

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of
7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。細胞増殖抑制試験結果において細胞毒性が溶解限界まで認められなかったため、OECDのガイドラインに従って溶解限界を最高用量とした。すなわち、連続処理法(24時間処理および48時間処理)ならびに短時間処理法(6時間処理の+S9 mixおよび-S9 mix)のいずれにおいても使用溶媒での溶解限界濃度を含む375, 750および1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の3用量(公比2)について染色体標本作製した後、顕微鏡観察を実施した。連続処理法ならびに短時間処理法のいずれにおいても被験物質処理による顕著な細胞増殖抑制作用は観察されず、染色体異常、構造異常あるいは倍数性細胞の誘発も認められなかった。一方、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC(MMC)および短時間処理+S9 mixの陽性対照物質シクロホスファミド(CP)は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸には染色体異常を誘起する可能性がないものと判断した。

材料および方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数14の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000 mlの精製水で溶解した後、2.2 gの炭酸水素ナトリウム(関東化学株)を加えた。1N塩酸を用いてpHを7.2に調整した後、メンブランフィルター(0.2 μm :Gelman Sciences社)を用いて加圧濾過除菌した。非働化(56℃, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終

濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機株)を用い、CO₂濃度5%、37℃の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った¹⁾。

5. 被験物質

被験物質の7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸(ロット番号:0901, CAS No.:87-02-5)は分子式C₁₀H₉NO₂S, 分子量239.25, 純度91.8%(不純物として硫酸ナトリウム分2.0 wt%および水分3.5 wt%を含む)の粉末で、水、アセトンにほとんど溶けない。本試験にはスガイ化学工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

なお、本被験物質の純度は95%未満であるため、秤量に際して換算した。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質溶液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix存在下(+S9 mix)あるいは非存在下(-S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業株)で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学株)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール, 1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、す

なわち細胞生存率を算出した。

その結果、連続処理法48時間の1500 $\mu\text{g/ml}$ (溶解限界濃度)において僅かな細胞増殖抑制が観察されたが、他の試験系では明確な抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。従って、50%細胞増殖抑制濃度はいずれの試験系とも溶解限界濃度の1500 $\mu\text{g/ml}$ 以上と考えられた。

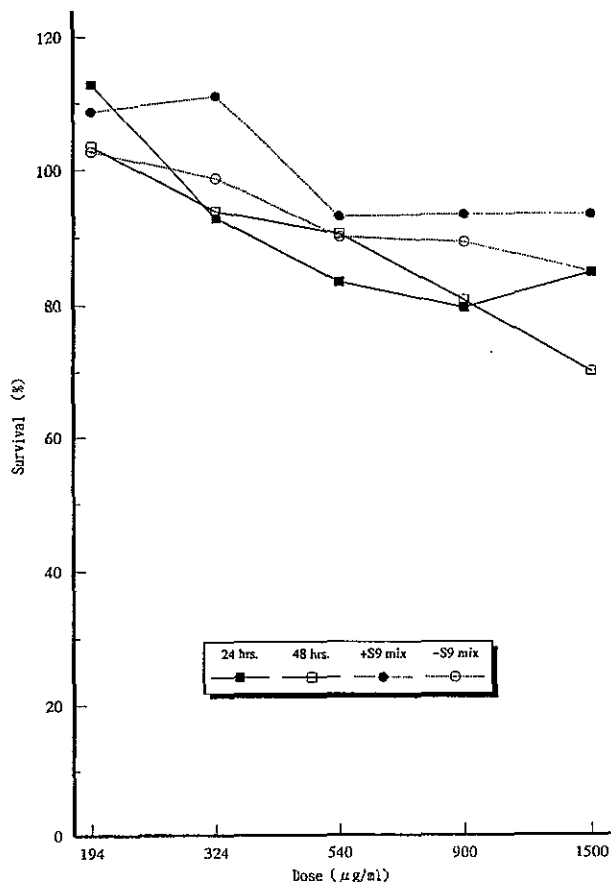


Fig. 1 Dose-survival curves of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果を基に、染色体異常試験では連続処理法、短時間処理法とも溶解限界濃度の1500 $\mu\text{g/ml}$ を高用量とし、以下公比2で減じた750および350 $\mu\text{g/ml}$ の計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理法の場合、マイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業(株))を、24時間処理で0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理で0.025 $\mu\text{g/ml}$ の用量で、短時間処理法の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を、12.5 $\mu\text{g/ml}$ の用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 $\mu\text{g/ml}$ となるようコルセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化

カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会²⁾による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合(+gap)と、含まない場合(-gap)とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸処理群の場合、24時間ならびに48時間処理のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、+S9 mixならびに-S9 mixのいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。また、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下において7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

Table 1. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [long-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	24	200	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.5	-
Test Sub.	375	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	750	24	200	0	0	0	5	0	0	2.5	2.5	0.0	-
	1500	24	200	0	2	0	5	0	0	3.5	3.5	1.0	-
MMC**	0.05	24	200	10	30	0	100	0	0	55.0	55.0	0.0	+
DMSO*	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
Test Sub.	375	48	200	0	1	0	2	0	0	1.5	1.5	0.5	-
	750	48	200	1	2	0	5	1	0	4.5	4.0	0.0	-
	1500	48	200	0	0	0	3	1	0	2.0	2.0	0.0	-
MMC**	0.025	48	200	7	38	0	100	2	0	55.0	55.0	0.0	+

*:Solvent control **:Positive control (mitomycin C)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others

Table 2. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [short-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	+	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-
Test Sub.	375	+	6	200	0	0	0	0	1	0	0.5	0.5	0.0	-
	750	+	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	1.5	-
	1500	+	6	200	0	0	0	2	0	0	1.0	1.0	0.0	-
CP**	12.5	+	6	200	4	20	0	71	0	0	40.5	39.0	0.0	+
DMSO*	0	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
Test Sub.	375	-	6	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	750	-	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
	1500	-	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
CP**	12.5	-	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-

*:Solvent control **:Positive control (cyclophosphamide)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat Res.*, **66**, 277(1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp.31-35.
- 3) 石館基 監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp.19-24.

連絡先

試験責任者：中嶋 圓
試験担当者：北沢倫世, 藤原正孝, 菊池正憲
(財)食品農医薬品安全性評価センター
〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
Michiyo Kitazawa, Masataka Fujiwara
Masanori Kikuchi
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

チモールのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Thymol by Oral Administration in Rats

要約

チモールを8, 40および200 mg/kg/dayの用量でSD系ラット(Crj:CD)に交配前14日から交配を経て雄は計43日間, 雌は妊娠, 分娩を経て哺育3日まで経口投与し, 反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

200 mg/kg群において, 雄で体重増加抑制の傾向および死亡が1例, 雌で投与後の一過性の自発運動減少および歩行失調が認められた。病理組織検査では, 雌雄とも前胃に粘膜上皮の増生, 炎症性細胞の浸潤, 水腫など被験物質の刺激性を示唆する変化が認められた。また, 雌の一部で胸腺の退縮, 副腎束状帯の脂肪滴増加が認められた。

40 mg/kg群においても, 雌雄の胃および雌の胸腺に病理組織変化が認められた。摂餌量, 器官重量, 雄の血液学検査および血液生化学検査においては被験物質に起因する変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

親動物の検査において, 性周期, 交尾率, 受胎率, 妊娠期間, 黄体数, 着床数, 着床率, 出産率, 分娩率, 分娩および哺育行動には被験物質に起因する変化は認められなかった。

新生児の検査において, 200 mg/kg群で低体重および体重増加抑制の傾向が認められた。出産児数, 出生産児数, 性比, 出生率, 4日生存率, 外表, 一般状態および剖検においては被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果より, チモールの反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも8 mg/kg/day, 生殖発生毒性に関する無影響量は, 親動物に対して雌雄とも200 mg/kg/day, 児動物に対しては40 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

チモール(和光純薬工業(株), Lot No.CAN1119, 純度99.6%)は, 融点50.4℃, 水酢酸, エタノール, エーテルに易容, 水には難溶, 光に対して不安定の白色結晶性の塊である。被験物質は室温・密閉・遮光下で保管した。また, 試験期間中安定であったことが製造者により確認

された。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手した雌雄のSD系ラット(Crj:CD)を6日間検疫・馴化後, 試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により, 1群につき雌雄各10匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも8週齢, 体重範囲は雄が333~371 g, 雌が193~221 gであった。

検疫・馴化を含めた全飼育期間中, 温度20~25℃, 湿度40~70%, 換気約12回/時, 照明12時間/日(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに, 1ケージあたり投与開始後は1匹, 交配期間中は雌雄各1匹, 哺育期間は1腹で収容し, 飼育した。

動物には, オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルターで濾過後, 紫外線照射した水道水をそれぞれ自由摂取させた。

3. 投与量および投与方法

SD系ラットを用いて, 被験物質を30, 100および300 mg/kgの用量で雌雄とも交配前13日から4日間の交配を経て, 雄は計17日間, 雌は交尾確認後7~9日間投与した結果, 300 mg/kg群で自発運動減少, 歩行失調, 腹這い, 呼吸緩徐, 眼瞼下垂, 流涎などの投与後症状および体重減少が認められた。100 mg/kg群では流涎が散見されたのみで明瞭な変化は認められなかった。以上の結果から, 本試験では高用量を200 mg/kgとし, 以下公比5で中用量を40 mg/kg, 低用量を8 mg/kgとした。この他に媒体のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は, 雌雄とも交配前14日間, 交配期間中, および雄は剖検前日までの計43日間, 雌は交尾後分娩を経て哺育3日までとし, 3%アラビアゴム水溶液に懸濁させた被験物質を胃ゾンデを用いて1日1回, 午前中に強制経口投与した。投与液量は5 ml/kgとし, 至近測定日の体重を基に算出した。

投与液の調製はイエローランプ照明下で行い, 投与に供するまで冷蔵・遮光下で保存した。投与液中の被験物質は本保存条件下で安定であること, 使用した投与液にはほぼ所定量の被験物質が均一に含有されていることを確認した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

1) 一般状態

全例について生死、外観・行動等を投与前および投与後に毎日観察した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

2) 体重および摂餌量

体重は、雄については投与開始日およびその後週1回、雌については投与開始日および交尾するまでは週1回、交尾後は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した(交尾確認日を妊娠0日, 分娩確認日を哺育0日とする)。また、体重増加量を交配前は投与開始日, 妊娠期間は妊娠0日, 哺育期間は哺育0日の体重を基準に算出した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

3) 雄の血液学検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日より約21時間絶食させ、チオペンタールナトリウム(ラボナール: 田辺製薬株)の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採取した血液の一部をEDTA-2Kにより凝固阻止し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500: 東亜医用電子株)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A: 立石電機株)、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000: 東亜医用電子株)により測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

4) 雄の血液生化学検査

雄の全生存動物について、解剖日に採取した血液を室温で約30分間放置した後、3000 r.p.m.(2050G)で10分間遠心分離し、得られた血清について、GOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、 γ -GTP(SSCC改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(Jendrassik改良法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(O-CPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形:株日立製作所)により測定した。

5) 病理検査

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ剖検し、下垂体、胸腺、

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体および前立腺の重量を測定した。また、これらの器官に加えて、脳、心臓、脾臓および卵巣を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体はプアン液)にて固定後保存した。

病理組織検査は対照および200 mg/kg群の雌雄の脳、下垂体、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺および剖検で変化が認められた雌の胸腺について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検した。その結果、雌の胸腺および副腎において被験物質の影響が疑われたので雌の8および40 mg/kg群のこれらの器官について検査した。また、雄の剖検時に被験物質による肉眼的変化が胃に認められたので、各群全例の雄の胃を検査するとともに、雌についても対照、8, 40および200 mg/kg群の各2, 5, 5, 5例の胃を代表例として採取し、組織検査を行った。なお、一部の例の副腎についてはオイルレッドO染色を実施した。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能

雌について、投与開始日から15日間、午前中に膈垢を採取し、ギムザ染色して性周期を検査した。交配前の投与終了後、各群内で雄1雌1の交配対を設け、最長14日間昼夜同居させ、毎日午前中に雌の膈垢を採取し、鏡検した。膈栓形成あるいは膈栓標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配後、交尾までに要した日数)、交尾までに逸した発情期の回数、交尾率([交尾動物数/同居動物数]×100)、受胎率([受胎動物数/交尾動物数]×100)を算出した。

2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌については全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が終了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。その後、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、一般状態、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

哺育4日の解剖時に卵巣、子宮を摘出して黄体数および着床数を検査した。交尾確認後25日を経ても分娩しない雌は剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮は2% KOH水溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間)、出産率([生児出産雌数/受胎雌数]×100)、着床率([着床数/黄体数]×100)、分娩率([総出産児数/着床数]×100)を算出した。

3) 新生児の観察・検査

(1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数、出産生児数、死産児数、性別および外表異常の有無を検査した。その後、一般状態、死

亡の有無を毎日観察した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬・固定後、実体顕微鏡下で剖検した。哺育0および4日の生存児数から出生率([出生産児数/総出生産児数]×100)、4日生存率([哺育4日生児数/出生産児数]×100)を算出した。

(2) 体重

哺育0および4日に1腹毎に雌雄単位でまとめて測定し、それぞれの平均値を算出した。また、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

(3) 剖検

全ての生存児について哺育4日に口腔を含む外表を検査した後、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検した。

6. 統計解析

パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行った。分散が一樣でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合で各群の例数が一定ならばDunnett法またはDunnett型、不定ならばScheffé法またはScheffé型により多重比較を行った。計数データはFisherの直接確率法により検定した。新生児に関するデータについては、各母動物毎に算出した平均値を統計単位とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物

200 mg/kg群の雄1例が投与開始後43日に死亡した。この動物の一般状態には変化は認められなかったが、剖検で前胃壁の肥厚、心房の拡張、肝臓および肺のうっ血が認められた。また、病理組織検査では、前胃粘膜上皮の軽度の増生、肝臓の軽度のうっ血、肺における中等度のうっ血性水腫および軽度の炎症性細胞の浸潤が認められた。なお、この他に200 mg/kg群の雌1例が妊娠18日(投与開始後33日)に投与過誤により死亡した。

2) 一般状態

200 mg/kg群において、雌の少数例で投与後の一過性の自発運動減少および歩行失調が投与開始後1日から13日までの間、継続または断続的に認められた。そのうち1例では妊娠19日および哺育1日にもそれらの症状が発現し、哺育1~2日には消瘦を示した。また、投与直後の一過性の流涎が、雄では投与開始後13日から継続して、雌では妊娠0日(投与開始後15日)から断続的に認められ、投与終了時までには雄のほぼ全例、雌の半数例に観察された。この他、200 mg/kg群の非分娩動物1例で妊娠24日に膈からの黒色粘液漏出が観察された。

3) 体重(Fig. 1,2)

200 mg/kg群の雄において、有意差は認められなかったが、体重および体重増加量が投与開始後14日以降、対照群に比べて若干低値で推移し、体重増加抑制の傾向

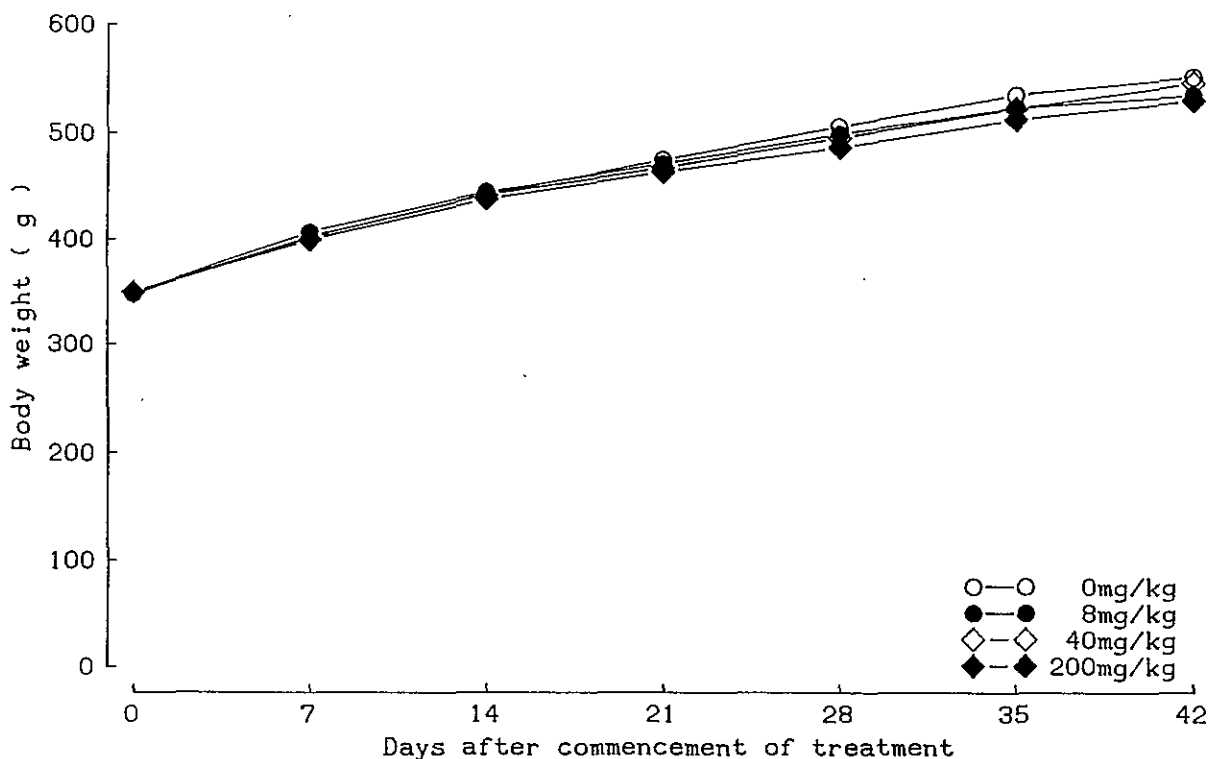


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

を示した。

4) 摂餌量

雌雄とも全期間を通して、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

5) 雄の血液学検査 (Table 1)

白血球百分比において、全被験物質投与群のリンパ球が有意な高値を、40および200 mg/kg群の単球が有意な低値を示したが、実数換算値においてリンパ球では各被験物質投与群とも有意な差は認められず、単球では200 mg/kg群で有意な差は認められなかった。また、いずれも当研究所の背景データの範囲内の変動であったことから、偶発的な変化と判断した。

6) 雄の血液生化学検査 (Table 2)

8 mg/kg群のトリグリセライドが有意な低値を示したが、40および200 mg/kg群では有意な変化が認められなかったことから偶発的なものと判断した。

7) 器官重量 (Table 3)

雌雄ともにいずれの器官においても、絶対重量および相対重量とも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

8) 剖検所見 (Table 4)

前胃壁の肥厚が200 mg/kg群の雄9例、雌1例に認められた。

肥厚した前胃粘膜の表面は白色化し、粗造を呈していた。また、胸腺の小型化が40および200 mg/kg群の雌で各1例に、副腎の白色化が200 mg/kg群の雌2例に認

められた。

その他、偶発的な変化として、脳室の拡張が200 mg/kg群の雄1例に認められた。なお、8 mg/kg群の雄1例は食道穿孔の形跡が観察されたため、投与過誤があったものと判断し、全データを集計から除外した。

9) 組織所見 (Table 5)

被験物質に起因する変化が前胃、胸腺および副腎に認められた。

前胃では、粘膜上皮の増生を主体とした変化が40および200 mg/kg群で雌雄ともに認められ、前胃粘膜は重層扁平上皮の増生および角化亢進により肥厚していた。肥厚した部分の粘膜下織に炎症性細胞の浸潤や水腫を伴う例が雄では多数、雌では少数認められた。

胸腺では、退縮が40および200 mg/kg群の雌で各1例に認められた。この2例は、剖検時に胸腺の小型化を示した例であった。

副腎では、皮質束状帯の脂肪滴の増加が200 mg/kg群の雌1例に認められた。この例は肉眼的に副腎の白色化を示した2例のうちの1例であった。同群の他の1例と8および40 mg/kg群の雌の副腎には変化は認められなかった。

その他に、対照あるいは被験物質投与群で認められた種々の変化については、いずれも自然発生的に観察される変化であり、発現状況に用量との関連が乏しいことから偶発病変と判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能 (Table 6)

各群ともほとんどが4~5日の正常な性周期を示し、交尾率および受胎率ともに対照群と被験物質投与群との

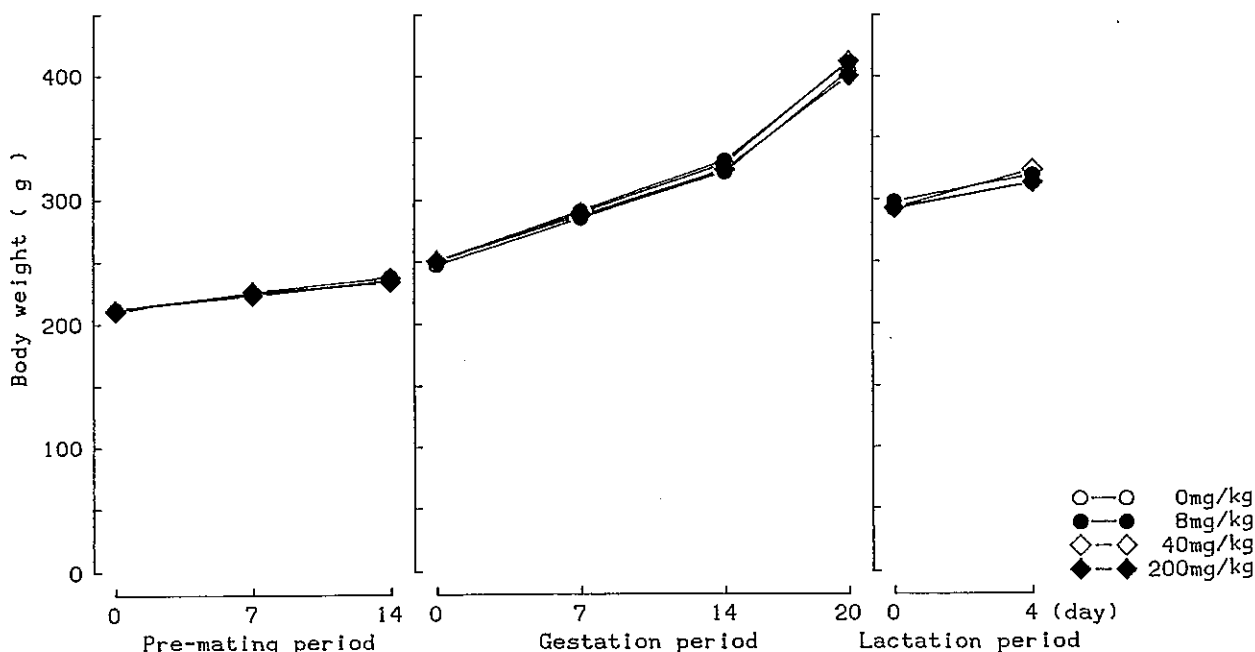


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Hematological examination in male rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
Number of animals	10	9	10	9
RBC ($10^4/\mu l$)	833 \pm 25.4	844 \pm 34.3	865 \pm 30.3	850 \pm 34.4
Ht (PCV) (%)	45.6 \pm 1.39	46.3 \pm 1.49	46.7 \pm 1.39	45.8 \pm 0.97
Hb (g/dl)	15.6 \pm 0.45	16.0 \pm 0.60	16.2 \pm 0.49	15.8 \pm 0.36
Reticulo (%)	24 \pm 2.2	24 \pm 3.0	26 \pm 4.7	24 \pm 3.9
MCV (μm^3)	54.7 \pm 0.93	54.9 \pm 1.39	54.1 \pm 1.44	54.0 \pm 1.44
MCH (pg)	18.7 \pm 0.30	19.0 \pm 0.52	18.7 \pm 0.50	18.6 \pm 0.61
MCHC (%)	34.3 \pm 0.22	34.5 \pm 0.39	34.6 \pm 0.42	34.5 \pm 0.40
Plt ($10^4/\mu l$)	99.3 \pm 9.29	102.4 \pm 10.22	106.5 \pm 13.71	108.5 \pm 7.85
WBC ($10^2/\mu l$)	103 \pm 27.2	111 \pm 26.8	112 \pm 29.8	128 \pm 23.2
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocytes	76 \pm 3.2	82 \pm 3.4*	84 \pm 5.2**	85 \pm 4.2**
Neutrophils				
segmented	14 \pm 2.8	11 \pm 3.4	10 \pm 4.6	10 \pm 3.4
band	0 \pm 0.4	0 \pm 0.0	1 \pm 0.5	0 \pm 0.0
Eosinophils	1 \pm 0.7	1 \pm 1.4	1 \pm 0.7	1 \pm 1.3
Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
Monocytes	9 \pm 3.9	6 \pm 1.5	4 \pm 1.4**	4 \pm 1.1*
Differential leukocyte counts ($\times 10^2/\mu l$)				
Lymphocytes	79 \pm 21.2	91 \pm 24.9	94 \pm 25.2	108 \pm 19.5
Neutrophils				
segmented	15 \pm 4.4	12 \pm 3.7	12 \pm 6.5	13 \pm 4.8
band	0 \pm 0.4	0 \pm 0.0	1 \pm 0.7	0 \pm 0.0
Eosinophils	1 \pm 0.9	1 \pm 1.6	1 \pm 0.8	1 \pm 1.9
Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
Monocytes	9 \pm 4.6	7 \pm 2.3	5 \pm 2.2*	6 \pm 2.3

Values are expressed as Mean \pm S.D.

* , Significantly different from the control group value at $P < 0.05$

** , Significantly different from the control group value at $P < 0.01$

Table 2 Blood chemical examination in male rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
Number of animals	10	9	10	9
GOT (AsT) (IU/l)	101 \pm 22.0	92 \pm 17.8	80 \pm 13.3	85 \pm 19.2
GPT (AlT) (IU/l)	27 \pm 12.9	24 \pm 4.3	24 \pm 3.6	22 \pm 2.6
γ -GTP (IU/l)	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
AIP (IU/l)	216 \pm 42.8	197 \pm 43.8	224 \pm 36.0	232 \pm 36.9
Total bilirbin (mg/dl)	0.2 \pm 0.05	0.2 \pm 0.05	0.2 \pm 0.04	0.1 \pm 0.05
Urea nitrogen (mg/dl)	15.7 \pm 2.18	15.4 \pm 1.69	16.6 \pm 2.29	16.1 \pm 2.47
Creatinine (mg/dl)	0.5 \pm 0.05	0.5 \pm 0.03	0.5 \pm 0.06	0.5 \pm 0.07
Glucose (mg/dl)	139 \pm 15.3	137 \pm 8.9	134 \pm 11.7	136 \pm 11.7
Total Chol. (mg/dl)	68 \pm 10.1	70 \pm 15.1	82 \pm 13.1	70 \pm 10.0
Triglyceride (mg/dl)	88 \pm 37.1	50 \pm 15.9*	74 \pm 26.9	77 \pm 72.2
Total protein (g/dl)	6.80 \pm 0.226	6.78 \pm 0.345	6.94 \pm 0.393	6.88 \pm 0.258
Albumin (g/dl)	3.60 \pm 0.134	3.58 \pm 0.109	3.67 \pm 0.113	3.63 \pm 0.106
A/G ratio	1.13 \pm 0.058	1.12 \pm 0.079	1.13 \pm 0.070	1.12 \pm 0.058
Inorganic phos. (mg/dl)	7.5 \pm 0.48	7.6 \pm 0.53	7.7 \pm 0.43	7.2 \pm 0.23
Ca (mg/dl)	9.6 \pm 0.22	9.6 \pm 0.21	9.8 \pm 0.29	9.7 \pm 0.27
Na (mEq/l)	144 \pm 0.8	144 \pm 0.3	144 \pm 0.9	144 \pm 0.7
K (mEq/l)	4.4 \pm 0.16	4.7 \pm 0.31	4.6 \pm 0.54	4.5 \pm 0.20
Cl (mEq/l)	100 \pm 1.3	100 \pm 1.1	100 \pm 1.8	100 \pm 0.7

Values are expressed as Mean \pm S.D.

* , Significantly different from the control group value at $P < 0.05$

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
Male				
Number of animals	10	9	10	9
Body weight (g)	528 ± 23.5	510 ± 24.7	519 ± 46.4	506 ± 27.7
Absolute organ weight				
Pituitary (mg)	14.3 ± 1.36	14.4 ± 1.30	14.2 ± 0.99	14.7 ± 1.45
Thymus (mg)	356 ± 54.4	353 ± 82.8	361 ± 108.4	391 ± 67.6
Liver (g)	14.48 ± 1.277	13.37 ± 0.817	14.55 ± 2.130	14.12 ± 1.455
Kidney (g)	3.14 ± 0.186	3.07 ± 0.330	3.34 ± 0.437	3.20 ± 0.211
Adrenal (mg)	70.2 ± 9.05	63.5 ± 11.04	64.9 ± 8.16	65.7 ± 10.00
Testis (g)	3.54 ± 0.210	3.45 ± 0.229	3.48 ± 0.398	3.55 ± 0.175
Prostate (g)	0.71 ± 0.209	0.63 ± 0.132	0.65 ± 0.109	0.73 ± 0.251
Epididymis (g)	1.28 ± 0.069	1.28 ± 0.091	1.29 ± 0.129	1.27 ± 0.058
Relative organ weight				
Pituitary (mg%)	2.7 ± 0.28	2.8 ± 0.23	2.8 ± 0.19	2.9 ± 0.26
Thymus (mg%)	67 ± 9.9	69 ± 16.2	69 ± 17.0	78 ± 16.3
Liver (g%)	2.74 ± 0.185	2.62 ± 0.174	2.79 ± 0.203	2.79 ± 0.186
Kidney (g%)	0.59 ± 0.032	0.60 ± 0.061	0.64 ± 0.058	0.64 ± 0.060
Adrenal (mg%)	13.3 ± 2.07	12.4 ± 1.88	12.6 ± 2.12	13.0 ± 1.84
Testis (g%)	0.67 ± 0.052	0.68 ± 0.070	0.67 ± 0.095	0.70 ± 0.037
Prostate (g%)	0.13 ± 0.039	0.12 ± 0.028	0.13 ± 0.031	0.14 ± 0.047
Epididymis (g%)	0.24 ± 0.018	0.25 ± 0.022	0.25 ± 0.030	0.25 ± 0.009
Female				
Number of animals	10	10	10	8
Body weight (g)	313 ± 12.2	320 ± 13.8	324 ± 11.5	314 ± 23.3
Absolute organ weight				
Pituitary (mg)	21.3 ± 2.95	21.3 ± 2.90	21.9 ± 1.29	20.3 ± 3.26
Thymus (mg)	212 ± 56.5	232 ± 39.5	216 ± 67.9	210 ± 79.7
Liver (g)	13.78 ± 0.612	13.50 ± 1.493	15.09 ± 1.021	14.91 ± 1.189
Kidney (g)	1.98 ± 0.163	1.98 ± 0.134	2.02 ± 0.157	2.05 ± 0.180
Adrenal (mg)	71.7 ± 11.83	71.9 ± 9.19	77.7 ± 9.04	70.1 ± 9.05
Relative organ weight				
Pituitary (mg%)	6.8 ± 0.94	6.7 ± 0.80	6.8 ± 0.31	6.5 ± 0.75
Thymus (mg%)	68 ± 18.3	73 ± 12.4	67 ± 22.6	65 ± 22.8
Liver (g%)	4.41 ± 0.172	4.22 ± 0.422	4.66 ± 0.259	4.75 ± 0.240
Kidney (g%)	0.63 ± 0.034	0.62 ± 0.039	0.63 ± 0.038	0.65 ± 0.073
Adrenal (mg%)	22.9 ± 3.33	22.5 ± 2.93	24.0 ± 2.60	22.3 ± 2.14

Values are expressed as Mean±S.D.