

Table 4 Summary of necropsy findings in rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex	Male					Female				
		Fate	Scheduled sacrifice				Dead	Scheduled sacrifice			
			0	8	40	200		0	8	40	200
Findings	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200	200	0	8	40	200	
Number of animals		10	9	10	9	1#	10	10	10	9	
Thymus											
Small		0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Stomach											
Thickening of wall in forestomach		0	0	0	9	1	0	0	0	1	
Heart											
Dilatation of atrium		0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Lung											
Congestion		0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Liver											
Congestion		0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Adrenal											
Whitish		0	0	0	0	0	0	0	0	2	
Brain											
Dilatation of cerebral ventricle		0	0	0	1	0	0	0	0	0	

#, One animal died at 43 days after commencement of treatment.

間に有意な差は認められなかった。また、ほとんどの雌が交配開始後4～5日以内に交尾し、交尾所要日数および交尾までに逸した発情期の回数ともに有意な差は認められなかった。

2) 分娩・哺育状態 (Table 7)

非分娩動物が200 mg/kg群で1例認められたが、他の母動物はいずれも正常な分娩を示した。妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率には、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。なお、非分娩動物には、剖検で子宮内に3例の死亡児が観察された。また、200 mg/kg群の着床数、着床率および分娩率が他の群に比べ若干低値を示したが、非分娩動物の着床数が3個であったことが反映したものであり、同群の他の動物の検査値にはいずれも異常は認められなかった。

哺育期間の観察において、哺育1～2日に投与後症状および削瘦を示した200 mg/kg群の母動物では哺育1日に児の胃内乳汁量が少なく、同腹児の17例中5例が死亡した。その他にはいずれの群の母動物にも異常は認められなかった。

3) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存率 (Table 7)

出産児数、出産生存児数、性比、出生率および新生児生存率ともに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。

(2) 出生児の観察

外表異常として、無尾および臍部の膨隆が40mg/kg群で各1例に認められたが、その他の新生児には異常は認められなかった。また、一般状態には各群いずれの新生児にも異常は認められなかった。

(3) 体重 (Table 7)

200 mg/kg群において、有意差は認められなかったが、哺育0および4日の体重、ならびにその間の体重増加量が雌雄とも対照群に比べ若干低値を示した。8および40 mg/kg群においては、雌雄とも対照群とほぼ同様な値を示した。

(4) 剖検

生存動物では、胸腺の頸部残留が8 mg/kg群で2例、臍ヘルニアが40 mg/kg群の腹部膨隆を示した例に観察されたが、他の新生児には異常は認められなかった。

Table 5 Summary of histopathological findings in rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ Findings	Sex Fate Dose (mg/kg/day)	Male					Female			
		Scheduled sacrifice				Dead	Scheduled sacrifice			
		0	8	40	200	200	0	8	40	200
Number of animals		10	9	10	9	1 [#]	10	10	10	9
Thymus										
Involution	+	*	*	*	*	*	0	0	1	1
Stomach										
Edema, forestomach	+	0	0	4	5	0	0/2 ^{&}	0/5 ^{&}	0/5 ^{&}	0/5 ^{&}
Erosion, forestomach	+	0	0	0	0	0	0/2	0/5	1/5	0/5
Hyperplasia, mucosa, forestomach	+	0	0	9	4	1	0/2	0/5	2/5	3/5
Inflammatory cell infiltration, forestomach	++	0	0	0	5	0	0/2	0/5	0/5	1/5
Inflammatory cell infiltration, forestomach	+	0	0	6	9	0	0/2	0/5	0/5	2/5
Heart										
Inflammatory cell infiltration, focal	+	6	*	*	1	0	0	*	*	1
Spleen										
Extramedullary hematopoiesis	+	0	*	*	0	0	0	*	*	1
Lung										
Congestive edema	++	*	*	*	*	1	*	*	*	*
Inflammatory cell infiltration	+	*	*	*	*	1	*	*	*	*
Liver										
Congestion	+	0	*	*	0	1	0	*	*	0
Extramedullary hematopoiesis	+	0	*	*	0	0	0	*	*	1
Hemorrhage, focal	+	2	*	*	0	0	0	*	*	0
Microgranuloma	+	9	*	*	6	0	1	*	*	0
Kidney										
Basophilic change, tubular epithelium	+	1	*	*	0	0	3	*	*	2
Calcification, corticomedullary junction	+	2	*	*	1	0	1	*	*	1
Cyst	+	1	*	*	0	0	1	*	*	0
Fibrosis, focal	+	0	*	*	0	0	1	*	*	1
Hyaline droplet, tubular epithelium	+	2	*	*	1	0	0	*	*	0
Testis										
Atrophy, seminiferous tubule	+	1	*	*	0	0				
Epididymis										
Inflammatory cell infiltration	+	1	*	*	1	0				
Prostate										
Inflammatory cell infiltration	+	10	*	*	4	0				
Pituitary										
Cyst	+	0	*	*	0	0	0	*	*	1
Hyperplasia, rathke's pouch	+	1	*	*	0	0	0	*	*	0
Adrenal										
Increase of fatty droplet, fascicular zone	+	0	*	*	0	0	0	0	0	1
Brain										
Dilatation of cerebral ventricle	+	0	*	*	1	0	0	*	*	0

+, Slight; ++, Moderate; *, Not examined.

&, Number of animals showing lesion / number of animals examined.

#, One animal died at 43 days after commencement of treatment.

Table 6 Fertility and pregnancy data 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
Estrous cycle (days)	4.3 ± 0.41 ^c	4.3 ± 0.35	4.6 ± 0.60	4.3 ± 0.42
Number of pairs examined	10	10	10	10
Number of pairs with successful mating	10	10	10	10
Mating index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	10	10	10	10
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until mating	2.3 ± 1.06	2.7 ± 1.16	3.0 ± 0.94	3.6 ± 3.89
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100

c) Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 7 Delivery and litter data 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
Number of females examined	10	10	10	9
Number of females with live pups	10	10	10	8
Gestation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	88.9
Gestation length (days)	22.3 ± 0.48 ^{b)}	22.5 ± 0.53	22.4 ± 0.52	22.4 ± 0.52
Number of corpora lutea	17.2 ± 1.81	17.5 ± 1.72	18.3 ± 2.26	17.9 ± 1.97
Number of implantation sites	15.9 ± 1.37	16.5 ± 1.96	17.2 ± 2.57	15.6 ± 4.58
Implantation index (%) ^{b)}	92.9	94.4	93.9	86.9
Delivery index (%) ^{c)}	96.7	90.7	93.5	84.9
Number of pups delivered	15.4 ± 1.78	15.0 ± 2.16	16.0 ± 2.05	16.4 ± 1.77
Number of live pups on day 0	15.3 ± 1.70	14.8 ± 2.10	15.8 ± 1.81	16.1 ± 1.73
Live birth index (%) ^{d)}	99.4	98.7	99.0	98.5
Sex ratio (male/female)	0.83(70/84)	0.74(64/86)	1.05(82/78)	0.87(61/70)
Number of live pups on day 4	15.3 ± 1.70	14.6 ± 2.46	15.6 ± 1.90	15.3 ± 1.98
Viability index on day 4 (%) ^{e)}	100.0	98.3	98.7	94.9
Body weight of pups (g)				
on day 0				
male	6.8 ± 0.66	6.7 ± 0.53	6.5 ± 0.85	6.1 ± 0.56
female	6.4 ± 0.62	6.3 ± 0.52	6.1 ± 0.78	5.8 ± 0.46
on day 4				
male	10.8 ± 1.06	10.7 ± 1.07	10.5 ± 1.09	9.7 ± 1.29
female	10.2 ± 1.06	10.2 ± 1.06	10.2 ± 1.11	9.3 ± 1.16
Body weight gain of pups (g)				
day 0 to 4				
male	4.1 ± 0.61	4.0 ± 0.59	4.0 ± 0.48	3.5 ± 0.79
female	3.8 ± 0.63	3.9 ± 0.57	4.1 ± 0.53	3.4 ± 0.78

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100

f) Values are expressed as Mean ± S.D.

死産児では、卵円孔開存が8, 40および200 mg/kg群で、各々1, 2, 1例に認められた。哺育1日以降の死亡例には異常は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

反復投与による影響として、200 mg/kg群の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。また、病理検査では、40 mg/kg以上の群で雌雄ともに前胃の粘膜上皮の増生などの被験物質に起因する変化が認められた。

雌で認められた投与後症状については、異性体である biosol および carvacrol で報告されている所見と同様の变化であり¹³⁾、いずれも投与後の時間経過とともに消失する一過性の変化であった。被験物質が属する phenol 誘導体は一般に中枢抑制作用を有することが知られており¹⁴⁾、被験物質も麻酔作用¹⁵⁾を有し、さらに筋収縮を直接抑制する作用¹⁶⁾もあることが報告されている。これらのことから、今回観察された投与後症状は被験物質の中枢抑制あるいは筋収縮抑制作用により発現した変化と考えられる。

病理検査において認められた前胃の変化については、肉眼的には肥厚として観察され、増生した粘膜の下織には炎症性細胞の浸潤あるいは水腫を伴うものも認められた。一般に phenol 類は刺激性を有し¹⁴⁾、被験物質および carvacrol も同様であることが報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。したがって、本変化については被験物質の刺激性に起因した変化と推察される。

200 mg/kg群の雄の死亡例には、病理検査で心房の拡張、炎症性細胞の浸潤を伴ったうっ血性肺水腫、および肝臓のうっ血など循環障害を示唆する変化が認められたが、死因につながる一般状態の変化は観察されず、原因を特定することはできなかった。しかし、雌では一部の動物に投与期間後半でも投与後症状が観察されていること、さらに被験物質が血圧降下作用および呼吸抑制作用¹⁹⁾を有することを考慮すると、この動物には何らかの要因で被験物質の作用が一時的に強く現れ、循環器系あるいは呼吸器系に異常を来して死亡した可能性が考えられる。

この他、胸腺の退縮が40および200 mg/kg群の雌で各1例に認められ、200 mg/kg群の動物では副腎束状帯の脂肪滴の増加を伴っていた。このうち40 mg/kg群の動物は同群の検査動物のなかで胃の変化が最も強く、また200 mg/kg群の例は分娩前後に投与後症状および消瘦を示した動物であった。胸腺の退縮はストレス状態の動物に認められる変化であり²⁰⁾、他の動物では同様な所見は認められなかったことから、これらの変化は感受性の高い動物が妊娠、分娩および哺育などの生理的な負荷に加えて被験物質の影響を受けたことにより生じた二次的な変化である可能性が考えられる。なお、200 mg/kg群の胸腺退縮を示した動物および非分娩動物で肉眼的に観察

された副腎の白色化については病理組織変化が認められず、毒性学的意義は不明であった。また、投与直後の一過性の流涎が200 mg/kg群の雌雄で観察されたが、単回皮下投与試験で大量投与した場合には流涎は発現していないことから²¹⁾、被験物質の局所刺激性に起因したものであると考えられる。

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、出産率には被験物質に起因する変化は認められなかった。分娩観察において、200 mg/kg群の1例は分娩せず、子宮内には未娩出の死亡胎児が観察されたが、同群の他の動物はいずれも正常に分娩し、分娩率にも異常はなかったことから、偶発的なものと判断した。また、哺育観察において、200 mg/kg群の1例で授乳量の減少が観察されたが、同群の他の母動物には異常は認められなかった。この動物には分娩前後に投与後症状および消瘦が観察されていることから、一時的に全身状態が悪化したことによる二次的な変化であり、被験物質の哺育行動への影響を示唆するものではないと考えられる。

新生児の検査において、200 mg/kg群で低体重および生後の体重増加抑制の傾向が認められ、被験物質の次世代発育への影響が示唆された。しかし、出産児数、出産生児数、性比、出生率および新生児生存率には被験物質の影響は認められなかった。また、外表、一般状態および剖検においても異常は認められなかった。したがって、被験物質の次世代に対する影響は比較的軽度なものと推察される。

被験物質は外因性 gonadotropin による幼若ラット子宮重量の増加作用を増強することから²²⁾、内分泌系あるいは生殖器系への影響が示唆されている。しかし、本試験においては最高用量の200 mg/kg群でも生殖機能および分娩、哺育に対する影響は認められなかった。また、鶏卵胚を用いた試験では四肢、眼、顎骨などの複合奇形を発現することが報告されているが²³⁾、ラットを用いた本試験においては催奇形性を示唆する変化は認められなかった。

以上のように、本試験では反復投与による影響として、親動物には40 mg/kg以上の群で、雌雄ともに前胃の病理変化、さらに200 mg/kg群では雄で体重増加抑制の傾向および死亡、雌で自発運動減少および歩行失調などの投与後症状が認められた。生殖・発生に及ぼす影響として、親動物の生殖機能および分娩、哺育機能には影響が認められなかったが、200 mg/kg群で新生児の発育への影響を示唆する変化が認められた。したがって、本試験条件下における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。

文献

- 1) P. M. Jenner et al., *Food Cosmet. Toxicol.*, **2**, 327 (1964).
- 2) 井関元八, 大阪市立大学医学誌, **5**, 111 (1956).
- 3) R. James and J. B. Glen, *J. Med. Chem.*, **23**, 1350 (1980).
- 4) C. W. Flickinger, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **37**, 596 (1976).
- 5) B. J. Dean, *Mut. Res.*, **47**, 75 (1978).
- 6) E. F. Davis et al., "Handbook of toxicology," ed by D. S. Dittmer, W. B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1959, pp.172-173.
- 7) A. Manabe et al., *Japan. J. Pharmacol.*, **44**, 77 (1987).
- 8) D. L. J. Opdyke, *Food Cosmet. Toxicol.*, **17**, 743 (1979).
- 9) P. Greaves, "Histopathology of preclinical toxicity studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp.112-114.
- 10) A. B. Kar et al., *J. Sci. Industr. Res.*, **19C**, 264 (1960).
- 11) M. J. Verrett et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 265 (1980).

連絡先

試験責任者：松浦郁夫
 試験担当者：田谷ゆかり，土谷 稔，涌生ゆみ，
 豊田直人，高野克代
 (株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Ikuo Matsuura (Study director)
 Yukari Taya, Minoru Tsuchitani,
 Yumi Wako, Naoto Toyota,
 Katsuyo Takano
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02, Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

チモールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Thymol on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、チモールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50.0~5000 μg /プレートの用量で行ったところ、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験とともに抗菌性が認められた。したがって、本試験ではS9 mix無添加試験を15.6~500 μg /プレート、S9 mix添加試験を62.5~2000 μg /プレート(TA1535およびTA1537は31.3~1000 μg /プレート)の範囲で用量を設定し、試験を実施した。

その結果、抗菌性はS9 mix無添加試験では、すべての検定菌で500 μg /プレート以上、また、S9 mix添加試験では、1000 μg /プレート(TA1535およびTA1537では500 μg /プレート)以上の用量で認められた。復帰変異コロニー数は、用いたすべての検定菌について、2回の本試験とともに、いずれの用量においても、2回の本試験とともに増加は認められなかったことから、チモールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

[検定菌]

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

*S. typhimurium*の4菌株¹⁾は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA*株²⁾は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用い、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

[被験物質]

チモール(CAS No. 89-83-8)は、分子量150.22の白色結晶である。試験には、和光純薬工業(株)製[ロット番号: CAN1119, 純度98%以上(不純物: 不揮発物0.05%以下および他のフェノール類を限度内含有)]のものを購入して、使用時まで室温で保管して用いた。

チモールは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性が良いことから、DMSOに20.0 mg/mlまたは50.0 mg/mlになるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、チモールのDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、本試験Iで調製した低濃度(156 $\mu\text{g}/\text{ml}$)溶液および高濃度(20.0 mg/ml)溶液について、室温遮光条件下で安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して101および102%であった。また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、それぞれ低濃度は95.7%、高濃度は97.5%であった。

[陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬(株))
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

[培地およびS9 mixの組成]

1) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

*: WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、

培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクトアガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および 5, 6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 を用いた。

〔試験方法〕

プレート法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに DMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。培養は 37℃ で 48 時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では 3 枚ずつ、各用量については 1 枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3 枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回、本試験は同一用量について 2 回実施し、結果の再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた 5 種の検定菌のうち、1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50.0 ~ 5000 μg/プレート の範囲で公比を約 3 とし、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験では 5 菌株すべてにおいて、500 μg/プレート 以上で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では TA1535 と TA1537 が 500 μg/プレート 以上で、その他は 1500 μg/プレート 以上の用量で抗菌性が認められた。

〔本試験〕

結果をそれぞれ Table 1, 2 に示した。チモールの用量を、S9 mix 無添加試験では 15.6 ~ 500 μg/プレート、S9 mix 添加試験では 62.5 ~ 2000 μg/プレート (TA1535 および TA1537 は 31.3 ~ 1000 μg/プレート) の範囲で公比を 2 とし設定し、試験を実施した。

2 回の試験のいずれにおいても、用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、チモールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの (陰性) と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." eds, by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
 試験担当者：坂本京子、川上久美子、原 巧、清水ゆり、松木容彦、中込まどか、飯田さやか
 (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
 Kyoko Sakamoto, Kumiko Kawakami,
 Takumi Hara, Yuri Shimizu,
 Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi,
 Sayaka Iida
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of thymol** in reverse mutation test (I) on bacteria

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	137 132 121 (130 \pm 8.2)	11 19 24 (18 \pm 6.6)	21 23 26 (23 \pm 2.5)	28 35 36 (33 \pm 4.4)	13 9 8 (10 \pm 2.6)	
	15.6	140 132 128 (33 \pm 6.1)	18 11 15 (15 \pm 3.5)	21 24 12 (19 \pm 6.2)	32 41 30 (34 \pm 5.9)	6 8 9 (8 \pm 1.5)	
	31.3	151 124 126 (134 \pm 15.0)	22 16 18 (19 \pm 3.1)	26 21 14 (20 \pm 6.0)	30 30 35 (32 \pm 2.9)	11 15 7 (11 \pm 4.0)	
	62.5	125 129 125 (126 \pm 2.3)	18 15 15 (16 \pm 1.7)	19 12 11 (14 \pm 4.4)	23 22 39 (28 \pm 9.5)	6 10 10 (9 \pm 2.3)	
	125	100 113 121 (111 \pm 10.6)	17 16 19 (17 \pm 1.5)	11 22 12 (15 \pm 6.1)	29 26 27 (27 \pm 1.5)	7 6 14 (9 \pm 4.4)	
	250	106 100 118 (108 \pm 9.2)	7 15 8 (10 \pm 4.4)	16 9 7 (11 \pm 4.7)	32 26 31 (30 \pm 3.2)	5* 8* 5* (6 \pm 1.7)	
	500	93* 79* 86* (86 \pm 7.0)	4* 0* 2* (2 \pm 2.0)	4* 12* 13* (10 \pm 4.9)	14* 18* 16* (16 \pm 2.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
S9mix (+)	0	111 134 144 (130 \pm 16.9)	11 19 13 (14 \pm 4.2)	30 18 23 (24 \pm 6.0)	39 34 37 (37 \pm 2.5)	11 7 17 (12 \pm 5.0)	
	31.3	ND	17 19 16 (17 \pm 1.5)	ND	ND	5 14 9 (9 \pm 4.5)	
	62.5	147 124 122 (131 \pm 13.9)	13 25 20 (19 \pm 6.0)	30 30 29 (30 \pm 0.6)	36 43 48 (42 \pm 6.0)	14 13 11 (13 \pm 1.5)	
	125	133 128 122 (128 \pm 5.5)	24 15 12 (17 \pm 6.2)	16 27 31 (25 \pm 7.8)	39 38 38 (38 \pm 0.6)	12 9 5 (9 \pm 3.5)	
	250	147 137 155 (146 \pm 9.0)	15 10 7 (11 \pm 4.0)	16 24 19 (20 \pm 4.0)	42 45 39 (42 \pm 3.0)	10 8 9 (9 \pm 1.0)	
	500	117 110 127 (118 \pm 8.5)	11* 8* 9* (9 \pm 1.5)	31 18 14 (21 \pm 8.9)	32 31 34 (32 \pm 1.5)	11* 8* 8* (9 \pm 1.7)	
	1000	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	14* 1* 7* (7 \pm 6.5)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
	2000	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)		0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)		
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	602 611 596 (603 \pm 7.5)	147 120 145 (137 \pm 15.0)	108 121 101 (110 \pm 10.1)	800 744 777 (774 \pm 28.1)	814 760 635 (736 \pm 91.8)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	1234 1347 1501 (1361 \pm 134.0)	278 249 236 (254 \pm 21.5)	1166 1335 1277 (1259 \pm 85.9)	456 476 462 (465 \pm 10.3)	184 264 259 (236 \pm 44.8)	

AF2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was above 98% and fixed compounds and other phenols were contained as impurity.

ND : Not done

Table 2. Mutagenicity of thymol** in reverse mutation test (II) on bacteria

With (+) or without (-) S9mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98		TA1537			
S9mix (-)	0	127	135	160	13	14	8	20	24	17	27	13	30	9	16	10
		(141 \pm 17.2)			(12 \pm 3.2)			(20 \pm 3.5)			(23 \pm 9.1)		(12 \pm 3.8)			
	15.6	110	108	114	5	10	11	23	29	20	26	26	30	5	11	11
		(111 \pm 3.1)			(9 \pm 3.2)			(24 \pm 4.6)			(27 \pm 2.3)		(9 \pm 3.5)			
	31.3	120	112	120	15	10	11	18	19	22	26	22	21	14	7	7
		(117 \pm 4.6)			(12 \pm 2.6)			(20 \pm 2.1)			(23 \pm 2.6)		(9 \pm 4.0)			
	62.5	125	125	112	8	12	14	25	19	15	30	27	27	13	5	9
		(121 \pm 7.5)			(11 \pm 3.1)			(20 \pm 5.0)			(28 \pm 1.7)		(9 \pm 4.0)			
125	142	137	105	13	13	17	15	27	10	22	21	19	8	7	9	
	(128 \pm 20.1)			(14 \pm 2.3)			(17 \pm 8.7)			(21 \pm 1.5)		(8 \pm 1.0)				
250	106	106	100	10	11	13	15	15	18	17	33	22	5	4	5	
	(104 \pm 3.5)			(11 \pm 1.5)			(16 \pm 1.7)			(24 \pm 8.2)		(5 \pm 0.6)				
500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	4*	0*	0*	14*	0*	4*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(1 \pm 2.3)			(6 \pm 7.2)		(0 \pm 0.0)				
S9mix (+)	0	131	150	134	16	11	13	23	22	20	31	29	31	13	13	13
		(138 \pm 10.2)			(13 \pm 2.5)			(22 \pm 1.5)			(30 \pm 1.2)		(13 \pm 0.0)			
	31.3	ND	ND	ND	12	20	16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	18	18	20
		ND			(16 \pm 4.0)			ND			ND		(19 \pm 1.2)			
	62.5	148	138	167	18	23	15	19	27	24	36	37	42	15	13	14
		(151 \pm 14.7)			(19 \pm 4.0)			(23 \pm 4.0)			(38 \pm 3.2)		(14 \pm 1.0)			
	125	147	118	115	8	19	19	28	26	22	31	40	56	13	18	15
		(127 \pm 17.7)			(15 \pm 6.4)			(25 \pm 3.1)			(42 \pm 12.7)		(15 \pm 2.5)			
250	156	140	126	13	11	16	28	23	17	41	54	48	18	15	8	
	(141 \pm 15.0)			(13 \pm 2.5)			(23 \pm 5.5)			(48 \pm 6.5)		(14 \pm 5.1)				
500	84	114	135	0*	0*	0*	29	21	23	11	20	16	0*	6*	0*	
	(111 \pm 25.6)			(0 \pm 0.0)			(24 \pm 4.2)			(16 \pm 4.5)		(2 \pm 3.5)				
1000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	16*	13*	12*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(14 \pm 2.1)			(0 \pm 0.0)		(0 \pm 0.0)				
2000	0*	0*	0*				0*	0*	0*	0*	0*	0*				
	(0 \pm 0.0)						(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)						
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2		9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1		80			
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	665	691	678	294	315	320	153	146	142	878	865	935	1270	1518	1580
		(678 \pm 13.0)			(310 \pm 13.8)			(147 \pm 5.6)			(893 \pm 37.2)		(1456 \pm 164.0)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5		2			
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	916	943	1176	265	268	313	1423	1378	1280	270	324	303	241	265	253
		(1012 \pm 143.0)			(282 \pm 26.9)			(1360 \pm 73.1)			(299 \pm 27.2)		(253 \pm 12.0)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was above 98% and fixed compounds and other phenols were contained as impurity.

ND : Not done

チモールの
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
Thymol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、チモールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)、短時間処理(6時間)ともに50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.08 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した高濃度群(0.08 mg/ml)では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix 非存在下で6時間処理した高濃度群(0.08 mg/ml)において細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix 存在下では、高濃度群(0.08 mg/ml)において、観察した細胞の5.5%に染色体異常が認められた。また、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、チモールは、染色体異常を誘発すると結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: Biocell)を10%添加したイーグルMEM(水製薬株)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37℃のCO₂インキ

ュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

チモール(略号: TM, CAS No.: 89-83-8, ロット番号: CAN1119, 和光純薬工業(株)製造)は、白色結晶で、水にやや溶け、エタノール、クロロホルム、ベンゼン、酢酸に易溶であり、融点51.5℃、沸点233.5℃、分子式C₁₀H₁₄O、分子量150.22、純度98%以上(不純物として不揮発物0.05%以下、他のフェノール類(含量未定)含む)の物質である。

被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)では、156.3 μg/ml~20.0 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.08 mg/mlであった(Fig. 1)。短時間処理のS9 mix 存在下および非存在下における50%の増殖濃度を明らかに越える濃度は、ともに0.07 mg/mlであった(Fig. 2)。なお、S9 mix 存在下において、高濃度になると増殖率の上昇が認められたが、これはディッシュの底面にS9もしくは被