

< 共同研究 12 >

研究題名：造血系細胞以外を用いた小核試験の開発と検証（肝、腸、皮膚、生殖器官）

【In vivo における皮膚を用いる小核試験の検討】

< 研究概要 >

- (1) ラットの皮膚を用いた小核試験を開発することを目的として、MMC と MMS を用いて検討を行った。皮膚組織をトリプシン処理と物理的細胞剥離の方法を用いることにより、細胞分離が可能となり、上記 2 つの clastogens 処理により皮膚基底細胞における有意で用量依存的な小核誘発が認められた。また、実験デザインとしては 1 日 1 回、3 日間投与が最適であった。
- (2) さらに試験の有用性を評価するために、5 つの皮膚を標的とするがん原性物質（ENNG、MNNG、4NQO、DMBA、B[a]P）を用いてラットおよびマウスに投与して皮膚における小核誘発性を検討した。その結果、5 化合物全てがラット・マウスともに皮膚基底細胞における小核を有意で用量依存的に誘発した。
- (3) 多環芳香族炭化水素 10 化合物を使用して in vivo 皮膚小核試験の検証を実施し、ヘアレスマウスの背部皮膚を使用する試験を含む実用的で簡便な試験法を開発した。使用した 10 化合物は皮膚小核試験によりいずれも陽性結果を示し、赤血球を使用する一般的な小核試験では検出できない染色体異常誘発性を有する皮膚がん原性物質の検出が可能であることが示唆された。

< 発表論文 >

- (1) Nishikawa T, Haresaku M, Adachi K, Masuda M, Hayashi M. Study of a rat skin in vivo micronucleus test: data generated by mitomycin C and methyl methanesulfonate. *Mutat Res.* 1999 Jul 21; 444(1):159-166.
- (2) 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.* 2002 Jan 15; 513(1-2): 93-102.
- (3) Nishikawa T, Nakamura T, Fukushima A, Takagi Y., Further evaluation of the skin micronucleus test: results obtained using 10 polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 2005 Dec 7; 588(1): 58-63.

【幼若ラットを用いる肝臓小核試験の検討】

< 研究概要 >

- (4) 肝臓を用いる小核試験には、肝細胞の分裂を促進する方法もあるが、幼若ラットを用いることにより自然な肝細胞分裂を利用することが可

能である。本研究により標準的な赤血球を用いる小核試験では検出できない肝臓を標的とするがん原性物質、肝臓における代謝活性化を必要とする遺伝毒性物質の検出に肝臓小核試験が有用であることが示唆された。また、同一動物を使用して末梢血小核試験とのコンビネーション試験が適用できることから、化学物質の小核誘発性を異なる臓器／器官で同時に評価することが可能である。MMS で肝臓小核試験に関して最初に共同研究を行った報告である。

- (5) (4) の続報として報告された共同研究成果であるが、SD ラット、F344 ラットの両系統に特記すべき差異はなく肝臓小核試験を実施することが可能と考えられた。
- (6) 肝臓に壊死や胆汁うっ滞を誘発あるいは酸化ストレスを与える肝毒性物質を9化合物を使用して、幼若ラット肝臓小核試験を実施した結果、所謂肝毒性を誘発する化合物でも肝臓を標的としないがん原性物質、あるいは非がん原性物質は陰性結果を示し、肝臓を標的とするがん原性物質は陽性結果を示すことが確認された。従って本法は、肝毒性による偽陽性を示すことなく、げっ歯類における肝がん原性物質を効果的に検出可能であると考えられた。
- (7) これまでに実施した幼若ラットを用いる肝臓小核試験では、化学物質を1回投与して複数回（投与後3、4、5日目）標本を作製して評価する方法が採用されていたが、使用動物数を削減するため、24時間間隔で2回投与して1回（2回目投与後4日目）採取する方法を検討した。その結果、2回投与する方法では1回投与する方法と比較して化学物質の投与可能用量が低下する可能性があるが、定性的には両者は同等の結果が得られることが確認された。従って、2回投与1回採取の改良法により動物数削減と労力、費用の削減に寄与する。

< 発表論文 >

- (4) Suzuki H, Ikeda N, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Suzuki T, Hagiwara T, Hatakeyama S, Nagaoka K, Yoshida J, Saito Y, Tanaka J, Hayashi M. Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res.* 2005 Jun 6; 583(2): 133-145.
- (5) Suzuki H, Takasawa H, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Ogawa I, Tanaka J, Imamura T, Miyazaki A, Hayashi M. Evaluation of a liver micronucleus assay with 12 chemicals using young rats (II): a study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test/Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group. *Mutagenesis.* 2009 Jan; 24(1): 9-16.
- (6) Takasawa H, Suzuki H, Ogawa I, Shimada Y, Kobayashi K, Terashima Y, Matsumoto H, Oshida K, Ohta R, Imamura T, Miyazaki A, Kawabata M, Minowa S, Maeda A, Hayashi M. Evaluation of a liver micronucleus assay in young rats (IV): a study using a double-dosing/single-sampling method by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental

Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res.* 2010 Apr 30; 698(1-2): 24-29.

- (7) Takasawa H, Suzuki H, Ogawa I, Shimada Y, Kobayashi K, Terashima Y, Matsumoto H, Aruga C, Oshida K, Ohta R, Imamura T, Miyazaki A, Kawabata M, Minowa S, Hayashi M. Evaluation of a liver micronucleus assay in young rats (III): a study using nine hepatotoxicants by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res.* 2010 Apr 30; 698(1-2): 30-37.

【ラットを用いる消化管小核試験の検討】

< 研究概要 >

マウスの結腸を用いた小核試験について5研究機関で3化学物質を使用して検討を行った。化学物質は4日間の投与を実施し、結腸上皮細胞を単離し、懸濁細胞の標本作製することによりいずれの化学物質も小核を有する細胞の有意な増加が確認された。本研究結果から、結腸発がん機構の研究に応用可能であることが示唆された。

< 発表論文 >

- (8) 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.* 2002 Jun 27; 518(1): 39-45.