

博士論文

In vivo 遺伝毒性試験としてのげっ歯類を用いた消化管小核試験の開発と
その有用性に関する研究

A study of development and utilization of a gastrointestinal tract
micronucleus test using rodents as an *in vivo* genotoxicity test

2019年2月

大山 わか

目次

略号一覧	1
序論	2
第1章 マウス結腸上皮細胞を用いる小核試験の開発	8
1-1 はじめに	9
1-2 実験方法	11
1-2-1 使用動物	11
1-2-2 化合物および動物への投与	11
1-2-2-1 実験1	11
1-2-2-2 実験2	11
1-2-3 結腸上皮細胞の単離細胞を用いた小核標本作製と観察	11
1-2-4 「クリプト標本」の作製と観察	12
1-2-5 末梢血小核標本の作製と観察	13
1-2-6 統計検定	13
1-3 実験結果	14
1-3-1 実験1	14
1-3-2 実験2	16
1-4 考察	18
第2章 マウスを用いた結腸小核試験のバリデーション	21
2-1 はじめに	22
2-2 実験方法	22
2-2-1 使用動物	22
2-2-2 化合物	22
2-2-3 動物への投与	22
2-2-4 小核標本作製および観察	23
2-2-5 統計処理	23
2-3 実験結果	23

2-3-1	モデル化合物を用いた結腸小核誘発の確認	23
2-3-2	溶媒対照群の小核頻度	27
2-4	考察	27
第3章	ラット腺胃および結腸を用いる小核試験への展開	29
3-1	はじめに	30
3-2	実験方法	32
3-2-1	使用動物	32
3-2-2	化合物	32
3-2-3	腺胃および結腸上皮細胞の turnover time の解析	32
3-2-4	動物への投与	33
3-2-4-1	胃発がん物質の投与	33
3-2-4-2	結腸発がん物質の投与	33
3-2-5	小核標本の作製	33
3-2-5-1	腺胃および結腸	33
3-2-5-2	骨髄	36
3-2-6	組織標本の作製	36
3-2-6-1	アポトーシス	36
3-2-6-2	EdU の取り込み	36
3-2-6-3	Ki-67 免疫染色の解析	36
3-2-7	統計手法	37
3-3	実験結果	37
3-3-1	腺胃および結腸上皮細胞の turnover time の解析	37
3-3-2	小核頻度、アポトーシスおよび細胞増殖活性の経時変化	38
3-3-2-1	胃発がん物質を用いた実験	38
3-3-2-2	結腸発がん物質を用いた実験	42
3-4	考察	44

第4章 発がん機序解析におけるラット結腸小核試験の利用：腸内細菌叢の有無による影響評価	47
4-1 はじめに	48
4-2 実験方法	49
4-2-1 使用動物	49
4-2-2 化合物	50
4-2-3 動物への投与	50
4-2-3-1 コメット試験、およびアポトーシスと細胞増殖の解析	50
4-2-3-2 小核試験、およびアポトーシスと細胞増殖の解析	51
4-2-4 標本作製および観察	52
4-2-4-1 コメット試験	52
4-2-4-2 小核試験	53
4-2-4-3 組織標本の作製およびアポトーシスと細胞増殖の解析	53
4-2-4-3-1 アポトーシスの染色と解析、および分裂中期像とクリプトの高さの解析	53
4-2-4-3-2 BrdUの染色と解析	54
4-2-5 統計処理	54
4-3 実験結果	54
4-3-1 コメット試験	54
4-3-2 結腸小核試験	55
4-3-3 組織標本の解析	56
4-3-3-1 アポトーシス	56
4-3-3-2 分裂中期細胞	57
4-3-3-3 クリプトの高さ	57
4-3-3-4 BrdU 標識細胞	57
4-4 考察	59
総括	62
Summary	65

謝辭	68
引用文献	69

略号一覧

ACF:	aberrant crypt foci
AO:	acridine orange
BM:	bone marrow
BrdU:	bromodeoxyuridine
CV:	conventional
Cvd:	conventionalized
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMH:	1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride [CAS 登録番号 306-37-6]
1,1-DMH:	1,1-dimethylhydrazine hydrochloride [CAS 登録番号 593-82-8]
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EdU:	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
GF:	germ-free
HBSS:	Hanks' balanced salt solution
ICH:	International Conference on Harmonisation of Technical Requirement for Registration of Pharmaceutical for Human Use
IME:	immature erythrocytes
MMC:	mitomycin C [CAS 登録番号 50-07-7]
MN:	micronucleus
MNed:	micronucleated
MNNG:	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine [CAS 登録番号 70-25-7]
MNU:	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea [CAS 登録番号 684-93-5]
OECD:	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS:	phosphate buffered saline
RET:	reticulocyte
TUNEL:	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling

序論

わが国において、昭和 56 年以降死因のトップを占めているのは悪性新生物、がんである[1]。がん発生に關与する要因には、食事、たばこのほか、環境中の物理的要因（紫外線、放射線等の曝露）、化学的要因（一般化学物質、農薬、大気・河川・土壤中に含まれる汚染物質等による曝露）、生物学的要因（ウィルスや細菌、寄生虫等の感染）が挙げられ、さらにこれらに遺伝的要因や加齢などが影響すると考えられている[2]。がん化の抑制には、これらのリスク因子を取り除くことが重要だが、遺伝的要因や加齢は現時点ではコントロールが困難である。一方、環境要因、特に化学物質は、発がんリスクを上昇させるポテンシャルを有するか否かを予め評価し、危険性を有する物質の曝露を積極的に避けるべきものである。正常細胞ががん化する過程には、いくつかの経路があると考えられている。一つは多段階説で、遺伝子の本体である DNA が上述のような要因で傷ついて起こる遺伝子突然変異がきっかけとなり、異常細胞が増えるとともに、徐々に複数の遺伝子が変異して異常細胞の増殖が加速化し、さらに悪性化することによりがん化が進行するというものである[3]。また、DNA を直接傷つけるのではなく、DNA メチル化やヒストンの修飾により遺伝子発現を変化させるエピジェネティックな変化もがん化に關与していることがわかっている[4]。近年、多数の遺伝子変異が一度のイベントで起こるクロモソリプシスという現象が見いだされ、多段階説では説明できない急激に発症するようながんの原因の一つである可能性も報告されている [5]。

がん化の引き金となる遺伝子突然変異や染色体異常を誘発するポテンシャルを持つ物質（遺伝毒性物質）を検出するために考案された試験が遺伝毒性試験（変異原性試験）である。遺伝毒性と変異原性の 2 種類の用語が用いられているが、一般的に遺伝毒性の方がより幅広い現象を意味する用語であり、変異原性は遺伝子突然変異と染色体の構造異常に限定して用いられることが多い。本論文では DNA 損傷性も問題とすることから以降原則として遺伝毒性を用いることとする。遺伝毒性試験には *in vitro* および *in vivo* の試験があり、比較的短期間に被験物質の遺伝毒性リスクの有無を評価できることから、発がん性予測の一次スクリーニングとして用いられている。新規の医薬品や化学物質、医薬部外品、農薬、食品添加物や機能成分を有する食品（特定保健用食品）等の申請に際しては、試験法ガイドラインが策定されており、試験結果の提出が必須である。1 つの試験で発がん性に関連するすべての遺伝毒性機序を検出することは難しいことから、複数の指標を用いて、*in vitro* および *in vivo* 試験の組合せによる試験（バッテリー法）の実施を必要としている。医薬品の遺伝毒性試験ガイドライン International Conference on Harmonisation (ICH) guidance S2 (R1) [6]の標準的な組み合わせ（標準バッテリー）には、2 つのオプションがある。オプション 1 は、(1) 細菌を用いて遺伝子突然変異を検出する「細菌を用いる復帰突然変異試験(エームス試験)」、(2) ほ乳動物細胞を用いる *in vitro* 試験、

および (3) げっ歯類を用いる *in vivo* 試験で、オプション 2 は、(2)の代わりに(3)の *in vivo* 試験を 2 種類の異なる組織を用いて実施する組み合わせである。Table 1 に主な既存遺伝毒性試験一覧を示す。

Table 1. Existing main genotoxicity tests.

		Endpoints for assessment of genotoxicity		
		Gene mutation	Chromosomal aberration	DNA damage
<i>In vitro</i>	Bacteria	Ames test	—	Rec assay
	Mammalian cell lines	Hprt gene mutation assay	Chromosomal aberration test/ Micronucleus test	UDS test
		Mouse lymphoma Tk gene mutation assay		
<i>In vivo</i>	Animals	Transgenic rodent gene mutation assay	Erythrocyte micronucleus test	Comet assay
			Bone marrow chromosomal aberration test	UDS test

ほ乳動物細胞を用いる *in vitro* 試験としては、染色体損傷性を検出する染色体異常試験、小核試験、および染色体損傷性と遺伝子突然変異を検出するマウスリンフォーマ Tk 試験のいずれかが標準的に用いられる。*In vitro* で遺伝毒性を示し、*in vivo* で遺伝毒性陰性の化合物が存在すること、および遺伝毒性の評価に、吸収、分布、代謝及び排泄などの要素を加味した試験法を加えることが望ましいことから、*in vivo* 遺伝毒性試験が標準的組合せに加えられている。*In vivo* 試験は、末梢血もしくは骨髄中の赤血球の小核または骨髄における分裂中期細胞の染色体異常のいずれかが評価の対象として第一に選択される。小核試験では、染色体の構造異常だけでなく数的異常も検出できる可能性があるため、標準的にはげっ歯類の造血細胞を用いる小核試験が広く用いられている。

げっ歯類の造血細胞を用いる小核試験は、細胞分裂の活発な赤芽球を評価対象とした試験である[7, 8]。赤芽球は、固形臓器と異なり細胞単離操作が不要で多数の細胞を容易に得られるため、サンプル調製が容易であること、また、ほ乳類の場合主核が脱核して小核のみが赤血球中に残るため、観察が容易であることから、汎用性が高く、標準化に適した試験である。さらに、広範な物質の染色体異常誘発性を検出できる非常に優れた試験である。しかし、化学物質の中には吸収性が悪いため、あるいは、肝臓で代謝活性化されて不安定になり、骨髄に到達し難いものがある。

遺伝毒性の適切な評価には、活性を有する物質の骨髄への暴露を十分考慮する必要がある。そのため、2つ目の *in vivo* 試験（セカンド *in vivo* 試験）の評価対象臓器は、想定可能な機序、代謝又は曝露情報などの要因を考慮して選択すべきとされている。また、がんのリスク評価における証拠の重み付け（weight of evidence）の観点から、発がん標的臓器における遺伝毒性評価は重要である。

骨髄以外の臓器を評価対象とする試験として以下のような手法が開発されてきた。

- ① 肝臓、胃の不定期 DNA 合成（UDS）試験[9,10]
- ② コメット試験[11]
- ③ トランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験[12]
- ④ DNA 付加体を検出する試験[13, 14]
- ⑤ 肝臓、脾臓、皮膚、結腸等、骨髄以外の臓器を用いる小核試験[15-18]

このうち、②③④は原理的には各種臓器を評価対象とすることができる。また、肝臓 UDS 試験、肝臓と胃のコメット試験およびトランスジェニック動物を用いる試験は OECD ガイドライン化されている。ただし、セカンド *in vivo* 試験として一般的には肝臓の DNA 鎖切断を検出する試験（コメット試験）が勧められている。曝露及び代謝能の観点から肝臓は特に適した組織と考えられるためである。

一方、ヒトにおけるがんの中で、大腸がんや胃がんはいずれも罹患率や死亡率が高いがんである[19, 20]。WHO の調べでは、2018 年（予測）、大腸がんの罹患率は 4 位、死亡率は 3 位、胃がんは罹患率 6 位、死亡率 5 位である[19]。日本では、2018 年（がんセンター予測）、大腸がんの罹患数は 1 位、死亡数は 2 位、胃がんは罹患数 2 位、死亡数 3 位である[20]。特に結腸がんは、1960 年代後半から増加しており、食生活の欧米化が大きな要因の一つと考えられている[21]。また、胃がんは 1990 年代前半までは死亡率が 1 位であった。これは高い塩分摂取量の影響（食塩の発がんプロモーション作用）が大きいと考えられる[22, 23]。その後、死亡率は横ばいあるいは減少傾向があるが、依然として死亡率の上位を占めている。ヒトの食生活において消化管は食品が最初に接触する部位であり、消化管の中でも胃は経口投与した物質が高濃度で最初に接触する部位である。動物実験においても化学発がん物質の *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) の経口投与により、ラットの胃にがんが発生することが報告されている[24]。また、肝臓で代謝活性化される 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) は、げっ歯類において主に結腸にがんを誘発することが知られている[25-28]。さらに、食品の焼け焦げ等から生成するヘテロサイクリックアミンは大腸がん発生の要因となることが報告されている[29, 30]。ラットに大腸の炎症を誘発した状態で化学発がん物質を投与すると、単独投与に比べ、がん化が加速するとの報告もある[31, 32]。このように、消化管をターゲットとした発がん物質が存在することから、消化管における遺伝毒性リスクの評価は重要であると考えられる。

消化管を評価対象とする *in vivo* 試験としては、上述したように DNA 損傷を検出するコメット試験や遺伝子突然変異を検出するトランスジェニック動物を用いる試験が標準化されているが、その他の試験は基礎研究として開発されたものであり、化学物質の安全性を評価するための試験法としては標準化されていない。この中で、小核試験は、UDS 試験や ^{32}P -ポストラベル法とは異なり、放射性標識体を使う必要がなく、また、DNA 付加体検出に用いる LC/MS/MS のように特別な装置も必要とせず、一般の実験室で汎用機器のみで実施可能な試験である。Fig. 1 に小核生成機序を示すように、染色体異常を有する細胞が 2 つの娘細胞に分裂する際に動原体を持たない染色体断片等が小核を形成することから、小核は染色体異常の指標となる。染色体異常はがん細胞の多くに見出され、特にがんの増殖と悪性化に深い関係があるといわれている[33-37]。また、小核は、染色体異常に比べ検出可能時間が長く[7, 38]、観察が技術的に容易であることから、小核を指標とした試験は標準化に適した手法である。さらに、小核試験は、染色体の構造異常を誘発する物質のみならず、紡錘糸形成阻害剤のような染色体の数の異常を引き起こす物質（異数性誘発物質）も検出可能である。小核を観察する場合は、分裂後の細胞を対象とすることが必要であるが、活発な細胞分裂を繰り返す消化管は小核観察が可能な臓器であると考えられる。そこで、本研究では、げっ歯類の消化管を用いる小核試験法を開発し、その有用性を検討することとした。

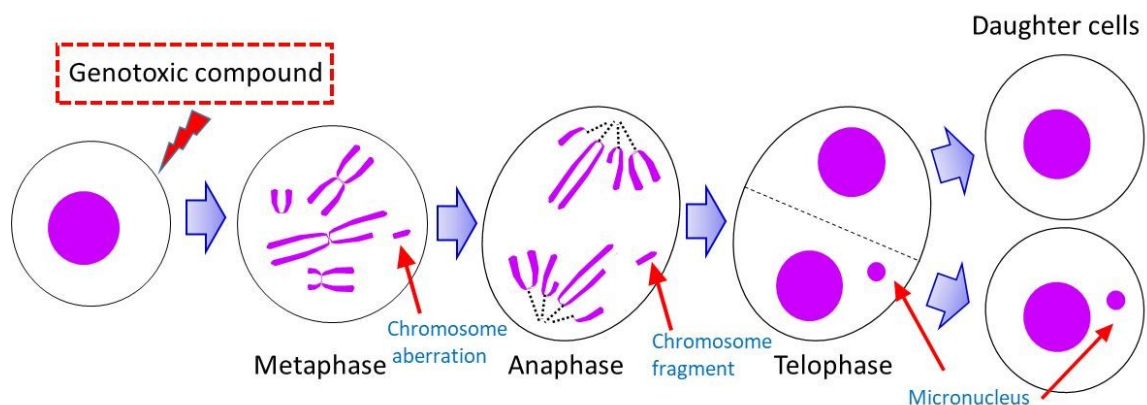


Fig.1. Induction of micronuclei in somatic cells.

第 1 章では、マウスを用い、結腸の小核観察に適した単離細胞を得る手法を検討し、新規な小核試験法を開発した。従来、結腸の薄切組織標本を用いて、小核を含む核異常[pyknotic nuclei, fragmented (karyorrhectic) nuclei, micronuclei]を検出する試験が主流であった[39-45]が、組織標本では細胞の 1 断面を観察するため、アポトーシスと小核との区別が難しく、必ずしも小核誘発性の正確な判定ができなかった。それに対し、組織から上皮細胞を単離する方法では、細胞全体 (whole cell) の観察が可能であることから、より正確な判定が可能と考えた。そこで、結腸上皮細胞を

単離して小核保有細胞を観察する新たな手法を考案し、3種類のモデル化合物、すなわち結腸を標的とする発がん物質である DMH、骨髄小核試験で陽性対照として汎用され、結腸に染色体異常を誘発することを既に確認している mitomycin C (MMC) [46]および結腸を標的としない発がん物質の 1,1-dimethylhydrazine hydrochloride (1,1-DMH) [47]を用いて、小核誘発性を結腸で検出する試験系の基礎的なデータを得た[48]。

第2章では、上記手法を他の機関に技術移転し、結腸を標的とする3種類の遺伝毒性物質 DMH、MMC および *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) [49]を用いた本試験法のバリデーションを実施した。国内5機関で試験を実施した結果、いずれの機関でも3化合物ともに再現性のある陽性の結果が得られ、本小核試験法が結腸を標的とする遺伝毒性物質の検出に有効な手法であることを検証した[50]。

第3章では、マウスで開発した結腸小核試験の手法を、ラットの腺胃および結腸を用いる小核試験系へ発展させた。ラットは一般毒性試験をはじめ、種々の安全性試験において用いられている動物種であり、ラットへの展開ができれば、毒性試験と同一動物を用いて複数のエンドポイントを同時に評価可能となり、総合的なリスク解析が可能となる。さらに、同一動物を用いた試験の実施により、実験動物数を減らすことができ、動物福祉にも貢献できることから、ラットでの消化管小核試験系の確立は重要と考えた。胃は、経口摂取された物質が直接接触する部位であることから、分解が早く骨髄に到達し難い物質、体内に吸収されにくい物質、あるいは食品のように混合物であり骨髄での暴露証明が難しい物質の評価に有用と考えられる。そこで、前章までに開発したマウス結腸の単離細胞採取法を応用し、新たにラット腺胃を用いる小核試験法を開発した。げっ歯類の胃は前胃と腺胃からなるが、扁平上皮細胞で構成される前胃に対し、腺胃は、上皮細胞が腺状構造をなす胃腺からなり、形態学的にもヒトの胃に類似していることから腺胃を評価対象とした。胃を標的とする発がん物質 MNU および MNNG を用い、単回経口投与によりラット腺胃において小核頻度の増加を検出できることを確認した。また、大腸を標的とする発がん物質 DMH の投与により、ラット結腸においても小核誘発性を検出できることを確認した[51]。

第4章では、開発したラット結腸小核試験を応用し、大腸発がんのイニシエーション段階において腸内細菌の及ぼす影響について検討した。ヒトの腸内には多種多様な細菌が存在しており、菌との共生は宿主の生理学的な恒常性維持に重要である。しかし、近年、腸内細菌が大腸がんを含む種々の消化管疾患に関わっていることも明らかにされつつある[52-54]。通常、腸内菌叢を持つラットは、DMHによる大腸がんの発生率や悪性度、あるいは前がん病変である Aberrant Crypt Foci (ACF) の異型度が無菌ラットに比べて高いとの報告がある[54-58]。これは、腸内細菌が大腸発がん過程において、発がんや前がん病変の促進にかかわっていることを示している。しかし、ACF 形成に先立って腸内細菌が宿主の結腸において DNA 損傷や染色体異

常等を持った細胞の産生に影響を与えるか否かについては明らかではない。そこで、無菌ラットおよび無菌ラットに通常ラットの腸内細菌を定着させたラット（通常化ラット）にDMHを単回投与し、結腸におけるDNA損傷および小核誘発性を調べた。同時に、アポトーシスならびに細胞増殖活性を測定し、腸内細菌叢の遺伝毒性に及ぼす影響を評価した[59]。

これらの研究により、結腸や胃における細胞遺伝学的損傷を検出、評価可能な試験系が確立したことになり、消化管が標的となる発がん性の機序解明に重要な役割を果たせるものと考えられる。以下の章においてそれぞれの試験法を詳細に紹介するとともに、結果の評価、解釈について考察し、消化管小核試験の有用性について述べる。

第1章

マウス結腸上皮細胞を用いる小核試験の開発

本章は以下の論文および未発表データに基づいています。

大山ワカ子、徳光崇.: マウス腸上皮細胞を用いる小核試験法. *Environ. Mut. Res. Commun.*, **17**, 265-269 (1996).

1-1 はじめに

結腸は、ヒトにおいてがんの罹患率や死亡率の高い部位であり[19, 20]、結腸における遺伝毒性物質の検出や遺伝毒性リスクの評価は重要である。結腸において小核誘発性を検出する試験としては、従来、結腸の組織標本を用いた手法が主流であり [39-43]、これらは小核を含む核異常 [pyknotic nuclei, fragmented (karyorrhectic) nuclei, micronuclei] を検出する試験であった。発がん物質投与 24 時間後までにピークとなる核異常は、標的臓器における発がん性と相関する指標であるが、pyknotic nuclei と karyorrhectic nuclei は、細胞分裂後に生じる micronuclei (小核) とは異なり、アポトーシスの一過程であることが後に報告され、遺伝毒性とは無関係とされた[60]。組織標本の場合は細胞の 1 断面を観察するため、必ずしも正確な判定ができるとは限らない。それに対し、組織から上皮細胞を単離して観察する方法では、細胞全体 (whole cell) の観察が可能であることから、より正確な判定に適している。そこで、単離細胞を用いた小核試験を開発することとした。結腸上皮細胞の単離法としては、粘膜面を物理的に剥がす (スクレープ) 方法や腸管を細切する方法、あるいはキレート剤や酵素処理による方法等がある[61-64]が、いずれも研究的志向の強いものであり、化学物質の安全性を評価するための試験法としては、実用化、標準化には至っていない。物理的手法だけでは多くの細胞をバラバラにするのは難しく、酵素処理の場合は細胞膜を傷つけやすいというデメリットがあるため、キレート剤を用いることにした。これまでに、徳光が開発したキレート剤 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) によるマウス腸上皮細胞単離法[65]を用いて、大腸を標的とする発がん物質 MNNG および DMH、ならびに骨髄小核試験の陽性対照として汎用される MMC の投与により、マウス結腸で染色体異常を検出できることを日本環境変異原学会にて報告した[46, 66, 67]。染色体の観察は細胞分裂中期に限られることから、適切な検出時間の見極めが難しく、また観察には熟練を要する。一方、小核は染色体異常に比べ検出可能時間が長く、技術的に観察が容易である。そこで、この手法を改変し、マウス結腸で小核を観察する小核試験法を開発した。小核は、被験物質曝露後に分裂した細胞に生じることから、小核誘発性の検出には、適切なサンプリング時間を設定することが重要である。結腸では、クリプト底部にある分裂増殖帯で分裂した上皮細胞がエスカレーター式に管腔側に押し上げられ、やがて管腔側から剥離する (Fig. 2)。げっ歯類では、結腸上皮細胞の turnover は 3-4 日と報告されている[68, 69]。

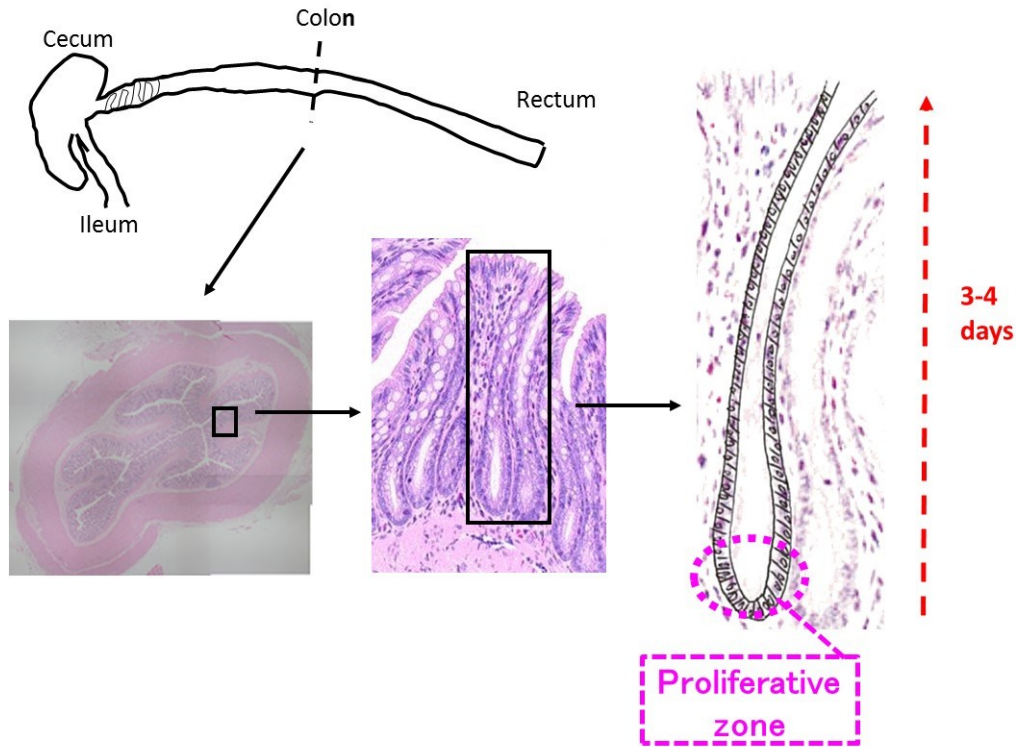


Fig. 2. Structure and cell kinetics of the colon.

また、Wargovich ら[40]は、大腸を標的とする発がん物質である DMH をマウスに単回投与したとき、結腸では投与後一旦細胞分裂が抑制され、投与 96 時間後までに回復することを報告している。従って、被験物質の単回投与 72-96 時間後に結腸を採取し、単離した上皮細胞を観察すれば小核誘発が検出できると考えた。本章では、実験 1 において、結腸に染色体異常を誘発することを既に確認している DMH あるいは MMC をマウスに単回投与し、投与 72 および 96 時間後に結腸での小核頻度の増加を検出できるか否かを検討した。次に、実験 2 において、DMH による結腸小核頻度の経時変化および用量依存性の確認を行うとともに、末梢血小核頻度も同時に調べ、骨髄への影響を評価した。また、DMH の構造異性体 (Fig. 3) で、結腸を標的としない発がん物質 1,1-DMH を用いて同様の解析を行い、本試験法の特異性 (結腸における発がん性が陰性の物質を陰性と判定すること) について検討した。

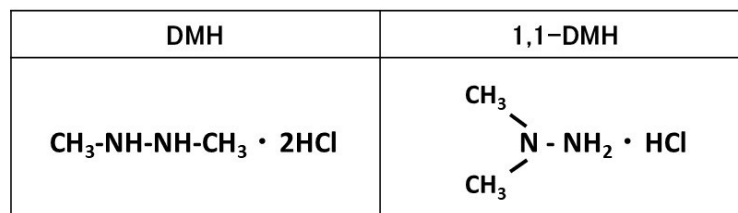


Fig. 3. Chemical formulae of DMH and 1,1-DMH

1-2 実験方法

1-2-1 使用動物

Slc:CD1(ICR)マウス（日本エスエルシー株）、雄、8週齢（5-6匹/群）を用いた。飼料は基礎飼料であるMF（オリエンタル酵母株製）、飲料水は水道水を用い、それぞれ自由摂取させた。実験は、ヤクルト本社中央研究所 動物実験委員会の承認を得て行った。

1-2-2 化合物および動物への投与

1-2-2-1 実験 1

DMH [306-37-6]は東京化成工業株製を用いた。1 mM EDTA に溶解した後、NaOH で pH 6.5 に調整し、所定の濃度まで溶媒で段階希釈した。0（溶媒）、10、20、30、40mg/10mL/kg body weight（以下、body weight は省略）の用量で腹腔内に1回投与し、投与72および96時間後に結腸を採取した。DMHは2塩酸塩を使用しており、40 mg/kg はフリー体としては約20 mg/kg に相当する。MMC [50-07-7]は協和発酵株製（マイトマイシン協和S、2 mg 力価/バイアル）を用いた。添付文書に従い、0.4 mg/mL の濃度に局方注射用蒸留水で溶解した後、生理食塩液で所定の濃度まで段階希釈した。0（溶媒）、0.5、1、2、4 mg/10 mL/kg の用量で腹腔内に1回投与し、投与72時間後に結腸を採取した。いずれの物質も調製後速やかに投与した。

1-2-2-2 実験 2

DMHは1-2-2-1項で示した方法で溶解し、0（溶媒）、10、20、30 mg/10mL/kg の用量で腹腔内に1回投与した。結腸は投与24、48、72、96、120時間後に、末梢血は0（投与直前）、24、48、72、96時間後に尾静脈から約10 μ L採取した。

結腸を標的としない発がん物質1,1-DMH[593-82-8]（東京化成工業株製）は、生理食塩液に溶解し、0（溶媒）、25、50、100 mg/10mL/kg の用量で腹腔内に1回投与した。結腸は投与24、48、72および96時間後に、末梢血は0（投与直前）、24、48、72時間後に採取した。マウス腹腔内投与のLD₅₀が125 mg/kgとの報告があること[47]から、それより低い100 mg/kgを最高用量とした。

1-2-3 結腸上皮細胞の単離細胞を用いた小核標本作製と観察

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、結腸下部を摘出した。内容物をリン酸緩衝液（PBS）で除去した後、腸管を裏返してガラス棒（直径4-5 mm）に医療用接着剤で固定した（Fig. 4）。1mM EDTA/マグネシウム・カルシウム不含PBS溶液を入れた試験管の中に裏返した腸管を浸し、30°C、15分静置した後、3分間ガラス棒を振動させ、クリプトを採取した。この段階ではクリプトの形を保持しているものが多いため、さらにピペッティングによりクリプトを解離した。約170 g（1000 rpm）で5分間遠

心後、細胞を集め、2-3 mL の PBS に懸濁し、ピペッティング後、氷冷した固定液（メタノールに酢酸を 0.5% の割合で混合した液）で 20 分以上固定した。固定液を 2 度交換し、少量の新しい固定液に細胞を再懸濁し、スライドグラスに 2-3 滴滴下し、air dry にて標本作製した。標本は観察まで室温で保存した。

観察時に acridine orange (AO, Calbiochem-Novabiochem Co., San Diego, CA, USA) (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を標本上に 1-2 滴滴下し、カバーグラスをかけ、蛍光顕微鏡（600 倍）を用い、IB 励起（490 nm）下で結腸上皮細胞を観察した。標本はすべて暗号化し、処理条件が分からない状態で観察した。マウス 1 個体当たり約 2000 個（実験 1）または 1000 個（実験 2）の細胞を観察し、小核保有細胞の頻度を算定した。

観察対象細胞は、①細胞質を保持しており、②楕円形から長方形で、③主核の核膜が明瞭であるもの、また、④細胞が重なっていないものとした。小核の判定基準は、①主核と同じ黄色い蛍光を発している、②直径が主核の 1/2 以下である、③主核と接しているものやピンホールほど極小のものは小核と数えないこととした。

1-2-4 「クリプト標本」の作製と観察

小核標本作製時に採取したクリプトの一部を 45% 酢酸で 30 分固定し（Fig. 4）、ゆるく遠心してクリプトを集めた。1% アセトオルセインを少量加えて染色し、スライドグラス上に 1-2 滴滴下した。水溶性包埋剤を加えてカバーグラスを載せ、軽く押しつぶして標本とした（以下、クリプト標本と称す）。光学顕微鏡（400 倍）にて 1 個体当たり約 100 個のクリプトについて、Fig. 5 の右図に示すように、分裂中期～終期像を観察し、クリプト当たりの分裂細胞数を算定することにより、小核標本作製時の結腸上皮細胞の分裂活動の状態の指標とした。

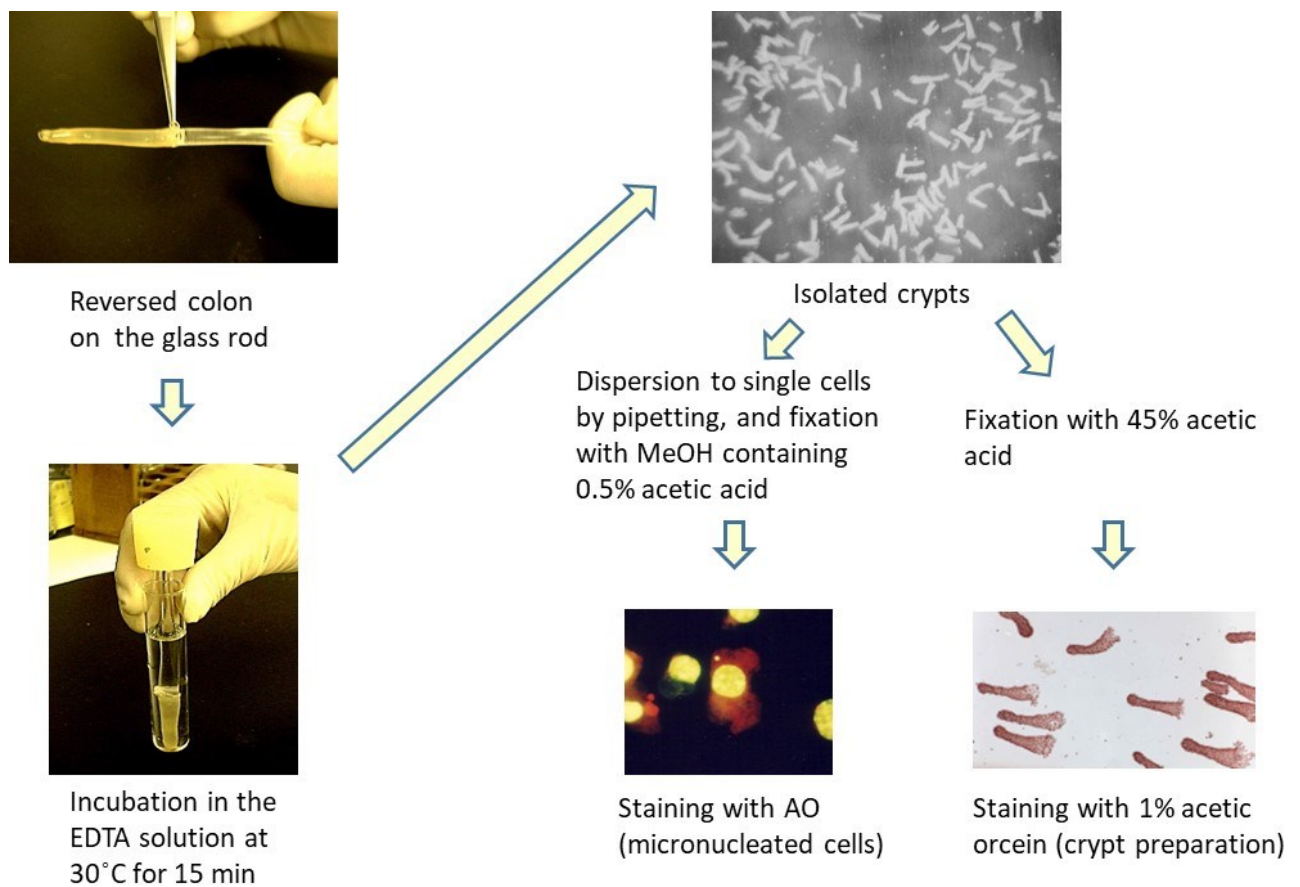


Fig. 4. Preparation for the analysis of micronucleated cells and mitotic cells of the colon.

1-2-5 末梢血小核標本の作製と観察

林らの方法[70]に従い、AO を塗布したスライドガラス上に採取した末梢血の一部を滴下し、カバーガラスをかけて標本とした。標本はすべて暗号化し、処理条件が分からない状態で観察した。蛍光顕微鏡（600 倍）を用い、IB 励起（490 nm）下にて、マウス 1 個体当たり約 1000 個の幼若赤血球を観察し、小核を保有する幼若赤血球の頻度を算定した。

1-2-6 統計検定

溶媒対照群（末梢血の場合は 0 時間）と被験物質投与群の間の有意性については、*F*-test により分散分析を行い、等分散の場合は Student's *t*-test、不等分散の場合は Aspin-Welch の検定を行った（Excel 2013）。

1-3 実験結果

1-3-1 実験 1

マウス結腸上皮細胞の小核保有細胞の写真を Fig. 5 に、クリプト標本を Fig. 6 に示す。

DMH 投与 72 および 96 時間後共に、20 および 30 mg/kg 群の小核頻度は溶媒対照群に比べて有意に増加し、用量依存性が認められた (Fig. 7a, b)。40 mg/kg 群では、96 時間後の値は 30 mg/kg 群に比べて低値であった。クリプト標本の観察から、投与 72 時間後の 40 mg/kg 群におけるクリプト当たりの平均分裂細胞数は溶媒対照群に比べて有意に低く、細胞分裂の抑制が認められた。96 時間後には分裂細胞数の回復がみられ、それに伴って小核頻度も 72 時間後に比べて増加し、溶媒対照群に比べ有意に高い値を示した。

MMC 投与 72 時間後において、用量依存的な小核頻度の増加が認められ、4 mg/kg 群では溶媒対照群に比べて有意に増加した (Fig. 8)。クリプト標本の観察から、分裂細胞数はいずれの用量群においても溶媒対照群に比べて有意な低下は認められなかった。

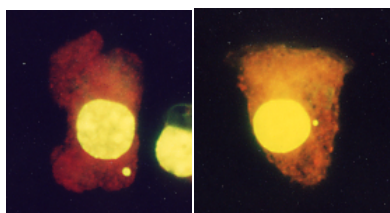


Fig. 5. Micronucleated cells in the colon of mice.

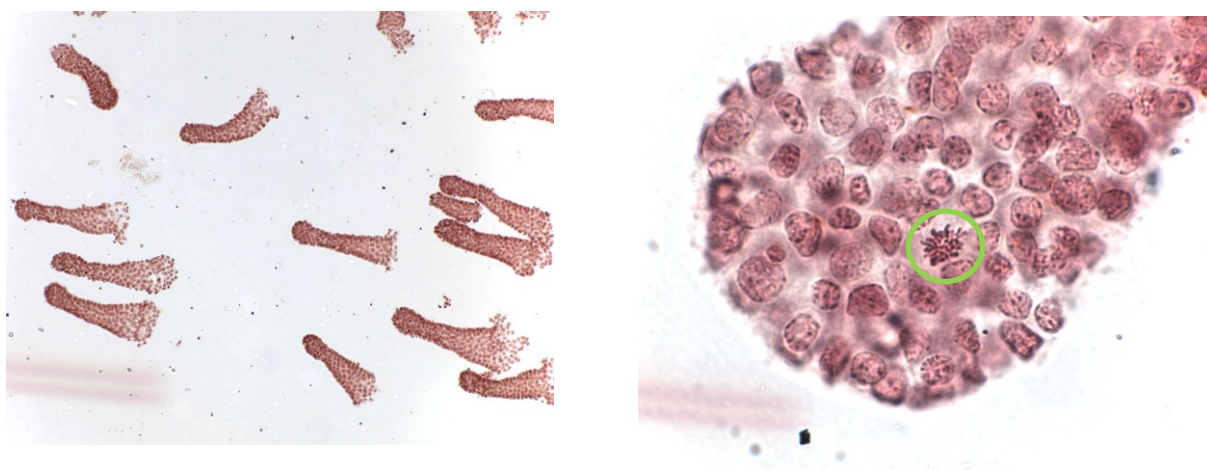


Fig. 6. Crypt preparations. Magnification; 100× (left), 1000× (right), mitotic cells (circle).

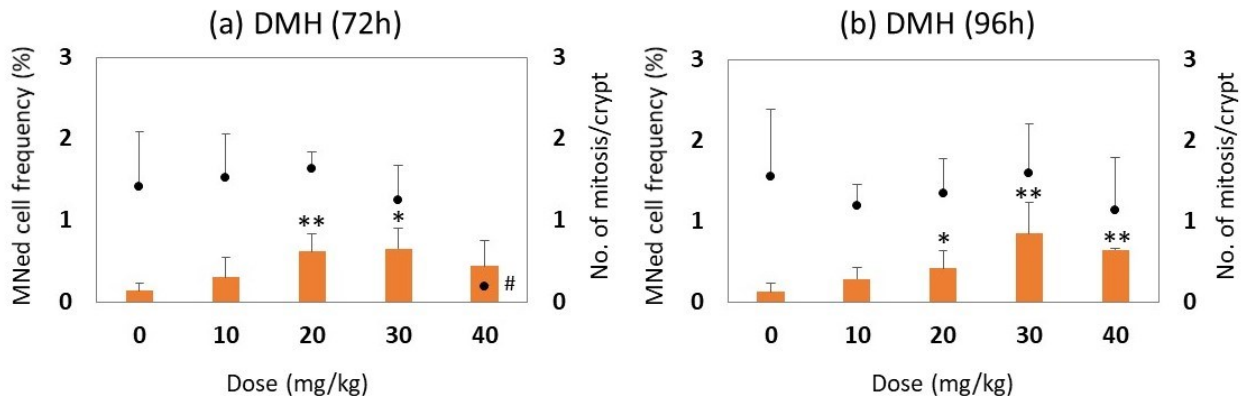


Fig. 7. Dose-responses in micronucleated (MNed) cell frequencies (■) and number of mitotic cells per crypt (●) in the colon of mice administered DMH after 72 (a) and 96 hours (b). Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$ (Student's t -test) as compared to the control.

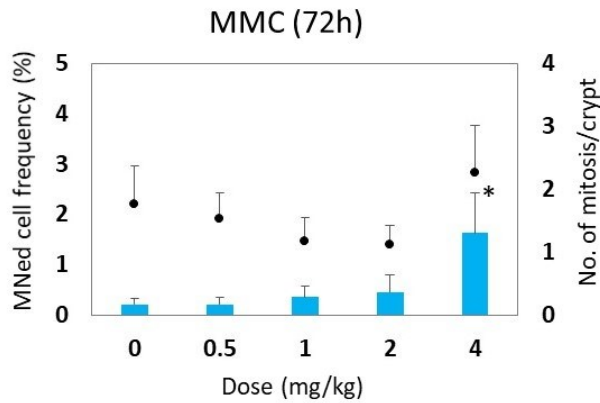


Fig. 8. Dose-responses in MNed cell frequencies (■) and number of mitotic cells per crypt (●) in the colon of mice administered MMC after 72 hours. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance: * $p < 0.05$ (Student's t -test) as compared to the control.

1-3-2 実験 2

DMH および 1,1-DMH 投与による結腸小核頻度、クリプト当たりの分裂細胞数、および末梢血小核頻度を Fig. 9a-f に示す。

DMH の 20 mg/kg 群および 30 mg/kg 群では、それぞれ 72 および 96 時間後に結腸小核頻度がピークとなり、その後溶媒対照レベルに向かって低下した (Fig. 9a)。クリプト当たりの分裂細胞数は、両用量群とも投与 24 時間後には溶媒対照群に比べて有意に低く、細胞分裂の抑制が認められた (Fig. 9b)。その後徐々に分裂細胞数は増加したが、48 あるいは 72 時間後まで溶媒対照群に比べ低値を示した。30 mg/kg 群では、分裂細胞数は 96 時間後に溶媒対照群に比べて有意に高くなり、その後溶媒対照レベルに向かって低下した。DMH 投与による末梢血小核頻度の増加は認められなかった (Fig. 9c)。

1,1-DMH 投与群では、いずれの用量および時間においても結腸の小核頻度の増加は認められなかった (Fig. 9d)。クリプト当たりの分裂細胞数についても溶媒対照群と比べて有意な低下はみられず、細胞分裂の抑制は認められなかった (Fig. 9e)。末梢血小核頻度は、投与 24 時間後の 100 mg/kg 群で $0.31 \pm 0.10\%$ を示し、投与前 (0 時間) の値 ($0.14 \pm 0.09\%$) に比べ統計学的には有意な差となったが、100 mg/kg 群の値は試験実施施設の背景データ (0.00-0.31%) の範囲内であることから、陰性と判断された (Fig. 9f)。

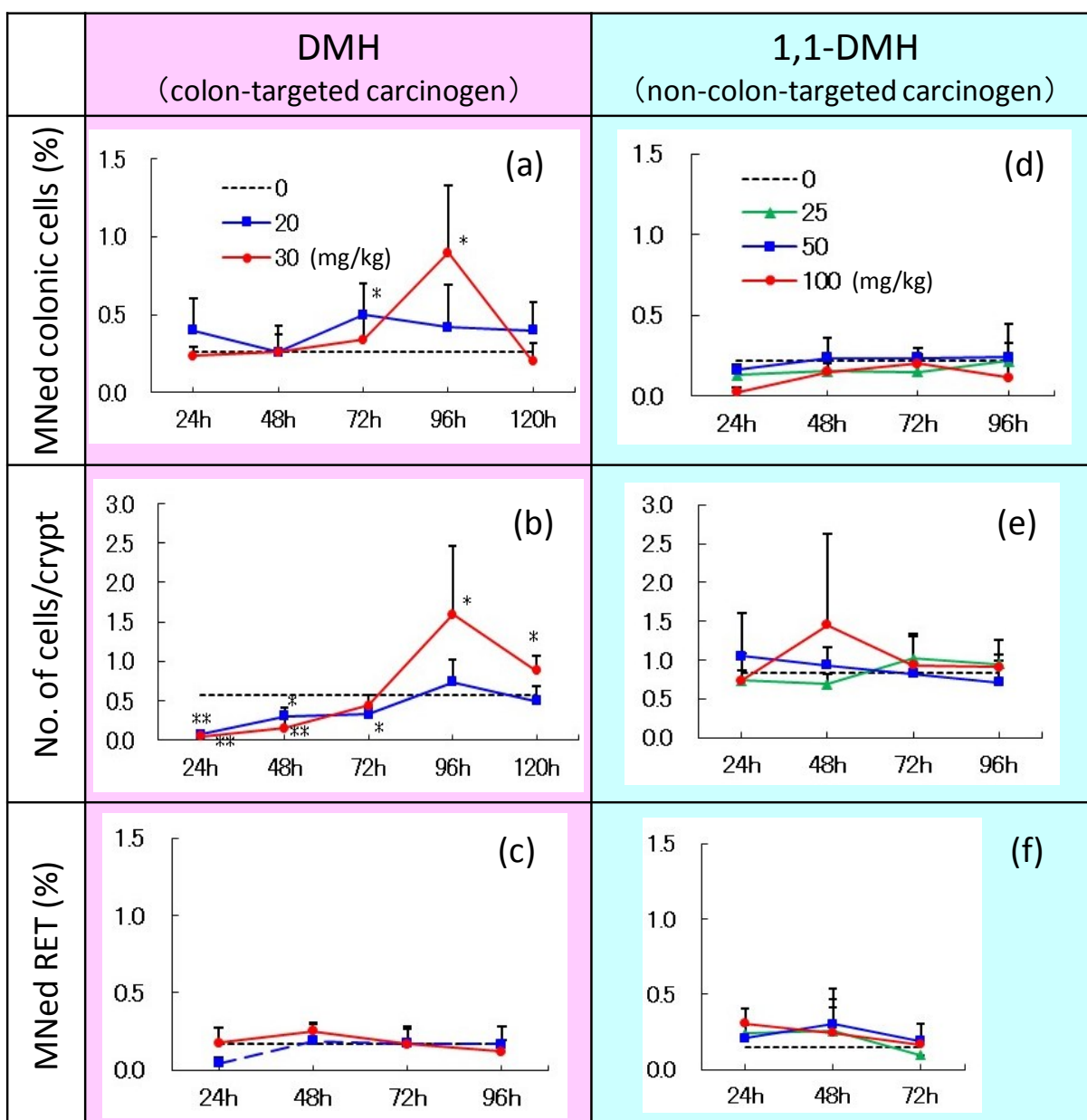


Fig. 9. Results of micronucleus tests with DMH and 1,1-DMH. Micronucleated cell frequencies (%) in the colon; (a) and (d), number of mitotic cells per crypt; (b) and (e), micronucleated reticulocyte frequencies; (c) and (f). Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance: * $p < 0.05$ (Student's t -test) as compared to the control.

1-4 考察

小核は染色体異常を有する細胞が分裂する際に形成されることから、小核観察は被験物質に曝露された細胞が分裂した後に観察する必要がある。実際、骨髄を用いる小核試験では細胞分裂後間もない幼若な赤血球を観察対象としている。結腸上皮細胞の場合、クリプト底部にある分裂増殖帯で分裂した細胞がエスカレーター式に基底部から順次管腔側に押し上げられ、やがて管腔側から剥離する。げっ歯類では、分裂から剥離まで 72-96 時間と報告されている[68, 69]。従って、被験物質の単回投与 72-96 時間後に結腸を採取し、単離した上皮細胞を観察すれば分裂後間もない細胞集団における小核誘発が検出できると考えた。そこで、結腸を標的とする発がん物質である DMH および小核試験の陽性対照物質としても使われる既知遺伝毒性物質である MMC をマウス腹腔内に単回投与し、前者は 72 および 96 時間後に、後者は 72 時間後に結腸上皮細胞を観察した結果、小核頻度の用量依存的増加が確認され、これらの物質の小核誘発性を結腸で検出できることが確認された。

DMH 40 mg/kg 群では、30 mg/kg 群に比べ小核頻度が低く、最高用量群において小核頻度の頭打ちが認められた。クリプト標本による分裂細胞数の観察結果から、40 mg/kg 群では投与 72 時間後に分裂細胞数の有意な低下が認められており、細胞分裂が抑制されていたことがわかる。投与 96 時間後には分裂細胞数が対照群レベルまで近づき、小核頻度も増加していることから、最高用量群の小核頻度の頭打ちは、細胞分裂抑制による小核誘発の遅延によるものと考えられ、標本作製時期検討の有用性が示唆された。小核標本と同時に作製するクリプト標本は、細胞の増殖抑制の有無を調べる有用な手段といえる。

実験 2 では、至適標本作製時期検討のため、DMH を用いて投与 24-120 時間後に結腸小核頻度の経時変化を調べた結果、20 mg/kg では投与 72 時間後に、また、30 mg/kg 群では 96 時間後に小核頻度のピークが認められ、実験 1 の結果が再現された。クリプト標本の観察結果から、投与 48 時間前後まで細胞分裂抑制が認められており、結腸での小核誘発性の検出は被験物質投与 72-96 時間後が適していることが明らかとなった。一方、同時に実施した末梢血小核試験の結果は陰性であった。DMH をマウスに投与した時の骨髄での小核誘発性については、マウスの系統や投与経路・投与回数により、陽性および陰性の結果が報告されている[71]ことから、骨髄小核試験では検出しにくい物質といえる。本研究において、骨髄小核試験では陰性となる条件下で結腸で陽性として検出できたことは、DMH の臓器特異性を示すと共に、本試験法が結腸を標的とする物質の小核誘発性の評価に有用であることを示唆している。

これまでに、DMH あるいは MMC をマウス腹腔内に単回投与した時、結腸に染色体異常が誘発されることを既に確認している [46, 67]。すなわち、DMH 投与後、30 時間で結腸の染色体異常頻度のピークおよび用量依存的増加 (0-30 mg/kg、最高頻度 12%) を認め、MMC 投与では、20 時間後に異常頻度のピークおよび用量依存的増加 (0-2 mg/kg、最高頻度 15%) を認めた。これらの結果は本研究における小核試験の結

果を支持するものといえる。

1,1-DMH は、結腸および骨髄の小核試験においていずれも陰性を示した。本化合物は、げっ歯類において、肝臓や肺にがんを誘発することが報告されているが、結腸では発がんしない[28, 47]。また、結腸での核異常も認められていない[41]。マウス骨髄での小核誘発性については、4回投与により弱い陽性が認められているが、単回あるいは2回投与では陰性の結果が報告されている[72, 73]ことから、本研究の結果はこれらの報告と一致した。これは、開発した結腸小核試験の精度（陰性の物質を陰性と判定する特異性）を示唆する結果である。

げっ歯類の結腸を用いる小核試験については、Goldberg ら[39]が 1983 年に組織標本を用いた方法を報告している。彼らのグループでは、組織標本を用いて、核異常（小核のほかに pyknosis や karyorrhexis を含む）を指標として DMH 等の発がん物質や放射線等による結腸への影響を検出する短期試験法（核異常は被験物質投与 3-6 時間後の比較的早期にピークとなる）を示している[39-42, 61]。その後、彼らは、小核は細胞分裂後に生じる染色体断片の指標であるのに対し、pyknosis や karyorrhexis はアポトーシスの過程で生じるものであることを明らかにした[60]。その後も Vanhauwaert ら[44]、Poul ら[45]が組織標本を用いた結腸小核試験の結果を報告しているが、組織標本を用いる場合は、細胞の断面を観察するため、核異常と小核を区別し難いと思われる。その点、単離細胞を用いる方法は、細胞全体（whole cell）を観察対象とするため、小核保有細胞を適切に判別できるという利点がある。単離細胞を用いる方法は、核異常の観察法として 20 mM EDTA で処理する方法[61]のほか、物理的手法（細切や固定後スクレープ）[62, 63]やトリプシンを用いる方法[64]が報告されている。本研究においても、予め各種酵素を用いた単離法を検討したが、EDTA 処理に比べ、酵素処理の場合は細胞膜が傷つきやすく、観察可能な intact な細胞を得るのが難しかった。そのため、共同研究者の徳光が独自に開発した 1 mM EDTA で結腸を処理して染色体標本を得る方法[65]を改変（処理温度・時間の変更等）し、小核標本とすることで、小核観察に適した細胞を得ることができた。EDTA を用いる方法は Blakey らも報告している[61]が、本研究では EDTA の濃度を 1 mM とし、ピペッティングとの組み合わせで細胞を単離し、低張処理をしないことで細胞膜の破裂・損傷が少ない細胞を得ることができた。また、固定液の酢酸濃度についても、*in vitro* 小核試験の手法[74]を参考に 0.5%とすることにより、細胞の膨潤が少なく、上皮細胞の形態が保持された細胞が得られやすくなった。アクリジンオレンジによる蛍光染色法を用いることにより、染色方法が簡便であるうえ、核と細胞質が明瞭に判別でき、観察しやすくなった。

本研究で開発したマウス結腸の小核試験法は、組織のパラフィン薄切による手法のデメリットを克服した単離細胞を用いる方法であり、小核保有細胞を適切に判別できる新規な試験法である。また、DMH および MMC の小核誘発性を陽性と判定できたこと、さらに、結腸を標的としない発がん物質 1,1-DMH は結腸で陰性を示したことから、本試験法は結腸を標的とする遺伝毒性物質を特異的に検出可能であることが示

唆された。また、最適な小核観察時期は、分裂した細胞が表面に到達する被験物質投与 72-96 時間後であることが示された。以上の結果から、本研究により小核誘発性を結腸で検出する試験系の基礎的なデータを得ることができた。

新規に開発した試験法の妥当性を評価するには、他の施設における再現性確認や、複数の化合物を用いた検出力の確認が必要である。そこで、第 2 章では本試験を複数の機関に技術移転し、バリデーションを行うことにした。

第2章

マウスを用いた結腸小核試験のバリデーション

本章は以下の論文に基づいています。

Ohyama, W., Gonda M., Miyajima, H., Kondo, K., Noguchi, T., Yoshida, J., Hatakeyama, S., Watabe, E., Ueno, Y., Hayashi, M., Tokumitsu, T.: Collaborative validation study of the in vivo micronucleus test using mouse colonic epithelial cells. *Mutat. Res.*, **518**, 39-45 (2002).

2-1 はじめに

新規に開発した試験法の妥当性については、複数の化合物を用いて検出力を確認するとともに、複数の機関で施設内および施設間で結果を再現できることを確認する必要がある。新規に開発したマウス結腸の小核試験について、国内5機関（株式会社ヤクルト本社、塩野義製薬株式会社、日本バイオアッセイ研究センター、科研製薬株式会社、日清キョーリン製薬株式会社（現 杏林製薬株式会社））でバリデーションを実施した。モデル化合物として既知遺伝毒性物質の DMH、MMC、および MNU の3化合物を用いて検証した。

2-2 実験方法

2-2-1 使用動物

雄性 CD1(ICR)マウスを、日本チャールスリバー(株)、日本エスエルシー(株)、あるいは日本クレア(株)から入手し、1週間以上馴化した後、8-10週齢で用いた。飼料および水は自由摂取させ、床敷を敷いたケージに5匹以下/ケージで飼育した。馴化期間および実験期間中の温度、湿度は一定とし、照明の明暗は12時間サイクルとした。動物は1群3匹以上とし、対照群と被験物質投与群にランダムに群分けした。全ての実験は、各機関における動物実験委員会の承認を得て行った。

2-2-2 化合物

DMH [306-37-6] (東京化成工業(株)) は、1 mM EDTA に溶解した後、NaOH で pH 6.5 に調整した。MNU [684-93-5] (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) は、生理食塩液に溶解したのち、所定の濃度まで段階希釈した。MMC [50-07-7] (Mitomycin Kyowa S, 2 mg 力価; 協和発酵工業(株)製) は、添付文書に従い、1バイアルを5 mL の注射用水に溶解した後、生理食塩液で所定の濃度まで段階希釈した。いずれの溶液も調製後速やかにマウスに投与した。

2-2-3 動物への投与

DMH は 30 mg/10 mL/kg の用量でマウス腹腔内に単回投与した。DMH は 2 塩酸塩を使用しており、30 mg/kg はフリー体としては約 15 mg/kg に相当する。溶媒対照群には 1 mM EDTA を 10 mL/kg の容量で腹腔内投与した。MNU は 66.7 mg/10 mL/kg、MMC は 4 mg/10 mL/kg の用量でマウス腹腔内に単回投与、溶媒対照群には生理食塩液を同様に投与した。96 時間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、結腸を摘出した。1 機関では、MMC 投与 48, 72, および 96 時間後に小核頻度を調べた。また、用量依存性の検討を DMH (0-30 mg/kg) については 1 機関で、MNU (0-66.7 mg/kg) および MMC (0-4 mg/kg) については 2 機関で実施した。溶媒対照群には 3-7 匹、被験物質投与群には 3-8 匹の動物を用いた。

2-2-4 小核標本作製および観察

結腸（直腸の上、4 cm 程度の長さ）を摘出し、リン酸緩衝液（PBS）で内容物を洗い出し、ガラス棒に裏返した。以下、第 1 章で記した方法で小核標本作製し、観察した。1 個体当たり、少なくとも 1000 個以上の細胞を観察し、小核を保有した細胞の頻度を算出した。

2-2-5 統計処理

溶媒対照群と被験物質投与群の間の有意性については、*F*-test により分散分析を行い、等分散の場合は Student's *t*-test、不等分散の場合は Aspin-Welch の検定を行った。用量依存性については、Cochran-Armitage の傾向検定を行った（SAS program Ver.5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）。

2-3 実験結果

2-3-1 モデル化合物を用いた結腸小核誘発の確認

各機関で得られた各物質の投与 96 時間後における結腸小核頻度を Fig. 10a-c に示す。全ての機関において、DMH、MMC、および MNU ともに陽性結果が得られた。各機関における小核頻度は、DMH 投与群で 0.41-0.52%（Fig. 10a）、MMC 投与群で 0.96-1.86%（Fig. 10b）、MNU 投与群で 1.02-1.49%（Fig. 10c）であった。

1 機関で MMC 投与 48-96 時間後の小核頻度の経時変化を調べた結果、48 時間後において溶媒対照群に比べて有意な増加が認められ、72 時間後にさらに増加したが、96 時間後には 72 時間後と同様の値であった（Fig. 11）。

用量依存性を調べた各機関にて、DMH、MMC、および MNU ともに、小核頻度の用量依存的増加が認められた（Fig. 12a-c）。

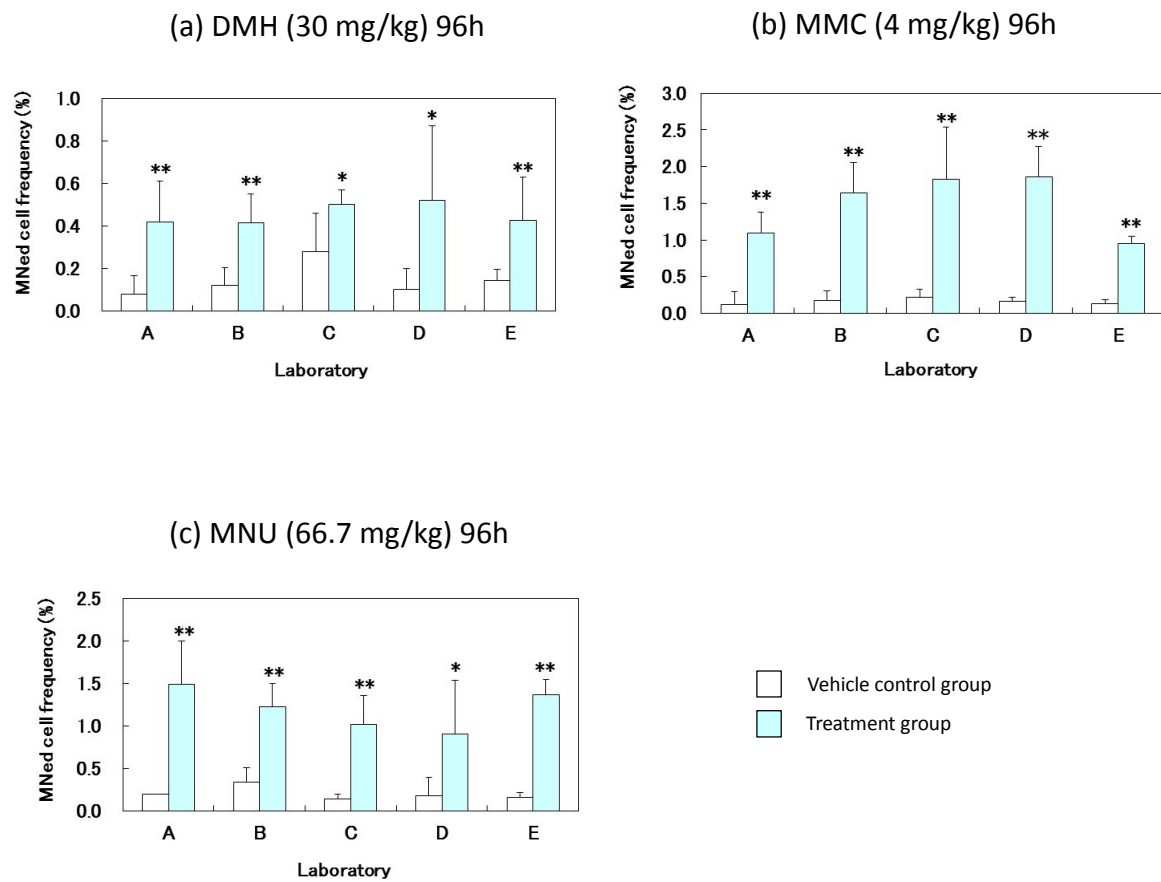


Fig. 10. Results of the inter-laboratory reproducibility on the colon MN test using mice at 96 h after single intraperitoneal injections of DMH (30 mg/kg) (a), MMC (4 mg/kg) (b), and MNU (66.7 mg/kg) (c). Data show the mean \pm SD. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t -test) as compared to the control. The number of animals analyzed is as follows; n in (a), A: 5 (control group) and 6 (treatment group), B: 5 and 7, C: 5 and 5, D: 5 and 5, and E: 7 and 8; n in (b), A: 5 and 5, B: 10 and 5, C: 6 and 4, D: 5 and 5, and E: 6 and 7; n in (c), A: 3 and 4, B: 5 and 5, C: 5 and 5, D: 5 and 5, and E: 6 and 7.

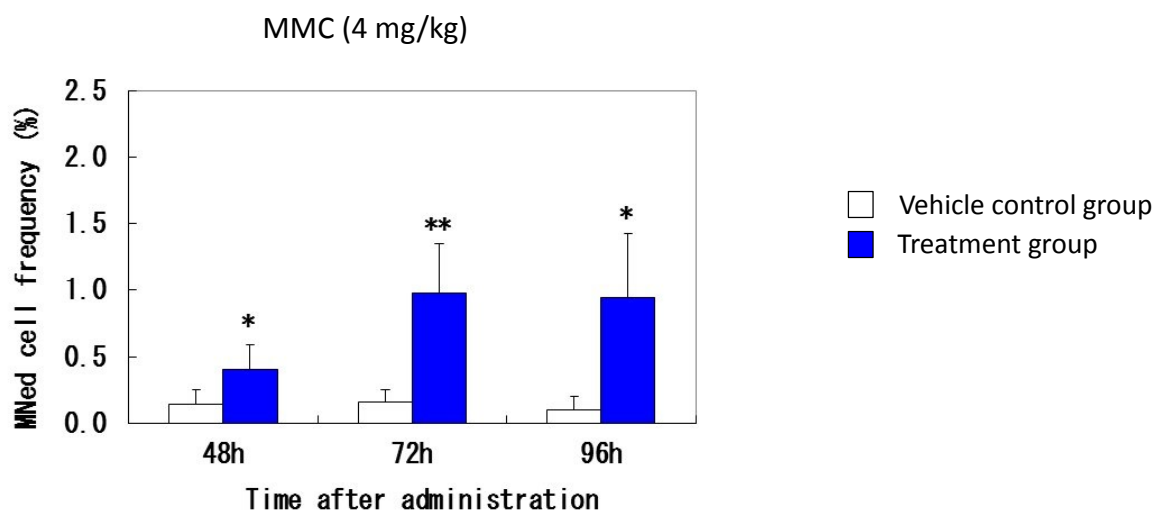


Fig. 11. Time-related responses in MNed cell frequencies after a single dose of MMC (4 mg/kg). Data show the mean \pm SD and were obtained from 5 animals per each point in laboratory B. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's *t*-test) as compared to the control.

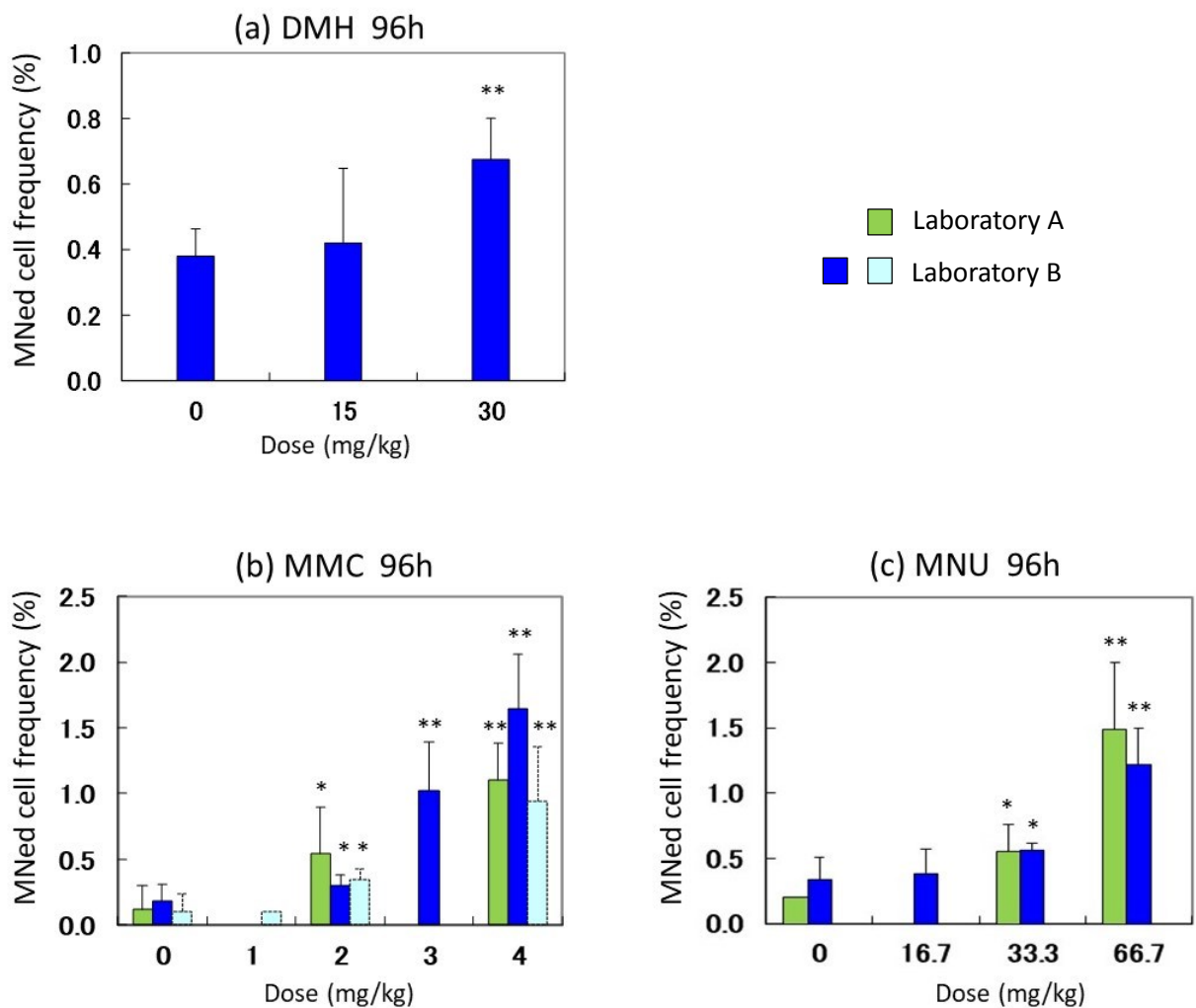


Fig. 12. Dose-related responses in MNed cell frequencies in the colon of mice at 96 h after a single dose of DMH (a), MMC (b), or MNU (c). Data show the mean \pm SD. (a): Each value was obtained from 5 animals in laboratory B. (b): Laboratory A tested at doses of 0, 2, 4 mg/kg, and laboratory B did twice independently at doses of 0, 2, 3, 4 mg/kg and 0, 1, 2 and 4 mg/kg with 5 animals per point. (c): Laboratory A performed the tests at doses of 0, 33.3, and 66.7 mg/kg with 3-4 animals per point and laboratory B did at doses of 0, 16.7, 33.3, and 66.7 mg/kg with 5 animals per point. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's *t*-test) as compared to the control. Dose-dependency was observed in each test ($p < 0.01$ with Cochran-Armitage trend test).

2-3-2 溶媒対照群の小核頻度

各機関における溶媒対照群の小核頻度は、EDTA 投与群では 0.03-0.38%、生理食塩液投与群では、0.10-0.34%であった。全機関の溶媒対照群のデータをまとめ、Table 2 に示す。1000 細胞当たりの小核細胞数は、EDTA 投与群では 1.8 個 (0.18%)、生理食塩液投与群では 1.7 個 (0.17%) であり、溶媒による差は認められなかった。溶媒対照に用いた全個体 (93 匹) の平均値は 1.8 個 (0.18%) であった。

Table 2 Micronucleus frequencies in control animals.

Solvent	Micronucleated cells/1000 cells						No. of animals	Mean (cells)	SD
	0	1	2	3	4	5			
EDTA	6	9	8	5	2	2	32	1.8	1.4
Saline	9	16	23	7	3	3	61	1.7	1.3
Total	15	25	31	12	5	5	93	1.8	1.3

Data from all laboratories were combined, for a total of 93 mice.

2-4 考察

新規に開発したマウス結腸上皮細胞を用いる小核試験について、複数の機関に技術を移転し、複数の物質を用いて検出力を調べると共に、施設内および施設間で結果の再現性を確認した。本研究では、モデル化合物として、第 1 章で結腸に小核を誘発することが確認された DMH および MMC、さらに、大腸を含め複数の臓器にがんを誘発することが知られている直接変異原物質の MNU[49]を用いて評価した。全ての機関で 3 物質ともに陽性として検出でき、施設間再現性が得られた。MMC の経時変化試験において、結腸小核頻度は、48 時間後に比べ 72 および 96 時間後で高い値を示し、前章の結果と同様に、72 あるいは 96 時間後に陽性として検出されることが確認された。また、用量依存性試験において、いずれの化合物も用量依存的な小核頻度の増加を示した。同一施設内で 2 回の用量依存性試験を行い、施設内再現性も確認された。

本研究における溶媒対照群の小核頻度は、いずれの溶媒の場合も類似しており、溶媒による差は認められなかった。最小値 0.0%、最大値 0.5%であり、全個体の平均値 ±標準偏差は $0.18 \pm 0.13\%$ であった。また、対照群の動物の約 90%において、1000 細胞当たりの小核細胞数は 3 未満であった。これらのデータは、筆者が所属する施設 (株ヤクルト本社中央研究所) における 172 匹のマウス (陰性対照群) の背景データ ($0.16 \pm 0.12\%$, unpublished data) と同様であった。施設ごとに溶媒対照群の小核頻度 (平均値) を比較すると、0.08-0.38%の範囲であり、ばらつきがみられた。5 施設のうち 4

施設は本試験法の経験が少ないこと、同じ施設における独立した実験で頻度の高低がみられていることから、ばらつきは実験間の差異および作製した標本の質の良し悪しに起因する可能性が考えられた。被験物質投与群では、施設内および施設間でより大きなばらつきがみられたが、その原因としては、上述の点に加え、マウスの個体差が一因と考えられる。再現性ある結果を得るのに重要な因子は、結腸上皮細胞から質の高い標本作製し、観察の標準化を図ることである。本研究では、経験の少ない施設があつたにもかかわらず、モデル化合物を用いた結腸小核試験の定性的結果はすべての施設で一致していた。この結果から、本試験法は実施が容易であり、経験の少ない施設であっても再現性のある結果が得られる試験法であることが示された。

本研究により、細胞懸濁液を用いる結腸小核試験は、古典的なパラフィン薄切による組織標本を用いる手法に比べ実施が容易であること、また、細胞の切断面ではなく whole cell を観察できるという利点があり、それにより再現性ある結果が得られることが確認された。以上のバリデーション研究により、新規に開発したマウス結腸小核試験法が、結腸を標的とする遺伝毒性物質の検出に有効な手法であることを検証した。

結腸での遺伝毒性評価のみならず、経口摂取した被験物質が直接高濃度で曝露する胃での評価も重要である。また、マウスで開発した試験法を一般毒性試験で汎用されているラットにも適用できれば、遺伝毒性情報に加え、毒性情報も含めた総合的なリスク評価が可能となる。さらに、動物福祉の観点から、一般毒性試験と動物を共有することにより、実験動物数の削減にも貢献できる。そこで、第3章では、ラット腺胃および結腸を用いる小核試験法の開発に取り組むこととした。

第3章

ラット腺胃および結腸を用いる小核試験への展開

本章は以下の論文に基づいています。

Ohyama, W., Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Yasutake, N.: 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**, 141-147 (2013).

3-1 はじめに

ラットは一般毒性試験をはじめ、種々の安全性試験において汎用されている動物種であり、化学物質や食品等の毒性プロファイルはラットで評価されることが多い。そのため、ラットの胃や結腸を用いる小核試験が確立できれば、毒性試験と同一動物を用いて複数のエンドポイントを同時に評価可能となり、総合的なリスク解析が可能となる。さらに、同一動物を用いた試験の実施により、実験動物数を減らすことができ、動物福祉にも貢献できることから、ラットでの消化管小核試験系の確立は重要と考えた。胃は大腸とともにヒトにおいてがんの罹患率ならびに死亡率の高い部位の一つであり[19, 20]、特に胃は、経口投与された被験物質が高濃度に直接接触する臓器である。医薬品の遺伝毒性試験ガイドライン ICH S2 (R1)[6]では、*in vitro* 試験で陽性となった場合のフォローアップあるいはオプション 2 を選択した場合には、セカンド *in vivo* 試験の実施が必要であり、その場合の評価対象臓器は、被験物質の作用機作、生体内での代謝あるいは暴露情報に基づいて選択される。経口投与された被験物質あるいはその代謝活性化体が不安定で骨髄に到達し難い場合や、体内に吸収されにくい物質、食品のようにいくつかの物質の混合物で骨髄への曝露を証明し難い物質の場合、胃はセカンド *in vivo* 試験の評価対象臓器として極めて重要と考えられる。また、胃における遺伝毒性評価は、胃を標的とした発がん物質の検出や発がんメカニズムの解析に有用である。胃を評価対象として小核を観察する試験は、Zhurkov ら[62]、Sycheva ら[63]のほか、岡田らと共に報告した手法[75]のみで、標準化された試験は無い。前 2 者は胃を標的とする遺伝毒性物質を用いておらず、陰性結果の報告であるため、胃を標的とする遺伝毒性物質を腺胃で陽性として検出できたことを報告したのは岡田らが初めてである。しかし、岡田らの細胞採取法は、マウス腺胃を切り出して切断面を糸で結び、裏返して中に緩衝液を入れ膨らませて EDTA 処理するという手法で、手技の難しさが課題であった。そこで、前章までにマウスで開発した結腸の単離細胞採取法を応用し、新たにラット腺胃を用いる小核試験法を開発した。げっ歯類の胃は前胃と腺胃からなるが、扁平上皮細胞で構成される前胃に対し、腺胃は上皮細胞が腺状構造をなす胃腺からなる (Fig. 13)。形態学的にヒトの胃に似ているのは腺胃であることから、小核誘発性の評価には腺胃を用いるのが有用であると考えた。

腺胃上皮細胞は胃腺の細胞増殖帯 (腺頸部) で分裂し、その後、胃小窩 (gastric pit) の細胞 (細胞増殖帯より管腔側の細胞)、すなわち、将来の被蓋上皮細胞は管腔側に移動し、げっ歯類では 2-4 日で管腔側に到達し、脱落するといわれている[68]。また、腺体部 (gastric gland) の細胞 (増殖帯より下側の細胞)、例えば壁細胞、副細胞、主細胞は、下方 (基底膜側) に移動するが、それらの細胞の lifespan は、げっ歯類では 2-200 日と報告されている。細胞の turnover は、動物種や系統、週齢等によっても異なると考えられることから、最初に、本研究に用いる 8 週齢の CD(SD)系ラットにおいて、腺胃上皮細胞が分裂後管腔側に到達する期間を核酸アナログ標識により確認す

ることとした。標識は 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を用いた。EdU 標識法は、EdU 分子中のアルキンと蛍光分子 (Alexa Fluor®色素) 中のアジド間の銅触媒共有結合の反応 (クリック反応) により、S 期におけるゲノム DNA 中への EdU の取り込みを検出するもので、サイズの小さいアジド化蛍光色素は、DNA を変性させないマイルドな条件下での効率的な検出を可能にする手法である。

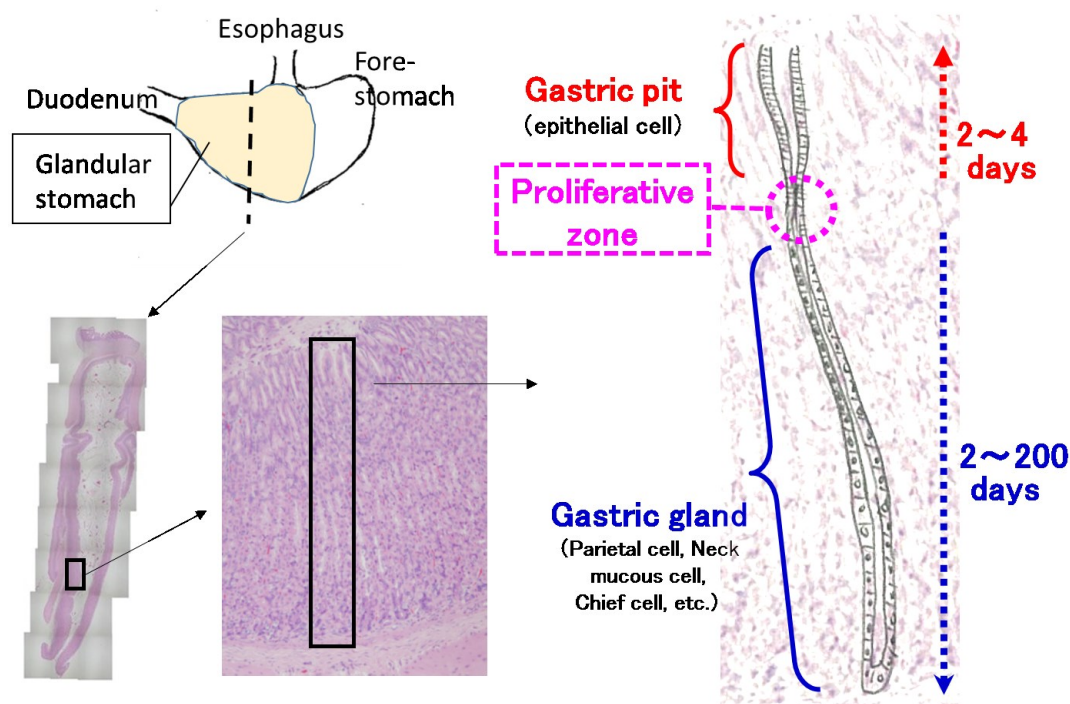


Fig. 13. Structure and cell kinetics of a rodent stomach.

次に、モデル化合物として、胃を標的とする発がん物質の MNU および MNNG を用いて、ラット腺胃における小核誘発性を検証した。MNU はげっ歯類において、胃、腸、神経組織のがんや白血病等を引き起こす直接変異原物質であり [49, 76, 77]、MNNG は経口投与した場合、投与部位の胃にがんを誘発する直接変異原物質として知られている [24]。これらの実験では、骨髄小核試験も同時に行い、腺胃と骨髄の両臓器における反応性を比較した。

また、得られた消化管小核頻度のデータが、分裂を伴わずに生じるアポトーシスではなく、分裂を経て染色体異常が顕在化した小核保有細胞の頻度を反映していることを検証するため、MNU を単回経口投与し、腺胃小核頻度と同時に、同一動物の組織標本を用いて、アポトーシス頻度および細胞増殖活性を経時的に測定した。アポトーシスは TUNEL 法で、細胞増殖活性は Ki-67 免疫染色法で調べ、Ki-67 陽性細胞数が細胞毒性による増殖抑制も反映するか否か、核酸アナログ EdU による標識法と比較す

ることにより考察した。

次に、結腸についても、被験物質の経口投与により、ラットでの小核誘発性を検出できることを確認するため、CD(SD)系ラットに DMH を単回経口投与後、結腸における小核頻度と同時に、アポトーシスおよび細胞増殖活性 (EdU 標識法および Ki-67 免疫染色法) の経時変化も調べ、腺胃および結腸を用いる消化管小核試験の特性を明らかにした。

3-2 実験方法

3-2-1 使用動物

7 週齢の雄性 Crl:CD(SD)ラット[日本チャールス・リバー(株)]を購入し、入荷 1 週間の馴化後、投与に用いた。動物は通常の飼育室で飼育し、固型飼料 F-2 (船橋農場(株)製) および水道水を自由摂取させた。飼育室は $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 30-70% に維持し、照明の明暗は 12 時間サイクルとした。実験は、ヤクルト中央研究所 動物実験委員会の承認を得て行った。

3-2-2 化合物

MNU [684-93-5] (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) は、45% (w/v) 酢酸で安定化されているものを用い、局方注射用蒸留水 (扶桑薬品工業(株)) に 5.5 mg/mL の濃度 (酢酸を含まない濃度) で溶解した。MNNG [70-25-7] (東京化成工業(株)) は 5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) (和光純薬工業(株)) / 局方注射用蒸留水 (扶桑薬品工業(株)) に 10 mg/mL の濃度で溶解した。DMH [306-37-6] (東京化成工業(株)) は 1 mM EDTA に溶解し、NaOH で pH6.5 に調整した。濃度は 8.86 mg/mL (塩酸を含む濃度) とした。各溶液はそれぞれの溶媒で段階希釈し、調製後速やかに動物に投与した。

核酸アナログ (チミジンのヌクレオシド類似体) として、EdU (Click-iT™ EdU Alexa Fluor® Assay Kit, Invitrogen/Life Technologies, Inc., OR, USA) を用いた。EdU は局方注射用蒸留水 (扶桑薬品工業(株)) に 10 mg/mL の濃度で溶解した。

3-2-3 腺胃および結腸上皮細胞の turnover time の解析

増殖帯で分裂した細胞がルーメン側の表面に移動する様子を解析するため、EdU を 4 mg/body の用量でラット腹腔内に単回投与し、24、48、72、および 96 時間後に安楽死させた。各時間の解析に 2 匹の動物を用いた。胃は大彎に沿って 2 つに切り、生理食塩水で内容物を洗い出し、前胃を除去した。結腸も同様に生理食塩水で洗い、3 部位 (結腸上部、中部、下部) を切り出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。腺胃は固定後、噴門側、胃体部、幽門部の 3 部位を切り出した。定法に従い各組織をパラフィン包埋した後、薄切して組織標本とした。Click-iT™ EdU Alexa Fluor® Assay Kit (Invitrogen/Life Technologies, Inc., OR, USA) を用い、添付の指示書に従って、蛍光染色し、蛍光顕微鏡 (IB 励起、490 nm) で観察、写真撮影した。

3-2-4 動物への投与

3-2-4-1 胃発がん物質の投与

最初の実験では、MNU を用いて 55 mg/kg の用量でラットに単回経口投与したとき、腺胃上皮細胞における小核頻度、アポトーシス頻度、および細胞増殖活性の経時変化について各群 3 匹を用いて検討した。対照群 (0 時間) は無処置とした。解剖の 1 時間前に EdU を 4 mg/body の用量で腹腔内に単回投与し、6、18、および 72 時間後に安楽死させた。腺胃の小核標本と同時に、組織標本を作製した。

次に、MNU と MNNG を用いて腺胃と骨髄における小核頻度の用量依存性を検討した。MNU は 13.8、27.5、および 55 mg/kg の用量群を、MNNG は 25、50、および 100 mg/kg の用量群を設定し、経口投与した。対照群にはそれぞれの溶媒を投与した。投与 24-120 時間後まで、24 時間毎に腺胃と骨髄を採取した。MNU と MNNG の最高用量は、それぞれ LD₅₀ の約 1/4 に相当する用量を設定した[78, 79]。

3-2-4-2 結腸発がん物質の投与

DMH を用いて 88.6 mg/kg (フリー体として約 40 mg/kg) の用量でラットに単回経口投与したとき、結腸上皮細胞における小核頻度、アポトーシス頻度、および細胞増殖活性の経時変化について各群 3 匹を用いて検討した。対照群 (0 時間) は無処置とした。解剖の 1 時間前に EdU を 4 mg/body の用量で腹腔内に単回投与し、6、18、24、48、72、および 96 時間後に安楽死させた。結腸の小核標本と同時に、組織標本を作製した。DMH の用量は LD₅₀ の約半分に相当する用量を設定した[80]。

3-2-5 小核標本の作製

3-2-5-1 腺胃および結腸

胃を摘出後、噴門部を残して前胃を除去し、内容物を Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) で洗い流した。直径約 0.5 cm 長さ約 10 cm のガラス棒で片側に直径約 1 cm のガラス球を有し、反対側の先端は噴門部に通しやすいうように尖らせたものを用意した (Fig. 14a)。

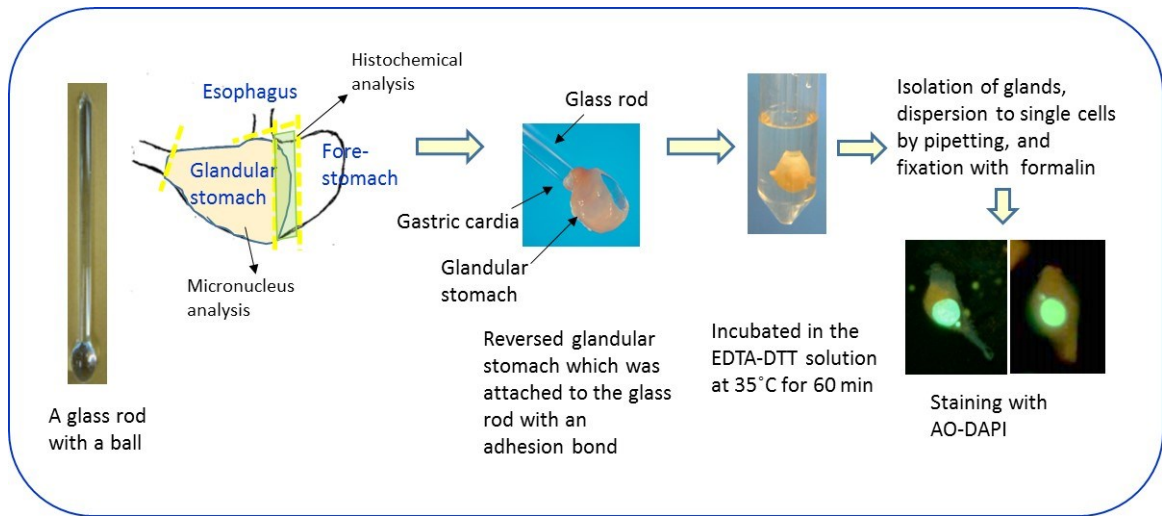
噴門部に通し、ガラス棒の尖った方の先端を通し、そのまま他端の玉まで組織を移動させ、腺胃内腔 (粘膜面) が表になるよう裏返し、数か所医療用接着剤で玉に接着した。2 mM dithiothreitol (DTT) を含む 1 mM EDTA/HBSS (Mg/Ca-free) を 20 mL 程度入れた 50 mL 容チューブに浸漬し、35°C で 60 分加温した。その後、ガラス棒を上下に振動させて上皮細胞を剥離した。組織標本を同時に作製する場合は、前胃を除去する前に、4-5 mm の幅の腺胃が残るように切り出し、前胃をつけたまま 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。

結腸については、第 2 章までに報告している方法を一部改変して小核標本を作製した (Fig. 14b)。以下に概要を示す。結腸を摘出後、内容物を HBSS で洗浄し、直径約

0.7 cm 長さ約 15 cm のガラス棒に裏返し、腸管の端を医療用接着剤で接着した。1 mM EDTA/HBSS (Mg/Ca-free) を入れた 15 mL 容のチューブに浸漬し (腸管全体が浸る程度)、35°C で 30 分加温した。途中 (加温開始 10-15 分後)、ガラス棒を上下に振動させ、細胞を剥離した。加温終了後さらにガラス棒を上下に振動させて上皮細胞を剥離した。組織標本を同時に作製する場合は、結腸中央部約 1 cm を切り出し、10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。剥離した胃線およびクリプトはパスツールピペットを用いてピペッティングし、細胞を単離した。腺胃の細胞懸濁液はメッシュ (150-160 μm 程度) に通し、ゴミや小塊を除去した。腺胃およびクリプトの細胞懸濁液を 170-410 g (1000-1500 rpm) で 5 分間遠心して単離細胞を回収し、少量の冷 HBSS に再懸濁した。10% 中性緩衝ホルマリンを加えて固定後、再度遠心して細胞を回収し、少量の 10% 中性緩衝ホルマリンを加えて懸濁した。細胞懸濁液は観察まで冷蔵保存した。

腺胃は、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AO と 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) の混合液、結腸は 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AO と 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI の混合液を用いて観察時に染色した。標本は全て暗号化し、処理条件が分からない状態で観察した。蛍光顕微鏡 (600 倍) の U 励起 (365 nm) にて、1 個体あたり 2000 個のインタクトな細胞を観察し、小核保有細胞の割合を算定した。インタクトな細胞は、細胞質を保持しており、楕円形から長方形で、主核の核膜が明瞭で断片化していないものとした。小核の判定基準は、主核と同じ黄色い蛍光を発しており、直径が主核の 1/3 以下であるものとした。

(a) Glandular stomach



(b) Colon

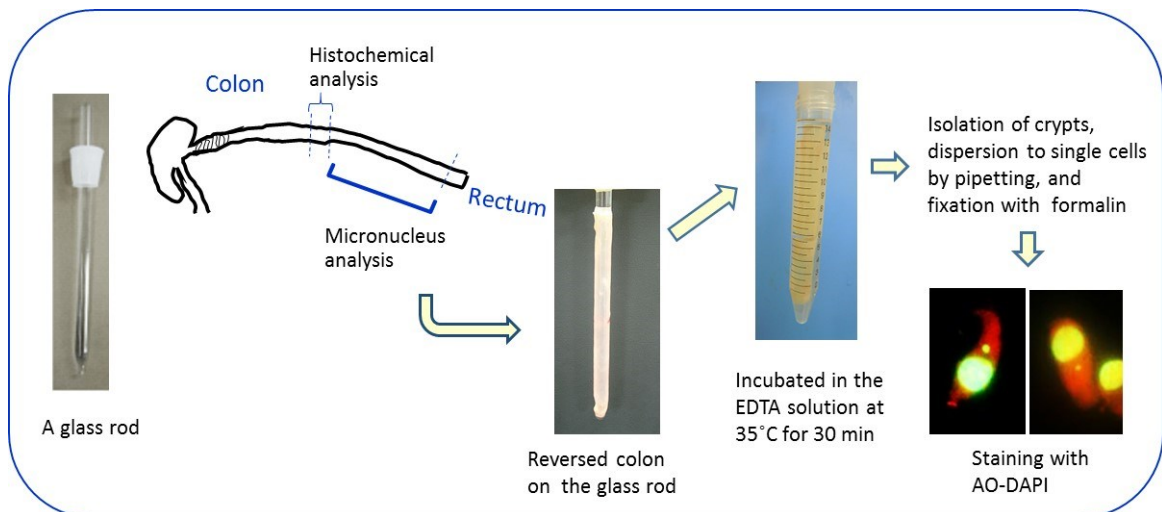


Fig. 14. Preparation for the micronucleus analysis of the glandular stomach (a) and the colon (b).

3-2-5-2 骨髄

右大腿骨を摘出し、両端を切り落とした。林らの方法[81]に従い、塗沫標本を作製し、AO (40 µg/mL) で染色し、標本は全てコード化して処理条件が分からない状態で観察した。総合倍率 600 倍の蛍光顕微鏡下 490 nm の励起光にて、1 個体当たり 2000 個の幼若赤血球 (immature erythrocytes; IME) を観察し、小核の有無を調べた。また、1 個体当たり 400 個以上の全赤血球を観察し、全赤血球に対する幼若赤血球の割合 (%IME) も調べた。

3-2-6 組織標本の作製

腺胃の一部および結腸中央付近の約 1 cm を組織標本に使用した。10%中性緩衝ホルンリンで組織を固定し、パラフィンに包埋、薄切した。これらの切片はアポトーシス頻度および細胞増殖活性 (EdU の取り込みおよび Ki-67 の免疫組織学的染色) の解析に用いた。いずれの解析においても、腺胃および結腸について、1 個体当たりよく広がった 30 個の胃腺あるいはクリプトの細胞を観察し、胃腺当たりあるいはクリプト当たりの陽性細胞数をカウントした。

3-2-6-1 アポトーシス

Apoptotic detection kit (DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System, Promega Corp., WI, USA) を用い、添付の指示書に従って、Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate nick end labeling (TUNEL) 染色を行った。Diaminobenzidine (DAKO/Agilent Technologies Inc., CA, USA) によるクロモゲン染色により、TUNEL 反応を視覚化した。ヘマトキシリンで核染色し、明らかに茶色に染色された核を持つ細胞を陽性細胞としてカウントした。

3-2-6-2 EdU の取り込み

上記「3-2-3」項で述べたように、組織標本を Click-iT™ EdU Alexa Fluor® Assay Kit (Invitrogen/Life Technologies 社) を用い、添付の指示書に従って、蛍光染色し、蛍光顕微鏡 (IB 励起、490 nm) で観察した。鮮やかな緑色に染まった核を持つ細胞を EdU 陽性細胞としてカウントした。

3-2-6-3 Ki-67 免疫染色の解析

組織標本を脱パラフィンして脱水後、antigen retrieval solution (Target Retrieval Solution, DAKO/Agilent Technologies Inc.) に入れ、マイクロウェーブ (出力 500w) で 27 分間処理した。3%過酸化水素水中で 5 分インキュベートし、内因性のペルオキシダーゼを失活させた。その後、1:500 で希釈したマウス抗ラット Ki-67 モノクローナル抗体 (clone MIB-5; DAKO/Agilent Technologies Inc.) で 60 分間インキュベートした。次に、1:200 で希釈したビオチン化ウサギ抗マウス immunoglobulin で 30 分間インキュ

ベートした後、1:300 に希釈した streptavidin/horseradish peroxidase (DAKO/Agilent Technologies Inc.) で 30 分間インキュベートした。Diaminobenzidine (DAKO/Agilent Technologies Inc.) で発色させ、ヘマトキシリンで核染色した。明らかに茶色に染色された核を持つ細胞を Ki-67 陽性細胞としてカウントした。

3-2-7 統計手法

腺胃、結腸および骨髄の小核頻度に関しては、Kastenbaum and Bowman 法[82]により有意性の検討を行った。小核頻度の用量依存性は、Cochran-Armitage の傾向検定で解析した。腺胃および結腸の EdU 標識細胞、Ki-67 陽性細胞および TUNEL 陽性細胞、並びに幼若赤血球比のデータについては、Dunnett テストを用いて有意性を検討した。これらの統計処理は、SAS program Ver.5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて実施した。

3-3 実験結果

3-3-1 腺胃および結腸上皮細胞の turnover time の解析

EdU 標識した腺胃組織標本の蛍光顕微鏡画像を Fig. 15A に示す。標識 24 時間後において、胃体部の EdU 標識細胞は、胃腺の上半分の特定領域に集中しており、この部位は細胞増殖帯と考えられた (Fig. 15Aa)。48 時間後になると、標識細胞は細胞増殖帯から上部 (胃内腔側) および下部 (基底膜側) に移動しており、標識細胞のいくつかは胃内腔表層近くに達していた (Fig. 15Ab)。72 時間後には、標識細胞は広い範囲に広がっており、いくつかは胃腺の先端に認められた (Fig. 15Ac)。96 時間後には、多くの標識細胞が先端に認められた (Fig. 15Ad)。発がん物質の投与実験で組織標本用に用いた前胃との境界近くの腺胃においても、同様の経時変化がみられた (data not shown)。

EdU 標識した結腸組織標本の蛍光顕微鏡画像を Fig. 15B に示す。結腸上部 (上行結腸) において、24 時間後に多くの標識細胞がクリプト底部から中央部に認められた (Fig. 15Ba)。48 時間後には、標識細胞の多くが管腔表層近くで認められ (Fig. 15Bb)、72 時間後以降はクリプト先端で多くの細胞が標識されていた (Fig. 15Bc-d)。同様の経時変化が結腸中央部および下部 (下行結腸) においても認められた (data not shown)。

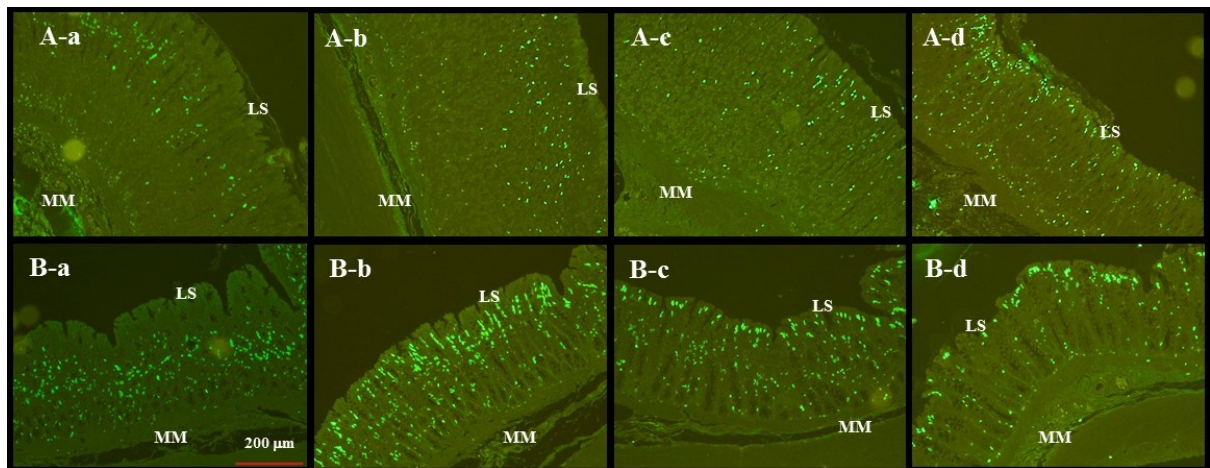


Fig. 15. Fluorescence microscopy images of the glandular stomach (A) and colon (B) tissue section of rats at 24 h (a), 48 h (b), 72 h (c), and 96 h (d) after labeling once with EdU. EdU-labeled cells (light green) reached the luminal surface by 96 h. MM; muscularis mucosae, LS; luminal surface.

3-3-2 小核頻度、アポトーシスおよび細胞増殖活性の経時変化

3-3-2-1 胃発がん物質を用いた実験

MNUを55 mg/kgの用量でラットに投与し、0、6、18、および72時間後の腺胃における小核頻度、TUNEL陽性細胞数、EdU標識細胞数、Ki-67陽性細胞数の経時変化をFig. 16に示す。

対照群(0時間)の小核頻度は0.07%であったのに対し、MNU投与6時間後の腺胃の小核頻度は0.18%であり、統計学的に有意な差はみられなかった。投与18および72時間後の小核頻度は、それぞれ0.47および2.37%であり、対照群に比べ有意な増加が認められた(Fig. 16a)。一方、胃腺当たりのTUNEL陽性細胞数は、対照群で0.02 cells/glandであったのに対し、MNU投与6時間後には0.90 cells/glandを示し、有意な増加が認められた。その後、18および72時間後にはそれぞれ0.33および0.38 cells/glandを示し、ピーク時の約1/3にまで低下した(Fig. 16b)。胃腺当たりのEdU標識細胞は、対照群で1.44 cells/glandであったのに対し、MNU投与6時間後には0.41 cells/glandを示し、有意な減少が認められ、MNU投与群において細胞増殖が抑制されていることが示された(Fig. 16c)。細胞増殖は18時間後には回復し、標識細胞数は1.29 cells/glandを示し、72時間後には2.87 cells/glandと細胞増殖の亢進がみられた。Ki-67陽性細胞数についても同様の経時変化が認められたが、各時間におけるKi-67陽性細胞数はEdU標識細胞を上回っていた(Fig. 16d)。すなわち、MNU投与0、6、18、および72時間後の値は、それぞれ3.02、1.18、1.94、および4.70 cells/glandであ

った。

胃発がん物質の MNNG および MNU を用いた腺胃小核試験と骨髄小核試験の組み合わせ試験の結果を Table 3 に示す。腺胃小核の誘発性については投与 24-120 時間後まで、また、骨髄小核の誘発性については 24-72 時間後まで調べた。

腺胃における小核頻度は、投与 24 時間後から増加し、48-96 時間後に最大に達し、その後低下した。小核頻度の経時的な増加のパターンは、Fig. 16 で認められたパターンと同様であった。最大となる時間は、用量の増加に応じて遅延する傾向があり、低用量から順に、MNU では 48、72、96 時間後、MNNG では 48、48、72 時間後であった。小核頻度の用量依存性はいずれの化合物の処理においても解析した全ての日において観察された ($p < 0.01$, Cochran-Armitage trend test)。

MNU は骨髄小核試験においても陽性を示した。小核保有幼若赤血球の頻度は、解析した全ての時間において、溶媒対照群に比べて有意に増加し、用量依存性が認められた ($p < 0.01$, Cochran-Armitage trend test)。小核頻度の最大値はいずれの用量群においても投与 48 時間後に認められた。幼若赤血球比は解析した全ての時間において、対照群に比べて有意に減少した。MNU とは対照的に、MNNG 投与群では、小核保有幼若赤血球の頻度および幼若赤血球比ともに、投与用量にかかわらず解析した全ての時間において溶媒対照群に比べて有意な差は認められなかった。

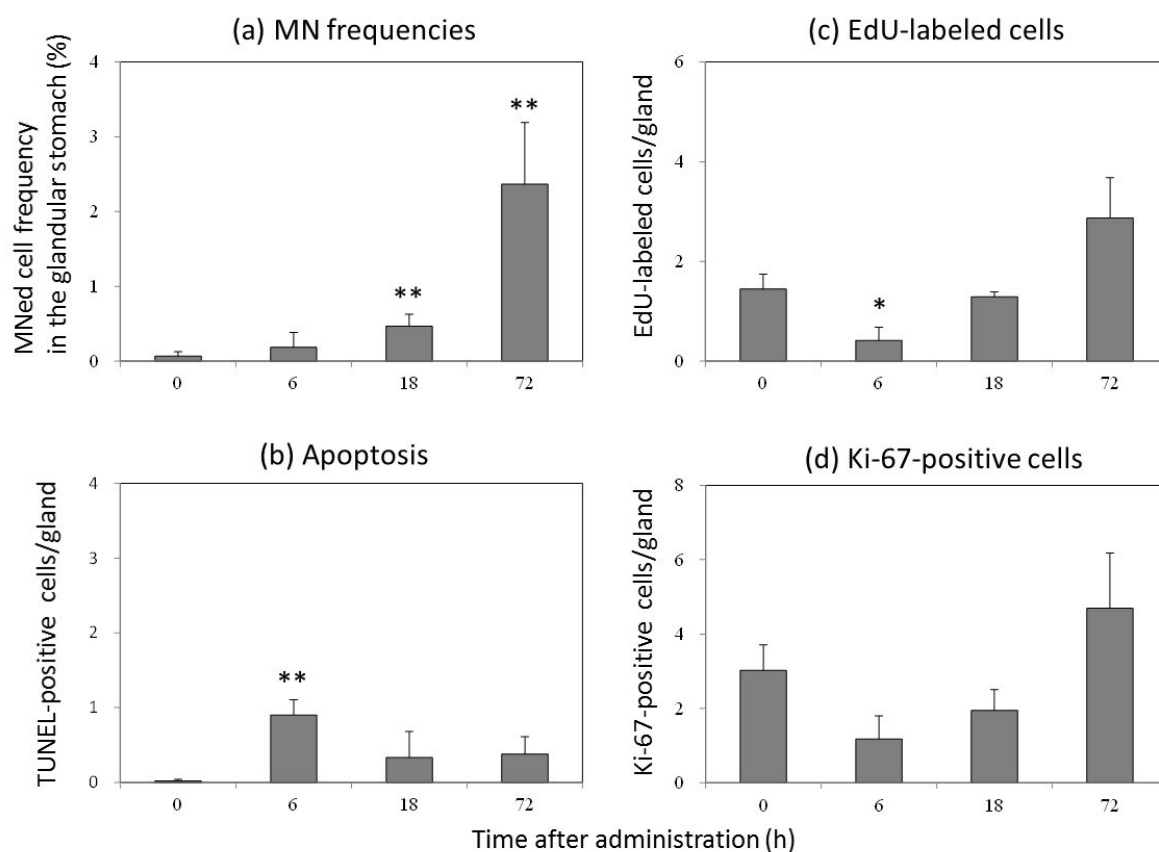


Fig. 16. Time-course of the incidence of MNed cells (a), TUNEL-positive cells (b), EdU-labeled cells (c) and Ki-67-positive cells (d) in the glandular stomach of MNU-treated rats. n: 3 animals/each group. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to the non-treated control (0 h); (a), Kastenbaum and Bowman's method; (b-d), Dunnett's test.

Table 3. Micronucleated cell frequencies in the glandular stomach and bone marrow of rats orally administered MNU or MNNG.

Chemical	Time after dosing	Dose (mg/kg)	No. of animals	Glandular stomach		Bone marrow					
				% MNed cells		% MNIME		% IME			
				Mean ± SD	(min / max)	Mean ± SD	(min / max)	Mean ± SD	(min / max)	SD	(min / max)
MNU	24 h	0	5	0.14 ± 0.2	(0.00 / 0.40)	0.16 ± 0.04	(0.10 / 0.20)	46.1 ± 3.2	(41.9 / 50.0)		
		13.8	5	0.29 ± 0.2 *	(0.10 / 0.55)	0.93 ± 0.27 **	(0.50 / 1.15)	23.6 ± 5.2 ##	(18.5 / 29.2)		
		27.5	5	0.23 ± 0.10	(0.15 / 0.40)	1.54 ± 0.62 **	(1.10 / 2.60)	28.3 ± 10.4 #	(17.8 / 43.6)		
		55.0	5	0.49 ± 0.3 **	(0.20 / 0.95)	2.06 ± 0.32 **	(1.60 / 2.30)	17.8 ± 5.9 ##	(12.6 / 27.3)		
	48 h	0	5	0.12 ± 0.1	(0.05 / 0.20)	0.16 ± 0.04	(0.10 / 0.20)	36.3 ± 7.8	(28.4 / 46.3)		
		13.8	5	0.30 ± 0.2 **	(0.05 / 0.65)	1.66 ± 0.70 **	(0.75 / 2.35)	26.4 ± 5.1 #	(21.0 / 32.6)		
		27.5	5	0.27 ± 0.2 *	(0.05 / 0.45)	3.36 ± 0.74 **	(2.50 / 4.25)	22.0 ± 6.8 #	(12.8 / 29.9)		
		55.0	5	1.22 ± 0.8 **	(0.45 / 2.45)	4.39 ± 0.93 **	(3.50 / 5.85)	16.5 ± 3.0 ##	(13.1 / 20.9)		
	72 h	0	5	0.07 ± 0.10	(0.00 / 0.25)	0.19 ± 0.11	(0.05 / 0.30)	40.3 ± 12.7	(24.5 / 59.7)		
		13.8	5	0.22 ± 0.2 **	(0.05 / 0.50)	0.21 ± 0.21	(0.05 / 0.55)	45.1 ± 9.6	(28.7 / 53.1)		
		27.5	5	0.52 ± 0.3 **	(0.20 / 0.95)	0.34 ± 0.14 *	(0.15 / 0.50)	33.2 ± 12.5	(21.7 / 53.3)		
		55.0	5	1.13 ± 0.6 **	(0.70 / 2.20)	1.76 ± 1.16 **	(0.55 / 3.50)	7.1 ± 5.4 ##	(3.3 / 16.3)		
	96 h	0	5	0.07 ± 0.10	(0.00 / 0.25)						
		13.8	5	0.25 ± 0.2 **	(0.10 / 0.55)	nd		nd			
		27.5	5	0.35 ± 0.1 **	(0.15 / 0.50)						
		55.0	5	1.37 ± 0.3 **	(1.15 / 1.80)						
	120 h	0	5	0.08 ± 0.1	(0.00 / 0.15)						
		13.8	5	0.11 ± 0	(0.05 / 0.15)	nd		nd			
		27.5	5	0.32 ± 0.2 **	(0.05 / 0.55)						
		55.0	5	1.06 ± 0.4 **	(0.45 / 1.45)						
MNNG	24 h	0	5	0.04 ± 0	(0.00 / 0.05)	0.16 ± 0.10	(0.05 / 0.30)	47.8 ± 8.7	(35.9 / 58.6)		
		25	5	0.35 ± 0.3 **	(0.05 / 0.80)	0.26 ± 0.14	(0.10 / 0.40)	44.5 ± 7.8	(36.0 / 54.3)		
		50	5	0.40 ± 0.2 **	(0.25 / 0.60)	0.18 ± 0.12	(0.05 / 0.35)	38.6 ± 7.6	(32.4 / 50.9)		
		100	5	0.91 ± 0.5 **	(0.40 / 1.60)	0.16 ± 0.05	(0.10 / 0.25)	38.8 ± 9.7	(24.8 / 48.2)		
	48 h	0	5	0.02 ± 0	(0.00 / 0.05)	0.22 ± 0.07	(0.15 / 0.30)	33.3 ± 6.1	(25.8 / 41.1)		
		25	5	0.42 ± 0.1 **	(0.20 / 0.55)	0.19 ± 0.02	(0.15 / 0.20)	48.0 ± 14.4	(30.0 / 67.1)		
		50	5	0.64 ± 0.5 **	(0.15 / 1.40)	0.19 ± 0.09	(0.10 / 0.30)	37.8 ± 7.3	(32.2 / 50.5)		
		100	5	0.91 ± 0.5 **	(0.45 / 1.65)	0.18 ± 0.08	(0.10 / 0.25)	36.2 ± 6.9	(26.6 / 41.9)		
	72 h	0	5	0.09 ± 0.10	(0.00 / 0.25)	0.11 ± 0.08	(0.00 / 0.20)	38.0 ± 9.3	(22.9 / 48.5)		
		25	5	0.35 ± 0.2 **	(0.10 / 0.55)	0.12 ± 0.08	(0.00 / 0.20)	35.1 ± 5.7	(27.4 / 43.2)		
		50	5	0.43 ± 0.2 **	(0.20 / 0.65)	0.15 ± 0.07	(0.10 / 0.25)	41.5 ± 7.3	(30.2 / 48.7)		
		100	5	0.93 ± 0.6 **	(0.30 / 1.50)	0.09 ± 0.11	(0.00 / 0.25)	40.7 ± 8.7	(27.9 / 49.4)		
	96 h	0	5	0.07 ± 0.1	(0.00 / 0.20)						
		25	5	0.13 ± 0.1	(0.00 / 0.35)	nd		nd			
		50	5	0.16 ± 0.2 *	(0.00 / 0.35)						
		100	5	0.58 ± 0.4 **	(0.25 / 1.15)						
	120 h	0	5	0.09 ± 0.10	(0.00 / 0.25)						
		25	5	0.11 ± 0.1	(0.00 / 0.30)	nd		nd			
		50	5	0.30 ± 0.2 **	(0.10 / 0.60)						
		100	5	0.52 ± 0.6 **	(0.05 / 1.55)						

Abbreviations: %IME, % immature erythrocytes; %MNIME, % micronucleated immature erythrocytes; nd, not done.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Kastenbaum and Bowman's method), significant difference from the vehicle control.

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (Dunnett's test), significant difference from the vehicle control.

3-3-2-2 結腸発がん物質を用いた実験

DMH を 88.6 mg/kg の用量でラットに投与し、0、6、18、24、48、72、96、および 120 時間後の結腸における小核頻度、TUNEL 陽性細胞数、EdU 標識細胞数、Ki-67 陽性細胞数の経時変化を Fig. 17 に示す。

DMH 投与 48 時間後までの結腸小核頻度 (0.00-0.08%) は対照群 (0 時間、0.03%) の値と比べて有意な増加は認められなかった (Fig. 17a)。投与 72 時間後には小核頻度が有意に増加し (0.57%)、96 時間後に最大に達し (0.90%)、その後 120 時間後には低下した (0.70%)。一方、クリプト当たりの TUNEL 陽性細胞数は、対照群で 0.01 cells/crypt であったのに対し、DMH 投与 6 および 24 時間後にはそれぞれ 1.34 および 2.47 cells/crypt を示し、有意な増加が認められた。その後、72 時間後には 0.59 cells/crypt を示し、ピーク時の約 1/4 にまで低下した (Fig. 17b)。クリプト当たりの EdU 標識細胞は、対照群で 5.67 cells/crypt であったのに対し、DMH 投与 18-48 時間後には有意な減少が認められ、投与 18 時間後には最低値の 0.86 cells/crypt を示し、DMH 投与群において細胞増殖が抑制されていることが示された (Fig. 17c)。細胞増殖は 72 時間後には対照群レベルにまで回復し (5.03 cells/crypt)、96 および 120 時間後にはそれぞれ 8.02 および 13.2 cells/crypt を示し、細胞増殖の亢進がみられた。Ki-67 陽性細胞数についても同様の経時変化が認められたが、各時間における Ki-67 陽性細胞数は EdU 標識細胞を上回っていた (Fig. 17d)。すなわち、対照群では 8.01 cells/crypt であったのに対し、DMH 投与 18 時間後には最低値の 2.38 cells/crypt、120 時間後には最大値の 21.2 cells/crypt を示した。

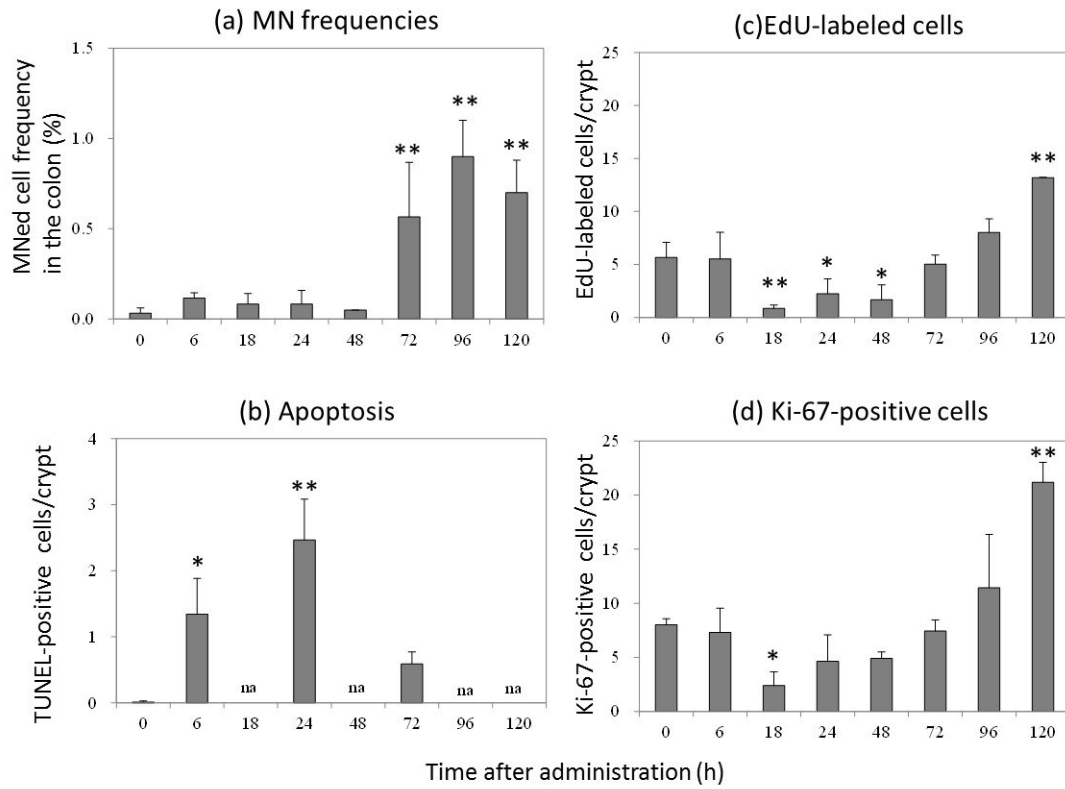


Fig. 17. Time-course of the incidence of MNed cells (a), TUNEL-positive cells (b), EdU-labeled cells (c) and Ki-67-positive cells (d) in the colon of DMH-treated rats. n: 3 animals/each group. Data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to the non-treated control (0 h); (a), Kastenbaum and Bowman's method; (b-d), Dunnett's test. na: not analyzed.

3-4 考察

ラット腺胃および結腸から単離した上皮細胞の懸濁液を用いた *in vivo* 小核試験を開発し、3種類のモデル化合物を用いて本試験の特性を調べた。ラットに胃発がん物質の MNU や MNNG、あるいは大腸発がん物質の DMH を単回胃内投与することにより、それぞれの標的臓器において、小核頻度が有意に増加した。小核頻度のピークは 48-96 時間後であり、その後減少に転じた。EdU 標識細胞の経時変化から、上皮細胞が細胞増殖帯から管腔側の表層に移動する時間は 72-96 時間後であることが示され、表層に達した細胞はその後管腔側に脱落する。小核頻度の経時変化パターンは、このような上皮細胞の細胞回転を反映したものといえる。また、小核頻度と細胞増殖の経時変化パターンは類似していたが、小核頻度とアポトーシス頻度の経時変化パターンは異なっていた。すなわち、細胞分裂を伴わずに生じるアポトーシスの頻度は投与 6 および/または 24 時間後の処理後の早い時期に増加し、72 時間後にはピーク時の 1/4 - 1/3 に減少した。細胞増殖は、アポトーシス頻度が高い時期に抑制され、投与 72 時間後までに回復した。小核頻度は、アポトーシスのピークよりも後で細胞増殖の回復とともに増加した。加えて、インタクトな細胞のみを観察するというクライテリアは、小核観察期間中にたとえアポトーシスがあったとしても、それを小核解析から排除するのに有効であると考えられる。これらのモデル化合物により、発がんの標的組織である腺胃および結腸において小核誘発を検出可能なことが確認された。また、小核の解析は被験物質の単回投与 48-96 時間後にサンプリングするのが適していることが示唆された。

MNU および MNNG はげっ歯類の胃にがんを誘発する直接変異原物質である [24, 76, 77]。ラット腺胃を用いた不定期 DNA 合成試験において、両物質ともに陽性結果が示されている [10, 83, 84]。マウスおよびラットの骨髄小核試験では、MNU は腹腔内および経口のいずれの投与経路を用いた場合にも陽性を示すことが報告されている [72, 85, 86]。MNNG もほとんどの試験でいずれの投与経路の場合にも陽性を示しているが、経口投与の場合は反応が弱い [85-90]。さらに、MutaTMMouse を用いた遺伝子突然変異試験において、変異頻度は胃線細胞では増加したが、骨髄細胞では増加しないことが報告されている [91]。本研究において、MNU 投与では腺胃と骨髄のいずれにおいても小核保有細胞が有意に増加した。一方、MNNG 投与では、本実験条件下において腺胃でのみ小核保有細胞の有意な増加が認められた。発がんの活性本体である methyl diazonium hydroxide は、非酵素反応による分解で MNNG から生じる。この分解は、胃粘膜に存在する高濃度のチオールによって加速される [92, 93]。また、MNNG はラットの全血あるいはヘモグロビンの存在下で速やかに分解されることが知られている [94]。本研究では、MNNG を投与したラットにおいて、幼若赤血球比の有意な変化が認められず骨髄抑制はなかったことから、MNNG の経口投与による小核保有赤血球の増加がみられなかったのは十分な活性分子が骨髄に到達しなかったためと考えている。これらのことから、被験物質を経口投与したときに直接高濃度で接触

する腺胃を標的とする小核試験は、MNNG のように非酵素的反応により、活性本体の寿命が短く不安定なために骨髄に到達しにくい物質を検出するのに有効であることが判明した。

DMH は大腸を標的とする発がん物質としてよく知られており、げっ歯類の結腸に小核を誘発する物質である [39, 44, 45, 62, 64]。第 1 章、第 2 章において、マウスに DMH を腹腔内投与し、結腸の小核試験を行い、陽性結果が得られることが示されており [48]、また、5 機関で行った共同研究により、その結果の再現性が得られている [50]。本研究において、DMH をラットに経口投与した時にも、結腸において小核が誘発されることが示された。一方、予備的に、DMH を経口投与した同じ動物の腺胃に対する影響を投与 72 時間後に調べたところ、小核頻度は $0.03 \pm 0.03\%$ で、陰性対照群の値 ($0.07 \pm 0.03\%$) と有意な差は認められなかった (unpublished data)。EdU 標識細胞数についても、陰性対照群の値 (1.44 ± 0.30 cells/gland) と DMH 投与群の値 (1.04 ± 0.13 cells/gland) に有意差は認められず、細胞増殖の抑制はみられなかった。DMH は肝臓で代謝活性化される間接変異原物質であり、結腸にがんを誘発するが胃には誘発しない [25]。ラットに DMH を 4 回経口投与した場合においても、腺胃小核頻度の有意な増加は認められていない [95]。腺胃および結腸における DMH のこれらの結果は、この化合物による発がんの臓器特異性と一致している。

細胞毒性の評価のため、組織標本を用い、Ki-67 免疫染色により増殖細胞を解析した。Ki-67 は、細胞周期の G0 期には発現しないが、G1、S、G2 および M 期に発現する核蛋白であり、細胞増殖のマーカーとして使われている [96]。Ki-67 陽性細胞が細胞増殖の促進だけでなく、抑制をも反映しているか否かを調べるため、チミジンアナログの EdU を用いた標識により細胞増殖を調べ、それらの結果を比較した。腺胃および結腸のいずれにおいても、Ki-67 陽性細胞数と EdU 標識細胞数の経時変化は類似していた。各時点において Ki-67 陽性細胞数は EdU 標識細胞数に比べて多かったが、これは EdU 標識細胞として可視化されるのは、EdU 投与 1 時間後に S 期にある細胞のみのためと考えられる。細胞毒性と Ki-67 陽性細胞数との相関性を解析するには更なるデータが必要であるが、細胞増殖の抑制は EdU 標識のような核酸類似体による標識法を用いずに Ki-67 免疫染色法でも解析可能なことが判明した。

本研究では、3 つのモデル化合物を用いてラット腺胃および結腸の小核試験を実施した結果、各物質の発がん標的である腺胃あるいは結腸で小核の増加が確認され、それぞれの遺伝毒性を検出することができた。しかし、腺胃における小核頻度の最大値および最小値 (Table 3) から、MNU および MNNG の高用量投与群では細胞毒性による小核誘発の遅延の影響も含め、個体差が大きい傾向にあった。単回投与の場合、小核誘発は 48-96 時間後に検出されることを考慮すると、2 回またはそれ以上の反復投与を行うことにより、個体差の縮小や遺伝毒性物質の検出感度の上昇が期待される。さらに、染色体損傷誘発物質や異数性誘発物質、また、非遺伝毒性物質等、多くの化合物を用いた実験を行うことにより、消化管小核試験の検出感度および特異性の評価

が可能となり、試験法の確立に貢献できると考える。

本研究により、マウスと同様にラットを用いる消化管小核試験法を開発することができた。ラット腺胃および結腸を用いる小核試験は、経口投与された物質の遺伝毒性の評価に有用であることが示唆された。近年、動物福祉への配慮が求められており、ラット消化管小核試験法の確立により、ラットを用いる一般毒性試験と動物の共有化が可能となり、実験動物数の削減にも貢献できるものと考えられる。また、ヒトへのリスクを考える場合、発がん臓器での遺伝毒性機序が関与するか否かを解析することは重要である。消化管小核試験は、消化管における発がんのメカニズム解析にも利用可能と考えられる。そこで、第4章では、ラット結腸消化管小核試験を応用し、腸内細菌定着の有無が大腸発がんのイニシエーション段階に及ぼす影響について検討することとした。

第4章

発がん機序解析におけるラット結腸小核試験の利用： 腸内細菌叢の有無による影響評価

本章は以下の論文に基づいています。

Ohyama, W.: Markedly enhanced micronucleus induction by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in colonic cells of rats with bacterial colonization in the intestine. *Mutat. Res.*, **838**, 1-8 (2019).

4-1 はじめに

ヒトの腸には 10-100 兆個、500-1000 種類に上る多種多様な菌が存在しているといわれている[97, 98]。腸内細菌と宿主は共生関係にあり、腸内細菌やそれらが産生する物質は、腸上皮細胞や免疫細胞の増殖や分化、病原菌の定着阻害等、生体防御機能の活性化に役立つほか、腸内細菌の産生する短鎖脂肪酸が腸のエネルギー源となるなど、菌の存在は宿主の生理学的な恒常性の維持に重要である[52, 99]。一方で、特定の腸内細菌が腐敗産物や発がん物質の産生[99-101]、化学発がん物質による大腸がんの前がん病変である ACF やがんの悪性化の促進に関与することも報告されている[54-58, 99]。また、腸内菌叢の乱れ「dysbiosis」が色々な腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎のような慢性炎症や、慢性炎症からの大腸がんの発生に関与していることが注目されている[53, 54, 103]。大腸を標的とする発がん物質の DMH を用いた実験では、発がん率や悪性度、あるいは前がん病変の指標である ACF の異型度が無菌 (GF) ラットに比べ通常 (CV) あるいは通常化 (Cvd) ラットで高いことが示されている[55-58]。これは、腸内細菌が DMH による大腸発がんの促進にかかわっていることを示している (Fig. 18)。しかし、腸内細菌が ACF 形成に先立って宿主の結腸において DNA 損傷や染色体異常等の遺伝毒性に影響を及ぼすか否かについては明らかではない。開発した結腸小核試験は、被験物質の遺伝毒性リスクの評価のみならず、発がんのイニシエーション段階における腸内細菌の影響の評価にも利用できると考えられた。

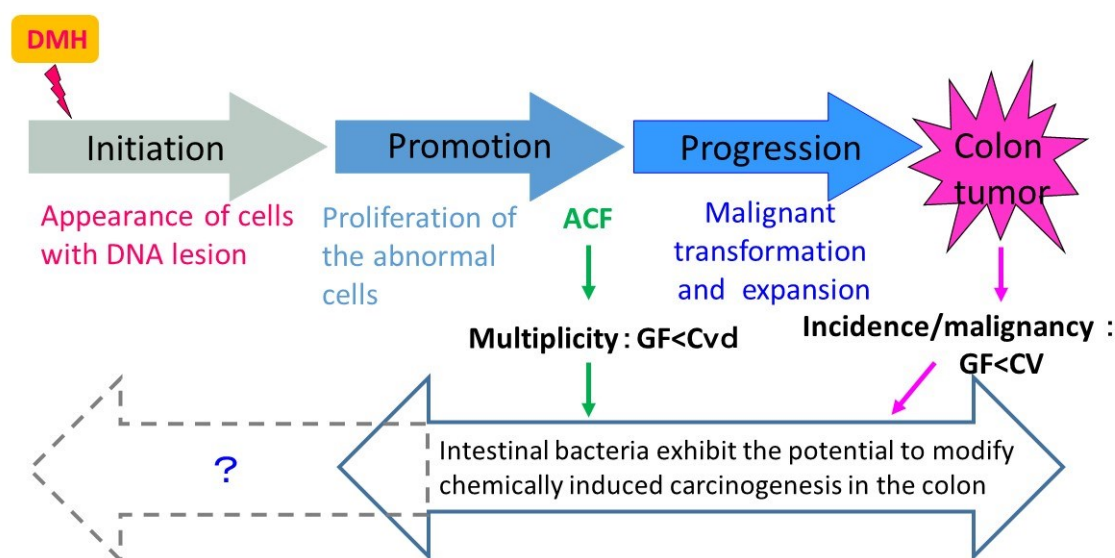


Fig. 18. Schematic images of multistep colon carcinogenesis by DMH administration.

そこで、DMH 投与後早期に結腸細胞に起きる遺伝学的変化を複数の指標、すなわち、DNA 損傷および小核を指標として調べると共に、アポトーシスや細胞増殖の指標の変化も同時に測定し、GF と CV ラットで比較することとした。DMH は肝臓で代

謝活性化されることが知られており (Fig. 19) [106-110]、また、コメット試験により DMH 投与数時間から 24 時間までに肝臓および結腸で DNA 損傷の増加が検出できることが報告されている[104, 105]。そのため、DMH 投与後 3-18 時間までの肝臓および結腸における DNA 損傷をコメット試験で調べた。

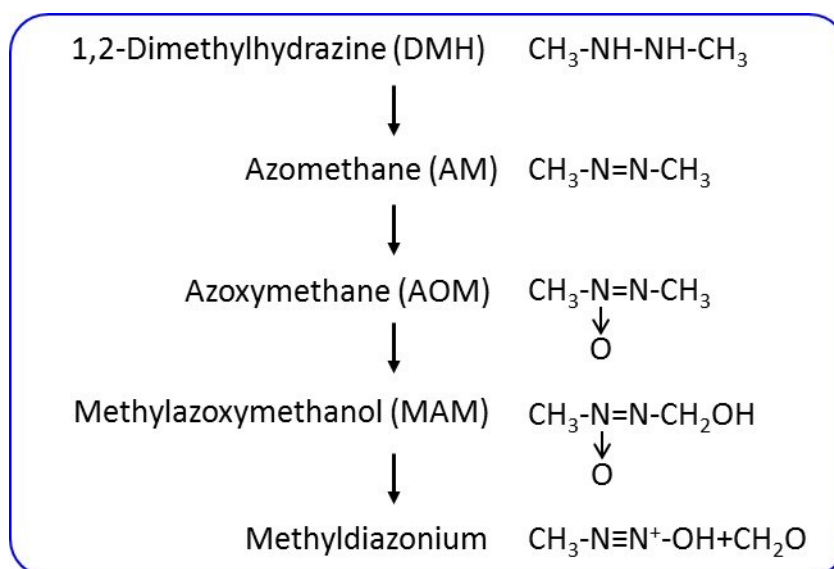


Fig. 19. Metabolic activation of DMH.

また、第 1, 2, 3 章に記載したように、通常マウスあるいはラットに DMH を単回投与したとき、投与 72-96 時間後に小核頻度のピークが認められている。また、無菌ラットの結腸上皮細胞の細胞周期は通常 (CV) ラットと比較して約 1.3 倍長く、分裂が遅いと報告がある[111]。このため、無菌ラットでは小核誘発が通常ラットに比べ遅れる可能性があることから、本研究では、投与 24-144 時間後まで経時的に結腸の小核頻度を調べた。さらに、これらの試験で用いたラット結腸の組織標本により、TUNEL 法にてアポトーシス頻度を求めたほか、bromodeoxyuridine (BrdU) 標識細胞数、分裂中期像の数、およびクリプトの高さを指標として細胞増殖活性を解析した。GF と Cvd ラットにおいてこれらの指標の経時変化を調べ、DMH 投与後早期において腸内細菌の有無による差があるか否かを調べ、消化管小核試験の有用性について検討した。

4-2 実験方法

4-2-1 使用動物

ヤクルト中央研究所で生産された雄性 F344; Yit GF ラットを使用した。全ての動物は、5 週齢まで無菌状態のビニルアイソレーター中で飼育した。ガンマ線滅菌した F-2 飼料 (船橋農場(株)製) とオートクレーブ滅菌した水を自由摂取させ、オートクレーブ

滅菌した床敷を敷いたケージに 3 匹以下/ケージで飼育した。GF ラットは実験期間終了までこの条件下で飼育した。月 1 回の定期チェックおよび解剖時の糞便検査で無菌状態を確認した。被験物質の投与は 7 週齢で行った。GF ラットの通常化 (conventionalization) は、尾上らの方法[58]に従い、GF ラットに通常環境で飼育している F344 ラットの糞便懸濁液を経口ゾンデで投与することにより行った。被験物質処理を行った 7 週齢時 (通常化後 16-18 日後) に糞便のグラム染色によりグラム陽性および陰性の菌が定着していることを確認した。飼育室は $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50-60% に維持し、照明の明暗は 12 時間サイクルとした。実験は、ヤクルト中央研究所 動物実験委員会の承認を得て行った。

4-2-2 化合物

DMH [306-37-6] (ナカライテスク株) は、局方生理食塩液 (株大塚製薬工場) に溶解した後、NaOH で pH 6.5 に調整した。DMH の濃度は、塩酸塩を含まない濃度で 2 mg/mL となるよう調製し、ミリポアフィルター (pore size: 0.45 μm) で滅菌した。第 3 章までと同様に塩酸塩を含む濃度で示す場合は、4.4 mg/mL となる。BrdU (和光純薬工業株) は 16 mg/mL となるよう局方注射用水 (株大塚製薬工場) で溶解した。

4-2-3 動物への投与

4-2-3-1 コメット試験、およびアポトーシスと細胞増殖の解析

肝臓と結腸における DNA 損傷および結腸におけるアポトーシスおよび細胞増殖の経時変化を解析するため、GF および Cvd ラットのそれぞれについて、DMH 投与 0 (無処置対照群)、3、4.5、6、および 18 時間後にサンプリングする群を設定した。実験スケジュールを Fig. 20 に示す。3、4.5、6 時間の群には各 4 匹の動物を用い、0 および 18 時間の群には各 3 匹用いた。DMH 投与群には、DMH を 44 mg/10mL/kg の用量 (フリー体として約 20 mg/kg) で皮下に単回投与した。所定の時間に動物を麻酔し、腹部大動脈からの放血により安楽死させた。肝臓と結腸のコメット標本および結腸の組織標本を作製した。投与 18 時間後の GF ラット 3 匹中 1 匹の肝臓コメット標本では標本作製作業中にゲルがはがれてロスしたため、この群の肝臓については 2 匹のみ解析した。

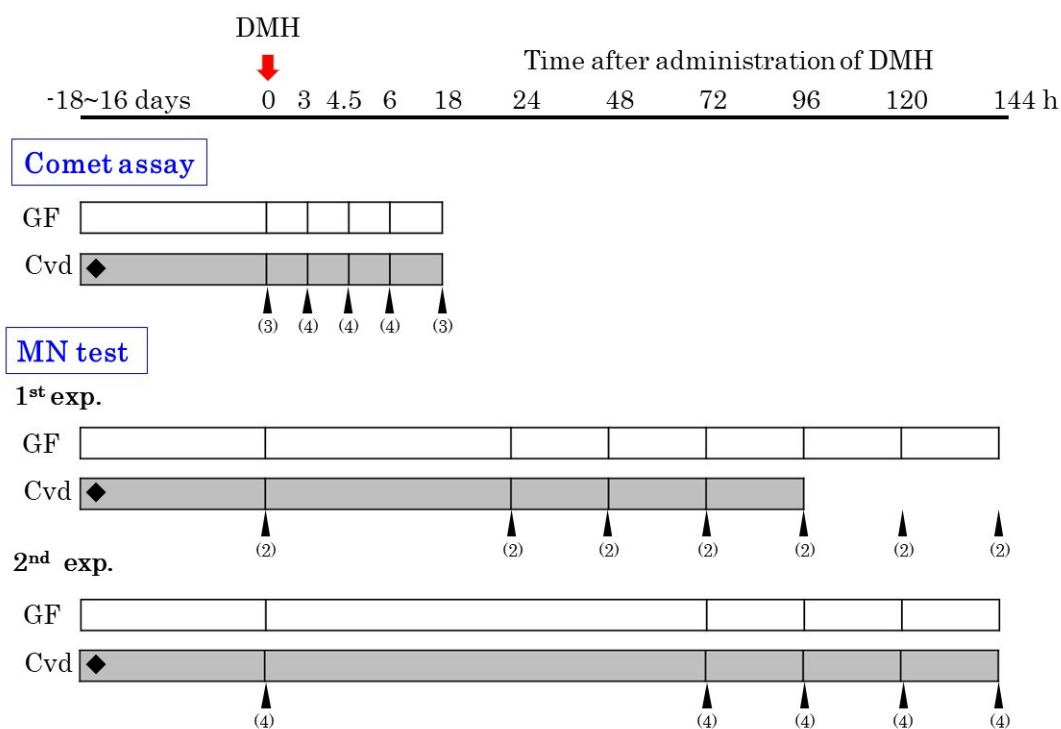


Fig. 20. Experimental schedule. DMH was administered subcutaneously at a dosage of 44 mg/kg. Untreated rats were used as controls (0 h). ◆, inoculation of feces of conventional F344 rats; ▲, sampling. The numbers in parentheses are the number of animals used at the time point in each GF and Cvd rat group.

4-2-3-2 小核試験、およびアポトーシスと細胞増殖の解析

GFおよびCvdラットを用いた小核試験は2回実施した。1回目の実験では、1群当たり2匹の動物を用いた。GFラットでは、DMH投与0（無処置対照群）、24、48、72、96、120、および144時間後にサンプリングする群を設定した。他方、Cvdラットでは、DMH投与0（無処置対照群）、24、48、72、および96時間後にサンプリングする群を設定した。動物へのDMH投与は上記4-2-3-1と同様に行った。細胞増殖活性を調べるため、解剖の1時間前に全ての動物にBrdUを40 mg/2.5 mL/kgの用量で静脈内投与した後、結腸の小核標本および組織標本を作製した。

2回目の実験では、1群当たり4匹の動物を用いた。GFおよびCvdラットともに、DMH投与0（無処置対照群）、72、96、120、および144時間後にサンプリングする群を設定した。1回目の実験で24および48時間後の群において細胞増殖抑制がみられたため、2回目の実験ではこれらの群は設定しなかった。動物へのDMH投与は上記4-2-3-1と同様に行った。各群について、4匹中2匹の動物に上記と同様にBrdUを投与した。所定の時間に結腸を採取し、小核標本および組織標本を作製した。

4-2-4 標本作製および観察

4-2-4-1 コメット試験

摘出した肝臓と遠位結腸を用い、佐々木らの方法[104]を一部改変してコメット標本作製した。以下に概略を記す。肝臓全体をハサミで細切し、その約 1/5 を氷冷したホモジナイズバッファー中でホモジナイズした。ホモジナイズバッファーは、75 mM sodium chloride (NaCl)、24 mM EDTA、および 10% (v/v) DMSO の組成で、pH 7.5 に調整した溶液を用いた。ポッター型のホモジナイザーで、内筒を削ってルーズにしたものを用いて、600 rpm で 1 ストロークのみホモジナイズした。遠位結腸は生理食塩液で内容物を洗い流し、直腸側約 1 cm を組織標本に用いた。残りを長軸方向に開き、ハサミの刃のない側で上皮細胞をスクレープした。これを 6 mL の氷冷したホモジナイズバッファー中で、肝臓と同様の方法でホモジナイズした。ホモジナイズした肝臓および結腸は、700 g で 10 分間、低温下で遠心し、沈殿をそれぞれ 10 mL および 2 mL の氷冷したホモジナイズバッファーに再懸濁した。懸濁液を 15 秒から 2 分程度静置して細胞塊を沈殿させたのち、上部の核を含む細胞懸濁液を採取してコメット標本に用いた。ゲルに包埋するまで細胞懸濁液を氷冷した。

標準融解アガロース (GP-42、ナカライテスク株) および低融解アガロース (LGT、ナカライテスク株) をそれぞれ 1% および 2% の濃度になるよう生理食塩液に入れ、電子レンジで温めながら溶解した。50°C に保温した標準融解アガロースを用い、スライドガラスに 1 層目を作製した。細胞懸濁液と 45°C に保温した低融解アガロースを等量混合し、75 μ L を固化した 1 層目の上に載せ、2 層目とした。固化後、標準融解アガロースを載せて 3 層目とした。1 個体当たり 2 枚の標本作製した。ゲル固化後速やかによく冷やした核溶解液に浸漬した。核溶解液は、予め 100 mM EDTA、2.5 M NaCl、および 10 mM tris hydroxymethyl aminomethane (Tris) を精製水に溶かし、NaOH で pH 10 に調整した溶液を作製しておき、実験当日 1% (w/v) sodium *N*-dodecanosylsarcosinate、1% (v/v) triton-X100 および 10% (v/v) DMSO を加えて使用の 30 分以上前に 10°C 以下に冷やしたものを使用した。標本は、核溶解液に一晩浸漬した後、電気泳動液を入れた容器に移した。電気泳動液は、300 mM NaOH と 1 mM EDTA を精製水に溶かし、pH 13 以上に調整して 10°C 以下に保存していたものを用いた。標本をこの溶液に 10 分間浸漬した後、新しい泳動液を入れたサブマリンタイプの泳動槽に移し、各群ランダムになるよう配置した。標本全面が覆われるよう泳動液を加え、さらに 10 分間静置した (DNA のアンワインド時間は合計 20 分間)。25V の定電圧で 15 分間電気泳動した。泳動開始時の電流が 300 mA となるよう、泳動液の量を調節した。泳動終了後、標本を冷やした中和液 (0.4 M Tris 水溶液、pH 7.5) で静かに 3 回 (5 分/回) 洗浄した。100% エタノールに 30 分以上浸漬して脱水後、自然乾燥させた。核溶解から脱水までの工程で用いた溶液は、予め全て保冷したものを用い、それぞれの工程は 5°C に設定した低温室内にて遮光下で実施した。標本は暗号化し、観察時に 20 μ g/mL のエチジウムブロマイド 50 μ L を標本に滴下してカバーガラスをかけ染色した。蛍光顕微鏡

(200倍)のグリーン励起(550 nm)にて、1個体当たり50個のコメット像を画像解析装置(ケイオー電子株、version 2.02)で計測した。ヘッドとテールが明らかであり、他の細胞と重なっていないものを観察対象とした。本研究では用いた画像解析システムで定義している% tail DNA、tail intensity、あるいは tail moment 等の他の指標の算出方法が、コメット試験の OECD ガイドライン 489 [11]で推奨している算出方法と異なる可能性があるため、DNA 鎖切断の指標として最も明確なコメット像の両端の距離を示す tail length を用いた。

4-2-4-2 小核試験

小核標本は、第1章で報告した方法の一部を改変して行った。変更点は30°C、15分静置した後、3分間ガラス棒を振動させていたが、より状態の良好な細胞を得るため、EDTA中での浸漬を30°C、30分保温とし、15分毎に2-3分間ガラス棒を振動させ、クリプトを採取した。ピペッティングにより細胞を単離し、固定後、細胞懸濁液をスライドグラスに滴下し、標本とした。標本は観察まで約-20°Cのフリーザーで保存した。なお、同時に組織標本を作製した個体については、腸管をガラス棒に裏返す前に直腸側約1 cmを採取し、組織標本とした。

小核標本はすべて暗号化し、処理条件が分からない状態で観察した。1回目の実験では1個体当たり約1000個、2回目の実験では1個体当たり約2000個のインタクトな細胞を観察し、小核保有細胞の頻度を算定した。インタクトな細胞は、細胞質を保持しており、楕円形から長方形で、主核の核膜が明瞭で断片化していないものとした。小核の判定基準は、主核と同じ黄色い蛍光を発しており、直径が主核の1/3以下であるものとした。

4-2-4-3 組織標本の作製およびアポトーシスと細胞増殖の解析

組織標本用に採取した結腸組織を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従ってパラフィン包埋し薄切組織切片を作製した。この組織切片をアポトーシス頻度および細胞増殖活性の指標(分裂中期像、クリプトの高さ、BrdUの取り込み)の解析に用いた。

4-2-4-3-1 アポトーシスの染色と解析、および分裂中期像とクリプトの高さの解析

TUNEL法によりアポトーシス細胞を免疫染色した。Apoptotic detection kit (DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System, Promega Corp., WI, USA)を用い、説明書に従って行った。アポトーシスの発色はdiaminobenzidine (DAKO/Agilent Technologies Inc., CA, USA)にて行い、ヘマトキシリンで核染色を行った。核が明らかな茶色を示す細胞をアポトーシス陽性細胞と判定した。各動物について、形が明瞭な約30のクリプトを観察し、クリプト当たりの陽性細胞数を算定した。同時に、クリプト当たりの分裂中期細胞数、クリプト底部から上部表面までの細胞数(クリプトの高さ)をカウン

トした。

4-2-4-3-2 BrdU の染色と解析

別の組織切片に対して、BrdU 染色キット (Oncogene Research Products, CA, USA) を用い、説明書の方法に若干変更を加えて染色した。概要を以下に記す。内因性ペルオキシダーゼを 3%過酸化水素水で消去した後、湿箱に入れ、37°C、60 分、組織切片をトリプシン溶液 (reagent 1A と 1B を等量混合した溶液) で処理した。氷冷した phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄し、変性溶液 (reagent 2) で室温、30 分処理した。PBS で 3 回洗浄し、ブロック溶液 (reagent 3) で室温、60 分処理した。ブロック溶液を除去し、biotinylated mouse anti-BrdU (reagent 4) で 4°C、18 時間処理した。PBS で 3 回洗浄し、streptavidine-peroxidase (reagent 5) で室温、10 分処理した。PBS で 3 回洗浄し、diaminobenzidine (reagent 6A, 6B, 6C を蒸留水と混合した液) で BrdU を取り込んだ核を発色させ、ヘマトキシリンで核染色した。核が明らかな茶色を示す細胞を BrdU 標識細胞と判定した。各動物について、形が明瞭な約 30 のクリプトを観察し、クリプト当たりの BrdU 標識細胞数を算定した。

4-2-5 統計処理

コメット試験では、各群の tail length の平均値を算出した。溶媒対照群と被験物質投与群の間の有意性については、*F*-test により分散分析を行い、等分散の場合は Student's *t*-test、不等分散の場合は Aspin-Welch の検定を行った (片側検定、有意水準 0.05)。小核試験では、溶媒対照群と被験物質投与群の間の有意性について、Kastenbaum and Bowman 法[82]を用いて解析した (片側検定、有意水準 0.05)。コメット試験および小核試験の各時間における GF と Cvd ラットの間の有意性については、*F*-test および Student's *t*-test により検定した (片側検定、有意水準 0.05)。これらの統計処理は、SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて実施した。また、各時間におけるアポトーシス頻度、細胞増殖の各指標については、1 群 2 匹のグループもあることから有意差検定は行わなかった。

4-3 実験結果

4-3-1 コメット試験

GF および Cvd ラットともに、DMH 投与群では肝臓および結腸の tail length が増加した (Fig. 21a, 21b)。最大値は投与 3 時間後に見られ、その後減少する傾向が見られた。GF ラットと Cvd ラットの間で、対照群、処理群ともに有意な差は認められなかった。

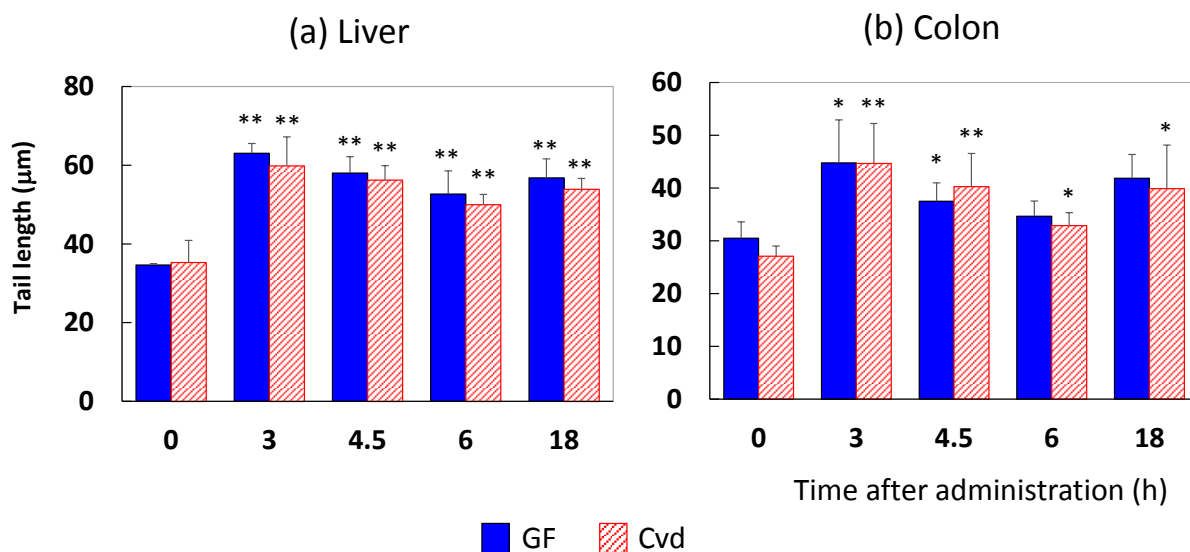


Fig. 21. Results of the comet assay in the liver (a) and colon (b) of rats treated with DMH. Data are expressed as the mean \pm SD. The number of animals analyzed is as follows: $n = 4$ animals/group at 3, 4.5, and 6 h; and $n = 3$ animals/group at 0 and 18 h, except in GF rat colon at 18 h (2 animals). Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t -test) as compared to the control (0 h).

4-3-2 結腸小核試験

1 回目の実験結果を Fig. 22a に示す。対照群の小核頻度は GF ラット (0.05%) と Cvd ラット (0%) で同様の値であった。GF ラットでは、小核頻度は投与後増加し、120 時間後に最大 (1.10%) となり、その後 144 時間後 (0.50%) には低下した。Cvd ラットでは、小核頻度は投与後著しく増加し、72 時間後には 2.45% を示した。その後減少し、96 時間後には 1.70% を示した。Cvd ラットの small 核頻度は、観察した期間において、常に GF ラットより高い傾向を示し、最大値を示した時間は GF ラットに比べ早かった。

2 回目の実験では、対照群の小核頻度は GF (0.15%) ラットと Cvd ラット (0.18%) で同様の値であった (Fig. 22b)。72 および 96 時間後の Cvd ラットの small 核頻度は、GF ラットに比べ有意に高かった。小核頻度の最大値は GF ラットで投与 120 時間後 (0.51%)、Cvd ラットで 72 時間後 (2.51%) であり、その後コントロールレベルに向かって低下した。Cvd ラットの値は 144 時間後にはほぼコントロールレベルに低下し (0.24%)、その時点での GF ラットの値 (0.46%) に比べ有意に低かった。DMH 投与後の Cvd ラットの small 核頻度の増加と減少は、GF ラットに比べより早くまた顕著であった。GF ラットの 120 時間後の値は、1 回目の実験に比べ低かったが、対照群に比べて有意に高く、最大値を示した時間は両実験で一致していた。したがって、小核頻度の経時変化は 2 回の実験で再現性が得られた。

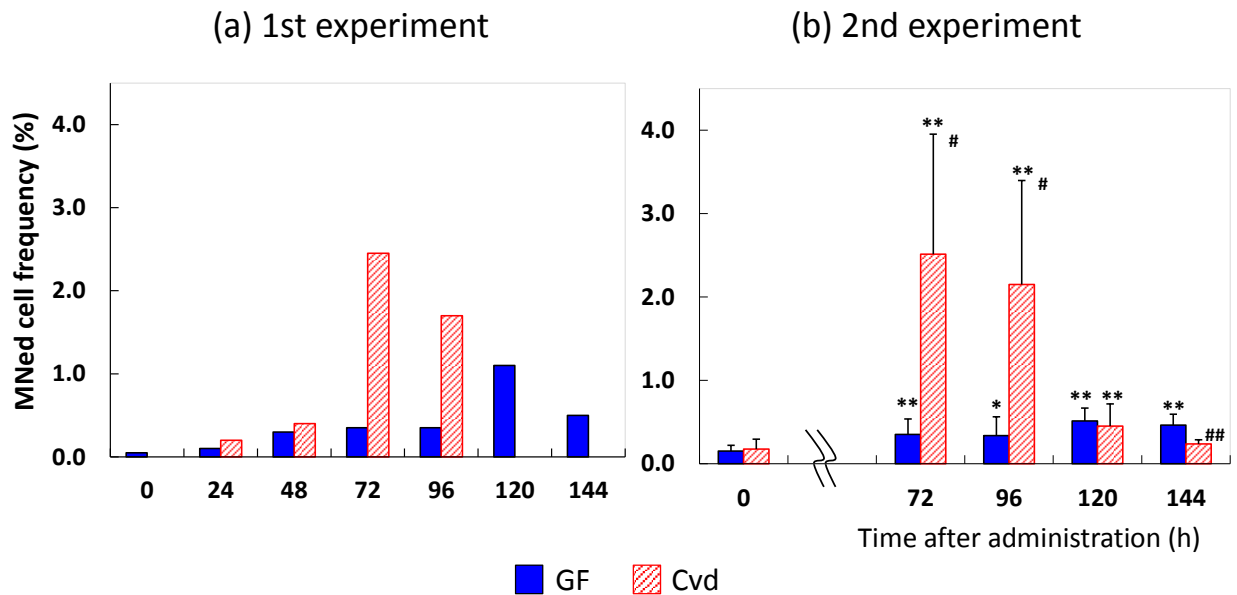


Fig. 22. Results of MN tests in the colon of rats treated with DMH. In the first experiment (a), two animals/group were analyzed, and the data are expressed as the mean. In the second experiment (b), four animals/group were analyzed, and the data are expressed as the mean \pm SD. Statistical significance in (b): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Kastenbaum and Bowman's method) as compared to the control (0 h). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (Student's t -test) as compared to the value of the correspondent GF group at the time point.

4-3-3 組織標本の解析

アポトーシスと細胞増殖の解析は、コメット試験 (0、4.5、6、18 時間) で用いた動物および 2 回の小核試験 (0、24、48、72、96、120、144 時間) で用いた動物の組織標本で解析した。組織標本は、コメット試験の動物は全て、小核試験の動物は BrdU を投与した動物のみから作成した。各指標の図は、これら 3 実験のデータを統合して表した。

4-3-3-1 アポトーシス

クリプトあたりのアポトーシス細胞数を Fig. 23a に示す。GF および Cvd ラットの対照群の平均値は、それぞれ 0.14 および 0.02 cells/crypt であった。両ラットとも投与 4.5 時間以降に増加し、GF ラットでは 24 時間後 (3.17 cells/crypt) に、Cvd ラットでは 6 時間後 (4.19 cells/crypt) に最大となった。その後、コントロールレベルに向かって低下した。Cvd ラットでは、96 時間後にはほぼコントロールレベルに低下 (0.14 cells/crypt) したが、GF ラットではその時点で (0.45 cells/crypt) であった。Cvd ラットではアポトーシス頻度の早い増加と減少がみられた。

4-3-3-2 分裂中期細胞

クリプトあたりの分裂中期細胞数を Fig. 23b に示す。対照群の値は、GF ラット (0.69 cells/crypt) と Cvd ラット (0.55 cells/crypt) で同様であった。GF ラットでは投与 48 時間後まで、Cvd ラットでは投与 24 時間後まで分裂中期細胞数の抑制がみられ、その後増加に転じた。しかし、リバウンド反応は Cvd ラットでより顕著で早い時間に起こった。最大値は、GF ラットでは 120 時間後 (1.17 cells/crypt) に、Cvd ラットでは 96 時間後 (1.55 cells/crypt) に認められた。その後、コントロールレベルに向かって低下した。

4-3-3-3 クリプトの高さ

クリプト底部からルーメン側表面までの上皮細胞数 (クリプトの高さ) の経時変化を Fig. 23c に示す。GF および Cvd ラットの対照群の値は、それぞれ 27.5 および 34.6 cells/crypt であった。Cvd ラットのクリプトの高さは、解析した期間中、常に GF ラットに比べて高い傾向を示した。両ラットともクリプトの高さは、投与後徐々に低くなり、72 時間後に最低値を示した。96 時間後から回復がみられ、GF ラットでは 144 時間後 (29.7 cells/crypt)、Cvd ラットでは 120 時間後 (41.7 cells/crypt) に最大値に達した。

4-3-3-4 BrdU 標識細胞

GF および Cvd ラットにおけるクリプト当たりの BrdU 標識細胞数を Fig. 23d に示す。対照群の値は、GF ラット (6.44 cells/crypt) と Cvd ラット (6.00 cells/crypt) で同様であった。GF ラットでは投与 48 時間後まで、Cvd ラットでは投与 24 時間後まで分裂中期細胞数の抑制がみられ、その後増加に転じたが、リバウンド反応は Cvd ラットでより顕著で早い時間に起こった。最大値は、GF ラットでは 120 時間後 (12.1 cells/crypt) に、Cvd ラットでは 96 時間後 (18.8 cells/crypt) にみられ、その後コントロールレベルに向かって低下した。

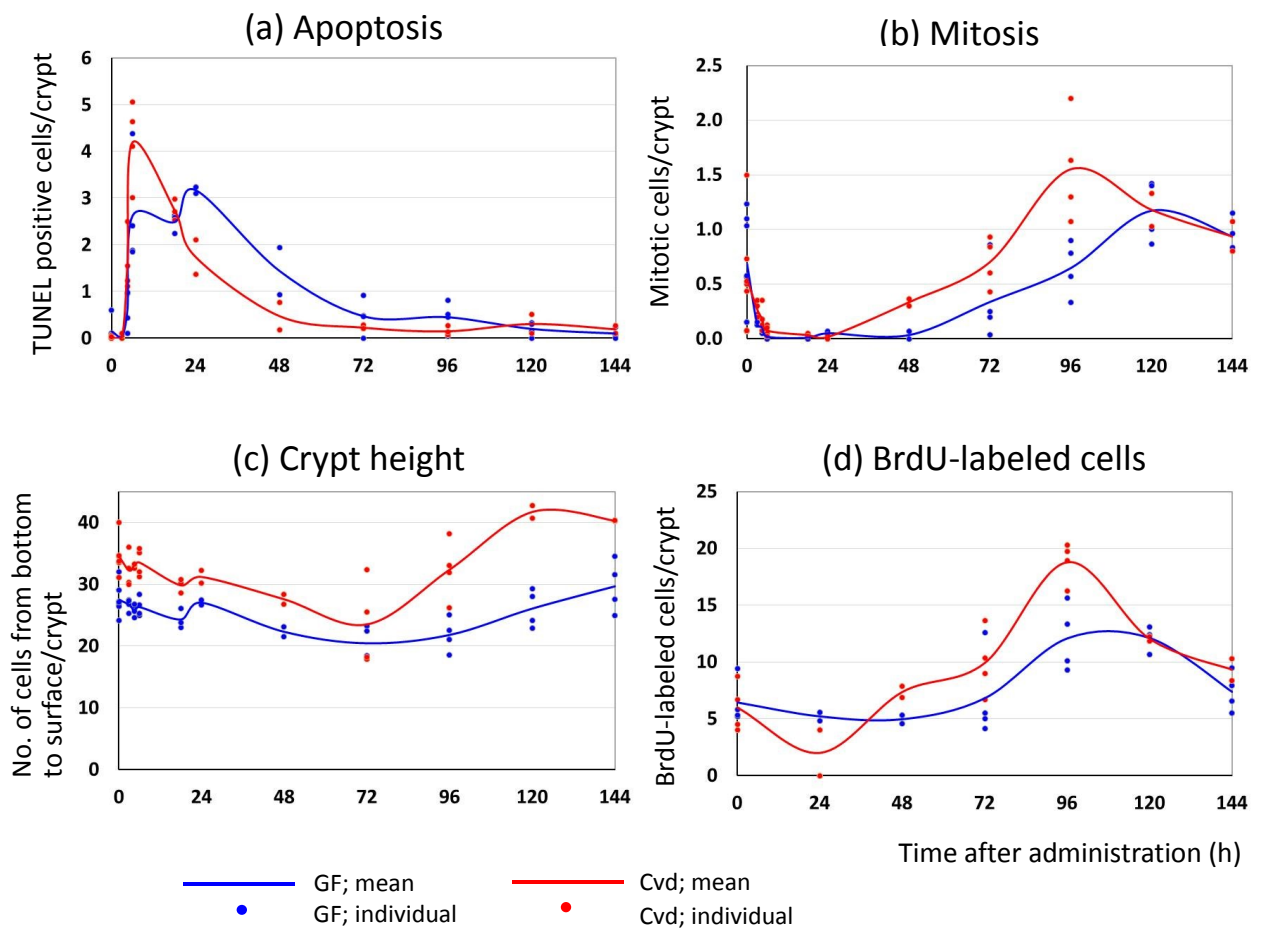


Fig. 23. Time-course of the incidence of apoptotic cells (a), mitotic cells (b), crypt height (c), and BrdU-labeled cells (d) in the colon of rats treated with DMH. Tissue sections were prepared from all animals used in the comet assay and from two animals administered BrdU at each time point in each experiment of the MN test. The data from these three assays were combined and are represented in the figure. The number of animals analyzed is shown below. n in (a) (b) (c) = 4 animals/group with some exceptions as follows: 7 animals at 0 h, 3 animals at 18 h, 2 animals at 24 and 48 h for both GF and Cvd rats, and 2 animals at 120 and 144 h for Cvd rats. n in (d) = 4 animals/group with some exceptions as follows: 2 animals at 24 and 48 h for both GF and Cvd rats and 2 animals at 120 and 144 h for Cvd rats.

4-4 考察

本研究では、DMH を GF ラットと Cvd ラットに単回投与後早期において、肝臓と結腸における DNA 損傷、および結腸小核頻度の経時変化を調べ、両ラットで比較した。肝臓および結腸の細胞における DNA 損傷については、DMH 投与 18 時間後まで解析した結果、損傷の最大値を示したのは両臓器共に投与 3 時間後であり、その後、損傷度は下がる傾向が見られた。どちらの臓器も、経時変化のパターンや各測定時間における値は両ラットで類似していた。DMH は生体内で azomethane (AM)、azoxymethane (AOM)、methylazoxymethanol (MAM)へと代謝され、MAM が活性代謝物である[26, 106-109]。ラットの場合、代謝に関しては、肝臓の CYP2E1 が関与しており [108]、MAM は血流経路で結腸に到達し[26, 106, 111]、そこで酵素反応による酸化または自然分解により methyldiazonium ion が生じ、これが DNA 塩基をアルキル化するとの報告がある[108, 109]。また、肝臓で MAM のグルクロン酸抱合体 (MAM-GlcUA) が形成され、これが胆汁を介して結腸に到達し、腸内細菌の酵素 (β -glucuronidase) により脱抱合され、腸で再活性化されるとの説[26, 112]もある。しかし、1,2-[14 C]dimethylhydrazine のラットへの皮下投与により胆汁中に排泄された放射活性は投与量の 1%以下であること[113]、また、腹腔内投与された MAM は肝臓でグルクロン酸抱合されないばかりでなく、腹腔内投与された MAM-GlcUA は尿中に排泄されるが胆汁中には排泄されないことから[111]、結腸での MAM の生物学的な影響に腸内細菌は関与しないとの説もある[111]。GF と Cvd で肝臓や腸の酵素活性が異なるとの報告 [99, 114] もあるが、肝臓および結腸における DNA の初期損傷に GF と Cvd で差がないという結果は、本研究の実験条件下で DMH を投与した場合には、肝臓での代謝活性化や活性体の結腸への到達量が GF と Cvd ラットで差がないことを示唆している。

その後引き続いて起こる結腸でのアポトーシス、小核頻度の増加と減少、ならびに代償性の細胞増殖は GF ラットに比べ Cvd でより早くより顕著であった。一方、対照群の値は両ラットとも同程度であった。今回、小核頻度の最大値を示した時間は、GF 群では DMH 投与 120 時間後、Cvd 群では 72 時間後であり、2 回の小核試験で経時変化の再現性が認められた。前章までに報告した通常の腸内細菌を持つ CV マウスやラットに DMH を単回投与したときの小核頻度のピーク時間は 72-96 時間後であり、本研究での Cvd ラットの small nuclear foci 頻度のピーク時間と一致していた。第 3 章において、通常ラットでは結腸上皮細胞が細胞増殖帯から管腔側の表層に移動する時間は 72-96 時間であることを示しており、小核頻度の経時変化パターンは、このような上皮細胞の細胞回転を反映したものといえる。なお、Cvd ラットの結腸におけるアポトーシス頻度および小核頻度のピークを示した時間が第 3 章で得た結果よりも早かったのは、DMH の投与用量および投与経路の違いによるものと考えられる。

マウスやラットの消化管上皮の細胞回転は GF に比べ腸内細菌を持つ動物で速いことが報告されている[110, 115, 116]。Alam ら[110]は、CV AGUS ラットの細胞周期 (50

時間)はGFラット(66.7時間)に比べ短いこと、クリプトの高さはCVラット(29.5 cells/crypt)がGFラット(23.5 cells/crypt)に比べ高いことを報告している。腸内細菌やその代謝産物はクリプト上皮細胞や免疫細胞の増殖・分化に影響を与え、上皮の生体防御機能を活性化する役割を果たしている[52]。腸内細菌の主要な代謝産物である短鎖脂肪酸は結腸のエネルギー源になっており、上皮細胞の細胞増殖を促進させる[117, 118]。また、G1期またはG0期がある程度の長さを保っていることが、完全でダメージのない幹細胞のゲノムを維持するのに重要であると考えられている[119]。これらの報告を考慮すると、GFとCvdラットの核頻度の経時変化パターンの違いが以下のように説明できる。すなわち、Cvdラットでは細胞周期が短いために、DNA損傷の修復が間に合わずアポトーシスにより排除され、結果としてアポトーシス頻度がGFよりも早くまた大きく増加した。Cvdラットでは、劇的な細胞の喪失を補うための早い回復に向けて、DNAの修復が不完全な細胞が増殖し、結果として核頻度がGFラットに比べて顕著に増加した。Cvdラットでは細胞回転が速いため、核頻度の増加と減少も早かった。そのため、DNA損傷度はGFとCvdラットで差がなくても、一旦DNAが傷ついた場合には、Cvdラットにおける速い細胞回転が核形成を加速化するため、核頻度はCvdで高かったものと考えられる。

最近の研究で、核が形成された細胞では、次の細胞周期で核の核膜が破裂し主核に取り込まれることがクロモソリプシスの一つの引き金になり得ると報告されている[5]。多段階発がんとは対照的に、クロモソリプシスにより、がんの発生と進行にかかわる遺伝子異常がまとめて引き起こされることから、がん化が飛躍的に進展することが示唆されている。これは核頻度が高ければ発がんリスクが高くなることを示唆している。本研究におけるCvdラットでGFラットに比べ核頻度が高いという結果は、DMHによるACF形成や発がん率がCVあるいはCvdラットで高いという報告と一致する[55-58]。また、結腸核試験が遺伝毒性物質による大腸発がんの機序解明に有用なツールとなることを示唆している。

本研究において、Cvdラットの菌叢構成は調べていないが、健康な通常ラットの腸内には多くの種類の菌が生息しており、門レベルでは *Firmicutes* および/または *Bacteroidetes* が優勢であると報告されている[120, 121]。菌叢構成の変化が化学物質によるラット結腸の核誘発に影響を与えるか否かについては更なる研究が必要である。腸内細菌と宿主は共生関係にあり、菌の存在は宿主の生理学的な恒常性の維持に重要である[52, 54, 99]。しかし、腸管内での存在は疾病を誘発するリスクも持っている。大腸発がんにおいては、特定の菌による発がん物質の産生、腸内細菌の持つ酵素による脱抱合による発がん物質の再活性化、発がん物質の活性化、宿主の生体防御反応の修飾、菌叢構成の乱れ (disbiosis) による慢性炎症等の関連が指摘されている[53, 54, 56, 58, 99, 103]。例えば、尾上ら[58]は、GF、Cvdラット、ならびに、*Escherichia coli*、*Enterococcus faecium*、*Bacteroides* 属と *Clostridium* 属の数菌株 (計 10 菌株) を定着させたノトバイオート (GB) ラットを用いて、DMHによるACF形成の比較を行い、

がん化に関与すると考えられている 4 個以上のクリプトからなる ACF 数が GB ラットで最も高いことを示している。GB ラットに定着させた菌は、フェカペンタンやインドール派生物等の DNA 損傷誘発物質の産生、あるいは、結腸に到達した発がん性物質の代謝物の再活性化にかかわる β -glucuronidase 活性を有する菌であり、これらの菌の定着が ACF の悪性を促進することが示された。Reddy ら[56]は、 β -glucuronidase 活性が高い *Clostridium perfringens* を定着させた GB ラットでは、GF ラットに比べ AOM による大腸発がん率が高いことを示し、特定の細菌が関与する可能性を報告している。Arthur ら[103]は、腸管内での炎症状態により腸内細菌叢のバランスが崩れ、特にコリバクチンを産生する *pks*⁺大腸菌が増殖し、これが細胞にダメージを与え、大腸がんの発生や促進に関与することを報告している。また、腸内菌叢の乱れ (dysbiosis) が色々な疾患、例えば慢性炎症からの大腸がんの発生に関与していることが注目されている[53, 54]。一方、がん化の促進ばかりでなく、抑制的に働く菌に関する報告も多く、例えば、ある種の乳酸産生菌ががんの悪性化や DNA 損傷 (イニシエーションやプロモーション) の抑制に関与していることが明らかになっている[58, 101, 122-124]。このように、腸内菌叢構成の変化が疾病やその抑制に関わっていることが明らかになりつつあることから、将来的には、腸内菌叢の統御により、大腸発がんを予防あるいは抑制できる可能性がある。

本研究において、DMH 投与後早期の段階で、ラット結腸上皮細胞に生じる細胞遺伝学的な変化に対する腸内細菌定着の影響を明らかにした。すなわち、肝臓および結腸における DNA 損傷度は GF と Cvd ラットで変わらなかったが、結腸のアポトーシス頻度、小核頻度および代償性の細胞増殖は GF ラットに比べ Cvd ラットでより高く、かつ、より早いタイミングで認められた。これは、Cvd ラットでは GF ラットに比べ結腸上皮細胞の細胞回転が速いこと[110]が大きく影響していると考えられた。本研究の結果は、DNA が傷ついた場合、腸内細菌叢の定着による速い細胞回転が小核生成を加速化したことを示す初めての報告である。

以上のように、ラット結腸小核試験やコメット試験等、複数のエンドポイントを用いることにより、腸内細菌叢の遺伝毒性に及ぼす影響を評価することができた。これは、開発した *in vivo* 結腸小核試験が大腸発がんの機序解明に有用なツールであることを示唆するものである。

総括

遺伝毒性試験は、発がんのイニシエーション段階における遺伝学的な傷害（遺伝子突然変異や染色体異常）を検出する試験系であり、新規の医薬品、医薬部外品、農薬、食品添加物等の申請に際しては、実施が義務付けられている。単一の試験で全ての遺伝毒性を検出することは不可能であり、*in vitro* および *in vivo* の複数の試験系を組み合わせるバッテリー法が一般的である。標準的な組み合わせのうち、*in vivo* 試験として一般的に行われているのは、げっ歯類の造血細胞を用いる小核試験であり、手技の汎用性が高く、広範な物質の染色体異常誘発性を検出できる優れた試験である。しかし、活性を有する物質の骨髄への暴露が十分でない場合、被験物質の遺伝毒性を適切に評価できないという限界もある。また、遺伝毒性のポテンシャルの有無は評価できるが、発がんの標的臓器における小核誘発性を評価することはできない。発がんのリスク評価における証拠の重み付け（weight of evidence）の観点から、発がん標的臓器における遺伝毒性評価は重要である。大腸や胃は、ヒトにおけるがんの罹患率や死亡率が高い部位である[19, 20]。消化管を評価対象とする *in vivo* 試験としては、これまでにコメット試験[11]、トランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験[12]、胃を用いる不定期 DNA 合成試験[10]等が開発され、前 2 者は OECD でテストガイドライン化されている。しかし、消化管を標的として染色体異常を検出する試験系は確立されていない。染色体異常はがん細胞の多くに見出され、特にがんの増殖と悪性化に深い関係があると考えられている[33-37]。そこで、本研究では、げっ歯類の消化管において染色体異常誘発性を評価する小核試験法を開発し、その有用性を検討した。

（1）第 1 章では、マウスを用い、結腸の小核観察に適した単離細胞を得る手法を検討し、新規な結腸小核試験法を開発した。結腸をガラス棒に裏返して EDTA 処理することにより、損傷の少ない上皮細胞懸濁液を得ることができた。大腸を標的とする発がん物質の DMH および骨髄小核試験の陽性対照物質として使用される MMC を用いて、結腸における小核頻度を観察した結果、結腸上皮の細胞回転から予測した投与 72 および 96 時間後に小核頻度の用量依存的増加が認められ、これらの物質の結腸における小核誘発性を検出することができた。また、DMH 投与による結腸小核頻度の経時変化から、至適標本観察時期は投与 72-96 時間後であることが判明した。一方、同一動物で実施した末梢血小核試験では陰性となり、発がんの標的臓器で特異的に陽性となることが判明した。さらに、結腸を標的としない発がん物質の 1,1-DMH は結腸小核試験で陰性を示し、本手法の精度（陰性の物質を陰性と判定する特異性）を示唆する結果が得られた。以上より、結腸で小核誘発性を検出する試験系の基礎的なデータを得ることができた。

（2）新規に開発した試験法の妥当性については、複数の化合物を用いて検出力を確

認するとともに、複数の機関で施設内および施設間で結果を再現できることを確認する必要がある。そこで、第2章では、開発した小核試験法を複数の機関に技術移転し、国内5機関で本試験法のバリデーションを実施した。第1章にて小核頻度の増加が確認された DMH および MMC に加え、結腸を含む多臓器を標的とする発がん物質の MNU を用いて結腸小核試験を実施した。その結果、単回投与 96 時間後に全ての機関で 3 物質ともに陽性結果となり、施設間再現性が得られた。MMC の経時変化試験において、結腸小核頻度は、48 時間後に比べ 72 および 96 時間後で高い値を示し、前章の結果と同様に、72 あるいは 96 時間後に陽性として検出されることが確認された。また、用量依存性試験において、いずれの化合物も用量依存的な小核頻度の増加を示した。同一施設内で 2 回の用量依存性試験を行い、施設内再現性も確認された。以上より、新規に開発したマウス結腸小核試験法が結腸を標的とする発がん物質の検出に有効な手法であることが検証された。

(3) 第3章では、マウスで開発した結腸小核試験の手法を、一般毒性試験で汎用されているラットの腺胃および結腸を用いる小核試験系に発展させた。ラットでの試験系が確立できれば、毒性試験と同一動物を用いて複数のエンドポイントの同時評価が可能となり、毒性と遺伝毒性を含めた総合的なリスク解析が可能となると共に、実験動物数の削減に貢献できる。本研究では、ラットに胃発がん物質の MNU や MNNG、あるいは大腸発がん物質の DMH を単回経口投与することにより、それぞれの標的臓器において、小核頻度の有意な増加が認められた。このことから、腺胃および結腸を用いる小核試験は、これらの部位を標的とする発がん物質の検出に有用であることが示された。また、同じ動物で骨髄小核試験を実施した結果、MNU 投与では腺胃と骨髄のいずれにおいても陽性を示したが、MNNG 投与では骨髄で陰性、腺胃で陽性であった。経口投与された被験物質が直接高濃度で接触する腺胃を用いる小核試験は、MNNG のように不安定で寿命が短く、骨髄に到達しにくい物質を検出するのに有効であることが示唆された。また、腺胃および結腸において、発がん物質単回投与後アポトーシスが増加した時間帯には細胞増殖抑制が起こり、アポトーシスが減少して細胞増殖活性が回復すると共に小核頻度が増加したことから、本手法ではアポトーシスではなく、染色体異常を持つ細胞が分裂して生じた小核保有細胞を検出していることが示された。小核頻度のピークは腺胃では投与 48-96 時間後（用量の増加に依存して遅れる傾向）、結腸では投与 96 時間前後に認められたことから、小核の解析は被験物質の単回投与 48-96 時間後にサンプリングするのが適していることが示された。さらに、腺胃および結腸のいずれにおいても、Ki-67 陽性細胞数と EdU 標識細胞数の経時変化が類似していたことから、細胞増殖抑制の有無は、EdU 標識のような核酸類似体による標識法を用いずに Ki-67 免疫染色法を適用できる可能性が示された。

(4) 第4章では、開発したラット結腸小核試験を応用し、大腸発がんのイニシエー

シオン段階において腸内細菌の及ぼす影響について検討した。ヒトの腸内には多種多様な細菌が存在しており、菌との共生は宿主の生理学的な恒常性維持に重要であるが、近年、腸内細菌が大腸がんを含む種々の消化管疾患に関わっていることが明らかにされつつある[53, 54]。そこで、無菌（GF）ラットおよび通常化（Cvd）ラットに DMH を単回投与し、結腸における DNA 損傷および小核誘発性と共に、アポトーシスならびに細胞増殖活性を比較検討した。DMH は肝臓で代謝活性化されることから、肝臓における DNA 損傷性も調べた。その結果、結腸および肝臓における DNA 損傷に腸内細菌叢の有無の影響は認められなかったが、結腸の小核頻度、アポトーシス頻度および代償性の細胞増殖は Cvd ラットでより高く、かつ、より早いタイミングで認められた。これは、Cvd ラットでは GF ラットに比べ結腸上皮細胞の細胞回転が速いこと [110] が大きく影響していると考えられた。本研究の結果は、DNA が傷ついた場合、腸内細菌叢の定着による速い細胞回転が小核生成を加速化したことを示す初めての報告であり、結腸小核試験が大腸がんの機序解明に有用なツールであることを示唆するものである。

以上の研究により、げっ歯類の結腸や胃を用いた *in vivo* 消化管小核試験系を確立することができ、消化管において遺伝毒性を発揮する物質の検出に有用であることが示された。結腸から腺胃へ、また、マウスからラットへ適用拡大できたことは、本手法の適用範囲が広いことを示している。特にラットでの試験が可能となったことは、一般的に行われているラットを用いる毒性試験に遺伝毒性の指標を組み込むことが可能となり、総合的なリスク評価の精度を高めることにつながる。さらに多くの化合物を用いた本試験系の検出力および特異性の検証により、医薬品や食品等、特に経口摂取する物質の評価に際しては、セカンド *in vivo* 試験の一つとして活用可能な試験に発展していくものとする。また、ヒトへのリスクを考える場合、発がん臓器での遺伝毒性機序の解析が必須であり、ここで新しく開発した試験法が消化管を標的とする発がん性の機序解明に重要な役割を果たせるものとする。

Summary

Cancer is the first leading cause of death in Japan. A series of events, such as genetic alterations including DNA or chromosome damage, continuous proliferation of the aberrant cells, and malignant progression lead to the development of cancer. Exposure to environmental carcinogens that induces genetic alterations is a cancer risk. Genotoxicity tests can detect 'Genotoxic compounds' that have the potential to induce genetic alterations, such as DNA damage, gene mutation, or chromosome aberration. Therefore, genotoxicity tests are useful for the initial screening of carcinogens. When applying for regulatory approval of newly developed chemical compounds, such as pharmaceuticals, quasi-drugs, pesticides, and food additives, it is essential to submit the results of genotoxicity tests conducted in compliance with the testing guidelines. In general, several *in vitro* and *in vivo* tests are conducted, and the results are comprehensively interpreted to assess the genotoxicity of the test compound. As a standard *in vivo* test, a rodent micronucleus (MN) test with hematopoietic cells (in bone marrow or peripheral blood) is commonly performed. However, it is difficult for some chemicals to reach the bone marrow because they are poorly absorbed, short-lived, or converted to unstable metabolites in the liver. For appropriate assessment of genotoxicity, it is necessary to thoroughly consider the exposure of the active substance to the target tissues evaluated. In humans, it is known that both colon and stomach cancers cause high morbidity and mortality. The gastrointestinal (GI) tract is the first contact site when chemicals are ingested orally. Therefore, it is important to assess the risk of genotoxicity in the GI tract. Among *in vivo* genotoxicity tests using tissues other than bone marrow, a comet assay and a gene mutation test using transgenic animals have been standardized for detecting DNA damage and gene mutation in any tissues, including the GI tract. Nevertheless, test systems for detecting chromosomal aberrations using the GI tract have not yet been standardized. Chromosomal aberrations are found in many cancer cells and are believed to be closely related to the proliferation and malignant progression of cancer. Therefore, an *in vivo* GI tract MN test was developed to detect the induction of chromosomal aberrations in the rodent GI tract, and its usefulness was evaluated in this study.

In chapter 1, the development of the mouse colon MN test, particularly the method to isolate single cells from the colonic epithelium was described. The cells with less damage were obtained by the treatment of colon with a chelating agent, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Two model chemicals were used in this study. One was the colon-targeted carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH), and the other was a cross-linking agent, mitomycin C (MMC), usually used as a positive control in the bone marrow MN test. These chemicals were administered once to mice intraperitoneally, and the colon was

dissected at 72 h and/or 96 h after treatment. Both DMH and MMC increased the frequencies of micronucleated (MNed) cells in the colon in a dose-dependent manner. These results suggested that the method developed could be a useful tool in detecting chromosomal aberrations in the mouse colon.

In chapter 2, a validation study was conducted to confirm the transferability and intra- and inter-laboratory reproducibility of the new method. Five laboratories collaborated and conducted the colon MN test with 3 model chemicals: DMH, MMC, and *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU), after technical transfer. All laboratories obtained positive results with these chemicals in the mouse colon MN test, indicating that intra- and inter-laboratory reproducibility was confirmed. This was not a full-scale validation study; however, the results show that the colon MN test is a reproducible and robust method to detect clastogenicity of chemicals in the mouse colon.

In chapter 3, the MN test method was expanded to use the glandular stomach and colon of rats which are widely used in general toxicity studies. When rats were treated once by oral gavage with stomach-targeted carcinogens, MNU or *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG), the frequencies of MNed cells in the glandular stomach increased significantly. This is the first report that shows a dose-dependent increase in the frequencies of MNed cells in the glandular stomach. A significant increase in MNed cell frequency in the rat colon was also observed after single administration of DMH by oral gavage. These results show that the GI tract MN test method was successfully established using rats. The use of rat models will make it easy to integrate the rat GI tract MN test into general toxicity studies. This can facilitate the sharing of animals, potentially leading to a reduction in the overall numbers of animals used in experiments. The reduction of experimental animal use is one of the principles of the 3Rs (replacement, reduction, and refinement of animal studies).

In chapter 4, the rat colon MN test was conducted to understand the mechanism of colon carcinogenesis, which may be correlated with intestinal bacteria. A wide variety of bacteria are present in the human intestine, and symbiosis between intestinal bacteria and the host plays an important role in host homeostasis. It is, however, becoming clear that intestinal bacteria are involved in various GI diseases, including colon cancer. In the present study, comet assays and MN tests were conducted using the colons of germ-free (GF) and conventionalized (Cvd) rats after a single subcutaneous injection of DMH. DNA damage was also evaluated in the liver comet assay, since DMH is metabolized and activated in this organ. In addition, incidences of apoptosis and cell proliferation were determined. As a result, the maximum MN frequency, apoptosis incidence, and indices of compensatory cell proliferation

in the colon were observed at earlier times and were greater in Cvd rats than in GF rats. There was, however, no significant difference in the DNA damage in the liver and colon. This is the first report showing that rapid cell proliferation in the colons of rats with bacterial colonization of the intestine has accelerated the production of MNed colonic cells. These results suggest that the rat colon MN test is a useful tool for mechanistic analysis of colon carcinogenesis.

In summary, an *in vivo* GI tract MN test using the rodent colon and stomach was developed. The preparation method for MN slides using the GI single cells isolated by the treatment with only EDTA is novel. Intra- and inter-laboratory reproducibility in the colon MN tests using mice was confirmed in the validation study. The method was expanded from colon to stomach and from mice to rats, which demonstrated its robustness. Particularly, the GI tract MN test using rats makes it possible to incorporate the genotoxic endpoint into general toxicity studies using rats. This leads not only to an increase in the accuracy of comprehensive risk assessment with other toxicological information, but also to animal welfare benefits. Furthermore, analysis of genotoxic mechanisms in the carcinogenicity target site is essential to define the risk to humans. Therefore, the *in vivo* GI tract MN test developed here will play an important role in elucidating the mechanism of carcinogenesis in the GI tract.

謝辞

本論文の作成にあたり、終始ご指導、ご助言を賜りました静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 環境科学専攻 生体機能学研究室 下位 香代子 教授に心から感謝いたしますとともに、厚く御礼申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、副査としてご指導、ご助言を賜りました静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 環境科学専攻 光環境生命科学研究室 伊吹 裕子 教授、環境科学専攻 生態発生遺伝学研究室 小林 亨 教授、食品栄養科学専攻 食品衛生学研究室 増田 修一 教授に深く感謝申し上げます。

本研究において、消化管小核試験の開発ならびにその投稿論文作成にあたり、多大なるご指導、ご助言を賜り、本論文のご校閲をも賜りました makoto international consulting 林 真 博士に心より感謝いたしますとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究において、消化管小核試験の開発に多大なるご助言を賜り、また、本論文の作成を勧めてくださいました株式会社 LSI メディエンス 濱田 修一 博士に深く感謝申し上げます。

本研究において、結腸小核試験のバリデーションにご参加、ご協力いただきました日本環境変異原学会 哺乳動物試験 (MMS) 研究会の皆様に感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多くのご指導、ご助言を賜りました元 株式会社ヤクルト本社中央研究所 諸富 正己 博士、野本 康二 博士(現 東京農業大学教授)、大澤 敏男 博士、安武 信義 博士、ならびに故 徳光 崇 博士に深く感謝申し上げます。

本研究において、高度な実験技術で支えてくださった多田(権田) 真紀氏、惜しみないご支援とご協力を賜りました株式会社ヤクルト本社 中央研究所 岡田 恵美子 博士、藤石 洋平 氏、成見 香瑞範 博士、小林 稔秀 安全性研究所長、ならびに安全性研究所の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文の執筆活動のため陰で支えてくれた夫に心から感謝いたします。

引用文献

- [1] 厚生労働省 平成 29 年人口動態統計月報年計（概数）の概況，死因， p10, <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai17/index.html>
- [2] Kee, M.: Cancer causation in booklet form. *Nature*, **303**, 648 (1983).
- [3] Shubik, P., Berenblum, I.: A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Br. J. Cancer*, **1**, 383-391(1947).
- [4] Ushijima, T.: Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, **5**, 223-231 (2005).
- [5] Zhang, C. Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J. M., Jackson, E. K., Liu, S., Meyerson, M., Pellman, D.: Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature*, **522**, 179-184 (2015).
- [6] ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirement for Registration of Pharmaceutical for Human Use) Harmonised Tripartite Guideline, Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, S2 (R1), Current Step 4 version dated 9 November 2011.
- [7] 林 真: ”小核試験－実験法からデータの評価まで－,増補版”, 株式会社サイエンティスト社, 東京, pp1-100 (1999).
- [8] 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 26 September 2014.
- [9] Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo (Test Guideline 486), in: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Adopted on 21st July 1997.
- [10] Furihata, C., Yamawaki, Y., Jin, S. S., Moriya, H., Kodama, K., Matsushima, T., Ishikawa, T., Takayama, S., Nakadate, M.: Induction of unscheduled DNA synthesis in rat stomach mucosa by glandular stomach carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 1327-1333 (1984).
- [11] In vivo mammalian alkaline comet assay (Test Guideline 489), in: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Adopted on 26 September 2014.
- [12] 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.
- [13] Randerath, K., Reddy, M. V., Gupta, R. C.: ³²P –labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6126-6129 (1981).
- [14] 松田知成: DNA 付加体の分析方法－LC/ESI/MS/MS はポストラベルを越えたか? *Environ. Mutagen. Res.*, **26**, 199-201 (2004).

- [15] Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Blakey, D. H., Stephen D. Dertinger, S. D., Abramsson-Zetterberg, L., Krishna, G.: 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**, 10-30 (2007).
- [16] Morita, T., MacGregor, J. T., Hayashi, M.: Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. *Mutagenesis*, **26**, 223-230 (2011).
- [17] Uno, Y., Morita, T., Luijten, M., Beevers, C., Hamada, S., Itoh, S., Ohyama, W., Takasawa, H.: Recommended protocols for the liver micronucleus test: Report of the IWGT working group. *Mutat. Res.*, **783**, 13-18 (2015).
- [18] Uno, Y., Morita, T., Luijten, M., Beevers, C., Hamada, S., Itoh, S., Ohyama, W., Takasawa, H.: Micronucleus test in rodent tissues other than liver or erythrocytes: Report of the IWGT working group. *Mutat. Res.*, **783**, 19-22 (2015).
- [19] Cancer fact sheets/ all cancers fact sheet 2018.: Cancer Today/ World Health Organization / International Agency for Research on Cancer. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>, last updated January 2019 (accessed 25th January 2019).
- [20] 2018年のがん統計予測, 国立がん研究センター, がん登録・統計, グラフデータベース, http://gdb.ganjoho.jp/graph_db/gdb9 (accessed 25th January 2019).
- [21] Kim, M. K., Sasaki, S., Otani, T., Tsugane, S.: Dietary patterns and subsequent colorectal cancer risk by subsite: A prospective cohort study. *Int. J. Cancer*, **115**, 790-798 (2005).
- [22] Kim, M. K., Sasaki, S., Sasazuki, S., Tsugane, S.: Prospective study of three major dietary patterns and risk of gastric cancer in Japan. *Int. J. Cancer*, **110**, 435-442 (2004).
- [23] Takahashi, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Enami, T., Hasegawa, T., Hayashi, Y.: Dose-dependent promoting effects of sodium chloride (NaCl) on rat glandular stomach carcinogenesis initiated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis*, **15**, 1429-1432 (1994).
- [24] Sugimura, T., Fujimura, S.: Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature*, **216**, 943-944 (1967).
- [25] Druckrey, H.: Production of colonic carcinomas by 1,2-dialkylhydrazines and azoxyalkanes. in: Walter, J., Burdette, A. B. (Eds.), *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium*, Charles C Thomas, Springfield, pp.267-279 (1970).
- [26] Pozharisski, K. M., Kapustin, Y. M., Likhachev, A. J., Shaposhnikov, J. D.: The mechanism of carcinogenic action of 1,2-dimethylhydrazine (SDMH) in rats. *Int. J. Cancer*, **15**, 673-683 (1975).
- [27] Maskens, A. P.: Histogenesis and growth pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **36**, 1585-1592 (1976).

- [28] U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.: Toxicological profile for hydrazines.
- [29] 大垣比呂子, 若林敬二: ヘテロサイクリックアミンの発癌性. 代謝, **26**, 臨時増刊号, 癌, 3-11 (1989).
- [30] Sugimura, T, Wakabayashi, K, Nakagama, H, Nagao, M.: Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, **95**, 290-299 (2004).
- [31] Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tanaka, T.: β -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, **96**, 69-76 (2005).
- [32] Hakura, A., Seki, Y., Sonoda, J., Hosokawa, S., Aoki, T., Suganuma, A., Kerns, W. D., Tsukidate, K.: Rapid induction of colonic adenocarcinoma in mice exposed to benzo[a]pyrene and dextran sulfate sodium. *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 2997-3001 (2011).
- [33] Radman, M., Jeggo, P., Wagner, R.: Chromosomal rearrangement and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **98**, 249-264 (1982).
- [34] Inoue, M., Sawada, N., Matsuda, T., Iwasaki, M., Sasazuki, S., Shimazu, T., Shibuya, K., Tsugane, S.: Attributable causes of cancer in Japan in 2005—systematic assessment to estimate current burden of cancer attributable to known preventable risk factors in Japan. *Annals of Oncology*, **23**, 1362-1369 (2012).
- [35] Schwechheimer, K., Cavenee, W. K.: Genetics of cancer predisposition and progression. *Clin. Investig.*, **71**, 488-502 (1993).
- [36] 祖父尼俊雄: 染色体異常の意義. “染色体異常試験—メカニズムから試験法、国際的標準化法まで—”, (株)サイエンティスト社, 東京, pp.1-6 (2005).
- [37] Gisselsson, D.: Chromosomal instability in cancer: causes and consequences. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, **5 (3)**, 236-243 (2001).
- [38] Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr.: Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow. *Mutat. Res.*, **127**, 129-137 (1984).
- [39] Goldberg, M. T., Blakey, D. H., Bruce, W. R.: Comparison of effects of 1,2-dimethylhydrazine and cyclophosphamide on micronucleus incidence in bone marrow and colon. *Mutat. Res.*, **109**, 91-98 (1983).
- [40] Wargovich, M. J., Medline, A., Bruce, W. R.: Early histopathologic events to evolution of colon cancer in C57BL/6 and CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**, 125-131 (1983).
- [41] Wargovich, M. J., Goldberg, M. T., Newmark, H. L. Bruce, W. R.: Nuclear aberrations as a short-term test for genotoxicity to the colon: evaluation of nineteen agents in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**, 133-137 (1983).

- [42] Ronen, A., Heddle, J. A.: Site-specific induction of nuclear anomalies (apoptotic bodies and micronuclei) by carcinogens in mice. *Cancer Res.*, **44**, 1536-1540 (1984).
- [43] Goldberg, M. T., Schop, R. N.: Assessment of 1,2-dimethylhydrazine in bone marrow micronucleus assay: variations in protocol and response. *Environ. Mol. Mutagen.*, **17**, 155-162 (1991).
- [44] Vanhauwaert, A., Vanparys, P., Kirsch-Volders, M.: The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. *Mutagenesis*, **16**, 39-50 (2001).
- [45] Poul, M., Jarry, G., Elhkim, M.O., Poul, J.: Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food. Chem. Toxic.*, **47**, 443-448 (2009).
- [46] Ohyama, W., Urakawa, M., Tokumitsu, T.: Chromosome aberrations induced by MMC in the intestinal epithelial cells of mice. *Mutat. Res.*, **272**, 278 (1992). (Selected abstracts of the 21st annual meeting of Japanese Environmental Mutagen Society)
- [47] 松下秀鶴 監修, 後藤純雄, 西村哲治編集: 1,1-Dimethylhydrazine. “化学物質の発がん・変異原性データ集, 再版”, 株式会社アイピーシー, 東京, pp. 88, (1988).
- [48] 大山ワカ子, 徳光崇: マウス腸上皮細胞を用いる小核試験法. *Environ. Mut. Res. Commun.*, **17**, 265-269 (1996).
- [49] 松下秀鶴 監修, 後藤純雄, 西村哲治編集: N-methyl-N-nitrosourea. “化学物質の発がん・変異原性データ集, 再版”, 株式会社アイピーシー, 東京, pp.157-160 (1988).
- [50] Ohyama, W., Gonda, M., Miyajima, H., Kondo, K., Noguchi, T., Yoshida, J., Hatakeyama, S., Watabe, E., Ueno, Y., Hayashi, M., Tokumitsu, T.: Collaborative validation study of the in vivo micronucleus test using mouse colonic epithelial cells. *Mutat. Res.*, **518**, 39-45 (2002).
- [51] Ohyama, W., Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Yasutake, N.: 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**, 141-147 (2013).
- [52] Umesaki, Y.: Use of gnotobiotic mice to identify and characterize key microbes responsible for the development of the intestinal immune system. *Proc. Jpn. Acad.*, **90**, 313-332 (2014).
- [53] Yamamoto, M., Matsumoto, S.: Gut microbiota and colorectal cancer. *Genes Environ.*, **38**, 11 (2016).
- [54] Schwabe, R. F., Jobin, C.: The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 800-812 (2013).
- [55] Reddy, B. S., Weisburger, J. H., Narisawa, T., Wynder, E. L.: Colon carcinogenesis in germ-free rats with 1,2-dimethylhydrazine and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.*, **34**, 2368-2372 (1974).

- [56] Reddy, B. S., Narisawa, T., Wright, P., Vukusich, D., Weisburger, J. H., Wynder, E. L.: Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res.*, **35**, 287-290 (1975).
- [57] Reddy, B. S., Narisawa, T., Weisburger, J. H.: Colon carcinogenesis in germ-free rats with intrarectal 1,2-dimethylhydrazine and subcutaneous azoxymethane. *Cancer Res.*, **36**, 2874-2876 (1976).
- [58] Onoue, M., Kado, S., Sakaitani, Y., Uchida, K., Morotomi, M.: Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Cancer Lett.*, **113**, 179-186 (1997).
- [59] Ohyama, W.: Markedly enhanced micronucleus induction by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in colonic cells of rats with bacterial colonization in the intestine. *Mutat. Res.*, **838**, 1-8 (2019).
- [60] Duncan, A. M. V., Heddle J. A., Blakey, D. H.: Mechanism of induction of nuclear anomalies by gamma-radiation in the colonic epithelium of the mouse. *Cancer Res.*, **45**, 250-252 (1985).
- [61] Blakey, D. H., Duncan, A. M. V., Wargovich, M. J., Goldberg, M. T., Bruce, W. R., Heddle, J.: Detection of nuclear anomalies in the colonic epithelium of the mouse. *Cancer Res.*, **45**, 242-249 (1985).
- [62] Zhurkov, V. S., Sycheva, L. P., Salamatova, O., Vyskubenko, I. F., Feldt, E. G., Sherenesheva, N. I.: 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).
- [63] Sycheva, L. P.: Evaluation of organ specificity of mutagenic effects of cyclophosphamide in mice by micronucleus test. *Bull. Exp. Biol. Med.*, No.4, 374-376 (2001) (translated from *Byull. Eksp. Biol. Med.*, **131**, No.4, 445-447).
- [64] Coffing, S., Engel, M., Dickinson, D., Thiffeault, C., Spellman, R., Shutsky, T., Schuler, M.: The rat gut micronucleus assay: a good choice for alternative in vivo genetic toxicology testing strategies. *Environ. Mol. Mutagen.*, **52**, 269-279 (2011).
- [65] Tokumitsu, T.: Chromosomal study on mouse intestinal mucosal cells, with a note on aberrations induced by a carcinogen, MNNG. *Proc. Japan Acad.*, **52**, 513-516 (1976).
- [66] Ohyama, W., Tokumitsu, T.: Chromosome observation of mouse intestinal epithelial cells. *Mutat. Res.*, **252**, 101 (1991). (Selected abstracts of the 18th annual meeting of Japanese Environmental Mutagen Society)
- [67] Ohyama, W., Urakawa, M., Tokumitsu, T.: Chromosome aberrations in the intestinal epithelial cells of mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat. Res.*, **292**, 287 (1993). (Selected abstracts of the 20th annual meeting of Japanese Environmental Mutagen Society)

- [68] Cameron, I. L.: Cellular and molecular renewal in the mammalian body. in: Cameron, I. L., Thrasher, J. D. (Eds.), Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body, Academic Press, New York, pp. 45-85 (1971).
- [69] Potten, C. S., Li, Y. Q., O'Connor, P. J., Winton, D. J.: A possible explanation for the differential cancer incidence in the intestine, based on distribution of cytotoxic effects of carcinogens in the murine large bowel. *Carcinogenesis*, **13**, 2305-2312 (1992).
- [70] Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr.: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, **245**, 245-249 (1990).
- [71] Morrison, V., Ashby, J.: High resolution rodent bone marrow micronucleus assays of 1,2-dimethylhydrazine: implication of systemic toxicity and individual responders. *Mutagenesis*, **10**, 129-135 (1995)
- [72] Morita, T., Asano, N., Awogi, T., Sasaki, Y. F., Sato, S., Shimada, H., Sutou, 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/JEMS/MMS. *Mutat. Res.*, **389**, 3-122 (1997)
- [73] Cluet, I., Melcion, C., Cordier, A.: Lack of predictivity of bone marrow micronucleus test versus testis micronucleus test: comparison with four carcinogens. *Mutat. Res.*, **292**, 105-111 (1993).
- [74] Matsuoka, A., Yamazaki, N., Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T.: 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**, 223-236 (1993).
- [75] Okada, E., Fujiishi, Y., Yasutake, N., Ohyama, W.: Detection of micronucleated cells and gene expression changes in glandular stomach of mice treated with stomach-targeted carcinogens. *Mutat. Res.*, **657**, 39-42 (2008).
- [76] Leaver, D. D., Swann, P. F., Magee, P. N.: The induction of tumours in the rat by a single oral dose of N-nitrosomethylurea. *Brit. J. Cancer*, **23**, 177-187 (1968).
- [77] Hirota, N., Aonuma, T., Yamada, S., Kawai, T., Saito, K., Yokoyama, T.: Selective induction of glandular stomach carcinoma in F344 rats by N-methyl-N-nitrosourea. *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 634-638 (1987).
- [78] US Department of Health, Education Welfare, in: Registry of toxic effects of chemical substances, Washington DC, US Government Printing Office, 1975, pp.1184.
- [79] US Department of Health, Education Welfare, in: Registry of toxic effects of chemical substances, Washington DC, US Government Printing Office, 1975, pp.589.
- [80] US Department of Health, Education Welfare, in: Registry of toxic effects of chemical substances, Washington DC, US Government Printing Office, 1975, pp.616.
- [81] Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr.: An application of

- acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **120**, 241-247 (1983).
- [82] Kastenbaum, M. A., Bowman, K. O.: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.*, **9**, 527-549 (1970).
- [83] Furihata, C., Matsushima, T.: In vivo short-term assays for tumor initiation and promotion in the glandular stomach of Fischer rats. *Mutat. Res.*, **339**, 15-35 (1995).
- [84] Furihata, C., Ikui, E., Matsushima, T.: DNA damaging and cell proliferative activity of 1-methyl-1-nitrosourea in rat glandular stomach mucosa. *Mutat. Res.*, **348**, 169-173 (1995).
- [85] Wakata, A., Miyamae, Y., Sato, S., Suzuki, T., Morita, T., Asano, N., Awogi, T., Kondo, K., Hayashi, M.: 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**, 84-100 (1998).
- [86] 若田明裕: げっ歯類の培養細胞と個体を用いる小核試験法の検討. *Environ. Mutagen Res.*, **24**, 99-109 (2002).
- [87] Watanabe, M., Honda, S., Hayashi, M., Matsuda, T.: Mutagenic effects of combinations of chemical carcinogens and environmental pollutants in mice as shown by the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **97**, 43-48 (1982).
- [88] Natarajan, A. T., Obe, G.: How do in vivo mammalian assays compare to in vitro assays in their ability to detect mutagens? *Mutat. Res.*, **167**, 189-201(1986).
- [89] Ashby, J., Mirkova, E.: The activity of MNNG in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutagenesis*, **2**, 199-204 (1987).
- [90] CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test): Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutat. Res.*, **278**, 83-98 (1992).
- [91] Brault, D., Bouilly, C., Renault, D., Thybaud, V.: Tissue-specific induction of mutations by acute oral administration of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and β -propiolactone to the MutaTM mouse: preliminary data on stomach, liver and bone marrow. *Mutat. Res.*, **360**, 83-87 (1996).
- [92] Weistler, O., Deimling, A. V., Kabori, O., Kleihues, P.: Location of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced gastrointestinal tumors correlates with thiol distribution. *Carcinogenesis*, **4**, 879-883 (1983).
- [93] Kabori, O., Schmerold, I., Ludeke, B., Ohgaki, H., Kleihues, P.: 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**, 2271-2274 (1988).

- [94] Jensen, D. E.: Denitrosation as a determinant of nitrosocimetidine in vivo activity. *Cancer Res.*, **43**, 5258-5267 (1983).
- [95] Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Yasutake, N., Ohyama, W.: Simultaneous micronucleus analyses of rat glandular stomach, colon and bone marrow using a four-day oral treatment regimen. *Mutat. Res.*, **758**, 87-94 (2013).
- [96] Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., Stein, H.: Cell cycle analyses of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunology*, **133**, 1710-1715 (1984).
- [97] Xu, J., Gordon, J. I.: Honor thy symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 10452-10459 (2003).
- [98] Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, Fraser-Liggett, M. C., Knight, R., Gordon, J. I.: The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, **449**, 804-810 (2007).
- [99] Gustafsson, B.: The physiological importance of the colonic microflora. *Scand. J. Gastroenterol.*, **Suppl. 77**, 117-131 (1982)
- [100] Van Tassel, R. L., MacDonald, D. K., Wilkins, T. D.: Production of a fecal mutagen by *Bacteroides* spp. *Infect. Immun.*, **37**, 975-980 (1982).
- [101] 諸富正己: 発癌物質の生成と分解. トキシコロジーフォーラム, **9**, 117-127 (1986).
- [102] Cuevas-Ramos, G., Petit, C. R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., Nougaurede, J. P.: *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 11537-11542 (2010).
- [103] Arthur, J. C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J. M., Fan, T. J., Campbell, B. J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A. B., Rhodes, J. M., Stintzi, A., Simpson, K. W., Hansen, J. J., Keku, T. O., Fodor, A. A., Jobin, C.: Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*, **338**, 120-123 (2012).
- [104] Sasaki, Y. F., Saga, A., Akasaka, M., Ishibashi, S., Yoshida, K., Su, Y. Q., Matsusaka, N., Tsuda, S.: Organ-specific genotoxicity of the potent rodent colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and three hydrazine derivatives: difference between intraperitoneal and oral administration. *Mutat. Res.*, **415**, 1-12 (1998).
- [105] Sekihashi, K., Yamamoto, A., Matsumura, Y., Ueno, S., Watanabe-Akanuma, M., Kassie, F., Knasmuller, S., Tsuda, S., Sasaki, Y. F.: Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat. Res.*, **517**, 53-74 (2002).
- [106] Pozharisski, K. M., Shaposhnikov, J. D., Petrov, A. S., Likhachev, A. J.: Distribution and carcinogenic action of 1,2-dimethylhydrazine (SDMH) in rats. *Z. Krebsforsch. Klin. Onkol.*, **87**, 67-80 (1976).
- [107] Sohn, O. S., Ishizaki, H., Yang, C. S., Fiala, E. S.: Metabolism of azoxymethane,

- methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P4502E1. *Carcinogenesis*, **12**, 127-131 (1991).
- [108] Sohn, O. S., Fiala, E. S., Requejo, S. P., Weisburger, J. H., Gonzalez, F. J.: Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res.*, **61**, 8435-8440 (2001).
- [109] Fiala, E.: Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer*, **40**, 2436-2445 (1977).
- [110] Alam, M., Midtvedt, T., Uribe, A.: Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, **29**, 445-451 (1994).
- [111] Matsumoto, H.: Carcinogenicity of cycasin, its aglycone methylazoxymethanol, and methylazoxymethyl-glucosiduronic acid. in: Naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis, E. C. Miller et al. (Eds.), Japan. Sci. Press, Tokyo/Univ. Park Press, Baltimore, pp.67-77 (1979).
- [112] Weisburger, J. H.: Colon carcinogens: Their metabolism and mode of action. *Cancer*, **28**, 60-70 (1971).
- [113] Hawks, A., Magee, P. N.: The alkylation of nucleic acids of rat and mouse in vivo by the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Br. J. Cancer*, **30**, 440-447 (1974).
- [114] Kawai, Y., Morotomi, M.: Intestinal enzyme activities in germfree, conventional, and gnotobiotic rats associated with indigenous microorganisms. *Infect. Immun.*, **19**, 771-778 (1978).
- [115] Khoury, K. A., Floch, M. H., Hersh, T.: Small intestinal mucosal cell proliferation and bacterial flora in the conventionalization of the germfree mouse. *J. Exp. Med.*, **130**, 659-670 (1969).
- [116] Savage, D. C., Siegel, J. E., Snellen, J. E., Whitt, D. D.: Transit time of epithelial cells in the small intestines of germfree mice and ex-germfree mice associated with indigenous microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 996-1001 (1981).
- [117] den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker B. M.: The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.*, **54**, 2325-2340 (2013).
- [118] Park, J.h., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., Usui, Y., Hatano, N., Shinohara, M., Saito, Y., Murata, Y., Matozaki, T.: Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: role of short-chain fatty acids. *PLoS ONE*, **11** (5), e0156334 (2016).
- [119] Tsubouchi, S., Potten, C. S.: Recruitment of cells in the small intestine into rapid cell cycle by small doses of external gamma or internal beta-radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **48**, 361-369 (1985).
- [120] Queipo-Ortuno, M. I., Seoane, L. M., Murri, M., Pardo, M., Gomez-Zumaquero, J. M.,

- Cardona, F., Casanueva, F., Tinahones, F. J.: Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS ONE*, **8** (5), e65465 (2013).
- [121] Li, D., Chen, H., Mao, B., Yang, Q., Zhao, J., Gu, Z., Zhang, H., Chen, Y. Q., Chen, W.: Microbial biogeography and core microbiota of the rat digestive tract. *Sci. Rep.*, **7**, 45840 (2017).
- [122] Reddy, B. S., Rivenson, A.: Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.*, **53**, 3914-3918 (1993).
- [123] Kulkarni N., Reddy, B. S.: Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **207**, 278-283 (1994).
- [124] Wollowski, I., Ji, S. T., Bakalinsky, A. T., Neudecker C., Pool-Zobel, B. L.: Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *J. Nutr.*, **129**, 77-82 (1999).