

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。