

## 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<sup>5,6,7</sup>。

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.