

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。