

博士論文

トランスジェニック動物を用いる突然変異試験と多臓器小核試験の  
統合型遺伝毒性評価系に関する研究

Study on combination of the gene mutation test and the multiple organ  
micronucleus test using transgenic animals

2020年7月

堀 妃佐子

# 目次

略号一覧.....	1
序論.....	3
第1章 B[a]Pを用いたF344系 <i>gpt delta</i> ラット突然変異試験と多臓器小核試験の統合の検討.....	9
1-1 緒論.....	9
1-2 実験方法.....	10
1-2-1 被験物質.....	10
1-2-2 動物および飼育管理.....	10
1-2-3 用量設定および投与.....	11
1-2-4 組織および血液の採取.....	11
1-2-5 遺伝子突然変異試験.....	11
1-2-6 骨髄小核試験.....	12
1-2-7 肝臓小核試験.....	12
1-2-8 結腸小核試験.....	13
1-2-9 末梢血小核試験.....	13
1-2-10 病理組織学的検査.....	13
1-2-11 非 Tg 動物による小核試験.....	13
1-2-12 統計解析.....	14
1-3 結果.....	14
1-3-1 体重および臓器重量.....	14
1-3-2 遺伝子突然変異試験.....	14
1-3-3 小核試験.....	15
1-3-4 病理組織学的検査.....	15
1-3-5 非 Tg 動物における小核試験.....	15
1-4 考察.....	23
第2章 結腸発がん物質 PhIP および DMH を用いた F344 系ラット.....	28
多臓器反復小核試験.....	28
2-1 緒論.....	28
2-2 実験方法.....	28
2-2-1 被験物質.....	28
2-2-2 動物および飼育管理.....	28

2-2-3 短期投与小核試験	29
2-2-4 28日間反復投与小核試験	29
2-2-5 病理組織学的検査	30
2-2-6 統計解析	30
2-3 結果	30
2-3-1 短期投与小核試験	30
2-3-2 28日間反復投与小核試験	31
2-3-3 病理組織学的検査	31
2-4 考察	40
第3章 DMHを用いたF344系 <i>gpt delta</i> ラット突然変異試験と小核試験の統合法 検討	42
3-1 諸論	42
3-2 実験方法	42
3-2-1 被験物質	42
3-2-2 動物および飼育管理	42
3-2-3 用量設定および投与	42
3-2-4 組織および血液の採取	43
3-2-5 遺伝子突然変異試験	43
3-2-6 小核試験	43
3-2-7 病理組織学的検査	43
3-2-8 統計解析	43
3-3 結果	43
3-3-1 体重推移、臓器重量	43
3-3-2 遺伝子突然変異試験	44
3-3-3 小核試験	44
3-3-4 病理組織学的検査	44
3-4 考察	51
総括	52
謝辞	56
引用文献	57
主論文目録	67

## 略号一覧

AO	acridine orange
B[a]P	benzo[ <i>a</i> ]pyrene
BM	bone marrow
BPDE	benzo[ <i>a</i> ]pyrene diol epoxide
CA	chromosomal aberration
CAS	chemical abstracts service
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMH	1,2-dimethylhydrazine
DW	distilled water
EDTA	ethylenediamine-tetraacetic acid
ERY	erythrocytes
FBS	fetal bovine serum
<i>gpt</i>	guanine phosphoribosyltransferase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE	hematoxylin-eosin
HEP	hepatocytes
ICH	International Conference on Harmonization
JEMS	Japanese Environment Mutagen Society
MF	mutant frequency
MMS	Mammalian Mutagenicity Study Group
MN	micronucleus
MN-COL	micronucleated colonic cells
MN-HEP	micronucleated hepatocytes
MN-PCE	micronucleated polychromatic erythrocytes
MN-RET	micronucleated reticulocytes
MTD	maximum tolerated dose
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbons
PB	peripheral blood
PBS	phosphate-buffered saline
PCE	polychromatic erythrocytes
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine

3Rs	reduction, replacement, refinement
RET	reticulocytes
SD	standard deviation
Tg	Transgenic
6-TG	6-thioguanine

## 序論

先進国において我々は 10 万種類ほどの化学物質に囲まれ、それらの恩恵を受けて日常の生活を送っている。衣食住に関する多くの物質が存在しているが、ヒトが摂取する化学物質としては、医薬品、農薬、食品添加物を含めた食品関連物質等、多種多様である。そのうち、化学的に合成された物質は、その利便性ととも安全性が担保されたものが上市されるべきであると考えられ、多くの法律によって管理されている。例えば、医薬品であれば薬機法、農薬は農薬取締法、食品関連は食品衛生法である。これらの法律では、新規の化学物質を登録申請するとき、安全性を保証するために多くの安全性試験を行い、その結果の提出が義務づけられている。

このように、新規の化学物質に対する安全性を保証するために多くの試験が行われている。中でもがんは日本人の死因第 1 位と言うこともあり、新規の化学物質のがんを誘発する作用を評価することは重要である。しかし、多くの実験動物を用いてがん原性（がんを誘発する性質）を評価するには、数年単位の試験期間、数億円の経費が必要であり、全ての化学物質について試験することは現実的ではない。そこでこれまでも用いられてきたのが、発がん過程で生じる遺伝子に対する毒性変化を捉える遺伝毒性試験である。遺伝毒性の主要なエンドポイントとしては、遺伝子突然変異、DNA 損傷、染色体異常があり、これまでに各エンドポイントを評価する試験系がそれぞれ確立されている。現在汎用されている主な遺伝毒性試験を Table 1 に示す。

Table 1  
Types of genotoxicity tests.

	Endpoints of genotoxicity		
	Gene mutation	DNA damage	Chromosomal aberration
<i>in vitro</i>	Ames test (Bacterial reverse mutation test)	Comet assay	Chromosomal aberration test
<i>in vivo</i>	Transgenic rodent gene mutation assay		Micronucleus test

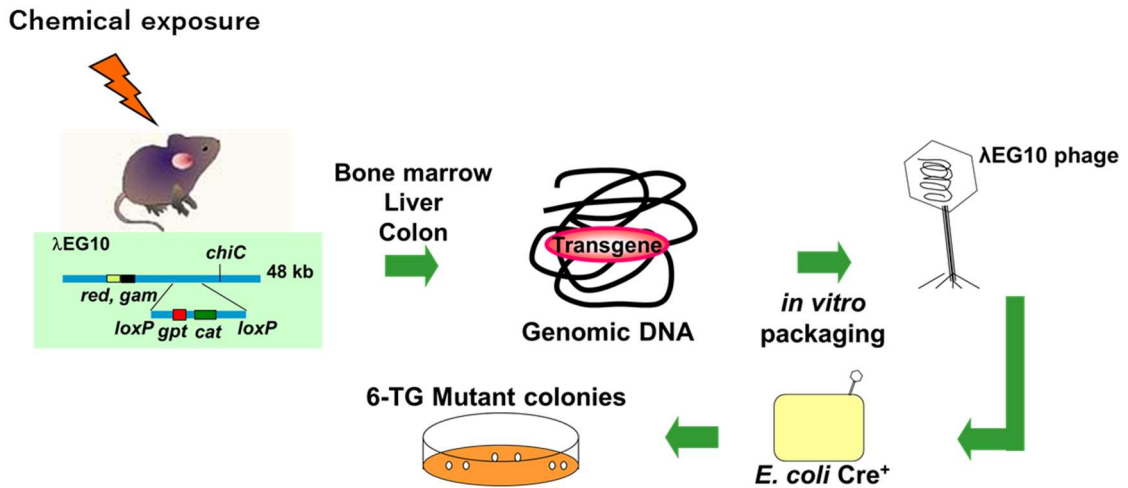
遺伝子突然変異を評価する *in vitro* 試験としては、OECD テストガイドライン化され汎用されている試験として、微生物を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）がある[1]。本試験は、必須アミノ酸であるヒスチジンの合成に関与する酵素遺伝子に変異

を有するネズミチフス菌（ヒスチジン要求性株）を試験菌株とし、突然変異により試験菌株が野生型のヒスチジン非要求性株に復帰する現象を利用している。ヒスチジンを含まない培地に被験物質を加え試験菌株を培養し、突然変異によりヒスチジンの合成が可能となった菌体が増殖し形成する変異体コロニー数を計測することで、被験物質の突然変異誘発能を評価する手法である。

*In vivo* の突然変異試験としては、突然変異検出用のレポーター遺伝子をゲノム中に導入したトランスジェニック（Tg）動物を用いる突然変異試験が OECD ガイドライン化されている[2]。評価に用いる Tg 動物は、マウスやラットでこれまでに複数の種類が開発されており、多くは点突然変異（1 塩基の置換）を検出する系である[3-5]。これらの Tg 動物に被験物質を投与し、評価対象の臓器からレポーター遺伝子を含むゲノム DNA を抽出し、レポーター遺伝子をλファージ粒子として回収した後、λファージを宿主大腸菌に導入することで、突然変異を持った遺伝子をλファージまたは大腸菌の変異体として検出する。検出された変異体の数を計測し、回収したレポーター遺伝子の数（λファージまたは大腸菌の総数）で除した、突然変異体頻度（Mutant Frequency=MF）を算出することで、被験物質の突然変異誘発能を評価することができる。

*gpt delta* Tg ラットおよびマウスは、点突然変異を検出するために大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとして組み込んだλ EG10 が導入されている Tg 動物である[4-6]。この *gpt* 遺伝子は、6-TG（6-チオグアニン）を DNA に取り込まれる形に変換する guanine phosphoribosyltransferase をコードしている。被験物質を投与した *gpt delta* ラットからλ EG10 ファージベクターを回収し、大腸菌に感染させ 6-TG を含む寒天培地で培養することで *gpt* が不活化した変異体のみがコロニーとして検出される。6-TG 含有培地で生育する *gpt* 変異体コロニー数を 6-TG を含まない培地で生育したコロニーの総数で除して MF を算出する（Fig. 1）。*gpt delta* Tg ラットおよびマウスは、λファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターに用いた Spi-アッセイによる欠失変異（塩基配列の一部が失われる変異）の評価も可能である。

DNA 損傷を評価する試験として使われる単細胞ゲル電気泳動（コメット）試験は、*in vivo* および *in vitro* で DNA の損傷程度を評価することが可能である。*In vivo* 試験が OECD テストガイドライン化されており、被験物質を投与した動物から評価対象の細胞を採取し、アガロースに包埋し電気泳動することにより、損傷により生じた DNA 断片が分子量の大きさに応じて泳動される程度を計測する[7]。突然変異試験およびコメット試験は、原理的には単一細胞や DNA が得られる組織であればいずれも対象とすることが可能である。



$$\text{Mutant frequency(MF)} = \frac{\text{Number of mutant colonies}}{\text{Total number of colonies}}$$

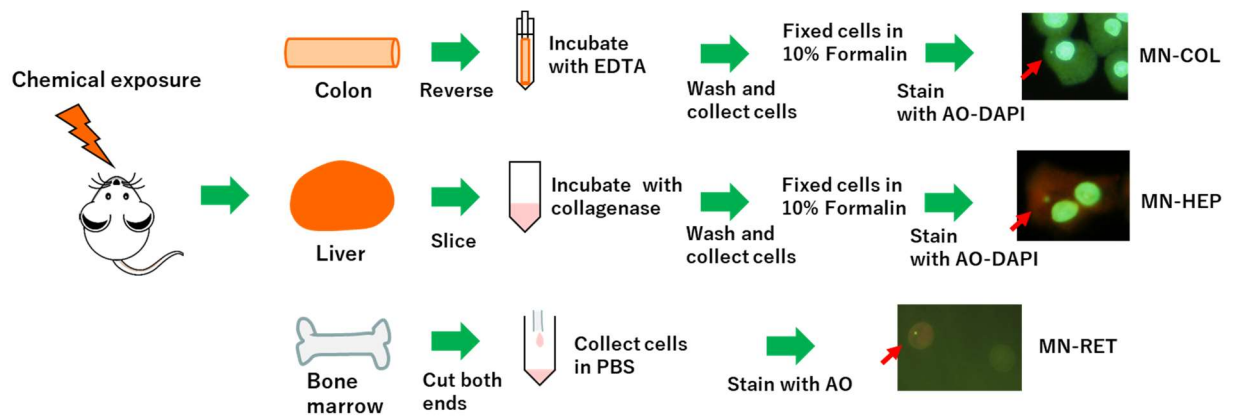
Fig. 1

An outline of *gpt* delta Tg rodent somatic cell gene mutation assay (*gpt* assay) .

染色体異常を評価する試験としては、染色体異常もしくは小核をエンドポイントとする試験があり、いずれも *in vitro*、*in vivo* に適用可能である[8-12]。 *In vitro* 試験で最も汎用されてきたのは、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験である[9]。本試験は、被験物質を曝露した培養細胞に生じる染色体の構造異常を、細胞分裂中期の像を観察することにより評価する手法である。

小核試験は、染色体異常により生じた染色体の断片が主核に取り込まれずに生じる小核を有する細胞の出現頻度を算出することで、被験物質の染色体異常誘発能を評価する手法である。 *in vivo* の赤血球（骨髄、末梢血）を対象とする小核試験が OECD のテストガイドライン化されており[12]、 *in vivo* 試験の第一選択として実施される頻度の高い試験である。赤血球以外の細胞を対象とする試験の開発もされており、これまでに肝臓、腺胃、結腸、皮膚等を対象とする手法が報告されている[13-19] (Fig. 2)。小核の出現頻度を計測するためには、評価対象とする組織において細胞を単離する手法がそれぞれ確立されている必要がある。





EDTA: ethylenediamine-tetraacetic acid, PBS:phosphate-buffered saline,  
 AO: acridine orange, DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole,  
 MN-COL: micronucleated colonic cells, MN-HEP:micronucleated hepatocytes, MN-RET: micronucleated reticulocytes

Fig. 2

An outline of micronucleus assay (colon, liver and bone marrow).

化学物質の遺伝毒性評価においては、通常これらの試験を複数組み合わせるバッテリー試験が実施される[20-22]。食品分野では、新規の食品添加物の申請時に、*in vitro* 試験として微生物を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）および培養細胞を用いる染色体異常試験、*in vivo* 試験としては、げっ歯類の小核試験の実施が求められる。さらに、Ames 試験で陽性の場合には *in vivo* コメット試験および Tg 動物を用いた突然変異試験の実施、*in vitro* 染色体異常試験が陽性の場合には、*in vivo* 小核試験の結果から判断するスキームが提示されている[22]。特定保健用食品、機能性表示食品、いわゆる健康食品などの新規食品においても、製造者が申請時あるいは必要に応じて安全性試験を実施するが、その中で実施される遺伝毒性試験も複数試験の組み合わせにより総合判断されることが一般的である[23-25]。ヒトにおいて長期間摂取されてきた実績があり、発がん性も確認されない食品成分であっても、*in vitro* 遺伝毒性試験では陽性を示す事例が知られている[26-28]。新規食品の評価においても、*in vitro* 遺伝毒性試験で陽性結果が得られた際にはその生物学的意義を検証する必要があり、適切に実施された *in vivo* 遺伝毒性試験が陰性である場合は生体にとって問題となる遺伝毒性は認められないとして、*in vitro* 試験結果は偽陽性と判断される。*In vitro* 試験における特有の反応や実験環境による影響が偽陽性の要因であることも知られており[20,26]、*in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性試験の組み合わせで総合的に生体への遺伝毒性影響を評価することが極めて重要である。

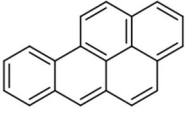
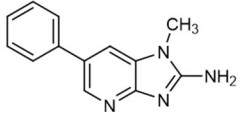
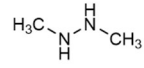
すなわち、予測性の高い遺伝毒性評価には *in vivo* 試験が不可欠である。一方で、動物福祉の面から実験動物を無制限に用いることは許されない。遺伝毒性試験の実施においても、動物福祉に基づく 3Rs (Reduction, Replacement, Refinement)、つま

り動物を用いる試験での使用動物数の削減、動物を用いない代替法への置き換え、試験における動物への苦痛の削減が求められている[20,29]。その例が、遺伝毒性のエンドポイントを一般毒性試験等の動物試験に組み込み、単独での試験を行わない方法と（integration）、異なる遺伝毒性のエンドポイントを検出する個別の試験を1回の試験に纏める組み合わせ方法である（combination）。これまでに combination としてはコメット試験と小核試験の組み合わせを中心に、種々の遺伝毒性試験の組み合わせに関する検討がされてきた[30-34]。Integration としては、単回あるいは反復投与毒性試験に各種の遺伝毒性試験を組み込む評価系の検討がなされてきた[35-39]。

本研究では、多臓器小核試験と Tg 動物を用いる遺伝子突然変異試験の異なるエンドポイントを組み合わせ（combination）、同一の動物で評価することを検討した。特に、食品の曝露経路として重要である消化管（結腸）での反復投与小核試験法が開発され[14,19]、その有用性が期待されているので、消化管（結腸）を含む多臓器での組み合わせ評価を実施した。解決すべき課題は、突然変異試験と多臓器小核試験のそれぞれの試験法には標準化されたプロトコルが存在するため、それぞれの条件が異なる場合にどのように試験方法を調整し、正確な遺伝毒性に関する情報を得ることができるとある。そのため、第1章では代表的な遺伝毒性発がん物質であり、かつ、食品の焼け焦げにも含まれる benzo[a]pyrene (Table 2) をモデル化合物とし、突然変異試験と多臓器小核試験を組み合わせ同一の動物にて評価する条件を検討した。次に、第2章では発がんの標的が消化管である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) および 1,2-dimethylhydrazine (DMH) をモデル化合物に選び、消化管での小核試験法を検討した。さらに、第3章では DMH をモデル化合物として、突然変異試験と結腸を含む多臓器小核の組み合わせ法による評価法の確立を検討した。

Table 2

Structure and toxicity (carcinogenicity and genotoxicity) of the test chemicals.

Chemicals		B[a]P Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	PhIP 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine	DMH 1,2-Dimethyl hydrazine
				
Carcinogenicity	IARC classification	IARC 1	IARC 2B	IARC 2B
	Target organ (rat,male)	forestomach, oesophagus, larynx(SD) [40,41] forestomach, liver, oral cavity, jejunum, duodenum, auditory canal, skin (Wistar) [42,43]	colon (F344) [44]	colon (F344, SD) [47]
Genotoxicity	Ames	positive [40]	positive [45]	positive [47]
	<i>in vitro</i> CA	positive [40]	positive [46]	positive [47]
	<i>in vivo</i> MN (BM or PB)	positive [40]	positive [45]	positive (single) negative (28 days) [47]

CA: chromosomal aberration test, MN: micronucleus test, BM: bone marrow, PB: peripheral blood

# 第1章 B[a]Pを用いたF344系 *gpt delta* ラット突然変異試験と多臓器小核試験の統合の検討

## 1-1 緒論

化学物質の安全性評価においてこれまで実験動物を用いた毒性試験が実施されてきたが、近年の動物愛護の高まりを受け、3Rsを考慮した試験系の改良が求められている。遺伝毒性試験においても、2011年に改定されたICHガイドラインS2(R1)では、使用動物数の削減に配慮した*in vivo*試験の実施が明記され、3Rsの考え方が反映されている[20]。試験に使用する動物の数を減らすための一つのアプローチは、*in vitro*遺伝毒性試験をより生体影響を反映させた外挿性の高い方法に改変することである。しかし、現時点において*in vitro*試験で生体に及ぼす遺伝毒性影響を十分な精度で評価することには限界があり、体内動態を考慮した評価が可能な*in vivo*試験は依然として重要である。*In vivo*試験の実施においては、個別のエンドポイントを検出する独立した試験系を組み合わせることにより、1個体の動物から複数のエンドポイントを検出することが可能となれば、使用動物数の削減が期待できる。

レポーター遺伝子を導入することによって作製されたTg動物は、突然変異の効率的な検出および分析に広く使用されてきた[3-5]。Tg動物を用いた突然変異試験は、現時点において複数の臓器の遺伝子変異を評価可能な唯一の手法である。従って、Tg動物における遺伝子突然変異試験を実施する際に、他の評価項目を組み合わせることが可能となれば、多エンドポイント遺伝毒性試験として有用性が高まるものとする。これまでに、Tg動物を用いた遺伝子突然変異試験と他の遺伝毒性試験または反復投与毒性試験との統合が報告されている[32-34,38,39]が、統合された各試験に適切な臓器の採取時期に関する検討が十分なされていないのが現状である。

骨髄を用いた*in vivo*小核試験は、染色体の構造異常/数的異常性誘発性を評価可能な試験系として、医薬品や化学物質の遺伝毒性評価において汎用されている。末梢血を用いた*in vivo*小核試験も確立されており、被験物質の28日間の反復投与による評価が可能であることも確認され、一般的な毒性試験に組み込むことが、3Rsを促進する手段として提案されている[8,12,20]。さらに、骨髄および末梢血に加えて、他の組織を標的とした小核試験法が開発されている[13-19]が、特に、肝臓と消化管において28日間の経口反復投与により既知の遺伝毒性発がん物質での小核誘発が認められ、小核試験と一般毒性試験との統合が可能であることが報告されている[14,15]。

本章では、Tg動物としてF344系 *gpt delta* Tg雄性ラットを用い、突然変異試験に多臓器小核試験を組み合わせた統合遺伝毒性試験法を検討した。被験物質はげっ歯類での発がん性が確認されており、食品の焼け焦げにも含まれている遺伝毒性発がん

物質 B[a]P [40-43]を用いた。B[a]P を 28 日間反復経口投与後、結腸、肝臓および骨髓を同一の動物から組織を採取し、遺伝子突然変異試験および小核試験を、さらに末梢血小核試験を実施した。突然変異試験として、本試験の主目的として評価されることの多い点突然変異を評価するため、*gpt* アッセイを実施した。

また、試験プロトコルの最適化を図るため臓器採取日の影響を検討した。Tg 動物を用いた突然変異試験の OECD ガイドライン (TG488) では、被験物質の 28 日間反復投与の最終投与から 3 日後に組織採取を行う (28+3) ことが推奨されている [2]。しかしながら、組織採取日が他の試験と異なるため、他のエンドポイントの評価と統合することが難しい。そのため、Tg 動物を用いた突然変異試験ガイドラインに準拠した 28+3 プロトコルと、最終投与の翌日に組織採取する一般的な毒性試験の標準プロトコル (28+1) の比較を行った (Fig. 3)。

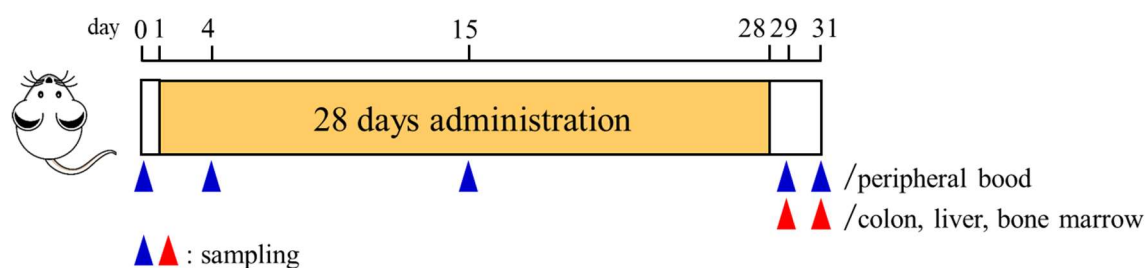


Fig. 3  
Time schedule of combination assay with *gpt* assay and micronucleus assay.

## 1-2 実験方法

### 1-2-1 被験物質

Benzo[a]pyrene (B[a]P; CAS No. 50-32-8) は Sigma-Aldrich から購入した。被験物質溶液は、溶媒として *in vivo* 小核試験の溶媒として OECD テストガイドラインにも示されており [10]、B[a]P の経口投与で小核および点突然変異が検出されている実績のある [32,33,36] オリーブ油 (ナカライテスク株式会社) を使用し、投与直前に作製した。

### 1-2-2 動物および飼育管理

7 週齢の F344 系 *gpt delta* Tg 雄性ラットおよび F344 系雄性ラットは日本エスエルシーより購入した。5-7 日間の馴化後に試験に使用した。飼育環境は、バリアシステムで  $23.5 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $55.5 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 12h:12h、空気交換 1 時間あたり 12-15 回で維持した。ウッドチップベッド (イワクラ株式会社) を用いたプラスチック製ケージに *gpt delta* ラットは個別に、また非 Tg ラットはケージあたり 2-3 匹

で飼育し、水道水および CE-2 ペレット飼料（日本クレア株式会社）は馴化期間、試験期間を通じて自由に摂取させた。本試験は、動物の処置および管理に関する法律（法律第 105 号、1973 年 10 月 1 日、2019 年 6 月 19 日改正）に基づいた、サントリーの動物実験に関する規則に従って動物実験の倫理委員会によって承認されたものである。

### 1-2-3 用量設定および投与

B[a]P の用量設定は、28 日間の反復投与試験結果[35-37]を参考に、maximum tolerated dose（最大耐量；MTD）に相当すると考えられた 125 mg/kg/day を最高用量とし、その 1/2 量の 62.5 mg/kg/day との 2 用量を設定した。全ての投与液量は 10 mL/kg/day に設定した。1 群あたり 5 匹の *gpt delta* ラットに、0（オリーブ油）、62.5 または 125 mg/kg/day の B[a]P を 28 日間（day 1-28）毎日、胃ゾンデを用い経口投与した。体重は、投与の初日から剖検日まで毎日測定した。

### 1-2-4 組織および血液の採取

最終投与の翌日（day 29）および 3 日後（day 31）に 64.8 mg/mL ペントバルビタールナトリウム（商品名ソムノペンチル；協立製薬株式会社）を用いて安楽死させ、血液を採取した後、臓器を摘出した。肝臓と脾臓は重量を測定した。結腸は、遠位部および近位部を除いた中間部を遺伝子突然変異試験および小核試験に使用した。小核試験用の細胞は、摘出直後に骨髓（大腿骨）、肝臓、および結腸の一部より調製した。これらの組織の残りは凍結し、突然変異試験で使用するまで -80°C で保存した。溶媒対照群および B[a]P 125 mg/kg/day 群のみ、組織病理学的検査に使用するために、肝臓および結腸の一部、脾臓、胸骨の骨髓を 10%中性緩衝液ホルマリンで固定した。

末梢血小核試験で使用するための血液は、投与開始の前日（day 0）、および day 4、15、29、31 に尾静脈より採取した。Day 4 以降は、前日の投与から 24 時間後に採血した。解剖日の血液は、解剖時に採取した血液の一部を末梢血小核試験に使用し、残りを血液学的検査に使用した。血液学的検査は、Sysmex XT-1800i 分析装置（シスメックス株式会社）を用いて行った。

### 1-2-5 遺伝子突然変異試験

凍結保存した結腸、肝臓、骨髓を用いて *gpt* アッセイを行った。*gpt* アッセイは既報[4,48,49]に従い、突然変異体頻度（MF）を 6-チオグアニン（6-TG）選択により求めた。RecoverEase DNA Isolation Kit（Agilent Technologies）を用いて各組織（約 50 mg）からゲノム DNA を抽出した。Transpack Packaging Extract（Agilent

Technologies) を用いた *in vitro* パッケージングにより  $\lambda$  EG10DNA を  $\lambda$  ファージとして回収した。パッケージングは 1 組織あたり 30  $\mu$ L のゲノム DNA を使用し、SM buffer で終容量 300  $\mu$ L に希釈した。大腸菌 YG6020 は、*gpt* アッセイ前日に LB+maltose broth (25  $\mu$ g/mL カナマイシン) で前培養 (37°C、終夜、振盪培養) を行った。アッセイ当日に前培養液を 1/40 の容量で LB+maltose broth (25  $\mu$ g/mL カナマイシン) に添加し、37°C、約 3 時間の振盪培養後、遠心分離し培地を除去し、菌体を LB +10mM MgSO<sub>4</sub> に懸濁することで YG6020 菌液を調製した。小試験管に YG6020 菌液を 200  $\mu$ L、パッケージングサンプルを 60  $\mu$ L ずつ加え、37°C、20 分の静置培養および 37°C、30 分の振盪培養を行った後、保温したソフトアガー (0.6% NaCl、0.6% Agar) を 2.5 mL 加えて混合し、M9 + Cm + 6-TG (M9 最少培地、10 mg/mL Pro, Leu, Ile、25  $\mu$ g/mL クロラムフェニコール、25  $\mu$ g/mL 6-TG) プレートに播種した。72 時間後以降にコロニー数をカウントし、パッケージングサンプル (300  $\mu$ L) のコロニー総数を変異体コロニー数として算出した。タイターの測定は、5  $\mu$ L のパッケージングサンプルを同様に YG6020 菌液と混合してプレインキュベーション後、ソフトアガーを加えて M9 + Cm プレートに播種した。また、M9 + Cm + 6-TG プレート上で形成された変異型 *gpt* 遺伝子を保有する変異体コロニーを計数した。*gpt* MF 値は、6-TG を含まない M9 + Cm プレート上のコロニー数より、パッケージングサンプル (300  $\mu$ L) での回収ファージ数に換算し、変異体コロニー数を除して算出した。

#### 1-2-6 骨髄小核試験

既報に従い[50-52]、大腿骨から回収した骨髄細胞をウシ胎児血清 (FBS) に懸濁し、ガラススライド上に塗抹した。細胞をアクリジンオレンジ (AO) で染色し、試験当時の OECD テストガイドライン TG474[10]に従い、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i; 株式会社ニコンインステック) を用いて 1 標本あたり 2 千個の幼若赤血球 (多染性赤血球; PCE) のうち小核を有する細胞数を求めた。さらに、500 個の赤血球あたりの PCE 数を観察した。

#### 1-2-7 肝臓小核試験

既報[14]に従い細胞調製、観察を行った。約 1 g の肝臓組織 (外側左葉) を採取し、剃刀にて 0.5-1 mm 程度にスライスした臓器片を 50 mL チューブに回収し、コラゲナーゼ溶液 20 mL を加え、37°C で 1 時間、振盪培養した。コラゲナーゼ溶液は、HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 液にコラゲナーゼヤクルト S (ヤクルト薬品株式会社) を 100 U/mL となるように添加し、pH 7.5 に調製し使用した。メスピペットを用いて臓器片がほぐれるまでピペッティングを行い、セルストレーナーでろ過、遠心

分離後に上清を除去し、得られた細胞を適量の10%中性ホルマリン溶液中に懸濁した。この肝細胞懸濁液をAOおよび4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) 溶液 (染色液の最終濃度としてAO: 500 µg/mL, DAPI: 10 µg/mL) で染色し、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i; 株式会社ニコンインステック) (U 励起) を用いて観察した。1 標本あたり 2 千個の細胞中の小核を有する細胞の数、分裂中期細胞の数を求めた。

#### 1-2-8 結腸小核試験

結腸のうち遠位部および近位部を除いた中間部を用いて、既報[53,54]に従い細胞調製および観察を行った。管腔の内容物を HBSS で洗浄除去した結腸組織は、粘膜面が表になるように裏返し、ガラス棒を通した。1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) - HBSS を入れた 15 mL チューブにガラス棒を通した腸管を浸漬し、35°C で 30 分間インキュベートして上皮細胞を回収した。ガラス棒を振動させ上皮細胞を剥離した EDTA-HBSS 溶液をパスツールピペットでピペッティングし、遠心分離後上清を除去した。得られた細胞は 2 mL の HBSS を加えピペッティング後、さらに 5 mL の 10% 中性ホルマリン溶液を加えて混和した。再度遠心分離、上清除去後の細胞は 10% 中性ホルマリン溶液で懸濁した。得られた細胞懸濁液を塗抹後 AO および DAPI 溶液 (染色液の最終濃度として AO: 125 µg/mL, DAPI: 2.5 µg/mL) で染色し、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i; 株式会社ニコンインステック) (U 励起) を用いて観察した。小核を有する細胞の数は、1 標本あたり 2 千個の細胞を観察し求めた。

#### 1-2-9 末梢血小核試験

試験期間中に採取した末梢血の小核試験は、*In vivo* Rat MicroFlow PLUS キット (Litron Laboratories) を用い、FACSVerse フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いた 3-Color 標識プロトコルに従い実施した。小核を有する網赤血球 (MN-RET) の頻度は、2 万個の網赤血球 (RET ; CD71 陽性赤血球) の解析より計算した。

#### 1-2-10 病理組織学的検査

ホルマリン固定した胸骨髄、脾臓、肝臓および結腸をパラフィンに包埋し、薄切 (2 µm) した。切片をヘマトキシリンおよびエオジンで染色し、染色標本を鏡検した。

#### 1-2-11 非 Tg 動物による小核試験

F344 雄ラットを 1 群 5 匹に分け、B[a]P を 0 (溶媒対照 : オリーブ油) 、62.5 または 125 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、28 日間 (day 1-28) 、胃ゾンデを用いて経



口投与した。最終投与の翌日 (day 29) に肝臓、結腸、および骨髄のサンプルを採取し、1-2-6 から 1-2-8 に示す手法にて小核試験を実施した。

### 1-2-12 統計解析

溶媒対照群と B[a]P 投与群の *gpt* MF および末梢血中の小核細胞の頻度について、Bartlett 検定により分散性を評価した (有意水準  $p < 0.05$ )。等分散の場合は Dunnett 型多重比較検定を実行し、不等分散の場合は Steel 検定を実行した。B[a]P 群と溶媒対照群との小核肝細胞 (MN-HEP)、小核幼若赤血球 (MN-PCE)、および小核結腸細胞 (MN-COL) の頻度の差を、Kastenbaum-Bowman の表を用いて条件付き二項検定にて分析した [55]。Day 29 と day 31 の *gpt* MF および小核細胞頻度の比較は Student の *t* 検定を用いて行った。体重と臓器重量 (絶対値および相対値) のデータは、Bartlett の分散均一性検定の後、一元配置分散分析または Kruskal-Wallis 検定を用いて解析した。有意差が見られた場合は、Dunnett 検定または Dunnett 型多重比較検定を実施した。

## 1-3 結果

### 1-3-1 体重および臓器重量

B[a]P 投与群で投与期間を通して体重増加抑制が認められた。125 mg/kg/day 群では、day 2 以降継続して溶媒対照群との間に有意差が認められた (Fig. 4)。肝臓の絶対重量は、day 29 および day 31 の 62.5 mg/kg/day 群で溶媒対照群よりも高く、day 29 で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な差が見られた。肝臓の相対重量は、day 29 および day 31 ともに用量依存的な増加が認められた。脾臓の絶対重量は用量依存的な低下傾向が認められ、day 29 の 125 mg/kg/day 群で溶媒対照群との有意差が認められた。一方、脾臓の相対重量は用量依存的な増加傾向が認められ、day 31 の 125 mg/kg/day 群で溶媒対照群との有意差が認められた (Table 3)。

### 1-3-2 遺伝子突然変異試験

結腸、肝臓、および骨髄で *gpt*MF の顕著な増加、さらに結腸および骨髄では用量依存的な増加が認められた (Fig. 5)。Day 29 では、対照群および 125 mg/kg/day 群の MF はそれぞれ結腸で  $3.64 \pm 2.08$ 、 $39.94 \pm 12.6$  (Fig. 5A)、肝臓で  $1.71 \pm 0.78$ 、 $37.65 \pm 7.96$  (Fig. 5B)、骨髄で  $2.05 \pm 2.55$ 、 $95.55 \pm 33.45$  (Fig. 5C) であった。Day 31 では、対照群と 125 mg/kg/day 群の MF はそれぞれ結腸で  $3.91 \pm 1.52$ 、 $70.88 \pm 43.44$  (Fig. 5A)、肝臓で  $2.61 \pm 1.63$ 、 $51.66 \pm 28.43$  (Fig. 5B)、骨髄で  $1.91 \pm 1.12$ 、 $89.4 \pm 25.63$  (Fig. 5C) であった。Day 29 と day 31 の比較では、62.5 mg/kg/day

群の結腸の MF においてのみ有意差が認められた。

### 1-3-3 小核試験

結腸での小核誘発頻度の増加はいずれの群においても認められなかった (Fig. 6A)。肝臓では、62.5 mg/kg/day 群で day 29 と day 31 の両方で MN-HEP のわずかな増加を示し、day 31 にのみ統計学的有意差が認められた (Fig. 6B)。骨髄では、MN-PCE の有意な増加が 125 mg/kg/day 群で見られたが、day 29 と比較して day 31 では減少した (Fig. 6C)。骨髄における幼若赤血球の割合の増加が 62.5 mg/kg/day 群の day 31 にのみ観察された (Fig. 6D)。

末梢血小核試験は、day 0、4、15、29 および 31 に採取した血液を用いて実施した (Fig. 7A)。B[a]P 投与期間中に用量依存的な小核の誘発が認められ、day 29 で最も高い頻度を示した。網赤血球の割合 (同日の対照群に対する比率) は day 4 では 100%より低く、その後上昇し、day 29 および day 31 においては 100%より高い値を示した (Fig. 7B)。

### 1-3-4 病理組織学的検査

B[a]P の 125 mg/kg/day 群について病理組織学的検査を実施した。骨髄において day 29 で造血抑制、day 31 に赤芽球の増加が観察された。脾臓では、day 29 および day 31 とともに髄外造血の亢進、day 29 に白脾髄の縮小が認められた。肝臓では、day 29 および day 31 で、オーバル細胞の過形成および小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。限局性の細胞壊死および門脈周囲の肝細胞好酸球性変性は day 29 のみ、髄外造血亢進が day 31 のみで認められた。結腸は B[a]P 投与による組織変化は見られなかった (Table 4)。

### 1-3-5 非 Tg 動物における小核試験

F344 系ラット (非 Tg) では、B[a]P 投与群 (day 29) で結腸および肝臓では B[a]P 投与による小核誘発は認められなかった (Fig. 8A, 8B)。骨髄において用量依存的かつ有意な小核誘発が認められた (Fig. 8C)。骨髄における幼若赤血球の割合は B[a]P 投与による変化は認められなかった (Fig. 8D)。

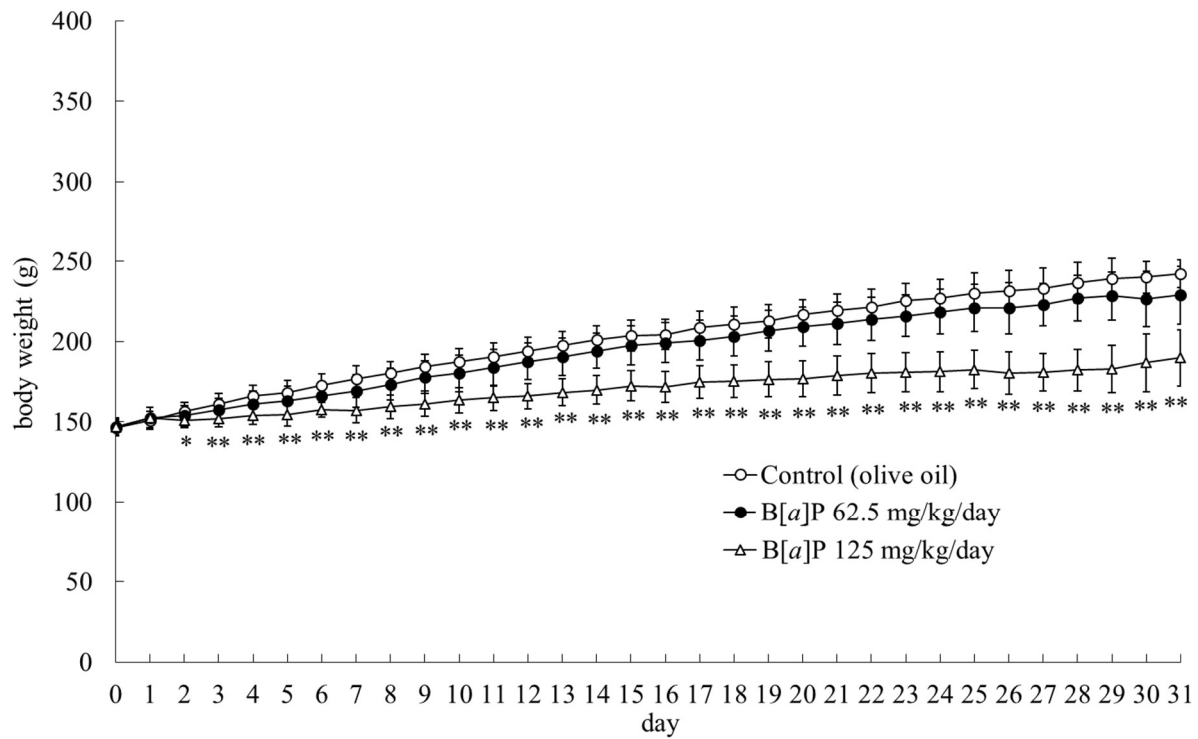


Fig. 4

Changes in the body weight of *gpt* delta rats treated with B[a]P.

The data represent the mean  $\pm$  SD (N=10, data from days 30 and 31 are N=5).

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

Table 3

Liver and spleen weight on day 29 and day 31 after B[a]P administration for 28 days to *gpt* delta rats.

Sampling day	Dose (mg/kg/day)	Body weight (g) <sup>a</sup>		Liver <sup>a</sup>				Spleen <sup>a</sup>			
				Absolute weight (g)		Relative weight (g/100g b.w.)		Absolute weight (g)		Relative weight (g/100g b.w.)	
day 29	0	239.6	± 16.3	9.66	± 0.88	4.03	± 0.23	0.61	± 0.04	0.25	± 0.02
	62.5	231.8	± 11.6	11.03	± 0.75 *	4.75	± 0.15 **	0.58	± 0.05	0.25	± 0.02
	125	185.1	± 11.2 **	9.89	± 0.89	5.34	± 0.21 **	0.50	± 0.06 **	0.27	± 0.03
day 31	0	242.2	± 8.8	9.83	± 0.67	4.06	± 0.16	0.61	± 0.03	0.25	± 0.02
	62.5	228.8	± 18.19	10.17	± 1.12	4.44	± 0.24 *	0.61	± 0.04	0.27	± 0.02
	125	189.9	± 17.6 **	9.61	± 1.41	5.04	± 0.29 **	0.55	± 0.08	0.29	± 0.03 *

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control on the same sampling day (Dunnett's test).

<sup>a</sup> Data represent the mean ± SD (N=5).

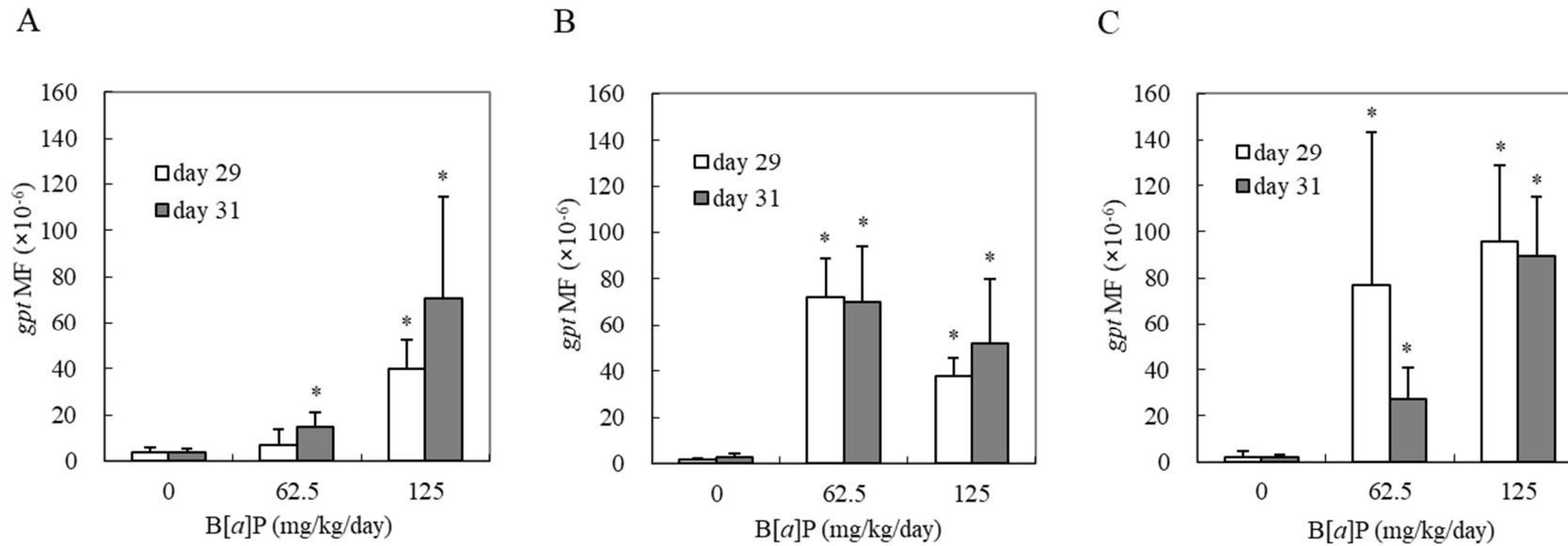


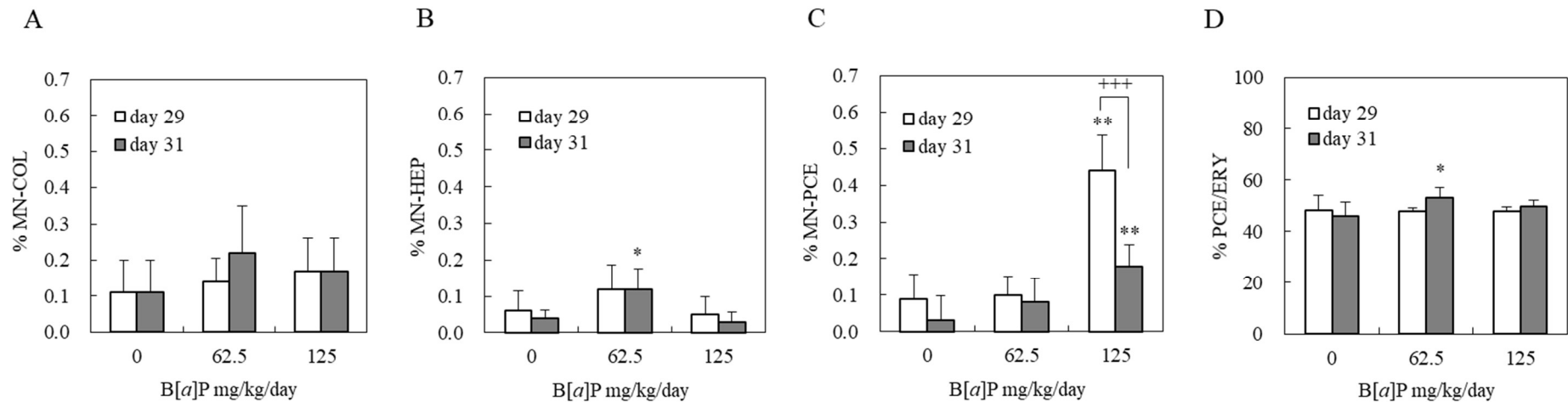
Fig. 5

Frequency of *gpt* mutant in the colon (A), liver (B), and bone marrow (C) of *gpt* delta rats treated with B[a]P.

MF: Mutant frequency. Data represent the mean  $\pm$  SD (N=5).

\* $p < 0.05$ : significant difference from the control on the same sampling day.

+ $p < 0.05$ : significant difference between day 29 and day 31 for the same dose.



**Fig. 6**

Frequency of micronucleated cells in the colon (A), liver (B), and bone marrow (C) and frequency of polychromatic erythrocytes in the bone marrow (D) of *gpt* delta rats treated with B[a]P.

MN-COL: micronucleated colonic cells, MN-HEP: micronucleated hepatocytes, MN-PCE: micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE: polychromatic erythrocytes, ERY: erythrocytes.

Data represent the mean  $\pm$  SD (N = 5).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control on the same sampling day.

+++ $p < 0.001$ : significant difference between day 29 and day 31 for the same dose.

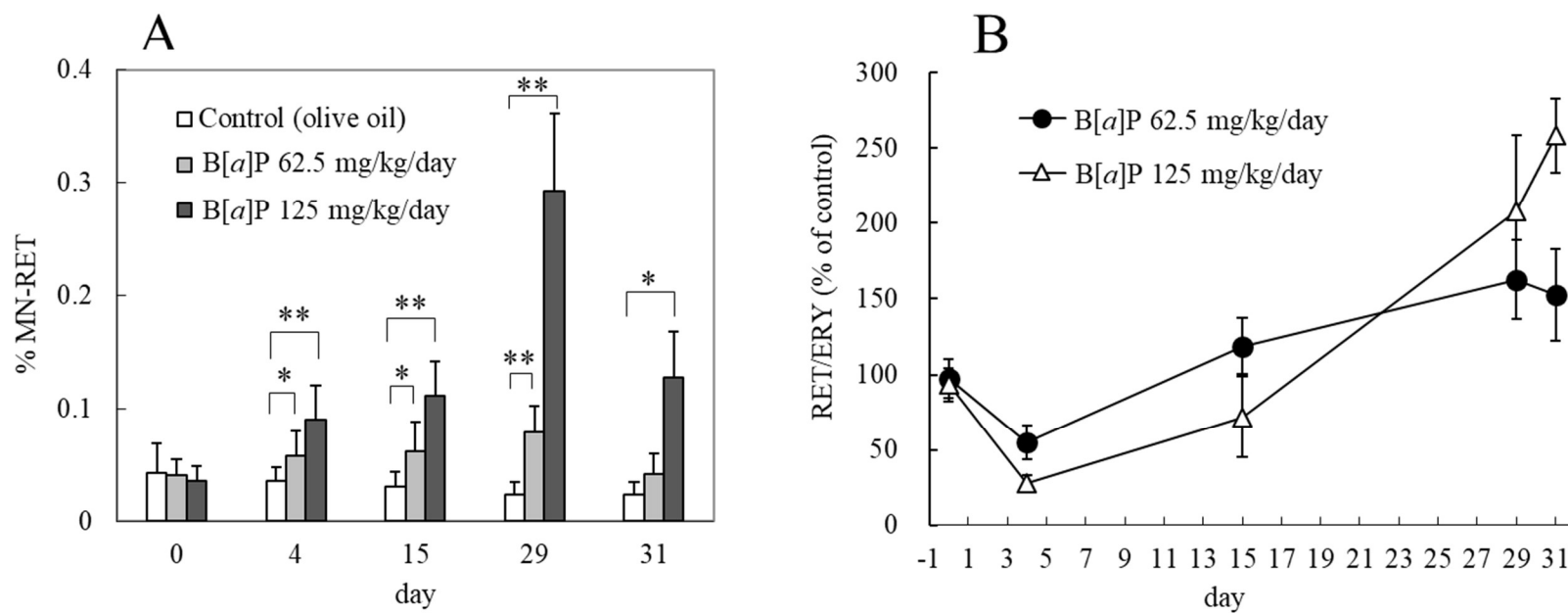


Fig. 7

Frequency of micronucleated cells (A) and reticulocytes (B) in the peripheral blood of *gpt* delta rats treated with B[a]P.

MN-RET: micronucleated reticulocytes, RET: reticulocytes, ERY: erythrocyte.

Data represent the mean  $\pm$  SD (N=10, data for day 31 is N=5).

A: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control. B: Statistical analysis was not carried out.

Table 4

Histopathological findings in the *gpt* delta rats on day 29 and day 31 after B[a]P administration for 28 days.

Site & findings	Group/Dose	Control (olive oil)				B[a]P 125 mg/kg/day			
	Sampling day	day 29		day 31		day 29		day 31	
	<i>No. examined</i>	5		5		5		5	
	grade	±	+	±	+	±	+	±	+
Bone marrow									
Decrease in hematopoiesis		0	0	1	0	0	4	0	0
Increase in rate of erythroblast production		0	0	0	0	0	0	2	3
Spleen									
Extramedullary hematopoiesis		4	0	1	0	4	1	1	4
Atrophy of white pulp (decrease in lymphocytes)		0	0	0	0	0	3	0	0
Colon		0	0	0	0	0	0	0	0
Liver									
Necrosis, focal		0	0	0	0	0	1	0	0
Extramedullary hematopoiesis		0	0	0	0	0	0	0	2
Hepatocyte eosinophilic degeneration, periportal		0	0	0	0	0	3	0	0
Oval cell hyperplasia		0	0	0	0	0	5	0	5
Hepatocyte hypertrophy, centrilobular		0	0	0	0	3	0	0	5

±: slight, +: mild.



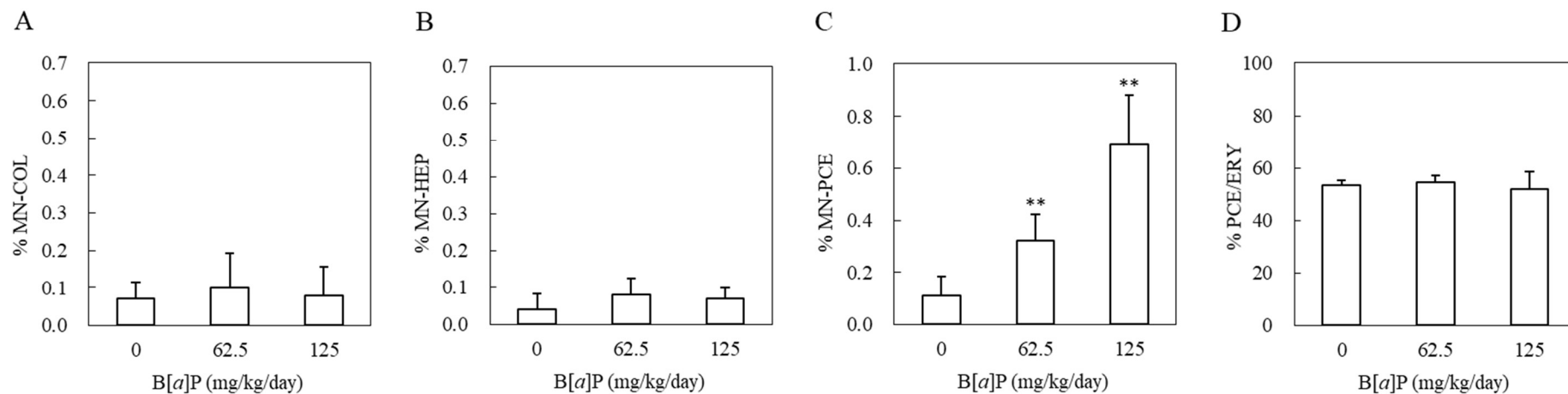


Fig. 8

Frequency of micronucleated cells in the colon (A), liver (B), and bone marrow (C) and frequency of polychromatic erythrocytes in the bone marrow (D) of F344 rats treated with B[a]P on day 29.

MN-COL: micronucleated colonic cells, MN-HEP: micronucleated hepatocytes, MN-PCE: micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE: polychromatic erythrocytes, ERY: erythrocytes.

Data represent the mean  $\pm$  SD (N=5).

\*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control (Dunnett's test).

#### 1-4 考察

B[a]P は食品の焼け焦げにも含まれている多環芳香族炭化水素で、最もよく研究されている遺伝毒性発がん物質の 1 つであり、さまざまな *in vitro* および *in vivo* 試験の報告がある[40]。B[a]P の経口投与による発がんは SD ラットで前胃、食道、喉頭 [40,41]、Wistar ラットでは前胃、肝臓、口腔、空腸、十二指腸、耳道、皮膚 [42,43] で認められている。本研究で使用した系統である F344 ラットを用いた発がん性試験の報告は見つからなかった。また、B[a]P の経口投与により、Tg 動物 (Muta<sup>TM</sup>Mouse、BigBlue<sup>®</sup>) の肝臓、結腸、および骨髄を含む多くの臓器について遺伝子突然変異の誘発が報告されている [3,34]。

本研究において、B[a]P の経口投与で遺伝子突然変異と小核の誘発を同時に検出することができた。まず、遺伝子突然変異試験は OECD テストガイドライン (TG488) [2] で示す day 31 に加え、28 日間連続投与の翌日 (day 29) にも臓器の採取を行った。投与量に関しては、125 mg/kg/day 群において溶媒対照群と比較して顕著な体重増加抑制を示しているため、MTD として十分な量の B[a]P が投与されたことを確認することができた。また、*gpt delta* ラットにおける多臓器小核試験の結果は、同じサンプリング日 (day 29) の非 Tg ラットにおいて得られた結果と同様であった。骨髄において、62.5 mg/kg/day の day 29 において非 Tg ラットのみで小核細胞の有意な増加を示し差異が見られたものの、125 mg/kg/day では非 Tg ラットおよび Tg ラットともに小核細胞の有意な増加を示した。Tg ラットにおける小核試験の陽性/陰性の判断は、非 Tg ラットを用いて得られたものと同様であった。ラットに導入されたレポーター遺伝子は  $\lambda$  ファージまたはバクテリア由来であり動物個体内では発現せず、F344 ラットと F344 系 *gpt delta* ラットの 13 週間の飼育後の一般毒性試験項目の測定結果に差がないことから [56]、導入された遺伝子が被験物質の体内動態や毒性に影響を及ぼすことは考えにくいと言える。

消化管から吸収された B[a]P は主に肝臓で複数の中間体を経て代謝活性化を受けることが報告されている [45,57]。B[a]P 代謝物の中で、ベンゾ[a]ピレンジオールエポキシド (BPDE) は、最終的な変異原として強力な活性を有する [58-60]。BPDE を含む B[a]P の代謝物および代謝物-DNA 付加物は、血液や肝臓を含む複数の臓器で検出されている [42,61]。結腸内の DNA 付加物に関するデータはないが、代謝活性化体は DNA およびタンパク質と効率よく結合あるいは抱合化されるため、結腸に活性化体として存在する量は限られるものと推測される。それゆえ、*gpt MF* について、62.5 mg/kg/day 群で肝臓および骨髄よりも結腸で低かったのは、経口投与された B[a]P の薬物動態を反映した結果であることが強く示唆された。

B[a]P 投与群の *gpt delta* ラットでは、結腸、肝臓および骨髄において高い MF が

観察されたが、小核誘発は骨髄および末梢血のみで、肝臓または結腸においては観察されなかった。B[a]Pの経口投与による肝臓コメット試験では陰性の結果が報告されている[36]。肝臓や結腸は、骨髄や末梢血よりも細胞増殖頻度が低いことが小核の検出力の差となった可能性がある。また、肝臓では病理組織学的な変化が認められていることから、肝細胞における細胞傷害性がコメット試験や小核試験の検出力を妨げていることも推察される。

B[a]Pを投与したTgおよび非Tgラットの末梢血および骨髄において、小核出現頻度の用量依存的な増加が観察された。げっ歯類を用いたこれまでのB[a]Pの反復投与末梢血小核試験では、陽性と陰性の両方の結果が報告されているが[32,36,37,51]、その原因は系統差に起因することが示唆されている[36]。本研究結果から、F344 *gpt delta* ラットは造血系組織においてB[a]Pが誘発する小核を高感度に検出できる系統であることが示された。また、MN-RETがday 29で最大値を示したのは、RETが投与初期に有意に減少した後に増加に転じていることから、投与後期の代償性造血促進を要因としている可能性がある。B[a]P投与による骨髄毒性の誘発は既に報告されている[62,63]が、本研究においても、脾臓の病理組織学的検査から髄外造血がB[a]P投与により促進されたことが示され、さらに、血液学的検査でも赤血球と白血球の減少が認められた(Supplemental Table 1)。一方、骨髄毒性のためにRETの数が減少すると小核の頻度が減少することが報告されている[64]ことから、骨髄毒性を有する化合物の評価では、顕著な造血抑制が小核の検出力に影響を与える可能性に留意すべきである。今回の試験条件下では、骨髄小核試験で通常評価され、被験物質の曝露証明として用いられる幼若赤血球の割合には大きな変化が見られず、B[a]P投与初期の骨髄毒性を捉えることはできなかった。それゆえ、遺伝毒性試験実施時に血液学的検査や病理組織学的検査を評価しておくことは、被験物質の曝露証明や評価対象臓器への影響に関する情報を得ることに繋がる重要な項目であることが明らかとなった。

Tg動物を用いた遺伝子突然変異試験に小核試験を組み込むことは、2つの試験が補足的な情報を提供し、発がん性の予測精度を高めることが期待される。Tg動物を用いた遺伝子突然変異試験では、発がん性物質の標的臓器と非標的臓器の両方でMFが有意に増加する可能性があることが知られているので[65-68]、MFのみに基づく標的臓器の予測は困難である。一方、肝臓や消化管において小核試験で得られた陽性結果と、発がん性との間には関連性が示唆されており[14]、MFよりも標的臓器の予測性が高いことが想定される。本研究では、各臓器における*gpt*MFの増加と小核の誘発は異なるパターンを示した。B[a]Pを含む多環芳香族炭化水素の発がん性には、DNA付加体形成、DNA修復、アポトーシス、および細胞周期調節を含む複数の要因が影響を及ぼしていることが示唆されている[42,69,70]。一方、B[a]P投与に起因するBPDE

付加体形成頻度、MF、および発がんの標的臓器の間に直接的な関係が存在するかどうかは明らかではない[42,61]。

Tg 動物を用いた遺伝子突然変異試験では、サンプリング日の違いによる MF の検出に顕著な差は見られなかった。OECD テストガイドライン TG488 で推奨されるサンプリング日である「最終投与の 3 日後」の根拠として、反復投与後の経時的サンプリングの適切かつ十分なデータはなく、投与直後の固定されていない突然変異が検出される理論上の懸念、および単回投与翌日は低かった MF が 3 日後には顕著に増加したというデータ[71,72]に基づいていることが推測される。本研究結果からは、最終投与の翌日の day 29 でも遺伝子突然変異の検出能力に問題はなく、Tg 動物を用いた遺伝子突然変異試験と種々の試験を、最適なプロトコルのもとで組み合わせることが可能であることが示唆された。

骨髄および末梢血の小核試験では、day 31 で day 29 と比較し小核誘発率の減少が認められた。これらの組織において、幼若赤血球中の小核誘発のピークは投与後 1-2 日であることが確認されている[73,74]。B[a]P もマウス骨髄小核試験において単回経口投与後 24、48 時間で確認された小核は、72 時間後の観察では認められなかった[73]。従って、これらの組織の小核誘発は、28+3 よりも 28+1 のプロトコルの方が、高い検出力を示すことが示唆された。従って、多臓器の小核試験を Tg 動物突然変異試験と組み合わせる場合には、休薬期間による小核誘発の経時的変化の考慮が重要である。また、一般反復投与毒性試験と統合する場合には 28+3 の設定は困難であるが、本研究により一般毒性試験と同一の 28+1 プロトコルで遺伝毒性を評価することも可能であることが示された。

本研究では、TG488 で推奨されている 8-12 週齢で試験するため、投与開始時に 8 週齢の動物を使用した。一方、多臓器小核試験では、一般的に 5-6 週齢の動物を使用している[14]。ラットの加齢による薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 発現量の変化が知られているが、SD 雄ラットにおいて 30 日齢までの肝臓中 CYP タンパク量は加齢とともに増加する一方、30 日齢と 8 週齢の比較では CYP1A は増加、CYP2B は減少を示すなど分子種により挙動が異なる[75]。代謝能の差違等より生じる試験結果への影響を考慮することは重要であるが、多臓器小核試験に最も適した動物の週齢の検討例は少なく [76]、今後の検討課題である。

以上より本章では、F344系 *gpt delta* 雄性ラットを用いて B[a]P の 28 日反復投与後の翌日および 3 日後に採取した組織を評価対象とし、結腸、肝臓および骨髄の *gpt* MF の増加、ならびに骨髄および末梢血での赤血球の小核誘発を確認した。また、F344 系の雄性ラット (非 Tg) を用いて 28 日間反復投与後の翌日に採取した組織での小核試験を実施し、Tg ラットと同様の結果を得た。これらの成果より、本試験条件において、遺

伝子突然変異および染色体異常をエンドポイントとした多臓器遺伝毒性評価が可能であり、試験を組み合わせることで*in vivo*遺伝毒性試験に使用する動物数の削減にも貢献できることが強く示唆された。

Supplemental Table 1

Results of hematological examination in the *gpt* delta rats after B[a]P administration for 28 days.

Items	Group/Dose Sampling day	Control (olive oil)		B[a]P 62.5 mg/kg/day		B[a]P 125 mg/kg/day	
		day 29	day 31	day 29	day 31	day 29	day 31
Erythrocytes	( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	915 $\pm$ 21.9	919 $\pm$ 21.3	831 $\pm$ 21.9 **	819 $\pm$ 56.5 *	777 $\pm$ 26.2 **	731 $\pm$ 16.3 *
Hemoglobin	(g/dl)	16.2 $\pm$ 0.34	16.1 $\pm$ 0.45	14.4 $\pm$ 0.39 **	14.0 $\pm$ 0.75 **	13.5 $\pm$ 0.40 **	12.8 $\pm$ 0.39 **
Hematocrit	(%)	46.3 $\pm$ 0.83	46.2 $\pm$ 1.14	42.2 $\pm$ 0.98 **	40.9 $\pm$ 2.01 **	39.5 $\pm$ 0.86 **	38.4 $\pm$ 0.86 **
MCV	(fl)	50.6 $\pm$ 0.32	50.2 $\pm$ 0.36	50.8 $\pm$ 0.22	50.0 $\pm$ 1.12	50.9 $\pm$ 0.77	52.5 $\pm$ 1.13 **
MCH	(pg)	17.8 $\pm$ 0.05	17.5 $\pm$ 0.10	17.3 $\pm$ 0.18 **	17.1 $\pm$ 0.31 *	17.3 $\pm$ 0.13 **	17.5 $\pm$ 0.19
MCHC	(%)	35.0 $\pm$ 0.11	34.9 $\pm$ 0.27	34.1 $\pm$ 0.35 **	34.2 $\pm$ 0.47	34.1 $\pm$ 0.36 **	33.3 $\pm$ 0.77 **
Platelets	( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	70.7 $\pm$ 6.5	75.0 $\pm$ 8.4	71.3 $\pm$ 5.2	74.0 $\pm$ 5.0	59.8 $\pm$ 6.7 *	50.2 $\pm$ 2.3 **
Leukocytes	( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	36 $\pm$ 6.7	36 $\pm$ 10.5	18 $\pm$ 1.7 **	19 $\pm$ 3.8 **	19 $\pm$ 5.1 **	17 $\pm$ 2.7 *
Lymphocyte	(%)	85.6 $\pm$ 0.7	82.8 $\pm$ 2.0	78.6 $\pm$ 2.4 *	81.8 $\pm$ 2.2	72.8 $\pm$ 4.8 *	76.6 $\pm$ 3.7 **
Neutrophil	(%)	12.7 $\pm$ 0.9	15.2 $\pm$ 2.0	20.1 $\pm$ 2.6 *	16.9 $\pm$ 1.9	25.8 $\pm$ 4.7 *	22.1 $\pm$ 3.8 **
Eosinophil	(%)	0.7 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3 **	0.0 $\pm$ 0.0 **	0.1 $\pm$ 0.3 **
Basophil	(%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocyte	(%)	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.4

Blood samples were collected in nonheparinized tubes from the abdominal aorta at necropsy.

Data represent the mean  $\pm$  SD.\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control on the same sampling day (Dunnett's test).

## 第2章 結腸発がん物質 PhIP および DMH を用いた F344 系ラット 多臓器反復小核試験

### 2-1 緒論

第1章において、典型的な遺伝毒性発がん物質である B[a]P をモデル化合物として、Tg 動物を用いた突然変異試験に多臓器小核試験を組み合わせた統合型の遺伝毒性試験を実施し、同一動物を用いて2種類のエンドポイント（突然変異と小核）の評価が可能であることを確認した。また、F344系の雄性ラット（非Tg）を用いて28日間反復投与後の翌日に採取した組織での小核試験を実施し、Tgラットと同様の結果を得、導入された遺伝子が小核誘発性に影響を与えないことを明らかにした。

第2章では、28日間の反復投与毒性試験への組み込み、または他の遺伝毒性試験との組み合わせを想定した、多臓器（結腸、肝臓、骨髄）小核試験の有用性を確認することを目的とした研究を行った。被験物質は、食品の摂取において曝露量が大きく、安全性評価に重要な消化管が発がん標的臓器である化合物を選定することとした。反復投与消化管小核試験については、短期投与および28日間反復投与の実績はあるものの[14,16,18,77,78]、まだ報告例は少ない。そこで、本章では、結腸にがんを誘発することが知られている遺伝毒性発がん物質である、PhIP および DMH をモデル化合物として選定した。PhIP は、加熱調理された肉や魚で生成が認められる複素環式アミンの1つであり、ラットの結腸に腺がんを誘発することが知られている[44]。DMH は、ラットで結腸の腺腫と腺がんを誘発する強力なアルキル化剤である[47]。骨髄小核試験では PhIP は強い小核誘発能があるが、DMH は高用量短期投与で陽性、低用量反復投与においては陰性結果が得られている[50,77]。ここでは、2種類のラット結腸発がん物質の短期投与による結腸小核誘発能を確認し、さらに、28日間反復投与での多臓器小核試験を行った。動物は、第1章にて使用した Tg 動物と同じ F344 系統の雄性ラットを用いた。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 被験物質

PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine hydrochloride; PhIP·HCl, >90%) はナード研究所から購入した。DMH (1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride; DMH · 2HCl; CAS No. 306-37-6, >98%) は東京化成工業株式会社から購入した。被験物質の投与時に、蒸留水を溶媒とした被験物質溶液を作製した。

#### 2-2-2 動物および飼育管理

6週齢のF344系雄性ラットは日本エスエルシーより購入した。約1週間の馴化後に試験に使用した。飼育環境は、バリアシステムで $23.5 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55.5 \pm 5\%$ 、明暗サイクル12h:12h、空気交換1時間あたり12-15回で維持した。ウッドチップベッド（イワクラ株式会社）を用いたプラスチック製ケージに1ケージ当たり2-3匹で飼育し、水道水およびCE-2ペレット飼料（日本クレア株式会社）は馴化期間、試験期間を通じて自由に摂取させた。本試験は、動物の処置および管理に関する法律（法律第105号、1973年10月1日、2019年6月19日改正）に基づいた、サントリーの動物実験に関する規則に従って動物実験の倫理委員会によって承認されたものである。

### 2-2-3 短期投与小核試験

28日間反復投与試験に先立ち、短期・高用量での小核誘発頻度を確認するための試験を実施した。F344系雄性ラットに溶媒対照（蒸留水）、PhIPを50、100、200 mg/kg/dayの用量で4日間、またはDMHを90 mg/kg/dayの用量で単回、胃ゾンデを用いて経口投与を行った。PhIP、DMHの投与回数、投与量はそれぞれSDラットにて結腸小核誘発能が確認されている条件を参考とし[77]、投与液量は5 mL/kg/dayに設定した。いずれの投与群も、初回投与より4日後に麻酔下で結腸および骨髄を採材した。結腸小核試験は1-2-8に示す通りに実施し、1匹あたり2千個の結腸上皮細胞（COL）における小核を有する細胞（MN-COL）の出現頻度を求めた。骨髄小核試験は1-2-6に示す通りに実施し、1匹あたり2千個の幼若赤血球（PCE）における小核を有する細胞（MN-PCE）の出現頻度および全赤血球（ERY）中の幼若赤血球の割合を求めた。

### 2-2-4 28日間反復投与小核試験

用量設定試験として、F344系雄性ラットにPhIP 100 mg/kg/day、DMHを10、25、50 mg/kg/dayの用量で4日間投与し（溶媒対象群として蒸留水5 ml/kg投与群を設定）、体重推移を確認したところ、PhIP投与群およびDMHの25および50 mg/kg/day投与群では、投与初日と比較した体重の減少が認められた。DMH 10 mg/kg/day投与群では、経時的な体重増加は認められているものの、溶媒対照群と比較すると増加の程度は抑えられていた。この結果および2-2-3の短期投与試験の結果に基づき、28日間反復投与の用量は、PhIPは25、50、75 mg/kg/day、DMHは2.5、5、10 mg/kg/dayに決定した。各化合物について所定の投与量となるように投与液を調製し、被験物質群および溶媒対照（蒸留水）群について28日間の経口反復投与を行った。投与開始より剖検日まで、体重を毎日測定した。投与最終日の翌日、麻酔下



で腹大動脈より採血した後に臓器を摘出した。肝臓は重量測定を行った。骨髄（大腿骨）、肝臓、結腸は、摘出後に一部を迅速に採取し、小核試験のための細胞調製を行った。結腸は、遠位部および近位部を除いた中間部を小核試験に用いた。小核試験で使用しなかった肝臓、結腸の一部および胸骨髄、脾臓は、病理組織学的検査に使用した。

結腸および骨髄の小核試験は短期投与小核試験（2-2-3）と同様のプロトコルにて行った。肝臓の小核試験は1-2-7に示す通りに実施し、1検体あたり2千細胞中の小核を有する細胞数を求めた。

### 2-2-5 病理組織学的検査

PhIP 75 mg/kg/day 群と DMH 10 mg/kg/day 群とそれぞれの溶媒対照群について、病理組織学的検査を実施した。28日反復投与後採取した後の結腸、肝臓、胸骨髄は、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した後、パラフィン包埋した。パラフィンブロックを2 $\mu$ mに薄切し作製した標本はヘマトキシリンとエオジンにて染色し顕鏡した。また、同群について、細胞増殖性を評価するためKi-67による免疫染色標本作製し、観察した。

### 2-2-6 統計解析

体重、臓器重量、小核出現頻度は各群で平均値および標準偏差を算出した。体重と臓器重量（絶対値および相対値）のデータは、Bartlettの分散均一性検定の後、一元配置分散分析またはKruskal-Wallis検定を用いて解析した。有意差が見られた場合は、Dunnnett検定またはDunnnett型多重比較検定を実施した。被験物質群と溶媒対照群との小核肝細胞（MN-HEP）、小核幼若赤血球（MN-PCE）、および小核結腸細胞（MN-COL）の頻度の差を、Kastenbaum-Bowman法[55]を用いて統計的に分析した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 短期投与小核試験

溶媒対照群における小核発現頻度は、結腸で0.19%、骨髄で0.09%であった。PhIPの4日間投与において、結腸、骨髄で用量依存的かつ顕著な小核誘発率の増加が認められた（Fig. 9A, 9B）。PhIP 50、100、200 mg/kg/day 投与における小核発現頻度は、結腸で0.37、0.62、0.66%、骨髄で0.72、1.54、5.10%であった。

DMHの単回投与では、結腸で0.94%の小核発現が認められ、溶媒対照群と比較し有意に増加した（Fig. 9A）。一方、骨髄では小核誘発率は0.11%であり、溶媒対照群

との差異は認められなかった (Fig. 9B)。

### 2-3-2 28 日間反復投与小核試験

投与期間全般にわたり、PhIP 投与群で用量依存的な体重増加抑制が認められた。50 および 75 mg/kg 群では、投与 1 週目以降、体重が低下あるいはほとんど変動しない期間が認められた (Fig. 10A)。DMH 投与では、用量依存的な体重増加抑制が認められ、10 mg/kg/日群では day 5 より試験終了時まで溶媒対照群と比較し有意な体重増加抑制を示した (Fig. 10B)。

臓器重量は、PhIP 投与群で肝臓の絶対重量の用量依存的な低下が認められ、50 mg/kg/day 以上で有意差が認められた。相対重量は 75 mg/kg/day 群のみで低下が認められた (Table 5)。DMH 投与群の肝臓の絶対重量は、10 mg/kg/day 群で有意な低下が認められた。肝臓の相対重量は、DMH 投与による変化は認められなかった (Table 5)。

PhIP の 28 日間反復投与では、結腸の 50 mg/kg/day で溶媒対照群と比較し有意な小核誘発率の増加が認められた (Fig. 11A)。PhIP 投与による肝臓における小核誘発は認められなかった (Fig. 11B)。骨髄では、25 mg/kg/day より用量依存的な小核誘発が認められた (Fig. 11C)。また、用量依存的な幼若赤血球の割合の低下が認められた (Fig. 11D)。

DMH の 28 日間反復投与では、結腸で 5 および 10 mg/kg/day で溶媒対照群との有意差が認められ、用量依存的な小核誘発率の増加が認められた (Fig. 12A)。肝臓では 2.5 mg/kg/day 以上の用量において溶媒対照群と比較し有意な小核誘発が認められた (Fig. 12B)。骨髄小核は陰性であり、幼若赤血球の割合にも変化は認められなかった (Fig. 12C, 12D)。

### 2-3-3 病理組織学的検査

PhIP、DMH ともに最高用量群について、結腸、肝臓の病理組織学的検査を実施した (Table 6)。PhIP 75 mg/kg/day 群の全例に結腸の杯細胞の萎縮、4 例に上皮細胞のアポトーシスの増加が認められた。肝臓の小肉芽腫が対照群、PhIP 75 mg/kg/day 群ともに 1 例認められた。DMH 10 mg/kg/day 群の全例に小葉中心性好酸性肝細胞、単細胞ネクロシス、単核球浸潤が認められた。DMH 10 mg/kg/day 群の結腸に異常は認められなかった。

結腸の細胞増殖の程度を確認するために、PhIP、DMH ともに最高用量群について結腸の Ki-67 染色を実施した。PhIP 75 mg/kg/day 投与群では、溶媒対照群との差異は認められなかった (Fig. 13A, 13B)。DMH 10 mg/kg/day 投与群で、溶媒対照群

と比較して増殖帯における Ki-67 陽性細胞の増加が認められた (Fig. 13C, 13D)。

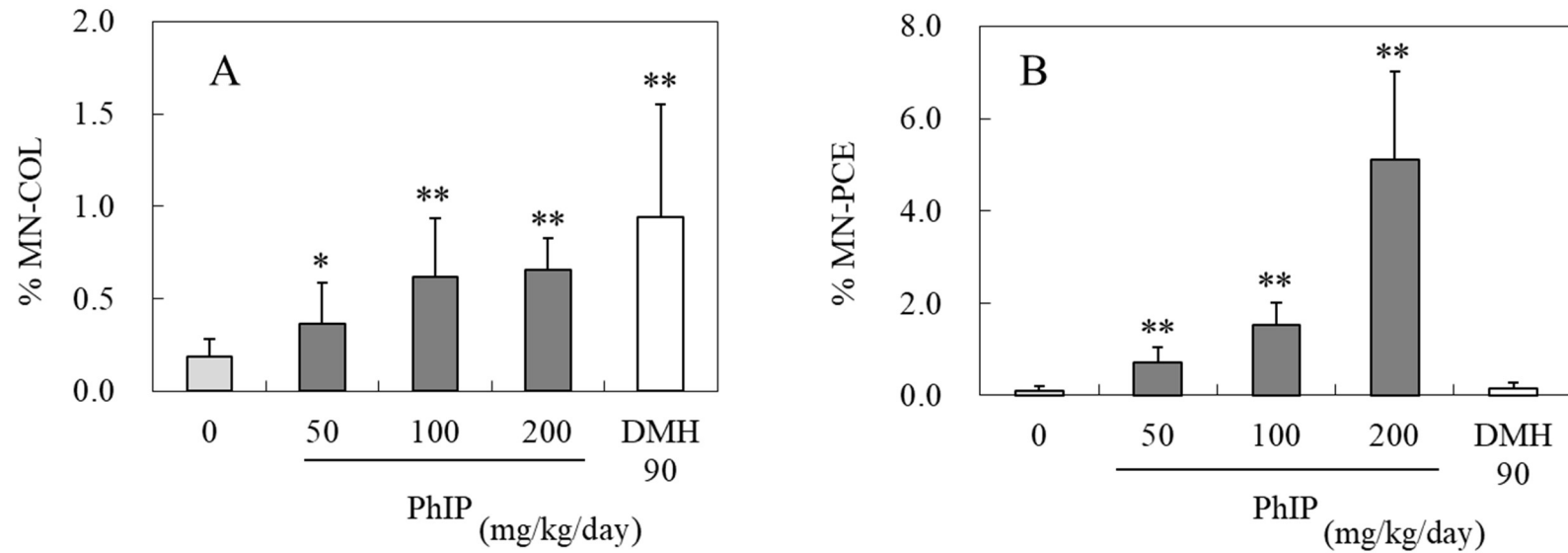


Fig. 9

Frequency of micronucleated cells in the colon (A) and bone marrow (B) of rats treated with PhIP (4 days) or DMH (single).

MN-COL: micronucleated colonic cells, MN-PCE: micronucleated polychromatic erythrocytes.

The data represent the mean  $\pm$  SD (N=5).

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

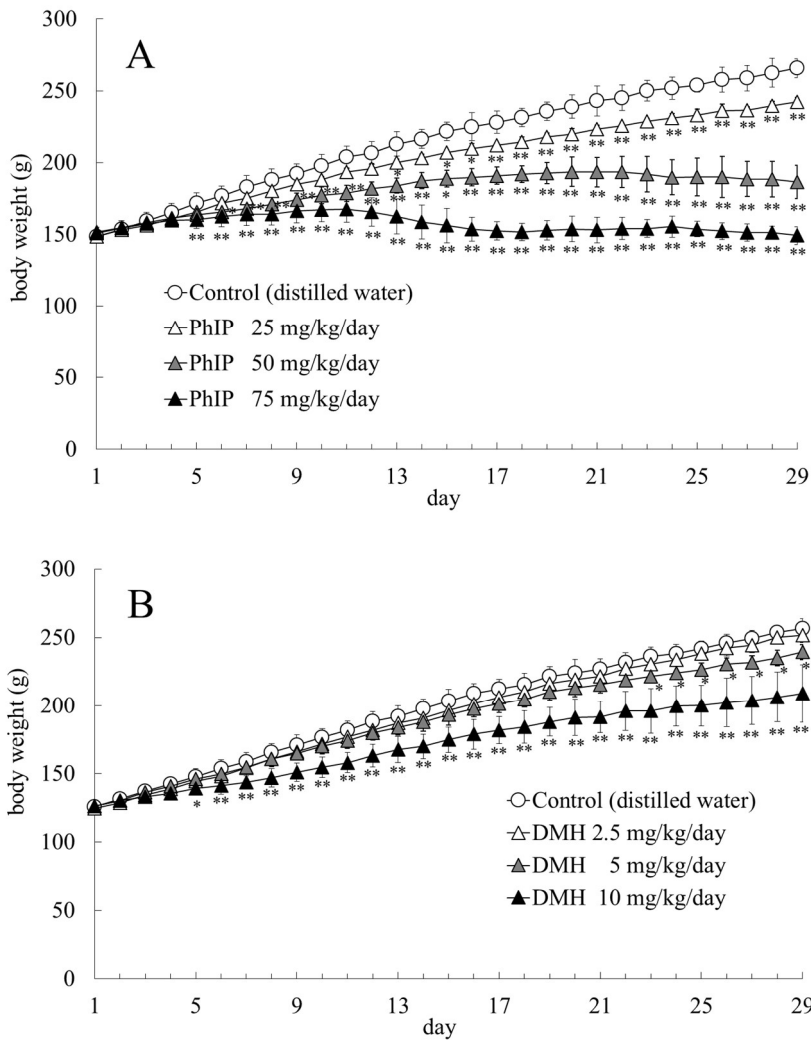


Fig. 10

Changes in the body weight of rats treated with PhIP (A) and DMH (B).

The data represent the mean  $\pm$  SD (N=5).

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

Table 5  
Liver weight after PhIP or DMH administration for 28 days.

Chemicals	Dose (mg/kg/day)	Body weight (g)	Liver	
			Absolute (g)	Relative (g/100 b.w.)
PhIP	0	265.7 ± 6.6	11.19 ± 0.45	4.22 ± 0.22
	25	242.3 ± 3.2**	10.62 ± 0.48	4.38 ± 0.18
	50	186.6 ± 11.6**	7.85 ± 0.99**	4.20 ± 0.29
	75	149.2 ± 6.2**	5.48 ± 0.38**	3.67 ± 0.14**
DMH	0	256.5 ± 7.1	11.06 ± 0.59	4.31 ± 0.11
	2.5	251.6 ± 5.5	11.37 ± 0.62	4.52 ± 0.18
	5	239.4 ± 5.6	10.35 ± 0.54	4.32 ± 0.18
	10	208.9 ± 21.0*	9.09 ± 0.87**	4.35 ± 0.09

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the vehicle control.

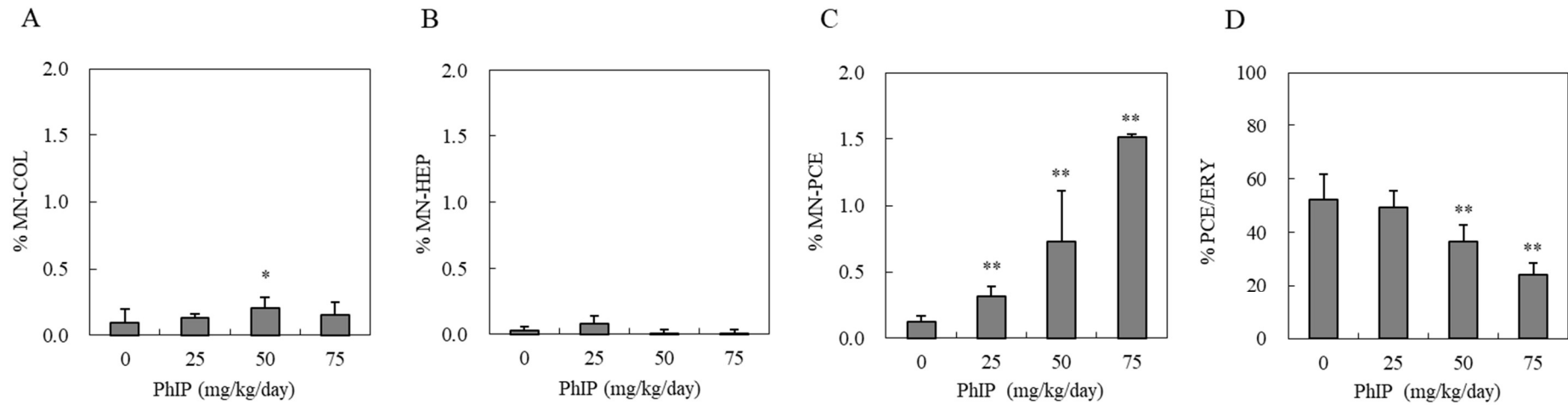


Fig. 11

Frequency of micronucleated cells in the colon (A), liver (B) and bone marrow (C) and frequency of polychromatic erythrocytes in the bone marrow (D) of rats treated with PhIP.

MN-COL: micronucleated colonic cells, MN-HEP: micronucleated hepatocytes, MN-PCE: micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE: polychromatic erythrocytes, ERY: erythrocytes.

The data represent the mean  $\pm$  SD (N=5).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control on the same sampling day.

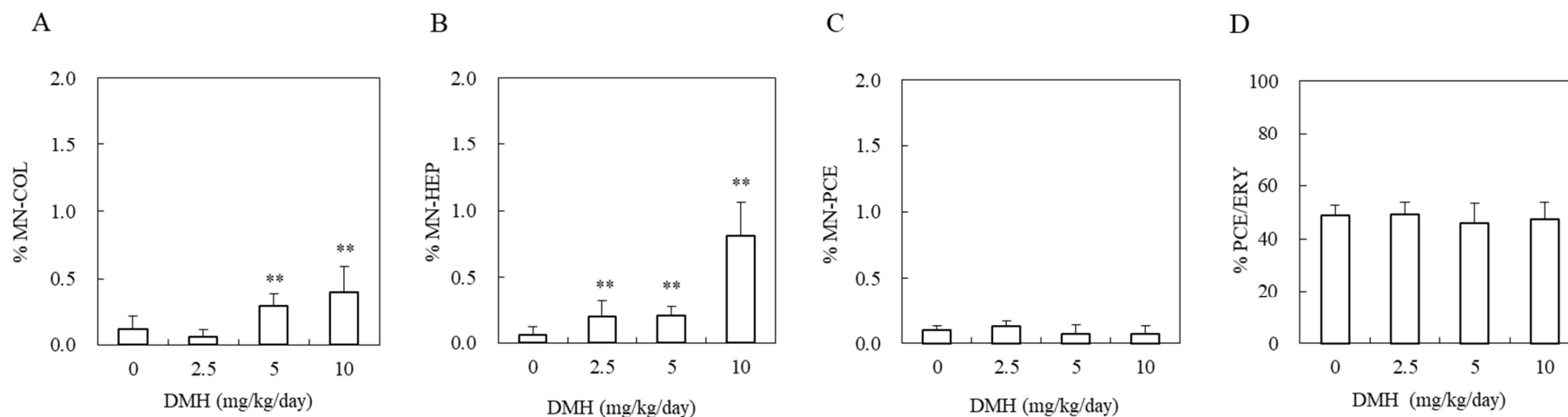


Fig. 12

Frequency of micronucleated cells in the colon (A), liver (B) and bone marrow (C) and frequency of polychromatic erythrocytes in the bone marrow (D) of rats treated with DMH.

MN-COL: micronucleated colonic cells, MN-HEP: micronucleated hepatocytes, MN-PCE: micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE: polychromatic erythrocytes, ERY: erythrocytes.

The data represent the mean  $\pm$  SD (N=5).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control on the same sampling day (Dunnett's test).



Table 6

Histopathological findings in the F344 rats after PhIP (75 mg/kg/day) or DMH (10 mg/kg/day) administration for 28 days.

Group (number of animals/group)		Control (5)			PhIP: 75 mg/kg/day (5) DMH: 10 mg/kg/day (5)		
		±	+	++	±	+	++
Grade		±	+	++	±	+	++
PhIP							
Liver	Microgranuloma	0	1	0	0	1	0
Colon	Atrophy goblet cell	0	0	0	0	5	0
	Apoptosis in colonic epithelium	0	0	0	0	3	1
DMH							
Liver	Microgranuloma	1	0	0	0	0	0
	Hepatocyte eosinophilic degeneration, Necrosis, single cell, centrilobular	0	0	0	3	2	0
	Mononuclear cell infiltration	0	0	0	2	3	0
Colon		0	0	0	0	0	0

±: slight, +: mild, ++: moderate

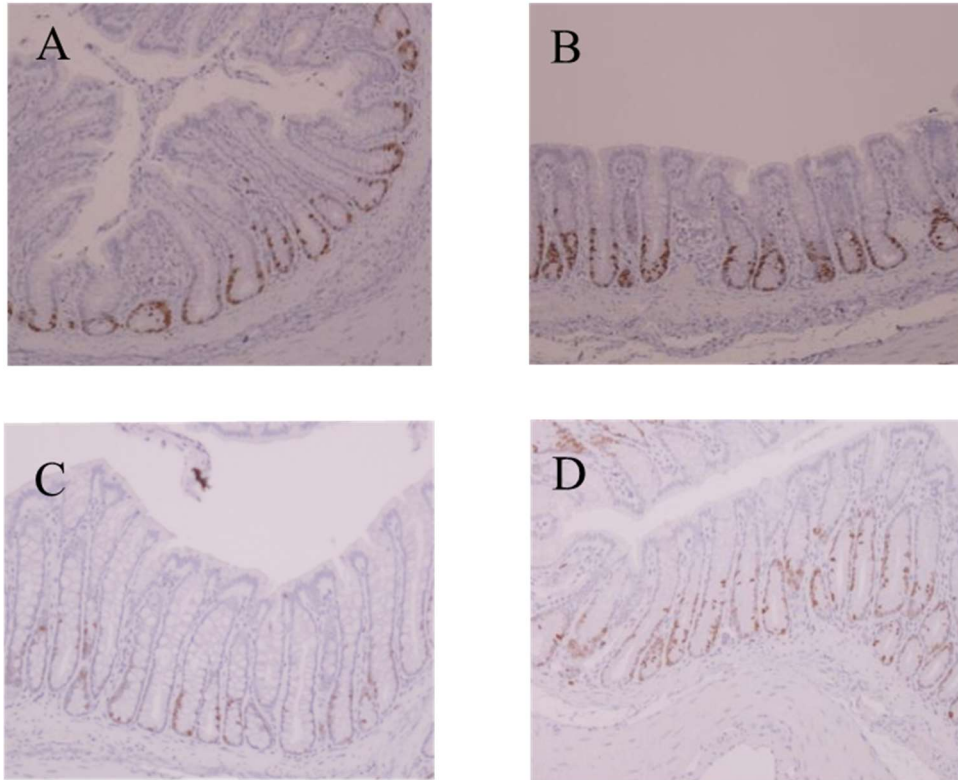


Fig. 13

Ki-67 staining of colonic epithelial cells of F344 rats treated PhIP (A: Control, B: PhIP 75 mg/kg/day) and DMH (C: Control, D: DMH 10 mg/kg/day).

## 2-4 考察

本章では、ラット結腸発がん物質である PhIP と DMH を用いて F344 系ラットの短期投与での結腸、骨髄、及び 28 日間反復投与での結腸、肝臓、骨髄、末梢血での小核試験を行った。その結果、短期投与において PhIP は結腸、骨髄で、DMH は結腸での小核誘発率の増加、28 日間反復投与では PhIP は結腸、骨髄、DMH は結腸、肝臓での小核誘発率の増加が確認され、いずれの化合物においても標的臓器である結腸において小核誘発能を確認できた。

PhIP の 28 日間反復投与において、結腸での小核誘発は 50 mg/kg/day で有意差が認められたが、用量依存性はなく、骨髄と比較して誘発頻度は低かった。病理組織学的検査より結腸上皮細胞のアポトーシスが確認されたが、Ki-67 染色による増殖能には溶媒対照群との間に差は認められなかったことから、細胞障害性の代償としての増殖亢進が充分でなく、小核を有する細胞の発生が観察し辛くなった可能性が示唆された。28 日間反復投与では短期投与よりも投与可能な用量が低いことも検出力に影響すると考えられ、複数の臓器を対象とし評価しておくことが遺伝毒性の捕捉性を高めるために有用であると言える。

SD ラットを使用した PhIP の 28 日間反復小核試験では、結腸、肝臓、骨髄において今回 F344 系ラットで得られたデータよりも高い頻度での小核が検出されている[78]。PhIP は主に CYP1A2 により酸化反応を受け *N*-ヒドロキシ PhIP が生成し、さらに第 2 相反応により生成する *N*-アセトキシ PhIP が DNA との付加体を形成する[43]。PhIP による乳がんの発生率は SD 雌ラットの方が F344 雌ラットよりも高いとの報告がある[79]。また、ラットにおいて CYP の発現には系統差があることが知られている[80]。雄の SD ラットと F344 ラットを直接的に比較、考察した報告は見当たらなかったが、代謝活性化能の系統差が小核誘発頻度の差違の要因である可能性も考えられる。また、週齢（投与開始が 6 週齢と 7 週齢）の違いが、同様に小核誘発頻度に影響していることも考えられる。

DMH の 28 日間反復投与における結腸の小核誘発率の増加は、結腸上皮において Ki-67 陽性細胞が溶媒対照群と比べ増加していることから、細胞増殖の亢進が小核の検出率に影響した可能性がある。DMH 投与群では肝臓でも高い小核誘発率が確認されたが、SD や F344 ラットへの DMH の経口投与による肝発がんは確認されていない[47]。肝臓での病理組織学的検査では毒性変化が見られており、遺伝毒性の発現が発がんに至るかどうかは、遺伝毒性以外の要因も関係している可能性がある。DMH は肝臓で代謝を受け、活性代謝物 (methylazoxymethanol) が抱合化された状態で存在し、腸管内に排出された後に腸内細菌により脱抱合されることが報告されている[81]。それゆえ今回、肝臓および結腸にて小核の誘発が認められ、骨髄では認められなかつ

たことは、DMH の体内動態の状況を反映した妥当な結果であるかもしれない。SD ラットの 28 日間反復骨髄小核試験でも同様に陰性結果が得られている[82]。一方、DMH は短期の高用量投与においては骨髄小核試験が陽性となることが報告されており[50]、活性体が血中でも存在している可能性があるが、反復投与では投与可能な用量が低く制限されることから、曝露量の差が小核の結果に反映しているものと推察される。

*In vivo* 遺伝毒性試験の判定には、評価対象組織が被験物質に曝露されていることを説明できる情報（曝露証明）が重要となる。骨髄小核試験では、成熟赤血球に対する幼若赤血球の割合（% PCE/ERY）の低下が曝露証明の一つとなるように[10]、評価対象の組織に病理組織学的検査における変化は曝露証明になりうる。さらに、病理組織学的検査による毒性影響や細胞増殖性の情報は、遺伝毒性結果の考察に有用となる。経口投与した DMH の消化管における曝露は自明であるため、曝露証明としての病理組織学的検査の意義は低い。一方で、今回の DMH 投与群における骨髄の陰性結果を考察する際に、幼若赤血球の割合では変化が認められず曝露証明にはならないが、肝臓での組織変化が生じていることに基づき体内での曝露を説明できる。骨髄のみを評価対象としていた場合には得られなかった肝臓の組織変化が、骨髄小核試験の考察にも活用できたと言える。

本章では、食品関連物質の評価で重要となる消化管でげっ歯類にて明確な発がん性が報告されている PhIP および DMH をモデル化合物とし、F344 系雄ラットを用いて短期および 28 日間の反復投与後の小核試験を行った。その結果、いずれの投与条件下でも、両化合物ともに結腸での小核誘発が認められた。このことより、結腸小核試験が 28 日間反復投与の一般毒性試験への組み込みや突然変異試験との組み合わせ評価が可能であることが示唆された。また、反復投与毒性試験等に小核試験を組み込む際には個々の物質の動態や毒性を考慮した臓器選択が重要であるが、毒性や体内動態の情報が限られる新規物質の評価においては、多臓器で評価することでより染色体異常誘発性の検出力が高まることが強く示唆された。

## 第3章 DMHを用いたF344系 *gpt delta* ラット突然変異試験と小核試験の統合法検討

### 3-1 諸論

第1章にて、F344系 *gpt delta* 雄性ラットを用いた突然変異評価系に小核試験（結腸、肝臓、骨髄、末梢血）を統合させた評価系において、B[a]Pの遺伝毒性が評価可能であること、さらに統合の上で考慮すべき臓器サンプリング時期を検討し、28日間反復投与の最終投与翌日（day 29）での評価が可能であることを確認した。

第2章にてF344系ラットを用いて結腸発がん物質であるPhIPおよびDMHの28日間反復投与小核試験を行い、非Tg動物で発がん標的臓器における小核誘発を検出可能であることを明らかにした。

第2章で被験物質としたPhIP、DMHはいずれも、突然変異試験で結腸にてMFの増加が想定される化合物である。PhIPはBigBlueラットにおいて、結腸、小腸、肝臓でのMF増加が確認されている[83,84]。一方、DMHの突然変異試験の報告は見当たらない。そこで、第3章ではDMHを被験物質として選定し、第1章で確立したTgラットにおける突然変異試験と小核試験の同時評価の検討を行った。併せて、28日間反復投与の翌日と3日後のサンプリング日を設定し、休薬期間の差による突然変異と小核の検出力の違いを確認し、統合法における各試験系の最適プロトコルを確保するための臓器採取のタイミングについて検討した。

### 3-2 実験方法

#### 3-2-1 被験物質

DMH (1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride; DMH·2HCl; CAS No. 306-37-6) は東京化成工業株式会社より購入した。投与時に蒸留水を溶媒とし投与溶液を作製した。

#### 3-2-2 動物および飼育管理

7週齢のF344系 *gpt delta* Tg 雄性ラット（日本エスエルシー株式会社）を購入し、5-7日の馴化後に試験に使用した。ラットは、1-2-2に示す環境と同じ条件にて飼育した。本試験は、動物の処置および管理に関する法律（法律第105号、1973年10月1日、2019年6月19日改正）に基づいた、サントリーの動物実験に関する規則に従って動物実験の倫理委員会によって承認されたものである。

#### 3-2-3 用量設定および投与

被験物質は、ラット体重 1 kg あたり 5 ml の投与溶液を用時調製し、1 群あたり 5 匹のラットに 1 日 1 回、28 日間 (day 1-28)、胃ゾンデを用いて経口投与を行った。DMH は蒸留水を溶媒とし、0 (溶媒対照)、5 および 10 mg/kg/day の投与量となるように調製した。DMH の最高用量は、第 2 章の結果に基づき、28 日間反復投与における MTD に相当すると考えられる 10 mg/kg/day とした。

#### 3-2-4 組織および血液の採取

1-2-4 に示した条件にて、突然変異試験および小核試験に使用する臓器 (肝臓、結腸、骨髄) および末梢血のサンプリングを実施した。

#### 3-2-5 遺伝子突然変異試験

1-2-5 に示す方法にて遺伝子突然変異試験を実施し、*gpt* 突然変異体頻度 (MF) を求めた。

#### 3-2-6 小核試験

結腸、肝臓、骨髄、末梢血の小核試験は、1-2-6 から 1-2-9 に示す方法にて実施した。

#### 3-2-7 病理組織学的検査

溶媒対照群および DMH 10 mg/kg/day 群について病理組織学的検査を実施した。ホルマリン固定した胸骨骨髄、脾臓、肝臓、および結腸をパラフィンに包埋した。切片 (2 μm) を調製し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した標本を病理組織学的に調べた。

#### 3-2-8 統計解析

溶媒対照群と DMH 投与群で得られた各種データについて、1-2-12 に示す通りに統計解析を行った。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 体重推移、臓器重量

投与期間を通して DMH 投与群で体重増加抑制が観察された。5 mg/kg 群では day 27-29 で、10 mg/kg/day 群は day 5 以降継続して溶媒対照群と比較して有意な低値を示した (Fig. 14)。臓器重量は、10 mg/kg/day 群で肝臓の絶対重量が day 29、day 31 で溶媒対照群と比較して有意に低く、相対重量は 5 mg/kg/day の day 29 で有意な

高値を示した。脾臓の絶対重量は DMH 投与による影響は認められなかったが、相対重量は、10 mg/kg/day 群の day 29、day 31 とも、溶媒対照群と比較し高値を示した (Table 7)。

### 3-3-2 遺伝子突然変異試験

結腸および肝臓では、day 29 および day 31 のいずれも用量依存的な MF の増加が認められ、特に結腸で高頻度に検出された (Fig. 15A, 15B)。一方、骨髄では DMH 投与による MF への影響は認められなかった (Fig. 15C)。Day 29 と day 31 における差異は、結腸の 5 mg/kg/day 群において day 31 の方が有意に高値であったが、それ以外はいずれの臓器においても認められなかった。

### 3-3-3 小核試験

小核誘発は結腸および肝臓で day 29 および day 31 のいずれでも顕著な増加が認められたが (Fig. 16A, 16B)、骨髄および末梢血においては認められなかった (Fig. 16C, 17A)。結腸の小核誘発頻度においてサンプリング日の差異は明確でなかった (Fig. 16A)。肝臓では day 29 より day 31 の方が高値を示した (Fig. 16B)。骨髄の赤血球中の幼若赤血球の割合は、10 mg/kg/day 群の day 31 のみ有意な低下が認められた (Fig. 16D)。末梢血における赤血球中の幼若赤血球の割合は、DMH 5 mg/kg/day 群ではサンプリング日によらず対照群との明らかな差異は認められず、10 mg/kg/day 群において day 4 で低値、day 15 から day 31 は高値傾向を示した (Fig. 17B)。

### 3-3-4 病理組織学的検査

病理組織学的検査において、骨髄および結腸では、day 29 および day 31 のいずれにおいても DMH 投与による顕著な影響は認められなかった (Table 8)。脾臓では、day 29 および day 31 において溶媒対照と比較し DMH 投与による髄外造血の亢進が確認された。肝臓では、DMH 投与群の day 29 および day 31 において中心静脈域を結ぶ肝細胞の好酸性変化、同領域に単細胞壊死が散在性に軽度～中程度に認められた。DMH 投与群の day 29 において、出血 (3 例) および溶媒対象群と同数の軽度の髄外造血 (1 例) が認められた。day 31 のみに、周囲への圧排を伴う再生性の過形成 (3 例) が認められた。

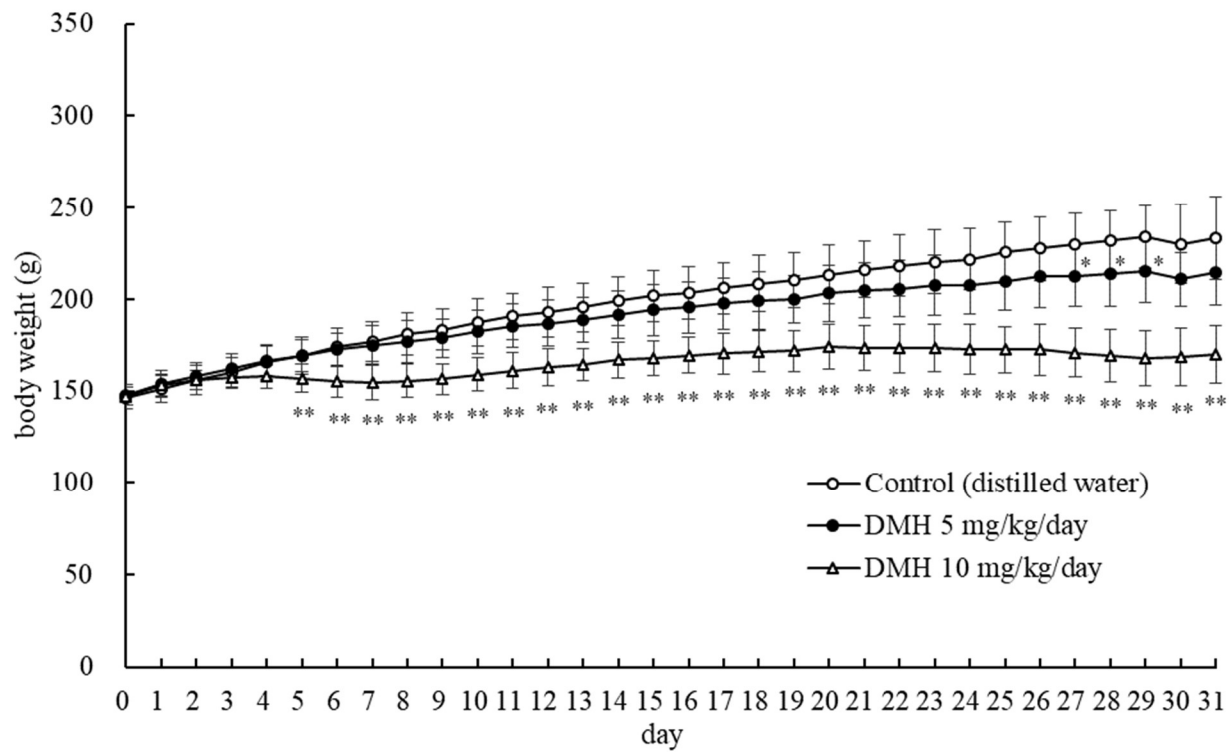


Fig. 14

Changes in the body weight of *gpt* delta rats treated with DMH.

The data represent the mean  $\pm$  SD (N=10, data from days 30 and 31 are N = 5).

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



Table 7

Liver and spleen weight on day 29 and day 31 after DMH administration for 28 days to *gpt* delta rats.

Sampling day	Dose (mg/kg/day)	Body weight <sup>a</sup> (g)	Liver <sup>a</sup>		Spleen <sup>a</sup>	
			Absolute weight (g)	Relative weight (g/100 g b.w.)	Absolute weight (g)	Relative weight (g/100 g b.w.)
day 29	Control (DW)	237.1 ± 9.6	9.26 ± 0.60	3.90 ± 0.11	0.59 ± 0.04	0.25 ± 0.02
	DMH 5	222.0 ± 16.9	9.32 ± 0.87	4.19 ± 0.10 *	0.63 ± 0.06	0.29 ± 0.02
	DMH 10	167.1 ± 16.5 **	6.23 ± 0.89 **	3.72 ± 0.21	0.60 ± 0.05	0.36 ± 0.03 **
day 31	Control (DW)	233.4 ± 22.6	8.92 ± 1.18	3.81 ± 0.19	0.62 ± 0.05	0.27 ± 0.01
	DMH 5	214.5 ± 17.7	8.53 ± 0.96	3.97 ± 0.14	0.62 ± 0.03	0.29 ± 0.01
	DMH 10	170.1 ± 15.8 **	6.50 ± 0.77 **	3.81 ± 0.17	0.62 ± 0.01	0.37 ± 0.03 **

<sup>a</sup> Data represent the mean ± SD (N=5).\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control on the same sampling day (Dunnett's test).

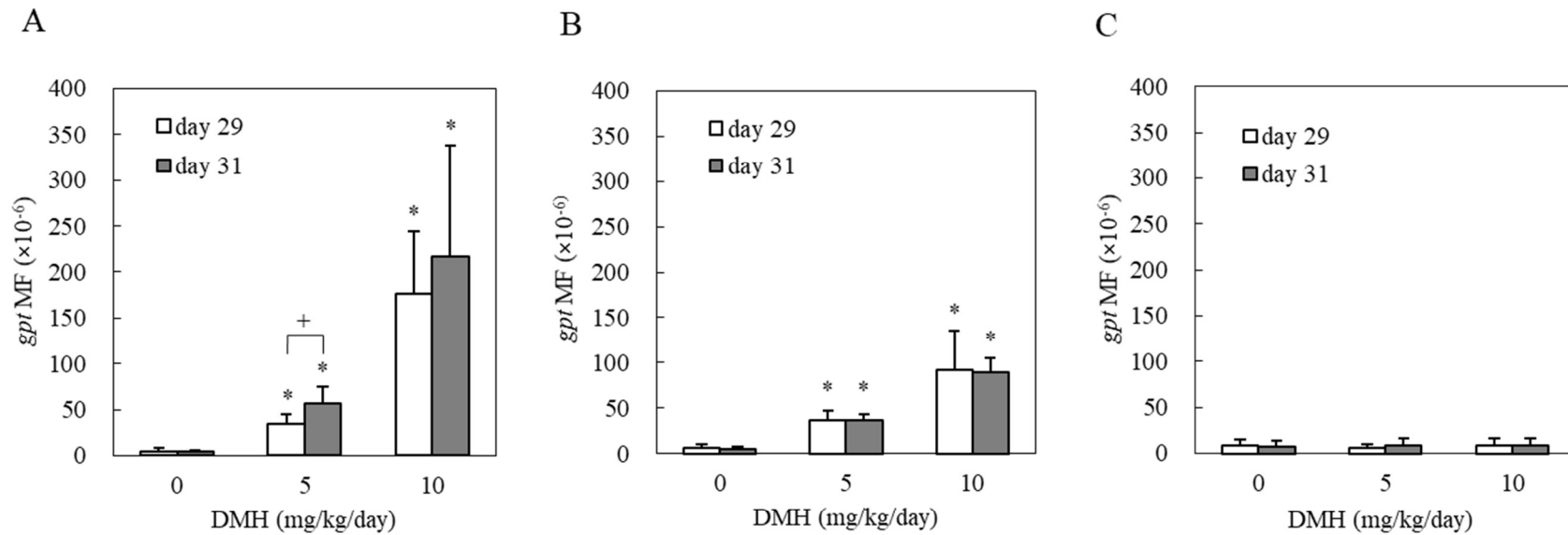


Fig. 15

Frequency of *gpt* mutants in the colon (A), liver (B), and bone marrow (C) of *gpt* delta rats treated with DMH.

MF: mutant frequency. Data represent the mean  $\pm$  SD (N=5).

\* $p < 0.05$ : significant difference from the control on the same sampling day.

+ $p < 0.05$ : significant difference between day 29 and day 31 for the same dose.

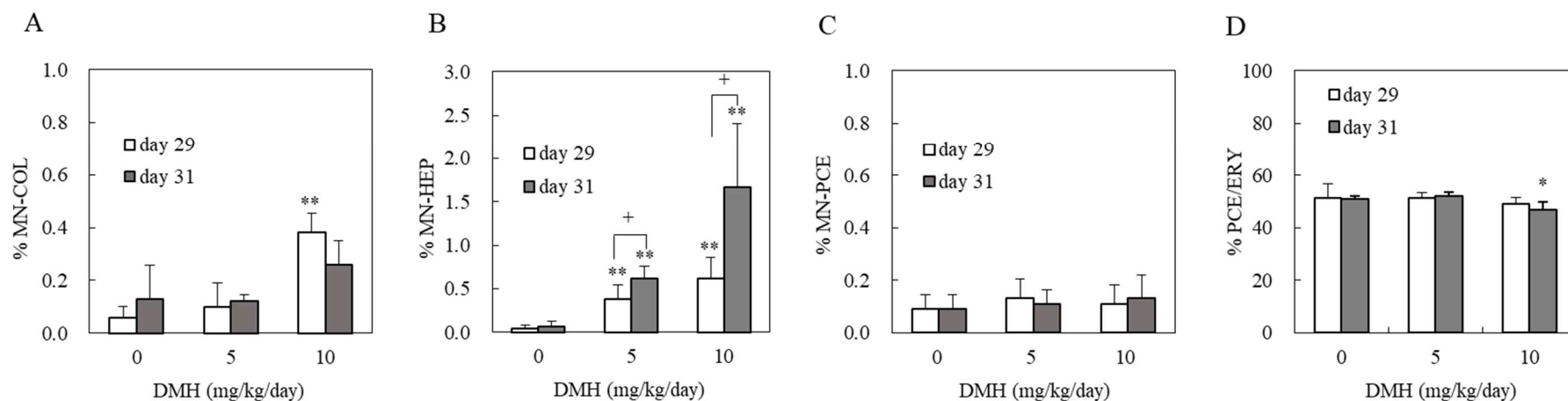


Fig. 16

Frequency of micronucleated cells in the colon (A), liver (B), and bone marrow (C) and frequency of polychromatic erythrocytes in the bone marrow (D) of *gpt* delta rats treated with DMH.

MN-COL: micronucleated colonic cells, MN-HEP: micronucleated hepatocytes, MN-PCE: micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE: polychromatic erythrocytes, ERY: erythrocytes.

Data represent the mean  $\pm$  SD (N=5).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significant difference from the control on the same sampling day.

+ $p < 0.05$ : significant difference between day 29 and day 31 for the same dose.

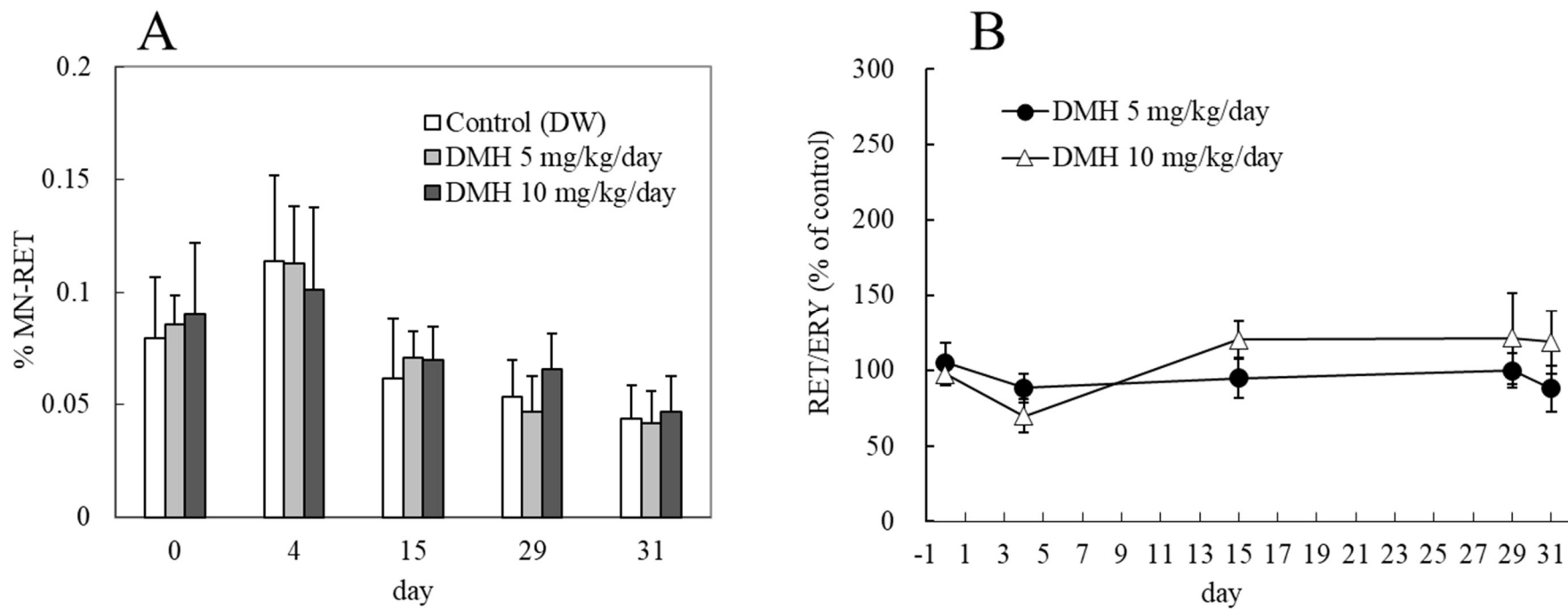


Fig. 17

Frequency of micronucleated cells (A) and reticulocytes (B) in the peripheral blood of *gpt* delta rats treated with DMH.

MN-RET: micronucleated reticulocytes, RET: reticulocytes, ERY: erythrocyte.

Data represent the mean  $\pm$  SD (N=10, data for day 31 is N=5).

Table 8

Histopathological findings in the *gpt* delta rats on day 29 and day 31 after DMH administration for 28 days.

Site & findings	Group/Dose	Control (DW)				DMH 10 mg/kg/day					
	Sampling day	day 29		day 31		day 29			day 31		
	<i>No. examined</i>	5		5		5			5		
grade	±	+	±	+	±	+	++	±	+	++	
Bone marrow		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen											
Extramedullary hematopoiesis		0	0	2	0	2	0	0	2	2	0
Colon		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver											
Necrosis, single cell, centrilobular		0	0	0	0	0	3	1	2	1	0
Extramedullary hematopoiesis		1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Hepatocyte eosinophilic degeneration, centrilobular		0	0	0	0	0	4	1	1	3	1
Hemorrhage		0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Hepatocellular hyperplasia		0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Microgranuloma		0	0	0	3	0	1	0	0	0	0

±: slight, +: mild, ++: moderate

### 3-4 考察

本研究において、DMHの28日間反復投与翌日(day 29)と3日目(day 31)に採取した結腸、肝臓、骨髄を用いて、遺伝子突然変異と小核誘発能を評価したところ、結腸および肝臓の*gpt* MFおよび小核誘発が認められた。DMHのラット発がん標的である結腸での突然変異および染色体異常について、本試験系にて捕捉可能であることが確認できた。

*gpt* MFはday 29とday 31で定量的な検出頻度に差が認められたものの、定性的な差(陽性/陰性)に影響するような違いは認められなかった。第1章におけるB[a]Pの検討と同様に、遺伝子突然変異試験のためのサンプリングはOECDテストガイドラインで推奨されるday 31と同時に、day 29に評価しても差支えないことが判明したと言える。

小核試験では、day 29およびday 31ともに結腸および肝臓で小核誘発率の増加が認められた一方、骨髄または末梢血においては影響が認められなかった。day 29における結腸、肝臓、骨髄小核試験の結果は、第2章で実施したF344系雄性ラット(非Tgラット)における28日間反復投与での結果との定性的な差は認められなかった。体重や各臓器でみられる毒性影響も非Tgラットの結果と近似していた。本研究では、OECDテストガイドラインTG488に従って投与開始時に8週齢の動物を使用した。一方、第2章にて実施した多臓器小核試験では、投与開始時に7週齢の動物を使用した。いずれも、ラットにおいてDMHの発がん標的臓器である結腸で明確な小核誘発能を示し、どちらの試験条件下でも適切に小核が検出されたと判断できる。ただし、異なる週齢のラットを使用する場合、感度に影響を与える可能性が示唆されていることから[76,85]、実験を計画する際は、週齢の影響を考慮する必要がある。

肝臓では、DMHは代謝されて活性代謝物が形成された後、抱合化され胆管または血液中に存在し、腸内に到達すると腸内細菌によって加水分解されアグリコンを形成することが報告されている[81]。抱合体が多く存在する骨髄および末梢血において、突然変異や小核頻度が上昇しないことは、DMHの体内動態と合致する。

以上の結果より、Tg動物を用いた突然変異試験で推奨されるサンプリング時期(day 31)と、一般毒性試験等で汎用されるサンプリング時期であるday 29では、突然変異誘発能の判断に影響する結果の差異はないことが示された。突然変異試験に多臓器小核試験を組み合わせることで、複数の組織で2つの主要な遺伝毒性エンドポイントを評価可能となり、遺伝毒性試験における実験動物数の削減にも貢献することが期待される。

## 総括

化学物質の安全性評価の一環として、発がん性を予測するための遺伝毒性試験を適正に実施することは重要である。生体における遺伝毒性を正確にするためには、*in vitro* 試験の外挿性の向上への取り組みと、*in vivo* 試験の実施の方策がある。*In vivo* 遺伝毒性試験の実施においては、化学物質の体内動態を考慮した適切な評価対象臓器の選定と、その臓器で評価可能なエンドポイントの組み合わせを踏まえた試験条件の選択が重要となる。それに加え、動物実験における動物福祉（3Rs）の観点より、代替法の活用、実験動物数の削減、および動物への苦痛の軽減が求められている。遺伝毒性試験においても、より少ない動物数で多くの情報を得るための試験の組み合わせ、他の試験との統合法検討が求められる。複数のエンドポイントを多臓器で評価するための手法の開発がなされているが、それらを組み合わせる際にそれぞれの試験で異なる至適試験条件の調整が必要となり、その検討は十分ではない。また、特に多臓器小核試験は他の *in vivo* 試験に比べて実績が少なく、組み合わせによる検討はほとんど報告されていない。食品関連物質の評価において、最初に曝露される消化管の遺伝毒性を評価することは重要であるが、これまで消化管を標的とした遺伝毒性を複数の試験の組み合わせで検出しようとした事例は見当たらない。

そこで本研究では、食品関連物質の評価に活用可能な統合型遺伝毒性試験の確立を目的とし、Tg 動物を用いる遺伝子突然変異試験と消化管を対象とした小核試験の組み合わせによる評価手法の確立を試みた。代表的な発がん物質であり、かつ、食品の焼け焦げにも含まれる B[a]P をモデル化合物とし、本組み合わせ試験法の技術的問題、特にサンプリングのタイミングについて検討した。次に発がんの標的が消化管である PhIP および DMH をモデル化合物とし、消化管での反復小核試験法の確立を検討した。さらに、DMH を用いて組み合わせ法による評価法の確立を検討した。最後に、得られた結果から、食品関連成分における遺伝毒性試験の組み合わせ評価あるいは一般毒性試験への組み込み評価の活用について考察した。

第1章では、F344 *gpt* delta Tg 雄性ラットを用いた突然変異試験に多臓器小核試験を組み合わせた統合遺伝毒性試験法を検討した。被験物質に B[a]P を用い、28日間反復経口投与後、結腸、肝臓および骨髄での遺伝子突然変異試験および小核試験、さらに末梢血小核試験を実施した。評価した全ての臓器で突然変異が検出された一方、明確な小核誘発が認められたのは骨髄と末梢血のみであり、エンドポイントにより結果に違いが認められた。試験プロトコルの最適化を図るため、突然変異試験の OECD テストガイドライン TG488 で推奨される最終投与から3日後（day 31）における評

価と一般的な毒性試験の最終投与翌日（day 29）との評価の比較を行ったが、遺伝毒性の判断に影響するような結果の違いは認められなかった。これらの結果より、Tg ラットと、通常の毒性試験で用いられる非 Tg ラットの小核試験結果は同等の陽性/陰性判断が可能であり、組み合わせによる評価結果の信頼性が示された。また、突然変異と小核試験では臓器ごとに検出力が異なるために、標的臓器が未知の物質に対して *in vivo* 試験を行う際の臓器選定が重要であることが示された。一方、突然変異試験を他の試験に合わせて最終投与の翌日に行うことには問題がないことが示された。

第 2 章では、食品関連物質の評価で重要となる消化管でげっ歯類に対する明確な発がん性（結腸発がん）を示す PhIP および DMH を対象モデル化合物とし、非 Tg ラットを用いて 28 日間の反復投与後に小核が検出できるかを検討した。その結果、いずれの化合物とも結腸での小核誘発が認められたことから、結腸小核試験が 28 日間反復投与の一般毒性試験への組み込みや突然変異試験との組み合わせ評価が可能であることが示唆された。ただし、PhIP の 28 日間投与での小核を有する結腸上皮細胞の出現頻度は低く、用量依存性も認められなかった。一方で同時に採取した骨髄では顕著な用量依存性を伴う小核誘発が見られており、臓器毎の被験物質の毒性影響の違いが小核の検出感度に影響していることが推察された。従って、消化管を標的臓器と想定した遺伝毒性評価を行う場合においても、曝露が期待され、さらに細胞増殖の盛んな骨髄等の他の組織の評価も同時に行っておくことが、遺伝毒性の捕捉性を高めるためには重要である。

第 3 章では、第 2 章の結果より、高頻度の結腸小核誘発が認められた DMH を用いて、B[a]P の評価で確立した統合型の遺伝毒性試験を実施した。その結果、day 29 および day 31 での評価において、DMH の発がん標的臓器である結腸に加え、肝臓でも突然変異および小核の誘発頻度が顕著に増加した一方、骨髄および末梢血（末梢血は小核試験のみ）では小核の誘発は認められなかった。臓器による違いが見られたのは、DMH の遺伝毒性活性本体が血中では抱合化され、消化管にて脱抱合される体内動態を反映していると解釈することができる。また、本試験結果からは、*in vivo* 遺伝毒性試験として最も汎用される骨髄小核試験では検出できない染色体異常誘発性を、多臓器小核試験を行うことで検出できる可能性が示された。

新規の化学物質は、まず *in vitro* の Ames 試験や哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、げっ歯類の *in vivo* 骨髄小核試験が実施されることが多い。*In vitro* 試験がいずれも陰性であった場合には、一般的にはそれ以上の追加試験は不要と判断される。一方、Ames 試験や染色体異常試験のいずれかあるいは両方で陽性結果が得られた場合には、骨髄小核試験に加えて追加の *in vivo* 試験を実施することにより、*in vitro* で認められた遺伝毒性が生体内でも認められるかどうかの確認が必要である。本研究結



果から、*in vivo* 試験では標的臓器を考慮した評価対象組織の選定が重要であることが示唆され、特に新規の食品関連物質に対しては、骨髄や末梢血の赤血球を対象とした評価に加え肝臓および結腸を評価対象とすることで、遺伝毒性の検出力を高めることができるものと強く提案する。

追加の *in vivo* 試験のエンドポイントとして遺伝子突然変異試験を選択することは、Tg 動物を必要とするための難しさもあるが、Ames 試験と同じエンドポイントを *in vivo* で評価出来る利点は大きい。また、食品関連成分では、Ames 試験での陽性事例も少なくないことから、Ames 試験で陽性結果であった場合に生体内での影響を詳細に確認するために活用可能である。Tg 動物を用いる遺伝子突然変異試験は、理論上は DNA が抽出できればどの臓器でも評価が可能であり、標的臓器を目的に合わせて選択できることも重要な利点である。一方で、B[a]P の評価でも見られたように、発がん標的臓器以外でも突然変異が誘発される傾向があるため、肝臓や消化管を用いた突然変異試験を、標的臓器に限定しない発がん性を検出する目的で活用することも可能である。多臓器小核試験は、突然変異試験よりも評価可能な臓器に限られるが、陽性結果が得られた臓器における発がん性との関連は突然変異試験よりも強いことが示唆されており、被験物質の毒性影響や細胞周期の影響を受けやすいエンドポイントである。従って、突然変異試験では広範に遺伝毒性を捕捉し、小核試験では特定の臓器に対する発がん性を考察する情報を得ることで、両者を同時に実施することの有用性は高いと結論付けることができる。

特に食品関連物質の *in vivo* 評価で重要な消化管での遺伝毒性試験は、これまでに実施例が少なく、PhIP および DMH の 28 日間反復投与後に小核が検出されたことは有用な知見であり、一般毒性試験への組み込みを可能とする結果である。結腸、肝臓、骨髄の小核試験は一般毒性試験実施時に細胞を回収しておけばいつでも評価が可能である。特に天然物由来の食品添加物等は、Ames 試験が陽性であってもその食品が使用禁止になることは通常なく、長期投与試験で発がん性の懸念がないことを確認して認可される場合が多い。本研究の成果より、新規食品の安全性評価において、長期投与試験の代わりに、一般毒性試験から得られる結腸、肝臓、骨髄での小核を評価することで、追加の動物を必要とせずに発がん性の予測を行うことができる有用性が示唆された。

以上、本研究では、食品関連物質の評価への活用に向けた、3Rs に配慮し、かつ生体への遺伝毒性を適切に判断するための *in vivo* 遺伝毒性評価系を検討し、F344 系 *gpt delta* ラットを用いた突然変異試験および遺伝子多臓器小核試験、さらにそれらを組み合わせた統合型試験の有用性を示すことができた。本研究において確立した *gpt delta* ラットを用いた 28 日間反復投与による突然変異試験および多臓器小核試験を実

施することにより、これまで汎用されてきた骨髄小核試験の単独実施よりも多くの情報を総合的に得ることができる。また、同時に一般毒性試験で評価される試験項目を評価しておくことは、遺伝毒性の考察に有用な情報を提供することに繋がる。

更なる 3Rs への対応として、Tg 動物を用いて新規の食品および食品関連物質の一般毒性を実施することも選択肢として挙げられる。Tg 動物での一般毒性試験に関する背景データの蓄積が必要であるため現状では困難であるものの、将来的には、*in vitro* 試験で突然変異誘発能が認められた場合には、多くの化学物質の評価で実施される 28 日間の反復投与毒性試験に、突然変異を含む遺伝毒性のエンドポイントを組み込む試験を実施することで、より包括的かつ 3Rs に配慮した安全性評価を達成することができる。

## 謝辞

本論文の提出にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府 薬食生命科学専攻 三好規之准教授に心より感謝する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 食品栄養学専攻 増田修一教授、環境科学専攻 伊吹裕子教授、薬食生命科学専攻 渡辺賢二教授に深く感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり終始ご指導を賜りました、静岡県立大学大学院食品栄養環境科学研究所 若林敬二特任教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行および論文作成に多大なるご指導を賜りました、林真博士に深く感謝申し上げます。

本研究の一部は、AMED の官民共同研究の一環として実施したものであり、主任研究員の山田雅巳博士、研究員の増村健一博士には、研究の計画から結果の考察に至るまで多大なるご指導、ご助言を賜りましたことを深く感謝申し上げます。また、同研究班にて研究内容に関して多くのご助言をいただきました諸先生方に大変感謝申し上げます。

本研究で遂行した *gpt delta* ラットを用いた突然変異試験に関しては、日本環境変異原学会にて能美健彦博士、林宏之博士が発起人となりました共同研究にて習得しました。同共同研究においてご指導いただき、論文執筆へのご支援をいただきました川村祐司博士には大変感謝申し上げます。肝臓小核試験および消化管小核試験に関しては、JEMS MMS 研究会にて発足しました共同研究にて実験手技をご指導いただきました。代表の濱田修一博士はじめ、共同研究にてお世話になりました諸先生方に大変感謝申し上げます。消化管小核試験では大山ワカ子博士、岡田恵美子博士に多くのご指導をいただき、大変感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、研究活動を支えていただき終始ご指導賜りました、北川義徳博士、藤居互博士に深く感謝申し上げます。実験の遂行にあたっては、田中康浩さん、下吉里実さん、百南綾華さんをはじめ多大なるご協力を賜りました、多くの方に感謝申し上げます。

## 引用文献

- [1] OECD, Test Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test Ames, OECD Publishing, Paris. (1997)
- [2] OECD, Test Guideline 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, OECD Publishing, Paris. (2020)
- [3] Lambert, IB., Singer, TM, Boucher, SE., Douglas, GR.: Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat. Res.*, **590**, 1-280 (2005)
- [4] Nohmi, T., Suzuki, T., Masumura, K.: Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutat. Res.*, **455**, 191-215 (2000)
- [5] Nohmi, T., Masumura, K., Toyoda-Hokaiwado, N., Transgenic rat models for mutagenesis and carcinogenesis. *Genes Environ.*, **39**, 11 (2017)
- [6] Masumura, K., Sakamoto, Y., Kumita, W., Honma, M., Nishikawa, A., Nohmi, T.: Genomic integration of lambda EG10 transgene in *gpt* delta transgenic rodents. *Genes Environ.*, **37**, 24 (2015)
- [7] OECD, Test Guideline 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Publishing, Paris. (2016)
- [8] Hayashi, M.: The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—, *Genes Environ.*, **38**, 18 (2016)
- [9] OECD, Test Guideline 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, OECD Publishing, Paris. (2016)
- [10] OECD, Test Guideline 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, OECD Publishing, Paris. (2016)
- [11] OECD, Test Guideline 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris. (2016)
- [12] OECD, Test Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris. (2016)
- [13] Morita, T., MacGregor, JT., Hayashi, M.: Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. *Mutagenesis*, **26**, 223-230 (2011)
- [14] Hamada, S., Ohyama, W., Takashima, R., Shimada, K., Matsumoto, K., Kawakami, S., Uno, F., Sui, H., Shimada, Y., Imamura, T, Matsumura, S., Sanada, H., Inoue, K., Muto, S., Ogawa, I., Hayashi, A., Takayanagi, T., Ogiwara, Y., Maeda, A., Okada, E., Terashima, T., Takasawa, H., Narumi, K., Wako, Y., Kawasaki, K., Sano, M., Ohashi, N., Morita, T., Kojima, H., Honma,

- M., Hayashi, M.: Evaluation of the repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: Summary of the collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat. Res.*, **780-781**, 2-17 (2015)
- [15] 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)
- [16] Narumi, K., Ashizawa, K., Takashima, R., Takasawa, H., Katayama, S., Tsuzuki, Y., Teramoto, H., Morita, T., Hayashi, M., Hamada, S.: Development of repeated dose liver micronucleus assay using adult rats: an investigation of diethylnitrosamine and 2, 4-diaminotoluene. *Mutat. Res.*, **747**, 234-239 (2012)
- [17] Nishikawa, T., Haresaku, M., Fukushima, A., Nakamura, T., Adachi, K., Masuda, M., Hayashi, M.: Further evaluation of an in vivo micronucleus test on rat and mouse skin: results with five skin carcinogens. *Mutat. Res.*, **513**, 93-102, (2002)
- [18] Ohyama, W., Gonda, M., Miyajima, H., Kondo, K., Noguchi, T., Yoshida, J., Hatkeyama, 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)
- [19] 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)
- [20] ICH S2 (R1), Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use (2011)
- [21] 厚生労働省、経済産業省、環境省: 監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準 最終改正 (2006)
- [22] 食品安全委員会: 添加物に関する食品健康影響評価指針 (2020)
- [23] 食品安全委員会 新開発食品専門調査会: 特定保健用食品の安全性評価に関する

基本的考え方 (2004)

- [24] 厚生労働省: 錠剤、カプセル状等食品の原材料の安全性に関する自主点検ガイドライン (平成 17 年 2 月 1 日付け食安発第 0201003 号別添 2 別紙 STEP7) (2005)
- [25] 消費者庁: 機能性表示食品の届出等に関するガイドライン (2017)
- [26] Takumi-Kobayashi, A., Ogura, R., Morita, O., Nishiyama, N., Kasamatsu, T.: Involvement of hydrogen peroxide in chromosomal aberrations induced by green tea catechins in vitro and implications for risk assessment. *Mutat. Res.*, **657**, 13-18 (2008)
- [27] Utesch, D., Feige, K., Dasenbrock, J., Broschard, TH., Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Lines, TC.: Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. *Mutat. Res.*, **654**, 38-44 (2008)
- [28] Hori, H., Takayanagi, T., Kamada, Y., Shimoyoshi, S., Ono, Y., Kitagawa, Y., Shibata, H., Nagao, M., Fujii, W., Sakakibara, Y.: Genotoxicity evaluation of sesamin and episesamin. *Mutat. Res.*, **719**, 21-28 (2011)
- [29] Thybaud, V., Lorge, E., Levy, DD., van Benthem, J., Douglas, GR., Marchetti, F., Moore, MM., Schoeny, R.: Main Issues Addressed in the 2014-2015 Revisions to the OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. *Environ. Mol. Mutagen.*, **58**, 284-295 (2017)
- [30] Pant, K., Krsmanovic, L., Bruce, SW., Kelley, T., Arevalo, M., Atta-Safoh, S., Debelie, F., La Force, ML., Springer, S., Sly, J., Paranjpe, M., Lawlor, T., Aardema, M.: Combination comet/micronucleus assay validation performed by BioReliance under the JaCVAM initiative. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **786-788**, 87-97 (2015)
- [31] Kasamoto, S., Masumori, S., Tanaka, J., Ueda, M., Fukumuro, M., Nagai, M., Yamate, J., Hayashi, M.: Reference control data obtained from an in vivo comet-micronucleus combination assay using Sprague Dawley rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **69**, 187-191 (2017)
- [32] Lemieux, CL., Douglas, GR, Gingerich, J., Phonethepswath, S., Torous, DK, Dertinger, SD., Phillips, DH, Arlt, VM, White, PA.: Simultaneous measurement of benzo[a]pyrene-induced *Pig-a* and *lacZ* mutations, micronuclei and DNA adducts in Muta™ Mouse. *Environ. Mol. Mutagen.*, **52**, 756-765 (2011)
- [33] Horibata, K., Ukai, A., Kimoto, T., Suzuki, T., Kamoshita, N., Masumura, K.,

- Nohmi, T., Honma, M.: Evaluation of in vivo genotoxicity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, benzo[*a*]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the *Pig-a* and *gpt* assays. *Environ. Mol. Mutagen.*, **54**, 747-754 (2013)
- [34] Long, AS., Wills, JW., Krolak, D, Guo, M, Dertinger, SD., Arlt, VM., White, PA.: Benchmark dose analyses of multiple genetic toxicity endpoints permit robust, cross-tissue comparisons of MutaMouse responses to orally delivered benzo[*a*]pyrene. *Arch. Toxicol.*, **92**, 967-982 (2018)
- [35] Rothfuss, A., Honma, M., Czich, A., Aardema, MJ., Burlinson, B., Galloway, S., Hamada, S., Kirkland, D., Heflich, RH., Howe, J., Nakajima, M., O'Donovan, M., Plappert-Helbig, U., Priestley, C., Recio, L., Schuler, M., Uno, Y., Martus, HJ.: Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutat. Res.*, **723**, 108-120 (2010)
- [36] Rothfuss, A., O'Donovan, M., De Boeck, M., Brault, D., Czich, A., Custer, L., Hamada, S., Plappert-Helbig, U., Hayashi, M., Howe, J., Kraynak, AR., van der Leede, BJ., Nakajima, M., Priestley, C., Thybaud, V., Saigo, K., Sawant, S., Shi, J., Storer, R., Struwe, M., Vock, E., Galloway, S.: Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. *Mutat. Res.*, **702**, 40-69 (2010)
- [37] Dertinger, SD., Phonethepswath, S., Franklin, D., Weller, P., Torous, DK., Bryce, SM., Avlasevich, S., Bemis, JC., Hyrien, O., Palis, J., MacGregor, JT.: Integration of mutation and chromosomal damage endpoints into 28-day repeat dose toxicology studies. *Toxicol. Sci.*, **115**, 401-411 (2010)
- [38] Onami, S., Cho, YM., Toyoda, T., Horibata, K., Ishii, Y., Umemura, T., Honma, N., Nohmi, T., Nishikawa, A., Ogawa, K.: Absence of in vivo genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4-week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats. *Mutagenesis.*, **29**, 295-302 (2014)
- [39] Akagi, J., Toyoda, T., Cho, YM., Mizuta, Y., Nohmi, T., Nishikawa, A., Ogawa, K.: Validation study of the combined repeated-dose toxicity and genotoxicity assay using *gpt* delta rats. *Cancer Sci.*, **106**, 529-541 (2015)
- [40] World Health Organization (WHO), Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons, WHO Environmental Health Criteria No. 202. Geneva, Switzerland. (1998)

- [41] Brune, H., Deutsch-Wenzel, RP., Habs, M., Ivankovic, S., Schmahl, D.: Investigation of the tumorigenic response to benzo(*a*)pyrene in aqueous caffeine solution applied orally to Sprague-Dawley rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **102**, 153-157 (1981)
- [42] Kroese, ED., Muller, JJA., Mohn, GR., Dortant, PM., Wester, PW.: Tumorigenic effects in Wistar rats orally administered benzo[*a*]pyrene for 2 years (gavage studies). Implications for human cancer risks associated with oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. National Institute for Public Health and the Environment, RIVM Report No. 658603010, Bilthoven, Netherlands. (2001)
- [43] Wester, PW., Muller, JJ., Slob, W., Mohn, GR., Dortant, PM., Kroese, ED.: Carcinogenic activity of benzo[*a*]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food. Chem. Toxicol.*, **50**, 927-935 (2012)
- [44] Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Imaida, K., Shirai, T., Nagao, M., Sugimura, T., Ito, N.: Dose-dependence of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-*b*]pyridine (PhIP) carcinogenicity in rats. *Carcinogenesis*, **14**, 2553-2557, (1993).
- [45] IARC, PhIP (2-AMINO-1-METHYL-6-PHENYLIMIDAZO[4,5-*b*]PYRIDINE). *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, **56**, 229-242 (1993)
- [46] Otsuka, C., Miura, KF., Satoh, T., Hatanaka, M., Wakabayashi, K., Ishidate, M Jr.: Cytogenetic effects of a food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), and its metabolite, 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (N-OH-PhIP), on human and Chinese hamster cells in vitro. *Mutat. Res.*, **367**, 115-121 (1996)
- [47] IARC, 1,2-DIMETHYLHYDRAZINE, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, **71**, 947-988 (1998)
- [48] Nohmi, T., Katoh, M., Suzuki, H., Matsui, M., Yamada, M., Watanabe, M., Suzuki, M., Horiya, N., Ueda, O., Shibuya, T., Ikeda, H., Sofuni, T.: A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi- and 6-thioguanine selections. *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**, 465-470 (1996)
- [49] Kawamura, Y., Hayashi, H., Tajima, O., Yamada, S., Takayanagi, T., Hori, H., Fujii, W., Masumura, K., Nohmi, T., Evaluation of the genotoxicity of aristolochic acid in the kidney and liver of F344 *gpt* delta transgenic rat using a 28-day repeated-dose protocol: A collaborative study of the *gpt* delta



- transgenic rat mutation assay. *Genes Environ.*, **34**, 18-24 (2012)
- [50] 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)
- [51] Hamada, S., Sutou, S., Morita, T., Wakata, A., Asanami, S., Hosoya, S., Ozawa, S., Kondo, K., Nakajima, M., Shimada, H, Osawa, K., Kondo, Y., Asano, N., Sato, S., Tamura, H., Yajima, N., Marshall, R., Moore, C., Blakey, DH, Schechtman, LM., Weaver, JL., Torous, DK., Proudlock, R., Ito, I., Namiki, C, Hayashi, M: Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environ. Mol. Mutagen.*, **37**, 93-110 (2001)
- [52] Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr.: An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **120**, 241-247 (1983)
- [53] Takayanagi, T., Wako, Y., Kawasako, K., Hori, H., Fujii, W., Ohyama, W., Repeated dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays using *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in young adult rats. *Mutat. Res.*, **780-781**, 100-106 (2015)
- [54] Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Kado, S., Wako, Y., Kawasako, K., Kaneko, K., Ohyama, W.: Evaluation of repeated dose micronucleus assays of the liver and gastrointestinal tract using potassium bromate: a report of the collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. *Mutat. Res.*, **780-781**, 94-99 (2015)
- [55] Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, **9**, 527-549 (1970)
- [56] 高木久宜、野崎祐次、河田昭彦、山田雅巳、増村健一、能美健彦: *gpt delta* ラットの 13 週間飼育試験. 日本環境変異原学会 41 回大会 (2012)
- [57] Xue, W., Warshawsky, D.: Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **206**, 73-93 (2005)
- [58] Thakker, DR., Yagi, H., Lu, AY., Levin, W., Conney, AH.: Metabolism of

- benzo[*a*]pyrene: conversion of (+/-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyrene to highly mutagenic 7,8-diol-9,10-epoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3381-3385 (1976)
- [59] Kapitulnik, J., Wislocki, PG., Levin, W., Yagi, H., Jerina, DM., Conney, AH.: Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo(*a*)pyrene which indicate that (+/-)-trans-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(*a*)pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice. *Cancer Res.*, **38**, 354-358 (1978)
- [60] Shiizaki, K., Kawanishi, M., Yagi, T.: Modulation of benzo[*a*]pyrene -DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor.: *Genes Environ.*, **39**, 14 (2017)
- [61] Ramesh, A., Inyang, F., Hood, DB., Archibong, AE., Knuckles, ME., Nyanda, AM.: Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(*a*)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp. Toxicol. Pathol.* **53**, 275-290 (2001)
- [62] Knuckles, ME., Inyang, F., Ramesh, A.: Acute and subchronic oral toxicities of benzo[*a*]pyrene in F-344 rats. *Toxicol. Sci.*, **61**, 382-388 (2001)
- [63] De Jong, WH., Kroese, ED., Vos, JG., Van Loveren, H.: Detection of immunotoxicity of benzo[*a*]pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. *Toxicol. Sci.*, **50**, 214-220 (1999)
- [64] Dertinger, SD., Tsai, Y., Nowak, I., Hyrien, O., Sun, H., Bemis, JC., Torous, DK., Keng, P., Palis, J., Chen, Y.: Reticulocyte and micronucleated reticulocyte responses to gamma irradiation: dose-response and time-course profiles measured by flow cytometry. *Mutat. Res.*, **634**, 119-125 (2007)
- [65] Hakura, A., Tsutsui, Y., Sonoda, J., Kai, J., Imade, T., Shimada, M., Sugihara, Y., Mikami, T.: Comparison between in vivo mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[*a*]pyrene in the *lacZ* transgenic mouse (Muta Mouse). *Mutat. Res.*, **398**, 123-130 (1998)
- [66] [No authors listed]: Organ variation in the mutagenicity of ethylnitrosourea in Muta<sup>TM</sup> Mouse: results of the collaborative study on the transgenic mutation assay by JEMS/MMS. The Collaborative Study Group for the Transgenic Mouse Mutation Assay Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**, 363-375 (1996)

- [67] Suzuki, T., Itoh, S., Nakajima, M., Hachiya, N., Hara, T.: Target organ and time-course in the mutagenicity of five carcinogens in Muta™ Mouse: a summary report of the second collaborative study of the transgenic mouse mutation assay by JEMS/MMS. *Mutat. Res.*, **444**, 259-268 (1999)
- [68] Nagao, M., Ochiai, M., Okochi, E., Ushijima, T., Sugimura, T.: LacI transgenic animal study: relationships among DNA-adduct levels, mutant frequencies and cancer incidences. *Mutat. Res.* **477**, 119-124 (2011)
- [69] Phillips, TD., Richardson, M., Cheng, YS., He, L., McDonald, TJ., Cizmas, LH., Safe, SH., Donnelly, KC., Wang, F., Moorthy, B., Zhou, GD.: Mechanistic relationships between hepatic genotoxicity and carcinogenicity in male B6C3F1 mice treated with polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Arch. Toxicol.*, **89**, 967-977 (2015)
- [70] Goldstein, LS., Weyand, EH., Safe, S., Steinberg, M., Culp, SJ., Gaylor, DW., Beland, FA., Rodriguez, LV.: Tumors and DNA adducts in mice exposed to benzo[a]pyrene and coal tars: implications for risk assessment. *Environ. Health. Perspect.*, **106**, 1325-1330 (1998)
- [71] Thybaud, V., Dean, S., Nohmi, T., de Boer, J., Douglas, GR., Glickman, BW., Gorelick, NJ., Heddle, JA., Heflich, RH., Lambert, I., Martus, HJ., Mirsalis, JC., Suzuki, T., Yajima, N.: In vivo transgenic mutation assays. *Mutat. Res.*, **540**, 141-151 (2003)
- [72] Heddle, JA., Martus, HJ., Douglas, GR.: Treatment and sampling protocols for transgenic mutation assays. *Environ. Mol. Mutagen.*, **41**, 1-6 (2003)
- [73] Vanparys, P., Deknudt, G., Vermeiren, F., Sysmans, M., Marsboom, R.: Sampling times in micronucleus testing. *Mutat. Res.*, **282**, 191-196 (1992)
- [74] [no authors listed]: Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. *Mutat. Res.*, **278**, 83-98 (1992)
- [75] 浅岡由次, 酒井洋樹, 平田暁大, 佐々木淳, 御領政信, 柳井徳磨, 岡田幸助: 幼若ラットを用いた中期イニシエーション活性検索法に関する実験病理学的研究. *Iwate Vet.*, **36**, 43-55 (2010)
- [76] 志賀野 美幸, 中館 記代子, 高沢 博修, 濱田 修一: 第7回 IWGT 宿題事項への対応: 反復投与肝臓小核試験における加齢の影響. 第6回アジア環境変異原学会/日本環境変異原学会第48回大会 合同大会. P-55. (2019)

- [77] Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Yasutake, N., Ohyama W.: A four-day oral treatment regimen for simultaneous micronucleus analyses in the glandular stomach, colon, and bone marrow of rats. *Mutat. Res.*, **758**, 87-94 (2013).
- [78] Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Kado, S., Ohyama, W.: Evaluation of a 28-day repeated-dose micronucleus test in rat glandular stomach, colon, and liver using gastrointestinal tract-targeted genotoxic carcinogens and non-carcinogens. *Mutat. Res.*, **844**, 62-68 (2019)
- [79] Imaida, K., Hagiwara, A., Yada, H., Masui, T., Hasegawa, R., Hirose, M., Sugimura, T., Ito, N., Shirai, T.: Dose-dependent induction of mammary carcinomas in female Sprague-Dawley rats with 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 1116-1120 (1996)
- [80] Nishiyama, Y., Nakayama, SMM., Watanabe, KP., Kawai, YK., Ohno, M., Ikenaka, Y., Ishizuka, M.: Strain differences in cytochrome P450 mRNA and protein expression, and enzymatic activity among Sprague Dawley, Wistar, Brown Norway and Dark Agouti rats. *J. Vet. Med. Sci.*, **78**, 675-680 (2016)
- [81] Fiala, E.: Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1, 2-dimethylhydrazine. *Cancer*, **36**, 2407-2412 (1975)
- [82] Takasawa, H., Takashima, R., Hattori, A., Narumi, K., Kawasako, K., Morita, T., Hayashi, M., Hamada, S.: Development of a Repeated-Dose Liver Micronucleus Assay Using Adult Rats (II): Further Investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene. *Mutat. Res.*, **751**, 12-18 (2013)
- [83] Stuart, G.R., de Boer, J.G., Haesevoets, R., Holcroft, J., Kangas, J., Sojonky, K., Thorleifson, E., Thornton, A., Walsh, D.F., Yang, H., Glickman, B.W.: Mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) in cecum and proximal and distal colon of *lacI* transgenic rats. *Mutagenesis* **16**, 431-437 (2001)
- [84] Okonogi, H., Stuart, GR., Okochi, E., Ushijima, T., Sugimura, T., Glickman, BW., Nagao, M.: Effects of gender and species on spectra of mutation induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in the *lacI* transgene. *Mutat. Res.*, **395**, 93-99 (1997)
- [85] Kirkland, D., Uno, Y., Luijten, M., Beevers, C., van Benthem, J., Burlinson, B., Dertinger, S., Douglas, GR., Hamada, S., Horibata, K., Lovell, DP., Manjanatha, M., Martus, HJ., Mei, N., Morita, T., Ohyama, W., Williams, A.: In vivo genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International

workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Mutat Res.*, **847**, 403035 (2019)

## 主論文目録

本博士論文は以下の論文の内容を総括したものである。

- [1] Hori, H., Shimoyoshi, S., Tanaka, Y., Momonami, A., Masumura, K, Yamada, M., Fujii, W., Kitagawa, Y.: Integration of micronucleus tests with a gene mutation assay in F344 *gpt* delta transgenic rats using benzo[*a*]pyrene. *Mutat. Res.*, **837**, 1-7 (2019)
  
- [2] Hori, H., Shimoyoshi, S., Tanaka., Y., Fujii, W., Kitagawa, Y., Hayashi, M.: Target-specific micronucleus induction by colon carcinogens: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine hydrochloride and 1,2-dimethylhydrazine. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **112**, 104578 (2020)
  
- [3] Hori, H., Shimoyoshi, S., Tanaka, Y., Momonami, A., Masumura, K, Yamada, M., Fujii, W., Kitagawa, Y., Hayashi, M.: Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat. Res.*, **849**, 503130 (2020)