



チモールの
細菌を用いる
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および方法	3
結果および考察	7
結 論	7
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1~3	

【要 約】

チモールの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、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および本試験を行った。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、S9 mix 無添加では5菌株すべてが 500 μg /プレート 以上で、S9 mix 添加では 1500 μg /プレート 以上 (TA1535, TA1537 は 500 μg /プレート 以上) の用量で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, 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、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の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。

【緒 言】

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た。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異⁽¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異⁽²⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する S9 mix 添加試験と、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【材料および方法】

〔検 定 菌〕

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

S. typhimurium の 4 菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、
から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年 5 月 9 日に から分与
を受けた。

検定菌は -80°C 以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について行った。

試験に際して、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°C 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。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は のロット番号 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) のものを購入した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

チモールは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号：KCL2807、) 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。

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秦野研究所において実施した。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、室温遮光条件下で調製後 4 時間ま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 101 および 102%であった。これらの値は当研究所で規定している基準内

(4時間後における平均含量が初期値の90%以上)であった(Appendix2)。

また、同じく本試験Iで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内(溶媒中での平均含量が添加量の90~110%)であった(Appendix3)。

[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))	ロット番号 46,	純度99.9%
SA	: アジ化ナトリウム	(和光純薬工業(株))	ロット番号 TWR3330, 純度90%以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641, 純度98%以上)
2AA	: 2-アミノアトラゼン	(和光純薬工業(株))	ロット番号 DSF2950, 純度90%以上)

AF2, 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを-20°C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 (TA菌株用)

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) バクアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオニン	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（ロット番号：DJ030HJ、1994年8月11日製造）を用いた。なお、培地 1 l 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	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バクトアガー (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 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	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 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 (キッコーマン(株)、ロット番号 RAA-309、1994年5月13日製造および RAA-317、同年10月27日製造)を用いた。PB および BF の投与量は 1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したもので、ラットの解剖および S9 の調製は 5 日目であった。

[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使用溶媒、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°C 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、それぞれそ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〕

結果を Table 1 に示した。チモールについて 50.0～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他は 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量を、S9 mix 無添加試験では 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、S9 mix 添加試験では 2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1535, TA1537 は 1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。チモールの用量を、S9 mix 無添加試験では 15.6～500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、S9 mix 添加試験では 62.5～2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1535 と TA1537 は 31.3～1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) の範囲で公比を 2 として 6 用量設定し、試験を実施した。2 回の試験のいずれも、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、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。

チモールについて実施したすべての試験において、陽性対照群ではいずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

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。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態、および試験計画書からの逸脱はなかった。

【文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N. : Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.L. : in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp.161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of thymol ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	92	88	83	14	10	13	31	25	24	17	20	27	8	3	8	
		(88 \pm 4.5)			(12 \pm 2.1)			(27 \pm 3.8)			(21 \pm 5.1)			(6 \pm 2.9)			
	50	85			15			26			20			7			
	150	81			21			32			21			9			
	500	0 *			0 *			9 *			13 *			4 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
S9mix (+)	0	85	85	110	16	15	16	23	23	23	26	34	31	8	7	7	
		(93 \pm 14.4)			(16 \pm 0.6)			(23 \pm 0.0)			(30 \pm 4.0)			(7 \pm 0.6)			
	50	111			9			31			26			10			
	150	89			9			28			40			9			
	500	93			5 *			24			40			14 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	451	557	477	308	292	250	146	123	118	686	670	745	835	1053	1077	
		(495 \pm 55.2)			(283 \pm 30.0)			(129 \pm 14.9)			(700 \pm 39.5)			(988 \pm 133.3)			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1144	1310	1219	333	240	272	1467	1476	1419	512	480	517	244	228	208	
		(1224 \pm 83.1)			(282 \pm 47.2)			(1454 \pm 30.6)			(503 \pm 20.1)			(227 \pm 18.0)			

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.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of thymol ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mea± S.D.)																			
		Base - pair substitution type						Frameshift type													
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537							
S9mix (-)	0	137	132	121	11	19	24	21	23	26	28	35	36	13	9	8	(130± 8.2)	(18± 6.6)	(23± 2.5)	(33± 4.4)	(10± 2.6)
	15.6	140	132	128	18	11	15	21	24	12	32	41	30	6	8	9	(133± 6.1)	(15± 3.5)	(19± 6.2)	(34± 5.9)	(8± 1.5)
	31.3	151	124	126	22	16	18	26	21	14	30	30	35	11	15	7	(134± 15.0)	(19± 3.1)	(20± 6.0)	(32± 2.9)	(11± 4.0)
	62.5	125	129	125	18	15	15	19	12	11	23	22	39	6	10	10	(126± 2.3)	(16± 1.7)	(14± 4.4)	(28± 9.5)	(9± 2.3)
	125	100	113	121	17	16	19	11	22	12	29	26	27	7	6	14	(111± 10.6)	(17± 1.5)	(15± 6.1)	(27± 1.5)	(9± 4.4)
	250	106	100	118	7	15	8	16	9	7	32	26	31	5 *	8 *	5 *	(108± 9.2)	(10± 4.4)	(11± 4.7)	(30± 3.2)	(6± 1.7)
	500	93 *	79 *	86 *	4 *	0 *	2 *	4 *	12 *	13 *	14 *	18 *	16 *	0 *	0 *	0 *	(86± 7.0)	(2± 2.0)	(10± 4.9)	(16± 2.0)	(0± 0.0)
S9mix (+)	0	111	134	144	11	19	13	30	18	23	39	34	37	11	7	17	(130± 16.9)	(14± 4.2)	(24± 6.0)	(37± 2.5)	(12± 5.0)
	31.3		ND		17	19	16		ND			ND		5	14	9					(9± 4.5)
	62.5	147	124	122	13	25	20	30	30	29	36	43	48	14	13	11	(131± 13.9)	(19± 6.0)	(30± 0.6)	(42± 6.0)	(13± 1.5)
	125	133	128	122	24	15	12	16	27	31	39	38	38	12	9	5	(128± 5.5)	(17± 6.2)	(25± 7.8)	(38± 0.6)	(9± 3.5)
	250	147	137	155	15	10	7	16	24	19	42	45	39	10	8	9	(146± 9.0)	(11± 4.0)	(20± 4.0)	(42± 3.0)	(9± 1.0)
	500	117	110	127	11 *	8 *	9 *	31	18	14	32	31	34	11 *	8 *	8 *	(118± 8.5)	(9± 1.5)	(21± 8.9)	(32± 1.5)	(9± 1.7)
	1000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	14 *	1 *	7 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(0± 0.0)	(0± 0.0)	(7± 6.5)	(0± 0.0)	(0± 0.0)
	2000	0 *	0 *	0 *				0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *				(0± 0.0)		(0± 0.0)	(0± 0.0)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
	Number of colonies / plate	602	611	596	147	120	145	108	121	101	800	744	777	814	760	635	(603± 7.5)	(137± 15.0)	(110± 10.1)	(774± 28.1)	(736± 91.8)
	Number of colonies / plate	1234	1347	1501	278	249	236	1166	1335	1277	456	476	462	184	264	259	(1361± 134.0)	(254± 21.5)	(1259± 85.9)	(465± 10.3)	(236± 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 3. Results of reverse mutation test (II) of thymol ** 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			WP2uvrA			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			12	20	16	ND			ND			18	18	20	(16 \pm 4.0)				(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