

# 学 位 論 文 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 Developmental study of *in vivo* rodent glandular stomach micronucleus assay

岡田 恵美子  
Emiko Okada

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 物質は骨髄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（ $\text{KBrO}_3$ ）を経口投与した場合には腺胃と骨髄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  $\text{KBrO}_3$  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。