# チモールの
# マウスを用いる
# 小核試験

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】

要　約 …… 1
緒　言 …… 2
実験材料 …… 3
　1.　実験動物および飼育条件 …… 3
　2.　被験物質 …… 3
毒性予備試験（投与量の決定） …… 4
　1.　方　法 …… 4
　2.　結　果 …… 4
小核予備試験（標本作製時期の決定） …… 5
　1.　方　法 …… 5
　2.　結　果 …… 6
小核本試験 …… 6
　1.　方　法 …… 6
　2.　結果および考察 …… 8
結　論 …… 9
特記事項 …… 9
文　献 …… 10
　Tables　1～5

【要　　約】

被験物質チモール（ＴＭ）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:BDF$_1$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実施した。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、ＴＭの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、ＴＭの 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 を雄マウスに投与し、投与後24、48および72時間に骨髄の塗抹標本を作製した。小核出現頻度（小核を有する幼若赤血球の比率）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髄細胞の増殖抑制も、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。

ＴＭ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、被験物質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、ＴＭの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なかった。

以上の結果から、ＴＭは、本試験条件下で Crj:BDF$_1$ 雄および雌マウスの骨髄細胞において、染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示さないと結論した。

## 【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、チモールの生体内における細胞遺伝学的影響を調べるために、雄および雌マウスを用いて骨髄細胞における小核試験を実施した。まず、小核本試験に用いる投与量を決定するために毒性予備試験を行って最大耐量を求め、次に小核本試験における標本作製時期を決定するために小核予備試験を行い、それらの結果に基づいて小核本試験を行った。

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：474」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。

## 【実　験　材　料】

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㈱（CRJ）から購入した8週齢の Crj:BDF$_1$（C57BL/6 と DBA/2 の近交系間 F$_1$）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。入荷日とその匹数は以下の通りである。

| 試験 | 入荷日 | 入荷匹数 |
|---|---|---|
| 毒性予備試験 | 1994年9月28日 | 雄雌各36匹 |
| 小核予備試験 | 1994年10月12日 | 雄雌各31匹 |
| 小核予備試験（追加分） | 1994年10月19日 | 雄　36匹 |
| 小核本試験 | 1994年11月9日 | 雄雌各31匹 |

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（143×293×148 mm, CRJ）に1匹ずつ収容し、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、オリエンタル酵母工業㈱）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。個体識別はフェルトペンによりマウスの尾に群と個体番号を記し、ケージには群ごとに色の異なるカードに、試験系識別番号、群および個体番号を記載して個体識別の補助とした。

なお、すべての試験において、投与経路および投与回数は「OECD 毒性試験ガイドライン：474」に準拠し、単回強制経口投与とした。

2．被験物質

名　　称　：　チモール（CAS. No. 89-83-8）

英名（略称）　：　Thymol（ＴＭ）

製　造　元　：

ロット番号　：

純　　度　：　98％以上（不純物として、不揮発物 0.05％以下、他のフェノール類限度内を含む）

物理化学的性質　：　性状；白色結晶

分子量；150.22

分子式；$C_{10}H_{14}O$

融点；51.5℃

沸点；233.5℃

保　管　条　件　：　室温

購　　入　　先　：

【毒性予備試験（投与量の決定）】

1．方法

1）実験群の設定

小核試験に用いるチモール（TM）の投与量を決定するため、雄雌ともに各群5匹ずつからなる7群を設け、公差を 250 mg/kg とすることにより、投与量をそれぞれ、500、750、1000、1250、1500、1750 および 2000 mg/kg とした。

2）検体の調製および投与方法

検体の投与容量はマウスの体重 kg 当たり 10 mℓ とした。投与検体はTMの所要量を正確に採取し、局方オリブ油（東豊薬品㈱、ロット番号：39L）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た。

投与は強制経口投与とした。投与日は、雄雌ともに1994年10月5日に行った。投与時の体重範囲は雄で23～27g、雌で19～21gであった。

3）死亡率および一般状態の観察

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（1994年10月5～8日）。

2．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（Table １、２）。したがって、ＴＭ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、本実験条件下で、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ＴＭの投与用量とした。

【小核予備試験（標本作製時期の決定）】

１．方法

１）実験群の設定

雄マウスに、ＴＭ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、1750 mg/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（Table 1)。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、72時間群）を設け、小核本試験における適切な標本作製時期を決定することとした。

２）検体の調製と投与方法

検体の調製と投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。雄マウスへの投与は、1994年10月31日に行った。投与時の体重範囲は、24～28ｇであった。

３）標本の作製

小核の観察のための骨髄標本は、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、骨髄細胞を 0.6 mℓ のウシ胎児血清（Hazleton、ロット番号：12103343）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。沈渣をピペッティング後、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、それぞれの骨髄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。乾燥した骨髄標本は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。

4）骨髄標本のアクリジンオレンジ（A.O.）螢光染色および小核の観察

骨髄標本のアクリジンオレンジ（A.O.）螢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髄標本上に数滴滴下し、カバーグラスをかけ、カバーグラス上から濾紙で余分な溶液を十分吸い取り、螢光顕微鏡下で観察した。

骨髄標本はそれぞれの個体ついて、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、そのなかの幼若赤血球の比率を調べて、骨髄細胞の増殖抑制の指標とした。

2．結　果

結果は Table 3 に示した。小核出現頻度に関しては、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、この用量では、幼若赤血球の比率を指標とした骨髄細胞の増殖抑制も認められなかった。以上の結果から、小核本試験における標本作製時期を、投与後24時間に決定した。また、ＴＭの 1250 mg/kg 投与により、いずれの時間群においても、骨髄細胞の増殖抑制も認められなかったことより、小核本試験に用いるＴＭの最高用量を雄雌ともに 1250 mg/kg と決定した。

## 【小 核 本 試 験】

1．方法

1）実験群の設定

毒性予備試験および小核予備試験の結果に基づき、小核本試験に用いる最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、さらに、高用量群に死亡が認められた場合の予備群として 156.3 mg/kg を設けた。また、標本作製時期を投与後24時間に設定し、各群5匹ずつからなる6群を以下のように設けた。

i）溶媒対照群（局方オリブ油）

ii）TM 156.3 mg/kg 投与群

iii）TM 312.5 mg/kg 投与群

iv）TM 625 mg/kg 投与群

v）TM 1250 mg/kg 投与群

vi）陽性対照群（cyclophosphamide, CPA：50 mg/kg）*

* 当研究室で、本用量のCPAの強制経口投与により小核が有意に誘発されることが認められている。

2）検体の調製および投与方法

投与検体の調製および投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。また、陽性対照物質（CPA, Sigma Chemical Co.、ロット番号：73H0846）は、局方生理食塩液（㈱大塚製薬工場、製造番号：K3B88）に溶解して所定の濃度に調製し、10 mℓ/kg の容量で単回強制経口投与した。投与は、雄雌ともに1994年11月16日に行った。投与時の体重範囲は、雄で23～28g、雌で18～21gであった。

秦野研究所において、156.3 mg/kg 群および 1250 mg/kg 群の投与検体について室温遮光条件下で調製後4時間までのTM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。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（Appendix 1）。

また、同検体について、含量測定試験を行った。その結果、調製後の濃度は、いずれも当研究所で規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の 85～115%）であった（Appendix 2、3）。

以上の結果から、TMは局方オリブ油中では安定であり均一性も認められ、また調製検体中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

3）標本の作製方法および小核の観察

1250 mg/kg 群において雄雌ともに毒性徴候は認められたものの、死亡した個体がなかったため、156.3 mg/kg 群の標本作製は行わなかった。他の用量群の標本の作製および小核の観察は、小核予備試験の場合と同様に行った。ただし標本の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（1994年11月17日）とした。

4）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。

2．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 4 および 5 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±３×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ＴＭ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、ＴＭの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。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、ＴＭの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なかった。

## 【結　　論】

以上の結果から、本試験条件下では被験物質ＴＭは、骨髄細胞において、染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示さず、また骨髄細胞の増殖抑制作用も示さないと結論した。

## 【特　記　事　項】

全試験期間を通して、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑い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認められなかった。

## 【文　　献】


1）Schmid, W. : The micronucleus test. Mutation Res. 31 : 9-15 (1975)

2）Schmid, W. : The micronucleus test for cytogenetic analysis. in "Chemical Mutagens" vol. 4., Hollaender, A. ed., Plenum Press, New York, London (1976), pp.76-78.

3）Hayashi, M., Sofuni T., Ishidate M., Jr. : An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Res. 120 : 241-247 (1983)

4）林　真　：　「小核試験」，サイエンティスト社，東京　(1991), pp. 44-55.

5）吉村　功　編：「毒性・薬効データの統計解析」，サイエンティスト社，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」，サイエンティスト社，東京 (1987), pp. 67-69.