

micronucleus, nucleus, and cytoplasm than the single fluorescent staining with either AO or DAPI. To evaluate the practicality of the staining method, 12 laboratories participated in the collaborative trial and obtained similar MNHEP frequencies after treatment with 40 mg/kg DEN. This result indicated that the new staining method is powerful even for novice users of the liver micronucleus assay.

We chose the 4-week-old rat for the liver micronucleus assay based on our present results and also on the knowledge of age-related changes in metabolic enzyme profiles: Cytochrome P-450 content in young rats is similar to that in adult rats (Imaoka et al., 1991); there is no major difference between 30-day-old and 100-day-old rats in the activity of hexobarbital hydroxylation, *N*-demethylation of ethylmorphine, *O*-demethylation of *p*-nitroanisole or hydroxylation of aniline (Fumer et al., 1969). P-450-1A2, 2A1, 2B1, 2B2, 2E1, 3A1, and 3A2 activity levels reach a maximum at about 30 days of age, thereafter, the levels of these P-450 species plateau in the liver due to growth hormone action. Conversely, P-450C7, 2C11, 2C12, and 2C22 are expressed rapidly after 30 days of age (Kato and Yamazoe, 1992). Thus, a compound which is principally activated by

P-450C family, may not be easily detected by this assay. Further confirmation of this notion is being pursued.

Based on the present outcomes using DEN, we propose the following standard protocol for the young rat liver micronucleus assay:

- Animals: Young rats up to 4 weeks old.
- Route: Oral or intraperitoneal administration.
- Chemical dosing: Single, or repeatedly if necessary.
- Sampling time: 3–5 days after the last treatment.
- Hepatocyte preparation: Collagenase perfusion method.
- Staining: AO-DAPI double staining.

An extensive collaborative study for validation of the present method is still ongoing organized by The Collaborative Study Group of the Micronucleus Test – Mammalian Mutagenicity Study Group/Japanese Environmental Mutagen Society (CSGMT-MMS/JEMS). This involves evaluating micronucleus induction in young rat liver cells by hepatocarcinogens and some other related chemicals. The degree of validation will determine the extent to which the present method becomes recognized as a useful tool for evaluating genotoxicity of chemicals in the rat liver.

References

- Angelosanto FA: Tissues other than bone marrow that can be used for cytogenetic analysis. *Environ molec Mutagen* 25:338–343 (1995).
- Brahlwaite I, Ashby J: A non-invasive micronucleus assay in the rat liver. *Mutat Res* 203:23–32 (1988).
- Clici I, Fournier E, Melcion C, Cordier A: In vivo micronucleus test using mouse hepatocytes. *Mutat Res* 216:321–326 (1989).
- Committee on the Mutagenicity of Chemicals: Guidance on a Strategy for Testing Chemicals for Mutagenicity. (London 2000).
- Fumer KL, Giam TE, Stitzel RE: The influence of age, sex and drug treatment on microsomal drug metabolism in four rat strains. *Biochem Pharmacol* 18: 1635–1641 (1969).
- Hayashi M, Murita T, Kadama Y, Sofuni T, Ishitate M Jr: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using Acridine Orange coated slides. *Mutat Res* 245:245–249 (1990).
- Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12:186–202 (1911).
- Imaoka S, Fujita S, Funae Y: Age-dependent expression of cytochrome P-450s in rat liver. *Biochim biophys Acta* 1097:187–192 (1991).
- Grisham JW: A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: autoradiography with thymidine-³H. *Cancer Res* 22:842–849 (1962).
- Kastenbaum MA, Bowman KU: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9:527–549 (1970).
- Kato R, Yamazoe Y: Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex- and species-related differences in drug toxicity. *Toxicol Lett* 64/65:661–667 (1992).
- Merati E, Brambilla-Campari Q, Ghis M, Marcellì A, Brambilla G: Cinnamaldehyde-induced micronuclei in rodent liver. *Mutat Res* 322:1–8 (1994).
- Morita T, Asano N, Awogi T, Sasaki Y, Sudo S, Shimoda H, Sutoh S, Suzuki T, Wakata A, Sofuni T, Hayashi M: Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens, Groups 1, 2A and 2B. The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMSMMS. *Mutat Res* 389:3–122 (1997).
- Noguchi T: The development of testis micronucleus test (Abstract). 26th JEMS, Hatano, 92 (1997).
- Parton JW, Garratt MI: An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using four-week-old rats treated with known clastogens. *Environ molec Mutagen* 29:379–385 (1997).
- Rossi AM, Romano M, Zaccaro I, Pulci R, Saltona M: DNA synthesis, mitotic index, drug-metabolizing systems and cytogenetic analysis in regenerating rat liver. *Mutat Res* 182:75–82 (1987).
- Roy B, Das RK: Evaluation of genotoxicity of doxofazoline, an antidepressant drug, in mice in vivo. II. Micronucleus test in bone marrow and hepatocytes. *Mutat Res* 241:169–173 (1990).
- Sawada S, Yamanaka T, Yamatsu K, Furuhata C, Matsushima T: Chromosome aberrations, micronuclei and sister-chromatid exchanges (SCEs) in rat liver induced in vivo by hepatocarcinogens including heterocyclic amines. *Mutat Res* 251:59–69 (1991).
- Sipes IG, Gandolfi AJ: Biotransformation of toxicants, in Amdur MO, Doull J, Klassen CD (eds): *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, pp 88–126 (McGraw-Hill, New York 1993).
- Tates AD, Neuteboom I, Hofker M, Engels L: A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. *Mutat Res* 74:11–20 (1980).
- Zhurkov VS, Sycheva IP, Salamatuva O, Vyskubenko IF, Foldi EG, Sharenshova NI: Selective induction of micronuclei in the rat/mouse colon and liver by 1,2-dimethylhydrazine: a seven-tissue comparative study. *Mutat Res* 368:115–120 (1996).

「食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」に関する臨時委員会の活動中間報告

林 真^{1*} (委員長), 長尾 美奈子² (副委員長), 祖父尼 俊雄³, 森田 健¹, 能美 健彦¹, 本間 正充¹, 宇野 芳文⁴, 葛西 宏⁵, 佐々木 有⁶, 太田 敏博⁷, 田中 憲穂⁸, 中嶋 圓⁹, 布柴 達夫¹⁰

¹ 国立医薬品食品衛生研究所 〒158-8501 世田谷区上用賀1-18-1

² 共立薬科大学 〒105-8512 港区芝公園1-5-30

³ (株)ノバスジーン 〒192-8512 八王子市久保山町2-3

⁴ 三菱ウェルファーマ(株) 〒292-0818 木更津市かずさ緑足1-1-1

⁵ 産業医科大学 〒807-8555 北九州市八幡西区医学生ヶ丘1-1

⁶ 八戸工業高等専門学校 〒039-1104 青森県八戸市田岡木上野平16-1

⁷ 東京薬科大学 〒192-0392 八王子市堀之内1432-1

⁸ (財)食品薬品安全センター 〒257-8523 桑野市落合729-5

⁹ (財)食品農医薬品安全性評価センター 〒437-1213 静岡県福田町埴新田字荒浜582-2

¹⁰ 東北大学 〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

要 約

食品関連物質の遺伝毒性の評価、解釈をするための戦略を構築するため、日本環境変異原学会に臨時委員会を設立し、厚生労働科学研究費補助金食品安全性確保研究事業「既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究」の研究班と共同し、定例の検討会議を毎月開催し、統一的な考えについて検討を続けている。本戦略を構築するためのモデルとして、コウジ酸を選択し、評価に必要と考えられる試験を実施し、その結果の評価、解釈を国際的議論のもとに標準化可能なものとするため、海外から指導的立場にある研究者をコンサルタントとして招聘し、議論、提言を受けた。本臨時委員会の活動は3年計画で進められており、現在は約1年半が経過したところである。ここでは、本委員会の設置意図を中心に活動の中間報告を行う。

1. はじめに

赤色2号をはじめとするタール系食用色素、既存添加物「コウジ酸」、アクリルアミド等、食品添加物を始め

とする食品関連物質に関する安全、安心が国民の関心を集めている。特に発がん性の問題はがんが死亡原因の第一位であることから、国民の健康にとって重大な問題であり、食品添加物の安全性に関しても、最大の懸念はやはり発がん性である。発がん性が認められた場合、その発生機序に遺伝毒性が関与するかが重要な問題になる。がん原性物質であっても遺伝毒性が認められない場合には閾値を仮定することができ、一日摂取許容量(ADI)が設定可能であると考えられてきた。一方、遺伝毒性メカニズムが原因であるがん原性物質に関しては閾値およびADIを設定することはできない。すなわち暴露が非常に低くても依然としてリスクがあるとされてきた。ところが、化学物質の遺伝毒性に関する情報は安全性評価の一環として広く用いられているが、hazard identificationを目的とする場合が主で、risk assessmentを行うための戦略が確立されていない。その理由の一つとして、この「遺伝毒性には閾値がない」とする思想が根底にあり、hazard identificationがそのままrisk assessmentとして用いられてきたことにある。遺伝毒性の試験法に関してはICH、OECD、IWGT等により国際的な調和がなされてきたが、試験結果の評価、解釈(すなわちリスク評価)に関しては国際的な基準はない。ただし、英国のDepartment of Healthの諮問会議であるCOMによるガイダンスが影響力を発揮しており、米国EPAに

* E-mail: hayashi@nrihs.go.jp

受付: 2004年10月15日 受理: 2004年10月15日

日本環境変異原学会

よるポジションペーパーも同様の内容となっている。また、最近EUのCPMPからは医薬品の遺伝毒性不純物のリスク評価に関するドラフトが出されている。しかしながら、我が国ではこのような検討がなされていないのが現状である。このように、近年海外で、リスク評価に係る戦略を検討する機運が高くなってきていることを考え合わせると、我が国においても、化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関する基本的な考えを確立することは重要なことであると考えられる。そこで、専門家集団である日本環境変異原学会の中に臨時委員会を設け、この問題について検討を開始することとした。本臨時委員会では、検討した戦略を日本環境変異原学会の統一見解としてまとめ、国際的なコンセンサスを得た論文として公表する予定である。まず、すべての人の生活に関係する食品関連物質を取り上げた、食品関連モデル化合物としてコウジ酸について検証を重ねてきた。食品関連物質の遺伝毒性の考え方が確立できれば、医薬品、農薬、工業化学物質等への適用は可能と考える。

なお、本臨時委員会の活動は、厚生労働科学研究費補助金食品安全性確保研究事業「既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究」の研究班と合同で進めているものである。本臨時委員会の活動は現在も継続中であり、ここでは、活動中間報告としてその活動目的を述べ、初期約1年間の検討会(第1回-第13回)の議事要旨を本臨時委員会の活動報告として提示する。

2. 遺伝毒性の戦略

本臨時委員会が描く「遺伝毒性の評価・解釈のための戦略」とは、遺伝毒性のリスク評価における定量的評価の導入である。遺伝毒性を有する発がん物質は閾値ならびにADIが設定されず、食品添加物等においては使用禁止の措置がとられる。例えば、食品添加物では、動物に対し低用量で高頻度でがんを誘発する物と、高用量でも低頻度でしかがんを誘発しない物では、そのリスクの違いは考慮されていながらも関わらず、最終的に同じ扱いがなされる。すなわち、ゼロリスクの考えである。しかし、リスクとは確率であり、0.01%のリスクも50%のリスクも、それが0%ではないということのみで同等のリスクととらえることは、リスク評価においても、横くリスクマネジメントにおいても、もはや現実的ではないと考える。本臨時委員会は、遺伝毒性のリスク評価に定量的評価を導入し、より現実的な遺伝毒性のリスク評価法を構築したいと考えている。この考えは、発がんとの関連だけでなく、次世代への遺伝的影響の評価においても同様である。定量的評価には、動物の発がんにおける遺伝毒性の関与(メカニズム)、ヒトにおける当該メカニズムの発現、閾値の設定、ヒトの曝露量などの検討が不可欠である。また、アフラトキシンは、遺伝毒性発がん物質

であるにもかかわらず、避けることのできない汚染物質ということでTDI(耐容一日摂取量)が設定されている。この例からも理解されるように、遺伝毒性発がん物質であってもなんらかの「実務的閾値」を設定することは可能と思われる。そのための、理論的構築やデータベースによる検証(例えば、各種遺伝毒性試験における反応の強さとヒトにおける発がん性の有無の相関など)が必要となろう。

なお、遺伝毒性の「検出・評価・解釈」という用語は、「リスク評価」と同義に用いている。「検出」ではどのような試験の組合せが遺伝毒性に係るハザードの確認に有効なのか、「評価」では各種試験の重み付けやin vivo遺伝毒性試験の有用性や限界、またその用量や反応の程度はどうか、「解釈」ではどのような遺伝毒性のメカニズムによりハザードが生じているのか、そのハザードはヒトにおいても影響(発がん性、生殖細胞突然変異など)を与えるのか、閾値は設定できるのか、既知物質と比較しての影響はどうか、ということの意味している。

3. コウジ酸の検討結果

化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈(すなわちリスク評価)に関する基本的な考えを確立するためのモデル化合物として、最初にコウジ酸を選択した。コウジ酸は、麹菌に由来する天然成分であり、抗菌、抗酸化、抗変色作用を有する添加物として食品に用いられてきた。また、メラニン色素形成を抑制する作用があることから、化粧品や医薬部外品にも用いられてきた。しかしながら、既存添加物の安全性確認作業の一環として実施されてきた安全性試験によって、マウス及びラットにおいて肝臓に対する発がん性が示唆され、その遺伝毒性も検出されたことから、食品添加物としての使用は禁止されることとなった化合物である。

コウジ酸の遺伝毒性試験ならびに発がん性試験については、これまでにいくつかの既発表および未発表のデータがある。さらに、本臨時委員会においても厚生労働科学研究費研究班とともに、追加検討を行った。それら一連の試験の結果については、すでに長尾委員による報告があるので参照されたい(環境変異原研究, 26, 193-198, 2004)。結論として、コウジ酸は多くのin vitro遺伝毒性試験およびいくつかのin vivo遺伝毒性試験において陽性を示したことから、遺伝毒性物質であることは明らかであるが、試験用量を考慮するとその程度は弱いものと考えられる。一方、肝臓においてはわずかな8-OH-dG量の増加が見られたが、突然変異の増加は観察されず、初期1年間の検討で得られたデータからは、肝臓で示唆されている腫瘍誘発性を遺伝毒性によって合理的に説明することはできていない。

4. 検討会議概要

以下は、日本環境変異原学会臨時委員会：「食品および食品添加物等に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」および厚生労働科学研究費研究班：「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」による合同検討会の概要である。

4.1. 第1回検討会(2003年1月27日)

林委員長より、以下のように本委員会設置の主旨について説明があった。化学物質の遺伝毒性に関する情報は安全性評価の一環として広く用いられているが、hazard identificationを目的とする場合が主で、risk assessmentを行うための戦略が確立されていない。その理由の一つとして、「遺伝毒性には閾値がない」とする思想が根底にあり、hazard identificationがそのままrisk assessmentとして用いられてきたことにある。近年海外で、この戦略を検討する機運が高くなってきていることも考え合わせると、この時期に専門家集団である日本環境変異原学会の中に臨時委員会を設け、化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関する基本的な考えを確立することは重要なことであると考え。まず、全ての人の生活に関係する食品関連の遺伝毒性について検討する。最も安全性が要求される食品関連物質についての考え方が確立されれば、医薬品、農薬、工業化学物質等への適用は大きな問題にはならないと考える。

本委員会の目的として、我々の生活環境中に存在する化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関する戦略を日本環境変異原学会の統一見解としてまとめ、学会に報告するとともに論文として公表する。さらに、国際的なコンセンサスを得るため、海外の専門家にコンサルテーションをお願いする。なお、本臨時委員会としては、食品および食品添加物に焦点を絞り、それらの安全性に関する考え方をまとめることを、本臨時委員会の目的とする。

本委員会を取り巻く現状として、遺伝毒性の試験法に関してはICH、OECD、IWGT等により国際的な調和がなされてきたが、試験結果の評価、解釈に関しては国単位で検討が開始されている。特に、英国のDepartment of Healthの諮問会議であるCOMによるガイダンスが影響力を発揮しており、米国EPAによるポジションペーパーも同様の内容となっている。また、最近EUのCPMPから医薬品の不純物に関するドラフトが出され、コメントが求められている。しかし、我が国ではこのような検討がなされていないのが現状である。

今後の計画として、8名の委員をコアとし、会合を重ねて問題点の抽出、整理、議論、とりまとめを行う。それぞれの会合においてさらに専門家の必要な場合には個別に招聘することとし、議論の質と正確さを高める配慮

をする。具体的には、文献、ドキュメントの収集とそれらの整理、解析を行う。手始めとして、前述のCOMガイダンス、USEPAのポジションペーパー、EUCPMPのドラフト、食品添加物として議論された赤色2号およびコウジ酸の遺伝毒性に関する文書等を用いる。

本臨時委員会の特色としては、具体的なデータを基に議論を進めることを基本とし、具体的な議論の積み重ねの上に概念的な考察を加える。特に、閾値の問題に関しては十分な議論の上に、学会としての統一見解を示したい。その過程において、個々の試験法の限界ならびに結果の解釈についても議論を深める。検討内容に関しては随時日本環境変異原学会のHP上に公開し、学会員が自由に発言できる体制を考える。また、本年11月に開催される日本環境変異原学会第32回大会において検討結果(少なくとも中間的なまとめ)を発表する。さらに、この議論を国際的に認知されるよう、海外の専門家にコンサルテーションを年度内に開催するとともに、速やかに論文として公表することを目指す。

長尾副委員長より、具体的進め方につき提案があった。COMガイドラインの項目ごとに討議し、他の資料ともつき合わせて矛盾点・補足すべき点等を議論する。遺伝毒性試験ごとの結果と発がん性、次世代毒性との致性をクリアにして考えていきたい。その後、赤色2号等の現実のデータを当てはめてみることで、本委員会の特徴付けをしたい。この提案を受けて、以下のような質疑応答、意見交換がなされた。

- 食品添加物だけでなく食品そのものも対象とするのか？ その方向で考えている。
- 遺伝毒性の閾値をどう取り扱うか？：行政サイドからの要望もあり、practicalな閾値の設定が可能かどうかを議論したい。そのためには遺伝毒性のメカニズム解析が必要だろう。
- 遺伝毒性の総合的評価法を議論するのか、個々の化学物質の評価を議論するのか？：最終的には前者を考えたい。
- 基本的なstrategyはCOMガイダンスで大筋良いと思えるので、COMの問題点は何か、データが足りないなら何が足りないのかを明らかにできれば良いのではないか？：遺伝毒性の問題の有無を我々のstrategyできちんと評価することが主目的。COMが良いという結論ならばそれでも良い。その評価法を用いて、例えばコウジ酸(遺伝毒性、発がん性の陽性・陰性データが種々あり、現状では評価が困難)をきちんと評価できれば良い。
- Genotoxic non-carcinogenをどう考えるかも一つの方法論ではないか？：遺伝毒性をもつこと自体の危険性をアピールできれば、遺伝毒性試験の実施意義もアピールできる。

- 本委員会の最終結論をどのようにまとめるのか。そのイメージは(例えば、危険度につき何らかのcallを発信する等)? : 化学物質の卓なるclassificationではなく、risk評価まで踏み込みたい(できるか否かは別として)。
- 知りたいことは、何を具体的にどうすればものが言えるのかという点。また、COM等ではin vivoの結果を重視しているが、in vitro陽性の結果が何を意味するのかも検討すべき。
- Epigeneticなものをどう扱うか? : 本委員会の趣意とは異なるように思えるので、必要があれば考慮する。
- 各遺伝毒性試験の既知データを解析するにあたり、定量的概念(どの用量から陽性になっているか、1 gオーダーか1000 gオーダーかでは意味が違うのではないか)も考慮してはどうか。
- 代謝の種差も考慮すべき。ヒトに対する遺伝毒性の有無を最終的には評価すべきではないか。
- 先ずは、COMの各stageの試験法の整理(発がん性等との一致率の評価等: 分担者を決め、review paperを中心に調査)から始めてはどうか? : 定量的評価も考慮するなら、膨大な作業量になるため困難か。分担は決めず、各人が可能な範囲で調査してみる。Discrepancyのあるものを中心に調査する手もある。
- 総論からまとめていくのは大変な作業になりそうなので、各論から始めてはどうか? 先ずはコウジ酸の評価を行う。評価のために何が足りないかを議論すれば、必ずCOMに何が足りないかや遺伝毒性総合評価のstrategyが見えてくるのではないか? : この方向性で検討を開始することになった。コウジ酸に関する資料を配付し、各委員ごとにそのriskを考察して、次回の委員会で討論することになった。

4.2. 第2回検討会(2003年3月18日)

林委員長より、厚生労働科学研究費申請に関する説明があった。概要としては、戦略に関する理論を構築するために必要なデータを得るための実験も行うこととする。運営に関しては、研究班とJEMS臨時委員会は協力して事業を推進するものであり、今後は合同の会合を持つこととする。

国際ワークショップに関しては、本年度中に開催する必要がある。3日程度の会合を計画し、最初の2日間はクローズドな会議とし、3日目に公開のワークショップかシンポジウムを開催する。クローズドな会議では、その時点までにまとめた我々の考えについてコンサルテーションを受ける。公開ワークショップでは、我々の考え、コンサルテーションのまとめ、ならびに海外からの参加者にそれぞれの立場から講演してもらう。

4.3. 第3回検討会(2003年5月26日)

長尾委員より、本委員会の課題につき説明があった。遺伝毒性評価のためのstrategyとしてUK COMのガイダンスを参考にしたとき、そこに含まれる3つの課題(1. in vivo 遺伝毒性の検出法と評価基準の確立、2. 発がん性に繋がる事象か否かの判定、特にaneugenicityを含めるべきかどうか、3. 遺伝毒性発がん性物質と遺伝毒性物質の閾値)を中心に議論したいとのことであった。Heritableな影響、特に遺伝毒性非発がん性物質のgerm cellへの影響についても議論すべきとの意見が出され、第4の課題として加えることになった。委員会の具体的な取り組み方法に関して討議し、先ずは各ガイダンス(COM, ICH, CPMP, EPA, Health Canadaなど)の比較表を森田委員が中心となって作成し、相違点を明らかにしつつ問題点の議論を行うことになった。議論の中で試験系に関する疑問点が出てきた場合、その試験系に精通している委員または専門家によるレビューをその都度行うことになった。

研究班におけるコウジ酸とタール系色素の研究内容につき確認が行われた。コウジ酸に関しては食添用、部外品用、試薬を代表する3種のロットを選び、先ずはin vitro Comet assay(佐々木委員)とTA98, TA100を用いる細菌を用いる復帰突然変異試験(ブラックライトの同時照射実験を含む: 木田委員)を行う。その結果を見て他の試験系でも3種ロットでの評価が必要かを考える。³²Pポストラベル法によるDNA付加体形成試験(長尾委員)を実施する前に各ロットの不純物分析とその遺伝毒性確認を行い、その後DNA付加体形成試験を行うかどうかを考える。光遺伝毒性(プラスミドDNA鎖切断試験, Ames試験, 染色体異常試験, Comet assay等: 田中委員)は先ずプラスミドDNA鎖切断試験を行い、その後他の試験系の必要性を考える。新たに、コウジ酸とタール系色素に関して遺伝毒性との構造活性相関を調べることにする(林委員)。

4.4. 第4回検討会(2003年6月30日)

コウジ酸の試験進捗状況について、担当者から途中経過について説明がなされた。TA100, WP2uvrA/pKM101, +/-S9 mixにおいて陽性となり、ロット間で大きな差はなかった(太田委員)。TA100, -S9 mixで3ロットとも同様に陽性、分析も開始した(長尾委員)。Comet試験, WT1K1, -S9 mix, 4, 8 h処理した結果全て陽性で、ロット間で大きな差は認められなかった(佐々木委員)。

森田委員からリスクアセスメントの基礎的事項の概説の後、ICH-Q3C, CPMPのgenotoxic impuritiesに関するposition paper, DearfieldらによるUS EPAのposition paper, UKDHのCOMガイダンス, Health Canadaの工業化学物質に関する文書の詳しい紹介があった。さらに、それらの間の比較表が提示され、説明がなされた。

今回の検討会は、コウジ酸の既存データに基づく評価を分担して行うこととした。分担は、in vitro non mammalian(能美委員)、in vitro mammalian(祖父尼委員)、in vivo 試験(中嶋委員、林委員)、Comet(佐々木委員)、carcinogenicity(宇野委員)とした。

4.5. 第5回検討会(2003年7月22日)

コウジ酸の既存データに基づく評価のまとめが報告され、多くの議論がなされた。

1) In vitro mammalian test systems(祖父尼委員)

遺伝子突然変異試験、染色体異常試験、SCEおよび小核試験のデータが報告された。染色体損傷性について1000 g/mL以上の濃度で陽性となるケースが認められたが、コウジ酸の分子量が142であることから、10 mM(1420 g/mL)を上回る濃度での陽性結果の生物学的妥当性に疑問が呈された。1000 g/mL以上の濃度での細胞毒性、pHのデータの必要性が指摘され、pHについて中嶋委員が確認することとなった。そのデータに基づき、必要に応じ、田中委員が染色体異常試験(細胞毒性評価を含む)を実施することとなった。追加情報として、佐々木委員により、WTK-1細胞を用いた染色体異常試験の結果(約10 mM以上で陽性)が紹介された。会議後、長尾委員より、CHL細胞において72時間処理で見られる小核がaneuploidyによるものかどうかを検討してはどうかとの提案がなされた。また、祖父尼委員より、WTK-1細胞での染色体異常誘発性に関連し、TK6細胞での検討(トリパンブルー法による細胞数計測も含む)の必要性が提案された。佐々木委員により、これら試験の実施の可否について検討中。

本間委員より、TK6とWTK-1細胞を用いたコウジ酸のtk座位遺伝子突然変異試験の結果速報が提示され、両細胞で濃度依存的な突然変異頻度増加がみられた。これを受け能美委員より、トランスジェニックラットを使って長期発がん試験と遺伝子突然変異試験を並行して行い、発がん標的臓器(甲状腺と肝臓)での突然変異誘発性を調べることの必要性が提案された。

2) Comet assay(佐々木委員)

In vitro Cometでは、2500 g/mL以上の濃度で、用いた2種類の細胞で陽性となったこと、in vivo Cometでは、マウスを用いた2つの機関の結果の相違(機関Aは陰性、機関Bは胃と肝で陽性)、ならびにマウスとラットの陽性臓器の相違(マウス：胃と肝、ラット：胃と肝に加え肺と骨髄)が報告された。前者の相違の要因としてマウスの系統差、被験物質の相違、検体調製の微妙な相違などが考えられるが、実際のところ何に起因するかを確認する必要性が指摘された。A社のサンプルを分析にかけることが提案され、実施することとなった(長尾委員)。なお、機関Bにおけるin vivo Cometの陽性反応は弱いものであったが、BaPのような多環芳香族炭化水素が示

すComet像と類似していた。ただし、in vivo Cometでは、BaPのような多環芳香族炭化水素は弱い陽性しか示さない。

3) In vivo mammalian test systems(中嶋委員)

優性致死(陰性)、マウス(陰性)&ラット(陽性)骨髄/末梢血小核試験、マウス(陽性)&ラット(陰性)肝臓小核試験、ラット肝UDS試験(陰性)、マウスTG試験(陰性；肝臓)およびDNA付加体試験(ラット甲状腺、陰性)の結果が報告された。総合すると、コウジ酸のin vivo 遺伝毒性(小核誘発性として)はマウス肝およびラット骨髄にみられ、動物種および標的臓器に相違が認められることから、実際の曝露評価や代謝の検討が必要かもしれない。また、いずれの陽性反応も致死用量付近(1000 mg/kg以上)であることも重要なポイントとなる可能性がある。マウスTG試験では1600 mg/kgを28日間投与されているが、なぜ、そのような高用量の投与が可能であったのかに疑問が呈された。

4) Carcinogenicity(宇野委員)

コウジ酸による甲状腺腫瘍および肝腫瘍を検討した試験(マウスがん原性試験、p53-KO & 野生型マウス反復投与試験、ラット肝二段階発がん試験、ラット伊東モデル試験、甲状腺腫瘍検討試験)から、マウスおよびラットの甲状腺腫瘍はプロモーション作用によること、肝腫瘍については、プロモーション作用に加え、イニシエーション作用も否定できないことが報告された。甲状腺については、DNA付加体や8-OH-dGの検討がなされ陰性結果を示したが、肝臓の当該データがなく、その必要性が指摘された。8-OH-dGについては西委員による検討結果が待たれる。また、宇野委員からショウジョウバエ試験、RDS試験等の実施を計画していることが紹介された。会議後、7月中旬に開催されたトキシコロジー学会で、コウジ酸による肝RDSの陽性結果が報告された(2%混餌投与で投与開始約3日目と2週間目の解析で陽性、4週間後では陰性)ことから、宇野委員によるRDSの探索は、混餌と強制経口での比較を加えてみる予定とのこと。

5) In vitro non mammalian(太田委員)

Ames試験データについて報告され、公文文献のいくつかはデータの信頼性に疑問があることが述べられ、最終的な評価材料としないことが提案され、了解された。さらに、太田委員によって検討されたTA100、TA98、TA102およびWP2 *uvrA*/pKM101を用いたAmes試験のデータが紹介された(コウジ酸のいずれのロットも代謝活性化の有無にかかわらず陽性)。さらに、UVA照射の影響は受けなかったこと、変異のタイプに他の化合物ではあまりみられないA・T→C・G、G・C→C・Gがみられたことが報告された。会議後、能美委員より、コウジ酸の化学構造からどのようなDNA損傷作用が考えられるのか、化学の立場から検討することの必要性が、また、

長尾委員より、topoisomerase阻害活性の有無を検討することの必要性も提案された。

4.6. 第6回検討会(2003年8月20日)

コウジ酸の遺伝毒性について新しいデータが紹介された。光切断(田中委員)について、コウジ酸を用いた光プラスミド切断性試験と、それに対するラジカルスカベンジャーの影響に関する試験が実施された。コウジ酸は光照射によるDNA切断を誘発し、これにはスーパーオキシドおよび過酸化水素の発生が関与していることが示唆された。TK6/WTK-1細胞によるTK-遺伝子突然変異試験(本間委員)について、TK6、WTK-1細胞とも用量依存的に突然変異を誘発することが示された。細胞毒性の結果と同細胞の反応性から、コウジ酸は主として、点突然変異を誘発すること、細胞周期停止作用があることが指摘された。

特別講演として、大阪市立大学福高昭治先生より「Genotoxic carcinogenの閾値に関する研究」について講演が行われた。

4.7. 第7回検討会(2003年9月22日)

コウジ酸溶液pHに関して中嶋委員より紹介された。前回のデータよりさらに高濃度での検討が提案され、それに回答するものである。DMSO、生理食塩液ともに最高用量で6.9および6.7と軽度を低下が観察されたが、染色体異常誘発性が認められる低pHは6程度であるので、pHの変化が染色体異常誘発性の原因とは考えがたないことが確認された。

E. coli WP2 *uvrA*/pKM101および*E. coli* WP2/pKM101を用いた結果が太田委員より報告された。S9 mixの存在に関わらず用量依存的に復帰変異コロニーが増加したが、WP2 *uvrA*/pKM101でより強い誘発が観察され、酸化傷害のみでなく、bulky adductを形成している可能性が示唆された。

BMD(Bench-mark dose)およびVSD(Virtual Safe Dose)算出法が宇野委員によって紹介された。コウジ酸の雌マウスにおける甲状腺発がんのデータを用いてBMDの計算のデモが行われ、数学モデル(Gamma, Multistage, Logistic, Provit, Quantal-linear, Quantal-quadratic, Weibull model)の違いによりBMDの値に多少違いが出るが、その差は小さいことが示された。また、遺伝毒性試験、例えばin vivo小核試験データへの適用に関しても議論がなされ、陰性対照の値を10%上昇させる用量を指標にしてはどうかとの提案もなされた。今後、本委員会の提案の一つとして検討する必要がある。

William G. Thilly: Have environmental mutagens caused oncomutations in people? Nature Genetics, 34, 255-259(2003)が本間委員より紹介された。ポイントは、人にがんを引き起こす突然変異のほとんどは内的要因に

よるものであり、環境変異原が突然変異を誘発することにより人のがんを引き起こすという証拠は特別の場合を除きほとんどない(紫外線照射、がんの化学療法や、放射線療法)。環境要因は突然変異を誘発するというよりもむしろ、突然変異を持つ細胞を選択すると考えた方が、人での環境発がんの事実をうまく説明できるように思われる。以上の発表に関して多くの議論がなされ、本委員会のポジションペーパーを作り上げる場合にも参考になるが、遺伝毒性に関する考え方を単純化しすぎることなく、いろいろな角度から考察を加える必要があるとされた。

日本環境変異原学会発表の要旨について長尾委員から説明があり、ヒトに対するコウジ酸の暴露量を、天然に存在する可能性のある「みそ、醤油」から試算してみるという説明があった。

長尾委員から、これまでに得られた新しいデータのまとめおよび今後の検討の方向性に関する以下の提案がなされた。コウジ酸の変異原性についての整理では、コウジ酸のHPLC分離により、コウジ酸の分離がS9で変異原性を示した。コウジ酸以外の分離に変異原性があるか否か現在検討中である。大腸菌変異スペクトル解析により、G→Aが35%、その他は9~15%、AT塩基対の変異が37%と高いのが特徴である。In vitroヒトリンパ芽球株細胞でTK変異、MN、Cometの誘発がみられ、MNについてはaneuploidyであるか否か検討する必要があると思われる。TK変異については塩基置換、LOH、aneuploidyによる可能性があるが、このメカニズムについては特に検討せず、トランスジェニックラットの結果を待つ方針である。In vitro染色体異常について、ヒト細胞TK6およびWTK-1細胞を用いて検討する(佐々木委員)。In vivo genotoxicityの検出法のrecommendationを作る場合に重要となる問題として以下の事項があげられた:

- In vitroにおけるMNはin vivo情報のために重要か。In vivoと動物種を統一する必要は無いか。
- ヒトの細胞を使うことは良いが、MNについてはWTK-1、TK6細胞の結果は陽性であり、Human keratinocyte および Hep G2の結果と異なる。後二者の再現性を検討した上で、理由を検討する必要があると思われる。
- コウジ酸はdirect mutagenであるが、S9の存在下でも活性は低下しないので下記に関する問題は無いが、S9で不活性化されるものは、胃に対する作用を調べる必要がある。変異原性試験において胃で使えるシステムとしてCometのvalidationが重要である。

以上の提案について議論がなされた。In vitroでの小核誘発性に関し、数的異常によるものか否かを、本間委員がFISHで検討することとした。また、トランスジェ

ニックのデータが非常に重要であることが確認され、中嶋委員が担当することとなった。雄 MutaMouse を用い、3 および 1.5% の混餌で 4 週間の投与とし、肝臓における変異を調べる。他の臓器も凍結保存しておき、必要に応じて解析する。また、DNA シークエンスの解析が必要な場合には衛研が協力することとした。その他、雌雄を用いるべき、BMD が求められるように多くの用量段階について検討すべき、Comet、肝小核等を組みあわせて行ったら、等の意見が出されたが、さらに検討することとした。

4.8. 第8回検討会(2003年10月22日)

コウジ酸の SVK14 および HepG2 を用いた *in vitro* 小核試験の結果に関する祖父尼委員のレビューが紹介された。

コウジ酸のラット肝 RDS 試験およびショウジョウバエ試験の中間結果が宇野委員より報告された。RDS 試験は強制経口投与と混餌投与で行い、投与3日後に同条件とも最高用量で RDS が誘発された。肝の重量変化および病理組織変化はなかった。体重当たり投与量は混餌投与の方が多かったが、体重増加量は強制経口投与で強く抑制された。甲状腺重量は強制経口投与より混餌投与で著しく増加した。ショウジョウバエの DNA 修復および遊毛スポット試験は陰性であった。

コウジ酸の MutaMouse を用いた遺伝子突然試験の計画概要が中嶋委員によって紹介され、内容が協議された。投与用量は 1、2 および 3% とすること、摘出器官に甲状腺を加えることになった。

Kerry L. Dearfield et al.: Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Res.*, 521, 121-135 (2002) の JETOC による日本語の解説記事が森田委員より紹介された。

4.9. 第9回検討会(2003年11月20日)

コウジ酸の遺伝毒性について、長尾委員より新しいデータが紹介された。3 ロットのコウジ酸の各 HPLC 分画について復帰突然変異誘発能を検討したところ、ロット間に相違は認められず、また NMR 分析により活性物質はコウジ酸であることが確認された。このことから、既報告の相反する *in vitro* 試験結果は、各ロットに含有されている可能性のある不純物によるものではないことが明らかとなった。

日本環境変異原学会発表スライドの改訂版が長尾委員より提示された。スライドは若干の変更がかけられた後、最終版とされる予定である。今後、リスク評価に関し必要とされるであろう議論内容について、以下の項目が上げられた：

- 閾値以下のものであれば、いくら加えても問題はないのか？

- 化学物質の使用をやめた場合のリスクは？
- 何に使うかによって許容できるレベルは異なるのでは？
- 発癌性のリスクには閾値があっても、遺伝毒性のリスクとしてはどうか？

4.10. 第10回検討会(2003年12月25日)

中嶋委員から、コウジ酸の TG 試験 (1, 2, 3% 混餌) の進捗状況について説明がなされた。12月19日に解剖が終わり、必要な組織(肝臓、胃、結腸、腎臓、甲状腺)を凍結した。肝臓の一部を DNA の酸化的障害 (8-OH-dG) を検討するため葛西委員に送付した。マクロでは全処理群で甲状腺の肥大、および最高用量群で子宮の肥大 (5 倍程度) が観察された。また、最高投与群において軽度な体重増加抑制が認められたが、その他特記すべき事項はない。また、最終日には末梢血の AO 超生体染色による小核試験のための標本作製したので、順次解析予定である。さらに、肝臓の一部を用いて Comet 試験を実施するための準備を進めている。

森田委員から、Commission of the European Communities の Regulation of the European Parliament and of the Council, concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals (REACH) に関する紹介がなされた。一般化学物質が対象で、CMR effects (carcinogenicity, mutagenicity and toxicity for reproduction) を中心に考慮し、危険物を規制しようとするものである。生産量により要求される試験項目が変わる点、陰性の場合 *in vitro* の試験がなくても受け入れ可能な *in vivo* 試験結果があれば、それでの評価も行う点等が新しい点であろう。

4.11. 第11回検討会(2004年1月16日)

葛西委員からコウジ酸を投与した TG マウス肝における 8-OH-dG の測定結果の説明があった。以前の試験では、2% コウジ酸を 2 週間投与したラットの甲状腺で明らかな減少がみられたが、MutaMouse の肝では 3% 混餌投与群で有意に増加した。葛西委員の発表について質疑がなされた。主なものとしては、コウジ酸は抗酸化物質なのに今回 8-OH-dG が上がった理由に関し、アスコルビン酸でも高用量だと上がることが判っており、コウジ酸の構造から考えて、ラジカルができてきている可能性が指摘された。その他、ラットでは甲状腺での 8-OH-dG の低下がマウスでも再現可能かとの疑問が提示されたが、マウスの甲状腺は非常に小さく、技術的に困難であることが指摘された。また、データのばらつきに関する質問等が出された。また、反応の強さ、再現性に関する質疑、応答があった。

MutaMouse を用いる試験の進捗状況について中嶋委員から報告がなされた。現時点で、DNA 抽出まで終了

しており、これから解析にかかる。また、同じ動物での Comet assay (28日投与の3日後の測定)と末梢血MNは陰性であった。

4.12. 第12回拡大検討会(クローズド会議:2004年2月12~13日, 国際シンポジウム:2004年2月14日)

本検討会は、海外コンサルタント(M.J. Aardema, D. Benford, D.H. Blakey, S.M. Galloway, D. Kirkland, Y.J. Surh, V. Thybaud, D. Tweats, L. Müller)を招き、拡大検討会として2回に分けて開催した。

1) クローズド会議

第12回拡大検討会議を海外の識者を招いてのコンサルテーション会議として開催するにあたり、本検討会の背景および目的が林委員長より説明された。最終目標は、3年間(2003年4月~2006年3月)の研究期間の最後まで残り2年で、食品関連物質の遺伝毒性に関するリスク評価の戦略を構築し、提言をまとめることにある。

長尾委員より、食品添加物としてのコウジ酸の遺伝毒性リスク評価について説明がなされた。すなわち、日本における食品添加物の規制の歴史、今回のコウジ酸規制の理由、薬事食品審議委員会検討されたコウジ酸の発癌性ならびに遺伝毒性データの要約、それらを基にしたHERP法やBMD法による発癌リスクの計算結果などが報告され、極めて弱い反応しか示さない化合物の評価をどう扱うかについて問題提起を行った。

宇野委員より、コウジ酸の遺伝毒性に関する新規データについて説明がなされた。本検討会がこの1年間で実施した下記11種の試験/検討の結果を、データをふまえて報告した。

- 培養液のpH: 影響なし
- Ames試験における不純物の影響: コウジ酸に起因
- Ames試験(再確認など): 陽性
- 光プラスミド試験: 陽性
- TK6/WTK-1細胞による突然変異および小核試験: 陽性
- TK6/WTK-1細胞によるComet試験: 陽性
- TK6細胞による光遺伝毒性試験: 陽性
- ショウジョウバエ翅毛スポット試験: 陰性
- 雌MutaMouseによる肝臓遺伝子変異: 陰性
- 雌MutaMouseによる肝臓の8-OH-dG形成: 陽性
- ラット肝臓RDS試験: 陽性

海外コンサルタントを中心として、コウジ酸の発癌性および遺伝毒性データが検証された。速の議論は「コウジ酸はヒトにも該当する遺伝毒性発癌物質かどうか?」という点に集約された。その結果、結論を導くには現時点ではデータ間のギャップが多く、そのギャップを埋める必要があるとされた。相反する結果が得られた

場合には、一般的にはなんらかのクライテリアでその重み付けをすることがあり、その中ではGLP試験か非GLP試験なのか、発表された論文の掲載誌は何か、試験のデザインは適切か、著者の評判はどうなのか、といった点も考慮されることがあるとされた。コウジ酸については、肝発癌性が遺伝毒性メカニズムに起因するものか否かを評価するには、いくつかの不明点、疑問点あるいは問題点すなわちギャップが存在することが指摘された。例えば、発癌性データに関しては、肝臓傷の質(良性か悪性か)や用いたコウジ酸の質(かび毒の含有率など)が明らかでないこと、ノックアウトマウスを用いた検討では群あたりの匹数が少ないことなど、また遺伝毒性データに関しては、肝臓小核ではマウス陽性/ラット陰性、骨髄/末梢血小核ではラット陽性/マウス陰性のように明確に一致していない点のあること、Comet試験ではtail momentの測定が必要とされたことなどである。これらの事項を解決するには、スライド標本の再評価やADMEデータ収集を含む追加確認試験の実施などが必要と提言された。

2) 国際シンポジウム

第12回拡大検討会議「その2」を、「食品関連物質等のリスクアセスメント戦略」と題した国際シンポジウムとして開催するにあたり、まず、その趣旨が長尾委員より説明された。以下、海外シンポジスト7名および国内シンポジスト2名による発表ならびに総合討論が行われた。その演題の中で、クローズド会議をふまえ、海外コンサルタントの提言が報告された。本シンポジウムの開催により、遺伝毒性を中心とした食品関連化学物質の安全性に関心のある多くの参加者に、遺伝毒性発癌物質であっても閾値を設定できる可能性のあることが認識されたものと思われる。今後は、どのようなケースに閾値の設定が可能なのか、また、その設定はどのように行うのが適切で人々に受け入れられるものなのかを明らかにする必要がある。

4.13. 第13回検討会(2004年3月15日)

2004年2月の鎌倉、東京会議について、今回の会議の成果については、Dr. Tweatsより提出される報告書の内容が重要であり、報告書を検討した上で今後の方向性を検討する。会議ではコウジ酸の発がん性、特に肝臓に対する発がん性に疑問が集中した。コウジ酸に遺伝毒性であったとしても甲状腺がんとの直接作用の関係はないであろう。また、肝がんを引き起こすとしても、それが遺伝毒性によるものがはっきりしない。従って、肝臓に対する遺伝毒性の有無を明らかに必要があるのではないかと。肝臓での小核試験を実施する際の問題点(ラット or マウス、加齢による影響、肝部分切除の影響)が話し合われた。

次年度コウジ酸に関する試験としては以下の試験を追

加試験として行うことが提案された：肝小核，肝臓でのDNAアグクトの検出，光毒性を考慮したMLA，ラット肝UDS，TK試験。試験データの信頼性を向上させるため，GLPでの試験，もしくは試験プロトコル等の精査の必要性である。今年度でコウジ酸に関する試験を終了させ，試験結果については来年度中に論文にまとめることを目指す。

次回のモデル化合物としてはアマランス，もしくは他のアゾ化合物を候補とする。化合物が決まり次第，手分けしてこれまでの試験データをレビューする。具体的な進め方に関しては，Dr. Tweatsの報告書を精査した上で，

もう一度話し合う。

5. おわりに

「食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」に関する臨時委員会の目指しているところを軸に，活動中間報告をまとめた。コウジ酸1つを取り上げても，そのリスク評価は容易なものではなく，検討すべき事項は山積している。検討を重ね，残りの1年半で，JEMSの会員からも理解の得られる遺伝毒性の「検出・評価・解釈」についての戦略を構築したい。



Evaluation of developmental toxicity of β -thujaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats

M. Ema^{a,*}, A. Harazono^a, S. Fujii^b, K. Kawashima^a

^aNational Institute of Health Sciences, Osaka Branch, 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan

^bSafety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd., 364-24, Shin-oi, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido, 004-0839, Japan

Received 2 October 2002; accepted 17 October 2003

Abstract

The objective of this study was to evaluate the developmental toxicity of β -thujaplicin (TP) in rats. Pregnant rats were given TP by gastric intubation at 15, 45, or 135 mg/kg on days 6–15 of pregnancy. The maternal body weight gain during administration at 45 and 135 mg/kg and after administration at 136 mg/kg and adjusted weight gain at 45 and 135 mg/kg were significantly reduced. A significant decrease in food consumption during and after administration was found at 45 and 135 mg/kg. A significant increase in the incidence of postimplantation loss was found in pregnant rats given TP at 135 mg/kg. A significantly lower weight was found in female fetuses at 45 and 135 mg/kg and in male fetuses at 135 mg/kg. Although a significantly increased incidence of fetuses with skeletal variations and decreased degree of ossification were found at 135 mg/kg, no significant increase in external, skeletal and internal malformations was detected after administration of TP. The data demonstrated that TP had adverse effects on embryonic/fetal survival and growth only at maternal toxic doses. No adverse effects on morphological development were found in rats fetuses. Based on the significant decreases in maternal body weight gain and weight of female fetuses at 45 mg/kg and higher, it is concluded that the no-observed-adverse-effect levels (NOAELs) of TP for both dams and fetuses are considered to be 15 mg/kg in rats.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: β -Thujaplicin; Hinokitiol; Developmental toxicity; Teratogenicity; Rat

1. Introduction

β -Thujaplicin (TP; CAS No. 499-44-5; Hinokitiol; 4-isopropyltropolone) is a phenolic component of essential oils extracted from cypress trees. TP has been found to act as an antibacterial agent (Saeki et al., 1989; Osawa et al., 1990; Tonari, 1998) and an antitumor agent (Yamato et al., 1984; Inamori et al., 1993). In addition, it possesses phyto-growth-inhibitory effects (Inamori et al., 1991). TP is used as a natural food preservative in Japan.

Several reports on the toxicity of TP are available. In mutagenicity screening tests of TP, positive results were obtained in a Rec-assay with S9 mix at 1.0 mg/disk and chromosome aberration test in vitro at 0.002–0.003 mg/ml, but not in the Ames test or a micronucleus test in mice (Sofuni et al., 1993). The DNA damaging activity of TP was weak in a spore Rec-assay (Ueno and Ishizaki, 1992). The values of LD50 have been reported to be 504 mg/kg in male ddy mice and 469 mg/kg in female ddy mice after oral gavage of TP (Shimizu et al., 1993). Recently, Ogata et al. (1999) reported a significant increase in the incidence of fetuses with malformations after oral administration of TP at 560 mg/kg and higher on day 9 of pregnancy in ICR mice and that TP induced dysmorphism in cultured mouse embryos at concentrations of 6.25 and 12.5 μ g/ml. However, there is no information on the developmental toxicity of TP in rats. Therefore, the present study was conducted to evaluate the potential teratogenicity of TP after administration throughout organogenesis in rats.

Abbreviations: TP, β -thujaplicin; LOAEL, lowest-observed-adverse-effect level; NOAEL, no-observed-adverse-effect level.

* Corresponding author at present address: Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81-3-3700-9878; fax: +81-3-3707-6950.

E-mail address: ema@hlis.go.jp (M. Ema).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats (Jcl: Wistar, Clea Co., Ltd., Tokyo, Japan) were used throughout this study. Animals were reared on a basal diet (F-1; Funabashi Farm Co., Funabashi, Japan) and tap water ad libitum and maintained in an air-conditioned room at 24 ± 1 °C, with a relative humidity of $55 \pm 5\%$, under a controlled 12-h light/dark cycle. Virgin female rats, weighing 216–244 g, were mated overnight with male rats. The day when sperm were detected in the vaginal smear was considered to be day 0 of pregnancy. The pregnant rats were distributed on a random basis into four groups of 16–17 rats each and housed individually.

2.2. Chemicals and dosing

The female rats were dosed once daily by gastric intubation with TP (purity >98%, SEIWA Technological Laboratories Ltd., Tokyo, Japan) at a dose of 0 (control), 15, 45, or 135 mg/kg from day 6 through day 15 of pregnancy. The dosage levels were determined based on the results of our range-finding study in which administration of TP by gastric intubation on days 6–15 of pregnancy caused maternal deaths and decreased maternal body weight gain and caused an increase in postimplantation loss and decrease in fetal weight at 125 mg/kg and higher in rats. TP was dissolved in olive oil (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). The volume of each dose was adjusted to 5 ml/kg of body weight based on daily body weight. The control rats received olive oil only. The formulations were kept in a cool and dark place for no more than 7 days.

2.3. Observations

The maternal body weight and food consumption were recorded daily. The pregnant rats were euthanized by ether overdose on day 20 of pregnancy. The peritoneal cavity and uterus were opened, and the numbers of live and dead fetuses and of resorptions were counted. The gravid uterus was removed and the dams weighed again. The adjusted weight gain, i.e. maternal weight gain throughout pregnancy corrected for gravid uterine weight, was calculated. To confirm the dam's pregnancy status, the uteri were immersed in 2% sodium hydroxide solution for over 1 h. The uteri were cleared and the implantation traces were seen to be stained yellowish-brown (Yamada et al., 1985). The live fetuses removed from the uterus were sexed, weighed, and inspected for external malformations and malformations within the oral cavity. Approximately one-half of the live fetuses in each litter were randomly selected and fixed in alcohol, stained with alizarin red S (Kawamura et al., 1990) and

examined for skeletal malformations. The remaining live fetuses in each litter were fixed in Bouin's solution prior to dissection. To detect internal malformations, fetal heads were examined by the free-hand razor-blade sectioning method of Barrow and Taylor (1969) and the thoracic areas were examined by Nishimura's micro-dissecting method (1974), a modification of Barrow and Taylor's method.

2.4. Data analysis

The litter was considered the experimental unit. The initial body weight, body weight gain and food consumption of pregnant rats, numbers of implantations, postimplantation loss and live fetuses per litter and body weight of live fetuses were evaluated by analysis of variance, followed by Dunnett's multiple comparison test if differences were found. The incidences of post-implantation loss and fetal malformations per litter were analyzed by the Kruskal–Wallis test to assess the overall effects. Whenever a significant trend was noted, pairwise comparisons were made using the Mann–Whitney test. Fisher's exact test was used when the incidence in the control group was zero. The 0.05 level of probability was used as the criterion for significance.

3. Results

Table 1 shows the maternal findings in rats given TP during organogenesis. One pregnant rat was dead on day 20 of pregnancy at 135 mg/kg. The body weight gain on days 6–16 at 45 and 135 mg/kg and on days 16–20 at 135 mg/kg was reduced significantly. The adjusted weight gain, which indicates the net weight gain of pregnant rats, was significantly lower in the 45 and 135 mg/kg groups than in the control group. The food consumption on days 6–16 and days 16–20 was significantly lower in the 45 and 135 mg/kg groups than the control group. These findings indicate that the lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) and no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of TP for pregnant rats are 45 and 15 mg/kg, respectively.

Pregnancy outcome in rats given TP during organogenesis are presented in Table 2. Litters totally resorbed were found in three of the 16 pregnant rats at 135 mg/kg. A significant increase in the number of resorptions per litter and incidence of postimplantation loss per litter and a significant decrease in the number of live fetuses per litter were also noted at 135 mg/kg. The weights of live fetuses were significantly decreased at 45 mg/kg and higher in females and at 135 mg/kg in males.

A summary of morphological findings in live fetuses of rats given TP during organogenesis is shown in Table 3. No fetus with external malformations was observed in any group. Skeletal examination revealed

Table 1
Maternal findings in rats given β -thujaplicin (TP) by gastric intubation on days 6–15 of pregnancy

Dose (mg/kg)	0 (control)	15	45	135
No. pregnant rats	16	16	16	17
No. of dead rats	0	0	0	1
Initial body weight	227 \pm 8	227 \pm 7	227 \pm 6	227 \pm 6
Body weight gain during pregnancy (g) ^a				
Days 0–6	17 \pm 5	17 \pm 4	16 \pm 2	17 \pm 3
Days 6–16	45 \pm 4	39 \pm 6	32 \pm 7*	13 \pm 9*
Days 16–20	48 \pm 6	48 \pm 5	42 \pm 6	21 \pm 12*
Adjusted weight gain during pregnancy (g) ^{a,b}	39 \pm 7	36 \pm 8	28 \pm 10*	24 \pm 5*
Food consumption during pregnancy (g) ^a				
Days 0–6	105 \pm 7	101 \pm 6	98 \pm 5*	101 \pm 5
Days 6–16	157 \pm 12	147 \pm 13	129 \pm 12*	103 \pm 11*
Days 16–20	72 \pm 5	70 \pm 4	63 \pm 7*	66 \pm 6*

^a Values are given as mean \pm S.D.

^b Adjusted weight gain refers to maternal body weight gain excluding the gravid uterus.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Table 2
Reproductive findings in rats given β -thujaplicin (TP) by gastric intubation on days 6–15 of pregnancy

Dose (mg/kg)	0 (control)	15	45	135
No. litters	16	16	16	16
No. corpora lutea per litter ^a	16.3 \pm 1.3	16.3 \pm 1.3	15.7 \pm 1.4	16.3 \pm 0.9
No. implantations per litter ^a	15.4 \pm 1.4	15.5 \pm 1.2	14.8 \pm 1.7	15.6 \pm 1.3
No. of litters totally resorbed	0	0	0	3
No. resorptions per litter ^a	1.3 \pm 1.4	1.3 \pm 1.2	2.0 \pm 1.0	9.9 \pm 4.6*
No. dead fetuses per litter ^a	0.1 \pm 0.3	0	0	0
% Postimplantation loss per litter ^b	8.5	8.0	13.6	63.5*
No. live fetuses per litter ^a	14.1 \pm 1.4	14.3 \pm 1.5	12.8 \pm 1.8	5.7 \pm 4.6*
Sex ratio of live fetuses (male/female)	114/111	116/112	107/97	56/35
Body weight of live fetuses (g) ^a				
Male	3.39 \pm 0.19	3.26 \pm 0.19	3.25 \pm 0.18	2.71 \pm 0.21*
Female	3.19 \pm 0.18	3.13 \pm 0.18	3.02 \pm 0.19*	2.62 \pm 0.11*

^a Values are given as mean \pm SD.

^b (No. resorptions and dead fetuses/No. implantations) \times 100.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

one fetus with sternoschisis at 135 mg/kg. Skeletal variations in the vertebrae, ribs, and/or sternebrae were found in all groups. The incidences of fetuses with skeletal variations and fetuses with bipartite sternebrae and with rudimentary 14th ribs were significantly higher in the 135 mg/kg group than the control group. The numbers of ossification centers of the caudal vertebrae and of the sternebrae were significantly decreased at 135 mg/kg. Hypoplasia of the spleen occurred in two fetuses in one dam at 135 mg/kg. A few fetuses with thymic remnant in the neck and/or left umbilical artery were found in the control group and TP-treated groups. However, there was no significant difference in the incidence of fetuses with internal malformations and variations between the TP-treated groups and the control group. These findings indicate that the

lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) and no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of TP for fetal rats are 45 and 15 mg/kg, respectively.

4. Discussion

This study was designed to screen for general developmental toxicity in rats. Doses of TP expected to induce maternal and developmental toxicity, such as a decrease in maternal body weight gain and food consumption and in fetal weight and an increase in postimplantation loss, were given to pregnant rats to characterize the effects of TP on embryonic/fetal development. Maternal toxicity, as evidenced by a significant decrease in body weight gain and food consumption

Table 3
Morphological examinations in fetuses of rats given β -thujaplicin (TP) by gastric intubation on days 6-15 of pregnancy

Dose (mg/kg)	0(control)	15	45	135
<i>External examination</i>				
No. fetuses (litters) examined	225(16)	228(16)	204(16)	91(13)
No. fetuses (litters) with malformations	0	0	0	0
<i>Skeletal examination</i>				
No. fetuses (litters) examined	116(16)	117(16)	105(16)	49(13)
No. fetuses (litters) with malformations	0	0	0	1(1)
Sternumschisis	0	0	0	1(1)
No. of fetuses (litters) with variations	11(7)	8(4)	10(7)	21(11)**
Cervical rib	4(2)	3(1)	3(2)	1(1)
Splitting of thoracic vertebral bodies	0	1(1)	0	0
14th ribs				
Extra	0	0	0	4(3)
Rudimentary	2(1)	1(1)	2(2)	9(7)**
Bipartite sternbrae	1(1)	2(1)	1(1)	9(7)**
Asymmetry of sternbrae	5(5)	1(1)	4(3)	3(3)
Degree of ossification ^a				
No. of ossification centers of caudal vertebrae	3.3±0.4	3.1±0.4	3.2±0.4	2.8±0.3**
No. of sternbrae	4.9±0.4	4.9±0.6	4.8±0.5	3.9±0.7**
<i>Internal examination</i>				
No. fetuses (litters) examined	109(16)	111(16)	99(16)	42(12)
No. fetuses (litters) with malformations	0	0	0	2(1)
Hypoplasia of spleen	0	0	0	2(1)
No. of fetuses (litters) with variations	5(3)	3(3)	2(2)	2(2)
Thymic remnant in neck	4(3)	1(1)	2(2)	2(2)
Left umbilical artery	1(1)	2(2)	0	0

^a Values are given as mean±SD.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

during the administration period was found at 45 mg/kg and higher. Although pregnant rats in the 45 mg/kg group recovered with respect to body weight after cessation of administration of TP, such recovery did not occur in the high dose group. This may be due to a lack of conceptuses at 135 mg/kg. However, a significantly low adjusted weight gain at 45 mg/kg and higher may suggest maternal toxicity. These findings indicate that TP exerts maternal toxicity at 45 mg/kg and higher when administered during organogenesis in rats.

Developmental endpoints should include the number and percent of pre- and postimplantation loss, morphological alterations in fetuses, and decreased fetal weight (Kimmel and Price, 1990; Schardein, 2000; OECD, 2001). Schardein (2000) stated that fetal size is an important in the assessment of potential teratogen as an indicator of developmental toxicity, and reduction in size or growth retardation commonly occurs among fetuses of dams given dosages that are toxic to the dam, to the offspring, or both. In the present study, a significant increase in the incidence of postimplantation loss was found at 135 mg/kg and a significantly decreased weight of female fetuses was found at 45 mg/kg and higher. These findings indicated that TP is

embryolethal at 135 mg/kg and toxic to fetal growth at 45 mg/kg and higher when administered during the period of organogenesis.

As for morphological examinations in the fetuses of exposed mother, a few fetuses with skeletal or internal malformations were found in the 135 mg/kg group. The malformations observed in the present study are not thought to be due to the administration of TP, because they occurred at a very low incidence and are of types that occur sporadically among control rat fetuses (Kameyama et al., 1980; Morita et al., 1987; Nakatsuka et al., 1997). Several types of skeletal and internal variations were also found in both the control group and TP-treated groups. These variations are frequently observed in fetuses of rats at term (Kimmel and Wilson, 1973; Kameyama et al., 1980; Morita et al., 1987; Nakatsuka et al., 1997). In the 135 mg/kg group, a significant increase in the incidence of fetuses with skeletal variations and fetuses with bipartite sternbrae and with rudimentary 14th ribs, but no extra ribs, and a significant decrease in the degree of ossification were accompanied by a significant decrease in the fetal weight. These findings show a correlation between these morphological alterations and growth retardation in fetuses. Although a skeletal variation, i.e. super-

numerary extra 14th ribs, is a warning sign of possible teratogenicity, the rudimentary 14th ribs, sternbral variations, and bilobed centra of the vertebral column are a normal variation (Kimmel and Wilson, 1973). Chahoud et al. (1999) noted that variations are unlikely to adversely affect survival or health and this might result from a delay in growth or morphogenesis that has otherwise followed a normal pattern of development. Consideration of these findings together suggests that the morphological changes observed in the present study do not indicate a teratogenic response and that TP possesses no teratogenic potential in rats.

In a developmental toxicity study in mice in which a single administration of TP was given at 420, 560, 750, or 1000 mg/kg by gastric intubation on day 9 of pregnancy, maternal deaths, dams with litter totally resorbed, and a significant increase in embryoletality were found at 750 mg/kg and higher (Ogata et al., 1999). A significant increase in the incidence of fetuses with malformations was accompanied by a significant decrease in fetal weight at 560 mg/kg and higher. Two highest doses, 750 and 1000 mg/kg, were maternally lethal, and the dose level of 560 mg/kg was very close to the maternally lethal dose. Thus, fetal malformations occurred after a single administration of TP at high doses in a single species. In other words, TP may be capable to produce fetal malformations under extreme experimental conditions in mice. Studies in additional species would be of great value in evaluating developmental toxicity of TP in conventional experimental conditions. We demonstrated here that TP possesses no adverse effects on morphological development in rat fetuses when administered during the whole period of organogenesis at doses which caused a decreased fetal weight, increased incidence of postimplantation loss, and maternal toxicity.

In conclusion, the administration of TP to pregnant rats throughout organogenesis had adverse effects on maternal rats and embryonic/fetal survival and growth but had no adverse effects on morphological development of fetuses even at maternally toxic and embryoletal doses. The data indicate that TP adversely affected the embryonic/fetal survival and growth only at maternally toxic doses in rats. Based on the significant decreases in maternal body weight gain and weight of female fetuses at 45 mg/kg and higher, it is concluded that the no-observed-adverse-effect levels (NOAELs) of TP for both dams and fetuses are considered to be 15 mg/kg in rats.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from Ministry of Health and Welfare, Japan.

References

- Barrow, V.M., Taylor, W.J., 1969. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *Journal of Morphology* 127, 291–306.
- Chahoud, I., Buschmann, J., Clark, R., Druga, A., Falke, H., Faqi, A., Hansen, E., Heinrich-Hirsch, B., Helleig, J., Lingk, W., Parkinson, M., Paumgartner, F.J.R., Pefl, R., Pfatzek, T., Scialli, A.R., Seed, J., Stahlmann, R., Ulbrich, B., Wu, X., Yasuda, M., Younes, M., Solecki, R., 1999. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Report of the second workshop on the terminology in developmental toxicology. Berlin, 27–28 August 1998. *Reproductive Toxicology* 13, 77–82.
- Inamori, Y., Nishiguchi, K., Matsuo, N., Tsujibo, H., Baba, K., Ishida, N., 1991. Phytogrowth-inhibitory activities of tropolone and hinokitiol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39, 2378–2381.
- Inamori, Y., Tsujibo, H., Ohishi, H., Ishii, F., Mizugami, M., Aso, H., Ishida, N., 1993. Cytotoxic effect of hinokitiol and tropolone on the growth of mammalian cells and on blastogenesis of mouse splenic T cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 16, 521–523.
- Kameyama, Y., Tanimura, T., Yasuda, M., 1980. Spontaneous malformations in laboratory animals—photographic atlas and reference data. *Congenital Anomalies* 20, 25–106. (Japanese).
- Kawamura, S., Hirohashi, A., Kato, T., Yasuda, M., 1990. Bone-staining technique for fetal rat specimens without skinning and removing adipose tissue. *Congenital Anomalies* 30, 93–95.
- Kimmel, C.A., Wilson, G.J., 1973. Skeletal deviations in rats: malformations or variations? *Teratology* 8, 309–316.
- Kimmel, C.A., Price, C.J., 1990. Development toxicity studies. In: Arnold, D.L., Grice, H.C., Krewski, D.R. (Eds.), *Handbook of in Vivo Toxicity Testing*. Academic Press, San Diego, pp. 273–301.
- Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishinura, K., Hasegawa, Y., Miyamoto, M., Watanabe, T., 1987. Spontaneous malformations in laboratory animals: frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Congenital Anomalies* 27, 147–206.
- Nakatsuka, T., Horimoto, M., Ito, M., Matsubara, Y., Akaike, M., Ariyuki, F., 1997. Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) survey on background control data of developmental and reproductive toxicity studies in rats, rabbits and mice. *Congenital Anomalies* 37, 47–138.
- Nishinura, K., 1974. A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. *Congenital Anomalies* 14, 23–40. (Japanese).
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), 2001. OECD Guideline for the testing of chemicals, Proposal for updating guideline 414, Prenatal developmental toxicity study. Adopted: January 22, 2001.
- Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y., Nagasawa, A., Ogawa, H., Yasuda, K., Aoki, N., 1999. Teratogenicity of thujaplicin in ICR mice. *Food and Chemical Toxicology* 37, 1097–1104.
- Osawa, K., Matsumoto, T., Maruyama, T., Takiguchi, T., Okuda, K., Takazoe, I., 1990. Studies of the antibacterial activity of plant extract and their constituents against periodontopathic bacteria. *Bulletin of Tokyo Dental College* 31, 17–21.
- Saeki, Y., Ito, Y., Shibata, M., Sato, Y., Okuda, K., Takazoe, I., 1989. Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria. *Bulletin of Tokyo Dental College* 30, 129–135.
- Schardein, J.L., 2000. Principles of teratogenesis applicable to drug and chemical exposure. In: Schardein, G.L. (Ed.), *Chemically Induced Birth Defects*. Marcel Dekker, New York, pp. 1–65.
- Shimizu, M., Noda, T., Yamano, T., Yamada, A., Morita, S., 1993. Acute oral toxicity of natural food additives in mice and rats. *Seikatsu Eisei* 37, 215–220. (Japanese).
- Sofuni, T., Miyabe, M., Ishizaki, M., Watanabe, S., Maita, K., Kawamura, T., 1993. Mutagenicity test on food additives (series II).



Evaluation of developmental toxicity of β -thujaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats

M. Ema^{a,*}, A. Harazono^a, S. Fujii^b, K. Kawashima^a

^aNational Institute of Health Sciences, Osuku Branch, 1-1-43 Hoenzaka, Chun-ku, Osaka 540, Japan

^bSafety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd., 364-24, Shin-oi, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido, 004-0839, Japan

Received 2 October 2002; accepted 17 October 2003

Abstract

The objective of this study was to evaluate the developmental toxicity of β -thujaplicin (TP) in rats. Pregnant rats were given TP by gastric intubation at 15, 45, or 135 mg/kg on days 6–15 of pregnancy. The maternal body weight gain during administration at 45 and 135 mg/kg and after administration at 135 mg/kg and adjusted weight gain at 45 and 135 mg/kg were significantly reduced. A significant decrease in food consumption during and after administration was found at 45 and 135 mg/kg. A significant increase in the incidence of postimplantation loss was found in pregnant rats given TP at 135 mg/kg. A significantly lower weight was found in female fetuses at 45 and 135 mg/kg and in male fetuses at 135 mg/kg. Although a significantly increased incidence of fetuses with skeletal variations and decreased degree of ossification were found at 135 mg/kg, no significant increase in external, skeletal and internal malformations was detected after administration of TP. The data demonstrated that TP had adverse effects on embryonic/fetal survival and growth only at maternal toxic doses. No adverse effects on morphological development were found in rats fetuses. Based on the significant decreases in maternal body weight gain and weight of female fetuses at 45 mg/kg and higher, it is concluded that the no-observed-adverse-effect levels (NOAELs) of TP for both dams and fetuses are considered to be 15 mg/kg in rats.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: β -Thujaplicin; Hinokitiol; Developmental toxicity; Teratogenicity; Rat

1. Introduction

β -Thujaplicin (TP; CAS No. 499-44-5; Hinokitiol; 4-isopropyltropolone) is a phenolic component of essential oils extracted from cypress trees. TP has been found to act as an antibacterial agent (Saeki et al., 1989; Osawa et al., 1990; Tonari, 1998) and an antitumor agent (Yamato et al., 1984; Inamori et al., 1993). In addition, it possesses phyto-growth-inhibitory effects (Inamori et al., 1991). TP is used as a natural food preservative in Japan.

Several reports on the toxicity of TP are available. In mutagenicity screening tests of TP, positive results were obtained in a Rec-assay with S9 mix at 1.0 mg/disk and chromosome aberration test in vitro at 0.002–0.003 mg/ml, but not in the Ames test or a micronucleus test in mice (Sofuni et al., 1993). The DNA damaging activity of TP was weak in a spore Rec-assay (Ueno and Ishizaki, 1992). The values of LD50 have been reported to be 504 mg/kg in male ddy mice and 469 mg/kg in female ddy mice after oral gavage of TP (Shimizu et al., 1993). Recently, Ogata et al. (1999) reported a significant increase in the incidence of fetuses with malformations after oral administration of TP at 560 mg/kg and higher on day 9 of pregnancy in ICR mice and that TP induced dysmorphogenicity in cultured mouse embryos at concentrations of 6.25 and 12.5 μ g/ml. However, there is no information on the developmental toxicity of TP in rats. Therefore, the present study was conducted to evaluate the potential teratogenicity of TP after administration throughout organogenesis in rats.

Abbreviations: TP, β -thujaplicin; LOAEL, lowest-observed-adverse-effect level; NOAEL, no-observed-adverse-effect level.

* Corresponding author at present address: Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81-3-3700-9878; fax: +81-3-3707-6950.

E-mail address: ema@hihs.go.jp (M. Ema).

0278-6915/\$ - see front matter © 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.fct.2003.10.009

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats (Jcl: Wistar, Clea Co., Ltd., Tokyo, Japan) were used throughout this study. Animals were reared on a basal diet (F-1; Funabashi Farm Co., Funabashi, Japan) and tap water ad libitum and maintained in an air-conditioned room at 24 ± 1 °C, with a relative humidity of $55 \pm 5\%$, under a controlled 12-h light/dark cycle. Virgin female rats, weighing 216–244 g, were mated overnight with male rats. The day when sperm were detected in the vaginal smear was considered to be day 0 of pregnancy. The pregnant rats were distributed on a random basis into four groups of 16–17 rats each and housed individually.

2.2. Chemicals and dosing

The female rats were dosed once daily by gastric intubation with TP (purity >98%, SEIWA Technological Laboratories Ltd., Tokyo, Japan) at a dose of 0 (control), 15, 45, or 135 mg/kg from day 6 through day 15 of pregnancy. The dosage levels were determined based on the results of our range-finding study in which administration of TP by gastric intubation on days 6–15 of pregnancy caused maternal deaths and decreased maternal body weight gain and caused an increase in postimplantation loss and decrease in fetal weight at 125 mg/kg and higher in rats. TP was dissolved in olive oil (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). The volume of each dose was adjusted to 5 ml/kg of body weight based on daily body weight. The control rats received olive oil only. The formulations were kept in a cool and dark place for no more than 7 days.

2.3. Observations

The maternal body weight and food consumption were recorded daily. The pregnant rats were euthanized by ether overdose on day 20 of pregnancy. The peritoneal cavity and uterus were opened, and the numbers of live and dead fetuses and of resorptions were counted. The gravid uterus was removed and the dams weighed again. The adjusted weight gain, i.e. maternal weight gain throughout pregnancy corrected for gravid uterine weight, was calculated. To confirm the dam's pregnancy status, the uteri were immersed in 2% sodium hydroxide solution for over 1 h. The uteri were cleared and the implantation traces were seen to be stained yellowish-brown (Yamada et al., 1985). The live fetuses removed from the uterus were sexed, weighed, and inspected for external malformations and malformations within the oral cavity. Approximately one-half of the live fetuses in each litter were randomly selected and fixed in alcohol, stained with alizarin red S (Kawamura et al., 1990) and

examined for skeletal malformations. The remaining live fetuses in each litter were fixed in Bouin's solution prior to dissection. To detect internal malformations, fetal heads were examined by the free-hand razor-blade sectioning method of Barrow and Taylor (1969) and the thoracic areas were examined by Nishimura's micro-dissecting method (1974), a modification of Barrow and Taylor's method.

2.4. Data analysis

The litter was considered the experimental unit. The initial body weight, body weight gain and food consumption of pregnant rats, numbers of implantations, postimplantation loss and live fetuses per litter and body weight of live fetuses were evaluated by analysis of variance, followed by Dunnett's multiple comparison test if differences were found. The incidences of post-implantation loss and fetal malformations per litter were analyzed by the Kruskal–Wallis test to assess the overall effects. Whenever a significant trend was noted, pairwise comparisons were made using the Mann–Whitney test. Fisher's exact test was used when the incidence in the control group was zero. The 0.05 level of probability was used as the criterion for significance.

3. Results

Table 1 shows the maternal findings in rats given TP during organogenesis. One pregnant rat was dead on day 20 of pregnancy at 135 mg/kg. The body weight gain on days 6–16 at 45 and 135 mg/kg and on days 16–20 at 135 mg/kg was reduced significantly. The adjusted weight gain, which indicates the net weight gain of pregnant rats, was significantly lower in the 45 and 135 mg/kg groups than in the control group. The food consumption on days 6–16 and days 16–20 was significantly lower in the 45 and 135 mg/kg groups than the control group. These findings indicate that the lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) and no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of TP for pregnant rats are 45 and 15 mg/kg, respectively.

Pregnancy outcome in rats given TP during organogenesis are presented in Table 2. Litters totally resorbed were found in three of the 16 pregnant rats at 135 mg/kg. A significant increase in the number of resorptions per litter and incidence of postimplantation loss per litter and a significant decrease in the number of live fetuses per litter were also noted at 135 mg/kg. The weights of live fetuses were significantly decreased at 45 mg/kg and higher in females and at 135 mg/kg in males.

A summary of morphological findings in live fetuses of rats given TP during organogenesis is shown in Table 3. No fetus with external malformations was observed in any group. Skeletal examination revealed

Table 1
Maternal findings in rats given β -thujaplicin (TP) by gastric intubation on days 6–15 of pregnancy

Dose (mg/kg)	0 (control)	15	45	135
No. pregnant rats	16	16	16	17
No. of dead rats	0	0	0	1
Initial body weight	227 \pm 8	227 \pm 7	227 \pm 6	227 \pm 6
Body weight gain during pregnancy (g) ^a				
Days 0–6	17 \pm 5	17 \pm 4	16 \pm 2	17 \pm 3
Days 6–16	45 \pm 4	39 \pm 6	32 \pm 7*	13 \pm 9*
Days 16–20	48 \pm 6	48 \pm 5	42 \pm 6	21 \pm 12*
Adjusted weight gain during pregnancy (g) ^{a,b}	39 \pm 7	36 \pm 8	28 \pm 10*	24 \pm 5*
Food consumption during pregnancy (g) ^a				
Days 0–6	105 \pm 7	101 \pm 6	98 \pm 5*	101 \pm 5
Days 6–16	157 \pm 12	147 \pm 13	129 \pm 12*	103 \pm 11*
Days 16–20	72 \pm 5	70 \pm 4	63 \pm 7*	66 \pm 6*

^a Values are given as mean \pm S.D.

^b Adjusted weight gain refers to maternal body weight gain excluding the gravid uterus.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Table 2
Reproductive findings in rats given β -thujaplicin (TP) by gastric intubation on days 6–15 of pregnancy

Dose (mg/kg)	0 (control)	15	45	135
Nn. litters	16	16	16	16
No. corpora lutea per litter ^a	16.3 \pm 1.3	16.3 \pm 1.3	15.7 \pm 1.4	16.3 \pm 0.9
No. implantations per litter ^a	15.4 \pm 1.4	15.5 \pm 1.2	14.8 \pm 1.7	15.6 \pm 1.3
No. of litters totally resorbed	0	0	0	3
No. resorptions per litter ^a	1.3 \pm 1.4	1.3 \pm 1.2	2.0 \pm 1.0	9.9 \pm 4.6*
No. dead fetuses per litter ^a	0.1 \pm 0.3	0	0	0
% Postimplantation loss per litter ^b	8.5	8.0	13.6	63.5*
No. live fetuses per litter ^a	14.1 \pm 1.4	14.3 \pm 1.5	12.8 \pm 1.8	5.7 \pm 4.6*
Sex ratio of live fetuses (male/female)	114/111	116/112	107/97	56/35
Body weight of live fetuses (g) ^a				
Male	3.39 \pm 0.19	3.26 \pm 0.19	3.25 \pm 0.18	2.71 \pm 0.21*
Female	3.19 \pm 0.18	3.13 \pm 0.18	3.02 \pm 0.19*	2.62 \pm 0.11*

^a Values are given as mean \pm S.D.

^b (No. resorptions and dead fetuses/No. implantations) \times 100.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

one fetus with sternoschisis at 135 mg/kg. Skeletal variations in the vertebrae, ribs, and/or sternbrae were found in all groups. The incidences of fetuses with skeletal variations and fetuses with bipartite sternbrae and with rudimentary 14th ribs were significantly higher in the 135 mg/kg group than the control group. The numbers of ossification centers of the caudal vertebrae and of the sternbrae were significantly decreased at 135 mg/kg. Hypoplasia of the spleen occurred in two fetuses in one dam at 135 mg/kg. A few fetuses with thymic remnant in the nick and/or left umbilical artery were found in the control group and TP-treated groups. However, there was no significant difference in the incidence of fetuses with internal malformations and variations between the TP-treated groups and the control group. These findings indicate that the

lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) and no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of TP for fetal rats are 45 and 15 mg/kg, respectively.

4. Discussion

This study was designed to screen for general developmental toxicity in rats. Doses of TP expected to induce maternal and developmental toxicity, such as a decrease in maternal body weight gain and food consumption and in fetal weight and an increase in postimplantation loss, were given to pregnant rats to characterize the effects of TP on embryonic/fetal development. Maternal toxicity, as evidenced by a significant decrease in body weight gain and food consumption

Table 3
Morphological examinations in fetuses of rats given β -thujaplicin (TP) by gastric intubation on days 6-15 of pregnancy

Dose (mg/kg)	0(control)	15	45	135
<i>External examination</i>				
No. fetuses (litters) examined	225(16)	228(16)	204(16)	91(13)
No. fetuses (litters) with malformations	0	0	0	0
<i>Skeletal examination</i>				
No. fetuses (litters) examined	116(16)	117(16)	105(16)	49(13)
No. fetuses (litters) with malformations	0	0	0	1(1)
Sternoschisis	0	0	0	1(1)
No. of fetuses (litters) with variations	11(7)	8(4)	10(7)	21(11)**
Cervical rib	4(2)	3(1)	3(2)	1(1)
Splitting of thoracic vertebral bodies	0	1(1)	0	0
14th ribs				
Extra	0	0	0	4(3)
Rudimentary	2(1)	1(1)	2(2)	9(7)**
Bipartite sternbrae	1(1)	2(1)	1(1)	9(7)**
Asymmetry of sternbrae	5(5)	1(1)	4(3)	3(3)
Degree of ossification*				
No. of ossification centers of caudal vertebrae	3.3 \pm 0.4	3.1 \pm 0.4	3.2 \pm 0.4	2.8 \pm 0.3**
No. of sternbrae	4.9 \pm 0.4	4.9 \pm 0.6	4.8 \pm 0.5	3.9 \pm 0.7**
<i>Internal examination</i>				
No. fetuses (litters) examined	109(16)	111(16)	99(16)	42(12)
No. fetuses (litters) with malformations	0	0	0	2(1)
Hypoplasia of spleen	0	0	0	2(1)
No. of fetuses (litters) with variations	5(3)	3(3)	2(2)	2(2)
Thymic remnant in neck	4(3)	1(1)	2(2)	2(2)
Left umbilical artery	1(1)	2(2)	0	0

* Values are given as mean \pm SD.

** Significantly different from the control, $P < 0.05$.

during the administration period was found at 45 mg/kg and higher. Although pregnant rats in the 45 mg/kg group recovered with respect to body weight after cessation of administration of TP, such recovery did not occur in the high dose group. This may be due to a lack of conceptuses at 135 mg/kg. However, a significantly low adjusted weight gain at 45 mg/kg and higher may suggest maternal toxicity. These findings indicate that TP exerts maternal toxicity at 45 mg/kg and higher when administered during organogenesis in rats.

Developmental endpoints should include the number and percent of pre- and postimplantation loss, morphological alterations in fetuses, and decreased fetal weight (Kimmel and Price, 1990; Schardein, 2000; OECD, 2001). Schardein (2000) stated that fetal size is an important in the assessment of potential teratogen as an indicator of developmental toxicity, and reduction in size or growth retardation commonly occurs among fetuses of dams given dosages that are toxic to the dam, to the offspring, or both. In the present study, a significant increase in the incidence of postimplantation loss was found at 135 mg/kg and a significantly decreased weight of female fetuses was found at 45 mg/kg and higher. These findings indicated that TP is

embryolethal at 135 mg/kg and toxic to fetal growth at 45 mg/kg and higher when administered during the period of organogenesis.

As for morphological examinations in the fetuses of exposed mother, a few fetuses with skeletal or internal malformations were found in the 135 mg/kg group. The malformations observed in the present study are not thought to be due to the administration of TP, because they occurred at a very low incidence and are of types that occur sporadically among control rat fetuses (Kameyama et al., 1980; Morita et al., 1987; Nakatsuka et al., 1997). Several types of skeletal and internal variations were also found in both the control group and TP-treated groups. These variations are frequently observed in fetuses of rats at term (Kimmel and Wilson, 1973; Kameyama et al., 1980; Morita et al., 1987; Nakatsuka et al., 1997). In the 135 mg/kg group, a significant increase in the incidence of fetuses with skeletal variations and fetuses with bipartite sternbrae and with rudimentary 14th ribs, but no extra ribs, and a significant decrease in the degree of ossification were accompanied by a significant decrease in the fetal weight. These findings show a correlation between these morphological alterations and growth retardation in fetuses. Although a skeletal variation, i.e. super-

numerary extra 14th ribs, is a warning sign of possible teratogenicity, the rudimentary 14th ribs, sternbral variations, and bilobed centra of the vertebral column are a normal variation (Kimmel and Wilson, 1973). Chahoud et al. (1999) noted that variations are unlikely to adversely affect survival or health and this might result from a delay in growth or morphogenesis that has otherwise followed a normal pattern of development. Consideration of these findings together suggests that the morphological changes observed in the present study do not indicate a teratogenic response and that TP possesses no teratogenic potential in rats.

In a developmental toxicity study in mice in which a single administration of TP was given at 420, 560, 750, or 1000 mg/kg by gastric intubation on day 9 of pregnancy, maternal deaths, dams with litter totally resorbed, and a significant increase in embryoletality were found at 750 mg/kg and higher (Ogata et al., 1999). A significant increase in the incidence of fetuses with malformations was accompanied by a significant decrease in fetal weight at 560 mg/kg and higher. Two highest doses, 750 and 1000 mg/kg, were maternally lethal, and the dose level of 560 mg/kg was very close to the maternally lethal dose. Thus, fetal malformations occurred after a single administration of TP at high doses in a single species. In other words, TP may be capable to produce fetal malformations under extreme experimental conditions in mice. Studies in additional species would be of great value in evaluating developmental toxicity of TP in conventional experimental conditions. We demonstrated here that TP possesses no adverse effects on morphological development in rat fetuses when administered during the whole period of organogenesis at doses which caused a decreased fetal weight, increased incidence of postimplantation loss, and maternal toxicity.

In conclusion, the administration of TP to pregnant rats throughout organogenesis had adverse effects on maternal rats and embryonic/fetal survival and growth but had no adverse effects on morphological development of fetuses even at maternally toxic and embryoletal doses. The data indicate that TP adversely affected the embryonic/fetal survival and growth only at maternally toxic doses in rats. Based on the significant decreases in maternal body weight gain and weight of female fetuses at 45 mg/kg and higher, it is concluded that the no-observed-adverse-effect levels (NOAELs) of TP for both dams and fetuses are considered to be 15 mg/kg in rats.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from Ministry of Health and Welfare, Japan.

References

- Barrow, V.M., Taylor, W.J., 1969. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *Journal of Morphology* 127, 291–306.
- Chahoud, I., Buschmann, J., Clark, R., Druga, A., Falke, H., Faqi, A., Hansen, E., Heinrich-Hirsch, B., Helleig, J., Lingk, W., Parkinson, M., Puumgarten, F.J.R., Pefil, R., Platzek, T., Scialli, A.R., Seed, J., Stahlmann, R., Ulbrich, B., Wu, X., Yasuda, M., Younes, M., Solecki, R., 1999. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Report of the second workshop on the terminology in developmental toxicology Berlin, 27–28 August 1998. *Reproductive Toxicology* 13, 77–82.
- Inamori, Y., Nishiguchi, K., Matsuo, N., Tsujibo, H., Baba, K., Ishida, N., 1991. Phytogrowth-inhibitory activities of tropolone and hinokitiol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39, 2378–2381.
- Inamori, Y., Tsujibo, H., Ohishi, H., Ishii, F., Mizugami, M., Aso, H., Ishida, N., 1993. Cytotoxic effect of hinokitiol and tropolone on the growth of mammalian cells and on blastogenesis of mouse splenic T cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 16, 521–523.
- Kameyama, Y., Tanimura, T., Yasuda, M., 1980. Spontaneous malformations in laboratory animals-photographic atlas and reference data. *Congenital Anomalies* 20, 25–106. (Japanese).
- Kawamura, S., Hirohashi, A., Kato, T., Yasuda, M., 1990. Bone-staining technique for fetal rat specimens without skinning and removing adipose tissue. *Congenital Anomalies* 30, 93–95.
- Kimmel, C.A., Wilson, G.J., 1973. Skeletal deviations in rats: malformations or variations? *Teratology* 8, 309–316.
- Kimmel, C.A., Price, C.J., 1990. Development toxicity studies. In: Arnold, D.L., Grice, H.C., Krewski, D.R. (Eds.), *Handbook of In Vivo Toxicity Testing*. Academic Press, San Diego, pp. 273–301.
- Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Miyamoto, M., Watanabe, T., 1987. Spontaneous malformations in laboratory animals: frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Congenital Anomalies* 27, 147–206.
- Nakatsuka, T., Horimoto, M., Ito, M., Matsubara, Y., Akaike, M., Ariyuki, F., 1997. Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) survey on background control data of developmental and reproductive toxicity studies in rats, rabbits and mice. *Congenital Anomalies* 37, 47–138.
- Nishimura, K., 1974. A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. *Congenital Anomalies* 14, 23–40. (Japanese).
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), 2001. OECD Guideline for the testing of chemicals, Proposal for updating guideline 414, Prenatal developmental toxicity study. Adopted: January 22, 2001.
- Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y., Nagasawa, A., Ogawa, H., Yasuda, K., Aoki, N., 1999. Teratogenicity of thujaplicin in ICR mice. *Food and Chemical Toxicology* 37, 1097–1104.
- Osawa, K., Matsumoto, T., Maruyama, T., Takiguchi, T., Okuda, K., Takazoe, I., 1990. Studies of the antibacterial activity of plant extract and their constituents against periodontopathic bacteria. *Bulletin of Tokyo Dental College* 31, 17–21.
- Sacki, Y., Ito, Y., Shibata, M., Sato, Y., Okuda, K., Takazoe, I., 1989. Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria. *Bulletin of Tokyo Dental College* 30, 129–135.
- Schardein, J.L., 2000. Principles of teratogenesis applicable to drug and chemical exposure. In: Schardein, G.L. (Ed.), *Chemically Induced Birth Defects*. Marcel Dekker, New York, pp. 1–65.
- Shimizu, M., Noda, T., Yamano, T., Yamada, A., Morita, S., 1993. Acute oral toxicity of natural food additives in mice and rats. *Seikatsu Eisei* 37, 215–220. (Japanese).
- Sofuni, T., Miyabe, M., Ishizaki, M., Watanabe, S., Maita, K., Kawamura, T., 1993. Mutagenicity test on food additives (series II).