

# 各種市販および自家製木酢液・竹酢液の変異原性

駒形 修<sup>1)</sup>・本山 直樹

千葉大学園芸学部生態制御化学研究室

1) 現在国立感染症研究所)

(受領：2004年5月6日；受理：2004年9月14日)

ISSN 0915-4698

環 動 昆

Jpn. J. Environ.  
Entomol. Zool.

環動昆 Vol. 15 No. 4 (2004) 別刷

JAPANESE SOCIETY OF ENVIRONMENTAL ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY

Seiyu Bldg., Nishi-Honmachi 1-12-19, Nishi-ku, Osaka 550, JAPAN.

## 各種市販および自家製木酢液・竹酢液の変異原性

駒形 修<sup>1)</sup>・本山 直樹

千葉大学園芸学部生態制御化学研究室

1) 現在国立感染症研究所)

(受領 : 2004年 5月 6日 ; 受理 : 2004年 9月 14日)\*

**Mutagenicity of various commercial and home-made Pyrolygneous Acid products**  
Osamu Komagata<sup>1)</sup> and Naoki Motoyama (Laboratory of Pesticide Toxicology, Faculty of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo-shi, Chiba 271-8510,  
<sup>1)</sup>Present Address: Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan). *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.* **15** : 231–238 (2004)

Attempts to evaluate the mutagenicity of twelve commercial and seven home-made pyrolygneous acid (PA) products employing the *umu* test were unsuccessful because of the presence of anti-bacterial components in the products, which inhibited the growth of *S. typhimurium*, the bacteria used for the test. When the assay was conducted with diluted solutions of three selected products in the range 1~10<sup>6</sup> ppm, positive reactions were obtained in the presence of metabolic activator S-9 Mix, although the A<sub>630</sub> values obtained were too low to confirm their mutagenicity. However, when several PA products were subjected to the *umu* test after removal of the anti-bacterial components on Sep-pak tC18 column, they all showed a positive reaction for mutagenicity. The simple clean-up method employed in the present study appears useful for evaluations of mutagenicity of samples such as PA products that consist of multiple components.

**Key words :** Mutagenicity, Pyrolygneous acid, *umu* test, *S. typhimurium*, S-9 Mix

市販木酢液12種と自家製木酢液7種の各々の原液について *umu* 試験により変異原性を検定したが、木酢液の検定菌に対する抗菌活性のために評価ができなかった。そこで木酢液3種を選んで、検定菌に対する影響を軽減するために1~10<sup>6</sup> ppmに希釈し同様に変異原性を検定した。検定菌への影響は減少し、S-9 Mix 処理条件下

で陽性反応を示したが、得られた吸光度は陽性対照と比較して低いレベルであり、変異原性は確認できなかった。一方、数種木酢液をSep-pak tC18カラムを用いて部分的に抗菌物質を除去した後で同様の検定を行った場合は、供試した木酢液全てがS-9 Mix 処理によって明確な変異原性陽性反応を示した。本研究で用いた部分精製方法は、木酢液のような混合成分からなる資材の変異原性を簡便に検定する方法として有用であると考えられる。

## はじめに

木酢液・竹酢液（以下木酢液と称する）は木・竹炭生産時の副産物であり、病虫害防除目的で農薬代替資材として宣伝され販売されている（岸本, 1996; 農文協, 2004）。木酢液にはイエバエ（竹井・林, 1968）やヤマビル（千葉県衛生研究所, 1997）に対して忌避効果があるという報告や、数種カメムシ類（谷田貝, 2001）に対して殺虫活性があるという報告がある。

また木酢液は、有機農業ブームに伴ってすでに広く普及していることから、平成15年の農薬取締法改正に伴って新設された農薬登録を要しない特定農薬（特定防除資材）の候補としても注目を集めている（日本農業新聞, 2004）。

一方著者らは木酢液の薬効について、著しい害虫防除活性を示した資材には合成ピレスロイドのシペルメトリンが混入されていたことから（本山・Rahman, 2004; Rahman and Motoyama, 1998）、害虫防除効果があるという農家の体験談には、合成化学農薬が混入されていたいわゆる漢方農薬の場合と同様に（駒形・本山, 1998; 1999）、疑義が存在することを暗示した。さらに、実際に各種市販品および自家製木酢液を供試して、通常推奨されている数100倍希釈液ではなく、10倍希釈液という濃厚液を処理しても植物体上の数種植物病原菌に対して防除効果が認められず、数種害虫に対しても10倍希釈液～原液を処理しても防除効果が認められないこと（駒形・本山, 2004a; 2004b）を確認した。従って、木酢液の農薬代替資材としての実用効果には疑問がある。

また、木酢液を農薬代替資材として使用する場合の安全性については、科学的な知見がほとんど見当たらない。

木酢液、木タールには200を超える成分が含まれているとされており、それらの成分は、有機酸、フェノール類、カルボニル、アルコール、その他中性成分、塩基等に分類できる（木材工業ハンドブック編集委員会, 1982年）。

梅津（2003）はこれらの成分中に、多数の変異原性、刺激性、生殖毒性、発ガン性をもつものがあることを指摘している。

著者らは上述した研究（駒形・本山, 2004a）において、各種木・竹酢液市販品および炭焼き窯から直接採取した木酢原液について主要成分の分析を行った結果、梅津（2003）が指摘した有害物質も含まれていることを確認した。ただし、市販の木酢液の品質にはばらつきがあり、成分によっては10倍以上の差が見られた。

各成分の単体での毒性については既に多くの情報があり、例えば発ガン性に関していえばIARC（International Agency for Research on Cancer）のような国際機関で発ガン性の評価がなされている。しかし、木酢液については混合物であるということの他に品質のばらつきもあり、また世界的に見て主要な資材とはいえないため、従来マウスに対する急性毒性（池田ら, 1964）以外、毒性評価の対象にはされてこなかった。

本論文では、前報（駒形・本山, 2004a; 2004b）で用いたのと同じ木酢液市販品、および炭焼き窯から直接採取した木酢原液について、毒性評価の一つとして変異原性試験であるumu試験を行っ

た結果を報告する。

## 材料と方法

### 1. 供試木酢液

供試した木酢液を表1に示した。これらの木酢液・竹酢液の主要成分と抗菌活性ならびに殺虫活性と水生生物に対する影響については前報(駒形・本山, 2004a; 2004b)に記載した通りである。

### 2. 試薬類

*umu* 試験は株式会社日本抗体研究所の試験キット, ウムラック®を用いた。検定菌 (*S. typhimurium*), 培養液, S-9 Mix, 陽性対照物質 (Furyl-furamide と 2-Aminoanthracene), 発色基質, 停止液はキットに付属のものを使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

### 3. 木酢液の部分精製

一部の木酢液 (C, F, G, H, M7) について固相抽出を行った。供試木酢液の pH は 2.6~4.7 の範

囲だったので (駒形・本山, 2004a), 固相カラムは Waters 社の Sep-pak tC18 (1g) を用いた。固相カラムはアセトン10mlを通液した後, 蒸留水10mlを通液しコンディショニングを行った。その後, 検体である木酢液の原液若しくは対照である蒸留水を100ml通液した。その後, 蒸留水50mlを通液してカラムを洗浄した後, 約10分間空気を吸引して乾燥させ, アセトン10mlで吸着物を溶出した。抽出液は40°C以下の湯浴で保温しながら窒素気流下でアセトンを乾固させて1mlのジメチルスルホキシド (DMSO) を加えて濃縮物を溶解させた後に, 蒸留水を加えて10mlとした。本液 (原液の10倍濃縮相当濃度) および更に蒸留水を用いて10倍 (原液相当濃度), 100倍希釈した液 (原液の10倍希釈相当濃度) を精製検体とした。なお, 通液速度は各液とも約1 ml/minであった。

### 4. 変異原性試験 (*umu* 試験)

木酢液の変異原性を *umu* 試験で検定した。検

表1 供試木酢液

Group	Product Code	Trade Name	Manufacturer, Dealer, or Temperature at which product was collected
Commercial Product	A	Joryu-Mokusakueki	Keiyo Co. Ltd. (Made in Malaysia)
	B	Joryu Seisei Binchotan-Mokusakueki	Apurotto Co. Ltd.
	C	Joryu Chikusaku Geneki	Kamimura Seitohjo Co, Ltd. (Made in China)
	D	Tokusan Chikusakueki	Apurotto Co. Ltd.
	E	Mokusaku Geneki	Yoki Sangyo Co. Ltd.
	F	Shikoku Konpirasama Fumotosan Chikusakueki	Shikoku Tekuno Inc.
	G	Junsei Mokusakueki	Wako Mokuzai Co. Ltd.
	H	Mokuchikusakueki	Made in Otaki, Chiba Prefecture
Commercial Diluted Product	I	Yomogi Sakueki	Airisu Oyama Co. Ltd.
	J	300-fold Diluted Mokusakueki	Takuto Co. Ltd.
	K	Shokubutsu Mokusaku Ikiiki-spray	Shimada Shoji Co. Ltd.
	L	Shokubutsu Chikusaku Ikiiki-spray	Shimada Shoji Co. Ltd.
Home-made Product	M1		(Temperature) 84 °C
	M2		82 °C
	M3		86 °C
	M4		97 °C
	M5		122 °C
	M6		186 °C
	M7		200 °C

定はキットに添付されているマニュアルに従って以下の手順で行った。冷凍されている検定菌 (*S. typhimurium*) 用培養液を室温に戻し、1 mlを菌凍結乾燥品に入れ、静かに攪拌し、室温で10分間静置した後、37°Cで3時間静置培養した。代謝活性化試験用のS-9 Mixは、凍結乾燥品に蒸留水1 mlを入れ、よく攪拌した。検体である木酢液は、実験1では原液を、実験2では公比10の蒸留水希釈液 ( $1 \sim 10^5$  ppm) を、実験3では前述した方法で部分精製した木酢液を試料として96穴マイクロタイタープレートの各ウェルにそれぞれ10  $\mu$ lずつ分注した。またS-9 Mixによる代謝活性化を必要としない陽性対照物質として、キットに同包のFurylfuramideを、代謝活性化を必要とする陽性対照物質として同じくキットに同包されている2-Aminoanthraceneを各々DMSOに溶解させた後、蒸留水で希釈し、木酢液と同様に10  $\mu$ lずつ分注した。調製した菌液を代謝活性化を必要としないウェルに100  $\mu$ lずつ分注した。残りの菌液には、その10%に相当する量のS-9 Mixを加え、代謝活性化を必要とするウェルに100  $\mu$ lずつ分注し、プレートを37°C、遮光の条件下で2時間培養した。37°Cに予熱しておいた発色基質を全ウェルに100  $\mu$ lずつ分注し、37°Cで1時間インキュベーションした後、反応停止液を全ウェルに100  $\mu$ lずつ分注した。3分後、色調が安定した後、マイクロプレートリーダー (Elx808, Bio-Tek Inst.) を用いて、発色度合いを波長630nmの吸光度 ( $A_{630}$ ) で測定した。吸光度は各々に該当する対照ウェルの吸光度を引くことにより補正した。なお、Sep-pak tC18カラムで部分精製した木酢液の対照ウェルには、蒸留水100 mlをカラムに通液して同様に処理したサンプルを用いた。

### 結果と考察

陽性対照の濃度-発色 ( $A_{630}$ ) 曲線は図1に示した。

#### 実験1：原液に対する試験

各種木酢液の原液を用いたumu試験の結果は

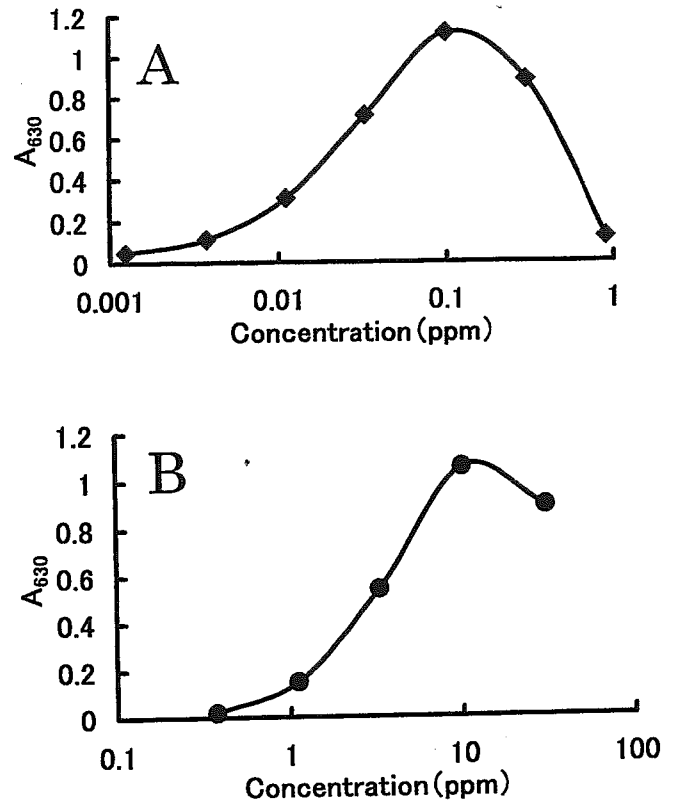


図1 変異原性試験における陽性対照の濃度-発色程度 ( $A_{630}$ ) 曲線。A: Furylfuramide (S-9 Mix 非処理), B: 2-Aminoanthracene (S-9 Mix 処理)

表2に示した。希釈品 (I~L) とS-9 Mix非処理下での木酢液Cを除いた市販木酢液、自家製木酢液はともに吸光度が負の値となった。これはumu試験で用いた検定菌*S. typhimurium*の生育が阻害されたことを示している。なお、ここで供試した木酢液の多くは、前報 (駒形・本山, 2004a) で述べたごとく、原液に近い濃度ではPS培地上の灰色かび病に対して抗菌活性を示したということと、また木酢液からは酢酸やホルムアルデヒドなどが検出されていることから、検定菌に対する生育阻害は当然予想されることである。希釈品 (I~L) の場合は酢酸をはじめとする成分濃度が著しく低いために生育阻害が起らなかったであろう。しかし、これらについても吸光度は低く、陽性対照の最小検出濃度程度もしくはそれ以下 (図1) であった。なお、S-9 Mix存在下での木