

<共同研究 20>

研究題名： 成熟ラットを用いた反復投与肝臓及び消化管小核試験法の検討

研究目的： 肝臓を用いた小核試験は薬物代謝の主要臓器である肝臓において小核誘発性を評価できる点で非常に優れた試験法である。特に不安定な代謝物が肝発がん性を示す発がん物質は骨髄小核試験で陰性となりやすいため、肝臓小核試験による評価は極めて有効である。また、消化管小核試験の特徴は経口投与された試験物質により最初に、直接、高濃度で曝露される胃、がんの発生率の高い大腸において小核誘発性を評価できる点である。また、一般毒性試験への組込みは、動物福祉に貢献するだけでなく、一般毒性指標と複数の臓器の小核評価を同一個体で同時に行うことでより高い精度の安全性評価度を可能にする。成熟ラットを用いた反復投与肝臓及び消化管小核試験の有用性および一般毒性試験への組込みの可能性を検討するため、MMS 研究会による共同研究を実施し、国内 24 研究機関が参加した。共同研究では **Genotoxic hepatocarcinogens, Genotoxic carcinogens but non-liver-targeted, Non-genotoxic hepatocarcinogens** を中心に肝臓は 22 化合物、消化管は 6 化合物について評価を行った。また、共同研究の後、異数性誘発物質や非発がん物質を中心に追加検討を行い、最終的には肝臓については 40 化合物、消化管については 19 化合物の評価を行った。

研究期間： 2010 年～2019 年進行中

研究成果： MMS 共同研究およびその後の追加検討の成果は以下の論文に発表するとともに、第 6 回、第 7 回遺伝毒性に関する国際ワークショップ (6<sup>th</sup> IWGT, 7<sup>th</sup> IWGT) でトピックスとして取り上げられた。肝臓小核試験は 7<sup>th</sup> IWGT で「肝臓小核試験は感度、特異性ともに高く、評価化合物の数やタイプについては OECD ガイドライン化に十分なバリデーションが行われている (ただし、国際的に広く用いられるためには加齢の影響や核内レセプターに作用する **Non-genotoxic hepatocarcinogens** についてはさらなる検討が必要である)」と評価された。消化管小核試験も 7<sup>th</sup> IWGT で「消化管小核試験は感度、特異性ともに高く、臓器特異的な小核誘発性の評価に有用である (ただし、OECD ガイドライン化には追加評価が必要である)」と評価された。

発表論文：

- 1) 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 Y, 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 Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 2-17.
- 2) Takashima R, Takasawa H, Kawasaki K, Ohyama W, Okada E, Narumi K, Fujiishi Y, Wako Y, Yasunaga K, Hattori A, Kawabata M, Nakadate K, Nakagawa M, Hamada S. Evaluation of a repeated dose liver micronucleus assay in rats treated with two genotoxic hepatocarcinogens, dimethylnitrosamine and 2-acetylaminofluorene: the possibility of integrating micronucleus tests with multiple tissues into a repeated dose general toxicity study. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 18-24.
  - 3) Ogawa I, Hagio S, Furukawa S, Abe M, Kuroda Y, Hayashi S, Wako Y, Kawasaki K. Evaluation of repeated dose micronucleus assays of the liver using *N*-nitrosopyrrolidine: a report of the collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 25-30.
  - 4) Sanada H, Koyama N, Wako Y, Kawasaki K, Hamada S. Repeated-dose liver micronucleus test of 4,4'-methylenedianiline using young adult rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 31-35.
  - 5) Terashima Y, Yokoi R, Takakura I, Saitou E, Wako Y, Kawasaki K, Souma S, Tamura T. Detection of micronuclei in hepatocytes isolated from young adult rats repeatedly treated with *N*-nitrosodi-*n*-propylamine. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 36-40.
  - 6) Maeda A, Tsuchiyama H, Asaoka Y, Hirakata M, Miyoshi T, Oshida K, Miyamoto Y. Evaluation of the repeated-dose liver micronucleus assay using 2,4-dinitrotoluene: a report of a collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 41-45.
  - 7) Imamura T, Koeda A, Morimoto K, Hatakeyama H, Suzuki H, Wako Y, Kawasaki K, Otabe K, Sato S. Evaluation of a repeated-dose liver micronucleus assay with 2,6-dinitrotoluene using young adult rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 46-50.

- 8) Uno F, Tanaka J, Ueda M, Nagai M, Fukumuro M, Natsume M, Oba M, Akahori A, Masumori S, Takami S, Wako Y, Kawasaki K, Kougo Y, Ohyama W, Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Hayashi M. Repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays for quinoline in rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 51-55.
- 9) Shimada Y, Sui H, Wako Y, Kawasaki K. Evaluation of the repeated-dose liver micronucleus assay with p-dimethylaminoazobenzene. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar ;780-781: 56-59.
- 10) Kawakami S, Araki T, Nakajima M, Kusuoka O, Uchida K, Sato N, Tanabe Y, Takahashi K, Wako Y, Kawasaki K, Tsurui K. Repeated-dose liver micronucleus assay: an investigation with 2-nitropropane, a hepatocarcinogen. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 60-63.
- 11) Takashima R, Takasawa H, Wako Y, Yasunaga K, Hattori A, Kawabata M, Nakadate K, Nakagawa M, Hamada S. Micronucleus induction in rat liver and bone marrow by acute vs. repeat doses of the genotoxic hepatocarcinogen monocrotaline. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 64-70.
- 12) Hayashi A, Kosaka M, Kimura A, Wako Y, Kawasaki K, Hamada S. Evaluation of the repeated-dose liver micronucleus assay using N-nitrosomorpholine in young adult rats: report on collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study (MMS) Group. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 71-75.
- 13) Matsumura S, Ikeda N, Hamada S, Ohyama W, Wako Y, Kawasaki K, Kasamatsu T, Nishiyama N. Repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with CI Solvent Yellow 14 (Sudan I) using young adult rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 76-80.
- 14) Sui H, Matsumoto H, Wako Y, Kawasaki K. Evaluation of in vivo genotoxicity by thioacetamide in a 28-day repeated-dose liver micronucleus assay using male young adult rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 81-84.
- 15) Shimada K, Yamamoto M, Takashima M, Wako Y, Kawasaki K, Aoki Y, Seki J, Miyamae Y, Wakata A. Repeated-dose liver micronucleus assay of mitomycin C in young adult rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 85-

89.

- 16) Matsumoto K, Zaizen K, Miyamoto A, Wako Y, Kawasaki K, Ishida H. Evaluation of the repeated dose liver micronucleus assay using young adult rats with cyclophosphamide monohydrate: a report of a collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 90-93.
- 17) Okada E, Fujiishi Y, Narumi K, Kado S, Wako Y, Kawasaki 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 Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 94-99.
- 18) Takayanagi T, Wako Y, Kawasaki 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 Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 100-106.
- 19) Muto S, Yamada K, Kato T, Wako Y, Kawasaki K, Iwase Y, Uno Y. Assessment of methyl methanesulfonate using the repeated-dose liver micronucleus assay in young adult rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 107-110.
- 20) Ogiwara Y, Sugiura M, Watanabe K, Tawara J, Endo E, Maruyama H, Tsuji S, Matsue K, Yamada H, Wako Y, Kawasaki K. Evaluation of the repeated-dose liver, bone marrow and peripheral blood micronucleus and comet assays using kojic acid. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 111-116.
- 21) Takayanagi T, Takashima R, Wako Y, Kawasaki K, Tanaka Y, Hori H, Fujii W. Repeated dose liver micronucleus assay using clofibrate in young adult rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 117-122.
- 22) Inoue K, Ochi A, Koda A, Wako Y, Kawasaki K, Doi T. The 14-day repeated dose liver micronucleus test with methapyrilene hydrochloride using young adult rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Mar; 780-781: 123-127.
- 23) Hamada S, Shigano M, Kawakami S, Ueda M, Sui H, Yamada K, Hagio S, Momonami A, Maeda A, Terashima Y, Ohyama W, Morita T, Hayashi M. Evaluation of the novel liver micronucleus assay using formalin-fixed tissues. *Genes & Environment* 2019; 41:13. <https://doi.org/10.1186/s41021-019-0128-5>