

## P-133 (O-11)

**Evaluation of the repeated dose gastrointestinal tract micronucleus assay: Summary report of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS.**

Ohyama W, Narumi K, Okada E, Fujiishi Y, Takayanagi T, Hori H, Matsumura S, Ikeda N, Natsume M, Tanaka J, Takashima R, Matsumoto H, Sui H, Hamada S, Asano N, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M

*The Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS*

As a part of the CSGMT/JEMS.MMS Collaborative study on the evaluation of the 14- and/or 28-day repeated oral dose liver micronucleus (MN) assay in rats with 26 chemicals, we additionally examined the incidence of MNed cells in gastrointestinal tract (GT) on 6 carcinogens out of them, which targeted stomach (MNNG), kidney (KBrO<sub>3</sub>) or liver (2AAF, DMN, quinoline, and C.I. Solvent Yellow).

MNNG was positive only in glandular stomach (GS). KBrO<sub>3</sub> and 2AAF also gave clear positive results in GS. These are known to give positive results in *in vitro* chromosomal aberration test without S9 mix. In contrast, there were chemicals that showed positive only in bone marrow or liver.

The results showed more appropriate evaluation of genotoxic effect of test agents *in vivo* can be done by MN assay with liver and/or GT, in addition to bone marrow. This method can also be incorporated into repeat-dose toxicological study. This also can contribute risk characterization under 3Rs condition.

## P-134 (O-12)

**Applications of *Pig-a*/PIG-A gene mutation assay: establishment of human PIG-A assay, and evaluation of genotoxicity induced by low-dose and long-term gamma-ray irradiation on mouse *Pig-a* assay**

Katsuyoshi Horibata<sup>1</sup>, Shigeo Ishikawa<sup>2</sup>, Kazumi Yamauchi<sup>3</sup>, Akiko Ukai<sup>1</sup>, Masamitsu Honma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Genetics and Mutagenesis, NIHS, <sup>2</sup>Faculty of Medicine, Yamagata University, <sup>3</sup>Department of Radiobiology, Institute for Environmental Sciences

The emerging *Pig-a* assay is an *in vivo* gene mutation assay targeted on endogenous *Pig-a* (PIG-A in human) gene, which is X-linked gene across species from rodents to human. The flow cytometric analysis enables to enumerate GPI anchor-deficient erythrocytes resulted by a mutation on the *Pig-a* gene from only few  $\mu$ L of peripheral bloods. We are applying the PIG-A assay to human genotoxic monitoring. We established the protocol of the PIG-A assay and examined the gene mutations in healthy volunteers and cancer patients treated chemotherapies. One of 13 patients exhibited significantly high mutation frequency. We are now investigating the PIG-A mutations in residents in Fukushima area who were exposed to low-dose irradiation for long-term by the 3.11 accident of Fukushima Daiichi nuclear plant, while we will also verify whether the *Pig-a* assay can demonstrate the genotoxic insult by low-dose and long-term irradiation in mouse studies.

**反復投与による消化管小核試験法の有用性の検討：MMS共同研究の報告**

大山 ワカ子<sup>1</sup>、成見 香瑞範<sup>1</sup>、岡田 恵美子<sup>1</sup>、藤石 洋平<sup>1</sup>、高柳 智美<sup>2</sup>、堀 妃佐子<sup>2</sup>、松村 奨士<sup>3</sup>、池田 直弘<sup>3</sup>、夏目 匡克<sup>4</sup>、田中 仁<sup>4</sup>、高島 理恵<sup>5</sup>、松本 浩孝<sup>6</sup>、須井 哉<sup>6</sup>、浅野 哲秀<sup>7</sup>、森田 健<sup>8</sup>、小島 肇<sup>8</sup>、本間 正充<sup>8</sup>、濱田 修一<sup>5</sup>、林 真<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ヤクルト本社、<sup>2</sup>サントリービジネスエキスパート、<sup>3</sup>花王、<sup>4</sup>安評センター、<sup>5</sup>三菱化学メディエンス、<sup>6</sup>食薬センター、<sup>7</sup>近畿大学、<sup>8</sup>国立衛研

14および/または28日反復経口投与によるラット肝小核試験共同研究(本学会MMS研究会主催)において評価した26化合物のうち6物質(MNNG、KBrO<sub>3</sub>、2AAF、DMN、quinoline、C.I. Solvent Yellow)について、肝臓、骨髄と同時に消化管(腺胃・結腸)における小核誘発性を評価した。

その結果、胃を発がん標的とするMNNGは腺胃でのみ陽性であった。また、腎臓あるいは肝臓を標的とするKBrO<sub>3</sub>、2AAFも腺胃で明瞭な小核誘発性を示した。何れも*in vitro*染色体異常試験(-S9)で陽性結果が知られている化合物である。一方、骨髄あるいは肝臓でのみ陽性を示す化合物もあった。

これらの結果から、骨髄の他に、肝臓や消化管を小核試験の評価対象臓器の選択肢に加えることで、目的に合せて、被験物質の生体内における遺伝毒性をより適切に評価できるといえる。この方法は反復投与毒性試験に組み込み可能であり、これにより動物数削減にも貢献できる。

***Pig-a*/PIG-A遺伝毒性試験の汎用性：ヒトPIG-Aアッセイの確立とマウス*Pig-a*アッセイによる放射線遺伝毒性評価**

堀端 克良<sup>1</sup>、石川 恵生<sup>2</sup>、山内 一己<sup>3</sup>、鶴飼 明子<sup>1</sup>、本間 正充<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部、<sup>2</sup>山形大学医学部歯科口腔・形成外科学講座、<sup>3</sup>(財)環境科学技術研究所生物影響研究部

近年開発が進んでいる*Pig-a*アッセイは、内在性遺伝子である*Pig-a*(ヒトではPIG-A)遺伝子を標的遺伝子としており、蓄積性を考慮した遺伝毒性を評価できる手法であると考えられている。また、解析には微量の末梢血を用いることから、個体を生存させた状態での遺伝毒性評価が可能である。加えて、*Pig-a*/PIG-A遺伝子は、マウスからヒトに至るまでX染色体上に座位しており、げっ歯類で確立されつつある*Pig-a*アッセイ原理を応用すれば、ヒトを対象とした遺伝毒性の蓄積性を踏まえた新規*in vivo*遺伝毒性試験を開発することができる。今回、我々はヒトPIG-Aアッセイ解析法を樹立し、化学療法および放射線治療を受けるヒト血液検体を対象に遺伝毒性を評価した。その結果、化学療法を受ける13例中1例において強い遺伝毒性を検出した。また、先の福島第一原子力発電所事故では、低線量放射線長期間暴露による遺伝毒性の問題が懸念されていることから、*Pig-a*アッセイによりそれらの遺伝毒性が検出可能かどうか、マウスを用いて検証した。