

Proficiency of the laboratory

32. In order to establish sufficient experience with the test prior to using it for routine testing, the laboratory should have performed a series of experiments with reference positive chemicals acting via different mechanisms and various negative controls (using various solvents/vehicle).

A selection of positive control chemicals (see table in para 25) should be investigated with short and long treatments in the absence of metabolic activation, and also with short treatment in the presence of metabolic activation, in order to demonstrate proficiency to detect clastogenic compounds and determine the effectiveness of the metabolic activation system. The concentrations of the selected chemicals should be chosen so as to give reproducible and concentration-related increases above the background in order to demonstrate the sensitivity and dynamic range of the test system

Historical control data

33. The laboratory should establish:

- A historical positive control range and distribution,
- A historical negative (untreated, solvent) control range and distribution.

When first acquiring data for an historical negative control distribution, concurrent negative controls should be consistent with published control data, where they exist. As more experimental data are added to the control distribution, concurrent negative controls should ideally be within the 95% control limits of that distribution. The laboratory's historical negative control database, should initially be built with a minimum of 10 experiments but would preferably consist of at least 20 experiments conducted under comparable experimental conditions. Laboratories should use quality control methods, such as control charts (e.g. C-charts or X-bar charts (45)), to identify how variable their positive and negative control data are, and to show that the methodology is 'under control' in their laboratory (see Annex 5). Further recommendations on how to build and use the historical data (i.e. criteria for inclusion and exclusion of data in historical data and the acceptability criteria for a given experiment) can be found in the literature (30).

34. Any changes to the experimental protocol should be considered in terms of their consistency with the laboratory's existing historical control databases. Any major inconsistencies should result in the establishment of a new historical control database.

35. Negative control data should consist of the incidence of cells with chromosome aberrations from a single culture or the sum of replicate cultures as described in paragraph 20. Concurrent negative controls should ideally be within the 95% control limits of the distribution of the laboratory's historical negative control database. Where concurrent negative control data fall outside the 95% control limit they may be acceptable for inclusion in the historical control distribution as long as these data are not extreme outliers and there is no

evidence that the test system is no longer 'under control' (see paragraph 33) and no evidence of technical or human failure.

Acceptability Criteria

39. Acceptance of a test is based on the following criteria:

- The concurrent negative control is considered acceptable for addition to the laboratory historical negative control database as described in paragraph 34

- Concurrent positive controls (see paragraph 25) should induce responses that are compatible with those generated in the historical positive control DB and produce a statistically significant increase compared with the concurrent negative control.

- Cell proliferation criteria should be fulfilled (Paragraph 16 and 17).

- All three experimental conditions were tested unless one resulted in positive results (see paragraph 27).

- Adequate number of cells and concentrations should be analyzable. (Paragraphs 29 and 20).

- The criteria for the selection of top concentration are consistent with those described in paragraphs 21, 22 and 23.

Evaluation and interpretation of results

Providing that all acceptability criteria are fulfilled, a test chemical is considered to be clearly positive if, in any of the experimental conditions examined (see paragraph 27-473): a) at least one of the test concentrations exhibits a statistically significant increase compared with the concurrent negative control, b) the increase is dose-related when evaluated with an appropriate trend test (see paragraph), and c) any of the results are outside the distribution of the historical negative control data (e.g. Poisson-based 95% control limit; see paragraph and Annex). When all of these criteria are met, the test chemical is then considered able to induce mutations/chromosomal aberrations/micronuclei in cultured mammalian cells in this test system. Recommendations for the most appropriate statistical methods can be found in the literature (xx) (xx) (xx).

Providing that all acceptability criteria are fulfilled, a test chemical is considered clearly negative if, in all experimental conditions examined (see paragraph xx): a) none of the test concentrations exhibits a statistically significant increase compared with the concurrent negative control, b) there is no

concentration-related increase when evaluated with an appropriate trend test and c) all results are inside the distribution of the historical negative control data (e.g. Poisson-based 95% control limit; see paragraph and Annex). The test chemical is then considered unable to induce mutations/chromosomal aberrations/micronuclei in cultured mammalian cells in this test system.

There is no requirement for verification of a clearly positive or negative response.

In case the response is neither clearly negative nor clearly positive as described above and in order to assist in establishing the biological relevance of a result, the data should be evaluated by expert judgement and/or further investigations. Scoring additional cells (where appropriate) or performing a repeat experiment possibly using modified experimental conditions (e.g. concentration spacing, other metabolic activation conditions [i.e. S9 concentration or S9 origin]) could be useful.

In rare cases, even after further investigations, the data set will preclude making a conclusion of positive or negative results, and will therefore be concluded as equivocal.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

新規の安全性評価試験法を国際的なガイドラインにするための
手法に関する研究

—多臓器小核試験（肝臓・胃腸管）プロトコルの基礎的検討—

—多臓器小核試験の統計学的解析—

研究分担者	森田 健	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部第四室 室長
	林 真	(公財)食品農医薬品安全性評価センター 理事長
研究協力者	幡野晶子	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部第四室
	濱田修一	国立医薬品食品衛生研究所—変異遺伝部
		(三菱化学メディエンス株式会社 試験研究センター)
	高沢博修	三菱化学メディエンス株式会社 試験研究センター
	高島理恵	三菱化学メディエンス株式会社 試験研究センター
	大山ワカ子	株式会社ヤクルト本社 中央研究所
	成見香瑞範	株式会社ヤクルト本社 中央研究所
	岡田恵美子	株式会社ヤクルト本社 中央研究所
	若田明裕	アステラス製薬株式会社 安全性研究所
	大橋信之	(公財)食品農医薬品安全性評価センター
	中嶋 圓	(公財)食品農医薬品安全性評価センター
	佐野正樹	(公財)食品農医薬品安全性評価センター

研究要旨

一般毒性試験に組み込み可能な多臓器小核試験法の構築の一環として、肝臓および胃腸管（腺胃・結腸）を用いる反復投与小核試験の開発を進めた。これまでの知見のデータギャップの補填、追加物質、陰性対照における各臓器における小核出現頻度、細胞増殖指標、病理組織学的検査等の検討を行い、背景データを蓄積するとともに、多臓器小核試験の有用性を示す知見が多く得られた。肝臓については、基本的標準プロトコルを作成した。また、遺伝毒性試験国際ワークショップ（IWGT）において本試験法は議論され、高い評価を受けた。さらに、より頑健な試験として構築するための検討事項が明らかとされた。

A. 研究目的

多臓器小核試験（肝臓および胃腸管）は、反復投与による *in vivo* 遺伝毒性試験として本邦で試験法の開発が進められている。本試験の特徴は、薬物代謝の主要臓器である肝臓、経口投与された試験物質が高濃度で直接暴露する消化器官（胃）、ならびに試験物質が腸内細菌により遺伝毒性物質に変換される可能性のある消化器官（結腸）において同一動物で同時に小核誘発性を検索できることである。したがって、従来からの骨髓および末梢血を加えると、5つの臓器・組織（末梢血、骨髓、肝臓、胃、結腸）における遺伝毒性の評価が同時に可能である。さらに、最大28日までの反復投与における評価とすることで、一般毒性試験への組込を可能とし、これまでのハザード主体ではなく、より高次元の遺伝毒性リスク評価に資することが期待できる。そこで、本研究では、反復投与による多臓器小核試験（肝臓および胃腸管）について、本格的なバリデーション研究の実施可能性を検討するために、その有用性を検討するとともに、基本的な試験プロトコルを開発することを目的とした。

B. 研究方法

多臓器小核試験の試験法開発に関する検討は、日本環境変異原学会哺乳動物試験研究会（MMS研究会）に委託し、試験の実施は、同研究会によって組織された24機関から成る小核試験共同研究グループによってなされた。

これまでに、肝臓については、diethylnitrosamin (DEN)、2,4-diaminotoluene (2,4-DAT)、1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) および

2,6-diaminotoluene (2,6-DAT) を用いた有用性の基礎的検討^{1,2)}、標本作製方法の検討、DENを用いた施設間差の統計学的検討、ならびに27種の化合物を用いた小核誘発性の検討を、また、胃腸管については、DMHおよび*N*-nitroso-*N*-methylurea (MNU)を用いた技術移転、組織調製法の検討、ならびに6種の化合物を用いた小核誘発性の検討を、強制経口反復投与 (mitomycin C (MMC)のみ腹腔内反復投与) により実施し、良好な成績を得てきた。今年度は、昨年度の知見におけるデータギャップの補填、ならびに今後の検討に向けた化学物質の追加検討やメカニズムに関する基礎的な検討を実施した。

1. 肝臓における検討

1.1. データギャップの補填

反復投与肝臓小核試験は、180~200日と長い肝細胞の寿命とそれがもたらす小核を有する肝細胞の蓄積により、低用量でも反復投与することで、C_{max}に依存することなく遺伝毒性物質の検出が可能な試験系と考えられる（図1）。昨年度は計27物質を用いて14日間あるいは28日間の反復投与による肝臓での小核誘発性を検討した。このうち、28日間の知見がなく、蓄積効果を評価するためのデータギャップとなっているものが8物質（2-nitrosodipropylamine (NDPA), *p*-dimethylaminoazobenzene (DAB), methyl methanesulfonate (MMS), kojic acid (KA), *N*-nitrosomorpholine (NMOR), C.I. solvent yellow 14 (Sudan I), cyclophosphamide monohydrate (CP), methapyrilene dihydrochloride (MP)) 存在したが、NDPA、DAB、MMSおよびKAの4物質については

28 日間投与試験を追加実施し、肝臓および骨髄における小核誘発性を評価した。

1.2. 追加物質による検討

肝臓小核試験による化学物質検出特性をより明確にするために、作用機序の異なる物質について検討した。すなわち、非遺伝毒性肝発がん物質でペルオキシゾーム増殖剤の di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) ならびに異数性誘発物質で非発がん物質の carbendazim について 14 日間および 28 日間反復投与を実施し、肝臓および骨髄における小核誘発性を評価した。

1.3. 固定肝細胞の保存期間の検討

小核観察に供する固定肝細胞が長期保存できれば、一般毒性試験等における肝小核誘発性の事後評価が可能となり、また、短い観察期間という実験上の制約も緩和され、極めて有益である。そこで、コラゲナーゼ処理後ホルマリン固定した肝細胞懸濁液について、1 年間の室温保存ならびに 3 年間の冷蔵（約 5℃）保存した場合の影響を検討した。

1.4. 陰性対照での肝臓小核出現頻度の検討

肝臓小核試験における背景データ蓄積ならびに小核検出の統計処理法構築の一環として、共同研究等における陰性対照動物における肝臓小核出現頻度を算出した。

1.5. 肝細胞増殖指標の検討

小核試験においては、対象細胞が分裂増殖していることが妥当性のある陰性評価の基準となる。そこで、細胞増殖の指標として肝細胞の分裂指数の利用可能性を検討するために、共同研究等における陰性対照動

物における肝細胞分裂指数を算出した。

1.6. 肝臓の病理組織学的検査

肝臓における小核誘発性と臓器毒性等との関連性を検証し、肝臓小核試験における病理組織学的検査の利用性を評価するために、肝臓の病理組織学的検査を実施した。

2. 胃腸管における検討

2.1. 追加物質による検討

胃腸管小核試験の化学物質検出特性を明らかにするために、作用機序を勘案して異なる物質について検討した。すなわち、*N*-methyl-*N*-nitrosourethane (NMUT、ラット発がん標的臓器は胃)、*N*-nitroso-*N*-methylurea (MNU、ラット発がん標的臓器は胃など)、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine hydrochloride (PhIP、ラット発がん標的臓器は結腸) については、28 日間強制経口反復投与後の胃、結腸、肝臓および骨髄の小核誘発性を評価した。

2.2. 固定胃腸管細胞の保存期間の検討

胃腸管においても、小核観察に供する固定胃腸管上皮細胞が長期保存できれば、一般毒性試験への組み込みに際して有益である。EDTA 処理後ホルマリン固定した胃腸管上皮細胞懸濁液について、約 3.5 年間の冷蔵（約 5℃）保存した場合の影響を検討した。

2.3. 陰性対照での胃腸管小核出現頻度の検討

胃腸管小核試験における背景データ蓄積ならびに小核検出の統計処理法構築の一環として、共同研究等における陰性対照動物

における胃腸管小核出現頻度を算出した。

2.4. 胃腸管の病理組織学的検査

胃腸管における小核誘発性と臓器毒性等との関連性を検証し、胃腸管小核試験における病理組織学的検査の利用性を評価するために、NMUT、MNU、あるいは PhIP を 28 日間強制経口反復投与後の胃腸管や肝臓の病理組織学的検査を実施した。

C. 研究結果

1. 肝臓における検討

本検討には計 24 機関が参加した(表 1)。また、試験物質の一覧を表 2 に示した。なお、昨年度検討した 27 物質のうち、ethyl methanesulfonate (EMS) については、1 用量のみの知見のため、今回の集計からは除き、計 26 物質とした。

1.1. データギャップの補填

NDPA、DAB、MMS あるいは KA を 4 週間反復経口投与し、肝小核誘発性を検討した結果、2 週間投与で陽性を示した NDPA、DAB および MMS はいずれも 4 週間投与で陽性を示した。一方、骨髄では、NDPA、DAB、MMS あるいは KA の 2 週間投与でそれぞれ陰性、陽性、陽性、陰性であったが、4 週間投与では MMS が陰性を示したものの、他は一致した結果が得られた(表 3)。表 3 における Group A-1 は、遺伝毒性肝発がん物質だが単回投与による骨髄/末梢血小核試験では陰性となるもの、Group A-2 は、遺伝毒性肝発がん物質だが単回投与による骨髄/末梢血小核試験で陽性となるもの、Group B は、遺伝毒性発がん物質だが肝臓を発がんの標的としないもの、Group C は、非遺伝毒性肝発がん物質である。なお、ここ

での遺伝毒性発がん物質の「遺伝毒性」は、「Ames 試験陽性あるいは標準的 *in vivo* 遺伝毒性試験陽性」と定義している。

1.2. 追加物質による検討

DEHP および carbendazim は 14 日間および 28 日間強制経口反復投与とも肝臓での小核誘発性を示した。一方、骨髄では carbendazim による小核誘発性が示されたが、DEHP では示されなかった(図 2)³⁾。

1.3. 固定肝細胞の保存期間の検討

1 年間の室温保存ならびに 3 年間約 5°C 冷蔵保存したホルマリン固定肝細胞懸濁液を用いて作製した小核標本は、いずれも屠殺後の標本と比較して観察に問題は無く、かつ同程度の小核出現頻度を示し、保存による影響は認められなかった(図 3)。

1.4. 陰性対照での肝臓小核出現頻度の検討

共同研究等における陰性対照動物におけるラット肝臓小核出現頻度は 8 週齢と 10 週齢でさほど差はなく 0.05~0.06%であった。また、2000 個の肝細胞の観察では、小核肝細胞を認めない個体が 4 割近くあった(表 4)。

1.5. 肝細胞増殖指標の検討

共同研究等では陰性対照動物におけるラットの肝細胞分裂指数は、8 週齢で 0.09%であったが、10 週齢では 0.0005%と極めて低かった。また、2000 個の肝細胞の観察で分裂中期細胞を認めない個体が 8 週齢では約 4 割、10 週齢では約 5 割あった。(表 5)。

1.6. 肝臓の病理組織学的検査

肝臓の病理組織学的検査の結果、遺伝毒

性肝発がん物質は肝細胞分裂の増加を示唆する所見を示したが、肝臓以外に発がん性を示す遺伝毒性物質には、当該所見はあまり認められなかった（表 6）。非遺伝毒性肝発がん物質は、対象物質数が少なく病理組織学的所見の一般化は困難であった。

2. 胃腸管における検討

本検討には計 8 機関が参加した（表 1）。

2.1. 追加物質による検討

NMUT、MNU、PhIP の 28 日間反復投与による胃腸管小核試験（肝臓および骨髄を含む）の結果を表 7 に示す。ラットにおける主要発がん標的臓器が胃の場合は腺胃における小核誘発性を示し、一部は骨髄で小核誘発性も示したが、肝臓では陰性であった。主要発がん標的臓器が結腸の場合は、結腸での小核誘発性を示した。これらは、骨髄においても小核誘発性を示したが、肝臓では示さなかった。

2.2. 固定胃腸管細胞の保存期間の検討

約 3.5 年間冷蔵保存したホルマリン固定胃腸管上皮細胞懸濁液を用いて作製した小核標本は、屠殺直後の標本と比較して観察に問題は無かった。陽性対照群の小核出現頻度は、屠殺直後の値に比べ、低値傾向ではあるが、試験実施施設における背景データの範囲内の値を示しており、保存による影響は認められなかった（図 4）。

2.3. 陰性対照での胃腸管小核出現頻度の検討

共同研究等における陰性対照動物におけるラット胃腸管小核出現頻度は 8 週齢と 10 週齢でさほど差はなく、腺胃で 0.07～0.09%、

結腸で 0.08～0.17%であった（表 8）。

2.4. 胃腸管の病理組織学的検査

NMUT、MNU、あるいは PhIP を 28 日間反復投与後の胃腸管や肝臓の病理組織学的検査の結果を表 9 に示す。NMUT および MNU 投与群では、結腸における変化は認められなかったが、胃では、用量の増加に応じた核崩壊やびらんの増加が認められた。また、NMUT 投与群の肝臓では、細胞浸潤の増加が認められた。PhIP 投与群では、結腸において核崩壊像が認められたが、胃および肝臓における変化は認められなかった。

D. 考察

肝臓小核試験

データギャップの補填ならびに新規追加物質を含む約 30 種類の化学物質を用いた肝臓小核試験により、同試験の特性が明らかとなってきた。Tioacetamide (TAA) を除くすべての遺伝毒性肝発がん物質が肝臓小核試験により陽性を示し、肝臓には発がん性を示さない遺伝毒性発がん物質のほとんどが、肝臓小核試験で陰性であった。すなわち、肝臓小核試験による肝発がん物質検出の高い感受性が示された。一方、非発がん物質や異数性誘発物質についての検証数は少なく、試験系の特異性に関しては引き続き今後の検討が必要である。

固定肝細胞の保存期間の検討からは、長期保存が可能と推察された。これは、一般毒性試験等において、ホルマリン固定細胞懸濁液の調製さえしておけば、後日、必要に応じて小核誘発性の評価が可能であることを示しており、実務上、極めて有益である。本件についても、保存法や期間、施設間の相違など、更なる知見が必要である。

ラット肝臓の自然小核出現頻度は 0.05～0.06%であり、骨髄における 0.14%の半分、末梢血における 0.07%より若干低い値であった⁴⁾。この低い出現頻度は、統計学的処理の検出力にも影響するため、至適観察細胞数を検討する必要がある、今後の統計学的解析課題である。一般的には、対照群の出現頻度が低くなると、同じ検出力を保つためにはより多くの観察数が必要となる。現在行われている OECD テストガイドラインの改訂においても、小核試験や染色体異常試験における観察細胞数の増加が検討されている。

細胞増殖性（対象臓器での細胞毒性）の評価では、分裂指数が利用できないことが明らかとなった。臓器重量や他の細胞増殖指標あるいは病理組織学的検査等による評価法の検討が必要であろう。

2013 年 10 月に開催された国際遺伝毒性試験ワークショップ (IWGT) では、肝臓小核試験が検討事項の 1 つに取り上げられ、その有用性等について議論された。そこでは、1) 肝臓小核試験は染色体損傷を指標としており、コメット試験や UDS 試験による DNA 損傷、あるいはトランスジェニック動物による遺伝子突然変異を指標としたものとは異なること、2) 肝臓小核試験は、例えば、骨髄あるいは末梢血小核試験で検出できない発がん物質である 2,4-DAT の検出ができるように、代謝活性化が必要な変異原の検出が期待されること、3) サンプリング可能時期が長期のため、種々の長さの毒性試験に組込みが可能であること、から有用性は高いと評価された。一方、今後の検討課題として、1) 肝毒性非発がん物質のデータ、2) 観察細胞数決定のためのデータ、3) 同時陽性対照の設定の必要性やその投

与期間の検討、4) 使用動物の適正週齢範囲の検討、が挙げられた (図 5)。陽性対照については、DEN および MMC の単回投与 (それぞれ経口および腹腔内投与) 14 日後あるいは 28 日後において肝臓小核の誘発が認められたことから⁵⁾、28 日間反復投与を必要としない陽性対照の可能性が示唆されている (図 6)。

メカニズムに関連しては、DEN の反復投与条件下で分裂増殖する肝細胞を核酸アナログ 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) で標識して、小核形成後の動態を検証する実験が行われ、小核保有肝細胞の長期残存性および反復投与による小核誘発頻度の蓄積効果を実証された⁶⁾。まだ多くの検討事項は残されているが、期待度の高い試験法であり、今後のバリデーションを見つめ、更なるデータの蓄積を図る必要がある。なお、これまでの知見をもとに作成された基本プロトコルを別添 1 に示す。

胃腸管小核試験

3 物質の追加検討や高用量短期 (4 日間) 投与による発がん物質および非発がん物質を用いた検討 (表 10)⁷⁾により、胃腸管小核試験についても、その特性が明らかになりつつある。発がん標的臓器との良好な関連性、ならびに非発がん物質における小核陰性知見は、本試験法の有用性を示している。特に、MNNG や NMUT のように、経口投与時に生体内において不安定な物質の遺伝毒性評価には、腺胃小核試験が有効である。一方、4 日間投与では腺胃、結腸ともに陽性と報告されている MNU の 28 日間投与において、腺胃では陽性を示したが結腸では陰性であった。その要因の一つとして、短期投与に比べ、長期反復投与で投与

可能最大量が低下したことが考えられる。また、胃や結腸では上皮細胞の寿命（3～4日）⁸⁾等が肝臓と大きく異なることから、毒性を有する物質の場合、至適投与用量および期間に影響しているものと推察される。

固定胃腸管細胞の保存性については、固定肝細胞と同様、長期保存が可能と推察された。施設間差の有無の検討等も含め、更なるデータ集積が望まれる。

ラットの腺胃における自然小核出現頻度は0.07～0.09%、結腸では0.08～0.17%で、肝臓よりも若干高めではあるが、末梢血と同等、骨髄よりは低い値であった。肝臓小核と同様、至適観察細胞数を検討する必要があり、今後の統計学的解析課題である。

変異原投与後の小核誘発と細胞増殖性の関連性の検討において、EdU法やKi-67法による細胞増殖性評価に利用可能であることが示唆されている⁹⁾。実際上の試験において、胃腸管の病理組織学的検査の利用を含め、対象臓器における細胞毒性評価の必要性ならびにその方法に関する検討が必要であろう。

総括

一般毒性試験に組み込み可能な肝臓および胃腸管を用いる小核試験は、被験物質によって異なる各臓器に対する感受性を考慮すると、極めて有用な *in vivo* 遺伝毒性試験法である。本共同研究内容の学会発表やIWGTでの議論等を通じ、国際的認知度も上がってきている。現在、これまでの共同研究の結果をサマリー論文として1報、個別論文として21報の計22報にまとめ、論文特集号として発表すべく、準備中である。本試験を有用な試験として確立するために、IWGTで指摘された検討課題の解決や国際

的なバリデーションの実施を含め、これらの試験法の完成度を高めるための検討が必要と考えられる。

参考文献

- 1) Narumi K. et al.: Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: An investigation of diethylnitrosamine and 2,4-diaminotoluene, *Mutat. Res.*, 747, 234-239, 2012.
- 2) Takasawa H. et al.: 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.
- 3) 高島理恵ら：非遺伝毒性発がん性物質および異数性誘発物質を用いた反復投与肝臓小核試験の特性の検討、日本環境変異原学会第42回大会（岡山）要旨集、pp78、2013.
- 4) Wakata A et al.: 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.
- 5) Shimada K. et al.: Single-dose liver micronucleus assay in adult rats with rest period, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Iguassue, pp292, 2013.
- 6) Narumi K. et al.: Persistence and accumulation of micronucleated hepatocytes in liver of rats after repeated administration of diethylnitrosamine, *Mutat. Res.*, 755, 100-107, 2013.
- 7) Okada E. et al.: 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.

8) Ohyama W. et al.: In vivo rat glandular stomach and colon micronucleus tests: Kineticsof micronucleated cells, apoptosis, and cell proliferation in the targettissues after a single oral administration of stomach-orcolon-carcinogens, *Mutat. Res.* 755, 141-147, 2013.

E. 結論

一般毒性試験に組み込み可能な肝臓および胃腸管（腺胃ならびに結腸）を用いる反復投与小核試験の有用性が示され、その特性を明らかにした。今後の検討課題が明確化されたとともに、肝臓小核試験については基本的標準プロトコールを作成した。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

<森田 健>

1. 論文発表

1.1. 書籍

1) 小島肇夫（監修）：森田健：動物実験代替安全性試験プロトコール集、第2章 GHS における代替法の基準および規制の動向、シーエムシー出版、東京、pp.11-15, 2013.

1.2. 雑誌

1) ○ Hironao Takasawa, Rie Takashima, Akiko Hattori, Kazunori Narumi, Kazufumi Kawasako, Takeshi Morita, Makoto Hayashi, Shuichi Hamada, Development of a repeated-dose liver

micronucleus assay using adult rats (II):

Further investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene, *Mutation Research*, 2013, 751: 12-18.

2) Yoshida M, Suzuki D, Matsumoto K, Shirota M, Inoue K, Takahashi T, Morita T, Ono A: Simulation of acute reference dose (ARfD) settings for pesticides in Japan. *J Toxicol Sci.*, 2013, 38: 205-214.

3) 吉田緑、鈴木大節、松本清司、代田眞理子、井上薫、高橋美和、森田健、小野敦、日本における農薬等の急性参照用量設定の基本的考え方、*食品衛生学雑誌*, 2013, 54: 331-334.

4) M. Hayashi, M. Honma, M. Takahashi, A. Horibe, J. Tanaka, M. Tsuchiya, T. Morita: Identification and evaluation of potentially genotoxic agricultural and food-related chemicals, 2013 Food Safety Commission, Cabinet Office, Government of Japan, ONLINE ISSN: 2187-8404, <http://dx.doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2013003>, *Food Safety*, 2013, 1: 3-15.

2. 学会発表

1) 森田健：ECVAM ワークショップ報告 Ames 陽性のフォローアップとして in vitro 哺乳類細胞試験は利用可能か？ 2013年、JEMS・MMS研究会第62回定例会

2) Morita T, Kojima H, Hayashi M: General Principles of Chemical Selection for in vivo Validation Studies, 2013, The XIII International Congress of Toxicology.

3) Morita T, Hatano A, Honma M: Effects of Reduction of the Top Concentration Limit

- Used in the In Vitro Chromosomal Aberration Test, 2013, 49th Congress of the European Societies of Toxicology.
- 4) OHamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Matsumoto H, Nakai T, 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, Kawasako K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus, Assay with 22 Chemicals Using Young Adult Rats (III): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 2013, Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 44th Annual Meeting.
- 5) OTakeshi Morita: Micronucleus test other than bone marrow/peripheral blood and liver, 2013, 6th International Workshop on Genotoxicity Testing.
- 6) Morita T, Hatano A, Honma M: New top concentration limit will not improve positive ratio in the in vitro chromosomal aberration test, resulting in small improvement of false positives, 2013, 11th International Conference on Environmental Mutagens.
- 7) OHamada S, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Takasawa H, Narumi K, Ohyama W, Wako Y, Kawasako K, Morita T, Kojima H, Hayashi M, Honma M.: Evaluation of Repeated-Dose Liver Micronucleus Assay with 22 Chemicals Using Young Adult Rats, 2013, 11th International Conference on Environmental Mutagens.
- 8) 森田健、幡野晶子、本間正充:改訂 OECD TGで提案された最高上限濃度では偽陽性の削減は期待できない、2013年、日本環境変異原学会第42回大会
- 9) S Canipa, A Cayley, W Drewe, R V Williams, S Hamada, A Hirose, T. Morita, M Honma: Using Existing In Vitro Structural Alerts For Chromosome Damage To Predict In Vivo Activity And Direct Future Testing, 2013年、日本環境変異原学会第42回大会
- <林 真>
1. 論文発表
 - 1.1. 書籍
なし
 - 1.2. 雑誌
 - 1) OTakasawa, 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-dimethylhydrazien and 2,6-diaminotoluene, Mutation Research, 2013, 751: 12-18.
 - 2) Yamada, T., Tanaka, Y., Haseggawa, R., Sakuratani, Y., Yamada, J., Kamata, E., Ono, A., Hirose, A., Yamazoem Y., Makenyan, O., Hayashi, M. : A Category approach to predicting the repeated-dose

- hepatotoxicity of allyl esters, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2013, 65: 189-195.
- 3) Sakuratani, Y., H.Q.Zhang, Nishikawa, S., Yamazaki, K., Yamada, T., Yamada, J., Gerova, K., G. Chankov, O. Mekenyan and Hayashi, M. : Hazard Evaluation Support System (HESS) for predicting repeated dose toxicity using toxicological categories, SAR and QSAR in *Environmental Research*, 2013, 1080/1062936X .
 - 4) Ema, M., Masumori, S., Kobayashi, N., Naya, M., Endoh, S., Maru, J., Hosoi, M., Uno, F., Nakajima, M., Hayashi, M. and Nakanishi, J.: In vivo comet assay of multi-walled carbon nanotubes using lung cells of rats intracheally instilled, *J. Appl. Toxicol.*, 2013, 33: 1053-1060.
 - 5) Makoto Hayashi, Masamitsu Honma, Motoko Takahashi, Atsuko Horibe, Jin Tanaka, Mai Tsuchiya, Takeshi Morita : Identification and evaluation of potentially genotoxic agricultural and food-related chemicals, 2013 Food Safety Commission, Cabinet Office, Government of Japan, ONLINE ISSN: 2187-8404, <http://dx.doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2013003>, *Food Safety*, 2013, 1: 3-15.
2. 学会発表
- 1) Makoto Hayashi: JACVAM Comet Validation and OECD Guidelines, International validation of the in vivo comet assay, Workshop on “Scientific and Regulatory Advances in Genetic Toxicology Safety Assessment”, 2013, 52th Society of Toxicology (SOT).
 - 2) Tateno, C., Ishida, Y., Kakuni, M., Fukumuro, M., Tanaka, J., Masumori, S., Nakajima, M., and Hayashi, M. : Establishment of the Comet Assay and Micronucleus Test Using Chimeric PXB-Mice with Humanized Liver, 2013, 52th Society of Toxicology (SOT).
 - 3) Ito, K., Masumori, S., Nakajima, M., Hayashi, M., Sakakibara, H., and Shimoi, K. : Different Micronucleus Inductions of Mice Exposed to N-Ethyl-N-Nitrosourea at Light and Dark dosing Times, 2013, 52th Society of Toxicology (SOT).
 - 4) Yamada, T., Abe, T., Hasegawa, Y., Sakuratani, Y., Yamada, J., Yamashita, T., Yamazoe, Y., O. Mekenyan, Hirose, A., and Hayashi, M. : Development of Hazard Evaluation Support System (HESS) and the Attached Database (HESS DB) for Repeated-Dose Toxicity of Chemical Substances, 2013, 52th Society of Toxicology (SOT).
 - 5) Takashima, R., Hamada, S., Shimada, K., Matsumoto, K., Kawakami, S., Tanaka, J., Matsumoto, H., Nakai, T., Imamura, T., Matsumura, S., Sanada, H., Terashima, Y., Inooue, K., Mutou, S., Hagio, S., Hayashi, A., Takayanagi, T., Ogiwara, Y., Maeda, A., Narumi, K., Wako, Y., Morita, T., Kojima, H., Hayashi, M., and Honma, M. : Evaluation of Repeated dose Liver Micronucleus Assay in Rats: Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS-MMS, 2013, 52th Society of Toxicology (SOT).
 - 6) Makoto Hayashi, Douglas Wolf, Shoji

- Fukushima, Angelo Moretto, Jun Sekizawa, Atsuko Kishimoto, Alan Boobis : Initiate Global Dialogue to Innovate Risk Assessment, 2013, HESI Workshop, Risk Assessment in the 21st Century.
- 7) 伊藤圭一、山口明子、向井大輔、中嶋圓、林 真、榊原啓之、下居香代子 : 時間生物学的視点を考慮した遺伝毒性試験、2013 年、第 40 回日本毒性学会
- 8) 櫻谷裕企、山田隆志、池永裕、山田隼、太田聡、林 真 : 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) I. 運用状況、2013 年、第 40 回日本毒性学会
- 9) 山田隆志、長谷川隆一、櫻谷裕企、山田隼、吉成浩一、山添康、広瀬明彦、林 真 : 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) II. 収載データの解析 : NOEL の分布・発現毒性・カテゴリー化に必要な機序的情報について、2013 年、第 40 回日本毒性学会
- 10) Morita T, Kojima H, Hayashi M: General Principles of Chemical Selection for in vivo Validation Studies, 2013, The XIII International Congress of Toxicology.
- 11) OHamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Matsumoto H, Nakai T, 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, Kawasako K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus, Assay with 22 Chemicals Using Young Adult Rats (III): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 2013, Environmental Mutagenesis and Genomics Society.
- 12) Tanaka, J., Siga, A., Ueda, M., Masumori, S. and Hayashi, M. : Evaluation of Pathological Specimens Obtained From Comet Assay Validation Studies, 2013, 11th International Conference on Environmental Mutagens.
- 13) OHamada S, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Takasawa H, Narumi K, Ohyama W, Wako Y, Kawasako K, Morita T, Kojima H, Hayashi M, Honma M.: Evaluation of Repeated-Dose Liver Micronucleus Assay with 22 Chemicals Using Young Adult Rats, 2013, 11th International Conference on Environmental Mutagens.
- 14) Makoto Hayashi : Scientific opinion on safety testing of a finished product for genotoxicity (clastogenicity), 2013, The 2nd Asia Safety Experts Workshop.
- 15) 林 真 : 化学物質の安全性評価における代替法の役割、2013 年、日本動物実験代替法学会第 26 回大会
- 16) 山田隆志、田中雄四郎、長谷川隆一、櫻谷裕企、山田隼、吉成浩一、山添康、小野敦、広瀬明彦、林 真 : 未試験化学物質の反復投与毒性の予測に有用な in vitro 試験の提案、2013 年、日本動物実験代替法学会第 26 回大会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1 多臓器（肝臓・胃腸管）小核試験共同研究参加機関一覧

	参加機関
1	アステラス製薬
2	アステラスリサーチテクノロジー
3	旭化成ファーマ
4	安評センター
5	第一三共
6	エーザイ
7	食薬センター
8	北興化学工業
9	イナリサーチ
10	花王
11	科研製薬
12	マルホ
13	三菱化学メディエンス
14	田辺三菱製薬
15	日産化学工業
16	近畿大学
17	新日本科学
18	サントリービジネスエキスパート
19	大正製薬
20	帝人ファーマ
21	東レ
22	ヤクルト本社
23	キッセイ薬品工業
24	国立衛研

肝臓小核試験

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

胃腸管小核試験

表 2 反復投与肝臓小核試験物質一覧

#	Chemical	Abbreviation	CAS no.	Chemical class
1	2,4-Diaminotoluene	2,6-DAT	95-80-7	aromatic amine
2	N-Nitrosodiethylamine	DEN	55-18-5	nitroso amine
3	Dimethylnitrosoamine	DMN	62-75-9	nitroso compound
4	N-Nitrosopyrrolidine	NPYR	930-55-2	nitroso compound
5	4,4'-Methylenedianiline	MDA	101-77-9	aniline
6	N-Nitrosodipropylamine	NDPA	621-64-7	nitroso compound
7	2,4-Dinitrotoluene	2,4-DNT	121-14-2	aromatic nitro compound
8	2,6-Dinitrotoluene	2,6-DNT	606-20-2	aromatic nitro compound
9	Quinoline	QUN	91-22-5	heterocyclic compound
10	p-Dimethylaminoazobenzene	DAB	60-11-7	azo compound
11	2-Nitropropane	2-NP	79-46-9	alkyl nitro compound
12	1,2-Dimethyl hydrazine 2HCl	DMH	306-37-6	hydrazine compound
13	Monocrotaline	MCT	315-22-0	alkaloid
14	N-Nitrosomorpholine	NMOR	59-89-2	nitroso compound
15	2-Acetylaminofluorene	2-AAF	53-96-3	aromatic amine
16	C.I.solvent yellow 14	Sudan I	842-07-9	azo compound
17	Thioacetamide	TAA	62-55-5	thioamide
18	Mitomycin C	MMC	50-07-7	quinone and aziridine compound
19	Cyclophosphamide H ₂ O	CP	6055-19-2	bis compound
20	Potassium bromate	KBrO ₃	7758-01-2	inorganic metal compound
21	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine	MNNG	70-25-7	nitroso compound
22	Methyl methanesulfonate	MMS	66-27-3	alkyl sulfonate
23	Kojic acid	KA	501-30-4	ketone compound
24	2,6-Diaminotoluene	2,6-DAT	823-40-5	aromatic amine
25	Crofbate	CFB	637-07-0	chlorophenoxy compound
26	Methapyrilene HCl	MP	135-23-9	ethylene diamine

表3 反復投与肝臓小核試験結果一覧

Chemical	Literature						Present data				
	in vitro		in vivo MN (BM/PB)		Rat carcinogenicity		in vivo MN (liver)		in vivo MN (BM/PB)		
	Ames	CA	Single	4W	Liver	Others	2W	4W	2W	4W	
A-1	2,4-DAT	+	+	-	-	+	mgl	+	+	-	-
	DEN	+	+	-	ND	+	eso, kid, vsc, orc, sto	+	+	-	-
	DMN	+	+	-	ND	+	kid, lun, vsc, tes	+	+	-	-
	NPYR	+	ND	-	ND	+	kid, vsc, tes	+	+	-	-
	MDA	+	+	-	ND	+	thy	+	+	+	-
	NDPA	+	+	-	ND	+	eso, nas	+	+	-	-
	2,4-DNT	+	-	-	ND	+	ski, mgl	+	+	-	-
	2,6-DNT	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
	QUN	+	+	-	ND	+	-	+	+	-	-
	DAB	+	+	-	ND	+	-	+	+	+	+
2-NP	+	+	-	ND	+	-	+	+	-	-	
A-2	DMH	+	+	+	-	+	col	+	+	-	-
	MCT	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
	NMOR	+	+	-	ND	+	vsc	+	ND	-	ND
	2-AAF	+	+	+	+	+	ski	+	+	+	+
	Sudan I	-	-	-	ND	+	-	-	ND	-	ND
	TAA	-	TC	+	ND	+	-	-	-	-	-
B	MMC	+	+	+	-	-	per	+	+	+	+
	CP	+	+	+	-	-	ub, lym, ner	-	ND	+	ND
	KBrO3	+	+	+	-	-	kid, per, thy	-	-	+	+
	MNNG	+	+	+	ND	-	eso, smi, sto	-	-	-	+?
	MMS	+	+	+	+	-	nas, ner	+	-	+	+
	KA	+	E	E	ND	-	thy	-	-	-	-
2,6-DAT	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	CFB	-	+	-	-	+	pan	+	+	-	-
	MP	E	+	ND	ND	+	-	+	ND	-	ND

mgl: mammary gland; eso: esophagus; kid: kidney; vsc: vascular system; orc: oral cavity; sto: stomach; lun: lung; tes: testes; thy: thyroid gland; nas: nasal; ski: skin; col: colon; per: peritoneal cavity; ub: urinary bladder; lym: lymphocyte; ner: nervous system; smi: small intestine; pan: pancreas
E: equivocal, ND: no data, TC: technical compromised

表4 陰性対照における肝臓小核出現頻度

Age	No. of rats	No. of experiments	MNHEPs Mean ± SD (%)	No. of rats Zero MN in 2000 hepatocytes
8W old	205	41	0.06 ± 0.06	79 (39%)
10W old	87	17	0.05 ± 0.05	28 (32%)

表5 陰性対照における肝細胞分裂指数

Age	No. of rats	No. of experiments	M phaseHEPs Mean ± SD (%)	No. of rats Zero M phase in 2000 hepatocytes
8W old	200	40	0.09 ± 0.12	71 (36%)
10W old	87	17	0.0005 ± 0.0599	43 (49%)

表6 反復投与肝臓小核試験における肝の病理組織検査結果

Group A

Chemicals	Dosing period	Dose (mg/kg)	H	S	APM	F	Pob	The other pathological findings	Liver MN	Liver Cacin.
DMN	2W	4	-	+	+	-	-	Cell infiltration	+	-
	4W	2	-	-	-	-	-	Cell infiltration	+	+
NPYR	2W	100	+	+	+	-	+	Cell infiltration	+	-
	4W	50	+	+	+	-	-	Cell infiltration, brown pigment deposition	+	+
MDA	2W	125	+	+	-	-	+	Cell infiltration	+	-
	4W	120	+	+	+	-	+	Cell infiltration	+	+
NDPA	2W	40	+	+	+	-	+	Cell infiltration, vacuolation	+	+
	2W	200	+	-	-	-	-	N	+	-
2,4-DNT	4W	200	+	-	+	-	+	N	+	+
	2W	50	+	+	+	-	+	Cell infiltration, vacuolation	+	-
2,6-DNT	4W	40	+	-	+	+	+	Cell infiltration, vacuolation	+	+
	2W	120	+	+	+	-	-	N	+	-
QUN	4W	60	+	+	+	-	-	N	+	+
	2W	100	+	+	-	-	-	N	+	-
DAB	4W	100	+	-	-	-	-	Brown pigment deposition	+	+
	2W	40	-	-	-	-	-	N	+	-
2-NP	4W	40	+	-	+	+	-	N	+	+

Group A (continued)

Chemicals	Dosing period	Dose (mg/kg)	H	S	APM	F	Pob	The other pathological findings	Liver MN	Liver Cacin.
MCT	2W	1.5	-	-	-	-	-	N	+	-
	4W	15	+	+	-	-	-	Congestion, edema, fibrosis, vacuolation	+	+
NMOR	2W	30	+	+	+	-	+	Cell infiltration	+	+
	2W	240	+	-	-	+	+	N	+	-
2-AAF	4W	120	+	-	-	+	+	Dilatation of bile duct, cell debris	+	+
	2W	600	+	+	-	-	-	N	-	+
TAA	2W	20	-	+	+	-	-	N	-	+
	4W	20	+	+	+	-	-	N	-	+

Group B

Chemicals	Dosing period	Dose (mg/kg)	H	S	APM	F	Pob	The other pathological findings	Liver MN	Liver Cacin.
MMC	2W	1	+	-	-	-	-	N	+	-
	4W	1	+	-	+	-	-	N	+	-
CP	2W	10	-	-	-	-	-	N	-	-
	2W	80	-	-	-	-	-	N	-	-
EBrG3	4W	80	-	-	-	-	-	N	-	-
	2W	25	-	-	-	-	-	Cell infiltration	-	-
MNNG	4W	25	-	+	-	-	-	Cell infiltration	-	-
	2W	50	-	-	-	-	-	N	+	-
MMS	4W	30	-	-	-	-	-	N	-	-
	2W	1000	-	-	-	-	-	N	-	-
KA	4W	500	-	-	-	-	-	N	-	-

Group C

Chemicals	Dosing period	Dose (mg/kg)	H	S	APM	F	Pob	The other pathological findings	Liver MN	Liver Cacin.
CFB	2W	500	+	-	-	-	-	N	+	-
	4W	500⇒400	+	-	-	-	-	N	+	-
MP	2W	100	+	+	+	-	+	Cell infiltration	+	+

H: Hypertrophy, S: Single cell necrosis, APM: Anisokaryosis, Prominent nucleolus, Mitotic figure,

F: Focus of altered hepatocyte, Pob: Proliferation oval cell or bile duct

表7 反復投与胃腸管小核試験結果一覧（14日間・28日間投与）

Chemical (dose range, mg/kg/day)	Results in the tested tissues								Battery		Rat carcino- genicity (main target tissue)	
	Glandular stomach		Colon		Liver		Bone marrow		in vitro			
	14day	28day	14day	28day	14day	28day	14day	28day	Ames	CA		
MNNG (3.125-25)	+	+	-	-	-	-	-	-	Inc.	+ (-59)	+ [-59]	Stomach
NMUT (2.5-10)	/	+	/	-	/	-	/	-	-	+ (-59)	+ [-59]	Stomach
MNU (2.91-11.7)	/	+	/	-	/	-	/	+	+	+ (-59)	+ [-59]	Stomach, colon, etc.
PhIP HCl (25-75)	/	-	/	+	/	-	/	+	+	+ (+59)	+ (+59)	Colon
KBrO ₃ (40-80)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+ (±59)	+ [-59]	Kidney
2AAF (60-240, 30-120)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+ (+59)	+ [±59]	Liver
DMN (1-4, 0.5-2)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+ (+59)	+ (+59)	Liver
Quinoline (30-120, 15-60)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+ (+59)	+ (+59)	Liver
Sudan I (150-600)	-	/	-	/	-	/	+	/	+	+ (+59)	-	Liver

表8 陰性対照における胃腸管小核出現頻度

Tissue	Dosing period (days)	No. of rats	No. of exp.	Age of rats at necropsy	Frequency of MNed cells (%)			
					Mean ± SD		Min. and Max. of individual value	
					(Min. - Max. of exp. mean)			
		Min.	Max.					
Glandular stomach	4	30	6	8w	0.09 ± 0.08 (0.05 - 0.17)		0.00	0.35
	14	30	6	8w	0.07 ± 0.06 (0.02 - 0.12)		0.00	0.25
	28	30	6	10w	0.08 ± 0.06 (0.06 - 0.10)		0.00	0.25
Colon	4	30	6	8w	0.11 ± 0.09 (0.07 - 0.17)		0.00	0.30
	14	30	6	8w	0.08 ± 0.08 (0.01 - 0.14)		0.00	0.25
	28	30	6	10w	0.17 ± 0.12 (0.09 - 0.31)		0.05	0.50

表 9 反復投与胃腸管小核試験における病理組織検査結果

	MNU (2.92 mg/kg)					MNU (5.84 mg/kg)					MNU (11.7 mg/kg)				
	-	+ -	+	++	+++	-	+ -	+	++	+++	-	+ -	+	++	+++
Liver															
Cellular infiltration, portal area	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Stomach															
Karyorrhexis, forestomach	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	3	2	0	0
Karyorrhexis, fundic gland	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	2	2	0
Karyorrhexis, pyloric gland	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	1	3	0
Erosion, forestomach	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Erosion, fundic gland	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Erosion, pyloric gland	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	3	1	1	0	0
Colon															
Karyorrhexis, proximal	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Karyorrhexis, middle	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Rectum															
Karyorrhexis	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
	NMUT (2.5 mg/kg)					NMUT (5 mg/kg)					NMUT (10 mg/kg)				
	-	+ -	+	++	+++	-	+ -	+	++	+++	-	+ -	+	++	+++
Liver															
Cellular infiltration, portal area	2	0	3	0	0	0	1	3	1	0	0	0	4	1	0
Stomach															
Karyorrhexis, forestomach	0	0	5	0	0	0	1	3	1	0	0	1	4	0	0
Karyorrhexis, fundic gland	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0
Karyorrhexis, pyloric gland	0	0	5	0	0	0	0	2	3	0	0	0	2	3	0
Erosion, forestomach	3	0	0	0	2	1	0	0	0	4	0	0	0	0	5
Erosion, fundic gland	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	2	1	1	1	0
Erosion, pyloric gland	1	2	2	0	0	2	1	0	1	1	0	0	0	3	2
Colon															
Karyorrhexis, proximal	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Karyorrhexis, middle	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Rectum															
Karyorrhexis	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
PhIP	PhIP (25 mg/kg)					PhIP (50 mg/kg)					PhIP (75 mg/kg)				
	-	+ -	+	++	+++	-	+ -	+	++	+++	-	+ -	+	++	+++
Liver															
Cellular infiltration, portal area	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Stomach															
Karyorrhexis, forestomach	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Karyorrhexis, fundic gland	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Karyorrhexis, pyloric gland	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Erosion, forestomach	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Erosion, fundic gland	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Erosion, pyloric gland	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Colon															
Karyorrhexis, proximal	0	0	5	0	0	0	2	2	0	0	0	0	5	0	0
Karyorrhexis, middle	0	4	1	0	0	2	1	1	0	0	0	4	1	0	0
Rectum															
Karyorrhexis	3	2	0	0	0	0	4	0	0	0	2	3	0	0	0