

げっ歯類の腺胃を用いる
in vivo 小核試験系の開発研究

2014. 9

岡田 恵美子

目次

第一章 緒言.....	1
第二章 腺胃上皮細胞を用いる小核試験法の開発.....	6
1. 序文.....	6
2. 材料と方法.....	9
2.1. 動物.....	9
2.2. 化学物質.....	9
2.3. 投与.....	9
2.4. 腺胃小核標本の作製および観察.....	10
2.5. 末梢血を用いる小核試験.....	12
2.6. 統計.....	12
3. 結果.....	13
3.1. 腺胃小核保有細胞像および腺胃小核頻度.....	13
3.2. 末梢血を用いる小核試験.....	13
4. 考察.....	14
付図表.....	16

第三章 4 日間投与による、腺胃、結腸、骨髓の小核同時評価系の構築.....	19
1. 序文	19
2. 材料と方法	23
2.1. 動物	23
2.2. 化学物質	23
2.3. 投与および処置	23
2.4. 腺胃小核試験	24
2.5. 結腸小核試験	25
2.6. 骨髓小核試験	26
2.7. Ki-67 陽性細胞数を指標とした細胞増殖抑制の評価	27
2.8. 統計	28
3. 結果	29
3.1. 胃を発がん標的とする遺伝毒性物質を用いた検証	29
3.2. 結腸を発がん標的とする遺伝毒性物質を用いた検証	30
3.3. 食品添加物と植物フラボノイドを用いた検証	30
3.4. 毒性学的所見	31

4. 考察.....	32
付図表	37
第四章 腺胃小核試験の 28 日間反復投与毒性試験への組み込みの検討.....	53
1. 序文	53
2. 材料と方法	57
2.1. 動物	57
2.2. 化学物質	57
2.3. 投与および処置	57
2.4. 病理組織学的検査	58
2.5. 腺胃小核試験	59
2.6. 結腸小核試験	59
2.7. 肝小核試験	60
2.8. 骨髓小核試験	61
2.9. Ki-67 陽性細胞数を指標とした細胞増殖抑制の評価	61
2.10. 統計	62
3. 結果	64

3.1. 体重および一般状態の変化	64
3.2. 臓器重量の変化	64
3.3. 病理組織学的変化	64
3.4. 腺胃、結腸、肝臓、骨髄の小核試験	65
4. 考察	67
付図表	71
第五章 総括	86
要旨	91
引用文献	95
謝辞	111

第一章 緒言

食品、医薬品、化粧品および新規化学物質の開発の際には、各種ガイドラインに則って複数の毒性試験を実施し、その安全性を担保する必要がある。特に、開発品が遺伝毒性（遺伝子や染色体に傷害を起こす性質）を有する場合、催奇形性や遺伝病の発症、さらには発がんリスクの増加につながる危険性がある。そのため、遺伝毒性評価は開発段階において実施すべき毒性評価項目の 1 つとして挙げられている。

遺伝毒性の有無を検出する試験（遺伝毒性試験）は、細菌などの微生物、哺乳類の培養細胞およびマウスやラットなどの実験動物を用いて行われる。また、遺伝毒性を有する物質（遺伝毒性物質）は DNA や染色体に様々な形で傷害を引き起こすため、遺伝学的指標の異なるいくつかの試験法が開発されている。遺伝学的指標としては、① 遺伝子突然変異誘発性、② 染色体異常誘発性、③ DNA 損傷性などが用いられる。

遺伝毒性の評価の際には、通常、ガイドラインで推奨される特定の遺伝毒性試験（バッテリー試験）を複数組み合わせる。日米 EU 医薬品規制調和国際会議で合意された医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン（ICH ガイドライン）のうち、遺伝毒性評価に関する ICH S2（R1）ガイドライン（医薬品の遺伝毒性および解釈に関するガイダンスについて）[1]には、遺伝毒性試験の標準的組み合わせとして以下の 2 つのオプションが示されている。

オプション1：「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「染色体傷害を検出するための細胞遺伝学的試験 (*in vitro* 分裂中期での染色体異常試験または *in vitro* 小核試験) またはマウスリンフォーマ *Tk* 試験」、「*in vivo* 遺伝毒性試験 (一般には、げっ歯類造血細胞での染色体傷害、すなわち小核または分裂中期細胞の染色体異常を検出する試験)」の組み合わせ。

オプション2：「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「2種類の異なる組織における *in vivo* 遺伝毒性試験 (一般には、げっ歯類造血細胞を用いる小核試験および2つの *in vivo* 試験)」の組み合わせ。

食品や医薬品などの遺伝毒性は、通常、いずれかのオプションを選択して試験を実施し、その成績から総合的に評価される。さらに、これらのバッテリー試験の成績だけでは判断が難しい場合には追加試験を実施し、より広範な検討を行う必要がある。

遺伝毒性の判断が難しい場合に実施する追加試験や、オプション2で推奨される第2の組織 (通常、造血細胞以外の組織) を用いる *in vivo* 試験では、被験物質の曝露や標的臓器を考慮した試験の選択が求められる。例えば、生体内の主要な代謝器官である肝臓を用いた遺伝毒性試験は、造血細胞を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験で陰性を示す一部の遺伝毒性発がん物質の検出に有用であることが知られている[1]。一方、経口摂取する物質のうち、①体内吸収が少ない、または体内での分解や失活が早く、骨髄や血中に到達できない物質や、②複合物質のため骨髄または血中への曝露証明が難しい物質については、被験物質が直接

接触する消化管（特に胃）での評価が有効と考えられる。さらに、ヒトでは胃がんや大腸がんなど消化管のがん罹患率が高いこと[2]からも、消化管での評価は重要である。胃を用いた遺伝毒性試験には、DNA 損傷性を評価する comet assay[3,4]、遺伝子突然変異誘発性を評価するトランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験[5]および DNA 修復を誘導する物質を検出する不定期 DNA 合成試験[6,7]があるが、染色体異常誘発性を評価する試験法は開発されていない。

染色体異常誘発性を評価する遺伝毒性試験の 1 つとして、*in vitro* や *in vivo* を用いた小核試験が開発されている[8,9]。小核は染色体や有糸分裂装置に損傷を受けた細胞が分裂する際に生じる小さい核であり、小核試験では小核を有する細胞の頻度を指標として遺伝毒性（染色体異常誘発性）の有無を評価する。げっ歯類の造血細胞（骨髄または末梢血）を用いる小核試験はバッテリー試験の 1 つとして汎用されており、遺伝毒性物質を広く検出できることが知られている[1]。また、肝臓や皮膚など造血細胞以外の臓器を用いた小核試験の開発も進められており、その有用性が報告されている[10-12]。一方、消化管を用いた小核試験については、結腸を中心に研究が進められているものの、胃を用いた研究報告はほとんどない[10-22]。そのため、本研究では経口摂取する物質が直接接触する腺胃での染色体異常誘発性を評価する試験法として、げっ歯類の腺胃を用いる *in vivo* 小核試験法の開発を試みた。

遺伝毒性を *in vivo* 試験により評価する場合には、短期投与または長期投与のどちらかの試験方法を選択する必要がある[1]。そのため、開発した腺胃小核試験法が短期投与および長期投与の試験方法に組み入れて実施可能か否かを検証する必要がある。短期投与条件下で行う *in vivo* 試験の利点としては、被験物質の最大投与可能用量を高く設定できること、また、試験に必要な時間や被験物質量が少なく済むことが挙げられる。一方、長期投与条件下で行う *in vivo* 試験では、一般毒性試験の供試動物を用いて試験を実施することで使用動物数を削減できることに加え、一般毒性試験で得られる毒性プロファイルを考慮して *in vivo* での遺伝毒性リスクを総合的に評価することができる。

さらに近年、動物実験の 3R（使用動物数の削減／苦痛の軽減／代替法の利用）の原則[23]に従い、非臨床毒性試験においても動物愛護への貢献が強く求められている。ICH S2 (R1) ガイドラインにおいても、① 短期投与条件下において 2 つ以上の指標または組織を用いて評価する場合、組み合わせ試験として 1 つの試験として実施すること、また、② *in vivo* 試験を長期投与とする場合、科学的に正しければ一般毒性試験に遺伝毒性の指標を組み込むことを考慮すべきであることが記されており[1]、試験に使用する動物数の削減が求められている。そのため本研究では、短期投与条件下で行う組み合わせ試験として、消化管（腺胃と結腸）および骨髄での小核誘発性を同一動物で評価するための短期投与試験系（腺胃、結腸、骨髄での小核同時評価系）の構築を試みた。さらに、長期投与条件下で行う試験と

して、一般毒性試験（28 日間反復投与毒性試験）への腺胃小核試験の組み込みの可能性を検討した。

第二章 腺胃上皮細胞を用いる小核試験法の開発

1. 序文

食品など経口摂取する物質の遺伝毒性評価には、被験物質がはじめに接触する消化管（特に胃）を用いた評価は有効と考えられる。これまでに、消化管での染色体異常誘発性の有無を評価する試験として、げっ歯類の結腸を用いた小核試験系の開発が進められているが、胃を用いた小核試験の研究報告はほとんどない[10-22]。そのため、げっ歯類の腺胃を用いる小核試験法の開発を試みた。

これまでに報告された多くの結腸小核試験では、組織標本を光学顕微鏡下で観察することで小核を保有する細胞数を計測し、算出した小核保有細胞の頻度（小核頻度）を指標に遺伝毒性の有無を評価する方法が用いられている[13-17]。この方法の場合、細胞の断面を観察することから、小核保有細胞とアポトーシス細胞や異形核細胞を区別することが難しい。そのため、マウスやラットの結腸から上皮細胞を回収して小核標本作製する手法が開発されつつある。結腸小核標本作製に用いる上皮細胞の回収法としては、ÇelikらやCoffingらによりラット結腸を酵素処理する方法が、Sychevaらによりホルマリン固定したマウス結腸をスクレイプする方法が、大山らによりマウス結腸をethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 処理する方法が報告されている[18-22]。特に、マウス結腸をEDTA処理することで得られる上皮細胞を用いて小核標本作製した場合には、損傷の少ない完全な形の細胞を観察対象とすることが可能となり、小核保有細胞の判別も容易となる。そこで著者

は、マウス結腸小核試験で用いられるEDTA処理法を同動物（マウス）の腺胃に応用することで、小核評価に利用可能な腺胃小核標本の作製が可能であると考えた。

さらに小核試験では、標本作製法に加え、標本作製時期（サンプリング時期）が重要となる。小核は染色体や有糸分裂装置に損傷を受けた細胞が分裂する際に形成されるため、小核試験では被験物質の影響を受けた後に分裂して生じた細胞を観察対象とする必要がある。例えば、造血細胞を用いる小核試験において評価対象となる幼若赤血球は、細胞分裂開始から6～8時間かけて形成され、その後、骨髓に18～22時間程度留まることが知られている[24]。そのため、骨髓小核試験では被験物質を単回投与した24～48時間後に2回以上のサンプリングを、末梢血小核試験では36～72時間後に2回以上のサンプリングを行う必要がある[9]。また、結腸小核試験については、評価対象となる結腸上皮細胞の寿命が3～5日程度であること[25,26]に加え、遺伝毒性物質をマウスに単回投与した2～4日後に小核頻度が増加することが報告されている[21,22]。一方、げっ歯類の腺胃では、胃底腺や幽門腺の中央部に増殖帯が存在し、管腔側には寿命の短い（3～4日程度）被蓋上皮細胞が、筋層側には寿命の長い（2～200日程度）副細胞、壁細胞、主細胞、幽門腺細胞が分布している[25,27,28]。そのため、腺胃小核試験では、寿命の最も短い被蓋上皮細胞に合わせて、被験物質投与後3～4日目の上皮細胞を用いるのが適していると考えた。

本章では、EDTA処理法を用いた腺胃小核試験法の妥当性を評価するため、マウスに遺伝毒性発がん物質を単回経口投与し、投与後3および4日目に採材した腺胃より小核標本を

作製して腺胃小核頻度を調べた。さらに、腺胃小核試験の有用性を検証するため、供試動物を用いて末梢血小核試験を実施した。遺伝毒性発がん物質としては、*N*-nitroso-*N*-methylurea (MNU) および *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) の2種類の化合物を用いた。これらの物質はマウスの胃を発がん標的の1つとする、代謝活性化を必要としない遺伝毒性物質である[29,30]。また、マウス造血細胞を用いる小核試験の成績として、MNUでは陽性、MNNGでは陰性または弱陽性の結果が報告されている[31-35]。

2. 材料と方法

2.1. 動物

7～8 週齢の雄性 BALB/c マウスを日本クレア(株)より購入し、5 日以上馴化した後、7～9 週齢で実験に用いた。BALB/c マウスは造血細胞を用いる小核試験において一般的に用いられるマウスの系統である。動物は通常の飼育室において 1 ケージあたり 4～5 匹を飼育し、固型飼料 [F-2、(株)船橋農場] および自家水道水を自由摂取させた。実験には 1 群 4～5 匹の動物を用いた。なお、本動物実験は、(株)ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規程に従い、(株)ヤクルト中央研究所 動物実験委員会の承認を得て実施した。

2.2. 化学物質

遺伝毒性物質として MNU [CAS 684-93-5、Lot. No. 352-57B、Chem Service Inc.] および MNNG [CAS 70-25-7、Lot. No. FIE02、Tokyo Kasei Co., Ltd.] を用いた。これらの物質を、それぞれ局方注射用蒸留水 (DW) および 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して、すぐに投与に使用した。

2.3. 投与

上記の遺伝毒性物質または溶媒を、それぞれマウスに単回経口投与した。投与は胃ゾンデを用いた胃内強制投与とした。MNU および MNNG の投与用量は、予備試験において毒

性兆候（体重減少など）の認められた 100 mg/10 mL/kg 体重とした。また、溶媒対照群には各溶媒を 10 mL/kg 体重の容量で投与した。

2.4. 腺胃小核標本の作製および観察

大山らのマウス結腸小核標本作製法[21,22]を改変して腺胃小核標本を作製した。すなわち、投与後 3 および 4 日目に、エーテル麻酔下においてマウスの頸静脈を切断し放血することで安楽死を行い、その後、腺胃を摘出した。摘出した腺胃は前胃との境界部を糸で縛ったのち裏返してシリンジに接着させ、内部にリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を入れて膨らませた（Fig. 1A）。膨らませた腺胃を、30 mM EDTA を含む PBS 中でインキュベートし（35℃、30 分）、腺胃上皮細胞を剥離した。途中、5 分間の振動を 2 回繰り返すことで、細胞の剥離を促した。腺胃上皮細胞はクリプト状の形態で採取されるため（Fig. 1B）、パスツールピペットでピペッティングすることにより細胞を単離した後、メッシュ（160 μ m）に通して夾雑物を取り除き、遠心して単離細胞を回収した。回収した細胞を 10%中性緩衝ホルマリンにより固定した後、新しい 10%中性緩衝ホルマリンに交換し、観察時まで 4℃で保存した。

染色は Suzuki らの方法[36]を改変して行った。すなわち、観察時に 100 μ g/mL アクリジンオレンジ（AO, CALBIOCHEM）と 5 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI, Sigma-Aldrich）の混合染色液および細胞懸濁液を等量ずつスライドガラス上で混合し、カ

バーガラスをかけた。蛍光顕微鏡下 [UV 励起 (365 nm) 、400 倍] において、1 個体あたり 1200 個の細胞を観察し、小核を有する細胞の割合 (小核頻度) を算出した。観察対象細胞は、細胞質を保有しており、核膜が明瞭で、細胞が重なっていないものとした。また、主核が断片化している細胞は観察対象としなかった。小核は、主核と同じ色の蛍光を発しており、主核と接しておらず、直径が主核の 1/2 以下のものとした[37]。

なお、上記標本作製法の諸条件は、以下に示す (1) ～ (3) の検討を行い決定した。

(1) 腺胃上皮細胞採取時の EDTA 濃度

裏返した腺胃を 1、30 または 50 mM の EDTA で処理し腺胃上皮細胞の回収量を比較したところ、30 mM EDTA 処理で細胞回収量が多いことがわかった。そのため、腺胃上皮細胞採取時の EDTA 濃度を 30 mM とした。

(2) 腺胃上皮細胞の単離方法

採取したクリプト形態の上皮細胞に対し、① パルツールピペットによるピペッティング、② 0.25% trypsin 処理 (4°C、1 時間) 、③ 0.25% trypsin + 0.45 mM dithiothreitol (DTT) 処理 (4°C、1 時間) または④ 0.25% trypsin + 4.5 mM DTT 処理 (4°C、1 時間) を行い、細胞の単離方法を検討した。その結果、②～④の処理では細胞同士の接着が認められ、評価可能な単離細胞が得られなかった。一方、①の処理により評価可能な単離細胞が得られたため、細胞の単離法としてピペッティングによる方法を採用した。

(3) 細胞の固定・染色法

単離した腺胃上皮細胞に対し、① メタノールと 0.5%酢酸による固定後 AO 染色または② 10%中性緩衝ホルマリン固定後 AO と DAPI による混合染色を行うことで標本作製し、両者を比較した。どちらの手法によっても観察可能な標本が得られたが、②の処理により細胞質と核を明確に判別することができる小核標本を得ることができた。さらに、染色液の濃度を検討した結果、100 $\mu\text{g/mL}$ AO と 5 $\mu\text{g/mL}$ DAPI を含む染色液が観察に適していた。

2.5. 末梢血を用いる小核試験

Hayashi らの方法[38]に準じて末梢血を用いる小核試験を行った。試験は腺胃小核頻度を算出した動物を用いて行った。投与後 2 および 3 日目に採取した尾静脈血 5～10 μL 程度を AO 塗布したスライドガラス上にのせ、カバーガラスをかけて広げた後、2～3 時間静置した。蛍光顕微鏡下 [B 励起 (490 nm)、600 倍] で観察を行い、個体ごとに、① 2000 個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球の割合（小核頻度）、② 2000 個以上の全赤血球を観察し、全赤血球に占める幼若赤血球の割合（幼若赤血球比）を算出した。

2.6. 統計

Student の *t*-検定により、溶媒対照群とその他の群との検定を行った（有意水準 1%および 5%、両側）。

3. 結果

3.1. 腺胃小核保有細胞像および腺胃小核頻度

検討した手法により、細胞質を保有し、細胞膜や核膜が明瞭な腺胃小核標本を作製することが可能であった (Fig. 1C)。また、正常細胞と小核保有細胞の判別は容易であった。

1 個体あたり 1200 個の腺胃上皮細胞を観察して小核頻度を算出した結果、投与後 3 および 4 日目ともに、MNU および MNNG 投与群の小核頻度は溶媒対照群と比較して有意に増加した (Fig. 2)。また、投与後 3 および 4 日目の小核頻度は同程度であった。

3.2. 末梢血を用いる小核試験

腺胃小核頻度の算出を行った動物を用いて末梢血小核試験を行った。その結果、MNU 投与群では、投与後 2 および 3 日目に小核頻度の有意な増加が認められ、陽性結果が得られた (Fig. 3A)。また、幼若赤血球比の有意な減少も観察され、細胞増殖抑制が認められた (Fig. 3B)。一方、MNNG 投与群では、投与後 2 および 3 日目ともに、小核頻度の増加および幼若赤血球比の減少は認められなかった (Fig. 3A,B)。

4. 考察

マウスを用いて腺胃小核標本の作製法を検討したところ、EDTA 処理（30 mM EDTA、35℃、30 分間）により回収した腺胃上皮細胞をホルマリン固定することで、小核保有細胞の判別が容易な小核標本の作製が可能となった。また、胃を発がん標的とする遺伝毒性物質である MNU や MNNG を経口投与したマウスにおいて、腺胃小核頻度の有意な増加を確認することができた。MNU および MNNG 投与群の腺胃小核頻度は、標本作製時期の違い（投与後 3 および 4 日目）に関わらず、同程度であった。これは、腺胃の増殖帯で生じた小核保有細胞が排除されずに腺胃上皮に残存したためであると考えている。以上より、被験物質をマウスに単回経口投与しその後 3～4 日目に当該手法を用いて小核標本作製することで、腺胃における小核誘発性（染色体異常誘発性）の評価は可能であることが示された。

興味深いことに、MNNG を経口投与したマウスでは、腺胃小核頻度が有意に増加したのに対し、同一動物の末梢血では小核頻度の増加は認められず、末梢血小核試験で陰性となった。MNNG は経口投与条件下で実施した造血細胞を用いる小核試験において陰性成績が得られることが報告されており[31-35]、今回の末梢血小核試験の成績と一致した。また、Brault らは MNNG を経口投与した MutaTM Mouse の胃において変異頻度が増加し、骨髄や肝臓では増加しないことを報告している[39]。この結果について Brault らは、MNNG は生体内での分解が早く、経口投与後、骨髄や肝臓に十分到達しないことが原因であると考察

している。彼らの報告は、今回得られた MNNG の小核試験での成績（腺胃：陽性、造血細胞：陰性）を支持する。そのため、経口投与後、生体内での分解や失活が早い被験物質の評価には、今回開発した腺胃小核試験の実施が有効であると考えられた。

以上より、EDTA 処理により回収される腺胃上皮細胞を用いたマウス腺胃小核試験により、遺伝毒性（染色体異常誘発性）の評価が可能であり、経口摂取する物質の評価に有効であることが示された。

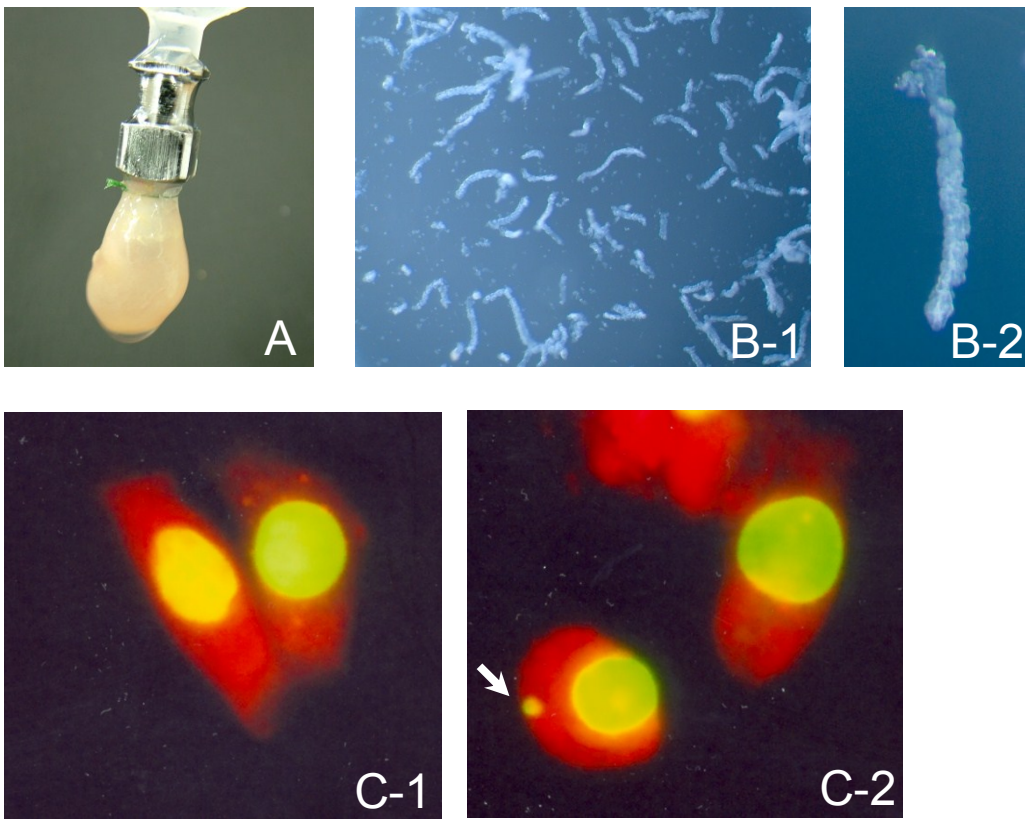


Fig. 1

Glandular stomach attached to syringe (A), gastric glands obtained by EDTA treatment (B), and fluorescence microscopy image of gastric epithelial cells stained with AO and DAPI (C-1: DW treatment, C-2: MNU treatment). Magnification: 8 \times (B-1), 14 \times (B-2), and 200 \times (C). Arrow indicates a micronucleus.

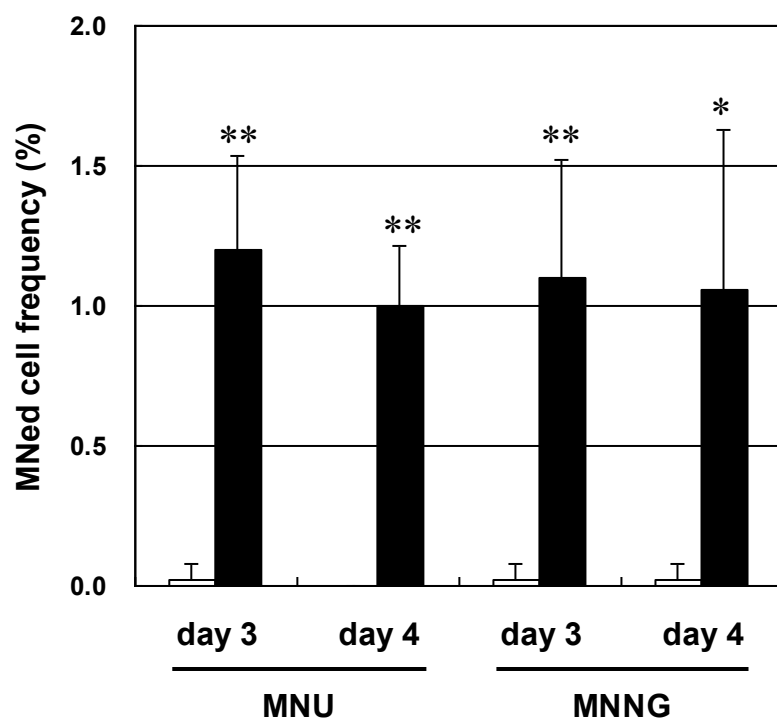


Fig. 2

Frequency of micronucleated (MNed) cells in the glandular stomach of mice after administration of MNU or MNNG. Each column and bar represent mean \pm SD [□: vehicle treatment group (4 mice), ■ : mutagen treatment group (5 mice)].

Statistical significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with vehicle control (Student's *t*-test).

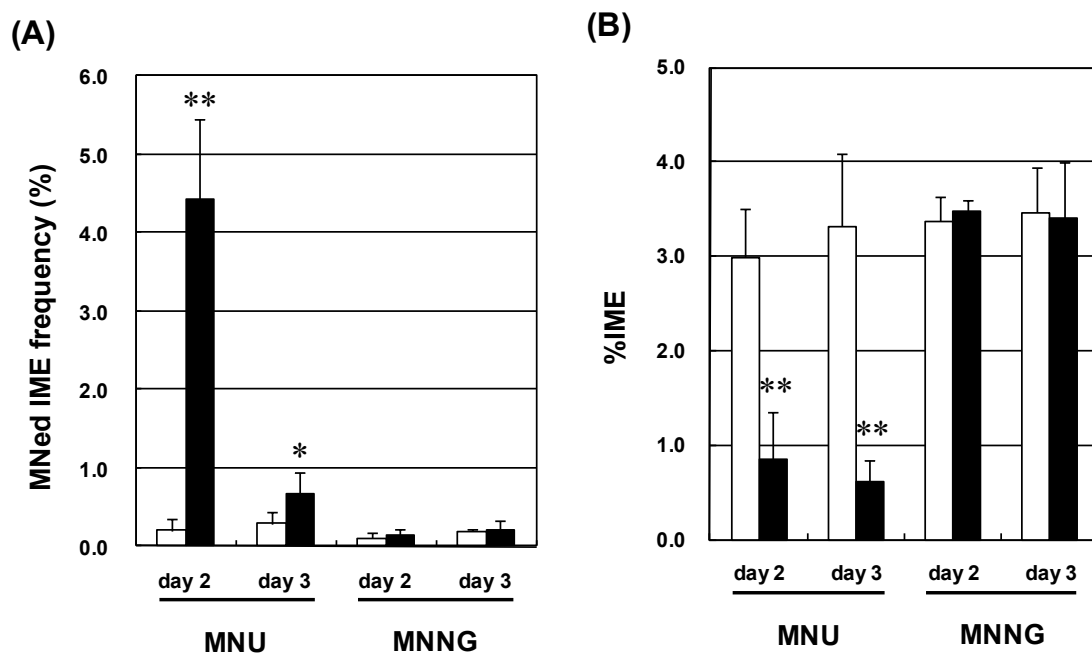


Fig. 3

Frequency of micronucleated (MNed) immature erythrocytes (IMEs) (A) and %IME (B) in the peripheral blood of mice after administration of MNU or MNNG. Each column and bar represent mean \pm SD [□ : vehicle treatment group (4 mice), ■ : mutagen treatment group (5 mice)].

Statistical significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with vehicle control (Student's t -test).

第三章 4 日間投与による、腺胃、結腸、骨髄の小核同時評価系の構築

1. 序文

前章では、マウスの腺胃をEDTA処理することで腺胃小核標本の作製が可能であることを明らかにした。その後、著者は大山らとともに、マウスで開発した腺胃小核標本作製法を一般毒性試験に汎用されるラットに応用し、ラットについても腺胃小核標本の作製が可能であることを確認した[40]。マウスやラットから作製したこれらの標本を用いて実施した腺胃小核試験では、経口投与条件下で実施する造血細胞小核試験で陰性を示す物質を含めて、胃を発がん標的とする遺伝毒性物質の陽性検出が可能であった[第二章,40]。そのため、げっ歯類を用いた腺胃小核試験は、食品など経口摂取する物質の遺伝毒性評価に有意義であると考えられた。

一方、骨髄を用いる小核試験はバッテリー試験の1つとして汎用されており、遺伝毒性物質を広く検出できることが知られている[1]。また、結腸小核試験は難消化性物質や腸内細菌により遺伝毒性物質に変換されうる物質の評価に有用と考えられている[12]。そのため、経口摂取する物質の遺伝毒性評価においては、消化管小核試験（腺胃と結腸）と骨髄小核試験を実施することで、より適切な評価が可能になると考えられる。さらに動物愛護に関する3Rの概念に基づき、短期投与条件下で行う遺伝毒性試験については、2つ以上の異なる指標または組織を組み合わせて実施することが望まれる[1]。そこで、消化管と骨髄での小核誘発性を同一動物で評価するための短期投与試験系（腺胃、結腸、骨髄の小

核同時評価系) の構築を試みた。

腺胃、結腸、骨髄の小核試験を同一動物で実施するためには、3つの試験の標本作製時期を同じにする必要がある。著者はその後の検討により、EDTA処理により得られる消化管上皮細胞は、腺胃では被蓋上皮細胞（胃腺中央部の増殖帯より管腔側の細胞）が主であること、また結腸ではクリプトを構成する全上皮細胞であることを確認している（data not shown）。さらに、ラットの被蓋上皮細胞（腺胃）および結腸上皮細胞は、約4日間かけて胃腺またはクリプトの上部（管腔側）に移行することを確認しており[40]、その寿命は3〜4日程度であると考えられた。また、遺伝毒性物質をラットに単回経口投与し投与後5日目までの小核頻度を経日的に調べたところ、腺胃では投与後2〜4日目に、結腸では投与後4日目に小核頻度が最大となることを確認している[40]。一方、骨髄小核試験において被験物質を複数回投与する場合には、最終投与後18〜24時間目に1回骨髄を採取し標本作製する必要がある[9]。これらの時間を考慮し、同一動物を用いた腺胃、結腸、骨髄の小核試験は、被験物質をラットに4日間連続投与し、最終投与後24時間目に標本作製することで実施可能と考えた（Fig. 4）。

また、小核試験の成績は評価対象臓器における細胞増殖活性の影響を受けることが知られている。特に、被験物質の投与により細胞増殖が抑制された場合には、小核形成が妨げられ、小核試験で偽陰性の成績が得られる危険性がある。そこで、小核誘発性の評価と同時に、Ki-67陽性細胞数を指標として腺胃や結腸の上皮細胞における細胞増殖抑制を評価

することとした。Ki-67タンパクは細胞周期のG1、S、G2およびM期で発現することから、細胞増殖マーカーとして広く用いられている[41]。また著者は、Ki-67陽性細胞数を指標として、消化管上皮細胞の細胞増殖抑制評価が可能であることを確認している[40]。

考案した4日間投与による小核同時評価系を評価するため、本研究では消化管を標的とする6種の遺伝毒性発がん物質 [MNU、4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)、MNNG、N-methyl-N-nitrosourethane (NMUT)、1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH)、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine hydrochloride (PhIP)] をモデル化合物として用いた。MNU、4NQO、MNNGおよびNMUTは経口投与条件下においてラットの腺胃を発がん標的とする物質である[42-46]。また、MNUはラットの結腸でも発がん報告がある[47]。MNU、MNNGおよびNMUTは代謝活性化を必要としない直接変異原物質であり、4NQOは投与後はじめに接触する細胞内で代謝活性化され遺伝毒性を発揮する物質である[48]。一方、DMHやPhIPはラットの結腸を発がん標的とする遺伝毒性物質であり、肝臓および／または消化管で代謝活性化された後、結腸に作用することが知られている[49-53]。

本検討では、上記の遺伝毒性発がん物質に加え、食品添加物である臭素酸カリウム (KBrO₃) と赤色2号 (Amaranth、AM) および植物フラボノイドであるケルセチン (QN) をモデル化合物として用いた。これらの3物質は、代謝活性化系非存在下での*in vitro*培養細胞を用いる小核試験および／または染色体異常試験において陽性報告がある[37,54-60]。KBrO₃については、骨髄や腎臓を用いた小核試験での陽性報告があり[55,56,61,62]、消化

管での発がん報告はないが、腎臓、腹膜および甲状腺での発がん報告がある[56,63-65]。

一方、AMとQNについては、骨髄や結腸を用いた小核試験や染色体異常試験での陰性報告がある[16,66-68]。また、ラットの腸および／または腎臓での発がん性を示唆する報告が数報あるものの[69-71]、発がん性がないとする報告が多い[65,72-76]。

以上の9種類のモデル化合物をラットに4日間経口投与し最終投与後24時間目に標本作製を行うことで、腺胃、結腸、骨髄での小核誘発性の同時評価が可能か否かを検証し、本試験系が経口摂取物質の遺伝毒性評価に有効であるか否かを検討した。

2. 材料と方法

2.1. 動物

7 週齢の雄性 Crl:CD (SD) ラットを日本チャールス・リバー(株)から購入し、1 週間の馴化後、投与に用いた。Crl:CD (SD) ラットは造血細胞を用いる小核試験および一般毒性試験において一般的に用いられるラットの系統である。動物は通常の飼育室において 1 ケージあたり 2~3 匹を飼育し、固型飼料 [F-2、(株)船橋農場] および自家水道水を自由摂取させた。なお、本動物実験は、(株)ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規程に従い、(株)ヤクルト中央研究所 動物実験委員会の承認を得て実施した。

2.2. 化学物質

試験に使用した化学物質を Table 1 に示した。これらを媒体に溶解または懸濁し、すぐに投与に使用した。

2.3. 投与および処置

上記化学物質を、それぞれ 1 日 1 回、4 日間連続経口投与した。投与は胃ゾンデを用いた胃内強制投与とし、投与容量は全群 10 mL/kg 体重/day とした。また、実験には 1 群 5 匹の動物を用いた。MNU、4NQO、MNNG、NMUT、DMH および PhIP は 3 段階以上、KBrO₃、AM および QN は 1 段階の用量を設定した (Table 1)。最高投与用量は予備試験において

毒性兆候（体重減少など）の認められる用量とした。また、毒性兆候の認められない場合には 1000 mg/kg 体重/day とした。陰性対照群には各種溶媒を 4 日間連続経口投与した（ただし、AM の陰性対照は 2% Tween 80 とした）。陽性対照群には、MNU と DMH を併用投与した (Fig. 4)。すなわち、化学物質投与期間（4 日間）のうち、第 1 日目に DMH 88.6 mg/kg 体重、第 3、4 日目に MNU 21.6 mg/kg 体重を経口投与した。この投与スケジュールは以下の事例より決定した。① MNU 21.6 mg/kg 体重をラットに 2 日間連続経口投与しその後 24 時間目において、腺胃および骨髄の小核頻度が有意に増加するが、結腸小核頻度は増加しないこと（data not shown）、② DMH 88.6 mg/kg 体重をラットに単回経口投与後しその後 96 時間目において、結腸小核頻度が有意に増加するが、腺胃および骨髄の小核頻度は増加しないこと[40, data not shown]。

最終投与後 24 時間目に、ペントバルビタール麻酔下において腹部大動脈を切断し放血することで安楽死を行い、腺胃、結腸および右大腿骨を採材した。

2.4. 腺胃小核試験

大山らとともに開発したラット腺胃小核試験の方法[40]に準じて行った (Fig. 5)。すなわち、切り出した腺胃の噴門部よりガラス棒を挿入し、ガラス棒の先端に備えた玉部に腺胃粘膜面が表になるように裏返して医療用アロンアルファで接着した。裏返した腺胃を 1 mM EDTA と 2 mM DTT を含む Mg^{2+}/Ca^{2+} -free Hanks' Buffer solution (HBSS) 中でインキュ

ベート（35℃、1 時間）することで上皮細胞を剥離した。インキュベート後は、腺胃を振ることで細胞の剥離を促した。細胞懸濁液をパスツールピペットでピペッティングした後、メッシュ（160 μm ）に通し夾雑物を取り除いた。遠心（1000～1500 rpm、5 分、4℃）により細胞を回収し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。その後、10%中性緩衝ホルマリンを交換し、観察時まで4℃で保存した。

観察時に AO と DAPI の混合染色液（AO : 50 $\mu\text{g/mL}$ 、DAPI : 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ）と細胞懸濁液を等量混合し、蛍光顕微鏡下 [UV 励起（365 nm）、600 倍] で観察した。観察には暗号を付した標本を用い、1 個体あたり 2000 個の上皮細胞を観察して小核を有する細胞の割合（小核頻度）を算出した。観察対象細胞は、細胞質を保有しており、核膜が明瞭で、細胞が重なっていないものとした。また、主核が断片化している細胞は観察対象としなかった。小核は、主核と同じ色の蛍光を発しており、主核と接しておらず、直径が主核の 1/3 以下のものとした[77]。

2.5. 結腸小核試験

大山らとともに開発したラット結腸小核試験の方法[40]に準じて行った（Fig. 6）。すなわち、結腸を粘膜面が表になるようにガラス棒に裏返し、1 mM EDTA を含む HBSS (pH 6.8) 中でインキュベート（35℃、30 分）することで上皮細胞を剥離した。途中、5 分間の振動を2回繰り返した。剥離した上皮細胞をピペッティングにより単離後、遠心（1000～1500 rpm、

5 分、4℃) により回収し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。その後、10%中性緩衝ホルマリンを交換し、観察時まで 4℃で保存した。

観察時に AO と DAPI の混合染色液 (AO : 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DAPI : 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と細胞懸濁液を等量混合し、蛍光顕微鏡下 [UV 励起 (365 nm) 、600 倍] で観察した。観察には暗号を付した標本を用い、1 個体あたり 2000 個の上皮細胞を観察して小核を有する細胞の割合 (小核頻度) を算出した。観察対象細胞および小核の判定基準は、腺胃小核試験と同様とした。

2.6. 骨髓小核試験

MNU、4NQO、MNNG、NMUT、DMH および PhIP の評価は、Kawabata らの細胞懸濁法 [78]により行った。すなわち、1 mL の 10%中性緩衝ホルマリンで大腿骨から骨髓細胞を遠心管に洗い出し、5 分程度静置した後に上清を回収した。さらに 10%中性緩衝ホルマリン 1 mL を加えて遠心 (1000 rpm、5 分) し、骨髓細胞を回収した。その後、10%中性緩衝ホルマリンを交換し、観察時まで 4℃で保存した。観察時には、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AO 液と細胞懸濁液を等量ずつスライドガラス上で混合し、カバーガラスをかけた。

KBrO₃、AM および QN の評価は、Hayashi らの塗抹法 [79]により行った。すなわち、0.5 mL のウシ胎児血清で大腿骨から骨髓細胞を遠心管に洗い出した後、その少量をスライドガラス上に薄く広げた。風乾させた後にメタノールで 5 分間固定し、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AO 液を数滴のせてカバーガラスをかけた。

いずれの標本も暗号を付し、蛍光顕微鏡下〔IB 励起（490 nm）、600 倍〕で観察した。

個体ごとに、① 2000 個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球の割合（小核頻度）、② 500 個以上の全赤血球を観察し、全赤血球に占める幼若赤血球の割合（幼若赤血球比）を算出した。なお、幼若赤血球比が 1%以下の個体については骨髓小核頻度の算出を行わなかった。

2.7. Ki-67 陽性細胞数を指標とした細胞増殖抑制の評価

抗 Ki-67 抗体による免疫組織化学染色により、腺胃と結腸での細胞増殖抑制の有無を評価した。評価には 1 群あたり 3 匹の動物を用いた。すなわち、小核試験に供した動物またはサテライト群の動物から、胃体部と結腸中間部の一部を採材し、定法に従いパラフィン組織標本を作製した。組織標本を脱パラフィン後、3%過酸化水素水に 5 分浸漬した。トリス緩衝生理食塩水（TBS）で洗浄後、賦活化溶液（Target Retrieval Solution Concentrated, Dako/Agilent Technologies Inc.）を用いて賦活化した後、一次抗体（Monoclonal mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, clone MIB-5, Dako/Agilent Technologies Inc.）と 1 時間反応させた。その後、ビオチン標識二次抗体（Immunoglobulins/Biotinylated Rabbit Polyclonal Anti-Mouse, Dako/Agilent Technologies Inc.）および horseradish peroxidase（HRP）標識ストレプトアビジン（Dako/Agilent Technologies Inc.）にそれぞれ 30 分間反応させた後、diaminobenzidine（DAB, Dako/Agilent Technologies Inc.）により発色させた。免疫組織化学染色を行った標本

は、ヘマトキシリンによる染色を行った。

光学顕微鏡下(600 倍)において 1 個体あたり 30 本の胃腺および結腸クリプトを観察し、胃腺またはクリプト 1 本あたりの Ki-67 陽性細胞数を算出した。

2.8. 統計

小核保有細胞の出現頻度については Kastenbaum & Bowman の統計学的方法を用いて陰性対照群とその他の群との間の統計を行った(有意水準 0.1%、1%および 5%、片側)。また、有意性が認められた場合には、Cochran-Armitage による傾向検定を行った(有意水準 0.1%、1%および 5%、片側)。その他の計量データについても、被験物質毎に陰性対照群と被験物質投与群との比較を行った。すなわち、2 群間での比較の場合には F 検定(有意水準 5%、両側)により等分散性が確認されたため、Student の t -検定を行った。他群間での比較の場合には、多重比較検定法で統計学的有意性を検定した。すなわち、Bartlett 法による等分散性の検定(有意水準 5%、両側)を行い、分散が等しい場合には Dunnett 法の多重比較検定、分散が等しくない場合には、Steel の検定を行った(いずれも有意水準 0.1%、1%および 5%、両側)。

3. 結果

3.1. 胃を発がん標的とする遺伝毒性物質を用いた検証

MNU の経口投与により、腺胃と結腸では全用量群（5.84～35.1 mg/kg 投与群）において有意かつ用量依存的に小核頻度が増加した（Fig. 7A,B、Table 2）。これらの臓器において Ki-67 陽性細胞数の減少は認められず、細胞増殖抑制は認められなかった。骨髄では、5.84 および 11.7 mg/kg 投与群において小核頻度の有意かつ用量依存的な増加が認められた（Fig. 7C、Table 2）。23.4 および 35.1 mg/kg 投与群では幼若赤血球比が 1%以下となり、強い細胞増殖抑制が認められた。そのため、これらの投与群では小核頻度を算出しなかった。

4NQO の経口投与により、腺胃では全用量群（5～20 mg/kg 投与群）において有意かつ用量依存的に小核頻度が増加した（Fig. 8A、Table 2）。一方、結腸では小核頻度の増加は認められなかった（Fig. 8B、Table 2）。これらの臓器において、Ki-67 陽性細胞数の減少は認められず、細胞増殖抑制は認められなかった。骨髄では、高用量群（20 mg/kg 投与群）において小核頻度が有意に増加し、小核頻度の増加には用量相関性が認められた（Fig. 8C、Table 2）。幼若赤血球比は高用量群で有意に減少した。

MNNG 6.25～50 mg/kg または NMUT 5～20 mg/kg の経口投与により、腺胃では全用量群において有意かつ用量依存的に小核頻度が増加した（Fig. 9A, 10A、Table 2）。腺胃での Ki-67 陽性細胞数の減少は認められず、細胞増殖抑制は認められなかった。一方、結腸と骨髄において小核頻度の増加は認められなかった（Fig. 9B,C, 10B,C、Table 2）。NMUT 10 mg/kg

投与群の結腸において、Ki-67 陽性細胞数の統計学的に有意な減少が認められたが、その程度は微弱なもので用量相関性もなく、小核誘発性に影響を与えるものではなかった。

3.2. 結腸を発がん標的とする遺伝毒性物質を用いた検証

DMH 10～80 mg/kg または PhIP 50～250 mg/kg の経口投与により、結腸では全用量群において有意かつ用量依存的に小核頻度が増加した (Fig. 11B, 12B、Table 2)。結腸での Ki-67 陽性細胞数は、DMH 10 mg/kg 投与群で有意に増加し、DMH 80 mg/kg 投与群で有意に減少した。一方、腺胃では小核頻度の増加および Ki-67 陽性細胞数の減少は認められなかった (Fig. 11A, 12A、Table 2)。DMH 投与群の骨髄では、40 および 80 mg/kg 投与群において小核頻度が有意に増加し、小核頻度の増加には用量相関性が認められた (Fig. 11C、Table 2)。また、DMH 40 mg/kg 投与群では、幼若赤血球比が有意に減少した。PhIP 投与群の骨髄では、50 mg/kg 投与群において小核頻度が有意に増加した (Fig. 12C、Table 2)。PhIP 150 および 250 mg/kg 投与群では幼若赤血球比が 1%以下となり、強い細胞増殖抑制が認められた。そのため、これらの投与群では小核頻度を算出しなかった。

3.3. 食品添加物と植物フラボノイドを用いた検証

KBrO₃ 80 mg/kg の経口投与により、腺胃と骨髄では小核頻度が有意に増加した (Fig. 13A,C、Table 3)。結腸の小核頻度は、統計学的に有意に増加したがその値は 0.09%と小さ

く、本報告の陰性対照値と同程度であった (Fig. 13B、Table 3, 4)。KBrO₃ 投与により、腺胃の Ki-67 陽性細胞数は有意に増加した。また結腸と骨髄において、Ki-67 陽性細胞数および幼若赤血球比の変動は認められず、細胞増殖抑制は認められなかった。

AM 1000 mg/kg および QN 1000 mg/kg の経口投与では、腺胃、結腸、骨髄のいずれの臓器においても小核頻度の増加は認められなかった (Fig. 14、Table 3)。また、腺胃、結腸および骨髄において、Ki-67 陽性細胞数ならびに幼若赤血球比に変動は認められず、いずれの臓器においても細胞増殖抑制は認められなかった。

両試験の陽性対照群 (MNU と DMH の併用投与群) の腺胃、結腸および骨髄では、陰性対照群と比較して有意な小核頻度の増加が認められ、3 臓器同時に陽性反応が得られた (Fig. 13, 14、Table 3)。

3.4. 毒性学的所見

MNU、4NQO、MNNG、NMUT、DMH、PhIP および KBrO₃ を投与したラットの体重は、陰性対照群と比較して有意に低値を示した (Table 1)。一方、AM と QN を投与したラットの体重については、陰性対照群との間に有意な差は認められなかった。一般状態の変化として、MNU 60 mg/kg 投与群のラットで立毛が認められた。肉眼所見として、MNU、4NQO、MNNG、NMUT 投与動物において胃の腫脹と胃粘膜出血が認められた。また DMH 投与群では、結腸の長さが用量依存的に短縮した。

4. 考察

胃および／または結腸を標的とする 6 種の遺伝毒性発がん物質をラットに 4 日間連続経口投与した結果、それぞれの標的臓器において遺伝毒性の検出が可能であった (Table 5)。すなわち、MNU 投与により腺胃と結腸で、4NQO、MNNG および NMUT 投与により腺胃で、DMH と PhIP 投与により結腸で小核頻度の用量依存的な増加が確認された。また、MNU、4NQO、DMH、PhIP の投与により、骨髄での小核頻度の増加も確認された。これらの結果から、4 日間連続投与後 24 時間目の評価により、腺胃、結腸、骨髄での小核誘発性を同一動物で評価できることが示された。

4NQO、MNNG および NMUT 投与群では、結腸での小核誘発性および細胞増殖抑制は認められなかった。この理由として、これらの物質が生体内で不安定であり、経口投与後、結腸に十分量曝露されなかったためと考える。また、DMH および PhIP 投与群では、腺胃での小核誘発性および細胞増殖抑制は認められなかった。これらの化合物は、胃での発がん報告はなく、肝臓および／または腸で代謝活性化された後、または抱合体が腸肝循環する過程で腸内細菌による脱抱合を受け再活性化された後、結腸に作用しがんを誘発することが知られている[49-53,80,81]。そのため、胃で小核を誘発せず、結腸で小核頻度が増加する今回の結果は妥当であると考えられた。

6 種の遺伝毒性発がん物質の骨髄小核試験の成績は、これまでに報告されている経口投与条件下での造血細胞を用いる小核試験の成績と一致した[19,34,35,62,82-85]。特に MNNG

や NMUT を経口投与したラットでは、腺胃において小核頻度の増加が認められたが、骨髄では認められなかった。今回の MNNG の結果は、単回投与条件下でのマウスやラットにおいても確認されている[第二章,40]。また、Brault らは MNNG を経口投与した MutaTM Mouse の胃において変異頻度が増加し、骨髄や肝臓では増加しないことを報告している[39]。

NMUT の *in vivo* 遺伝毒性試験の報告については、Furihata らによるラットを用いる胃 UDS 試験での陽性報告が唯一であり[6,7]、腺胃や骨髄での染色体異常誘発性の有無を示したのは本研究が初めてである。加えて、経口投与された MNNG や NMUT は、腺胃でチオールと反応し分解され DNA のメチル化を誘導することや、血中ですばやく分解されることが報告されている[46,86-90]。これらの特性は、MNNG や NMUT の臓器特異性に関係すると考えられている。以上のように、MNNG や NMUT では経口投与後はじめに接触する腺胃においてのみ陽性結果が得られたことから、消化管と骨髄を組み合わせた当該小核試験は、経口摂取する物質の遺伝毒性評価に非常に有用であると考えられた。

MNU 23.4 mg/kg ならびに MNNG 25 および 50 mg/kg を 4 日間投与したラットの腺胃小核頻度を、単回投与後の小核頻度[40]と比較したところ、4 日間投与した場合には約 2.3～4.1 倍の高値を示すことが明らかとなった。また、DMH 80 mg/kg を 4 日間投与したラットの結腸小核頻度については、単回投与後と比較して約 1.4 倍の高値を示した。消化管小核試験の評価対象細胞（腺胃被蓋上皮細胞および結腸上皮細胞）の寿命は 3～4 日程度であることから[40]、今回認められた投与回数の増加に伴う小核頻度の増加は、小核保有細胞が消化

管上皮から排除されずに 3～4 日間残存し蓄積することにより生じたものと考えている。そのため、消化管小核試験に 4 日間投与スケジュールを採用することで、腺胃や結腸での小核誘発性の検出感度が上昇するものと考えられた。

本検討では、6 種の消化管を標的とする遺伝毒性発がん物質に加え、 KBrO_3 の遺伝毒性を腺胃や骨髄の小核試験により検出することができた。食品添加物（小麦粉改良剤）として使用される KBrO_3 は、代謝活性化系非存在下における *in vitro* 遺伝毒性試験や、骨髄や腎臓を用いた *in vivo* 遺伝毒性試験において、染色体異常誘発性を示すことが知られている [37,54-56,58,61,62]。そのため、今回確認された腺胃や骨髄での陽性成績は、妥当な成績であった。また、結腸の小核頻度は統計学的に有意に増加したが、本報告における陰性対照値と同程度であったことから、結腸小核試験の成績は陰性と判断した。経口投与された KBrO_3 は、胃から速やかに血中に移行すること、また胃、小腸、血中および尿中で素早く分解されることから [56,91]、結腸では重篤な染色体損傷が認められなかったものとする。

一方、AM や QN を投与したラットでは、腺胃、結腸および骨髄のいずれの臓器においても小核頻度の増加は認められなかった。今回の試験では、AM の投与用量として国際連合食糧農業機関／世界保健機関合同食品添加物専門家会議（JECFA）の定める 1 日許容摂取量（0.5 mg/kg 体重） [92] の 2000 倍に相当する用量を、QN の投与用量として懸濁液として投与可能な最大用量を採用しており、投与量は十分であった。また、小核評価を行った全臓器において、小核形成に影響を与えうる細胞増殖抑制は認められなかった。さらに、

陽性対照群の腺胃、結腸、骨髄では小核頻度が有意に増加し、試験が適切に実施されていることが示された。以上より、AM や QN は、腺胃、結腸、骨髄において染色体異常を誘発しない可能性が強く示唆された。これらの陰性成績は、AM や QN が発がん性を有さない結論する多くの研究報告[65,72-76]と一致する。

AM と QN については、代謝活性化系非存在下における *in vitro* 遺伝毒性試験で染色体異常誘発性が報告されている[55,57,59,60]。また、*in vivo* 遺伝毒性試験では、Sasaki らや Tsuda らがマウスの胃や結腸を用いる comet assay により AM の DNA 損傷性を報告している[93,94]。一方、Poul らはマウス結腸小核試験で陰性成績を報告しており、その理由として Sasaki らや Tsuda らが報告した DNA 損傷は修復され小核を形成しなかったと考察している[16]。この Poul らの報告は、今回得られた AM の成績を支持する。また QN については、骨髄小核試験での陰性成績が報告されているが[55,67,68]、経口投与後 QN が高濃度で直接曝露される消化管において小核誘発性が認められないことを示した報告は今回が初めてである。以上のように、AM と QN は *in vivo* において骨髄のみならず腺胃や結腸においても小核誘発性を示さなかった。そのため、今回開発した腺胃、結腸、骨髄での小核同時評価系は、*in vitro* 遺伝毒性試験で陽性となる物質について *in vivo* での遺伝毒性や発がん性のポテンシャルを確認するための追加試験としても有効であると考えられた。

以上の結果から、4 日間投与後 24 時間目の標本作製により、腺胃、結腸、骨髄での小核同時評価が可能となることが示された。また、当評価系は経口摂取する物質の広範的な遺伝毒性評価に有効であることが明らかになった。

Treatment schedule

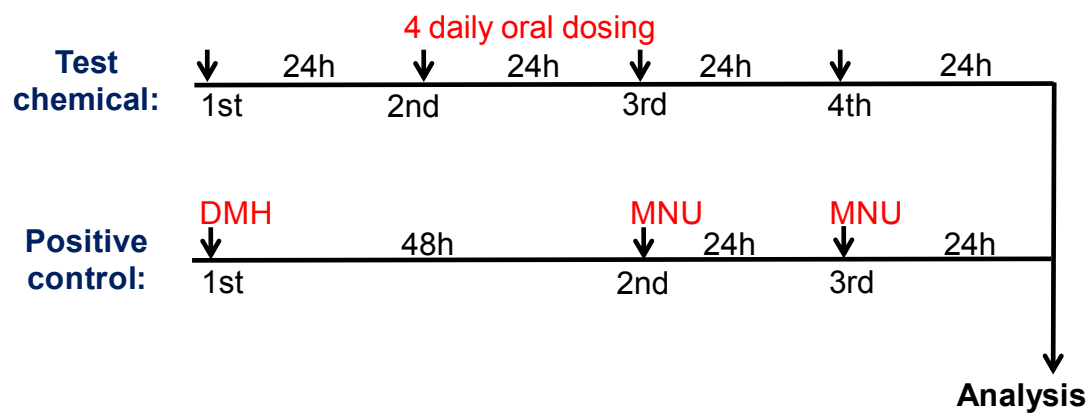


Fig. 4

Treatment schedule for simultaneous micronucleus analyses in the glandular stomach, colon, and bone marrow.

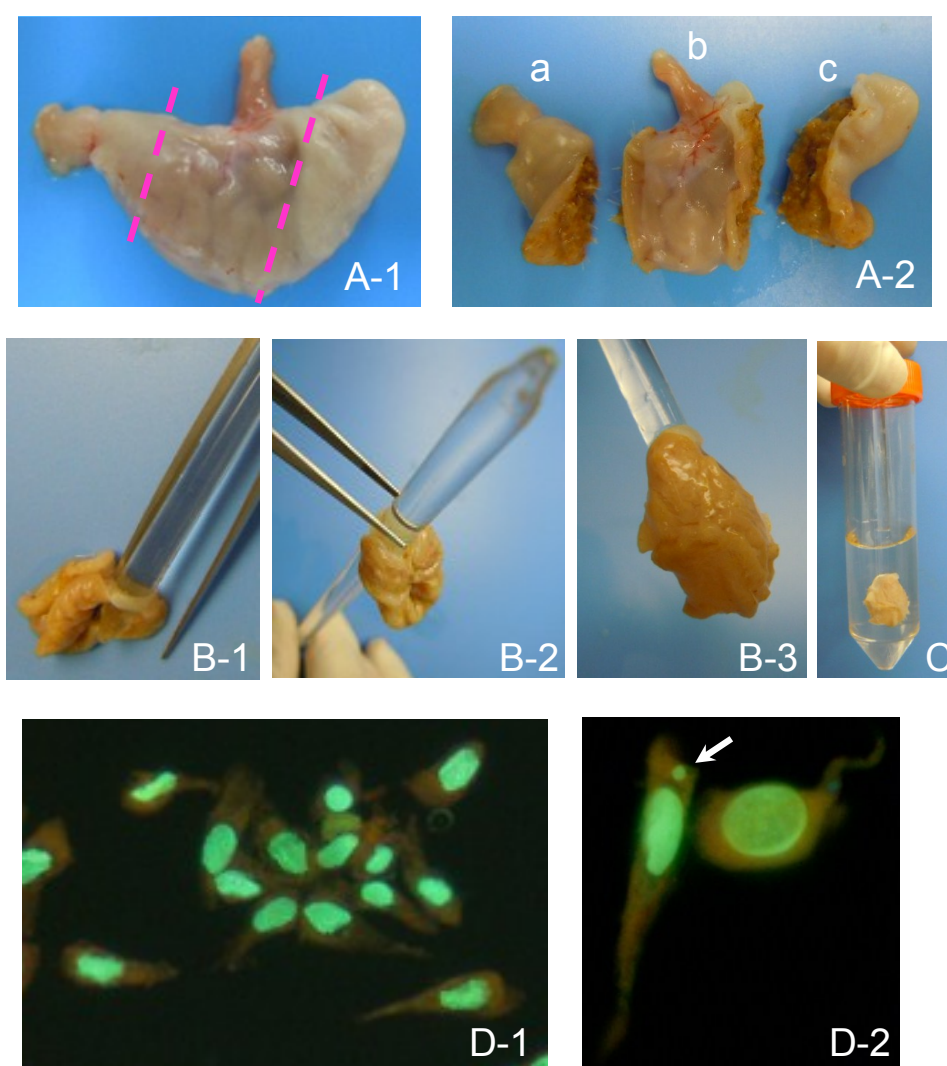


Fig. 5

Method of the slide preparation for rat glandular stomach micronucleus test. After the stomach had been divided along the dotted lines (A-1), the part of “b” was used for micronucleus assay (A-2); the parts of “a” and “c” can be used as needed for histopathological examination. The glandular stomach was everted on a glass rod (B-1, -2, and -3) and incubated in a tube containing 1 mM EDTA + 2 mM DTT in HBSS to isolate the epithelium (C). The isolated epithelium was dispersed into single cells by pipetting, and then the cells were fixed with 10% neutral-buffered formalin.

Fluorescence microscopy image of gastric epithelial cells stained with AO and DAPI (D). Magnification: 200× (D-1) and 400× (D-2). Arrow indicates a micronucleus.

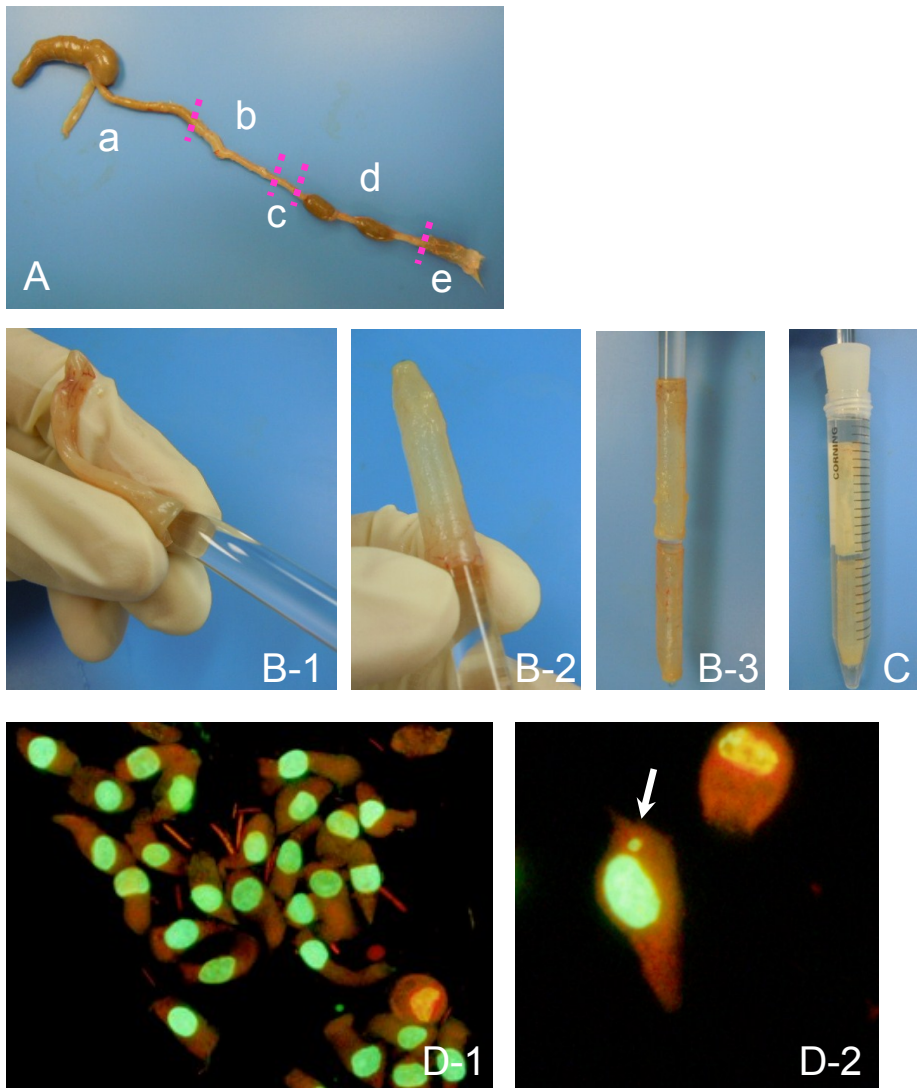


Fig. 6

Method of the slide preparation for rat colon micronucleus test. The parts of “b” and “d” were used for micronucleus assay (A); the parts of “a”, “c” and “e” can be used as needed for histopathological examination. The colon was everted on a glass rod (B-1, -2, and -3) and incubated in a tube containing 1 mM EDTA in HBSS to isolate the epithelium (C). The isolated epithelium was dispersed into single cells by pipetting, and then the cells were fixed with 10% neutral-buffered formalin.

Fluorescence microscopy image of colonic epithelial cells stained with AO and DAPI (D). Magnification: 200× (D-1) and 400× (D-2). Arrow indicates a micronucleus.

Table 1
Chemical information

Chemicals [CAS number]	Abbreviation	Source	Lot. No.	Purity	Vehicle	Dosage (mg/10 mL/kg body weight /day)
<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methylurea [684-93-5]	MNU	Sigma-Aldrich	100M1436	(contains 55% water and acetic acid)	DW	5.84, 11.7**, 23.4**, 35.1** (converted to MNU amount)
			037K0690	(contains 44.68% water and acetic acid)	DW	21.6 for positive control (converted to MNU amount)
4-Nitroquinoline-1-oxide [56-57-5]	4NQO	Tokyo kasei	N4RDF -SL	98.5%	0.5% MC	5, 10*, 20**
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> - nitrosoguanidine [70-25-7]	MNNG	Tokyo kasei	FIE02	98.1%	5% DMSO	6.25, 12.5, 25, 50**
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea [615-53-2]	NMUT	Tokyo kasei	ABVVA	>95%	DW	5, 10, 20**
1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride [306-37-6]	DMH	Tokyo kasei	VU5VG -RD	100%	DW	10*, 20**, 40**, 80**
			EZC6C	100%	1 mM EDTA in saline	88.6 for positive control
2-Amino-1-methyl- 6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>] pyridine hydrochloride [no CAS number]	PhIP	NARD Institute	080125	100%	0.5% MC	50*, 150**, 250**
Potassium bromate [7758-01-2]	KBrO ₃	Wako	PEM1558	>99.8%	DW	120 [#]
Amaranth (Food Red No. 2) [915-67-3]	AM	Nacalai tesque	80703D	>85%	DW	1000
Quercetin dihydrate [6151-25-3]	QN·2H ₂ O	Sigma-Aldrich	087K0744	>98%	2% Tween 80	1000 (converted to QN amount)

DW: distilled water, DMSO: dimethyl sulfoxide, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt,
MC: methylcellulose.

*Dosage with reducing body weight compared to the vehicle control group; statistical significance: $p < 0.05$ (Dunnett's test).

**Dosage with reducing body weight compared to the vehicle control group; statistical significance: $p < 0.01$ (Dunnett's test).

[#]Dosage with reducing body weight compared to the vehicle control group; statistical significance: $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

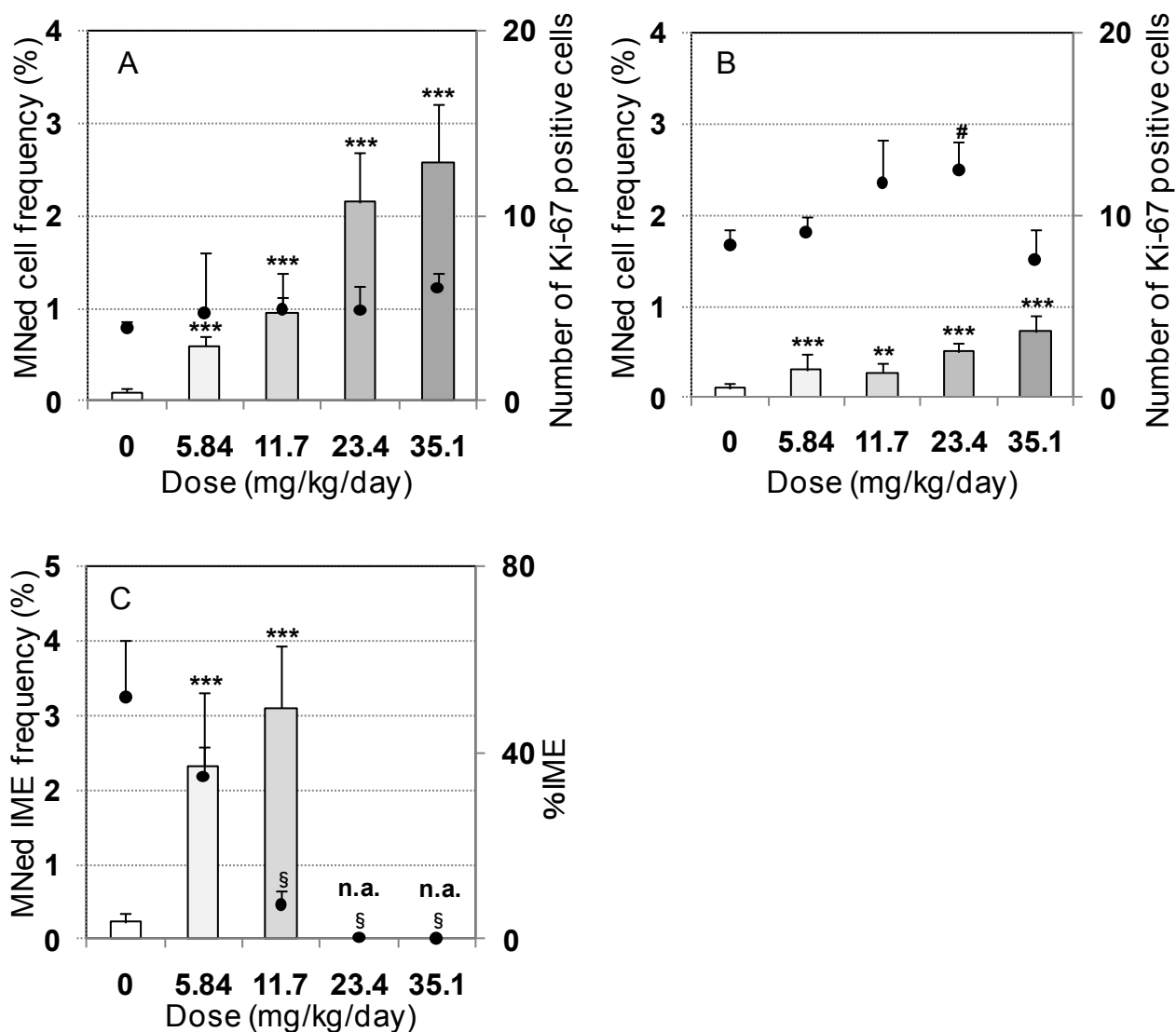


Fig. 7

Micronucleus test in glandular stomach (A), colon (B), and bone marrow (C) using rats administered MNU for 4 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs). Each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells (per gland or crypt) or the %IME. The horizontal axis represents dosage (mg/kg/day). Data expressed as mean \pm SD. n.a.: not analyzed.

Statistical significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kastenbaum & Bowman test), # $p < 0.05$ (Dunnett's test), § $p < 0.05$ (Steel test) as compared to the vehicle control.

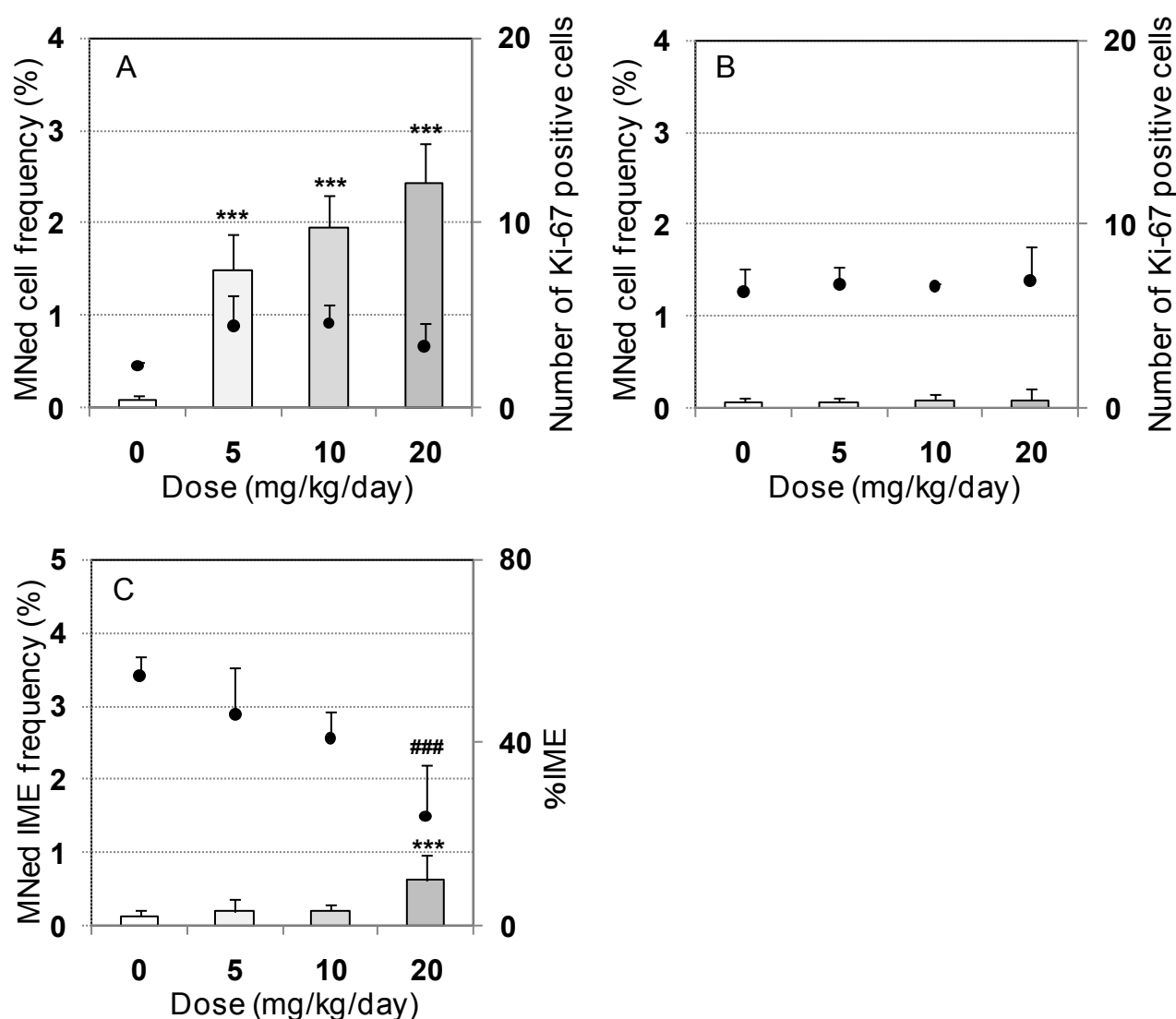


Fig. 8

Micronucleus test in glandular stomach (A), colon (B), and bone marrow (C) using rats administered 4NQO for 4 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs). Each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells (per gland or crypt) or the %IME. The horizontal axis represents dosage (mg/kg/day). Data expressed as mean \pm SD.

Statistical significance: *** $p < 0.001$ (Kastenbaum & Bowman test), ### $p < 0.001$ (Dunnett's test) as compared to the vehicle control.

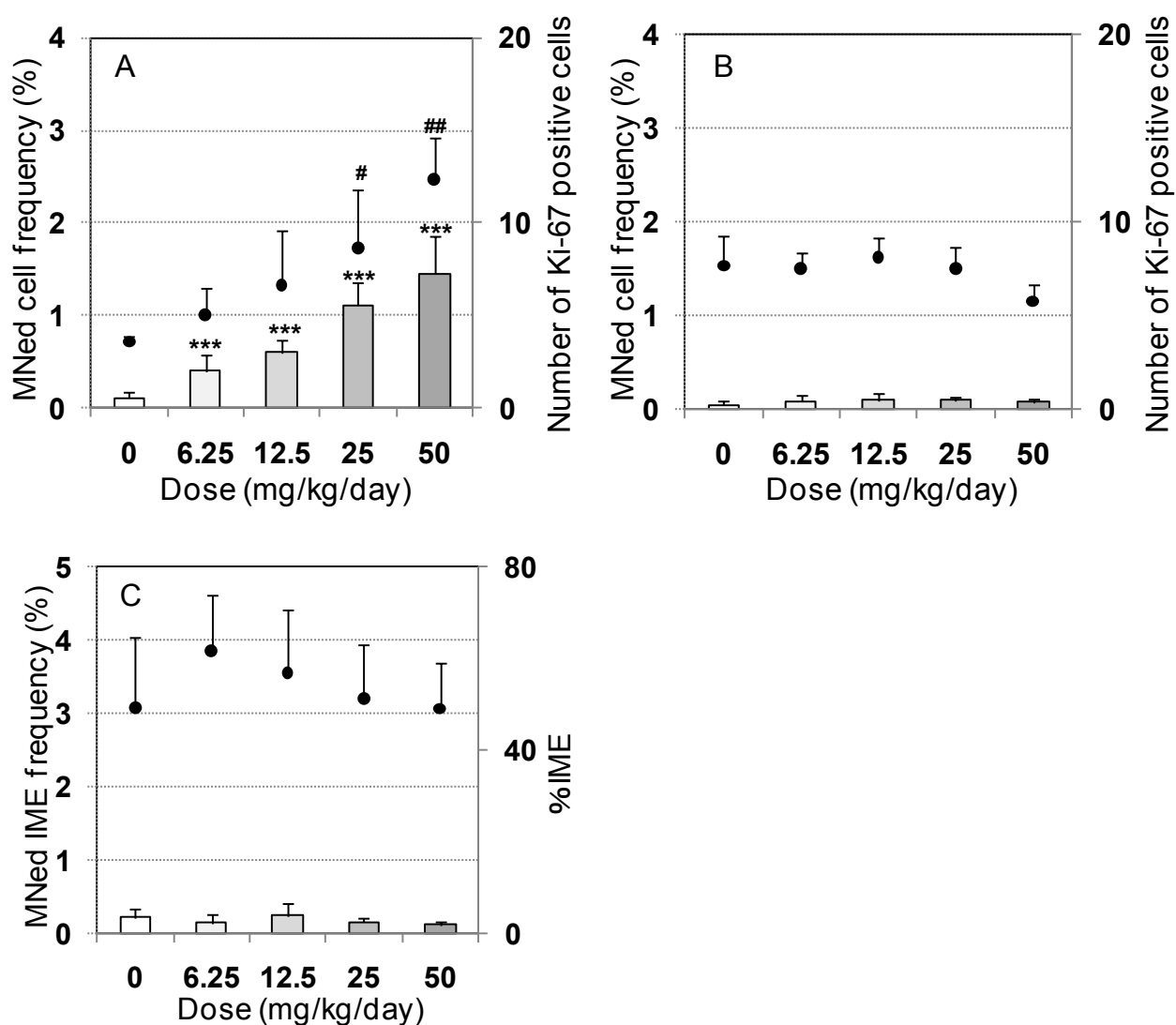


Fig. 9

Micronucleus test in glandular stomach (A), colon (B), and bone marrow (C) using rats administered MNNG for 4 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs). Each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells (per gland or crypt) or the %IME. The horizontal axis represents dosage (mg/kg/day). Data expressed as mean \pm SD.

Statistical significance: *** p <0.001 (Kastenbaum & Bowman test), # p <0.05, ## p <0.01 (Dunnett's test) as compared to the vehicle control.

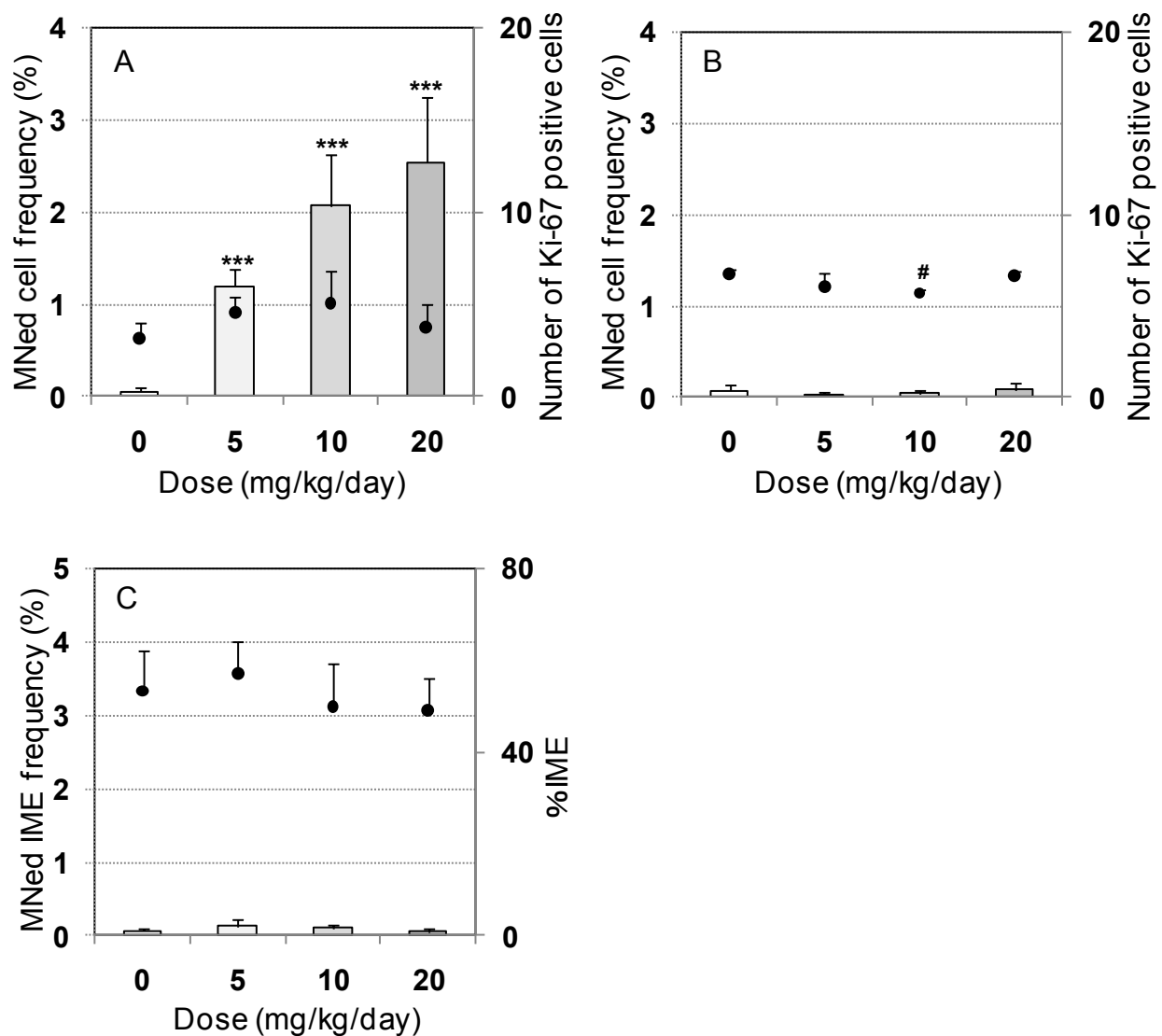


Fig. 10

Micronucleus test in glandular stomach (A), colon (B), and bone marrow (C) using rats administered NMUT for 4 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs). Each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells (per gland or crypt) or the %IME. The horizontal axis represents dosage (mg/kg/day). Data expressed as mean \pm SD.

Statistical significance: *** $p < 0.001$ (Kastenbaum & Bowman test), # $p < 0.05$ (Dunnett's test) as compared to the vehicle control.

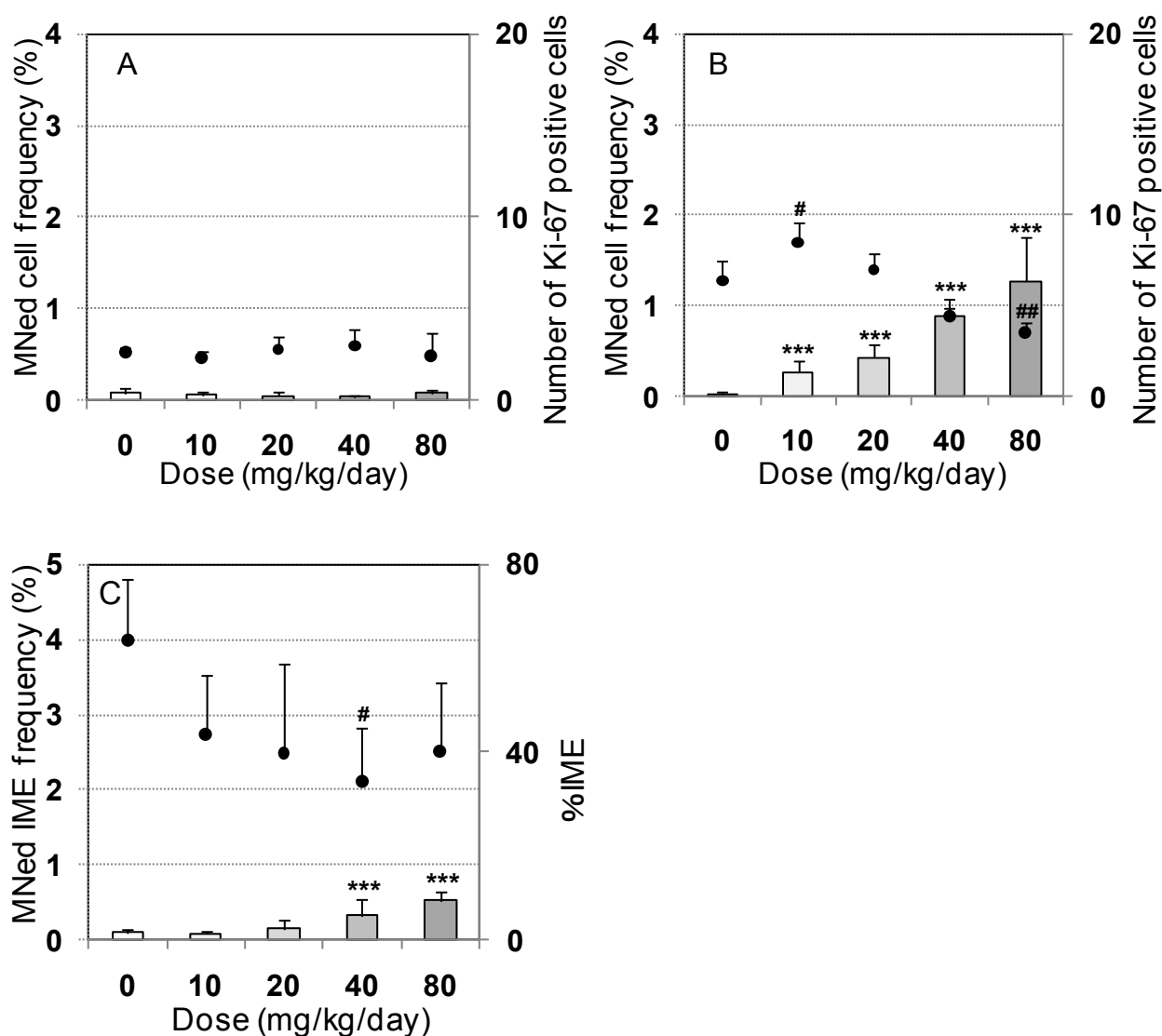


Fig. 11

Micronucleus test in glandular stomach (A), colon (B), and bone marrow (C) using rats administered DMH for 4 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs). Each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells (per gland or crypt) or the %IME. The horizontal axis represents dosage (mg/kg/day). Data expressed as mean \pm SD.

Statistical significance: *** p <0.001 (Kastenbaum & Bowman test), # p <0.05, ## p <0.01 (Dunnett's test) as compared to the vehicle control.

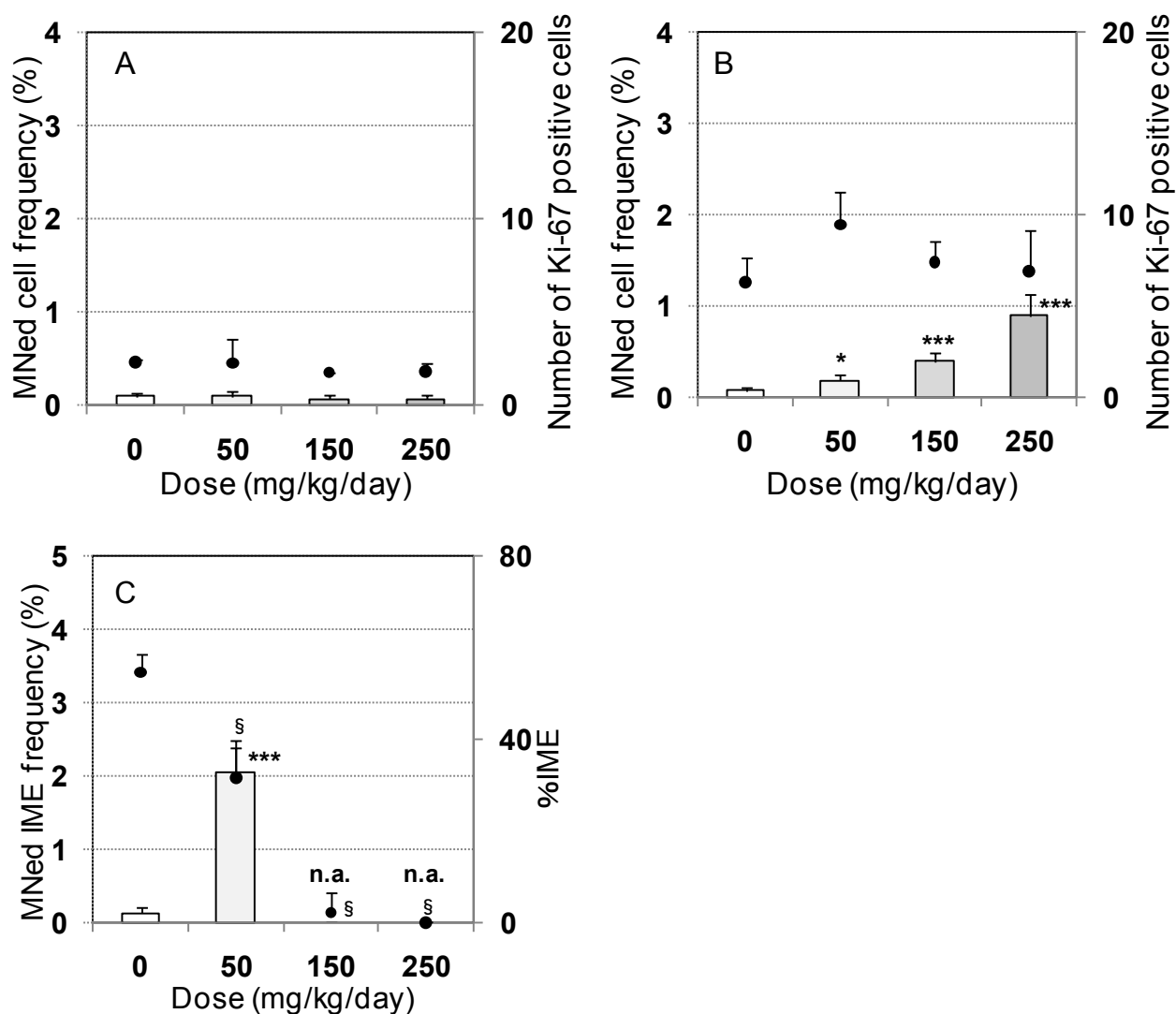


Fig. 12

Micronucleus test in glandular stomach (A), colon (B), and bone marrow (C) using rats administered PhIP for 4 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs). Each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells (per gland or crypt) or the %IME. The horizontal axis represents dosage (mg/kg/day). Data expressed as mean \pm SD. n.a.: not analyzed.

Statistical significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Kastenbaum & Bowman test),[§] $p < 0.05$ (Steel test) as compared to the vehicle control.

Table 2

Frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs) after 4 daily oral administration of gastrointestinal tract carcinogens (individual data)

Chemical (mg/kg/day)	Glandular stomach		Colon		Bone marrow	
	Frequency	Mean \pm SD	Frequency	Mean \pm SD	Frequency	Mean \pm SD
DW	0.10, 0.10, 0.00, 0.15, 0.10	0.09 \pm 0.05	0.05, 0.05, 0.10, 0.20, 0.10	0.10 \pm 0.06	0.35, 0.25, 0.05, 0.30, 0.20	0.23 \pm 0.12
MNU, 5.84	0.75, 0.55, 0.50, 0.55, 0.65	0.60 \pm 0.10 ***	0.60, 0.25, 0.35, 0.20, 0.15	0.31 \pm 0.18 ***	2.50, 1.85, 1.40, 1.90, 3.95	2.32 \pm 0.99 ***
MNU, 11.7	0.85, 1.50, 0.70, 0.45, 1.30	0.96 \pm 0.43 ***	0.10, 0.30, 0.35, 0.30, 0.35	0.28 \pm 0.10 **	1.70, 2.95, 3.40, 3.85, 3.60	3.10 \pm 0.85 ***
MNU, 23.4	1.55, 2.05, 2.60, 2.80, 1.75	2.15 \pm 0.54 ***	0.55, 0.50, 0.45, 0.40, 0.65	0.51 \pm 0.10 ***	n.a.	n.a.
MNU, 35.1	1.50, 2.60, 3.00, 3.00, 2.80	2.58 \pm 0.63 ***	0.65, 0.60, 0.60, 1.00, 0.80	0.73 \pm 0.17 ***	n.a.	n.a.
Trend		+++		+++		+++
0.5% MC	0.15, 0.10, 0.05, 0.05, 0.10	0.09 \pm 0.04	0.00, 0.05, 0.10, 0.10, 0.10	0.07 \pm 0.04	0.05, 0.10, 0.15, 0.10, 0.25	0.13 \pm 0.08
4NQO, 5	1.95, 1.80, 0.95, 1.30, 1.45	1.49 \pm 0.40 ***	0.15, 0.05, 0.05, 0.05, 0.05	0.07 \pm 0.04	0.45, 0.10, 0.25, 0.05, 0.15	0.20 \pm 0.16
4NQO, 10	2.20, 2.40, 1.50, 1.75, 1.90	1.95 \pm 0.36 ***	0.10, 0.00, 0.10, 0.10, 0.15	0.09 \pm 0.05	0.20, 0.10, 0.35, 0.20, 0.20	0.21 \pm 0.09
4NQO, 20	2.80, 2.85, 1.95, 2.55, 2.05	2.44 \pm 0.42 ***	0.00, 0.05, 0.05, 0.30, 0.05	0.09 \pm 0.12	0.75, 0.35, 1.15, 0.30, 0.60	0.63 \pm 0.34 ***
Trend		+++		n.a.		+++
PhIP, 50	0.10, 0.05, 0.05, 0.05, 0.20	0.09 \pm 0.07	0.20, 0.20, 0.25, 0.15, 0.10	0.18 \pm 0.06 *	1.65, 2.50, 2.15, 1.70, 2.20	2.04 \pm 0.36 ***
PhIP, 150	0.05, 0.05, 0.00, 0.15, 0.05	0.06 \pm 0.05	0.45, 0.35, 0.25, 0.45, 0.45	0.39 \pm 0.09 ***	n.a.	n.a.
PhIP, 250	0.10, 0.05, 0.05, 0.10, 0.00	0.06 \pm 0.04	1.15, 1.00, 0.55, 1.00, 0.75	0.89 \pm 0.24 ***	n.a.	n.a.
Trend		n.a.		+++		n.a.
5% DMSO	0.05, 0.20, 0.15, 0.05, 0.10	0.11 \pm 0.07	0.10, 0.00, 0.05, 0.00, 0.05	0.04 \pm 0.04	0.30, 0.35, 0.20, 0.15, 0.10	0.22 \pm 0.10
MNNG, 6.25	0.30, 0.35, 0.20, 0.60, 0.55	0.40 \pm 0.17 ***	0.10, 0.00, 0.00, 0.15, 0.15	0.08 \pm 0.08	0.15, 0.05, 0.25, 0.00, 0.25	0.14 \pm 0.11
MNNG, 12.5	0.45, 0.75, 0.75, 0.50, 0.55	0.60 \pm 0.14 ***	0.20, 0.05, 0.00, 0.10, 0.10	0.09 \pm 0.07	0.15, 0.15, 0.30, 0.10, 0.50	0.24 \pm 0.16
MNNG, 25	1.15, 0.95, 1.25, 1.40, 0.80	1.11 \pm 0.24 ***	0.10, 0.05, 0.05, 0.15, 0.10	0.09 \pm 0.04	0.25, 0.15, 0.15, 0.05, 0.15	0.15 \pm 0.07
MNNG, 50	1.05, 1.80, 1.95, 1.05, 1.40	1.45 \pm 0.42 ***	0.05, 0.05, 0.05, 0.15, 0.05	0.07 \pm 0.04	0.10, 0.15, 0.15, 0.10, 0.10	0.12 \pm 0.03
Trend		+++		n.a.		n.a.
DW	0.05, 0.00, 0.05, 0.05, 0.10	0.05 \pm 0.04	0.05, 0.05, 0.05, 0.20, 0.00	0.07 \pm 0.08	0.05, 0.10, 0.10, 0.05, 0.05	0.07 \pm 0.03
NMUT, 5	0.90, 1.40, 1.15, 1.25, 1.30	1.20 \pm 0.19 ***	0.05, 0.05, 0.00, 0.05, 0.00	0.03 \pm 0.03	0.05, 0.05, 0.20, 0.10, 0.25	0.13 \pm 0.09
NMUT, 10	2.75, 2.05, 1.25, 2.30, 2.00	2.07 \pm 0.55 ***	0.05, 0.10, 0.00, 0.00, 0.05	0.04 \pm 0.04	0.05, 0.05, 0.10, 0.15, 0.15	0.10 \pm 0.05
NMUT, 20	2.80, 2.50, 2.20, 1.65, 3.55	2.54 \pm 0.71 ***	0.15, 0.00, 0.15, 0.10, 0.00	0.08 \pm 0.08	0.05, 0.10, 0.00, 0.00, 0.10	0.05 \pm 0.05
Trend		+++		n.a.		n.a.
DW	0.10, 0.15, 0.10, 0.05, 0.00	0.08 \pm 0.06	0.05, 0.00, 0.05, 0.00, 0.05	0.03 \pm 0.03	0.10, 0.05, 0.15, 0.10, 0.10	0.10 \pm 0.04
DMH, 10	0.00, 0.05, 0.05, 0.10, 0.10	0.06 \pm 0.04	0.35, 0.15, 0.20, 0.45, 0.20	0.27 \pm 0.13 ***	0.10, 0.05, 0.05, 0.10, 0.10	0.08 \pm 0.03
DMH, 20	0.05, 0.05, 0.00, 0.10, 0.05	0.05 \pm 0.04	0.40, 0.65, 0.50, 0.25, 0.35	0.43 \pm 0.15 ***	0.15, 0.10, 0.10, 0.05, 0.35	0.15 \pm 0.12
DMH, 40	0.05, 0.05, 0.05, 0.00, 0.05	0.04 \pm 0.02	1.05, 1.00, 0.55, 0.95, 0.85	0.88 \pm 0.20 ***	0.20, 0.30, 0.15, 0.70, 0.25	0.32 \pm 0.22 ***
DMH, 80	0.10, 0.05, 0.10, 0.10, 0.05	0.08 \pm 0.03	1.40, 1.90, 0.60, 1.40, 1.05	1.27 \pm 0.48 ***	0.70, 0.40, 0.45, 0.45, 0.60	0.52 \pm 0.13 ***
Trend		n.a.		+++		+++

n.a.: not analyzed.

Statistical significance: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 (Kastenbaum & Bowman test) as compared to the vehicle control and ⁺⁺⁺ p <0.001 (Cochran-Armitage) in trend test.

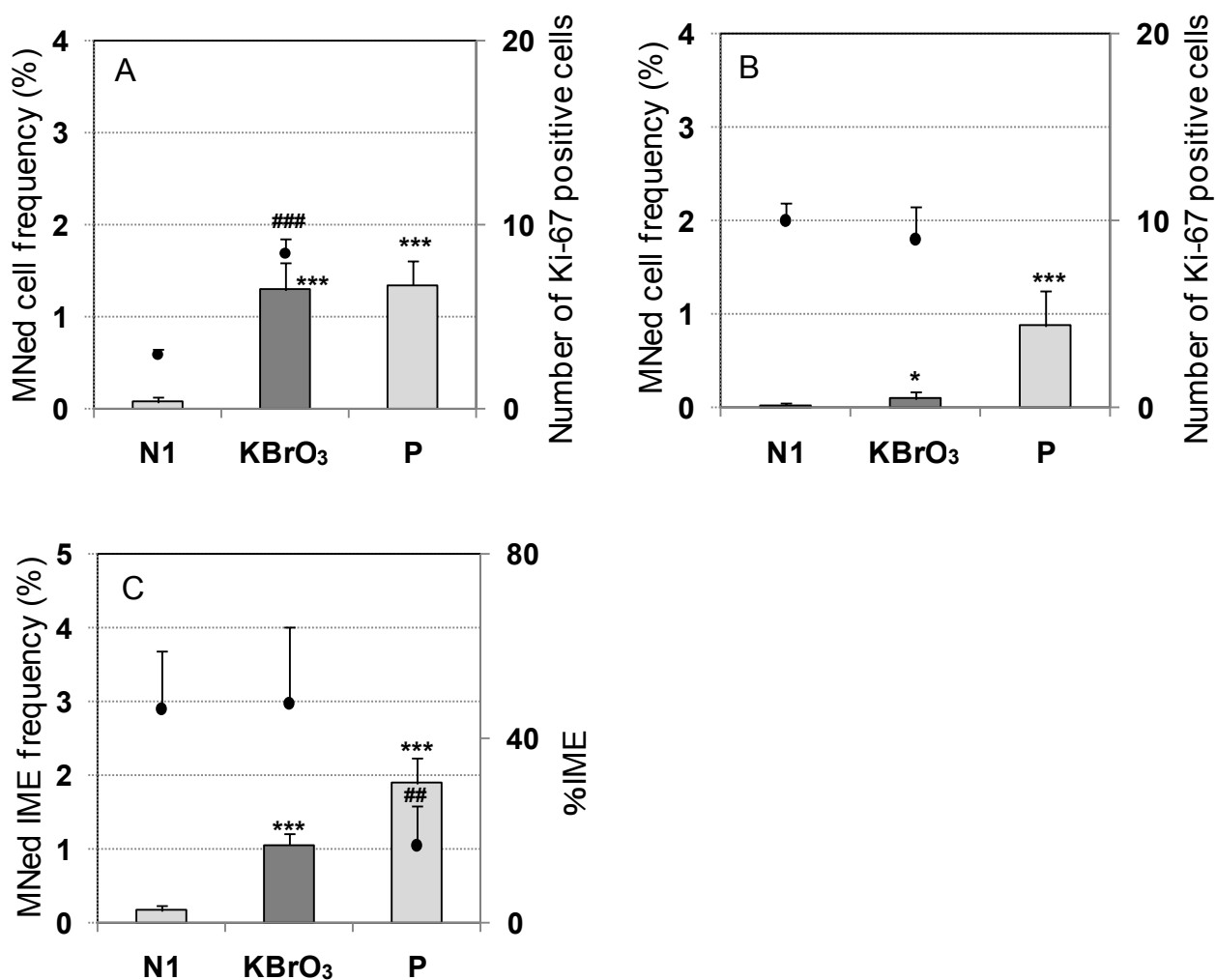


Fig. 13

Micronucleus test in glandular stomach (A), colon (B), and bone marrow (C) using rats administered KBrO₃ 120 mg/kg/day for 4 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs). Each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells (per gland or crypt) or the %IME. Data expressed as mean \pm SD. N1: negative control group treated with DW. P: positive control group treated with DMH 88.6 mg/kg/day on day 1 and MNU 21.6 mg/kg/day on days 3-4.

Statistical significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Kastenbaum & Bowman method), ^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$ (Student's t -test) as compared to the negative control.

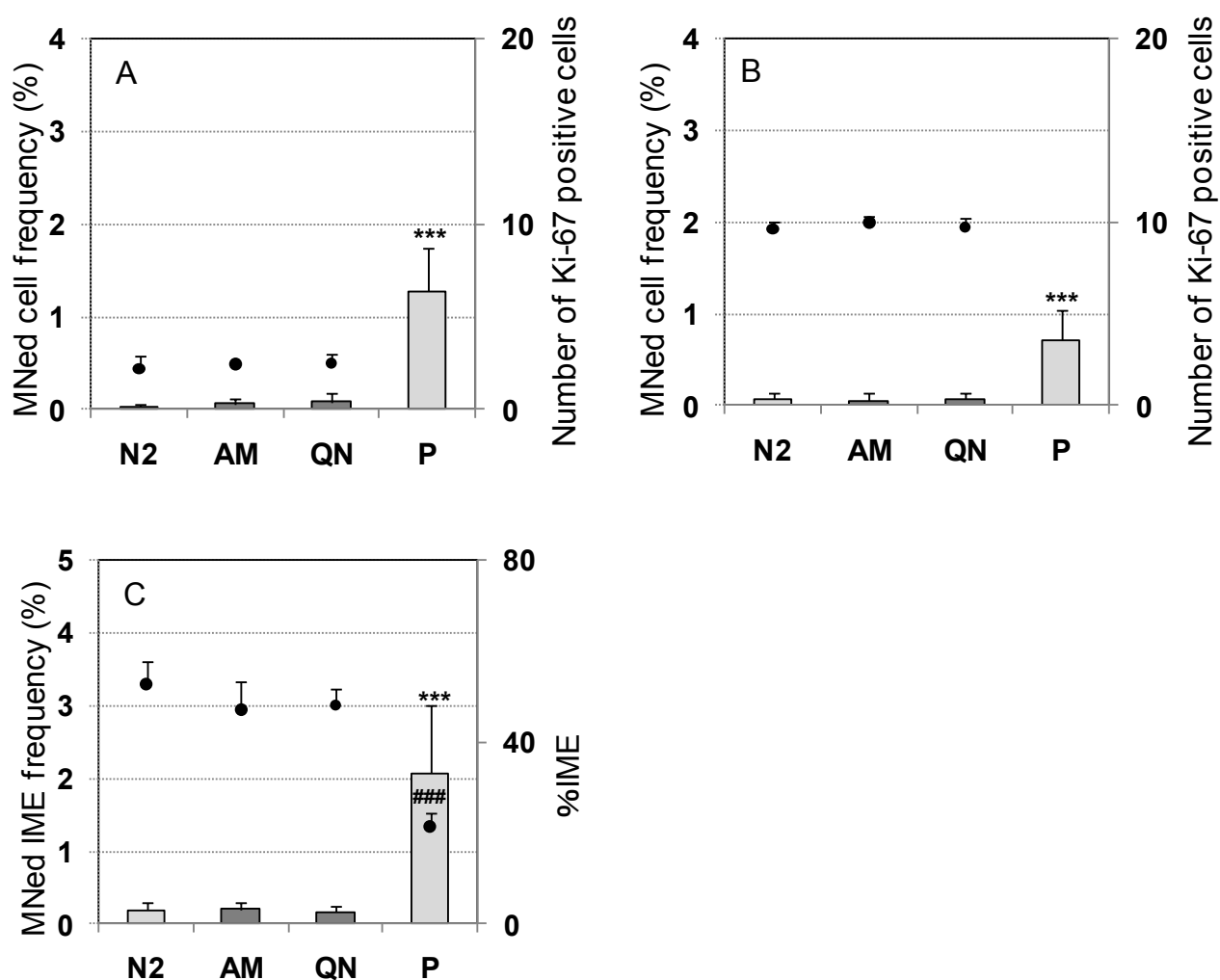


Fig. 14

Micronucleus test in glandular stomach (A), colon (B), and bone marrow (C) using rats administered AM 1000 mg/kg/day and QN 1000 mg/kg/day for 4 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs). Each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells (per gland or crypt) or the %IME. Data expressed as mean \pm SD. N2: negative control group treated with 2% Tween 80. P: positive control group treated with DMH 88.6 mg/kg/day on day 1 and MNU 21.6 mg/kg/day on days 3-4. Statistical significance: *** p <0.001 (Kastenbaum & Bowman method), ### p <0.001 (Student's t -test) as compared to the negative control.

Table 3

Frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs) after 4 daily oral administration of KBrO₃, AM, and QN (individual data)

Chemical (mg/kg/day)	Glandular stomach				Colon				Bone marrow			
	Frequency			Mean ± SD	Frequency			Mean ± SD	Frequency			Mean ± SD
DW	0.00, 0.05, 0.15, 0.10, 0.05				0.07 ± 0.06	0.00, 0.05, 0.05, 0.00, 0.00				0.02 ± 0.03	0.10, 0.15, 0.10, 0.30, 0.15	0.16 ± 0.08
KBrO ₃ , 120	1.65, 1.55, 1.25, 0.90, 1.15				1.30 ± 0.30	0.10, 0.05, 0.05, 0.20, 0.05				0.09 ± 0.07	1.25, 0.90, 1.20, 1.00, 0.90	1.05 ± 0.17
MNU+DMH	1.45, 1.10, 1.20, 1.75, 1.25				1.35 ± 0.26	0.40, 0.90, 0.75, 1.45, 0.85				0.87 ± 0.38	2.10, 1.35, 1.70, 2.25, 2.05	1.89 ± 0.36
2% Tween 80	0.00, 0.00, 0.00, 0.05, 0.05				0.02 ± 0.03	0.10, 0.05, 0.00, 0.20, 0.00				0.07 ± 0.08	0.30, 0.25, 0.10, 0.10, 0.25	0.20 ± 0.09
AM, 1000	0.15, 0.00, 0.05, 0.05, 0.05				0.06 ± 0.05	0.00, 0.00, 0.20, 0.00, 0.05				0.05 ± 0.09	0.25, 0.10, 0.30, 0.25, 0.15	0.21 ± 0.08
QN, 1000	0.00, 0.00, 0.05, 0.25, 0.10				0.08 ± 0.10	0.15, 0.00, 0.10, 0.10, 0.00				0.07 ± 0.07	0.30, 0.10, 0.20, 0.15, 0.10	0.17 ± 0.08
MNU+DMH	0.70, 2.00, 1.10, 1.25, 1.35				1.28 ± 0.47	0.40, 1.20, 0.50, 0.60, 0.90				0.72 ± 0.33	1.25, 2.15, 2.35, 1.20, 3.45	2.08 ± 0.92

n.a.: not analyzed.

Statistical significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Kastenbaum & Bowman test) as compared to the vehicle control.

Table 4

Frequency of micronucleated (MNed) cells or of MNed immature erythrocytes (IMEs) in control animals

Substances	Frequency of MNed cells or of MNed IMEs, mean ± SD,%			
	Glandular stomach	Colon	Bone marrow	
			Cell suspension	Smear method
			method	
Negative control				
DW	0.07 ± 0.05 (n=20)	0.06 ± 0.06 (n=20)	0.13 ± 0.10 (n=15)	0.16 ± 0.08 (n=5)
5% DMSO	0.11 ± 0.07 (n=5)	0.04 ± 0.04 (n=5)	0.22 ± 0.10 (n=5)	–
0.5% MC	0.09 ± 0.04 (n=5)	0.07 ± 0.04 (n=5)	0.13 ± 0.08 (n=5)	–
2% Tween 80	0.02 ± 0.03 (n=5)	0.07 ± 0.08 (n=5)	–	0.20 ± 0.09 (n=5)
Total	0.07 ± 0.05 (n=35)	0.06 ± 0.06 (n=35)	0.15 ± 0.10 (n=25)	0.18 ± 0.09 (n=10)
Positive control				
MNU + DMH	1.32 ± 0.36 (n=10)	0.80 ± 0.34 (n=10)	–	1.99 ± 0.67 (n=10)

n: animal number, –: not done.

Table 5

Results of the multi-tissue micronucleus analyses in the glandular stomach, colon, and bone marrow of rats

Chemical	Multi-tissue MN test			Reported data			
	Glandular stomach	Colon	BM	Ames	CA	MN (BM/PB)	Carcinogenicity
MNU	+	+	+	+	+	+	Stomach, Colon
4NQO	+	—	+	+	+	+	Stomach
MNNG	+	—	—	+	+	—	Stomach
NMUT	+	—	—	+	+	ND	Stomach
DMH	—	+	+	Inc.	+	+	Colon
PhIP	—	+	+	+	+	+	Colon
KBrO ₃	+	—	+	+	+	+	Kidney
AM	—	—	—	—	+	—	Non
QN	—	—	—	+	+	—	Non
MNU+DMH	+	+	+	ND	ND	ND	ND

+: positive, —: negative, Inc.: inconclusive, ND: not done.

BM: bone marrow, Ames: Ames test (test for gene mutation in bacteria), CA: *in vitro* metaphase chromosome aberration test or *in vitro* micronucleus test, MN: *in vivo* micronucleus test, PB: peripheral blood.

第四章 腺胃小核試験の 28 日間反復投与毒性試験への組み込みの検討

1. 序文

食品など経口摂取する物質の遺伝毒性評価には、被験物質が直接接触する消化管（特に胃）を用いた試験が有効であると考えられることから、本研究では EDTA 処理による腺胃小核標本の作製法を新規に開発した。また、*in vivo* 腺胃小核試験により遺伝毒性を評価する場合には、短期投与または長期投与のどちらかの試験方法を選択することになるため[1]、第三章では短期投与条件下での試験法を検討し、消化管（腺胃と結腸）および骨髄での小核誘発性を同一動物で評価する短期投与試験系を開発した。さらに本章では、長期投与条件下で行う試験として、一般毒性試験の供試動物を用いた腺胃小核試験（28 日間反復投与毒性試験への腺胃小核試験の組み込み）の妥当性を検討した。

長期投与条件下で行う *in vivo* 遺伝毒性試験については、一般毒性試験の供試動物を用いて試験を実施することで使用動物数を削減できることに加え、一般毒性試験で得られる毒性プロファイルを考慮して遺伝毒性リスクを総合的に評価することができる。また ICH S2 (R1) ガイドラインには、動物愛護に関する 3R の概念に基づき、*in vivo* 試験を長期投与とする場合、科学的に正しければ一般毒性試験に遺伝毒性の指標を組み込むことを考慮すべきであることが記されている[1]。一般毒性試験への組み込みが可能な遺伝毒性試験としては、バッテリー試験である造血細胞を用いる小核試験が知られている[1]。また、肝臓を用いた小核試験についても一般毒性試験への組み込みが検討されている。成熟動物の肝臓

は分裂活性が低く寿命の長い臓器（200 日以上）であるため、短期投与条件下での小核評価には不向きであるが、被験物質を反復投与することで小核誘発性の評価が可能となることが知られている[95-97]。また、生体内の主要な代謝器官である肝臓を用いた小核試験は、造血細胞を用いる小核試験で陰性となる肝発がん物質の検出に有用であることが報告されている[11,12,95,97]。そのため、腺胃小核試験が 28 日間反復投与毒性試験に組み込み可能となると、3 つの臓器（腺胃、肝臓、造血細胞）を用いた小核同時評価が可能となり、被験物質の生体内での動態を考慮した有益な遺伝毒性評価系になりうると考えられる。

EDTA 処理法を用いた腺胃小核試験において評価対象となる被蓋上皮細胞は、腺胃増殖帯で生じ、3～4 日かけて管腔側に移動した後に脱落する[40]。また、小核は細胞分裂の際に生じるため、小核を保有する被蓋上皮細胞は胃粘膜に 3～4 日程度残存するものと考えられる。この仮説は、① 遺伝毒性物質投与後 3 および 4 日目の腺胃小核頻度が同程度であること[第二章]、② 遺伝毒性物質を単回投与した場合と比較して 4 日間投与することで腺胃小核頻度が増加すること[第三章]からも支持される。一方、腺胃上皮に残存した小核保有細胞は寿命である 4 日を過ぎると脱落するため、腺胃小核頻度は 4 日間投与条件下で最大となり、それ以上投与期間を延長しても小核頻度の大幅な増加は認められないと考えられる。また毒性を有する被験物質の場合、通常、反復投与時の最大投与可能用量は短期投与時に比べ低下する。そのため、28 日間反復投与毒性試験に腺胃小核試験を組み込む際には、28 日間反復投与可能な低用量域において遺伝毒性評価が可能であることを確認する必要がある。

ある。そこで本章では、遺伝毒性発がん物質を 4、14 および 28 日間反復経口投与したラットの腺胃小核頻度を調べることで、28 日間反復投与条件下で実施する腺胃小核試験の妥当性を評価した。また供試動物については、一般毒性試験の検査項目である体重測定、一般状態の観察および病理組織学的検査を実施することで、一般毒性試験との同時実施の可能性について検討した。さらに同動物を用いて、一般毒性試験への組み込みが可能と考えられる肝臓と骨髄を用いる小核試験および前章で組み合わせ試験として実施した結腸小核試験を合わせて実施し、腺胃以外の臓器を用いて小核誘発性の有無を調べた。

今回の検討では、小麦粉改良剤として製パンに使用される食品添加物である KBrO_3 をモデル化合物として用いた。 KBrO_3 は遺伝毒性および発がん性を有し、その作用機序には酸化ストレスやプロモーション作用が関与しているものと考えられている[56,63,64]。そのため、欧州では使用禁止、日米では最終食品完成前に分解・除去することが義務付けられている。バッテリー試験の成績として、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験, 代謝活性化系存在下および非存在下）、*in vitro* 培養細胞を用いる染色体異常試験（代謝活性化系非存在下）および骨髄小核試験での陽性結果が報告されている[37,54-58,62]。また、腎臓、腹膜、甲状腺での発がん報告があるが、ラットの胃、結腸、肝臓における発がん報告はない[56,63-65]。さらに KBrO_3 を経口投与したラットの腎臓では、DNA の断片化、小核保有細胞の増加、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の増加および変異頻度の増加（GC から TA への塩基置換）が認められる[61,98,99]。ラットの消化管や肝臓への遺伝毒性の影響

としては、本研究で開発した短期投与条件下での腺胃、結腸、骨髄の小核同時評価系（4日間投与試験）により、腺胃と骨髄において小核頻度の増加が認められたが、結腸では認められなかった[第三章]。また、Kasai らは、KBrO₃を経口投与したラットの肝臓において、8-OHdG の増加が認められないことを報告している[98]。そのため、KBrO₃の28日間反復投与小核試験では、腺胃と骨髄で陽性成績が、結腸と肝臓で陰性成績が得られるものと予想される。

2. 材料と方法

2.1. 動物

4.5 週齢の雄性 Crl:CD (SD) ラットを日本チャールス・リバー(株)より購入し、10 日間の馴化後、投与に用いた。Crl:CD (SD) ラットは造血細胞を用いる小核試験および一般毒性試験において一般的に用いられるラットの系統である。動物は通常の飼育室において 1 ケージあたり 2~3 匹を飼育し、固型飼料 [F-2、(株)船橋農場] および自家水道水を自由摂取させた。なお、本動物実験は、(株)ヤクルト本社中央研究所における動物実験等実施に関する規程に従い、(株)ヤクルト中央研究所 動物実験委員会の承認を得て実施した。

2.2. 化学物質

臭素酸カリウム [CAS 7758-01-2、Lot No. PEM1558、純度 99.8%以上、和光純薬工業(株)] を DW により所定の濃度に溶解し、すぐに投与に用いた。

2.3. 投与および処置

DW または KBrO_3 を 1 日 1 回、4 日間、14 日間および 28 日間経口投与した。 KBrO_3 4 日間投与群の投与用量は 80 mg/kg 体重/day とした。また、 KBrO_3 14 および 28 日間投与群の投与用量は 40、60 および 80 mg/kg 体重/day とした。これらの用量は、Hamada らの報告[62] および予備試験で認められた毒性兆候（体重減少など）をもとに決定した。全ての投与は

ゾンデを用いた胃内強制経口投与とし、投与容量を 10 mL/kg 体重とした。試験では、1 群 5 匹のラットを用いた。投与期間中、以下の投与日に体重を測定した。4 日間投与試験では 1 日 1 回、14 日間投与試験では投与第 1、4、8、11、14、15 日目、28 日間投与試験では投与第 1、4、8、11、15、18、22、25、28、29 日目。また投与日（投与前後）および剖検日に、動物の一般状態を観察した。

18 時間の絶食を行った後、最終投与後 24 時間目にペントバルビタール麻酔下において腹部大動脈を切断することで放血し安楽死させた。その後、腺胃、結腸、肝臓、右大腿骨、腎臓を採材した。また、全例の肝臓および腎臓の重量を測定した。

2.4. 病理組織学的検査

小核試験を実施した全動物の腺胃、結腸、肝臓および腎臓について、病理組織学的検査を実施した。定法に従い、肝臓（外側左葉の一部）、腺胃〔胃体部と幽門部を含む領域（Fig. 5A-2 の a）〕、結腸〔近位および中央部（Fig. 6A の a, c）〕および左側腎臓を 10%中性緩衝ホルマリンにより固定後、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋した組織を薄切したのち、ヘマトキシリン・エオシンにより染色して病理組織標本とし、光学顕微鏡下において検査を実施した。

2.5. 腺胃小核試験

大山らとともに開発したラット腺胃小核試験の方法[40]に準じて実施した (Fig. 5)。すなわち、病理組織学的検査に使用しない腺胃部分 (Fig. 5A-2 の b) を玉付きガラス棒に裏返し、1 mM EDTA と 2 mM DTT を含む HBSS 中でインキュベートすることで上皮細胞を剥離した。剥離した上皮細胞をピペッティングにより単離し、メッシュに通して夾雑物を取り除いた。遠心により細胞を回収し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。その後、10%中性緩衝ホルマリンを交換し、観察時まで 4°C で保存した。

観察時に AO と DAPI の混合染色液 (AO : 50 $\mu\text{g/mL}$ 、DAPI : 2.5 $\mu\text{g/mL}$) と細胞懸濁液を等量を混合し、蛍光顕微鏡下 [UV 励起 (365 nm)、600 倍] で観察した。観察には暗号を付した標本を用い、1 個体あたり 2000 個の上皮細胞を観察して小核を有する細胞の割合 (小核頻度) を算出した。

2.6. 結腸小核試験

大山らとともに開発したラット結腸小核試験の方法[40]に準じて実施した (Fig. 6)。すなわち、病理組織学的検査に使用しない結腸部分 (Fig. 6A の b, d) を粘膜面が表になるようにガラス棒に裏返し、1 mM EDTA を含む HBSS (pH 6.8) 中でインキュベートすることで上皮細胞を剥離した。途中、5 分間の振動を 2 回繰り返した。剥離した上皮細胞をピペッティングにより単離後、遠心により回収し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。その

後、10%中性緩衝ホルマリンを交換し、観察時まで4℃で保存した。

観察時に AO と DAPI の混合染色液（AO : 125 µg/mL、DAPI : 2.5 µg/mL）と細胞懸濁液を等量混合し、蛍光顕微鏡下 [UV 励起 (365 nm)、600 倍] で観察した。観察には暗号を付した標本を用い、1 個体あたり 2000 個の上皮細胞を観察し、小核を有する細胞の割合（小核頻度）を算出した。なお、40 mg/kg/day 投与群については結腸小核試験を実施しなかった。

2.7. 肝小核試験

Narumi らの非灌流法[95,96]により行った。すなわち、組織標本用の組織採取部位に隣接した外側左葉の中央部約 1 g をカミソリにて 1 mm 程度に細分し、コラゲナーゼ液 [コラゲナーゼ-ヤクルト S (Lot.100225-01、ヤクルト薬品工業(株)) 100 U/mL in HBSS、pH 7.5] 中にてインキュベートした (37℃、振盪速度 ; 50~70 rpm、1 時間)。途中、180 rpm、1 分間の振盪を 2 回行った。その後、臓器片がほぐれるまでピペッティングし、セルストレーナー (100 µm) でろ過後、遠心 (50 g、2 分、4℃) して細胞を回収した。10%中性緩衝ホルマリンで固定後、適量の 10%中性緩衝ホルマリンに再度懸濁させ、観察時まで 4℃で保存した。

観察時に AO と DAPI の混合染色液（AO : 500 µg/mL、DAPI : 10 µg/mL）と細胞懸濁液を等量混合し、蛍光顕微鏡下 [UV 励起 (365 nm)、400 倍] で観察した。また観察には暗

号を付した標本を用いた。観察対象細胞は、単核、2 核、多核を含む全ての肝細胞（細胞膜が明瞭であり、他の細胞との境界が明瞭なもの）とした。1 個体あたり 2000 個の肝細胞（分裂期細胞を除く）を観察し、小核を有する細胞の割合（小核頻度）を算出した。また、1 個体あたり 2000 個の肝細胞を観察し、分裂期細胞の割合（MI 値）を算出した。

2.8. 骨髓小核試験

Kawabata らの細胞懸濁法[78]により行った。すなわち、1 mL の 10%中性緩衝ホルマリンで大腿骨から骨髓細胞を遠心管に洗い出し、5 分程度静置した後に上清を回収した。さらに 10%中性緩衝ホルマリン 1 mL を加えて遠心し、骨髓細胞を回収した。その後、10%中性緩衝ホルマリンを交換し、暗号を付して、観察時まで 4℃で保存した。

40 µg/mL AO 液と細胞懸濁液を等量ずつスライドガラス上で混合し、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡下 [IB 励起 (490 nm)、600 倍] で観察した。個体ごとに、① 2000 個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球の割合（小核頻度）、② 1000 個の全赤血球を観察し、全赤血球に占める幼若赤血球の割合（幼若赤血球比）を算出した。

2.9. Ki-67 陽性細胞数を指標とした細胞増殖抑制の評価

抗 Ki-67 抗体による免疫組織化学染色により、腺胃と結腸での細胞増殖抑制の有無を評価した。評価には 1 群あたり 3 匹の動物を用いた。抗 Ki-67 抗体による免疫組織化学染色

は、第三章で行った方法に準じて実施した。すなわち、上記 2.4.項にて作製したパラフィン組織標本を脱パラフィン後、3%過酸化水素水に 5 分浸漬した。TBS で洗浄後、賦活化溶液 (Target Retrieval Solution Concentrated) により賦活化した後、一次抗体 (Monoclonal mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, clone MIB-5) と 1 時間反応させた。その後、ビオチン標識二次抗体 (Immunoglobulins/Biotinylated Rabbit Polyclonal Anti-Mouse) および HRP 標識ストレプトアビジンにそれぞれ 30 分間反応させた後、DAB により発色させた。免疫組織化学染色を行った標本は、ヘマトキシリンによる染色を行った。

光学顕微鏡下 (600 倍) において 1 個体あたり 30 本の胃体部の胃腺および 20 本の結腸クリプトを観察し、胃腺またはクリプト 1 本あたりの Ki-67 陽性細胞数を算出した。

2.10. 統計

小核保有細胞の出現数については、Kastenbaum and Bowman の統計学的方法を用いて投与期間毎に溶媒対照群と KBrO_3 投与群との検定を行った (有意水準 0.1%、1%および 5%、片側)。また、有意性が認められた場合には、Cochran-Armitage による傾向検定を行った (有意水準 0.1%、1%および 5%、片側)。その他の計量データについても、投与期間毎に溶媒対照群と KBrO_3 投与群との比較を行った。すなわち、2 群間での比較の場合には F 検定により等分散性の検定 (有意水準 5%、両側) を行い、等分散の場合は Student の t -検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の t -検定により、両群間の差を検定した (有意水準 0.1%、

1%および 5%、両側)。多群間での比較の場合には、Bartlett 法による等分散性の検定（有意水準 5%、両側）を行い、分散が等しい場合には一元配置分散分析、分散が等しくない場合には Kruskal-Wallis の検定を行った（有意水準 0.1%、1%および 5%、両側）。

3. 結果

3.1. 体重および一般状態の変化

4、14、28 日間投与試験のいずれにおいても、溶媒対照群と KBrO_3 投与群の体重値に、統計学的に有意な違いは認められなかった (Fig. 15)。しかし、 KBrO_3 投与による微弱な体重増加抑制は認められ、28 日間投与試験における 60 および 80 mg/kg 投与群においてそれぞれ 25 および 11 日目以降に溶媒対照群と比較して有意な体重増加の抑制が認められた (data not shown)。 KBrO_3 投与に起因する一般状態の変化は認められなかった。

3.2. 臓器重量の変化

4 および 14 日間投与試験の 80 mg/kg 投与群ならびに 28 日間投与試験の 60 および 80 mg/kg 投与群において、腎臓の相対重量が溶媒対照群と比較して有意に増加した (Table 6)。 KBrO_3 投与による肝重量の変化は認められなかった。

3.3. 病理組織学的変化

14 日間投与試験では、60 および 80 mg/kg 投与群の腺胃において、増殖帯近辺の上皮細胞に核破砕/核濃縮像がごく僅かに認められた (Table 7)。また、腎臓の近位尿細管の細胞質に好酸性小体/硝子滴像がみられ、その像は用量依存的に増加した (Table 8)。

28 日間投与試験では、14 日間投与試験で認められた腺胃と腎臓での病理所見が、より重

症化して認められた (Table 7, 8、Fig. 16, 17)。腎臓では、近位尿細管上皮細胞の変性が認められた (Table 8、Fig. 17D)。

一方、4 日間投与試験では、病理組織学的検査を行ったいずれの臓器においても KBrO_3 投与に起因する病理組織学的な変化は認められなかった。また、14、28 日間投与試験において、 KBrO_3 投与に起因する病理組織学的な変化は、結腸と肝臓では認められなかった。

3.4. 腺胃、結腸、肝臓、骨髄の小核試験

腺胃では、いずれの投与期間においても、小核頻度と Ki-67 陽性細胞数の有意な増加が認められ、14 および 28 日間投与試験ではそれぞれ用量相関性が確認された (Fig. 18、Table 9)。4 および 14 日間投与後の小核頻度は、それぞれ 0.84%、0.87% (80 mg/kg 投与群) で同程度となった。また、14 および 28 日間投与後の小核頻度は、それぞれ 0.37%、0.66% (40 mg/kg 投与群)、0.67%、0.76% (60 mg/kg 投与群)、0.87%、1.28% (80 mg/kg 投与群) となり、28 日間投与することで若干の増加傾向を示した。投与期間の延長に起因する Ki-67 陽性細胞数の増減は認められなかった。

一方、結腸や肝臓において小核頻度の増加は認められなかった (Fig. 19, 20、Table 10, 11)。また、これらの臓器において、Ki-67 陽性細胞数や MI 値の減少は認められず、細胞増殖抑制は認められなかった。

骨髄では、いずれの投与期間においても小核頻度の有意な増加が認められ、14 および 28

日間投与試験では用量相関性が確認された (Fig. 21、Table 12)。また、骨髄での増殖抑制は認められなかった。

以上より、KBrO₃ を 4～28 日間投与した多臓器小核試験では、いずれの投与期間においても、腺胃および骨髄を用いた小核試験では陽性、結腸および肝臓を用いた小核試験では陰性の成績が得られた (Table 13)。

4. 考察

今回、KBrO₃を40～80 mg/kg/dayの用量で4、14、28日間経口投与した動物では、標的臓器の腎臓で毒性変化（重量増加や好酸性小体/硝子滴の増加）が認められた。さらに、28日間投与した動物では体重増加抑制や尿細管上皮の変性が認められた。これらの所見は、Kurokawa らや Deangelo らの報告した、KBrO₃を飲水投与したラットで認められる毒性所見と一致した[56,63,64]。また、いずれの投与期間においても骨髓小核頻度の増加が認められ、28日間投与後の小核頻度は Hamada らの報告値[62]と近似していた。以上より、今回の試験は KBrO₃の毒性が認められる用量域で実施しており、一般毒性試験における用量設定要件を満たしていることが確認された。

腺胃の小核頻度は、4～28日間のいずれの投与期間でも有意に増加し、14および28日間投与試験での用量依存性も確認された。第三章では KBrO₃の4日間投与（投与用量：120 mg/kg/day）により腺胃小核頻度が増加する結果が得られたが、今回の4日間投与試験（投与用量：80 mg/kg/day）でも結果は再現された。また、14および28日間投与試験では、細胞増殖亢進の認められた高用量群のみならず、増殖亢進の認められない低および中用量群においても小核頻度の有意な増加が認められた。さらに、KBrO₃は代謝活性化系非存在下における *in vitro* 培養細胞を用いる染色体異常試験および小核試験において陽性を示すことが報告されている[37,54-56]。これらのことから、今回認められた小核頻度の増加は、KBrO₃の遺伝毒性によるものと考えられる。以上のように、KBrO₃の投与期間を28日まで

延長しても腺胃小核試験での陽性結果が得られたことから、28 日間反復投与条件下においても腺胃小核試験での遺伝毒性評価が可能であることが示された。

第三章では、遺伝毒性物質を 4 日間投与した場合に、単回投与時と比較して腺胃小核頻度が 2.3~4.1 倍程度増加することを確認した。これは、試験に用いる腺胃上皮細胞の寿命が 3~4 日であり、4 日間の投与期間中に小核保有細胞が蓄積されて小核頻度が増加するためと考える。また、分裂後 4 日を過ぎると小核保有細胞は管腔内に脱落するため、投与期間を 4 日間以上に延長しても小核頻度は増加しないものと考えられる。今回の試験では、4~28 日間投与後の腺胃小核頻度に大きな違いは認められず、上記の仮説は支持された。従って、短期投与および長期投与条件下において最大投与可能量が同じであるような低毒性の物質（例えば食品など）を評価する場合には、28 日間反復投与条件下で実施する腺胃小核試験により遺伝毒性評価が可能であることが示唆された。また、被験物質の毒性が強く、28 日間投与可能な用量が短期投与時に比べて著しく低下する場合には、被験物質の投与用量を高く設定できる短期投与条件下での評価（例えば第三章で開発した 4 日間投与試験による評価）が適切であると考えられた。腺胃小核試験を短期投与あるいは反復投与のどちらの試験条件下で実施することが適切であるかの判断については、ICH S2（R1）ガイドラインに従い[1]、試験開始前に得られる反復投与毒性試験の投与量が適切かどうかの情報より判断されるべきであると考えられた。

腺胃小核試験を一般毒性試験に組み込む場合には、病理組織学的検査と小核誘発性の評

価を同一動物で実施する必要がある。病理組織学的検査における胃のトリミング部位については、欧州 RITA データベース（Registry of Industrial Toxicology Animal-data）グループと NACAD（North American Control Animal Database）グループの報告した共同論文において、① 噴門部から十二指腸にかけての前胃、胃底部、幽門部および幽門括約筋を含む領域、ならびに② 前胃と腺胃の境界領域の 2 領域が示されている[100]。本実験では胃底部および幽門部を用いて病理組織学的検査を行い、投与用量や投与日数に依存した核濃縮や核破砕像の増加を確認することができた。さらに著者は、腺胃小核試験の実施と合わせて、前胃、胃底部、幽門部および幽門括約筋を含む領域ならびに前胃と腺胃の境界領域を用いた病理組織学的検査が可能となる切り出し部位を確かめていることから（data not shown）、同一動物を用いての病理組織学的検査と小核誘発性の評価は可能と考えている。

結腸や肝臓では、いずれの投与期間でも小核誘発性は認められなかった。これらの結果は、KBrO₃ 投与によりラットの結腸や肝臓での発がん報告がない事実[56,63-65]と一致している。結腸については、KBrO₃ 投与に起因した病理組織学的変化および細胞増殖活性への影響は認められておらず、結腸での毒性変化は示されていない。経口投与された KBrO₃ は胃から速やかに血中に移行すること、また胃、小腸、血中および尿中で素早く分解されることが報告されている[56,91]。そのため、4 日間投与時と同様に[第三章]、経口投与された KBrO₃ は結腸に十分量曝露されず、重篤な染色体損傷が認められなかったものとする。

さらに肝臓においても、KBrO₃ 投与に起因した臓器重量の変化、病理組織学的変化およ

び MI 値の変化は認められなかった。Kasai らは、KBrO₃ をラットに経口投与した場合、腎臓では 8-OHdG が増加するが、同動物の肝臓では増加しないことを報告している[98]。そのため、KBrO₃ を経口投与したラットの肝臓には毒性または遺伝毒性の影響は少ないと考えられ、今回の肝小核試験陰性結果は妥当と考えられた。

KBrO₃ を用いた今回の検討では、4 日間投与試験の成績と同様に、14 または 28 日間反復投与条件下においても腺胃小核頻度の増加が認められた。また、その頻度は投与期間の違いにより大きな影響を受けないことが明らかとなった。そのため、反復投与条件下において著しい投与可能用量の低下が認められない場合には、腺胃小核試験の 28 日間反復投与毒性試験への組み込みは可能であることが示唆された。

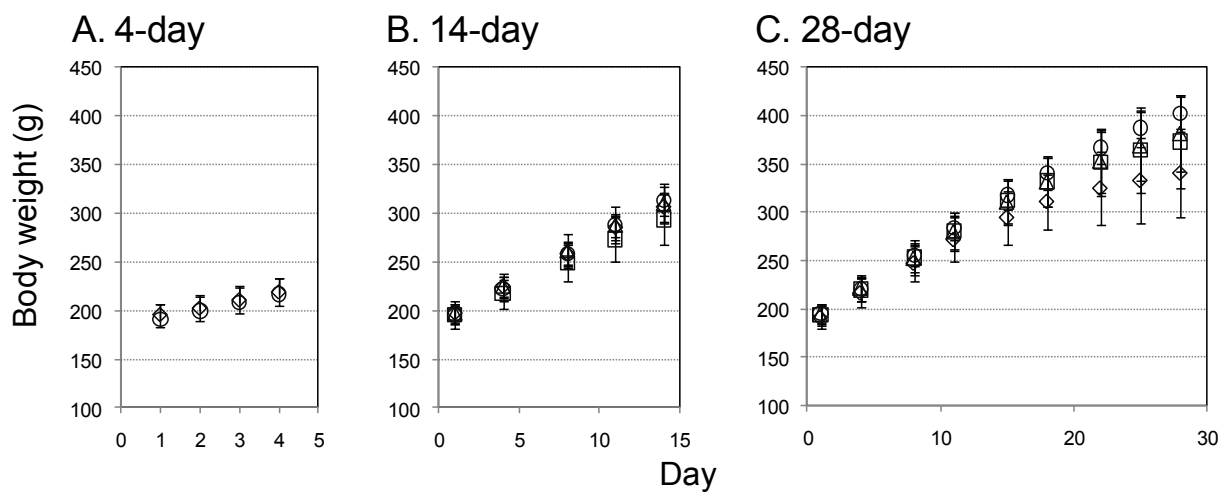


Fig. 15

Changes in body weight of the DW and KBrO₃ treatment groups in the 4-day (A), 14-day (B) and 28-day (C) experiments. The data are expressed as the mean \pm SD (\circ : DW treatment groups, \triangle : KBrO₃ 40 mg/kg treatment groups, \square : KBrO₃ 60 mg/kg treatment groups, \diamond : KBrO₃ 80 mg/kg treatment groups). The dosages using in the 4-day experiment were only 0 (DW) and 80 mg/kg.

Table 6

Organ weight

Administration period	Substance/ Dosage(mg/kg)		Body weight (g)	Liver		Kidney	
				AB (g)	RE (g/100g)	AB (g)	RE (g/100g)
4 days	DW		202.1	6.65	3.29	1.83	0.91
	KBrO ₃	80	201.8	6.97	3.46	2.02	1.00*
14 days	DW		295.9	9.30	3.14	2.51	0.85
	KBrO ₃	40	289.6	9.38	3.24	2.60	0.90
	KBrO ₃	60	273.7	8.68	3.17	2.56	0.93
	KBrO ₃	80	285.8	9.21	3.22	2.77	0.97 ^{##}
28 days	DW		382.9	10.92	2.86	2.79	0.73
	KBrO ₃	40	365.0	10.77	2.94	3.01	0.82
	KBrO ₃	60	352.8	10.69	3.01	3.11	0.88 ^{##}
	KBrO ₃	80	322.8 [#]	9.44	2.93	3.22	1.00 ^{##}

AB: Absolute weight. RE: Relative weight by body weight.

Statistical significance: * $p < 0.05$ (Student's t -test), [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ (Dunnett's test) compared to the DW control.

Table 7

Pathological findings (glandular stomach)

Period	Substance/ dosage (mg/kg)	Glandular stomach				
		Karyorrhexis / pyknosis, epithelium near the proliferative zone				
		–	±	+	++	+++
4 days	DW	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 80	5	0	0	0	0
14 days	DW	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 40	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 60	0	5	0	0	0
	KBrO ₃ 80	0	5	0	0	0
28 days	DW	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 40	0	0	5	0	0
	KBrO ₃ 60	0	0	5	0	0
	KBrO ₃ 80	0	0	5	0	0

Grade signs: –, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

Table 8

Pathological findings (kidney)

Period	Substance/ dosage (mg/kg)	Kidney									
		Eosinophilic body / hyaline droplet, proximal tubule epithelium					Degeneration, proximal tubule epithelium				
		–	±	+	++	+++	–	±	+	++	+++
4 days	DW	3	2	0	0	0	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 80	2	3	0	0	0	5	0	0	0	0
14 days	DW	1	4	0	0	0	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 40	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 60	0	0	4	1	0	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 80	0	0	0	5	0	5	0	0	0	0
28 days	DW	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0
	KBrO ₃ 40	0	0	1	2	2	4	1	0	0	0
	KBrO ₃ 60	0	0	0	1	4	3	2	0	0	0
	KBrO ₃ 80	0	0	0	1	4	4	0	1	0	0

Grade signs: –, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

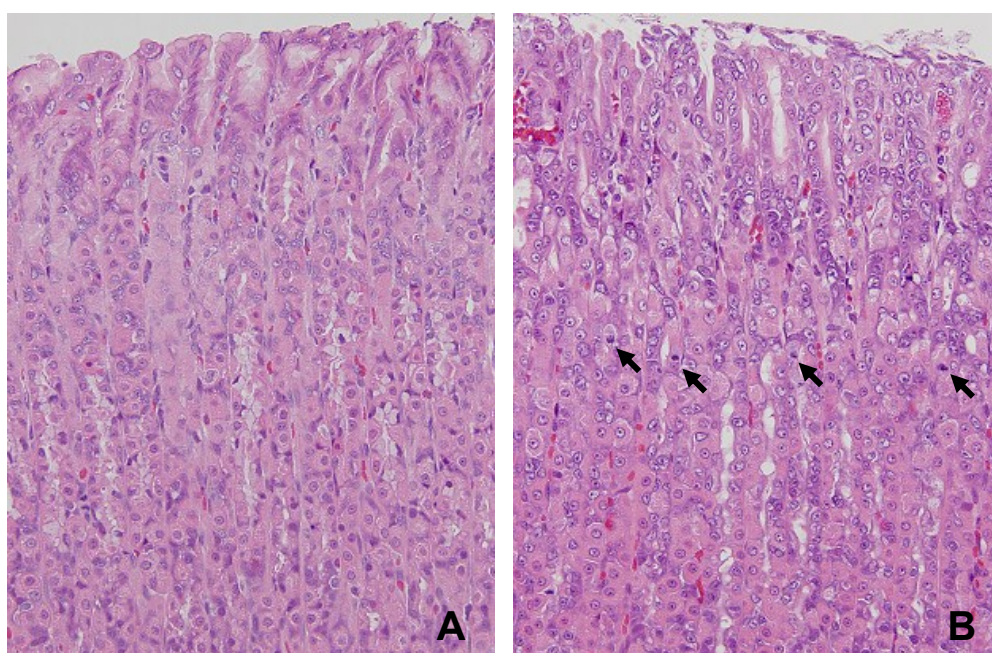


Fig. 16

HE staining of the glandular stomachs from rats receiving either 4 days of treatment with DW (A) or 28 days of 80 mg/kg KBrO₃ (B). Magnification: 200×.

Nuclear karyorrhexis/pyknosis was not observed in (A); however, (B) shows slight nuclear karyorrhexis/pyknosis near the proliferative zone (+, arrows).

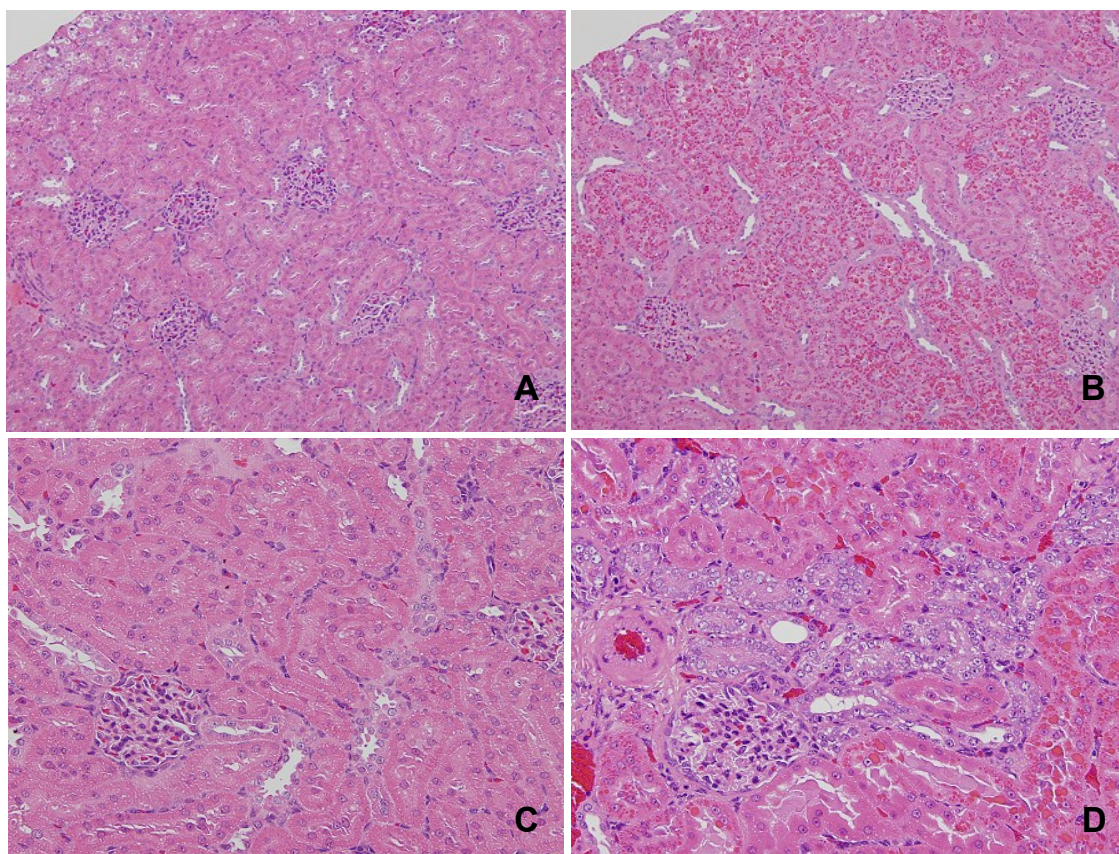


Fig. 17

HE staining of the kidneys from rats receiving either 4 days of treatment with DW (A, C) or 28 days of 80 mg/kg KBrO_3 (B, D). Magnification: 100 \times (A, B) and 200 \times (C, D).

In (A) and (C), eosinophilic body/hyaline droplets and degeneration were not observed. However, (B) and (D) show the formation of eosinophilic body/hyaline droplets and degeneration in the proximal tubular epithelium (+++ and +, respectively).

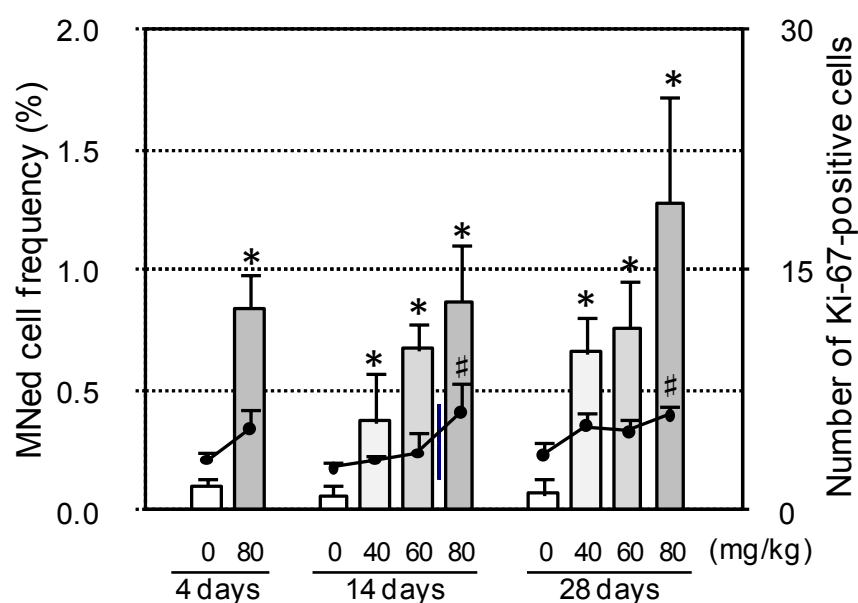


Fig. 18

Frequency of MNed cells and cell proliferation in glandular stomach after KBrO₃ administration for 4, 14, and 28 days. Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells, and each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells per gland. The data are expressed as the mean \pm SD.

Statistical significance: * p < 0.001 (Kastenbaum and Bowman test), # p < 0.05 (Dunnett's test) compared to the DW control.

Table 9

Frequency of micronucleated (MNed) cells in glandular stomach after KBrO₃ administration for 4, 14, and 28 days (individual data)

Chemical (mg/kg/day)	Animal number	Frequency of MNed cells		
		4 days	14 days	28 days
DW	1	0.10	0.10	0.05
	2	0.05	0.00	0.15
	3	0.15	0.10	0.00
	4	0.10	0.05	0.05
	5	0.10	0.05	0.10
	Mean ± SD	0.10 ± 0.04	0.06 ± 0.04	0.07 ± 0.06
KBrO ₃ 40	1	-	0.05	0.75
	2	-	0.50	0.75
	3	-	0.30	0.80
	4	-	0.45	0.50
	5	-	0.55	0.50
	Mean ± SD	-	0.37 ± 0.20***	0.66 ± 0.15***
KBrO ₃ 60	1	-	0.70	1.05
	2	-	0.50	0.85
	3	-	0.80	0.70
	4	-	0.65	0.60
	5	-	0.70	0.60
	Mean ± SD	-	0.67 ± 0.11***	0.76 ± 0.19***
KBrO ₃ 80	1	1.00	1.05	1.35
	2	0.80	0.95	2.00
	3	0.65	0.50	0.95
	4	0.95	1.05	0.90
	5	0.80	0.80	1.20
	Mean ± SD	0.84 ± 0.14***	0.87 ± 0.23***	1.28 ± 0.44***
Trend		-	++	++

–; not done.

Statistical significance: *** $p < 0.001$ (Kastenbaum & Bowman method) as compared with DW control and

⁺⁺ $p < 0.01$ (Cochran-Armitage) in trend test.

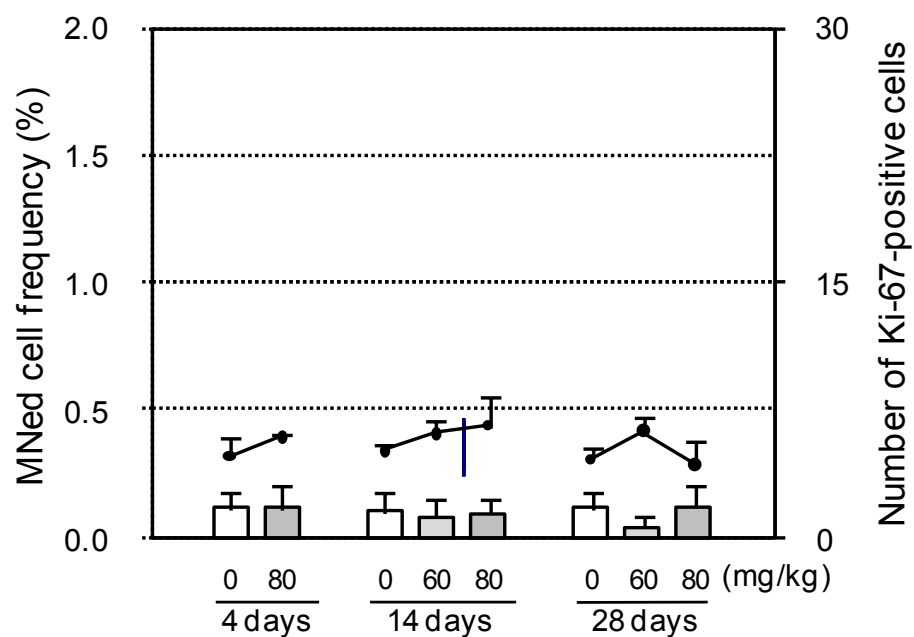


Fig. 19

Frequency of MNed cells and cell proliferation in the colon after KBrO₃ administration for 4, 14, and 28 days.

Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells, and each closed circle represents the number of Ki-67-positive cells per crypt. The data are expressed as the mean \pm SD.

Table 10

Frequency of micronucleated (MNed) cells in colon after KBrO₃ administration for 4, 14, and 28 days (individual data)

Chemical (mg/kg/day)	Animal number	Frequency of MNed cells		
		4 days	14 days	28 days
DW	1	0.20	0.20	0.05
	2	0.05	0.15	0.10
	3	0.15	0.10	0.15
	4	0.05	0.05	0.20
	5	0.10	0.00	0.05
	Mean ± SD	0.11 ± 0.07	0.10 ± 0.08	0.11 ± 0.07
KBrO ₃ 60	1	-	0.20	0.05
	2	-	0.05	0.00
	3	-	0.05	0.05
	4	-	0.05	0.00
	5	-	0.05	0.10
	Mean ± SD	-	0.08 ± 0.07	0.04 ± 0.04
KBrO ₃ 80	1	0.25	0.15	0.20
	2	0.10	0.05	0.05
	3	0.00	0.05	0.10
	4	0.15	0.15	0.15
	5	0.05	0.05	0.20
	Mean ± SD	0.11 ± 0.10	0.09 ± 0.05	0.14 ± 0.07

–; not done.

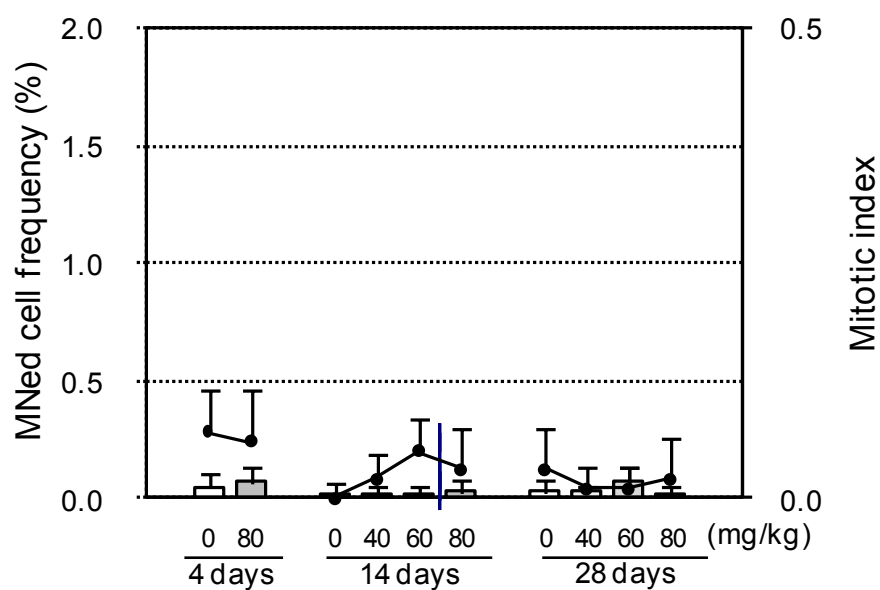


Fig. 20

Frequency of MNed cells and cell proliferation in the liver after KBrO_3 administration for 4, 14, and 28 days.

Each bar represents the frequency of micronucleated (MNed) cells, and each closed circle represents the mitotic index of hepatocytes. The data are expressed as the mean \pm SD.

Table 11

Frequency of micronucleated (MNed) cells in liver after KBrO₃ administration for 4, 14, and 28 days (individual data)

Chemical (mg/kg/day)	Animal number	Frequency of MNed cells		
		4 days	14 days	28 days
DW	1	0.00	0.00	0.00
	2	0.10	0.00	0.00
	3	0.10	0.00	0.00
	4	0.00	0.00	0.05
	5	0.05	0.10	0.10
	Mean ± SD	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.04
KBrO ₃ 40	1	-	0.05	0.05
	2	-	0.00	0.05
	3	-	0.00	0.05
	4	-	0.05	0.00
	5	-	0.00	0.00
	Mean ± SD	-	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.03
KBrO ₃ 60	1	-	0.00	0.10
	2	-	0.00	0.05
	3	-	0.00	0.15
	4	-	0.05	0.00
	5	-	0.05	0.05
	Mean ± SD	-	0.02 ± 0.03	0.07 ± 0.06
KBrO ₃ 80	1	0.05	0.00	0.05
	2	0.15	0.05	0.00
	3	0.05	0.00	0.05
	4	0.10	0.00	0.00
	5	0.00	0.10	0.00
	Mean ± SD	0.07 ± 0.06	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.03

–; not done.

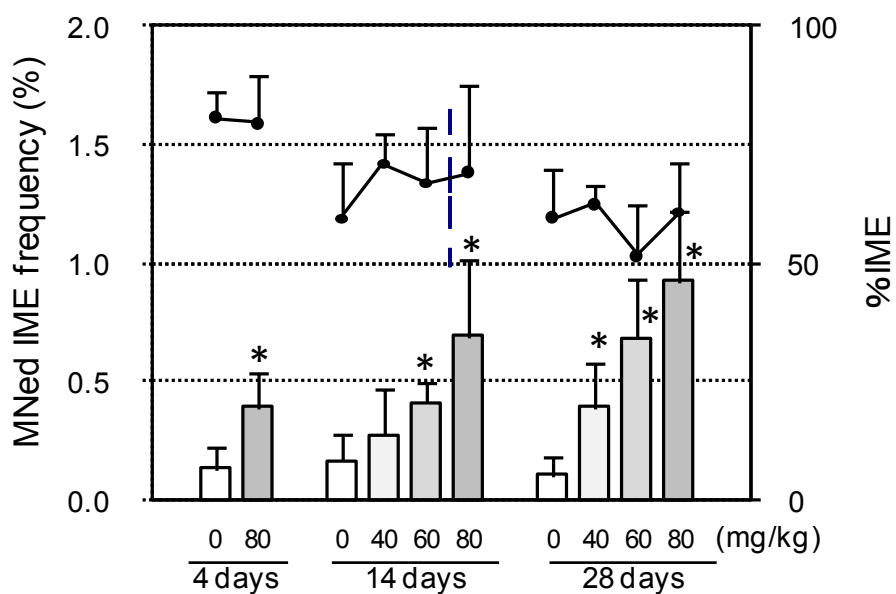


Fig. 21

Frequency of MNed cells and cell proliferation in the bone marrow after KBrO_3 administration for 4, 14, and 28 days. Each bar represents the frequency of micronucleated immature erythrocytes (MNed IMEs), and each closed circle represents %IME. The data are expressed as the mean \pm SD.

Statistical significance: * $p < 0.001$ (Kastenbaum and Bowman test) compared to the DW control.

Table 12

Frequency of micronucleated (MNed) immature erythrocytes (IMEs) in bone marrow after KBrO₃ administration for 4, 14, and 28 days (individual data)

Chemical (mg/kg/day)	Animal number	Frequency of MNed IMEs		
		4 days	14 days	28 days
DW	1	0.10	0.10	0.20
	2	0.05	0.10	0.15
	3	0.25	0.30	0.00
	4	0.20	0.05	0.10
	5	0.05	0.25	0.05
	Mean ± SD	0.13 ± 0.09	0.16 ± 0.11	0.10 ± 0.08
KBrO ₃ 40	1	-	0.20	0.30
	2	-	0.45	0.55
	3	-	0.10	0.45
	4	-	0.10	0.55
	5	-	0.50	0.10
	Mean ± SD	-	0.27 ± 0.19	0.39 ± 0.19***
KBrO ₃ 60	1	-	0.40	1.00
	2	-	0.30	0.70
	3	-	0.40	0.80
	4	-	0.40	0.35
	5	-	0.55	0.55
	Mean ± SD	-	0.41 ± 0.09***	0.68 ± 0.25***
KBrO ₃ 80	1	0.30	0.55	1.05
	2	0.40	1.05	1.00
	3	0.20	0.65	0.60
	4	0.60	0.25	0.65
	5	0.45	0.95	1.30
	Mean ± SD	0.39 ± 0.15***	0.69 ± 0.32***	0.92 ± 0.29***
Trend		-	++	++

–; not done.

Statistical significance: *** $p < 0.001$ (Kastenbaum & Bowman method) as compared with DW control and

⁺⁺ $p < 0.01$ (Cochran-Armitage) in trend test.

Table 13

Overall summary of results

	Administration period	Increase of MNed cell frequency	Inhibition of cell proliferation	Increase/decrease in organ weight	Pathological findings
Glandular stomach	4 days	+	—	n.d.	—
	14 days	+	—	n.d.	+
	28 days	+	—	n.d.	+
Colon	4 days	—	—	n.d.	—
	14 days	—	—	n.d.	—
	28 days	—	—	n.d.	—
Liver	4 days	—	—	—	—
	14 days	—	—	—	—
	28 days	—	—	—	—
Bone marrow	4 days	+	—	n.d.	n.d.
	14 days	+	—	n.d.	n.d.
	28 days	+	—	n.d.	n.d.
Kidney (target organ)	4 days	n.d.	n.d.	Increase	—
	14 days	n.d.	n.d.	Increase	+
	28 days	n.d.	n.d.	Increase	+

+, positive; —, negative; n.d., not done.

第五章 総括

遺伝毒性は、通常、ガイドラインで推奨される特定の遺伝毒性試験（バッテリー試験）を複数組み合わせることで実施し、その成績から総合的に評価される。また、バッテリー試験の成績だけでは判断が難しい場合に必要となる追加試験や、ICH S2（R1）ガイドラインのオプション2で推奨される第2の組織（通常、造血細胞以外の組織）を用いる *in vivo* 試験では、被験物質の曝露や標的臓器を考慮した試験の選択が求められる[1]。特に食品やその他の経口摂取する物質の評価には、被験物質が直接接触する消化管（特に胃）を用いる試験が有効であると考えられる。胃を用いた遺伝毒性試験には、comet assay[3,4]、トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験[5]および不定期 DNA 合成試験[6,7]があるが、染色体異常誘発性を指標とした試験法は開発されていない。そこで本研究では腺胃を用いる小核試験法を新規に考案し、腺胃での小核頻度を指標に遺伝毒性（染色体異常誘発性）の評価が可能か否か検証した。

腺胃小核標本は、大山らのマウス結腸小核標本作製法[21,22]を改変し、マウス腺胃を EDTA 処理することで剥離した上皮細胞をホルマリン固定して作製した。また、小核標本作製時期は、腺胃上皮細胞の寿命を考慮し、被験物質投与後 3 および 4 日目とした。胃を発がん標的とする遺伝毒性物質 MNU および MNNG を単回経口投与したマウスから上記の方法で腺胃小核標本作製し、小核保有細胞数の頻度（小核頻度）を算出したところ、溶媒対照群と比較して小核頻度の有意な増加が観察された。そのため、当該手法が胃での染

色体異常誘発性の評価に利用可能であることが示された。また、同じ動物から採取した尾静脈血を用いて末梢血小核試験を実施したところ、MNNG 投与群では小核頻度の増加が認められず、末梢血小核試験で陰性結果を示した。そのため、経口投与後被験物質が直接接触する腺胃を用いた小核試験は、経口摂取する物質の遺伝毒性評価に有用であると考えられた。その後、著者は当手法を一般毒性試験に汎用されるラットに応用し、ラットを用いた場合にも遺伝毒性物質の単回投与後 2～4 日目に腺胃小核頻度が増加することを明らかにした[40]。

遺伝毒性を *in vivo* 試験により評価する場合には短期投与または長期投与のどちらかの試験方法を選択することになるため、開発した腺胃小核試験が短期投与および長期投与の試験方法に組み入れて実施可能か否かを検証する必要がある。さらに ICH S2 (R1) ガイドラインには、動物愛護の観点から、① 短期投与条件下において 2 つ以上の指標または組織を用いて評価する場合、組み合わせ試験として 1 つの試験として実施すること、また、② *in vivo* 試験を長期投与とする場合、科学的に正しければ一般毒性試験に遺伝毒性の指標を組み込むことを考慮すべきと記されている[1]。そのため、まず短期投与条件下での試験法として、経口摂取した物質が直接接触する腺胃、難消化性物質や腸内細菌により遺伝毒性物質に変換されうる物質の評価に有用な結腸[12]および遺伝毒性物質を広く検出できる骨髓[1]での小核誘発性を同一動物で評価するための短期投与試験系（腺胃、結腸、骨髓の小核同時評価系）の構築を試みた。

腺胃、結腸、骨髄の小核試験を同一動物で実施する場合、各試験の標本作製時期が異なるために多くの動物が必要となる。一方、被験物質をラットに4日間連続投与しその後24時間目に標本作製を行うことで、これら3臓器での小核誘発性を同一動物で評価可能であると考えた。上記評価系の妥当性を検証するため、6種の消化管を標的とする遺伝毒性発がん物質（胃と結腸を標的とするMNU、胃を標的とする4NQO、MNNG、NMUT、および結腸を標的とするDMH、PhIP）をそれぞれラットに4日間経口投与し、試験を実施した。その結果、MNU投与により腺胃、結腸、骨髄で、4NQO投与により腺胃と骨髄で、MNNG、NMUT投与により腺胃で、DMH、PhIP投与により結腸と骨髄で、小核頻度の用量依存的な増加が認められた。これらの結果から、4日間連続投与後24時間目の評価により、腺胃、結腸、骨髄での小核誘発性を同一動物で評価できることが示された。特に、MNNGやNMUTの投与では、骨髄での小核頻度の増加は認められず、腺胃でのみ陽性成績（小核頻度の用量依存的な増加）が得られたことから、消化管を組み合わせた当評価系が非常に有効であることが明らかとなった。さらに、食品添加物であるKBrO₃とAM、および植物フラボノイドQNを4日間経口投与した結果、発がん報告のあるKBrO₃では腺胃と骨髄において小核頻度の増加が認められ、非発がん物質であるAMとQNでは3臓器全てにおいて小核誘発性は認められなかった。以上の結果から、今回開発した短期投与による腺胃、結腸、骨髄の小核同時評価系は、経口摂取する物質の*in vivo*における遺伝毒性や発がんリスクを適切に評価できる試験系であることが明らかとなった。

さらに、長期投与条件下で行う試験として一般毒性試験の供試動物を用いた腺胃小核試験（28 日間反復投与毒性試験への腺胃小核試験の組み込み）の妥当性を検討した。長期投与条件下で行う *in vivo* 試験については、一般毒性試験の供試動物を用いて試験を実施することで使用動物数の削減に大きく貢献できることに加え、一般毒性試験で得られる毒性プロファイルを考慮して遺伝毒性リスクを総合的に評価することができる。しかしながら、小核を保有する腺胃被蓋上皮細胞は細胞分裂後 4 日を過ぎると脱落するため、腺胃小核頻度は 4 日間投与条件下で最大となり、それ以上投与期間を延長しても小核頻度の増加は認められないことが予想される。また毒性を有する被験物質の場合、通常、反復投与時の最大投与可能用量は短期投与時に比べ低下する。そのため、一般毒性試験に腺胃小核試験を組み込む際には、28 日間投与可能な低用量域において遺伝毒性評価が可能であることを確認する必要がある。そこで、遺伝毒性発がん物質である KBrO_3 を 4、14、28 日間反復経口投与したラットの腺胃小核頻度を調べ、28 日間反復投与条件下における腺胃小核試験の妥当性を評価した。その結果、4 日間投与試験の成績と同様に、14 または 28 日間反復投与条件下においても腺胃小核頻度の増加が認められた。また、投与期間を 4 日間以上とした場合、腺胃小核頻度は投与期間の違いにより大きな影響を受けないことが明らかとなった。そのため、反復投与条件下において著しい投与可能用量の低下が認められない場合には、腺胃小核試験の 28 日間反復投与毒性試験への組み込みは可能であることが示唆された。

本研究で開発した腺胃小核試験法は、経口摂取した物質が直接曝露される胃において染色体異常誘発性を評価できるはじめての試験法である。当試験は、生体内での分解や失活が早いため造血細胞を用いる小核試験による評価が難しい遺伝毒性物質の検出に非常に有効であった。さらに、短期投与条件下において結腸や骨髄の小核試験と同時に実施することが可能であること、また、一般毒性試験に組み込み可能な試験としても期待できることから、経口摂取する物質の広範的な毒性評価に非常に有意義であることが示された。開発した *in vivo* 腺胃小核試験については、現在、日本環境変異原学会の分科会である哺乳動物試験研究会において共同研究を実施しており、当該試験が標準試験法として国際的に認知されるよう活動を進めている。その成果については、2013 年に開催された遺伝毒性試験の国際ワークショップ (International Workshop on Genotoxicity Tests) でも報告された。今後は、本試験を広く普及するために、より洗練されたプロトコールの作製およびメカニズム関連事項の解明に向けた種々の検討を行いたいと考えている。

要旨

げっ歯類の腺胃を用いる *in vivo* 小核試験系の開発研究

食品、医薬品、化粧品および新規化学物質の開発の際には、各種ガイドラインに則って複数の毒性試験を実施し、その安全性を担保する必要がある。特に、開発品が遺伝毒性を有する場合、発がんリスクの増加などにつながる危険性があるため、遺伝毒性評価は実施すべき毒性評価項目の1つとして挙げられている。遺伝毒性は、通常、ガイドラインで推奨される特定の遺伝毒性試験（バッテリー試験）を複数組み合わせ実施し、その成績から総合的に評価される。また、バッテリー試験の成績だけでは判断が難しい場合に必要となる追加試験や、ICH S2 (R1) ガイドラインで推奨される第2の組織を用いる *in vivo* 試験では、標的臓器を考慮した試験の選択が求められる。食品などの経口摂取する物質については、経口摂取した物質が直接接触する消化管を用いる試験が有効であるため、今回、げっ歯類の腺胃を用いる *in vivo* 小核試験系の開発を試みた。

小核は染色体に損傷を受けた細胞が分裂する際に生じる小さい核であり、小核試験では小核を有する細胞の頻度（小核頻度）を指標として遺伝毒性の有無を評価する。造血細胞（骨髄または末梢血）を用いる小核試験はバッテリー試験の1つとして汎用されており、また肝臓や皮膚を用いる小核試験の研究も進められている。その一方、胃を用いた小核試験の研究報告はほとんどない。そこで、EDTA 処理による腺胃小核標本作製法を新規に考

案し、腺胃での小核頻度を指標として遺伝毒性評価が可能か否かを検証した。その結果、胃を標的とする遺伝毒性発がん物質をマウスに単回経口投与後 3、4 日目に腺胃小核頻度の増加が認められ、腺胃小核頻度を指標とした遺伝毒性評価が可能であることが示された。その後、著者は当手法を毒性試験に汎用されるラットに応用し、ラットを用いた場合にも遺伝毒性物質の単回投与後 2～4 日目に腺胃小核頻度が増加することを明らかにした。

遺伝毒性を*in vivo*試験により評価する場合、短期投与または長期投与のどちらかの試験方法を選択することになる。さらにICH S2 (R1) ガイドラインには、動物愛護の観点から、① 短期投与条件下において2つ以上の指標または組織を用いて評価する場合、組み合わせ試験として1つの試験として実施すること、また、② *in vivo*試験を長期投与とする場合、科学的に正しければ一般毒性試験に遺伝毒性の指標を組み込むことを考慮すべきであることが記されている。そのため、短期投与条件下で行う試験として、消化管（腺胃と結腸）および骨髄での小核誘発性を同一動物で評価する短期投与試験系（腺胃、結腸、骨髄の小核同時評価系）の開発を試みた。

腺胃、結腸、骨髄の小核試験を同一動物で実施する場合、各試験の標本作製時期が異なるために多くの動物が必要となる。一方、被験物質をラットに4日間経口投与しその後24時間目に標本作製を行うことで、3臓器での小核同時評価が可能であると考え、6種の消化管を標的とする遺伝毒性発がん物質を用いて当評価系の妥当性を検証した。その結果、標的とする腺胃および／または結腸で陽性成績（小核頻度の用量依存的な増加）が得られ、

同一動物での評価が可能であることが確認された。さらに、検証に用いた2物質は骨髓小核試験で陰性となり、消化管を組み合わせた当評価系が有効であることが示された。また、食品関連物質を用いた検討では、遺伝毒性発がん物質（KBrO₃）を経口投与した場合には腺胃と骨髓で陽性成績が得られたが、非発がん物質（赤色2号やケルセチン）を投与した場合には3臓器全てにおいて陰性成績が得られた。以上の結果から、短期投与条件下で行う当該試験が、経口的に摂取する物質の*in vivo*での遺伝毒性リスクを適切に評価できることが示された。

最後に、長期投与条件下で行う試験として一般毒性試験の供試動物を用いた腺胃小核試験（28日間反復投与毒性試験への腺胃小核試験の組み込み）の妥当性を検討した。食品添加物である KBrO₃ を最長 28 日間ラットに反復経口投与して腺胃小核試験を実施した結果、4 日間投与時と同様に陽性成績が得られた。また、被験物質の投与期間を 4 日間以上とした場合、腺胃小核頻度は投与期間の違いにより大きな影響を受けないことが明らかとなった。そのため、反復投与条件下において著しい投与可能用量の低下が認められない場合には、腺胃小核試験の 28 日間反復投与毒性試験への組み込みは可能であることが示唆された。

本研究で開発した腺胃小核試験は、経口摂取した物質が直接曝露される胃において染色体異常誘発性を評価できるはじめての試験法である。当試験は、造血細胞を用いる小核試験による評価が難しい遺伝毒性物質の検出に非常に有効であった。さらに、短期投与条件下において結腸や骨髓の小核試験と同時に実施することが可能であること、また、一般毒

性試験に組み込み可能な試験としても期待できることから、経口摂取する物質の広範的な毒性評価に非常に有意義であることが示された。

引用文献

- [1] Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1), in: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Harmonized Tripartite Guideline, ICH, Adopted on 9 November 2011.
- [2] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, CA Cancer J. Clin. 61 (2011) 69-90.
- [3] In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay (Draft Test Guideline), in: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, December 2013.
- [4] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen. 35 (2000) 206-221.
- [5] Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays (Test Guideline 488), in: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Adopted on 26 July 2013.
- [6] C. Furihata, Y. Yamawaki, S. Jin, H. Moriya, K. Kodama, T. Matsushima, T. Ishikawa, S. Takayama, M. Nakadate, Induction of unscheduled DNA synthesis in rat stomach mucosa by

glandular stomach carcinogens, J. Natl. Cancer Inst. 72 (1984) 1327-1334.

[7] C. Furihata, T. Matsushima, In vivo short-term assays for tumor initiation and promotion in the glandular stomach of Fischer rats, Mutat. Res. 339 (1995) 15-35.

[8] In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (Test Guideline 487), in: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Adopted on 22 July 2010.

[9] Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (Test Guideline 474), in: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Adopted on 21 July 1997.

[10] M. Hayashi, J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, I.D. Adler, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, S. Sutou, In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environ. Mol. Mutagen. 35 (2000) 234-252.

[11] M. Hayashi, J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, L. Abramsson-Zetterberg, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, N. Asano, H. Suzuki, W. Ohyama, D. Gibson, In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutat. Res. 627 (2007) 10-30.

- [12] T. Morita, J.T. MacGregor, M. Hayashi, Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, *Mutagenesis* 26 (2011) 223-230.
- [13] M.T. Goldberg, D.H. Blakey, W.R. Bruce, Comparison of the effects of 1,2-dimethylhydrazine and cyclophosphamide on micronucleus incidence in bone marrow and colon, *Mutat. Res.* 109 (1983) 91-98.
- [14] A. Vanhauwaert, P. Vanparys, M. Kirsch-Volders, The *in vivo* gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage, *Mutagenesis* 16 (2001) 39-50.
- [15] V.S. Zhurkov, L.P. Sycheva, O. Salamatova, I.F. Vyskubenko, E.G. Feldt, N.I. Sherenesheva, Selective induction of micronuclei in the rat/mouse colon and liver by 1,2-dimethylhydrazine: a seven-tissue comparative study, *Mutat. Res.* 368 (1996) 115-120.
- [16] M. Poul, G. Jarry, M.O. Elhkim, J. Poul, Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 443-448.
- [17] L.L. Hégarat, A. Jacquin, E. Bazin, V. Fessard, Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human caco-2 cells and in mice gut cells, *Environ. Toxicol.* 21 (2006) 55-64.
- [18] A. Çelik, B. Mazmanci, Y. Çamlıca, A. Aşkin, Ü. Çömelekoğlu, Induction of micronuclei by lambda-cyhalothrin in Wister rat bone marrow and gut epithelial cells, *Mutagenesis* 20 (2005) 125-129.

- [19] S. Coffing, M. Engel, D. Dickinson, C. Thiffeault, R. Spellman, T. Shutsky, M. Schuler, The rat gut micronucleus assay: a good choice for alternative *in vivo* genetic toxicology testing strategies, *Environ. Mol. Mutagen.* 52 (2011) 269-279.
- [20] L.P. Sycheva, Z.I. Zholdakova, E.E. Polyakova, N.E. Lukmanova, L.V. Akhal'tseva, V.S. Zhurkov, Mutagenic activity of cyclohexene and products of its chlorination, *Bull. Exp. Biol. Med.* 129 (2000) 581-583.
- [21] W. Ohyama, T. Tokumitsu, An *in vivo* micronucleus test using colonic epithelial cells of mice, *Environ. Mutagen. Res. Commun.* 17 (1996) 265-269.
- [22] W. Ohyama, M. Gonda, H. Miyajima, K. Kondo, T. Noguchi, J. Yoshida, S. Hatakeyama, E. Watabe, Y. Ueno, M. Hayashi, T. Tokumitsu, Collaborative validation study of the *in vivo* micronucleus test using mouse colonic epithelial cells, *Mutat. Res.* 518 (2002) 39-45.
- [23] W.M.S. Russell, R.L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen & Co., Ltd., London, 1959, pp. 1-238.
- [24] M. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 127 (1984) 129-137.
- [25] I.L. Cameron, Cell proliferation and renewal in the mammalian body, in: I.L. Cameron, J.D. Thrasher (Eds.), *Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body*, Academic Press, New York, 1971, pp. 45-85.

- [26] 竹内 昭雄、「6.2 大腸」、人体組織学 4 消化器、小川 和朗ほか編、(株)朝倉書店、1987、
pp. 248-267.
- [27] 服部 隆則、藤田 哲也、「5.2 胃粘膜の細胞分化と細胞交代」、人体組織学 4 消化器、
小川 和朗ほか編、(株)朝倉書店、1987、pp. 203-210.
- [28] 伊藤 信行、「II 標的器官の毒性病理 (1) 消化器系 F 腺胃」、最新毒性病理学、(株)中
山書店、1994、pp. 127-137.
- [29] M. Tatematsu, K. Ogawa, T. Hoshiya, Y. Shichino, T. Kato, K. Imaida, N. Ito, Induction of
adenocarcinoma in the glandular stomach of BALB/c mice treated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea,
Jpn. J. Cancer Res. 83 (1992) 915-918.
- [30] R. Schoental, J.P.M. Bensted, Gastro-intestinal tumours in rats and mice following various
routes of administration of *N*-methyl-*N*-nitroso-*N'*-nitroguanidine and
N-ethyl-*N*-nitroso-*N'*-nitroguanidine, *Br. J. Cancer* 23 (1969) 757-764.
- [31] J.A. Haddle, M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J.T. MacGregor, G.W. Newell, M.F.
Salamon, The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S.
Environmental Protection Agency Gene-Tox program, *Mutat. Res.* 123 (1983) 61-118.
- [32] B.E. Matter, J. Grauwiler, Micronuclei in mouse bone-marrow cells. A simple *in vivo* model
for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* 23 (1974) 239-249.
- [33] A.T. Natarajan, G. Obe, How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their

- ability to detect mutagens?, *Mutat. Res.* 167 (1986) 189-201.
- [34] J. Ashby, E. Mirkova, The activity of MNNG in the mouse bone marrow micronucleus assay, *Mutagenesis* 2 (1987) 199-204.
- [35] M. Watanabe, S. Honda, M. Hayashi, T. Matsuda, Mutagenic effects of combinations of chemical carcinogens and environmental pollutants in mice as shown by the micronucleus test, *Mutat. Res.* 97 (1982) 43-48.
- [36] H. Suzuki, T. Shirotori, M. Hayashi, A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation, *Cytogenet. Genome Res.* 104 (2004) 299-303.
- [37] A. Matsuoka, N. Yamazaki, T. Suzuki, M. Hayashi, T. Sofuni, Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosomal aberration test, *Mutat. Res.* 272 (1993) 223-236.
- [38] M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.* 245 (1990) 245-249.
- [39] D. Brault, C. Bouilly, D. Renault, V. Thybaud, Tissue-specific induction of mutations by acute oral administration of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nirtosoguanidine and β -propiolactone to the MutaTM Mouse: preliminary data on stomach, liver and bone marrow, *Mutat. Res.* 360 (1996) 83-87.

- [40] W. Ohyama, E. Okada, Y. Fujiishi, K. Narumi, N. Yasutake, In vivo rat glandular stomach and colon micronucleus tests: kinetics of micronucleated cells, apoptosis, and cell proliferation in the target tissues after a single oral administration of stomach- or colon-carcinogens, *Mutat. Res.* 755 (2013) 141-147.
- [41] J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H.H. Wachter, U. Schwab, H. Stein, Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67, *J. Immunol.* 133 (1984) 1710-1715.
- [42] A. Maekawa, C. Matsuoka, H. Onodera, H. Tanigawa, K. Furuta, T. Ogiu, K. Mitsumori, Y. Hayashi, Organ-specific carcinogenicity of *N*-methyl-*N*-nitrosourea in F344 and ACI/N rats, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 109 (1985) 178-182.
- [43] M. Ito, S. Yamada, H. Suzuki, T. Nagayo, Effect of salivary gland extirpation on the carcinogenesis of rat stomach by 4-nitroquinoline 1-oxide, *Gann* 60 (1969) 223-225.
- [44] M. Takahashi, Effect of alkylbenzenesulfonate as a vehicle for 4-nitroquinoline 1-oxide on gastric carcinogenesis in rats, *Gann* 61 (1970) 27-33.
- [45] T. Sugimura, S. Fujimura, Tumor production in glandular stomach of rats by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, *Nature* 216 (1967) 943-944.
- [46] R. Schoental, Experimental induction of gastro-intestinal tumours in rodents by *N*-alkyl-*N*-nitrosourethans and certain related compounds, *GANN Monograph* 3 (1968) 61-71.

- [47] D.D. Leaver, P.F. Swann, P.N. Magee, The induction of tumours in the rat by a single oral dose of *N*-nitrosomethylurea, *Br. J. Cancer* 22 (1969) 177-187.
- [48] T. Matsushima, T. Sugimura, Metabolism, in: H. Endo, T. Ono, T. Sugimura (Eds.), *Chemistry and Biological Actions of 4-Nitroquinoline 1-Oxide*, Springer-Verlag, New York/Heidelberg, 1971, pp. 53-60.
- [49] H. Druckrey, Production of colonic carcinomas by 1,2-dialkylhydrazines and azoxyalkanes, in: W.J. Burdette (Ed.), *Carcinoma of the Colon and Antecedent Epithelium*, Charles C. Thomas, Spring Field, 1970, pp. 267-279.
- [50] D.W. Rosenberg, C. Giardina, T. Tanaka, Mouse models for the study of colon carcinogenesis, *Carcinogenesis* 30 (2009) 183-196.
- [51] N. Ito, R. Hasegawa, M. Sano, S. Tamano, H. Esumi, S. Takayama, T. Sugimura, A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis* 12 (1991) 1503-1506.
- [52] World Health Organization (WHO) International Agency for Research on Cancer (IARC), Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* 71 (1999) 947-989.
- [53] T. Sugimura, K. Wakabayashi, H. Nakagama, M. Nagao, Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish, *Cancer Sci.* 95 (2004) 290-299.

- [54] M. Ishidate Jr., T. Sofuni, K. Yoshikawa, Chromosomal aberration tests *in vitro* as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens, GANN Monogr. Cancer Res. 27 (1981) 95-108.
- [55] M. Hayashi, M. Kishi, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals, Food Chem. Toxicol. 26 (1988) 487-500.
- [56] Y. Kurokawa, A. Maekawa, M. Takahashi, Y. Hayashi, Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate - a new renal carcinogen, Environ. Health Perspect. 87 (1990) 309-335.
- [57] H. Caria, T. Chaveca, A. Laires, J. Rueff, Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes, Mutat. Res. 343 (1995) 85-94.
- [58] T. Sofuni, M. Hayashi, A. Matsuoka, Data Book of Chromosomal Aberration Test *In Vitro*, revised edition 1998, Life-science Information Center, Tokyo, 1999, p 400-401.
- [59] T. Sofuni, M. Hayashi, A. Matsuoka, Data Book of Chromosomal Aberration Test *In Vitro*, revised edition 1998, Life-science Information Center, Tokyo, 1999, pp. 242-243.
- [60] T. Sofuni, M. Hayashi, A. Matsuoka, Data Book of Chromosomal Aberration Test *In Vitro*, revised edition 1998, Life-science Information Center, Tokyo, 1999, pp. 424-425.
- [61] L. Robbiano, R. Carrozzino, C.P. Puglia, C. Corbu, G. Brambilla, Correlation between

induction of DNA fragmentation and micronuclei formation in kidney cells from rats and human and tissue-specific carcinogenic activity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161 (1999) 153-159.

[62] S. Hamada, S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya, S. Ozawa, K. Kondo, M. Nakajima, H. Shimada, K. Osawa, Y. Kondo, N. Asano, S. Sato, H. Tamura, N. Yajima, R.

Marshall, C. Moore, D.H. Blakey, L.M. Schechtman, J.L. Weaver, D.K. Torous, R. Proudlock, S.

Ito, C. Namiki, M. Hayashi, Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Environ. Mol. Mutagen.* 37 (2001) 93-110.

[63] Y. Kurokawa, S. Takayama, Y. Konishi, Y. Hiasa, S. Asahina, M. Takahashi, A. Maekawa, Y. Hayashi, Long-term *in vivo* carcinogenicity tests of potassium bromate, sodium hypochlorite, and sodium chlorite conducted in Japan, *Environ. Health Perspect.* 69 (1986) 221-235.

[64] A.B. Deangelo, M.H. George, S.R. Kilburn, T.M. Moore, D.C. Wolf, Carcinogenicity of potassium bromate administered in the drinking water to male B6C3F₁ mice and F344/N rats, *Toxicol. Pathol.* 26 (1998) 587-594.

[65] World Health Organization (WHO) International Agency for Research on Cancer (IARC), Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* 73 (1999) 481.

- [66] D. Aparajita, M. Anita, Genotoxicity testing of the food colours amaranth and tartrazine, *Int. J. Hum. Genet.* 4 (4) (2004) 277-280.
- [67] D. Utesch, K. Feige, J. Dasenbrock, T.H. Broschard, M. Harwood, B. Danielewska-Nikiel, T.C. Lines, Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin, *Mutat. Res.* 654 (2008) 38-44.
- [68] J.T. MacGregor, C.M. Wehr, G.D. Manners, L. Jurd, J.L. Minkler, A.V. Carrano, *In vivo* exposure to plant flavonols, influence on frequencies of micronuclei in mouse erythrocytes and sister-chromatid exchange in rabbit lymphocytes, *Mutat. Res.* 124 (1983) 255-270.
- [69] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO) Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), Toxicological evaluation of some food colours, thickening agents, and certain other substances, WHO Food Additive Series 8 (1975), <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v08je02.htm> (accessed 03.05.14).
- [70] A.M. Pamukcu, Ş. Yalçiner, J.F. Hatcher, G.T. Bryan, Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*), *Cancer Res.* 40 (1980) 3468-3472.
- [71] J.K. Dunnick, J.R. Hailey, Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods, *Fundam. Appl. Toxicol.* 19 (1992) 423-431.
- [72] S.A. Clode, J. Hooson, D. Grant, W.H. Butler, Long-term toxicity study of amaranth in rats using animals exposed *in utero*, *Food Chem. Toxicol.* 25 (1987) 937-946.
- [73] European Food Safety Authority (EFSA), Scientific opinion on the re-evaluation of amaranth

(E 123) as a food additive, EFSA Journal 1649 (2010) 1-41.

[74] World Health Organization (WHO) International Agency for Research on Cancer (IARC),
Some aromatic azo compounds, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to
Humans 8 (1975) 41-51.

[75] J.V. Formica, W. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids,
Food Chem. Toxicol. 33 (1995) 1061-1080.

[76] T. Okamoto, Safety of quercetin for clinical application (Review), Int. J. Mol. Med. 16 (2005)
275-278.

[77] M. Fenech, The *in vitro* micronucleus technique, Mutat. Res. 455 (2000) 81-95.

[78] M. Kawabata, H. Takasawa, S. Minowa, H. Saitou, M. Nakagawa, M. Nakajima, S. Hamada,
New method of specimen preparation as cell suspension for a micronucleus test, Genes Environ.
29 (2007) 100-106.

[79] H. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., An application of acridine orange fluorescent staining to
the micronucleus test, Mutat. Res. 120 (1983) 241-247.

[80] K.M. Pozharisski, Y.M. Kapustin, A.J. Likhachev, J.D. Shaposhnikov, The mechanism of
carcinogenic action of 1,2-dimethylhydrazine (SDMH) in rats, Int. J. Cancer 15 (1975) 673-683.

[81] M. Onoue, S. Kado, Y. Sakaitani, K. Uchida, M. Morotomi, Specific species of intestinal
bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats, Cancer

Lett. 113 (1997) 179-186.

[82] A. Wakata, Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo, M.

Hayashi, Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood:

summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS, Environ. Mol. Mutagen. 32

(1998) 84-100.

[83] S. Phonethepswath, D. Franklin, D.K. Torous, S.M. Bryce, J.C. Bemis, S. Raja, S. Avlasevich,

P. Weller, O. Hyrien, J. Palis, J.T. MacGregor, S.D. Dertinger, Pig-a mutation: kinetics in rat

erythrocytes following exposure to five prototypical mutagen, Toxicol. Sci. 114 (2010) 59-70.

[84] A.E. Director, J. Nath, M.J. Ramsey, R.R. Swiger, J.D. Tucker, Cytogenetic analysis of mice

chronically fed the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5*b*]pyridine, Mutat. Res.

359 (1996) 53-61.

[85] K.A. Criswell, G. Krishna, D. Zielinski, G.A. Urda, P. Juneau, S. Bulera, M.R. Bleavins,

Validation of a flow cytometric acridine orange micronuclei methodology in rats, Mutat. Res. 528

(2003) 1-18.

[86] O. Wiestler, A.V. Deimling, O. Kabori, P. Kleihues, Location of

N-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced gastrointestinal tumors correlates with thiol

distribution, Carcinogenesis 4 (1983) 879-883.

[87] L. Romert, S. Swedmark, D. Jenssen, Thiol-enhanced decomposition of MNNG, ENNG and

- nitrosocimetidine: relationship to mutagenicity in V79 Chinese hamster cells, *Carcinogenesis* 12 (1991) 847-853.
- [88] O. Kobori, I. Schmerold, B. Ludeke, H. Ohgaki, P. Kleihues, DNA methylation in rat stomach and duodenum following chronic exposure to *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and the effect of dietary taurocholate, *Carcinogenesis* 9 (1988) 2271-2274.
- [89] D.E. Jensen, Denitrosation as a determinant of nitrosocimetidine *in vivo* activity, *Cancer Res.* 43 (1983) 5258-5267.
- [90] R. Schoental, D.J. Rive, Interaction of *N*-alkyl-*N*-nitrosourethanes with thiols, *Biochem. J.* 97 (1965) 466-474.
- [91] K. Kawana, T. Nakaoka, Y. Horiguchi, S. Watanabe, S. Watanabe, S. Kawauchi, Toxicological study of potassium bromate. I. Absorption, metabolism and excretion of potassium bromate after oral administration in rats, *Eisei Kagaku* 37 (1991) 258-265.
- [92] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO) Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, WHO Food Additives Series 19 (1984),
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v19je02.htm> (accessed 03.05.14).
- [93] Y.F. Sasaki, S. Kawaguchi, A. Kamaya, M. Ohshita, K. Kawabata, K. Iwama, K. Taniguchi, S. Tsuda, The comet assay with 8 mouse organs: result with 39 currently used food additives, *Mutat.*

Res. 519 (2002) 103-119.

- [94] S. Tsuda, M. Murakami, N. Matsusaka, K. Kano, K. Taniguchi, Y.F. Sasaki, DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice, *Toxicol. Sci.* 61 (2001) 92-99.
- [95] K. Narumi, K. Ashizawa, R. Takashima, H. Takasawa, S. Katayama, Y. Tsuzuki, H. Tatemoto, T. Morita, M. Hayashi, S. Hamada, Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: an investigation of diethylnitrosamine and 2,4-diaminotoluene, *Mutat. Res.* 747 (2012) 234-239.
- [96] K. Narumi, K. Ashizawa, Y. Fujiishi, R. Tochinal, E. Okada, Y. Tsuzuki, H. Tatemoto, S. Hamada, K. Kaneko, W. Ohyama, Persistence and accumulation of micronucleated hepatocytes in liver of rats after repeated administration of diethylnitrosamine, *Mutat. Res.* 755 (2013) 100-107.
- [97] H. Takasawa, R. Takashima, A. Hattori, K. Narumi, K. Kawasako, T. Morita, M. Hayashi, S. Hamada, Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rat (II): further investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene, *Mutat. Res.* 751 (2013) 12-18.
- [98] H. Kasai, S. Nishimura, Y. Kurokawa, Y. Hayashi, Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxyguanosine in rat target organ DNA, *Carcinogenesis* 8 (1987) 1959-1961.
- [99] T. Yamaguchi, M. Wei, N. Hagihara, M. Omori, H. Wanibuchi, S. Fukushima, Lack of

mutagenic and toxic effects of low dose potassium bromate on kidneys in the Big Blue rat, *Mutat.*

Res. 652 (2008) 1-11.

[100] C. Ruehl-Fehlert, B. Kittel, G. Morawietz, P. Deslex, C. Keenan, C.R. Mahrt, T. Nolte, M.

Robinson, B.P. Stuart, U. Deschl, Revised guides for organ sampling and trimming in rats and

mice - Part 1: a joint publication of the RITA and NACAD groups, *Exp. Toxicol. Pathol.* 55

(2003) 91-106.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、株式会社ヤクルト本社中央研究所 大山 わか 副主席研究員ならびに安武 信義 博士の長年に渡る多大なご指導に心から感謝いたします。また、本論文作成に際し多くのご助言を頂きました、東京農工大学農学部 新井 克彦 教授、宇都宮大学 吉澤 史昭 教授、東京農工大学農学府 普後 一 名誉教授、同大学農学研究院 天竺桂 弘子 講師ならびに株式会社ヤクルト本社中央研究所 金子 公幸 理事に深謝いたします。最後に、本研究を進めるに当たって惜しみなくご支援くださった、株式会社ヤクルト本社の皆様ならびに日本環境変異原学会 哺乳類試験研究会の皆様深く感謝申し上げます。