

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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ）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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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)~(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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ）で生育阻害が観察され、TA98 株と TA1537 株では 50000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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.