

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 | |
| S9mix (-) | 0 | 127 135 160 (141 \pm 17.2) | 13 14 8 (12 \pm 3.2) | 20 24 17 (20 \pm 3.5) | 27 13 30 (23 \pm 9.1) | 9 16 10 (12 \pm 3.8) | | | | | | |
| | 15.6 | 110 108 114 (111 \pm 3.1) | 5 10 11 (9 \pm 3.2) | 23 29 20 (24 \pm 4.6) | 26 26 30 (27 \pm 2.3) | 5 11 11 (9 \pm 3.5) | | | | | | |
| | 31.3 | 120 112 120 (117 \pm 4.6) | 15 10 11 (12 \pm 2.6) | 18 19 22 (20 \pm 2.1) | 26 22 21 (23 \pm 2.6) | 14 7 7 (9 \pm 4.0) | | | | | | |
| | 62.5 | 125 125 112 (121 \pm 7.5) | 8 12 14 (11 \pm 3.1) | 25 19 15 (20 \pm 5.0) | 30 27 27 (28 \pm 1.7) | 13 5 9 (9 \pm 4.0) | | | | | | |
| | 125 | 142 137 105 (128 \pm 20.1) | 13 13 17 (14 \pm 2.3) | 15 27 10 (17 \pm 8.7) | 22 21 19 (21 \pm 1.5) | 8 7 9 (8 \pm 1.0) | | | | | | |
| | 250 | 106 106 100 (104 \pm 3.5) | 10 11 13 (11 \pm 1.5) | 15 15 18 (16 \pm 1.7) | 17 33 22 (24 \pm 8.2) | 5 4 5 (5 \pm 0.6) | | | | | | |
| | 500 | 0* 0* 0* (0 \pm 0.0) | 0* 0* 0* (0 \pm 0.0) | 4* 0* 0* (1 \pm 2.3) | 14* 0* 4* (6 \pm 7.2) | 0* 0* 0* (0 \pm 0.0) | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| S9mix (+) | 0 | 131 150 134 (138 \pm 10.2) | 16 11 13 (13 \pm 2.5) | 23 22 20 (22 \pm 1.5) | 31 29 31 (30 \pm 1.2) | 13 13 13 (13 \pm 0.0) | | | | | | |
| | 31.3 | ND | 12 20 16 (16 \pm 4.0) | ND | ND | 18 18 20 (19 \pm 1.2) | | | | | | |
| | 62.5 | 148 138 167 (151 \pm 14.7) | 18 23 15 (19 \pm 4.0) | 19 27 24 (23 \pm 4.0) | 36 37 42 (38 \pm 3.2) | 15 13 14 (14 \pm 1.0) | | | | | | |
| | 125 | 147 118 115 (127 \pm 17.7) | 8 19 19 (15 \pm 6.4) | 28 26 22 (25 \pm 3.1) | 31 40 56 (42 \pm 12.7) | 13 18 15 (15 \pm 2.5) | | | | | | |
| | 250 | 156 140 126 (141 \pm 15.0) | 13 11 16 (13 \pm 2.5) | 28 23 17 (23 \pm 5.5) | 41 54 48 (48 \pm 6.5) | 18 15 8 (14 \pm 5.1) | | | | | | |
| | 500 | 84 114 135 (111 \pm 25.6) | 0* 0* 0* (0 \pm 0.0) | 29 21 23 (24 \pm 4.2) | 11 20 16 (16 \pm 4.5) | 0* 6* 0* (2 \pm 3.5) | | | | | | |
| | 1000 | 0* 0* 0* (0 \pm 0.0) | 0* 0* 0* (0 \pm 0.0) | 16* 13* 12* (14 \pm 2.1) | 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 | 665 691 678 (678 \pm 13.0) | 294 315 320 (310 \pm 13.8) | 153 146 142 (147 \pm 5.6) | 878 865 935 (893 \pm 37.2) | 1270 1518 1580 (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 (1012 \pm 143.0) | 265 268 313 (282 \pm 26.9) | 1423 1378 1280 (1360 \pm 73.1) | 270 324 303 (299 \pm 27.2) | 241 265 253 (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

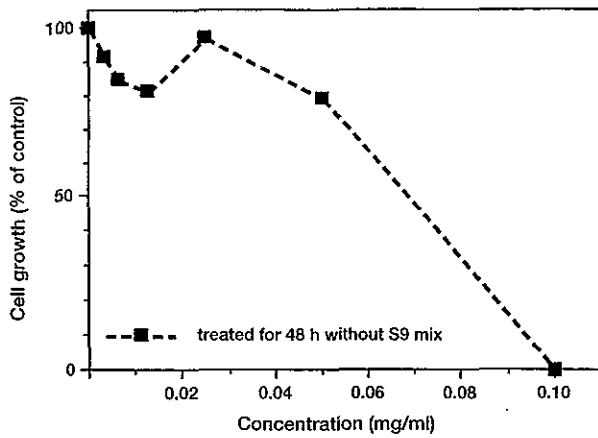


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells continuously treated with thymol

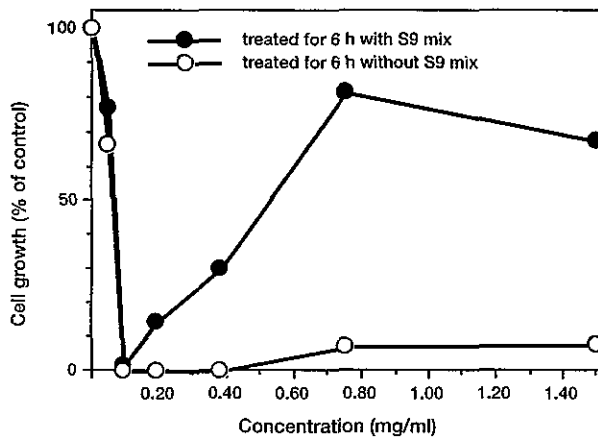


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with thymol

験物質と思われる沈殿が付着したためと考えられた。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果、50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度は、いずれも近似していることから、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理とも0.08 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、陰性および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林²⁾の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾(p<0.05)を行った。原則として以上2回の検定でも有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。チモールを加えて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、細胞毒性により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、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。チモールを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した高濃度群(0.08 mg/ml)では、細胞毒性により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、染色体の構造異常および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%(gapを含む)に染色体の構造異常が認められ、陽性の結果が得られた。また、いずれの処理群でも、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、チモールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に弱いながら染色体異常を誘発すると結論した。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with thymol (TM)* without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | Others ³⁾ | No. of cells with aberrations | | Polyploid ⁴⁾ (%) | Trend test ⁵⁾ | |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|-------------------------------|-----------|-----------------------------|--------------------------|----|
| | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | | TAG (%) | TA (%) | | SA | NA |
| Control | | | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.50 | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.13 | | |
| TM | 0.020 | 24 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.38 | | |
| TM | 0.040 | 24 | 200 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 (1.5) | 1 (0.5) | 0.00 | NT | NT |
| TM | 0.080 | 24 | 15 ^T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.00 ^{6)T} | | |
| MC | 0.00005 | 24 | 200 | 3 | 29 | 61 | 0 | 4 | 0 | 97 | 0 | 72 (36.0) | 70 (35.0) | 0.00 | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.38 | | |
| TM | 0.020 | 48 | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.13 | | |
| TM | 0.040 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.63 | NT | NT |
| TM | 0.080 | 48 | 0 ^T | | | | | | | | | | | T | | |
| MC | 0.00005 | 48 | 200 | 4 | 31 | 59 | 0 | 1 | 20 | 115 | 5 | 60 (30.0) | 57 (28.5) | 0.75 | | |

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at p<0.05 when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. 6) Forty cells were analysed. *: Purity was more than 98.0%, and unvolatile materials (≤0.05%) and other kinds of phenol (≤1.95%) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with thymol (TM)** with and without S9 mix.

| Group | Concentration (mg/ml) | S9 mix | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | Others ³⁾ | No. of cells with aberrations | | Polyploid ⁴⁾ (%) | Trend test ⁵⁾ | |
|-----------------------|-----------------------|--------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|----|
| | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | | TAG (%) | TA (%) | | SA | NA |
| Control | | | | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.00 | | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 0.13 | | | |
| TM | 0.020 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.38 | | | |
| TM | 0.040 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 11 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 0.00 | NT | NT | |
| TM | 0.080 | - | 6-(18) | 77 ^T | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 (5.2) | 3 (3.9) | 0.58 ^{6)T} | | | |
| CPA | 0.005 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.13 | | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | + | 6-(18) | 200 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 (1.5) | 2 (1.0) | 0.25 | | | |
| TM | 0.020 | + | 6-(18) | 200 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 0.13 | | | |
| TM | 0.040 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.13 | + | NT | |
| TM | 0.080 | + | 6-(18) | 200 | 1 | 5 | 7 | 0 | 2 | 0 | 15 | 11*(5.5) | 10 (5.0) | 0.75 | | | |
| CPA | 0.005 | + | 6-(18) | 200 | 10 | 193 | 272 | 1 | 1 | 360 | 837 | 1 | 176 (88.0) | 175 (87.5) | 0.00 | | |

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at p<0.05. 6) One hundred and seventy-three cells were analysed. *: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyploid at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **: Purity was more than 98.0%, and unvolatile materials (≤0.05%) and other kinds of phenol (≤1.95%) were contained as impurities.

文献

- 1) 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.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 4) 吉村 功, 大橋靖夫 編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 日下部博一, 橋本恵子,
長尾哲二, 太田 亮
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
Keiko Hashimoto, Tetsuji Nagao,
Ryo Ohta
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

チモールのマウスを用いる小核試験

Micronucleus Test of Thymol on Mice

要約

OECD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、チモールの生体内における細胞遺伝学的影響を評価するために、Crj:BDF₁雄および雌マウスを用い、強制経口投与による小核試験を、毒性予備試験および小核予備試験を行い、投与量および標本作製時期を設定した後、小核本試験を実施し、陰性の結果を得た。

毒性予備試験を行った結果、雄および雌マウスにおける最大耐量は、それぞれ2000 mg/kgおよび1250 mg/kgであった。小核予備試験において、2000、1750および1500 mg/kgを雄マウスに投与したところ、いずれの場合にも、死亡例が観察されたため、1250 mg/kgを雄および雌マウスに投与し、投与後24、48および72時間に骨髓の塗抹標本を作製した。小核出現頻度は、24時間群と他の群との間に明瞭な差は認められなかった。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率を指標とした骨髓細胞の増殖抑制も、認められなかった。これらの結果から、雄雌ともに小核本試験でのチモールの最高用量を1250 mg/kgとし、標本作製時期を投与後24時間に決定した。

チモールの312.5、625および1250 mg/kgを雄および雌マウスにそれぞれ投与し、投与後24時間目に標本を作製した。小核出現頻度はいずれの投与群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量依存性も認められなかった。また、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、いずれの投与群においても、溶媒対照群との間に有意差は認められず、被験物質が標的細胞を充分暴露した証拠は得られなかった。しかし、高用量に近い用量で致死となっていることから、充分評価に耐える試験結果であると考えられる。

以上の結果から、チモールは、本試験条件下でCrj:BDF₁雄および雌マウスの骨髓細胞において、小核誘発作用を示さないと結論した。

方法

1. 実験動物および飼育条件

実験には、日本チャールス・リバー(株)(CRJ)から購入した8週齢のCrj:BDF₁(C57BL/6とDBA/2の近交系間F₁)雄および雌マウスを、1週間以上予備飼育した後、異常の認められなかった動物を9週齢で試験に供した。

動物は、床敷としてホワイト・フレーク®(CRJ)を入れたTPX樹脂製ケージ(CRJ)に1匹ずつ収容し、バリアシステムの飼育室(設定温度:23±1℃、設定湿

度:55±5%、換気回数:約15回/時間、明暗サイクル:午前7時点灯、午後7時消灯)で、マウス繁殖用固型飼料(NMF)と水道水を自由に摂取させて飼育した。動物の群分けは自由群分け(無作為抽出)により行った。

2. 被験物質

チモール(CAS. No. 89-83-8, ロット番号:CAN1119, 和光純薬(株)製造)は、白色結晶で、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、他のフェノール類を限度内含む)の物質である。被験物質は、室温に保存した。

3. 検体の調製と投与方法

検体の投与容量はマウス体重kg当り10 mlとした。投与検体は所要量を正確に採取し、局方オリブ油に懸濁して最高用量の原液を調製した。それ以下の用量については、最高用量の調製液を上記の溶媒で希釈して所定の濃度に調製した。また、投与検体はすべて用時調製とし、単回強制経口投与した。

試験に先立ち、156.3 mg/kg群および1250 mg/kgの投与検体について室温遮光条件下でチモールの局方オリブ油中での安定性を調べた。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、103および96.6%であった。また、同検体について、含量測定試験を行った。その結果、156.3 mg/kg群および1250 mg/kgの投与検体について、含量はそれぞれ99.1および105%であった。

また、陽性対照物質、サイクロフォスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方生理食塩液に溶解して所定の濃度に調製し、50 mg/kgを単回強制経口投与した。

4. 標本の作製

小核の観察のための骨髓標本は、Schmidの方法^{1,2)}に従って作製した。すなわち、投与後所定の時間に頸椎脱臼法によりマウスを致死させて左右の大腿骨を摘出した。その両骨端を切断して、骨髓細胞を0.6 mlのウシ胎児血清(Hazleton)で洗い出し、遠沈管に集め、1000 rpmで5分間遠心分離して、上清を除いた。沈渣をピペティング後、細胞浮遊液の一部をスライドグラス上に塗抹(各個体につき3枚の標本)し、それぞれの骨髓標本に試験系識別番号および暗番号を記し、室温で一晩自然乾燥させた。乾燥した骨髓標本は5分間メタノールで固定し、標本観察時まで室温保存した。

5. 骨髓標本のアクリジンオレンジ(A.O.) 蛍光染色および小核試験の観察

骨髓標本のアクリジンオレンジ(A.O.) 蛍光染色および小核の観察は、林らの方法^{3,4)}に従って行った。0.04 mg/mlのA.O.溶液を上記のメタノールで固定済の骨髓標本上に数滴滴下し、カバーガラスをかけ、カバーガラス上から濾紙で余分な溶液を十分吸い取り、蛍光顕微鏡下で観察した。

骨髓標本はそれぞれの個体について、2名の観察者によりブラインド法で観察した。1個体あたり2000個の幼若赤血球(polychromatic erythrocytes)を観察し、その中の小核を有するものの数を記録した。また赤血球を1個体あたり500個観察し、その中の幼若赤血球の比率を調べて、骨髓細胞の増殖抑制の指標とした。

6. 有意差検定

それぞれの小核出現頻度について、Fisherの正確確率検定法⁵⁾により、溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で5%水準で有意差検定を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroniの補正⁶⁾を行った。更に、小核出現頻度の用量(対数値)依存性についてCochran-Armitageの傾向検定⁷⁾を5%水準で行った。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率について、それぞれ溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で、t検定を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroniの補正を行った。

7. 毒性予備試験(投与用量の決定)

小核試験に用いるチモールの投与量を決定するために、雄雌ともに各群5匹からなる7群を設け、投与量をそれぞれ、500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750および2000 mg/kgとした。投与当日を0日として4日間にわたり毎日一般状態を観察し、死亡の有無を調べた。

その結果、投与直後、すべての投与群において自発運動の低下が認められ、用量の増加とともに、よろめき歩行、腹臥、呼吸促迫などの毒性徴候が現れた。死亡例は、雄では認められず、雌では1500および1750 mg/kg群で各2匹確認された。したがって、チモールの強制経口投与によるCrj:BDF₁雄および雌マウスの最大耐量は、雄では2000 mg/kg、雌では1250 mg/kgであると判断し、それぞれを小核予備試験に用いる投与用量とした。

8. 小核予備試験(標本作製時期の決定)

雄マウスに、チモールの2000 mg/kgを投与したところ、15匹中7匹の死亡例が観察された。そこで雄マウスについて、さらに用量を下げて小核予備試験を実施したところ、1750mg/kg群で15匹中2匹、1500 mg/kg群で15匹中1匹の死亡が認められた。したがって小核予備試験において、雄、雌ともに同用量の1250 mg/kgを用いることとなったため、標本観察は雄マウスについてのみ行うこととした。雄マウス各5匹ずつからなる3群(24時間群、48時間群および72時間群)を設けた。

9. 小核本試験

小核予備試験において、雄雌いずれの投与群においても、小核の誘発および骨髓増殖抑制が観察されなかったため、小核本試験に用いる高用量を雄雌ともに1250 mg/kgとし、これをもとに公比2で減じ、中用量を625 mg/kg、低用量を312.5 mg/kgとした。また、高用量で、死亡が認められた場合にそなえて、低用量の1/2量の156.3 mg/kg群も用意し、溶媒対照群、陽性対照群を含めて雄雌それぞれ計6群を設定した。各群5匹の動物を無作為に割り当てた。標本作製時期は小核予備試験の結果に基づき、雄雌ともに投与後24時間とした。

結果および考察

雄および雌の小核本試験の結果をそれぞれTable 1および2に示す。雄雌ともに溶媒対照群と陽性対照群の小核出現頻度は、それぞれの過去5年間の背景データのばらつきの範囲内(平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差)であった。Fisherの正確確率検定法(Bonferroniの補正)による有意差検定の結果、小核出現頻度はチモールのいずれの投与群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。さらに、Cochran-Armitageの傾向検定の結果においても、用量に依存した有意な増加傾向は認められなかった。一方、CPAを50 mg/kg投与した陽性対照群での小核出現頻度は、5%水準で有意な増加がみられた。また、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、いずれの投与群においても、溶媒対照群との間に有意差は認められず、被験物質が標的細胞を充分暴露した証拠は得られなかった。しかし、高用量に近い用量で致死となっていることから、充分評価に耐える試験結果であると考えられる。

以上の結果から、チモールは、本試験条件下でCrj:BDF₁雄および雌マウスの骨髓細胞において、小核誘発作用を示さないと結論した。

Table 1. Results of micronucleus test in BDF₁ male mice after single administration of thymol by gavage

| Group | Animal No. | MNPCE / PCE ^{a)} | PCE / ERY ^{b)} |
|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Solvent control Olive oil 10 ml/kg | 1 | 2 / 2000 | 261 / 500 |
| | 2 | 3 / 2000 | 261 / 500 |
| | 3 | 4 / 2000 | 174 / 500 |
| | 4 | 0 / 2000 | 232 / 500 |
| | 5 | 3 / 2000 | 286 / 500 |
| | Total % (Mean ± S.D.) | 12 / 10000 (0.12 ± 0.08) | 1214 / 2500 (48.6 ± 8.6) |
| TM 312.5 mg/kg | 11 | 5 / 2000 | 238 / 500 |
| | 12 | 3 / 2000 | 293 / 500 |
| | 13 | 1 / 2000 | 272 / 500 |
| | 14 | 5 / 2000 | 311 / 500 |
| | 15 | 6 / 2000 | 279 / 500 |
| | Total % (Mean ± S.D.) | 20 / 10000 (0.20 ± 0.10) | 1393 / 2500 (55.7 ± 5.4) |
| TM 625 mg/kg | 16 | 3 / 2000 | 152 / 500 |
| | 17 | 1 / 2000 | 263 / 500 |
| | 18 | 1 / 2000 | 207 / 500 |
| | 19 | 8 / 2000 | 306 / 500 |
| | 20 | 6 / 2000 | 276 / 500 |
| | Total % (Mean ± S.D.) | 19 / 10000 (0.19 ± 0.16) | 1204 / 2500 (48.2 ± 12.3) |
| TM 1250 mg/kg | 21 | 1 / 2000 | 228 / 500 |
| | 22 | 3 / 2000 | 198 / 500 |
| | 23 | 3 / 2000 | 308 / 500 |
| | 24 | 1 / 2000 | 319 / 500 |
| | 25 | 7 / 2000 | 287 / 500 |
| | Total % (Mean ± S.D.) | 15 / 10000 (0.15 ± 0.12) | 1340 / 2500 (53.6 ± 10.5) |
| Positive control CPA 50 mg/kg | 26 | 27 / 2000 | 179 / 500 |
| | 27 | 17 / 2000 | 164 / 500 |
| | 28 | 22 / 2000 | 201 / 500 |
| | 29 | 51 / 2000 | 298 / 500 |
| | 30 | 40 / 2000 | 299 / 500 |
| | Total % (Mean ± S.D.) | 157 / 10000 (1.57 ± 0.70)*** | 1141 / 2500 (45.6 ± 13.1) |

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes/total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes/total number of erythrocytes observed

TM: thymol (purity was above 98% and fixed compounds and other phenol were contained as impurity), CPA: Cyclophosphamide

***: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level

Table2. Results of micronucleus test in BDF₁ female mice after single administration of thymol by gavage

| Group | Animal No. | MNPCE / PCE ^{a)} | PCE / ERY ^{b)} |
|---------------------------------------|----------------|---------------------------|-------------------------|
| Solvent control Olive oil 10 ml/kg | 51 | 7 / 2000 | 293 / 500 |
| | 52 | 4 / 2000 | 297 / 500 |
| | 53 | 0 / 2000 | 347 / 500 |
| | 54 | 5 / 2000 | 337 / 500 |
| | 55 | 1 / 2000 | 322 / 500 |
| | Total | 17 / 10000 | 1596 / 2500 |
| | %(Mean ± S.D.) | (0.17 ± 0.14) | (63.8 ± 4.8) |
| TM 312.5 mg/kg | 61 | 5 / 2000 | 242 / 500 |
| | 62 | 2 / 2000 | 302 / 500 |
| | 63 | 3 / 2000 | 302 / 500 |
| | 64 | 3 / 2000 | 352 / 500 |
| | 65 | 1 / 2000 | 318 / 500 |
| | Total | 14 / 10000 | 1516 / 2500 |
| | %(Mean ± S.D.) | (0.14 ± 0.07) | (60.6 ± 8.0) |
| TM 625 mg/kg | 66 | 3 / 2000 | 341 / 500 |
| | 67 | 1 / 2000 | 304 / 500 |
| | 68 | 3 / 2000 | 306 / 500 |
| | 69 | 2 / 2000 | 335 / 500 |
| | 70 | 6 / 2000 | 283 / 500 |
| | Total | 15 / 10000 | 1569 / 2500 |
| | %(Mean ± S.D.) | (0.15 ± 0.09) | (62.8 ± 4.8) |
| TM 1250 mg/kg | 71 | 2 / 2000 | 347 / 500 |
| | 72 | 3 / 2000 | 355 / 500 |
| | 73 | 1 / 2000 | 304 / 500 |
| | 74 | 3 / 2000 | 342 / 500 |
| | 75 | 2 / 2000 | 256 / 500 |
| | Total | 11 / 10000 | 1604 / 2500 |
| | %(Mean ± S.D.) | (0.11 ± 0.04) | (64.2 ± 8.2) |
| Positive control CPA 50 mg/kg | 76 | 28 / 2000 | 306 / 500 |
| | 77 | 31 / 2000 | 272 / 500 |
| | 78 | 31 / 2000 | 225 / 500 |
| | 79 | 17 / 2000 | 275 / 500 |
| | 80 | 36 / 2000 | 294 / 500 |
| | Total | 143 / 10000 | 1372 / 2500 |
| | %(Mean ± S.D.) | (1.43 ± 0.35)*** | (54.9 ± 6.2) |

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes/total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes/total number of erythrocytes observed

TM: thymol (purity was above 98% and fixed compounds and phenol were contained as impurity), CPA: Cyclophosphamide

***: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level

文献

- 1) W. Schmid, *Mutat. Res.*, 31, 9, (1975).
- 2) W. Schmid, "Chemical Mutagens," Vol. 4. ed. by A. Hollender, Plenum Press, New York, London, 1976, pp. 76-78.
- 3) M. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate, Jr., *Mutat. Res.*, 120, 241, (1983)
- 4) 林 真, "小核試験," サイエнтиスト社, 東京, 1991, pp. 44-55.
- 5) 吉村 功 編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエнтиスト社, 東京, 1987, pp. 76-78.
- 6) 吉村 功, 大橋靖雄 責任編集, "毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp.18-222.
- 7) 吉村 功 編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエнтиスト社, 東京, 1987, pp. 67-69.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹
試験担当者: 堀谷尚古, 加藤恵基, 原 巧,
関野早苗, 松木容彦, 飯田さやか,
中込まどか

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Naoko Horiya, Motoe Katoh, Takumi
Hara, Sanae Sekino, Yasuhiko Matsuki,
Sayaka Iida, Madoka Nakagomi
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

無断転載・複製（コピー）を禁ず