日の体重から算出した。なお、投与前後それぞれ約 3 時間の絶食を行なった。

#### 4.5. 毒性試験

供試動物の被験物質 2 回連続投与に対する最大耐量を求めるため毒性試験を行なった。用量は 2500, 5000, および 10000 mg/kg の 3 用量を設定した。最高用量の 10000 mg/kg は被験物質を原液のまま 10 mL/kg の容量で投与することを意味した。用量あたり 3 匹の動物に投与し、2 回投与後 24 時間までの一般状態を観察した。

#### 4.6. 小核試験

小核試験は 2 回投与・1 回標本作製による方法を用いた。本法は連続投与小核試験で通常行われる方法の 1 つである。

##### 4.6.1. 用量

被験物質の投与用量は 1250, 2500, 5000 mg/kg (公比 2) の 3 用量を設定した。

#### 4.6.2. 供試動物数

1用量群あたり5匹の動物を用いた。

#### 4.6.3. 対照群

陽性対照群および陰性(媒体)対照群を設定した。陽性対照群にはMMC溶液を10 mg/kgの用量で1回強制経口投与した(投与容量10 mL/kg)。陰性対照群には10 mL/kgの容量で純水を1日1回、24時間間隔で2回強制経口投与した。

#### 4.6.4. 標本作製時期および供試動物数

以下に各用量群における骨髓塗抹標本の作製時期と供試動物数を示す。

| 用 量 群               | 標本作製時期および供試動物数 |   |
|---------------------|----------------|---|
|                     | 最終投与後 24 時間    |   |
| 陰性対照 (純水)           |                | 5 |
| 1250 mg/kg          |                | 5 |
| 2500 mg/kg          |                | 5 |
| 5000 mg/kg          |                | 5 |
| 陽性対照 (MMC 10 mg/kg) |                | 5 |

#### 4.6.5. 一般状態の観察

1回目投与後1, 3, 5, 24 および48時間に一般状態を観察した。

#### 4.6.6. 体重測定

被験物質投与開始日および骨髓細胞採取日に、個体別の体重を測定した。

#### 4.7. 小核の観察

##### 4.7.1. 塗抹標本の作製

頸椎脱臼で動物を安楽死させ、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し、余分の血清を棄てた。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させた。骨髓細胞浮遊液の小滴をピペットでスライドグラスに取り、カバーグラスを用いて細胞を均等に塗抹した。各動物あたり2枚の塗抹標本を作製し、標本には暗号化したコード番号を記載した。骨髓細胞を十分乾燥させた後、標本はメタノールで5分間固定し、3%ギムザ液(メルク社製ギムザ溶液をpH 6.8リン酸緩衝液で希釈)で30分間、室温で染色した。

##### 4.7.2. 塗抹標本の観察

1動物につき1枚の塗抹標本について、光学顕微鏡下1000倍にて赤血球の観察を行っ

た（残りの1枚は予備標本とした）。観察方法はSchmidの方法<sup>2)</sup>に従い、小核を有する多染性赤血球の出現頻度（小核出現頻度）と骨髓増殖抑制の指標である多染性赤血球の割合を調べた。小核出現頻度は多染性赤血球を2000個観察し、下記の計算式に従って求めた。多染性赤血球の割合については、多染性赤血球と正染性赤血球をあわせて1000個観察し、下記の計算式に従って求めた。

$$\text{小核出現頻度 (\%)} = \frac{\text{MNPCE}}{\text{PCE}} \times 100$$

$$\text{多染性赤血球の割合 (\%)} = \frac{\text{PCE}}{\text{PCE} + \text{NCE}} \times 100$$

MNPCE：小核を有する多染性赤血球数

PCE：多染性赤血球数

NCE：正染性赤血球数

#### 4.7.3. 小核の判定基準および多染性赤血球の識別基準

ギムザ染色による小核の判定は、1) 赤血球中に存在している核、2) 大きさが成熟赤血球の直径1/2以下、および3) 近接する白血球の核と同じ染色性をしていることを基準とした。また、ギムザ染色による多染性赤血球と正染性赤血球の識別方法としては、多染性赤血球は青から紫がかった色であるのに対して、正染性赤血球は少し濁った赤色をしているため、視野の中で明らかに赤味を帯びていると判断される赤血球を正染性赤血球とみなし、その他をすべて多染性赤血球として観察した。

#### 4.8. 統計学的解析

小核出現頻度についての統計学的解析にはKastenbaum-Bowman<sup>3)</sup>の数表（被験物質投与群）およびカイ二乗検定（陽性対照群）を用いた。多染性赤血球の割合についての統計学的解析にはWilcoxonの順位和検定を行った。いずれの検定法も有意水準を5%以下に設定した。

#### 4.9. 試験の有効性

被験物質の小核誘発性の判定を行う前に、試験の有効性の確認を行った。試験が以下の基準に合致していれば、その試験を有効とした。

- ① 陰性対照群の小核出現頻度の平均値が0.3%以下であること。
- ② 陽性対照群の小核出現頻度の平均値が2.0%以上であること。

#### 4.10. 結果の判定

少なくとも1つの被験物質投与群で小核出現頻度が有意に増加し、さらに、傾向検定により用量相関性が認められれば陽性と判定した。一方、いずれの被験物質投与群においても小核出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。最終的な判定は小核誘発能の強さ、および骨髄増殖抑制の程度等の結果を考慮に入れて総合的に判断した。

## 5. 試験結果および考察

### 5.1 毒性試験結果

毒性試験における死亡率を Appendix 1 に示した。2 回目投与 24 時間後までに 10000 mg/kg 群の動物に死亡例が確認された。

個体別一般状態を Appendix 3 に示した。2500 mg/kg 群で異常は認められなかった。しかし、5000 mg/kg 群で立毛および自発運動低下、10000 mg/kg 群で立毛、自発運動低下、身震い、体温低下、自発運動消失、腹部膨満が認められた。

以上の結果より、ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液の 2 回連続投与に対する最大耐量は 5000 mg/kg であった。したがって、小核試験の最高用量は 5000 mg/kg に設定した。

### 5.2. 小核試験結果

小核試験の成績と統計学的解析の結果を Table 1 に、個体別成績および投与日の体重を Appendix 2 に示す。また、小核試験における死亡率を Appendix 1 に示し、個体別一般状態を Appendix 4 に示す。

#### 5.2.1. 死亡率および一般状態

ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液のすべての用量群において、試験期間中に死亡した動物は認められなかった。一般状態の観察においては 1250 および 2500 mg/kg 群で異常な症状は認められなかった。しかし、5000 mg/kg 群に立毛が認められた。

#### 5.2.2. 小核出現頻度

2 回目投与 24 時間後、陰性対照群における小核出現頻度が 0.25% であったのに対して、被験物質投与群の小核出現頻度は 0.12~0.24% であり、いずれの用量群においても陰性対照群と比べて有意な増加は認められなかった。

一方、MMC を投与した陽性対照群の小核出現頻度は 2.15% であり、明らかな増加が認められた。

#### 5.2.3 多染性赤血球の割合

2 回目投与 24 時間後、陰性対照群における多染性赤血球の割合が 52.6% であったのに対して、被験物質投与群の多染性赤血球の割合は 49.0~50.3% であり、いずれの用量群においても陰性対照群と比べて有意な減少は認められなかった。

一方、陽性対照群の多染性赤血球の割合は 51.5% であり、陰性対照群に対して減少が認められたが、統計学的に有意ではなかった。

## 6. 試験の有効性

小核試験の陰性対照群における小核出現頻度は 0.3% 以下であった。一方、陽性対照群に



おける小核出現頻度は2.0%以上であった。よって、本小核試験は試験の有効性の基準を満足しているものと判断された。参考資料として、当研究所における対照群の背景値をAppendix 5に示す。

## 7. 結論

以上の結果より、ICR系(Crlj:CD1)マウスを用いた本実験条件下において、ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液の小核誘発性は陰性であると結論した。

## 8. 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

被験物質保管庫の温度が許容値上限(10°C)を0.1°C上回る日(20秒未満)が1日認められたが、逸脱程度は軽微なものであったため、試験に影響はなかつたと判断された。その他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、予期しえなかつた事態等)は認められなかつた。

## 9. 参考文献

- 1) Hayashi, M., R. R. Tice, J. T. MacGregor, D. Anderson, D. H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F. B. Oleson Jr., F. Pacchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou and B. Vannier (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Res.*, 312; 293~304.
- 2) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis, in: A. Hollaender (Ed.) *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, vol. 4, Plenum. New York, pp. 31~54.
- 3) Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation Res.*, 9; 527~549.

Table 1 Summary of results - micronucleus test

| Sampling time (hr) | Substance                           | Dose (mg/kg) | No. of mice | MNPCE / PCE (%)                 |                 | PCE / (PCE+NCE) (%)            |                |
|--------------------|-------------------------------------|--------------|-------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------|
|                    |                                     |              |             | Mean $\pm$ SD (range)           | S <sup>KC</sup> | Mean $\pm$ SD (range)          | S <sup>W</sup> |
| 24 <sup>a)</sup>   | Vehicle (Pure water)                | 0 x 2        | 5           | 0.25 $\pm$ 0.06 ( 0.15 ~ 0.30 ) | —               | 52.6 $\pm$ 6.1 ( 43.6 ~ 59.4 ) | —              |
|                    |                                     | 1250 x 2     | 5           | 0.18 $\pm$ 0.15 ( 0.00 ~ 0.35 ) | N.S.            | 50.3 $\pm$ 9.8 ( 36.1 ~ 63.6 ) | N.S.           |
|                    | Wood vinegar (beitsuga/sugi/hinoki) | 2500 x 2     | 5           | 0.12 $\pm$ 0.06 ( 0.05 ~ 0.20 ) | N.S.            | 50.2 $\pm$ 6.2 ( 39.6 ~ 55.5 ) | N.S.           |
|                    |                                     | 5000 x 2     | 5           | 0.24 $\pm$ 0.09 ( 0.15 ~ 0.35 ) | N.S.            | 49.0 $\pm$ 9.7 ( 34.1 ~ 60.4 ) | N.S.           |
|                    | Mitomycin C                         | 10 x 1       | 5           | 2.15 $\pm$ 0.79 ( 1.25 ~ 3.30 ) | ***             | 51.5 $\pm$ 5.5 ( 47.5 ~ 60.7 ) | N.S.           |

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

SD : Standard deviation.

S<sup>KC</sup> : Statistical analysis using the tables of Kastenbaum-Bowman or a chi-square test.

S<sup>W</sup> : Statistical analysis using Wilcoxon's sum of ranks test.

N.S. : Not significantly different from the concurrent vehicle control ( $p > 0.05$ ).

\*\*\* : Significantly different from the concurrent vehicle control at  $p \leq 0.001$ .

a) : 24 hours after the final administration.

## Appendix 1 Mortality in toxicity and micronucleus tests

| Test              | Substance                                  | Dose<br>(mg/kg) | Mortality |
|-------------------|--|-----------------|-----------|
| Toxicity test     | Wood vinegar<br>(beitsuga/sugi/<br>hinoki) | 2500 x 2        | 0 / 3     |
|                   |  | 5000 x 2        | 0 / 3     |
|                   |  | 10000 x 2       | 1 / 3     |
| Micronucleus test | Vehicle                                    | 0 x 2           | 0 / 5     |
|                   | Wood vinegar<br>(beitsuga/sugi/<br>hinoki) | 1250 x 2        | 0 / 5     |
|                   |  | 2500 x 2        | 0 / 5     |
|                   |  | 5000 x 2        | 0 / 5     |
| Mitomycin C       | 10 x 1                                     | 0 / 5           |           |

Mortality : Number of death / Number of animals dosed.

Vehicle : Pure water.

## Appendix 2 Individual values of micronucleus test

| Sampling time (hr) | Substance                                  | Dose (mg/kg) | Animal number | B.W. (g) | MNPCE/PCE (%) | PCE/(PCE+NCE) (%) |
|--------------------|--|--------------|---------------|----------|---------------|-------------------|
| 24 <sup>a)</sup>   | Vehicle<br>(Pure water)                    | 0 x 2        | 111           | 31.0     | 0.25          | 43.6              |
|                    |  |              | 112           | 33.6     | 0.25          | 56.5              |
|                    |  |              | 113           | 33.9     | 0.15          | 59.4              |
|                    |  |              | 114           | 36.0     | 0.30          | 52.7              |
|                    |  |              | 115           | 34.4     | 0.30          | 50.6              |
|                    | Wood vinegar<br>(beitsuga/sugi/<br>hinoki) | 1250 x 2     | 116           | 32.9     | 0.00          | 63.6              |
|                    |  |              | 117           | 31.9     | 0.35          | 36.1              |
|                    |  |              | 118           | 34.0     | 0.05          | 51.4              |
|                    |  |              | 119           | 32.8     | 0.30          | 51.4              |
|                    |  |              | 120           | 34.7     | 0.20          | 49.2              |
|                    |  | 2500 x 2     | 121           | 34.2     | 0.05          | 51.8              |
|                    |  |              | 122           | 36.6     | 0.15          | 39.6              |
|                    |  |              | 123           | 35.5     | 0.10          | 55.5              |
|                    |  |              | 124           | 32.6     | 0.10          | 50.4              |
|                    |  |              | 125           | 35.1     | 0.20          | 53.5              |
|                    | 5000 x 2                                   | 126          | 32.2          | 0.15     | 60.4          |                   |
|                    |  | 127          | 33.4          | 0.30     | 34.1          |                   |
|                    |  | 128          | 33.4          | 0.15     | 52.8          |                   |
|                    |  | 129          | 34.4          | 0.25     | 51.5          |                   |
|                    |  | 130          | 35.1          | 0.35     | 46.3          |                   |
| Mitomycin C        | 10 x 1                                     | 131          | 34.2          | 3.30     | 52.0          |                   |
|                    |  | 132          | 30.6          | 1.25     | 47.5          |                   |
|                    |  | 133          | 30.3          | 2.55     | 47.7          |                   |
|                    |  | 134          | 34.1          | 1.90     | 60.7          |                   |
|                    |  | 135          | 31.8          | 1.75     | 49.4          |                   |

B.W. : Body weight on the day of the first administration.

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

<sup>a)</sup> : 24 hours after the final administration.

## Appendix 3 Individual clinical observation in toxicity test

| Test          | Substance                                  | Dose<br>(mg/kg) | Animal<br>number | Time after the administration |   |     |         |          |
|---------------|--|-----------------|------------------|-------------------------------|---|-----|---------|----------|
|               |  |                 |                  | 1                             | 3 | 5   | 24      | 48 (hr)  |
| Toxicity test | Wood vinegar<br>(beitsuga/sugi/<br>hinoki) | 2500 x 2        | 11               | —                             | — | —   | —       | —        |
|               |  |                 | 12               | —                             | — | —   | —       | —        |
|               |  |                 | 13               | —                             | — | —   | —       | —        |
|               |  | 5000 x 2        | 14               | —                             | — | —   | —       | D,P      |
|               |  |                 | 15               | —                             | P | —   | —       | —        |
|               |  |                 | 16               | —                             | — | —   | —       | —        |
|               |  | 10000 x 2       | 17               | —                             | P | D,P | D,H,P,S | Fd       |
|               |  |                 | 18               | —                             | P | —   | —       | A,Lo,H,P |
|               |  |                 | 19               | —                             | P | P   | —       | A        |

— : No abnormalities detected.

A : Abdominal distention.

Fd : Found dead.

Lo : Loss of spontaneous motor activity.

D : Decrease in spontaneous motor activity.

H : Hypothermia.

P : Piloerection.

S : Shivering.

## Appendix 4 Individual clinical observation in micronucleus test

| Test                 | Substance                                  | Dose<br>(mg/kg) | Animal<br>number | Time after the first administration |   |   |    |         |
|----------------------|--|-----------------|------------------|-------------------------------------|---|---|----|---------|
|                      |  |                 |                  | 1                                   | 3 | 5 | 24 | 48 (hr) |
| Micronucleus<br>test | Vehicle<br>(Pure water)                    | 0 x 2           | 111              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 112              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 113              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 114              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 115              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      | Wood vinegar<br>(beitsuga/sugi/<br>hinoki) | 1250 x 2        | 116              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 117              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 118              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 119              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 120              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  | 2500 x 2        | 121              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 122              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 123              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 124              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      |  |                 | 125              | —                                   | — | — | —  | —E      |
|                      | 5000 x 2                                   | 126             | —                | —                                   | — | — | —E |         |
|                      |  | 127             | —                | —                                   | — | — | —E |         |
|                      |  | 128             | —                | —                                   | — | — | —E |         |
|                      |  | 129             | P                | —                                   | — | — | —E |         |
|                      |  | 130             | P                | P                                   | — | — | —E |         |
| Mitomycin C          | 10 x 1                                     | 131             | —                | —                                   | — | — | —E |         |
|                      |  | 132             | —                | —                                   | — | — | —E |         |
|                      |  | 133             | —                | —                                   | — | — | —E |         |
|                      |  | 134             | —                | —                                   | — | — | —E |         |
|                      |  | 135             | —                | —                                   | — | — | —E |         |

— : No abnormalities detected.

E : Euthanatized for sampling.

P : Piloerection.

## Appendix 5 Laboratory historical control data in micronucleus tests

| Group                          | No. of mice | MNPCE / PCE (%) <sup>a)</sup> | PCE / (PCE+NCE) (%) <sup>a)</sup> |
|--------------------------------|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Negative control <sup>b)</sup> | 483         | 0.17 ± 0.10                   | 55.1 ± 5.9                        |
| Positive control <sup>c)</sup> | 336         | 4.49 ± 2.36                   | 49.5 ± 8.4                        |

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

Data accumulation period : 1998.12 - 2006.12

a) Mean ± SD

b) Solvent or vehicle control

c) Mitomycin C (10 mg/kg)





平成18年度 農林水産省 農薬的資材安全性評価情報整備事業  
(農薬的資材安全性確認試験)

スギ木酢液：マウスを用いる小核試験

(試験番号 IET 06-0118)

最終報告書

試験終了日：2007年3月12日

茨城県常総市内守谷町 4321 番地  
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： 2007年 3月 12日

陳述書

スギ木酢液：マウスを用いる小核試験

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において実施された。

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，試験結果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



2007年3月12日

**試験委託者（代行）**

名称： 財団法人 残留農薬研究所 試験事業部  
所在地： 茨城県常総市内守谷町4321番地（〒303-0043）

**試験施設**

名称： 財団法人 残留農薬研究所  
所在地： 茨城県常総市内守谷町 4321 番地（〒303-0043）  
運営管理者： 理事長 寺本 昭二

**試験指針（テストガイドライン）の適用**

農林水産省，農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針  
（12 農産第 8147 号 2-1-1，2000 年）

**記録等の保管**

当該試験の試験計画書、生データ、塗抹標本、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。保管期間は、塗抹標本や被験物質のサンプルについては5年間、その他の資料については15年間とする。なお、塗抹標本については、それによる試験成績の再評価が妥当性を失うとの理由からこの期間より前に処分する場合は、その理由を付し、文書で記録する。

**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

**動物飼育管理：**

竹澤 祐造

## 目次

|   | 頁  |
|---|----|
| 表紙 -----  | 1  |
| 陳述書 -----   | 2  |
| 試験委託者 -----   | 3  |
| 試験施設 -----  | 3  |
| 試験指針（テストガイドライン）の適用 -----  | 3  |
| 記録等の保管 -----  | 4  |
| 試験従事者 -----   | 4  |
| 目次 -----  | 5  |
| 1. 要約 -----   | 7  |
| 2. 試験目的 -----   | 8  |
| 3. 被験物質 -----   | 8  |
| 4. 試験材料および方法 -----  | 8  |
| 4.1. 供試動物 -----   | 8  |
| 4.2. 動物飼育管理 -----   | 9  |
| 4.3. 投与液の調製 -----   | 10 |
| 4.4. 投与方法および投与回数 -----  | 10 |
| 4.5. 毒性試験 -----   | 10 |
| 4.6. 小核試験 -----   | 10 |
| 4.7. 小核の観察 -----  | 11 |
| 4.8. 統計学的解析 -----   | 12 |
| 4.9. 試験の有効性 -----   | 12 |
| 4.10. 結果の判定 -----   | 13 |
| 5. 試験結果および考察 -----  | 14 |
| 5.1. 毒性試験結果 -----   | 14 |
| 5.2. 小核試験結果 -----   | 14 |
| 6. 試験の有効性 -----   | 14 |
| 7. 結論 -----   | 15 |
| 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<br>事態および試験計画書に従わなかったこと ----- | 15 |
| 9. 参考文献 -----   | 15 |

目次 (続き)

|   | 頁  |
|---|----|
| TABLES  |    |
| 1. Summary of results – micronucleus test -----                   | 16 |
| APPENDICES  |    |
| 1. Mortality in toxicity and micronucleus tests -----             | 17 |
| 2. Individual values of micronucleus test -----                   | 18 |
| 3. Individual clinical observation in toxicity test -----         | 19 |
| 4. Individual clinical observation in micronucleus test -----     | 20 |
| 5. Laboratory historical control data in micronucleus tests ----- | 21 |

## 1. 要約

雄の ICR 系 (CrIj:CD1) マウスを用い、骨髓細胞におけるスギ木酢液の小核試験を実施した。被験物質投与群は 2500, 5000, および 10000 mg/kg の 3 用量を設定し、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回の強制経口投与を行った。陰性対照群には被験物質投与液の調製に用いた純水を 2 回強制経口投与し、陽性対照群にはマイトマイシン C を 10 mg/kg で 1 回強制経口投与した。1 用量群あたり 5 匹の動物に投与し、最終投与 24 時間後にすべての動物から骨髓塗抹標本作製した。

標本観察の結果、スギ木酢液のいずれの用量群でも陰性対照群と比べて小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に明らかな増加が認められた。

以上の結果より、本実験条件下では、ICR 系 (CrIj:CD1) マウスの骨髓細胞において、スギ木酢液の小核誘発性は陰性であると結論した。

## 2. 試験目的

スギ木酢液のマウス骨髄細胞における小核誘発性の有無を検索した。

## 3. 被験物質

試験委託者により提供された被験物質に関する情報を次に示す。

名称： スギ木酢液  
ロット番号： W15082  
性状： 液体  
保管条件： 財団法人残留農薬研究所第 3 実験棟被験物質保管庫，保管庫番号  
REF-3-M5，冷蔵暗所（実測温度範囲：1.7～7.1℃）

## 4. 試験材料および方法<sup>1), 2)</sup>

### 4.1. 供試動物

#### 4.1.1. 動物種および選定理由

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県）で生産された ICR 系 SPF マウス（Crj:CD1）を用いた。マウスは小核試験に汎用されている動物種であり，当研究所は本系統について豊富な背景データを蓄積している。

#### 4.1.2. 性

雄の動物を用いた。

#### 4.1.3. 入荷時の週齢，購入数，および体重範囲

毒性試験用の購入動物数は 31 匹（IET 06-0117 と 06-0119 の試験と併せて購入）とした。小核試験用の購入動物数も 31 匹とした。生産者による出荷時の体重の範囲は，28～34 g であった。

#### 4.1.4. 検疫・馴化期間

入荷後 7 日間の検疫・馴化期間をおいた。入荷時および馴化終了時に触診を含む観察を行った。また，検疫・馴化期間中，ケージサイドから 1 日 1 回（週末および祝日を除く）動物の一般状態を観察した。

#### 4.1.5. 投与時の週齢および体重

7 週齢で試験に供した。毒性試験および小核試験において試験に供したマウスの投与日投与初日における平均体重（最小値～最大値）は以下に示す通りであった。毒性試験の余剰動物は 4 匹（ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液，スギ木酢液および蒸留木酢液の 3 検体で使



用する予定だった動物)であり、投与終了後試験系より除外した後に安楽死させた。また、小核試験の余剰動物は6匹であり、投与終了後試験系より除外した後に安楽死させた。

#### 供試動物の体重

| 試験   | 性 | 動物数<br>(匹) | 体重 (g)           |
|------|---|------------|------------------|
|      |   |            | 平均値 (最小値～最大値)    |
| 毒性試験 | 雄 | 9          | 34.3 (31.8～35.9) |
| 小核試験 | 雄 | 25         | 35.0 (31.4～37.9) |

## 4.2. 動物飼育管理

### 4.2.1. 飼育環境

温度  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエア方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室 (動物室 115) で動物を飼育した。飼育期間中の動物飼育室の実測温湿度は、 $21.1 \sim 23.1^{\circ}\text{C}$  および  $51.5 \sim 62.1\%$  の範囲であった。

### 4.2.2. ラックおよび飼育ケージ

動物は、金網床付アルミニウム製ケージ (215 W × 330 D × 180 H mm) に 5 匹以内で収容した。各ケージはステンレス鋼製可動ラックに収容した。用いるラックには被験物質名および試験番号を記入したテープを貼り、各ケージにはケージ番号、被験物質名、試験番号、用量、性別、試験の種類、解剖日、動物番号、および個体識別を記した標識を付けた。

### 4.2.3. 動物の群分けおよび個体識別

入荷時に動物を無作為に各ケージに分配することで群分けを行った。投与初日に各動物の体重が平均体重の  $\pm 20\%$  を超えていないことを確認した。

ケージ内での各個体の識別は、ピクリン酸飽和 70% エタノール溶液を用いて被毛の一部を染色することで行った。

### 4.2.4. 飼料

保証飼料である MF 固型 (Lot No. 060907A4, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京都) を、ステンレス鋼製バスケット型給餌器により自由に摂取させた。飼料中の汚染物質の分析結果を確認したところ、残留農薬研究所が定めた許容基準値以下または範囲内であった。

#### 4.2.5. 飲水

市上水（茨城県常総市）をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。飲水中の汚染物質の分析結果を確認したところ、残留農薬研究所が定めた許容基準値以下であった。

#### 4.3. 投与液の調製

##### 4.3.1. 被験物質投与液の調製

被験物質は水に自由に混和するため、純水（Simpli Lab, 日本ミリポア・リミテッドを用いて製造）を溶媒として用いた。被験物質溶液は原液を最高濃度として、段階希釈により低濃度の被験物質溶液を調製した。被験物質溶液は投与日ごとに調製し、残余はそのつど廃棄した。

##### 4.3.2. 陽性対照物質投与液の調製

陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC) を用いた。マイトマイシン注用 2 mg (2 mg (力価) MMC/瓶, Lot No. 480AEL, 協和醗酵工業株式会社, 東京都) に純水を 2 mL/瓶加えて溶解させ、1 mg/mL の MMC 溶液を投与直前に調製した。

#### 4.4. 投与方法および投与回数

被験物質投与群のすべての動物に対し、胃ゾンデを用いて 10 mL/kg の容量で 1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回の強制経口投与を行った。この投与方法は、マウス小核試験で通常用いられている方法である。個々の動物に対する投与容量は、被験物質投与開始日の体重から算出した。なお、投与前後それぞれ約 3 時間の絶食を行なった。

#### 4.5. 毒性試験

供試動物の被験物質 2 回連続投与に対する最大耐量を求めるため毒性試験を行なった。用量は 2500, 5000, および 10000 mg/kg の 3 用量を設定した。最高用量の 10000 mg/kg は被験物質を原液のまま 10 mL/kg の容量で投与することを意味した。用量あたり 3 匹の動物に投与し、2 回投与後 24 時間までの一般状態を観察した。

#### 4.6. 小核試験

小核試験は 2 回投与・1 回標本作製による方法を用いた。本法は連続投与小核試験で通常行われる方法の 1 つである。

##### 4.6.1. 用量

被験物質の投与用量は 2500, 5000, 10000 mg/kg (公比 2) の 3 用量を設定した。

#### 4.6.2. 供試動物数

1用量群あたり5匹の動物を用いた。

#### 4.6.3. 対照群

陽性対照群および陰性(媒体)対照群を設定した。陽性対照群にはMMC溶液を10 mg/kgの用量で1回強制経口投与した(投与容量10 mL/kg)。陰性対照群には10 mL/kgの容量で純水を1日1回、24時間間隔で2回強制経口投与した。

#### 4.6.4. 標本作製時期および供試動物数

以下に各用量群における骨髓塗抹標本の作製時期と供試動物数を示す。

| 用量群                | 標本作製時期および供試動物数 |   |
|--------------------|----------------|---|
|                    | 最終投与後24時間      |   |
| 陰性対照(純水)           |                | 5 |
| 2500 mg/kg         |                | 5 |
| 5000 mg/kg         |                | 5 |
| 10000 mg/kg        |                | 5 |
| 陽性対照(MMC 10 mg/kg) |                | 5 |

#### 4.6.5. 一般状態の観察

1回目投与後1, 3, 5, 24および48時間に一般状態を観察した。

#### 4.6.6. 体重測定

被験物質投与開始日および骨髓細胞採取日に、個体別の体重を測定した。

#### 4.7. 小核の観察

##### 4.7.1. 塗抹標本の作製

頸椎脱臼で動物を安楽死させ、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し、余分の血清を棄てた。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させた。骨髓細胞浮遊液の小滴をピペットでスライドグラスに取り、カバーグラスを用いて細胞を均等に塗抹した。各動物あたり2枚の塗抹標本を作製し、標本には暗号化したコード番号を記載した。骨髓細胞を十分乾燥させた後、標本はメタノールで5分間固定し、3%ギムザ液(メルク社製ギムザ溶液をpH 6.8リン酸緩衝液で希釈)で30分間、室温で染色した。

##### 4.7.2. 塗抹標本の観察

1動物につき1枚の塗抹標本について、光学顕微鏡下1000倍にて赤血球の観察を行っ

た（残りの1枚は予備標本とした）。観察方法は Schmid の方法<sup>2)</sup>に従い、小核を有する多染性赤血球の出現頻度（小核出現頻度）と骨髓増殖抑制の指標である多染性赤血球の割合を調べた。小核出現頻度は多染性赤血球を2000個観察し、下記の計算式に従って求めた。多染性赤血球の割合については、多染性赤血球と正染性赤血球をあわせて1000個観察し、下記の計算式に従って求めた。

$$\text{小核出現頻度 (\%)} = \frac{\text{MNPCE}}{\text{PCE}} \times 100$$

$$\text{多染性赤血球の割合 (\%)} = \frac{\text{PCE}}{\text{PCE} + \text{NCE}} \times 100$$

MNPCE：小核を有する多染性赤血球数

PCE：多染性赤血球数

NCE：正染性赤血球数

#### 4.7.3. 小核の判定基準および多染性赤血球の識別基準

ギムザ染色による小核の判定は、1) 赤血球中に存在している核、2) 大きさが成熟赤血球の直径 1/2 以下、および 3) 近接する白血球の核と同じ染色性をしていることを基準とした。また、ギムザ染色による多染性赤血球と正染性赤血球の識別方法としては、多染性赤血球は青から紫がかった色であるのに対して、正染性赤血球は少し濁った赤色をしているため、視野の中で明らかに赤味を帯びていると判断される赤血球を正染性赤血球とみなし、その他をすべて多染性赤血球として観察した。

#### 4.8. 統計学的解析

小核出現頻度についての統計学的解析には Kastenbaum-Bowman<sup>9)</sup> の数表（被験物質投与群）およびカイ二乗検定（陽性対照群）を用いた。多染性赤血球の割合についての統計学的解析には Wilcoxon の順位和検定を行った。いずれの検定法も有意水準を5%以下に設定した。

#### 4.9. 試験の有効性

被験物質の小核誘発性の判定を行う前に、試験の有効性の確認を行った。試験が以下の基準に合致していれば、その試験を有効とした。

- ① 陰性対照群の小核出現頻度の平均値が0.3%以下であること。
- ② 陽性対照群の小核出現頻度の平均値が2.0%以上であること。

#### 4.10. 結果の判定

少なくとも1つの被験物質投与群で小核出現頻度が有意に増加し、さらに、傾向検定により用量相関性が認められれば陽性と判定した。一方、いずれの被験物質投与群においても小核出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。最終的な判定は小核誘発能の強さ、および骨髄増殖抑制の程度等の結果を考慮に入れて総合的に判断した。

## 5. 試験結果および考察

### 5.1 毒性試験結果

毒性試験における死亡率を Appendix 1 に示した。試験期間中に死亡した動物は認められなかった。

個体別一般状態を Appendix 3 に示した。2500 および 5000 mg/kg 群で異常は認められなかった。しかし、10000 mg/kg 群で立毛が認められた。

以上の結果より、スギ木酢液の 2 回連続投与に対する最大耐量は 10000 mg/kg 以上と考えられた。したがって、小核試験の最高用量は 10000 mg/kg に設定した。

### 5.2. 小核試験結果

小核試験の成績と統計学的解析の結果を Table 1 に、個体別成績および投与日の体重を Appendix 2 に示す。また、小核試験における死亡率を Appendix 1 に示し、個体別一般状態を Appendix 4 に示す。

#### 5.2.1. 死亡率および一般状態

スギ木酢液のすべての用量群において、試験期間中に死亡した動物は認められなかった。一般状態の観察においては 2500 mg/kg 群で異常な症状は認められなかった。しかし、5000 および 10000 mg/kg 群に立毛が認められた。

#### 5.2.2. 小核出現頻度

2 回目投与 24 時間後、陰性対照群における小核出現頻度が 0.20%であったのに対して、被験物質投与群の小核出現頻度は 0.16~0.26%であり、いずれの用量群においても陰性対照群と比べて有意な増加は認められなかった。

一方、MMC を投与した陽性対照群の小核出現頻度は 4.35%であり、明らかな増加が認められた。

#### 5.2.3 多染性赤血球の割合

2 回目投与 24 時間後、陰性対照群における多染性赤血球の割合が 52.2%であったのに対して、被験物質投与群の多染性赤血球の割合は 51.4~56.3%であり、いずれの用量群においても陰性対照群と比べて有意な減少は認められなかった。

一方、陽性対照群の多染性赤血球の割合は 44.1%であり、陰性対照群に対して減少が認められたが、統計学的に有意ではなかった。

## 6. 試験の有効性

小核試験の陰性対照群における小核出現頻度は 0.3%以下であった。一方、陽性対照群における小核出現頻度は 2.0%以上であった。よって、本小核試験は試験の有効性の基準を満

足しているものと判断された。参考資料として、当研究所における対照群の背景値を Appendix 5 に示す。

## 7. 結論

以上の結果より、ICR 系 (Crj:CD1) マウスを用いた本実験条件下において、スギ木酢液の小核誘発性は陰性であると結論した。

## 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および試験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。

## 9. 参考文献

- 1) Hayashi, M., R. R. Tice, J. T. MacGregor, D. Anderson, D. H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F. B. Oleson Jr., F. Pacchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou and B. Vannier (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Res.*, 312: 293~304.
- 2) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis, in: A. Hollaender (Ed.) *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, vol. 4, Plenum. New York, pp. 31~54.
- 3) Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation Res.*, 9: 527~549.

Table 1 Summary of results - micronucleus test

| Sampling time (hr) | Substance               | Dose (mg/kg) | No. of mice | MNPCE / PCE (%)                 |                 | PCE / (PCE+NCE) (%)            |                |
|--------------------|-------------------------|--------------|-------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------|
|                    |                         |              |             | Mean $\pm$ SD (range)           | S <sup>KC</sup> | Mean $\pm$ SD (range)          | S <sup>W</sup> |
| 24 <sup>a)</sup>   | Vehicle<br>(Pure water) | 0 x 2        | 5           | 0.20 $\pm$ 0.11 ( 0.05 ~ 0.35 ) | —               | 52.2 $\pm$ 9.4 ( 42.0 ~ 60.9 ) | —              |
|                    |                         | 2500 x 2     | 5           | 0.16 $\pm$ 0.04 ( 0.10 ~ 0.20 ) | N.S.            | 52.4 $\pm$ 8.1 ( 42.3 ~ 62.6 ) | N.S.           |
|                    | Wood vinegar (sugi)     | 5000 x 2     | 5           | 0.22 $\pm$ 0.04 ( 0.15 ~ 0.25 ) | N.S.            | 51.4 $\pm$ 6.8 ( 41.7 ~ 57.4 ) | N.S.           |
|                    |                         | 10000 x 2    | 5           | 0.26 $\pm$ 0.08 ( 0.15 ~ 0.35 ) | N.S.            | 56.3 $\pm$ 4.6 ( 50.0 ~ 61.7 ) | N.S.           |
|                    | Mitomycin C             | 10 x 1       | 5           | 4.35 $\pm$ 1.91 ( 2.55 ~ 7.05 ) | ***             | 44.1 $\pm$ 5.9 ( 37.8 ~ 53.7 ) | N.S.           |

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

SD : Standard deviation.

S<sup>KC</sup> : Statistical analysis using the tables of Kastenbaum-Bowman or a chi-square test.

S<sup>W</sup> : Statistical analysis using Wilcoxon's sum of ranks test.

N.S. : Not significantly different from the concurrent vehicle control ( $p > 0.05$ ).

\*\*\* : Significantly different from the concurrent vehicle control at  $p \leq 0.001$ .

<sup>a)</sup> : 24 hours after the final administration.



## Appendix 1 Mortality in toxicity and micronucleus tests

| Test              | Substance              | Dose<br>(mg/kg) | Mortality |
|-------------------|------------------------|-----------------|-----------|
| Toxicity test     | Wood vinegar<br>(sugi) | 2500 x 2        | 0 / 3     |
|                   |                        | 5000 x 2        | 0 / 3     |
|                   |                        | 10000 x 2       | 0 / 3     |
| Micronucleus test | Vehicle                | 0 x 2           | 0 / 5     |
|                   | Wood vinegar<br>(sugi) | 2500 x 2        | 0 / 5     |
|                   |                        | 5000 x 2        | 0 / 5     |
|                   |                        | 10000 x 2       | 0 / 5     |
| Mitomycin C       | 10 x 1                 | 0 / 5           |           |

Mortality : Number of death / Number of animals dosed.

Vehicle : Pure water.

## Appendix 2 Individual values of micronucleus test

| Sampling time (hr) | Substance               | Dose (mg/kg) | Animal number | B.W. (g) | MNPCE/PCE (%) | PCE/(PCE+NCE) (%) |
|--------------------|-------------------------|--------------|---------------|----------|---------------|-------------------|
| 24 <sup>a)</sup>   | Vehicle<br>(Pure water) | 0 x 2        | 111           | 34.8     | 0.15          | 42.0              |
|                    |                         |              | 112           | 37.4     | 0.05          | 42.0              |
|                    |                         |              | 113           | 34.4     | 0.25          | 57.5              |
|                    |                         |              | 114           | 33.8     | 0.35          | 58.5              |
|                    |                         |              | 115           | 34.9     | 0.20          | 60.9              |
|                    | Wood vinegar<br>(sugi)  | 2500 x 2     | 116           | 32.4     | 0.15          | 46.4              |
|                    |                         |              | 117           | 32.7     | 0.20          | 54.9              |
|                    |                         |              | 118           | 33.8     | 0.15          | 42.3              |
|                    |                         |              | 119           | 35.5     | 0.20          | 55.9              |
|                    |                         |              | 120           | 35.7     | 0.10          | 62.6              |
|                    |                         | 5000 x 2     | 121           | 33.9     | 0.20          | 47.4              |
|                    |                         |              | 122           | 37.2     | 0.15          | 41.7              |
|                    |                         |              | 123           | 35.7     | 0.25          | 53.2              |
|                    |                         |              | 124           | 34.5     | 0.25          | 57.2              |
|                    |                         |              | 125           | 31.4     | 0.25          | 57.4              |
|                    | 10000 x 2               | 126          | 33.7          | 0.20     | 50.0          |                   |
|                    |                         | 127          | 35.0          | 0.35     | 53.8          |                   |
|                    |                         | 128          | 36.6          | 0.15     | 61.7          |                   |
|                    |                         | 129          | 37.4          | 0.30     | 57.1          |                   |
|                    |                         | 130          | 31.6          | 0.30     | 59.1          |                   |
| Mitomycin C        | 10 x 1                  | 131          | 36.0          | 2.55     | 41.7          |                   |
|                    |                         | 132          | 34.6          | 7.05     | 43.5          |                   |
|                    |                         | 133          | 37.9          | 3.75     | 44.0          |                   |
|                    |                         | 134          | 35.5          | 2.85     | 37.8          |                   |
|                    |                         | 135          | 37.7          | 5.55     | 53.7          |                   |

B.W. : Body weight on the day of the first administration.

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

<sup>a)</sup> : 24 hours after the final administration.

## Appendix 3 Individual clinical observation in toxicity test

| Test          | Substance              | Dose<br>(mg/kg) | Animal<br>number | Time after the administration |   |   |    |         |
|---------------|------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|---|---|----|---------|
|               |                        |                 |                  | 1                             | 3 | 5 | 24 | 48 (hr) |
| Toxicity test | Wood vinegar<br>(sugi) | 2500 x 2        | 11               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                        |                 | 12               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                        |                 | 13               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                        | 5000 x 2        | 14               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                        |                 | 15               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                        |                 | 16               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                        | 10000 x 2       | 17               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                        |                 | 18               | —                             | — | — | —  | P       |
|               |                        |                 | 19               | —                             | — | — | —  | —       |

— : No abnormalities detected.

P : Piloerection.

## Appendix 4 Individual clinical observation in micronucleus test

| Test              | Substance            | Dose (mg/kg) | Animal number | Time after the first administration |   |    |     |         |
|-------------------|----------------------|--------------|---------------|-------------------------------------|---|----|-----|---------|
|                   |                      |              |               | 1                                   | 3 | 5  | 24  | 48 (hr) |
| Micronucleus test | Vehicle (Pure water) | 0 x 2        | 111           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 112           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 113           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 114           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 115           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   | Wood vinegar (sugi)  | 2500 x 2     | 116           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 117           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 118           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 119           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 120           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      | 5000 x 2     | 121           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 122           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 123           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 124           | —                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   |                      |              | 125           | P                                   | — | —  | —   | —E      |
|                   | 10000 x 2            | 126          | —             | —                                   | — | —  | P,E |         |
|                   |                      | 127          | P             | —                                   | — | —  | P,E |         |
|                   |                      | 128          | P             | —                                   | — | —  | —E  |         |
|                   |                      | 129          | —             | —                                   | — | —  | —E  |         |
|                   |                      | 130          | —             | —                                   | — | —  | —E  |         |
| Mitomycin C       | 10 x 1               | 131          | —             | —                                   | — | —E |     |         |
|                   |                      | 132          | —             | —                                   | — | —E |     |         |
|                   |                      | 133          | —             | —                                   | — | —E |     |         |
|                   |                      | 134          | —             | —                                   | — | —E |     |         |
|                   |                      | 135          | —             | —                                   | — | —E |     |         |

— : No abnormalities detected.

E : Euthanatized for sampling.

P : Piloerection.

## Appendix 5 Laboratory historical control data in micronucleus tests

| Group                          | No. of mice | MNPCE / PCE (%) <sup>a)</sup> | PCE / (PCE+NCE) (%) <sup>a)</sup> |
|--------------------------------|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Negative control <sup>b)</sup> | 483         | 0.17 ± 0.10                   | 55.1 ± 5.9                        |
| Positive control <sup>c)</sup> | 336         | 4.49 ± 2.36                   | 49.5 ± 8.4                        |

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

Data accumulation period : 1998.12 - 2006.12

a) Mean ± SD

b) Solvent or vehicle control

c) Mitomycin C (10 mg/kg)



最終報告書の修正書

1. 試験名称

蒸留木酢液：マウスを用いる小核試験 (IET 06-0119)

2. 試験委託者 (代行)

名称： 財団法人 残留農薬研究所 試験事業部

所在地： 茨城県常総市内守谷町 4321 番地 (〒303-0043)

3. 試験施設

名称： 財団法人 残留農薬研究所

所在地： 茨城県常総市内守谷町 4321 番地 (〒303-0043)

運営管理者： 理事長 寺本 昭二

4. 修正内容および修正理由

修正箇所： 3. 被験物質 (最終報告書第 8 頁)

1) 修正前の記載

ロット番号： W15082

2) 修正後の記載

ロット番号： 05-010-02

3) 修正理由

記載ミス

5. 修正書の作成

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



2007年4月25日

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： 2007年 4月 25日

## 2. 試験目的

蒸留木酢液のマウス骨髄細胞における小核誘発性の有無を検索した。

## 3. 被験物質

試験委託者により提供された被験物質に関する情報を次に示す。

名称： 蒸留木酢液  
ロット番号： 05-010-02  
性状： 液体  
保管条件： 財団法人残留農薬研究所第 3 実験棟被験物質保管庫，保管庫番号 REF-3-M5，冷蔵暗所（実測温度範囲：1.4～10.1°C）

## 4. 試験材料および方法<sup>1), 2)</sup>

### 4.1. 供試動物

#### 4.1.1. 動物種および選定理由

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県）で生産された ICR 系 SPF マウス（CrIj:CD1）を用いた。マウスは小核試験に汎用されている動物種であり，当研究所は本系統について豊富な背景データを蓄積している。

#### 4.1.2. 性

雄の動物を用いた。

#### 4.1.3. 入荷時の週齢，購入数，および体重範囲

毒性試験用の購入動物数は 31 匹（IET 06-0117 と 06-0118 試験と併せて購入）とした。小核試験用の購入動物数も 31 匹とした。生産者による出荷時の体重の範囲は，27～34 g であった。

#### 4.1.4. 検疫・馴化期間

入荷後 7 日間の検疫・馴化期間をおいた。入荷時および馴化終了時に触診を含む観察を行った。また，検疫・馴化期間中，ケージサイドから 1 日 1 回（週末および祝日を除く）動物の一般状態を観察した。

#### 4.1.5. 投与時の週齢および体重

7 週齢で試験に供した。毒性試験および小核試験において試験に供したマウスの投与日投与初日における平均体重（最小値～最大値）は以下に示す通りであった。毒性試験の余剰動物は 4 匹（ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液，スギ木酢液および蒸留木酢液の 3 検体で使



平成18年度 農林水産省 農薬的資材安全性評価情報整備事業  
(農薬的資材安全性確認試験)

蒸留木酢液：マウスを用いる小核試験

(試験番号 IET 06-0119)

最終報告書

試験終了日：2007年3月12日

茨城県常総市内守谷町 4321 番地  
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： 2007年 3月 12日

陳述書

蒸留木酢液：マウスを用いる小核試験

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において実施された。

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、試験結果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



2007年3月12日

**試験委託者 (代行)**

名称： 財団法人 残留農薬研究所 試験事業部  
所在地： 茨城県常総市内守谷町4321番地 (〒303-0043)

**試験施設**

名称： 財団法人 残留農薬研究所  
所在地： 茨城県常総市内守谷町 4321 番地 (〒303-0043)  
運営管理者： 理事長 寺本 昭二

**試験指針 (テストガイドライン) の適用**

農林水産省，農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針  
(12 農産第 8147 号 2-1-1, 2000 年)

## 記録等の保管

当該試験の試験計画書、生データ、塗抹標本、最終報告書および記録は、財団法人残留農業研究所の資料保管施設で保管する。保管期間は、塗抹標本や被験物質のサンプルについては5年間、その他の資料については15年間とする。なお、塗抹標本については、それによる試験成績の再評価が妥当性を失うとの理由からこの期間より前に処分する場合は、その理由を付し、文書で記録する。

## 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

動物飼育管理： 竹澤 祐造

## 目次

|   | 頁  |
|---|----|
| 表紙 .....  | 1  |
| 陳述書 .....   | 2  |
| 試験委託者 .....   | 3  |
| 試験施設 .....  | 3  |
| 試験指針（テストガイドライン）の適用 .....  | 3  |
| 記録等の保管 .....  | 4  |
| 試験従事者 .....   | 4  |
| 目次 .....  | 5  |
| 1. 要約 .....   | 7  |
| 2. 試験目的 .....   | 8  |
| 3. 被験物質 .....   | 8  |
| 4. 試験材料および方法 .....  | 8  |
| 4.1. 供試動物 .....   | 8  |
| 4.2. 動物飼育管理 .....   | 9  |
| 4.3. 投与液の調製 .....   | 10 |
| 4.4. 投与方法および投与回数 .....  | 10 |
| 4.5. 毒性試験 .....   | 10 |
| 4.6. 小核試験 .....   | 10 |
| 4.7. 小核の観察 .....  | 11 |
| 4.8. 統計学的解析 .....   | 12 |
| 4.9. 試験の有効性 .....   | 12 |
| 4.10. 結果の判定 .....   | 13 |
| 5. 試験結果および考察 .....  | 14 |
| 5.1. 毒性試験結果 .....   | 14 |
| 5.2. 小核試験結果 .....   | 14 |
| 6. 試験の有効性 .....   | 14 |
| 7. 結論 .....   | 15 |
| 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<br>事態および試験計画書に従わなかったこと ..... | 15 |
| 9. 参考文献 .....   | 15 |

## 目次 (続き)

|   | 頁  |
|---|----|
| TABLES  |    |
| 1. Summary of results – micronucleus test -----                   | 16 |
| APPENDICES  |    |
| 1. Mortality in toxicity and micronucleus tests -----             | 17 |
| 2. Individual values of micronucleus test -----                   | 18 |
| 3. Individual clinical observation in toxicity test -----         | 19 |
| 4. Individual clinical observation in micronucleus test -----     | 20 |
| 5. Laboratory historical control data in micronucleus tests ----- | 21 |

## 1. 要約

雄の ICR 系 (CrIj:CD1) マウスを用い、骨髓細胞における蒸留木酢液の小核試験を実施した。被験物質投与群は 2500, 5000, および 10000 mg/kg の 3 用量を設定し、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回の強制経口投与を行った。陰性対照群には被験物質投与液の調製に用いた純水を 2 回強制経口投与し、陽性対照群にはマイトマイシン C を 10 mg/kg で 1 回強制経口投与した。1 用量群あたり 5 匹の動物に投与し、最終投与 24 時間後にすべての動物から骨髓塗抹標本を作製した。

標本観察の結果、蒸留木酢液のいずれの用量群でも陰性対照群と比べて小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に明らかな増加が認められた。

以上の結果より、本実験条件下では、ICR 系 (CrIj:CD1) マウスの骨髓細胞において、蒸留木酢液の小核誘発性は陰性であると結論した。

## 2. 試験目的

蒸留木酢液のマウス骨髄細胞における小核誘発性の有無を検索した。

## 3. 被験物質

試験委託者により提供された被験物質に関する情報を次に示す。

名称： 蒸留木酢液  
ロット番号： W15082  
性状： 液体  
保管条件： 財団法人残留農薬研究所第 3 実験棟被験物質保管庫，保管庫番号  
REF-3-M5，冷蔵暗所（実測温度範囲：1.4～10.1°C）

## 4. 試験材料および方法<sup>1), 2)</sup>

### 4.1. 供試動物

#### 4.1.1. 動物種および選定理由

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県）で生産された ICR 系 SPF マウス（CrIj:CD1）を用いた。マウスは小核試験に汎用されている動物種であり，当研究所は本系統について豊富な背景データを蓄積している。

#### 4.1.2. 性

雄の動物を用いた。

#### 4.1.3. 入荷時の週齢，購入数，および体重範囲

毒性試験用の購入動物数は 31 匹（IET 06-0117 と 06-0118 試験と併せて購入）とした。小核試験用の購入動物数も 31 匹とした。生産者による出荷時の体重の範囲は，27～34 g であった。

#### 4.1.4. 検疫・馴化期間

入荷後 7 日間の検疫・馴化期間をおいた。入荷時および馴化終了時に触診を含む観察を行った。また，検疫・馴化期間中，ケージサイドから 1 日 1 回（週末および祝日を除く）動物の一般状態を観察した。

#### 4.1.5. 投与時の週齢および体重

7 週齢で試験に供した。毒性試験および小核試験において試験に供したマウスの投与日投与初日における平均体重（最小値～最大値）は以下に示す通りであった。毒性試験の余剰動物は 4 匹（ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液，スギ木酢液および蒸留木酢液の 3 検体で使



用する予定だった動物)であり、投与終了後試験系より除外した後に安楽死させた。また、小核試験の余剰動物は6匹であり、投与終了後試験系より除外した後に安楽死させた。

#### 供試動物の体重

| 試験   | 性 | 動物数<br>(匹) | 体重 (g)<br>平均値 (最小値～最大値) |
|------|---|------------|-------------------------|
| 毒性試験 | 雄 | 9          | 35.7 (33.1～37.1)        |
| 小核試験 | 雄 | 25         | 33.4 (29.8～36.7)        |

## 4.2. 動物飼育管理

### 4.2.1. 飼育環境

温度  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $50 \pm 20\%$ , 換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエアー方式), 照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室 (動物室 115) で動物を飼育した。飼育期間中の動物飼育室の実測温湿度は,  $21.1 \sim 23.1^{\circ}\text{C}$  および  $51.5 \sim 62.1\%$  の範囲であった。

### 4.2.2. ラックおよび飼育ケージ

動物は, 金網床付アルミニウム製ケージ (215 W × 330 D × 180 H mm) に 5 匹以内で収容した。各ケージはステンレス鋼製可動ラックに収容した。用いるラックには被験物質名および試験番号を記入したテープを貼り, 各ケージにはケージ番号, 被験物質名, 試験番号, 用量, 性別, 試験の種類, 解剖日, 動物番号, および個体識別を記した標識を付けた。

### 4.2.3. 動物の群分けおよび個体識別

入荷時に動物を無作為に各ケージに分配することで群分けを行った。投与初日に各動物の体重が平均体重の  $\pm 20\%$  を超えていないことを確認した。

ケージ内での各個体の識別は, ピクリン酸飽和 70% エタノール溶液を用いて被毛の一部を染色することで行った。

### 4.2.4. 飼料

保証飼料である MF 固型 (Lot No. 060907A4, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京都) を, ステンレス鋼製バスケット型給餌器により自由に摂取させた。飼料中の汚染物質の分析結果を確認したところ, 残留農薬研究所が定めた許容基準値以下または範囲内であった。

#### 4.2.5. 飲水

市上水（茨城県常総市）をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。飲水中の汚染物質の分析結果を確認したところ、残留農薬研究所が定めた許容基準値以下であった。

### 4.3. 投与液の調製

#### 4.3.1. 被験物質投与液の調製

被験物質は水に自由に混和するため、純水（Simpli Lab, 日本ミリポア・リミテッドを用いて製造）を溶媒として用いた。被験物質溶液は原液を最高濃度として、段階希釈により低濃度の被験物質溶液を調製した。被験物質溶液は投与日ごとに調製し、残余はそのつど廃棄した。

#### 4.3.2. 陽性対照物質投与液の調製

陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC) を用いた。マイトマイシン注用 2 mg (2 mg (力価) MMC/瓶, Lot No. 480AEL, 協和醗酵工業株式会社, 東京都) に純水を 2 mL/瓶加えて溶解させ、1 mg/mL の MMC 溶液を投与直前に調製した。

### 4.4. 投与方法および投与回数

被験物質投与群のすべての動物に対し、胃ゾンデを用いて 10 mL/kg の容量で 1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回の強制経口投与を行った。この投与方法は、マウス小核試験で通常用いられている方法である。個々の動物に対する投与容量は、被験物質投与開始日の体重から算出した。なお、投与前後それぞれ約 3 時間の絶食を行なった。

### 4.5. 毒性試験

供試動物の被験物質 2 回連続投与に対する最大耐量を求めるため毒性試験を行なった。用量は 2500, 5000, および 10000 mg/kg の 3 用量を設定した。最高用量の 10000 mg/kg は被験物質を原液のまま 10 mL/kg の容量で投与することを意味した。用量あたり 3 匹の動物に投与し、2 回投与後 24 時間までの一般状態を観察した。

### 4.6. 小核試験

小核試験は 2 回投与・1 回標本作製による方法を用いた。本法は連続投与小核試験で通常行われる方法の 1 つである。

#### 4.6.1. 用量

被験物質の投与用量は 2500, 5000, 10000 mg/kg (公比 2) の 3 用量を設定した。

#### 4.6.2. 供試動物数

1 用量群あたり 5 匹の動物を用いた。

#### 4.6.3. 対照群

陽性対照群および陰性(媒体)対照群を設定した。陽性対照群には MMC 溶液を 10 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与した(投与容量 10 mL/kg)。陰性対照群には 10 mL/kg の容量で純水を 1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。

#### 4.6.4. 標本作製時期および供試動物数

以下に各用量群における骨髓塗抹標本の作製時期と供試動物数を示す。

| 用 量 群               | 標本作製時期および供試動物数 |  |
|---------------------|----------------|--|
|                     | 最終投与後 24 時間    |  |
| 陰性対照 (純水)           | 5              |  |
| 2500 mg/kg          | 5              |  |
| 5000 mg/kg          | 5              |  |
| 10000 mg/kg         | 5              |  |
| 陽性対照 (MMC 10 mg/kg) | 5              |  |

#### 4.6.5. 一般状態の観察

1 回目投与後 1, 3, 5, 24 および 48 時間に一般状態を観察した。

#### 4.6.6. 体重測定

被験物質投与開始日および骨髓細胞採取日に、個体別の体重を測定した。

### 4.7. 小核の観察

#### 4.7.1. 塗抹標本の作製

頸椎脱臼で動物を安楽死させ、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し、余分の血清を棄てた。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させた。骨髓細胞浮遊液の小滴をピペットでスライドグラスに取り、カバーグラスを用いて細胞を均等に塗抹した。各動物あたり 2 枚の塗抹標本を作製し、標本には暗号化したコード番号を記載した。骨髓細胞を十分乾燥させた後、標本はメタノールで 5 分間固定し、3%ギムザ液(メルク社製ギムザ溶液を pH 6.8 リン酸緩衝液で希釈)で 30 分間、室温で染色した。

#### 4.7.2. 塗抹標本の観察

1 動物につき 1 枚の塗抹標本について、光学顕微鏡下 1000 倍にて赤血球の観察を行っ

た（残りの1枚は予備標本とした）。観察方法は Schmid の方法<sup>2)</sup>に従い、小核を有する多染性赤血球の出現頻度（小核出現頻度）と骨髄増殖抑制の指標である多染性赤血球の割合を調べた。小核出現頻度は多染性赤血球を2000個観察し、下記の計算式に従って求めた。多染性赤血球の割合については、多染性赤血球と正染性赤血球をあわせて1000個観察し、下記の計算式に従って求めた。

$$\text{小核出現頻度 (\%)} = \frac{\text{MNPCE}}{\text{PCE}} \times 100$$

$$\text{多染性赤血球の割合 (\%)} = \frac{\text{PCE}}{\text{PCE} + \text{NCE}} \times 100$$

MNPCE：小核を有する多染性赤血球数

PCE：多染性赤血球数

NCE：正染性赤血球数

#### 4.7.3. 小核の判定基準および多染性赤血球の識別基準

ギムザ染色による小核の判定は、1) 赤血球中に存在している核、2) 大きさが成熟赤血球の直径 1/2 以下、および 3) 近接する白血球の核と同じ染色性をしていることを基準とした。また、ギムザ染色による多染性赤血球と正染性赤血球の識別方法としては、多染性赤血球は青から紫がかかった色であるのに対して、正染性赤血球は少し濁った赤色をしているため、視野の中で明らかに赤味を帯びていると判断される赤血球を正染性赤血球とみなし、その他をすべて多染性赤血球として観察した。

#### 4.8. 統計学的解析

小核出現頻度についての統計学的解析には Kastenbaum-Bowman<sup>3)</sup> の数表（被験物質投与群）およびカイ二乗検定（陽性対照群）を用いた。多染性赤血球の割合についての統計学的解析には Wilcoxon の順位和検定を行った。いずれの検定法も有意水準を5%以下に設定した。

#### 4.9. 試験の有効性

被験物質の小核誘発性の判定を行う前に、試験の有効性の確認を行った。試験が以下の基準に合致していれば、その試験を有効とした。

- ① 陰性対照群の小核出現頻度の平均値が0.3%以下であること。
- ② 陽性対照群の小核出現頻度の平均値が2.0%以上であること。

#### 4.10. 結果の判定

少なくとも1つの被験物質投与群で小核出現頻度が有意に増加し、さらに、傾向検定により用量相関性が認められれば陽性と判定した。一方、いずれの被験物質投与群においても小核出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。最終的な判定は小核誘発能の強さ、および骨髄増殖抑制の程度等の結果を考慮に入れて総合的に判断した。

## 5. 試験結果および考察

### 5.1 毒性試験結果

毒性試験における死亡率を Appendix 1 に示した。すべての試験期間中に死亡した動物は認められなかった。

個体別一般状態を Appendix 3 に示した。すべての用量群で異常は認められなかった。

以上の結果より、蒸留木酢液の 2 回連続投与に対する最大耐量は 10000 mg/kg 以上と考えられた。したがって、小核試験の最高用量は 10000 mg/kg に設定した。

### 5.2. 小核試験結果

小核試験の成績と統計学的解析の結果を Table 1 に、個体別成績および投与日の体重を Appendix 2 に示す。また、小核試験における死亡率を Appendix 1 に示し、個体別一般状態を Appendix 4 に示す。

#### 5.2.1. 死亡率および一般状態

蒸留木酢液のすべての用量群において、試験期間中に死亡した動物は認められなかった。一般状態の観察においては 2500 および 5000 mg/kg 群で異常な症状は認められなかった。しかし、10000 mg/kg 群に立毛が認められた。

#### 5.2.2. 小核出現頻度

2 回目投与 24 時間後、陰性対照群における小核出現頻度が 0.15%であったのに対して、被験物質投与群の小核出現頻度は 0.15~0.20%であり、いずれの用量群においても陰性対照群と比べて有意な増加は認められなかった。

一方、MMC を投与した陽性対照群の小核出現頻度は 2.52%であり、明らかな増加が認められた。

#### 5.2.3 多染性赤血球の割合

2 回目投与 24 時間後、陰性対照群における多染性赤血球の割合が 50.1%であったのに対して、被験物質投与群の多染性赤血球の割合は 43.9~49.6%であり、いずれの用量群においても陰性対照群と比べて有意な減少は認められなかった。

一方、陽性対照群の多染性赤血球の割合は 50.0%であり、陰性対照群とほぼ同値であり、統計学的に有意ではなかった。

## 6. 試験の有効性

小核試験の陰性対照群における小核出現頻度は 0.3%以下であった。一方、陽性対照群における小核出現頻度は 2.0%以上であった。よって、本小核試験は試験の有効性の基準を満足しているものと判断された。参考資料として、当研究所における対照群の背景値を

Appendix 5 に示す。

## 7. 結論

以上の結果より、ICR 系 (CrIj:CD1) マウスを用いた本実験条件下において、蒸留木酢液の小核誘発性は陰性であると結論した。

## 8. 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

被験物質保管庫の温度が許容値上限 (10°C) を 0.1°C 上回る日 (20 秒未満) が 1 日認められたが、逸脱程度は軽微なものであったため、試験に影響はなかつたと判断された。その他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, 予期しえなかつた事態等) は認められなかつた。

## 9. 参考文献

- 1) Hayashi, M., R. R. Tice, J. T. MacGregor, D. Anderson, D. H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F. B. Oleson Jr., F. Pacchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou and B. Vannier (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Res.*, 312; 293~304.
- 2) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis, in: A. Hollaender (Ed.) *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, vol. 4, Plenum. New York, pp. 31~54.
- 3) Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation Res.*, 9; 527~549.

Table 1 Summary of results - micronucleus test

| Sampling time (hr) | Substance              | Dose (mg/kg) | No. of mice | MNPCE / PCE (%)                 |                 | PCE / (PCE+NCE) (%)             |                |
|--------------------|------------------------|--------------|-------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|
|                    |                        |              |             | Mean $\pm$ SD (range)           | S <sup>KC</sup> | Mean $\pm$ SD (range)           | S <sup>W</sup> |
| 24 <sup>a)</sup>   | Vehicle (Pure water)   | 0 x 2        | 5           | 0.15 $\pm$ 0.09 ( 0.05 ~ 0.30 ) | —               | 50.1 $\pm$ 4.7 ( 43.2 ~ 55.4 )  | —              |
|                    |                        | 2500 x 2     | 5           | 0.20 $\pm$ 0.06 ( 0.15 ~ 0.30 ) | N.S.            | 45.4 $\pm$ 7.7 ( 37.3 ~ 53.1 )  | N.S.           |
|                    | Distilled wood vinegar | 5000 x 2     | 5           | 0.15 $\pm$ 0.08 ( 0.05 ~ 0.25 ) | N.S.            | 49.6 $\pm$ 9.8 ( 35.1 ~ 62.0 )  | N.S.           |
|                    |                        | 10000 x 2    | 5           | 0.16 $\pm$ 0.09 ( 0.05 ~ 0.30 ) | N.S.            | 43.9 $\pm$ 10.9 ( 30.6 ~ 54.1 ) | N.S.           |
|                    | Mitomycin C            | 10 x 1       | 5           | 2.52 $\pm$ 1.59 ( 1.00 ~ 5.05 ) | ***             | 50.0 $\pm$ 13.0 ( 28.1 ~ 60.8 ) | N.S.           |

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

SD : Standard deviation.

S<sup>KC</sup> : Statistical analysis using the tables of Kastenbaum-Bowman or a chi-square test.

S<sup>W</sup> : Statistical analysis using Wilcoxon's sum of ranks test.

N.S. : Not significantly different from the concurrent vehicle control ( $p > 0.05$ ).

\*\*\* : Significantly different from the concurrent vehicle control at  $p \leq 0.001$ .

a) : 24 hours after the final administration.



## Appendix 1 Mortality in toxicity and micronucleus tests

| Test              | Substance                 | Dose<br>(mg/kg) | Mortality |
|-------------------|---------------------------|-----------------|-----------|
| Toxicity test     | Distilled wood<br>vinegar | 2500 x 2        | 0 / 3     |
|                   |                           | 5000 x 2        | 0 / 3     |
|                   |                           | 10000 x 2       | 0 / 3     |
| Micronucleus test | Vehicle                   | 0 x 2           | 0 / 5     |
|                   | Distilled wood<br>vinegar | 2500 x 2        | 0 / 5     |
|                   |                           | 5000 x 2        | 0 / 5     |
|                   |                           | 10000 x 2       | 0 / 5     |
| Mitomycin C       | 10 x 1                    | 0 / 5           |           |

Mortality : Number of death / Number of animals dosed.

Vehicle : Pure water.

## Appendix 2 Individual values of micronucleus test

| Sampling time (hr) | Substance                 | Dose (mg/kg) | Animal number | B.W. (g) | MNPCE/PCE (%) | PCE/(PCE+NCE) (%) |
|--------------------|---------------------------|--------------|---------------|----------|---------------|-------------------|
| 24 <sup>a)</sup>   | Vehicle<br>(Pure water)   | 0 x 2        | 111           | 33.4     | 0.30          | 55.4              |
|                    |                           |              | 112           | 30.8     | 0.15          | 52.7              |
|                    |                           |              | 113           | 32.5     | 0.15          | 43.2              |
|                    |                           |              | 114           | 33.8     | 0.05          | 51.5              |
|                    |                           |              | 115           | 31.9     | 0.10          | 47.9              |
|                    | Distilled wood<br>vinegar | 2500 x 2     | 116           | 29.8     | 0.30          | 37.5              |
|                    |                           |              | 117           | 34.4     | 0.20          | 52.5              |
|                    |                           |              | 118           | 31.6     | 0.20          | 37.3              |
|                    |                           |              | 119           | 36.0     | 0.15          | 53.1              |
|                    |                           |              | 120           | 34.6     | 0.15          | 46.8              |
|                    |                           | 5000 x 2     | 121           | 34.7     | 0.20          | 35.1              |
|                    |                           |              | 122           | 29.9     | 0.05          | 52.0              |
|                    |                           |              | 123           | 36.7     | 0.25          | 46.6              |
|                    |                           |              | 124           | 33.3     | 0.10          | 52.1              |
|                    |                           |              | 125           | 31.4     | 0.15          | 62.0              |
|                    | 10000 x 2                 | 126          | 31.4          | 0.15     | 30.6          |                   |
|                    |                           | 127          | 34.0          | 0.05     | 46.9          |                   |
|                    |                           | 128          | 34.3          | 0.15     | 34.4          |                   |
|                    |                           | 129          | 34.6          | 0.30     | 54.1          |                   |
|                    |                           | 130          | 35.3          | 0.15     | 53.7          |                   |
| Mitomycin C        | 10 x 1                    | 131          | 35.2          | 3.00     | 52.5          |                   |
|                    |                           | 132          | 33.8          | 1.55     | 58.5          |                   |
|                    |                           | 133          | 32.5          | 2.00     | 50.0          |                   |
|                    |                           | 134          | 35.5          | 1.00     | 60.8          |                   |
|                    |                           | 135          | 33.9          | 5.05     | 28.1          |                   |

B.W. : Body weight on the day of the first administration.

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

<sup>a)</sup> : 24 hours after the final administration.

## Appendix 3 Individual clinical observation in toxicity test

| Test          | Substance                 | Dose<br>(mg/kg) | Animal<br>number | Time after the administration |   |   |    |         |
|---------------|---------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|---|---|----|---------|
|               |                           |                 |                  | 1                             | 3 | 5 | 24 | 48 (hr) |
| Toxicity test | Distilled wood<br>vinegar | 2500 x 2        | 11               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                           |                 | 12               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                           |                 | 13               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                           | 5000 x 2        | 14               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                           |                 | 15               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                           |                 | 16               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                           | 10000 x 2       | 17               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                           |                 | 18               | —                             | — | — | —  | —       |
|               |                           |                 | 19               | —                             | — | — | —  | —       |

— : No abnormalities detected.

## Appendix 4 Individual clinical observation in micronucleus test

| Test              | Substance              | Dose (mg/kg) | Animal number | Time after the first administration |   |    |    |         |
|-------------------|------------------------|--------------|---------------|-------------------------------------|---|----|----|---------|
|                   |                        |              |               | 1                                   | 3 | 5  | 24 | 48 (hr) |
| Micronucleus test | Vehicle (Pure water)   | 0 x 2        | 111           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 112           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 113           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 114           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 115           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   | Distilled wood vinegar | 2500 x 2     | 116           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 117           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 118           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 119           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 120           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        | 5000 x 2     | 121           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 122           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 123           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 124           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   |                        |              | 125           | —                                   | — | —  | —  | —E      |
|                   | 10000 x 2              | 126          | P             | —                                   | — | —  | —E |         |
|                   |                        | 127          | —             | —                                   | — | —  | —E |         |
|                   |                        | 128          | P             | P                                   | — | —  | —E |         |
|                   |                        | 129          | P             | P                                   | — | —  | —E |         |
|                   |                        | 130          | —             | —                                   | — | —  | —E |         |
| Mitomycin C       | 10 x 1                 | 131          | —             | —                                   | — | —E |    |         |
|                   |                        | 132          | —             | —                                   | — | —E |    |         |
|                   |                        | 133          | —             | —                                   | — | —E |    |         |
|                   |                        | 134          | —             | —                                   | — | —E |    |         |
|                   |                        | 135          | —             | —                                   | — | —E |    |         |

— : No abnormalities detected.

E : Euthanatized for sampling.

P : Piloerection.

## Appendix 5 Laboratory historical control data in micronucleus tests

| Group                          | No. of mice | MNPCE / PCE (%) <sup>a)</sup> | PCE / (PCE+NCE) (%) <sup>a)</sup> |
|--------------------------------|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Negative control <sup>b)</sup> | 483         | 0.17 ± 0.10                   | 55.1 ± 5.9                        |
| Positive control <sup>c)</sup> | 336         | 4.49 ± 2.36                   | 49.5 ± 8.4                        |

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

Data accumulation period : 1998.12 - 2006.12

a) Mean ± SD

b) Solvent or vehicle control

c) Mitomycin C (10 mg/kg)