

げっ歯類の培養細胞と個体を用いる 小核試験法の検討

若田 明裕*

山之内製薬株式会社安全性研究所 〒174-8511 東京都板橋区小豆沢1-1-8

Studies on in vitro and in vivo micronucleus tests using rodents

Akihiro Wakata

Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd.
1-1-8 Azusawa, Itabashi-ku, Tokyo, 174-8511

Summary

The cytokinesis-block method using cytochalasin B that was developed by Fenech and Morley for micronucleus assay using human lymphocytes was applied to the rodent CHL cell line. Consistent dose-response relationships were obtained in cultures treated with clastogens and an aneugen. Comparison with the chromosome aberration frequencies indicated that approximately 30 % of acentric chromosomes are expressed as micronuclei in the cells treated with mitomycin C and caffeine. The size distribution of the micronuclei suggested that the base-line frequency of micronuclei is mainly a reflection of mitotic dysfunctions rather than chromosome structural aberrations.

Conditions for route and frequency of administration in the mouse micronucleus test were evaluated. Both intraperitoneal injection and oral gavage were acceptable as routes of administration in this test. Double dosing, with a 24 h interval and sampling 24 h after the second dosing, was the most sensitive protocol compared to single, triple, or quadruple dosing protocols. The micronucleus test using bone marrow and peripheral blood from exposed rats was evaluated. It was concluded that the rat micronucleus test, using either bone marrow or peripheral blood, can be used as an alternative to the mouse micronucleus test.

Keywords : micronucleus test, cytokinesis-block method, cultured Chinese hamster cells, rats

緒 言

遺伝毒性評価において染色体異常誘発性は重要な指標の一つである。小核は染色体の構造異常や分裂異常の結果生じるもので (Heddle and Carrano, 1977), その分析が比較的簡単なことから, 小核試験として染色体異常の検出に in vivo の試験 (Schmid, 1975), 特にマウスの骨髓細胞を用いて広く実施されている (Mavournin et al., 1990)。しかし, 小核形成には細胞分裂が必要で, 培養

細胞においてはその分裂を経過した細胞が不明であることから, 培養細胞を用いる小核試験は定量性に欠けることが問題となっていた (Pincu et al., 1984; Brock et al., 1985)。そこで, 近年ヒトリンパ球を用いて開発された cytochalasin B により分裂細胞を特定する方法 (Fenech and Morley, 1985) を, 哺乳類培養細胞での染色体異常試験に繁用されているチャイニーズハムスターの樹立細胞株 (CHL) に応用し, 染色体異常試験に代わりうる培養細胞での定量性の高い小核試験法の検討を行い, その試験法を用い小核生成の機構の解明を行った。

また, 動物個体を用いるマウス小核試験の標準試験方法の確立を目的とし, 種々の処理方法における至適条件

* E-mail : wakata@yamanouchi.co.jp

受付 : 2002年6月21日 受理 : 2002年6月21日

©日本環境変異原学会

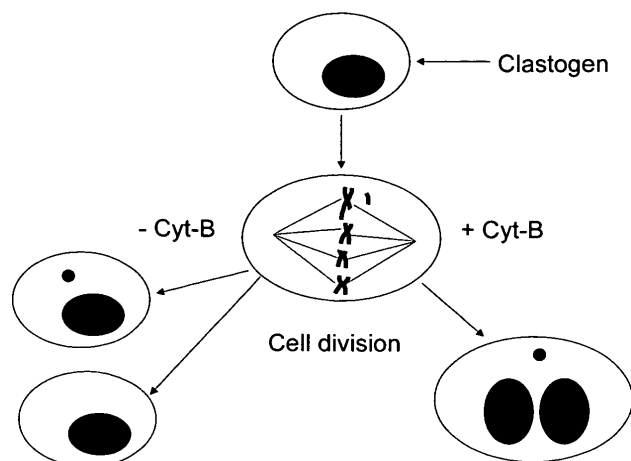


Fig. 1 Schematic diagram of the principal mechanism of micronucleated cells formation by a clastogen with and without cytochalasin B (Cyt-B).

の検討を行った。さらに、医薬品等のげっ歯類を用いる毒性試験では主にラットが用いられているため、ラットが小核試験にマウスと同様に用いることができれば他の毒性試験の結果と関連させることができ大変有用であることから、ラットを用いた小核試験の検討を行った。

1. 哺乳類培養細胞を用いる in vitro 小核試験の検討および小核生成機構の解析

日本において in vitro 染色体異常試験で汎用されているチャイニーズハムスター肺由来株化細胞である CHL 細胞を用いた。分裂細胞を識別するために用いられる cytochalasin B (cyt-B) は microfilament の合成阻害物質 (Carter, 1967) で、細胞質の分裂を阻害するが核の分裂は阻害しない (Wright and Hayflick, 1972) ので cyt-B を含む培養液で細胞を培養していると 1 回分裂期を経た細胞は 2 核細胞となる。このことから、cyt-B で処理した場合、変異原等で小核を誘発された細胞は小核を持った 1 つの二核の細胞として観察される。一方、cyt-B で処理しない場合は、1 核の小核を持つ細胞と小核を持たない 2 つの細胞となる (Fig. 1)。このように cyt-B で処理することにより分裂細胞を二核細胞として容易に識別できその細胞で小核を観察することでより定量的な小核誘発性の評価が可能になる (Fenech, 2000)。

1) Cytochalasin B (cyt-B) 処理条件の検討

まず最初に cyt-B の処理濃度の検討を行った。Cyt-B の処理濃度を変化させたときの出現する 1, 2, 3 および 4 核細胞の頻度を Fig. 2a に示す。

Cyt-B の処理濃度を高くするに従い 2 核細胞 (以下 CB 細胞と呼ぶ) の割合が高くなり、それによって単核細胞の割合が低下した。しかし、cyt-B 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では CB 細胞の割合が増えず、むしろ減少した。CB 細胞

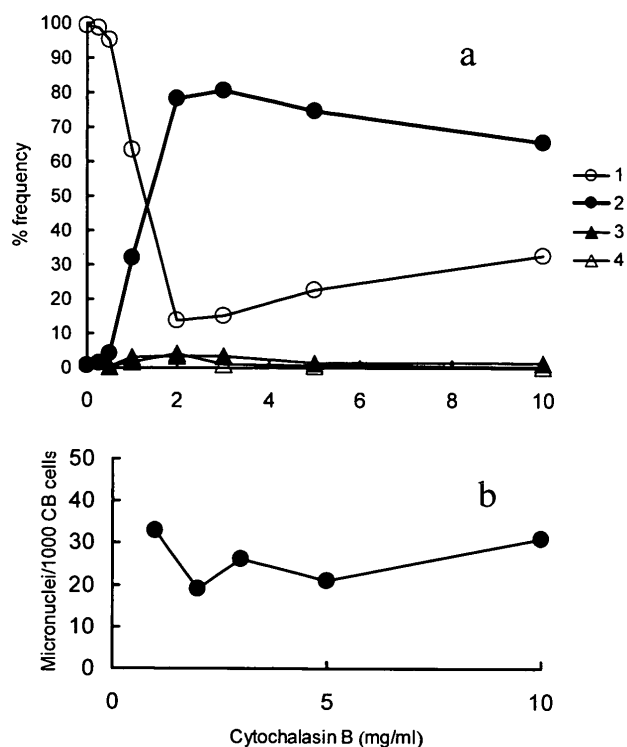


Fig. 2 Effects of cytochalasin B on the frequency of CB cells and micronuclei. The cells were grown for 24hr in the presence of cytochalasin B. (a) Frequency of cells with one (open circle), two (closed circle), three (closed triangle), and four (open triangle) nuclei. (b) Frequency of micronuclei in CB cells.

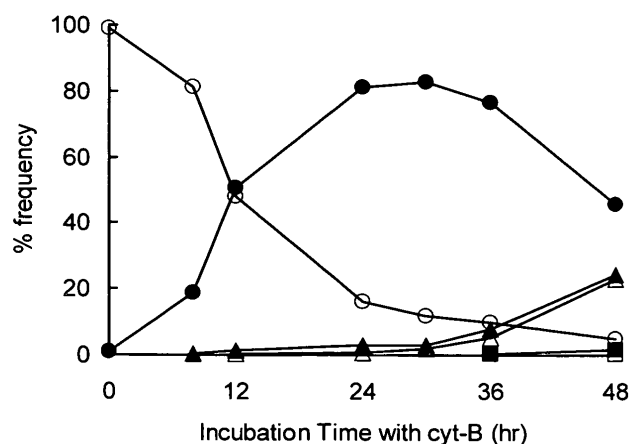


Fig. 3 Relationship between the frequency of CB cells and culture time in the presence of 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cytochalasin B. Cells with one (open circle), two (closed circle), three (closed triangle), four (open triangle), five (closed square) and six (open square) nuclei.

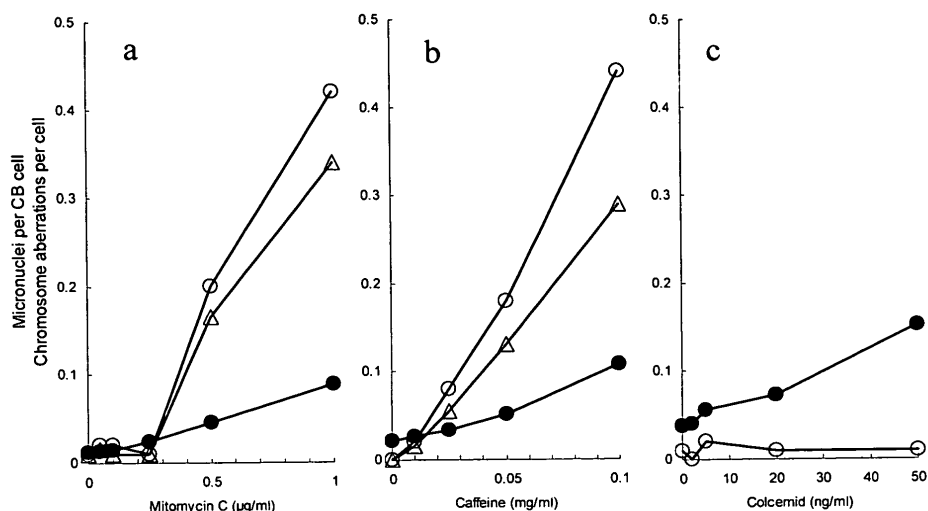


Fig. 4 Dose-response relationship of the frequencies of micronuclei and chromosome aberrations. (a) mitomycin C, (b) caffeine, (c) colcemid. Closed circle: micronuclei, open circle: chromosome aberrations, open triangle: number of chromosome aberrations from which a half number of exchange-type aberrations is subtracted.

の出現頻度の最大値は cyt-B $3\mu\text{g/ml}$ 処理時の 80.6% であった。この結果は、ヒトリンパ球での至適濃度 (Fenech and Morley, 1985) と同じであった。さらに cyt-B の濃度が高くなると単核細胞の割合が上昇する傾向が認められた。このことより過剰濃度の cyt-B は核の分裂をも阻害することがわかった。また、cyt-B の濃度が高くなると 3 核以上の細胞の出現が認められた。しかし、このような細胞は用量依存的には増えず、3 核以上の細胞をすべて合わせても最高で 8% 以上にはならなかった。各濃度における CB 細胞 1000 個あたりの小核の出現頻度を Fig. 2b に示す。小核の自然出現頻度は cyt-B の濃度に関わりなく $10\mu\text{g/ml}$ まではほぼ一定の値を示した。このことより、cyt-B それ自体は小核誘発性 (染色体異常誘発性) がないことが示された。以上の結果より、CHL 細胞に対しての cyt-B の至適処理濃度は $2\sim 3\mu\text{g/ml}$ であることがわかった。これより、以後の実験での cyt-B の濃度は $3\mu\text{g/ml}$ とした。

次に cyt-B 処理時間の検討を行った。細胞を cyt-B とともに培養した時間と 1 および 2 核さらにそれ以上の核を持つ細胞の出現頻度の変化を Fig. 3 に示す。

培養時間とともに 2 核細胞の出現頻度が上昇し、それに伴って単核細胞の頻度が減少した。最大の 2 核細胞の出現頻度が得られたのは 24~30 時間であった。しかし、30 時間以上培養を続けると、2 核細胞の頻度は培養時間の延長とともに減少していった。また、単核細胞は培養時間に従って減少する一方であった。それに対して、培養時間とともに 3 核以上の細胞の出現頻度が上昇し、48 時間培養後では全細胞の約 50% にまで達した。さらに、培養時間が長くなると、さらに多数の核を持つ細胞が観

察されるようになり 6 核の細胞まで現われた。このことは、cyt-B は細胞分裂時に、細胞が 2 つに分裂する過程を阻害する薬物であり、核の分裂は阻害しないため、核は細胞周期に従って分裂を繰り返すためだと考えられた (Wakata and Sasaki, 1987)。以上の結果より、2 核細胞の出現ピークは 24~30 時間培養後であること、cyt-B 処理をあまり長い時間行うことはよくないことがわかった。用いた CHL 細胞の倍加時間が約 12 時間であることを考えると 3 核以上の細胞は倍加時間の約 3 倍の 36 時間後あたりより顕著に増加することがわかった。以上のことから、培養時間は 24 時間とした。

2) 染色体異常出現頻度と小核出現頻度との比較

Fig. 4a, b, c にそれぞれ mitomycin C (MMC), caffeine, colcemid で処理したときの、染色体異常の出現頻度と CB 細胞中の小核の出現頻度の濃度相関性の比較を示す。染色体異常および小核の頻度は 1 細胞あたりの数として示した。染色体異常には染色体の断片を生成しないと考えられているギャップは含めなかった。MMC および caffeine で処理した場合、染色体異常および小核の出現頻度は濃度依存的増加した (Fig. 4 a, b)。ここで、小核の自然発生頻度は 0.024/cell であり、染色体異常の自然発生頻度は 0.017/cell とあまり変わらないにも関わらず、MMC や caffeine で誘発される染色体異常の数は小核の数よりもはるかに多くなる。このことは、1 つの染色体断片が 1 つの小核を作るとは限らない (Evans et al., 1959; Carrono and Heddle, 1973) ことで説明できるし、1 つの小核が複数の染色体断片を含んでいるとも考えられる。また、この染色体異常の数と小核の数との差

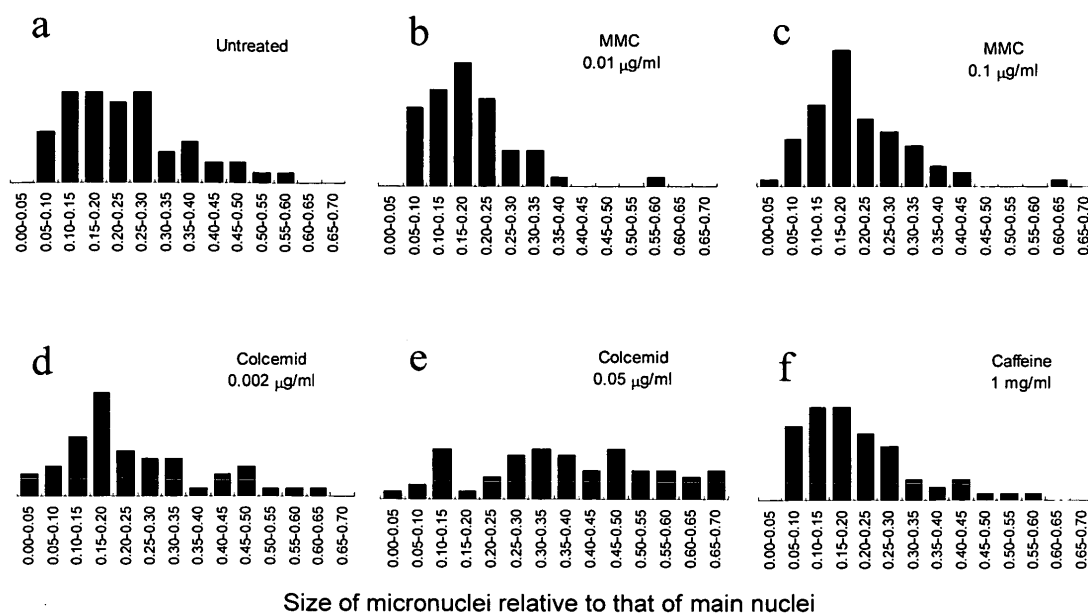


Fig. 5 Distribution of size of micronuclei in untreated control culture and cultures treated with mitomycin C (MMC), caffeine and colcemid. (a) untreated culture, (b) MMC 0.01 $\mu\text{g/ml}$, (c) MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$, (d) colcemid 0.002 $\mu\text{g/ml}$, (e) colcemid 0.05 $\mu\text{g/ml}$, (f) caffeine 1mg/ml. Diameters of fifty micronuclei were measured in each treatment.

はMMCの方がcaffeineより大きくなっている。これはMMCとcaffeineの誘発する異常の型が違うためで、MMCは交換型の異常を多く誘発しそれに比べcaffeineでははるかに少ない。最高濃度での交換型異常の割合は、MMC処理で62.2%，caffeineでは14.3%であった。染色分体交換型異常は、対象型の異常は染色体断片を生成しないとされていて、その割合は全染色分体交換型異常の半数である（Buckton et al, 1978; Heddle, 1965; Seabright, 1978; Wolff, 1961）ため、染色分体交換型異常の半数を減じた異常の数を、生成する染色体断片の数として図に示した（△）。この染色体断片の生成率（△）と小核誘発率（●）を比べてみるとMMCとcaffeineの差は小さくなった。このように化学物質によって一見染色体異常と小核の出現頻度の差があるようにみえるのは、その化学物質によって誘発される染色体異常の型と割合によることが示唆された。また、ここに示した濃度範囲では2個以上の異常を持った細胞はまれで、ほとんどの細胞が1つの異常しか持っていなかったため、単純に染色体断片の数と小核の数を比較してみると、MMC処理では約30%の染色体断片が小核を形成するという結果になった。しかし、Evansら（Evans et al., 1959）およびCarranoとHeddle（Carrano and Heddle, 1973）は電離放射線による染色体異常の誘発率と小核の誘発率との比較の結果はそれぞれ60%と70%の染色体断片が小核を形成すると報告していて、今回の結果はこの報告と大きな差がある。これは、電離放射線による染色体断片は染色体型のものがほとんどで、化学物質によるもの

は染色分体型のものがほとんどであるため、断片の大きさの違いにより小核を形成する割合が異なることが大きな要因であると考えられた。

Colcemidは紡錘糸の形成を阻害し細胞分裂時に染色体の不分離を起こす物質として知られているが、染色体の構造異常はほとんど誘発しない。しかし、in vivoの小核試験では小核を誘発する。今回の結果も、染色体の構造異常はほとんど認められなかったが、小核は用量依存的に直線的に増加した（Fig. 4c）。この結果より染色体の構造異常を起こす物質だけではなく、染色体の不分離を起こす物質も定量的に検出できることがわかった。Fig. 4に示されているように染色体の構造異常誘発物質および数値的異常誘発物質でも小核誘発率は濃度とともにほぼ直線的な増加を示し、高濃度でもその傾きが減少することなく定量性が高いことが示された。

また、それぞれの化学物質での無処理（濃度0）では小核の出現頻度が染色体の出現頻度を上回っていた。このことは、染色体の構造異常を起こさずに小核が生成されているということで、無処理での小核を形成するものは化学物質で誘発されるような染色体断片ではなく染色体の不分離により取り残された染色体によることが大きいことが示唆された（Wakata and Sasaki, 1987）。

3) 小核の大きさに関する解析

無処理, MMC 0.01 $\mu\text{g/ml}$, MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$, colcemid 0.002 $\mu\text{g/ml}$, colcemid 0.05 $\mu\text{g/ml}$, caffeine 1 mg/mlで処理した時に出現した小核の主核に対する大

きさの分布をそれぞれ Fig. 5a, b, c, d, e, f に示す。

これは、それぞれの処理で出現した小核 50 個を計測しその大きさの分布を示したものである。無処理で観察された小核の大きさの分布 (Fig. 5a) はある程度の広さをもって分布していたが、MMC 0.01 あるいは 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理で得たものは無処理のものに比べて小さいものが多く分布の範囲も狭かった (Fig. 5b, c)。これは MMC 処理によって生ずる小核は染色分体の断片に由来するものであるが、無処理のものはこのような染色体の構造異常によって生じた染色体断片とは異なるものが小核のもととなっていると考えられた。また、低濃度の colcemid で処理 (0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$) した場合は出現した小核のサイズの分布は、小さいサイズの小核の頻度がやや減少していたものの無処理のものと同様に広いものであった (Fig. 5d)。サイズが大きくて様々な大きさの小核が出現するのは、colcemid による紡錘体の異常で生じた取り残された染色体が小核を形成するためだと考えられている (Yamamoto and Kikuchi, 1980; Hogsted and Karlsson, 1985)。このことより自然発生の小核は紡錘体の機能不全による染色体不分離によることが多いことが示唆された。また高濃度の colcemid 処理 (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ではさらに大きなサイズの小核が大半を占めるようになる (Fig. 5e)。このように、ほとんど主核と変わらない大きさのものが出現することから、これらは核の異常分裂によるものだと考えられた (Wakata and Sasaki, 1987)。また、caffeine では MMC と同様にサイズの小さな小核が多く (Fig. 5f) 染色体構造異常による小核であることが示唆された。

In vitro 小核試験は近年注目度が高くなり、国際的な検討がなされている (Kirsch-Volders et al., 2000)。

2. げっ歯類個体を用いる小核試験法の検討

1) マウス小核試験における投与経路による小核誘発率の差の検討

制癌剤であり小核試験において陽性対照物質として広く用いられている Cyclophosphamide (CP) をマウスに腹腔内投与 (ip) あるいは経口投与 (po) したとき誘発された小核を持つ多染性赤血球の頻度を Table 1 に示す。

CP 投与後 24 時間に骨髓細胞標本作製し小核を持つ多染性赤血球を計数した。腹腔内投与では 50 mg/kg で 1.78% の小核出現頻度であったのに対し、po の 50 mg/kg では 0.59% であり 100 mg/kg では 1.89% と、同じ投与量では ip の方が小核誘発率が高い結果となった。しかし、骨髓細胞に対する影響の指標である、PCE 比は同様な小核誘発率が観察された、ip の 50 mg/kg 投与では 28.2% であり、po の 100 mg/kg 投与では 20.8% と同様な値を示した。この結果より、ip 投与の方が少ない投与量で小核誘発が観察されることがわかった。しかし、CP は骨髓細胞に強く毒性を示すことが知られている物

質である。このような物質の場合毒性が強く出る ip 投与では小核の観察可能な用量範囲が狭くなることがわかった。それに対し、po 投与では低用量であり小核誘発が観察されないが、ip 投与と同じ程度に骨髓に影響を与える量投与すると ip 投与と同程度の小核が観察されることがわかったが、そのためには大量の投与が必要であった (Wakata et al., 1989)。

この研究は 34 機関の共同研究として 17 化合物を用いて行われた 1 つであるが、全化合物についてのそれぞれの投与経路での小核誘発率を比較した結果を Table 2 に示す。

Benzene を除くすべての化合物で、同用量を投与した場合には po より ip の方が小核誘発率が高いかあるいは同程度であったが、投与量をそれぞれの投与経路での LD_{50} 値に対する比に換算した同投与量 (例えば、po の LD_{50} が 200 mg/kg で ip の LD_{50} が 100 mg/kg であった場合、po での 100 mg/kg と ip での 50 mg/kg はともにその投与経路の LD_{50} の 1/2 量であるので、 LD_{50} 値に対する比としては同投与量と考える) では、7 化合物で po した場合の方が高い小核誘発率がえられることがわかった (Hayashi et al., 1989)。このことより、in vivo 小核試験に関しては投与経路はあまり大きな影響がなく、毒性を指標とした適切な投与量が設定されている場合は、投与経路のいかにかわからず、同程度の感度で小核誘発率が測定されることがわかった。しかし、ip では検体量が少なく済むこと、po より小核誘発率は低くなる化合物がほとんどなく、高くなる化合物が多いこと、手技が po に比べ簡単であることより、どちらかといえば ip を選んだ方がよいと考えられた。

2) マウス小核試験における投与回数に関する検討

Methotrexate (MTX) を 1, 2 および 4 回腹腔内投与後、6, 24, 48 および 72 時間後に骨髓塗抹標本作製し (1 回投与では 24 時間後から)、小核の誘発を観察した。その結果を Fig. 6 に示す。

1 回投与では 16 mg/kg 投与 48 時間後に最大値の 0.50% の有意な小核誘発性が認められた。2 回投与では明らかに 1 回投与より高い小核誘発率が得られた。また、4 回投与では、低投与量から高い小核誘発率が得られたが、最大誘発率は 2 回投与とあまり変わらず、高用量になると骨髓毒性が強く出て観察不可能になり、小核の誘発が逆に減少した。以上の結果より、MTX は投与回数を多くすればするほどより低用量で小核を効率よく誘発することがわかったが、骨髓抑制も強く現われ、最大の小核誘発率に大きな増加は認められなかった。また、Schmid が小核試験のプロトコールとして最初に提案した方法 (Schmid, 1975) は、2 回投与後の 6 時間後に観察する方法であるが、今回の結果より、2 回投与後の 24 時間後に観察する方がより感度が良いことがわかった。

Table 1 Results of micronucleus test with cyclophosphamide administered by ip and po to CD-1 mice

Dose (mg/kg)	ip		po	
	MNPCE (%)	PCE (%)	MNPCE (%)	PCE (%)
Saline	0.03 ± 0.05 (4)	49.5 ± 0.7	0.05 ± 0.06 (4)	46.1 ± 3.2
25	0.42 ± 0.13 (4)	35.8 ± 5.6	nt	nt
50	1.78 ± 1.44 (4)	28.2 ± 2.3	0.59 ± 0.03 (4)	39.6 ± 8.8
100	4.46 (1)	8.8 ± 2.1	1.89 ± 0.88 (4)	20.4 ± 4.2
200	na	2.8 ± 2.5	2.09 ± 0.17 (3)	10.7 ± 2.2
400	nt	nt	1.33 ± 0.81 (3)	8.7 ± 5.2

() : number of animals analyzed, nt : not tested, na: not analyzed because of too low frequency of PCE, PCE: polychromatic erythrocyte, MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte

Table 2 Comparative sensitivity of administration routes, intraperitoneal injection and oral gavage, at same dosage

Compounds	Sensitivity	
	Dose (mg/kg)	Dose (% of LD ₅₀)
<i>Nucleic acid analogs</i>		
Ara-C	ip > po	ip > po
6-MP	ip = po	ip < po
<i>polycyclic hydrocarbons</i>		
B(a)P	ip > po	ip > po
DMBA	ip > po	ip < po
<i>Aromatic amines</i>		
2AAF	ip > po	ip > po
Phenacetin	ip = po	ip = po
<i>Alkylating agents</i>		
Cyclophosphamide	ip = po	ip < po
EMS	ip = po	ip = po
ENU	ip = po	ip = po
MMS	ip > po	ip < po
<i>Cross-linking agents</i>		
MMC	ip > po	ip < po
<i>Spindle poisons</i>		
Colchicine	ip > po	ip > po
Vincristine	ip > po	ip > po
<i>Inorganic chemicals</i>		
KBrO ₃	ip = po	ip < po
K ₂ CrO ₄	ip > po	ip > po
<i>Miscellaneous</i>		
Benzene	ip < po	ip < po
Procarbazine	ip > po	ip = po

Dose (mg/kg) : absolute dosage

Dose (% of LD₅₀) : relative dosage to LD₅₀ in each administration route.

Ara-C: 1-β-arabinofuranosylcytosine, 6-MP: 6-mercaptopurine, B(a)P: benzo[*a*]pyrene, DMBA: 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene, 2AAF: 2-acetylaminofluorene, EMS: ethyl methanesulfonate, ENU: *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, MMS: methyl methanesulfonate, MMC: mitomycin C

MTXについては、以上の結果より、1回投与では小核の誘発が弱いものでも2回投与することにより、明らかな小核の誘発が認められることがわかった。

この研究は33機関による共同研究で11化合物について投与回数を検討したうちの1つである。その11化合物のそれぞれの投与回数で得られた小核誘発率の最高値

をTable 3に示す。また、それぞれの化合物で得られた小核誘発率の最高値を太字下線で示し、2番目の値を太字で示した。

その結果、2回投与で最高値あるいは2番目に高い小核誘発率を示す化合物が1番多く、1回投与と4回投与ではほぼ同数であった。また、4回投与では2回投与よ

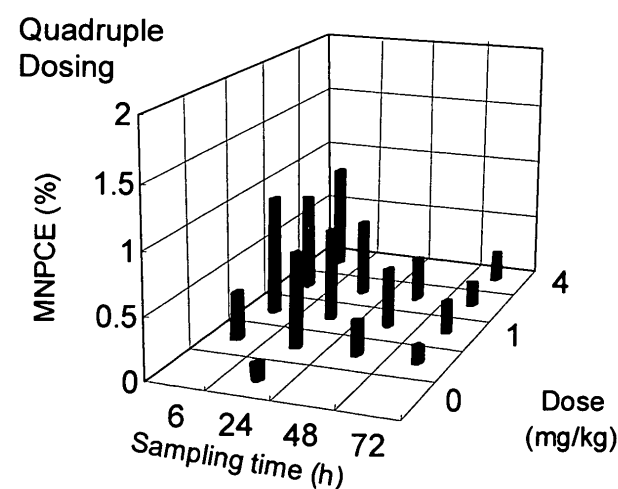
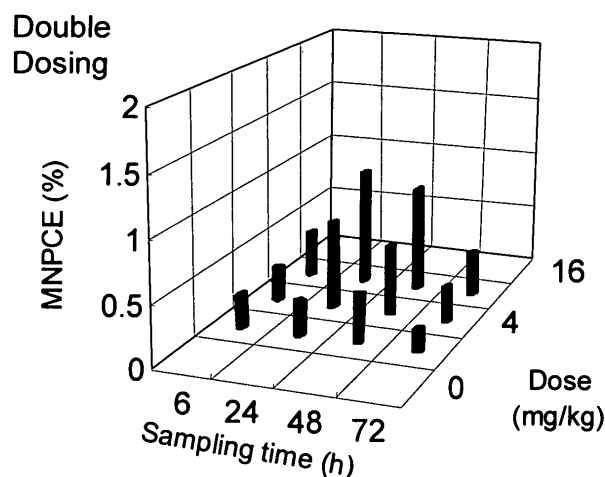
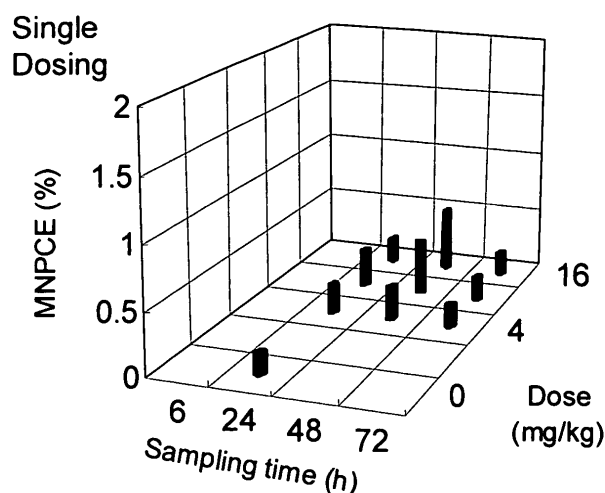


Fig. 6 Mean Induction of micronucleated polychromatic erythrocytes treated with methotrexate. MNPCEs were counted in 1000 PCE in the bone marrow cells of mice treated by single, double or quadruple dosing.

Table 3 Effect of frequency of administration on micronucleus induction

Compounds	MNPCE (%)		
	Frequency of administration		
	1	2	4
5-FU	3.13	<u>4.17</u>	1.60
6-MP	5.74	<u>8.45</u>	<u>11.8</u>
Ara-C	5.12	4.18	<u>7.26</u>
DMBA	2.54	<u>3.67</u>	2.08
2AAF	1.16	<u>1.63</u>	0.63
Phenacetin	1.23	<u>2.38</u>	0.95
ENU	3.13	<u>4.72</u>	<u>6.06</u>
EMS	<u>2.43</u>	1.48	<u>1.63</u>
K ₂ CrO ₄	<u>0.93</u>	<u>0.85</u>	0.80
Benzene	1.08	<u>1.40</u>	<u>1.52</u>
MTX	0.50	<u>0.97</u>	<u>0.83</u>

Maximum (bold underlined) and **Second** (bold) value in each chemical

5-FU: 5-fluorouracil, 6-MP: 6-mercaptopurine, Ara-C: 1- β -arabinofuranosylcytosine, DMBA: 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene, 2AAF: 2-acetylaminofluorene, ENU: *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, EMS: ethyl methanesulfonate, MTX: methotrexate

り高い小核誘発率を示すものもあったが、逆に小核誘発率が低下するもの、骨髄抑制のため観察が不可能になるものがあった (CSGMT, 1990)。投与回数を増すことは操作も煩雑になり、また毒性のある物質では投与量の設定も容易ではなく、あまり実用的ではないことがわかった。また、MTXのような1回投与では小核誘発性が弱く適切な標本作製時期 (投与48時間後) を設定しなければ、陽性結果を得られない化合物であっても、2回投与の24時間後には有意な小核誘発性が観察されることがわかった。これらをまとめると、スクリーニング的にある物質の小核誘発性を知るための試験としては、24時間間隔の2回投与後、24時間目に骨髄標本作製して観察すればよいことがわかった。

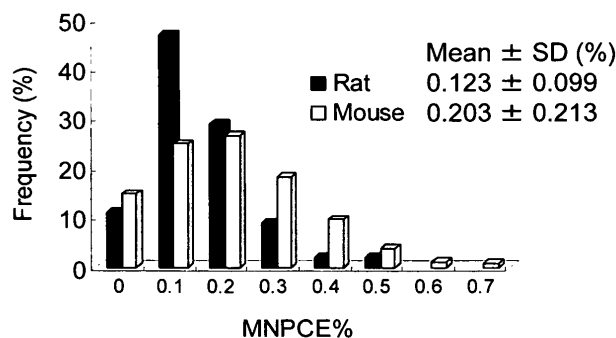
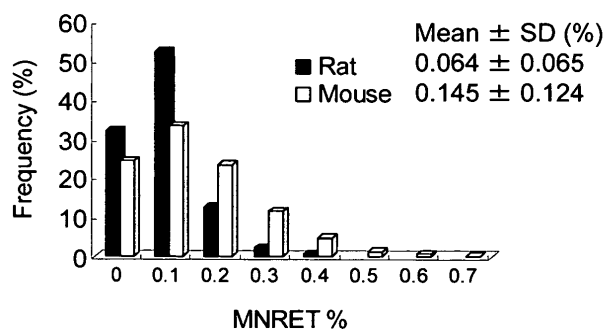
3) ラットを用いる小核試験の検討

医薬品等のげっ歯類を用いる毒性試験においてマウスはあまり用いられず、ラットが用いられることがほとんどである。そこで、小核試験においてもラットが用いられないかを検討した。試験化合物として、マウス小核試験陽性でラットに発癌性が認められている28化合物、マウス小核試験陽性でラットでの発癌性は不明の6化合物、マウス小核試験陰性でラットに発癌性が認められている2化合物およびマウスとラットで小核試験において相違が報告されている3化合物 (George et al., 1990; Westmoreland and Gatehouse, 1991; Meli and Seeberg, 1990) を選んだ (Table 4)。

これらの化合物についてラットを用い骨髄細胞と末梢血液で小核誘発性を調べた。まず、ラットの骨髄細胞お

Table 4 List of chemicals tested in the rat micronucleus assay

Mouse MN +ve rat carcinogens	
Acetaldehyde	Oil orange SS
2-Acetylaminofluorene	Phenacetin
<i>p</i> -Aminoazobenzene	1, 3-Propane sultone
<i>o</i> -Aminoazotoluene	Propylene oxide
Arsenic acid solution	Triethylenemelamine
Benzene	Urethane
Benzidine	
4-Chloro- <i>o</i> -phenylenediamine	Mouse MN +ve chemicals
Daunomycin	Azathioprine
<i>N, N'</i> -Diacetylbenzidine	Colchicine
1, 2-Dibromo-3-chloropropane	5-Fluorouracil
Diepoxybutane	6-Mercaptopurine
Diethyl sulfate	Methotrexate
Ethy methanesulfonate	Vincristine
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea	
Hydrazine	Mouse MN -ve carcinogens
Nitrogen mustard	Acrylonitrile
2-Methylaziridine	4, 4'-Methylene bis (2-chloroaniline)
Methyl methanesulfonate	
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea	Species difference reported chemicals
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N'</i> -nitrosoguanidine	Azobenzene
<i>N</i> -Nitrosomorpholine	1, 2-Dimethylhydrazine
	Solvent yellow 14

**Fig. 7** Distribution of MNPCE frequencies in the solvent control rats (the present study) and mice (CSGMT, 1986; 1990; 1992; Hayashi et al., 1989a; Morita et al., 1997).**Fig. 8** Distribution of MNRET frequencies in untreated rats (the present study) and mice (CSGMT, 1992; Morita et al., 1997).

よび末梢血における自然発生の小核を持つ幼若赤血球の頻度を調べた。それらをマウスと比較した結果を Fig. 7 および Fig. 8 に示す。

骨髓細胞における小核を持つ幼若赤血球の頻度は、ラットで 0.123%，マウスで 0.203%，末梢血においては、ラットで 0.064%，マウスで 0.145% といずれの場合もラットがマウスの約 1/2 と低かった。今回試験した化合物については、マウス骨髓細胞において検出されなかったのは 5 化合物であるのに対し、ラット骨髓細胞では 4 化合物とほとんど変わりなく、骨髓細胞を用いる場合はマウスとラットで検出力に差はなく、全く同等であることが示された (Table 5)。

またこれまで、末梢血を用いた場合は、小核誘発性を

検出できなかった化合物が 4 化合物とマウスの 1 化合物に比べ少し多かったが、マウスでは試験されていない化合物も多く、従来ラットでは脾臓において小核を持つ赤血球が除去されるためその能力のないマウスに比べ検出力が落ちると思われるほど大きな検出力の差はなく、ラットの末梢血でも十分小核誘発性の評価が可能であることを示した。また、小核誘発率を比較してみると、小核誘発率の絶対値で比較するとマウスが高く、すべての化合物においてラットと同じか高かった。しかし、先に示したようにラットでは小核を持つ幼若赤血球の自然発生頻度が低いので、コントロールと比較しての誘発率に換算すると、マウスより高く小核を誘発する化合物があることがわかった (Table 6)。

Table 5 Rat and mouse micronucleus assay 39 chemicals with peripheral blood and bone marrow

	Mouse						Rat					
	PB			BM			PB			BM		
	+	ND	-	+	ND	-	+	INC	-	+	ND	-
No. of Chemicals	24	14	1	28	6	5	31	3	4	34	1	4

PB: peripheral blood, BM; bone marrow, +; positive, ND; no data, INC; inconclusive, -; negative

Table 6 Comparative sensitivity of rat and mouse micronucleus assay

Chemicals	Species	Route	Bone marrow			Peripheral blood		
			Dose (mg/kg)	MNPCE		Dose (mg/kg)	MNRET	
				(%)	(Fold) inc.		(%)	(Fold) inc.
p-Aminoazobenzene	Rat	ip	80	0.41	3.4	80	0.38	3.5
	Mouse	ip	150	0.70	5.0	150	1.14	8.1
o-Aminoazotoluene	Rat	ip	600	0.11	0.9	600	0.16	8.0
	Mouse	ip	400	0.60	3.0			
Benzene	Rat	po	2000	2.34	16.7	2000	2.16	18.0
	Mouse	po	2000	2.75	34.4	2000	2.75	8.1
Diepoxybutane	Rat	po	144	4.00	22.2	144	0.78	26.0
	Mouse	po	72	8.68	36.2			
Ethyl methanesulfonate	Rat	ip	300	1.36	45.3	300	0.75	12.5
	Mouse	ip	200	1.48	8.2			
N-Ethyl-N-nitrosourea	Rat	ip	75	2.78	27.8	75	1.36	12.4
	Mouse	ip	100	7.85	60.4	50	3.78	11.8
5-Fluorouracil	Rat	ip	40	1.39	10.7	80	0.69	34.5
	Mouse	ip	50	3.13	24.1	50	2.54	18.1
Hydrazine	Rat	ip	75	0.58	2.8	12.5	0.15	2.5
	Mouse	ip				50	1.18	5.9
6-Mercaptopurine	Rat	ip	50	0.92	6.1	25	0.53	5.3
	Mouse	ip	50	6.98	27.9	25	2.9	7.3
MNNG	Rat	ip	100	1.20	4.0	100	0.75	3.75
	Mouse	ip	150	2.55	10.2	100	0.8	3.1
Nitrogen mustard	Rat	ip	2	3.24	23.5	2	0.66	7.5
	Mouse*	ip	2	7.17	29.6	2	4.98	21.4
1, 3-Propane sultone	Rat	ip	60	2.15	13.4	30	0.66	7.3
	Mouse	ip				72	1.92	11.3
Propylene oxide	Rat	ip	200	0.33	2.2	300	0.4	3.1
	Mouse	ip	300	0.53	8.8	300	0.4	6.7
Triethylenemelamine	Rat	ip	0.5	5.58	11.8	0.125	1.08	6.8
	Mouse	ip	1	7.52	32.7	1	6.64	66.4
Urethane	Rat	ip	1000	1.29	11.7	1000	1.6	40
	Mouse					1000	3.28	16.4
Vincristine	Rat	ip	0.2	0.99	7.6	0.08	0.26	4.3
	Mouse	ip	0.125	11.68	89.8	0.25	4.34	54.3

Light shadow: frequency in mice was more than twice that in rats

Dark shadow: frequency in rats was more than twice that in mice

* MS/Ae strain mice

結 語

このことにより、他の一般毒性試験の動物を用いて小核の評価が行える可能性が示唆された (Wakata et al., 1998)。

小核は染色体異常を観察する簡便で感度の高い検出法であるが、培養細胞では分裂細胞の特定という技術的な問題点がありその定量性が確保できなかったが、今回検討した方法により培養細胞でも *in vivo* の骨髓細胞と同様に定量的に小核誘発性を評価することができるよう

になった。このことにより、培養細胞を用いる小核試験が染色体異常試験の代わりとなる可能性があることが示された。また、小核試験にラットを用いることができることと示されたことにより、他の毒性試験との関連もとれ小核試験にラットを用いる有用性を示した。

謝 辞

In vitro 小核試験の研究は、京都大学放射線研究センターの佐々木正夫教授のもとに染色体異常試験を教えて頂きに伺った時に運良く出会い、研究の機会を与えて頂き、多くの御指導を受けて成し得たものです。ここに心より感謝申し上げます。マウスおよびラットを用いた小核試験の検討は、本学会 MMS 研究会の共同研究の一環として行われたものであり共同研究者の皆様の御協力なしでは成し得なかったものです。本研究を進めるに当たって多くの御助力を頂きました国立医薬品食品衛生研究所 林真部長、グラクソ・スミスクライン株式会社 森田健博士ならびに日本環境変異原学会、MMS 研究会、小核共同研究グループ (JEMS/MMS・CSGMT) の皆様に深く感謝致します。本研究を行うにあたり多くの御助力と御配慮を頂きました、山之内製薬株式会社 大島稔彦、山下智子、玉起美恵子、湯野幸一郎、宮内美津江、永井由美子諸氏に深く感謝致します。学生時代から現在まで長きにわたり広く御指導頂きました、就実女子大学 早津彦哉教授、岡山大学遺伝子実験施設 根岸和雄助教授、同薬学部 根岸友恵助教授、有元佐賀恵助教授に深く感謝致します。

参考文献

- Brock, W.A. and M. Williams (1985) Kinetics of micronucleus expression in synchronized irradiated Chinese hamster ovary cells, *Cell Tissue Kinet.*, 18, 247-254.
- Buckton, K.E., G. E. Hamilton, L. Paton and A.O. Langlands (1978) Chromosome aberrations in irradiation ankylosing spondylitis patients, in: H. J. Evans and D.C. Lloyd (Eds.), *Mutagen-induced Chromosome Damage in Man*, University Press, Edinburgh, pp. 142-154.
- Carrano, A.V. and J.A. Heddle (1973) The fate of chromosome aberrations, *J. Theor. Biol.*, 38, 289-304.
- Carter, S.B. (1967) Effects of cytochalasins on mammalian cells, *Nature*, 213, 261-264.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1986) Sex difference in the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 172, 151-163.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1990) Single versus multiple dosing in the micronucleus test: the summary of the 4th collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS. *Mutat. Res.*, 234, 205-222.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS. *Mutat. Res.*, 278, 83-98.
- Evans, H.J., G.J. Neary and F.S. Williamson (1959) The relative biological effectiveness of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen, Part II. Chromosome damage: The production of micronuclei, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1, 216-229.
- Fenech, M. and A.A. Morley (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.*, 147, 29-36.
- Fenech, M. (2000) A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division, *Mutagenesis*, 15, 329-336.
- George, E., M. Andrews and C. Westmoreland (1990) Effects of azobenzene and aniline in the rodent bone marrow micronucleus test, *Carcinogenesis*, 11, 1551-1556.
- Hayashi, M., S. Sutou, H. Shimada, S. Sato, Y.F. Sasaki and A. Wakata (1989) Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test: The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS, *Mutat. Res.*, 223, 329-344.
- Heddle, J.A. (1965) Randomness in the formation of radiation-induced chromosome aberrations, *Genetics*, 52, 1329-1334.
- Heddle J.A. and A.V. Carrano (1977) The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments, *Mutat. Res.*, 44, 63-69.
- Hogstedt, B. and A. Karlsson (1985) The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used, *Mutat. Res.*, 156, 229-232.
- Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, Jr., E. Lorge, H. Norppa, J. Surralles, W. von der Hude, and A. Wakata (2000) Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- Mavournin, K.H., D.H. Blakey, M.C. Cimino, M.F. Salamone and J.A. Heddle (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.*, 239, 29-80.
- Meli, C. and A.H. Seeberg (1990) Activity of 1,2-dimethylhydrazine in the mouse bone marrow micronucleus assay using a triple- and a single-dosing protocol, *Mutat. Res.*, 234, 155-159.
- Morita T., N. Asano, T. Awogi, Y.F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS, *Mutat. Res.*, 389, 3-122.
- Pincu, M., D. Bass and A. Norman (1984) An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutat. Res.*, 139, 61-65.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31, 9-15.
- Seabright, M. (1978) Participation of human chromosomes in induced changes. in: H.J. Evans and D.C. Lloyd (Ed.), *Mutagen-induced Chromosome Damage in Man*, University Press, Edinburgh, pp. 151-154.
- Wakata, A. and M.S. Sasaki (1987) Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in culture Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations, *Mutat. Res.*, 190, 51-57.
- Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo and M. Hayashi (1998) Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test.

- Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environ. Mol. Mutagen., 32, 84-100.
- Wakata, A., T. Yamashita, M. Tamaoki, T. Ohshima and M. Kojima (1989) Micronucleus test with cyclophosphamide administered by intraperitoneal injection and oral gavage, Mutat. Res., 223, 369-372.
- Westmoreland, C. and D.G. Gatehouse (1991). The differential clastogenicity of Solvent Yellow 14 and FD & C Yellow No. 6 in vivo in the rodent micronucleus test (observations on species and tissue specificity) , Carcinogenesis, 12, 1403-1407.
- Wolff, S. (1961) Some postirradiation phenomena that affect the induction of chromosome aberrations, J. Cell. Comp. Physiol., 59, 151-162.
- Wright, W.E. and L. Hayflick (1972) Formation of anucleate and multinucleate cells in normal and SV40 transformed WI-38 by cytochalasin B, Exp. Cell Res., 74, 187-194.
- Yamamoto, K.I. and Y. Kikuchi (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, Mutat. Res., 71, 127-131.