

最終報告書

チモールのラットを用いる急性毒性試験

(試験番号：04-203)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目次

要約	1
目的	2
材料および方法	2
結果	5
考察	6
文献	7

添付資料

群別平均表

Table 1	死亡率	8
Table 2	一般状態	9
Table 3	体重	10
Table 4	剖検	11

要 約

チモールの経口毒性について、ラットの反復投与毒性および生殖発生毒性についてはすでに検討され、報告¹⁾されている。

今回、チモールの急性毒性について、SD系[Crj:CD(SD)IGS]雌ラットを1群3匹として用い、固定用量を死亡状況を確認しながら段階的に単回経口投与する逐次法により検討した。

ステップ1として300mg/kgを投与した結果、死亡は認められなかった。ステップ2として、再度300mg/kgを投与したが、死亡は認められなかった。そこで、ステップ3では用量を上げて2000mg/kgを投与したが、死亡は認められなかった。ステップ4として、再度2000mg/kgを投与した結果、死亡は認められなかった。

300mg/kgでは、一般状態の変化は認められず、体重は順調な増加を示した。観察期間終了時の剖検において、内部諸器官の肉眼的変化は認められなかった。

2000mg/kgでは、自発運動の低下、横臥、歩行異常、筋弛緩および深大呼吸が投与日に認められた。翌日の観察2日より、下腹部の汚れおよび口鼻周囲の汚れが認められた。体重は、観察8日までは300mg/kgと比べて下廻る傾向が認められたが、観察15日には300mg/kgの体重と同等に回復した。剖検では、内部諸器官の肉眼的変化は認められなかった。

以上の結果より、チモールのラット経口投与における概ねの致死量は5000mg/kgと推定され、化学物質危険度分類(GHS)ではカテゴリー5に分類された。

目 的

チモールについて、ラットの経口投与における急性毒性を明らかにする。

材料および方法

1. 被験物質

チモール (CAS No. 89-83-8) は、水に難溶、エタノールやエーテルなどの有機溶媒に易溶な白色結晶性の塊である。試験には、

製造の試薬

を購入し、密栓

して冷暗所 (2~6°C) に保管・使用した。本被験物質の詳細は、Appendix 1 に示す。

試験に使用した被験物質は、投与終了後に分析し、試験期間中安定であったことを確認した (Appendix 2)。分析は、東京化成工業株式会社に委託して実施した。

2. 供試動物および飼育条件

SD 系 [Crj:CD(SD)IGS] の SPF 雌ラットを日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター (神奈川県厚木市下古沢 795) より搬入 (9 週齢の 16 匹、出荷時の体重範囲は 200~250g) し、5 日間試験環境に馴化させ、その間に臨床観察および体重測定による検疫を行ない、健康状態が良好であることを確認した。試験には、1 群の動物数を 3 匹とし、ステップ 4 まで実験ができるように、体重分布の中央値に近いものから 12 匹を選んで使用した。群分けは、ステップ 1 の投与前日の体重に基づく層化無作為抽出法により行ない、12 匹を 4 群に振り分けた。動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付とピクリン酸溶液でラットの被毛の一部を染色する方法で行なった。群分け時の平均体重 (体重の範囲) は、ステップ 1 で 241 (234~251) g, ステップ 2 で 239 (235~246) g, ステップ 3 で 240 (234~249) g, ステップ 4 で 244 (234~262) g, また投与時では、ステップ 1 で 216 (210~228) g, ステップ 2 で 214 (206~220) g, ステップ 3 で 215 (210~222) g およびステップ 4 で 228 (219~240) g であった。

動物は、馴化期間および投与後の観察期間とも、室温 22±3°C, 湿度 55±10%, 換気回数 10 回以上/時 (オールフレッシュエアー方式), 照明 12 時間/日 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定されたバリアーシステム動物室 (第 5 室) で、ステンレス製金網ケージ (260W×380D×180Hmm) に、3 匹ずつ収容して飼育した。飼

料（固型飼料ラボMRストック，日本農産工業株式会社，Lot.No.041158-2）と飲料水（孔径 1 μ m のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は，自由に摂取させた。給水には自動給水装置を用いた。

なお，動物の飼育期間中，動物室の温度は 22.2~22.7 $^{\circ}$ C，湿度は 54~56%の範囲で推移（Appendix 3）し，また飼料および飲料水の汚染物質の分析値（Appendices 4&5）は，当研究所が定めた基準値以下であることが確認された。従って，動物の飼育期間を通じて，試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3. 投与用量および投与方法

投与用量は，OECD の試験法ガイドライン 423（急性毒性等級法）の別表（Appendix 9 参照）に従って，5，50，300 あるいは 2000mg/kg の固定量とし，逐次法により各ステップごとに死亡状況を確認しながら，概略の致死量が推定できるまで段階的に，それぞれステップ 3 までは 1 日間隔で，ステップ 4 はステップ 3 の 5 日後に投与を行なった。本物質の致死量に関する既存情報として，ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性試験のための投与量設定試験で最高用量 300mg/kg の雄への 17 日間，雌への 7~9 日間の投与で，死亡は認められていないとの報告¹⁾があり，概略の致死量は 300mg/kg 以上と推定されたため，ステップ 1 の用量は 300mg/kg とした。

投与方法は，テフロン製胃ゾンデを用い，動物の胃内に単回投与した。なお，動物は各ステップ毎に，投与前日の午後 5 時から投与後 3 時間まで除餌し，飲料水のみを自由に摂取させた。投与は，午前中（ステップ 1 で 10:23~10:24，ステップ 2 で 9:37~9:38，ステップ 3 では 9:48~9:50，ステップ 4 では 9:46~9:47）に実施した。

4. 投与液の調製

本被験物質は，水に難溶であるため，1%メチルセルローズ水溶液[（メチルセルローズ 100cp：和光純薬株式会社（ロット番号 DWN4466），局方精製水：共栄製薬株式会社（ロット番号 181496）]に懸濁して投与液とした（300mg/kg 群：3w/v%，2000mg/kg 群：20w/v%）。投与液の調製は投与直前に行なった。投与液量は，体重 1kg 当たり 10mL とし，各個体の投与液量は投与直前の体重より算出した。

5. 観察事項

観察期間は投与後 14 日間とし、一般状態の観察および生死の確認は、観察 1 日（投与日）においては、投与後 1 時間までは継続して、その後は概ね投与後 2, 4 および 6 時間に観察した。観察 2 日は午前、午後の各 1 回、観察 3 日以降は午前中に 1 回行なった。体重は、観察 1（投与直前）、4, 8 および 15 日に測定した。剖検は、観察 15 日の観察終了後にエーテル麻酔により安楽死させ、内部器官を肉眼的に観察した。

6. 致死量の推定および化学物質危険度分類

OECD の試験法ガイドライン 423（急性毒性等級法）の別表（Appendix 9 参照）に従って、各ステップでの死亡率から概略の致死量を推定し、化学物質危険度分類の万国共通分類法 [Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures (GHS)] に従って、毒性の最も強いカテゴリー 1 から最も弱いカテゴリー 5 のいずれかに分類した。

結 果

1. 死亡率(Table 1)

ステップ 1 として 300mg/kg を投与したが、死亡は認められなかった。確認のため、ステップ 2 として再度 300mg/kg を投与したが、死亡は認められなかった。次に、ステップ 3 として 2000mg/kg を投与した結果、死亡は認められなかった。そこで、ステップ 4 として再度 2000mg/kg を投与したところ、死亡は認められなかった。このことから、毒性の強さは、化学物質危険度分類(GHS)における 2000~5000mg/kg の範囲を示すカテゴリ-5 に分類され、概ねの致死量は 5000mg/kg と推定された。

2. 一般状態(Table 2, Appendix 6)

300mg/kg において、観察期間中、一般状態の変化は認められなかった。

2000mg/kg においては、自発運動の低下、横臥、歩行異常、筋弛緩および深大呼吸が投与日に認められた。翌日の観察 2 日では、自発運動の低下が残る例もあったが、その他の症状は消失した。しかしながら、口鼻周囲の汚れが観察 3 日まで、下腹部の汚れが長い例で観察 8 日まで認められた。

3. 体重推移(Table 3, Appendix 7)

300mg/kg において、順調な体重増加を示した。

2000mg/kg では、観察 4 日および観察 8 日の体重が 300mg/kg の体重を下回る傾向にあった。観察 15 日では、300mg/kg の体重と同等に回復した。

4. 剖検(Table 4, Appendix 8)

観察期間終了時の剖検では、300mg/kg および 2000mg/kg とも、内部諸器官の肉眼的変化は認められなかった。

考 察

チモールを雌ラットに、ステップ 1 として 300mg/kg を単回経口投与したが死亡は認められず、ステップ 2 として再度 300mg/kg を投与したが、死亡は認められなかった。そこで、ステップ 3 として 2000mg/kg を投与したところ、死亡は認められなかった。ステップ 4 として 2000mg/kg を投与した結果死亡は認められなかった。

300mg/kg では、一般状態の変化は認められず、体重は順調な増加を示した。

2000mg/kg では、自発運動の低下、横臥、歩行異常、筋弛緩および深大呼吸が投与日に認められた。これらの症状は観察 2 日にはほぼ消失し、その後は、下腹部の汚れ或いは口鼻周囲の汚れが認められた。体重は、観察 8 日までは 300mg/kg と比べて下廻る傾向が認められたが、観察 15 日には 300mg/kg の体重と同等に回復した。

剖検では、300mg/kg および 2000mg/kg とともに、内部諸器官の肉眼的変化は認められなかった。

以上の結果により、チモールのラット経口投与における概ねの致死量は 5000mg/kg と推定され、化学物質危険度分類 (GHS) ではカテゴリ 5 に分類された。

文 献

- 1) 松浦郁夫, 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, 化学物質毒性試験報告, 4, 121-131, 1996.

Table 1 Mortality of female rats treated with thymol in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Number of animals treated	Number of animals that died							Mortality	Category (GHS)	LD ₅₀ (mg/kg)			
			1 ~0.5 ~1	2 ~2 ~4	3 ~6 ~24 (hrs)	4	5	6	7				8~15(days)		
1	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^a /3 ^b		
2	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	5	5000
3	2000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3		
4	2000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3		

a : Number of animals that died; b : Number of animals treated

Table 2

Clinical signs of female rats treated with thymol in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Signs	Grade	1					2	3	4	5	6	7	8	9~15(days)	
				~0.5	~1	~2	~4	~6(hrs)									
1	300	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		Signs		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	300	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		Signs		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2000	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		Decreased locomotor activity	1	0	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Abnormal gait	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypotonia	1	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Deep respiration	1	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled perineal region	1	0	0	0	0	0	2	2	2	2	1	1	1	0	0
Perioral smudge	1	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0		
4	2000	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		Decreased locomotor activity	1	1	2	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Abnormal gait	1	2	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypotonia	1	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Deep respiration	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Grade, 1 : Slight; 2 : Moderate

Table 3 Body weights of female rats treated with thymol in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Number of animals treated	Body weight (g)			
			1	4	8	15 (days)
1	300	3	216 ± 10 (3)	246 ± 12 (3)	254 ± 10 (3)	269 ± 13 (3)
2	300	3	214 ± 7 (3)	247 ± 16 (3)	261 ± 22 (3)	268 ± 10 (3)
3	2000	3	215 ± 6 (3)	216 ± 13 (3)	232 ± 5 (3)	252 ± 11 (3)
4	2000	3	228 ± 11 (3)	234 ± 9 (3)	249 ± 9 (3)	266 ± 19 (3)

Values represent mean body weight ± S.D. (number of animals examined)

Table 4 Incidence of necropsy findings of female rats treated with thymol in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Findings	Grade	Fate	
				Terminal kill	Found dead
1	300	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	
2	300	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	
3	2000	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	
4	2000	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	

Grade, 1 : Slight