

Title	食品リスク分析における総合的遺伝毒性発がん性評価の国際標準化へ向けた研究
Author(s)	小柳, 美穂子
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72185
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士論文

**食品リスク分析における
総合的遺伝毒性発がん性評価の
国際標準化へ向けた研究**

2018年

小柳 美穂子

目 次

略語一覧	3
緒 論	4
本 論	7
<i>alpha</i> -Glycosyl Isoquercitrin (AGIQ) の遺伝毒性の検証	7
第一節 染色体異常を指標とする試験	8
第二節 遺伝子突然変異を指標とする試験	33
結 論	58
総 括	59
謝 辞	62
参考文献	63

略語一覽

AGIQ	; <i>alpha</i> -Glycosyl Isoquercitrin
CGTase	; Cyclodextrin Glucanotransferase
CHO	; Chinese Hamster Ovary
CP	; Cyclophosphamide
DMSO	; Dimethyl Sulfoxide
EMS	; Ethyl Methansulfonate
ENU	; <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea
GLP	; Good Laboratory Practice
LC-MS/MS	; Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry
MMC	; Mitomycin C
MN-RET	; Micronucleated Reticulocyte(s)
OECD	; Organisation for Economic Cooperation and Development
RET	; Reticulocyte(s)
RICC	; Relative Increase in Cell Counts
SEM	; Standard Error of the Mean
TG	; Transgenic
VIN	; Vinblastine

緒 論

食品分野の毒性評価学研究において、トキシコロジストは、信頼性と透明性の高い科学的根拠に基づいて食の安全を守る使命がある。私たちの健康を守るための評価対象は、新規に開発される食品添加物にとどまらず、天然由来とされる既存添加物や化学構造の類似性のみを基に流通している指定添加物の 18 類指定香料約 3,000 物質も含まれる。これらの安全性を確保するための科学的根拠を得るには、利用できる資金や人材・資材、時間が限られることから、*in vitro*、*in vivo* の両観点に基づく毒性評価手法を利用した、合理的かつ論理的な戦略が必要である。とりわけ、発がん性と生殖発生毒性のスクリーニングに位置付けられる遺伝毒性の有無は、細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) や染色体異常試験、小核試験、コメットアッセイなどの、*in vitro* や *in vivo* の試験法を組み合わせる評価される¹⁻⁵。日本では、規制上、食品添加物の安全性評価における遺伝毒性試験の組み合わせは、染色体異常を指標とする *in vitro* 染色体異常試験と *in vivo* 小核試験、および、遺伝子突然変異を指標とする細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) からなる 3 試験が示されている^{4,5} (図 1)。この組み合わせでは、*in vitro* 染色体異常試験における結果が陽性の場合には、その染色体異常誘発性は、同じく染色体異常を指標とする *in vivo* 小核試験で検証することができる。その一方で、Ames 試験陽性の場合には、遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検証できないために遺伝子突然変異誘発性ありと判断されて、1) 当該評価物質の食品添加物開発を断念するか、2) 陰性の結果を期待して長期発がん性試験にチャレンジするか、あるいは、3) *in vivo* 小核試験陰性の Weight of Evidence (証

抛の重みづけ) によって総合評価されてきた。このように Ames 試験陽性は、食品・食品添加物開発に大きな影響を与えており⁶⁻⁹、数億円の費用と約 5 年以上の歳月が必要な発がん性試験を実施する前に、生体内代謝系が鑑みられた *in vivo* 試験法の確立が望まれていた。

そのような中で、遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検証する必要性から試験法の開発が進んだ結果、2011 年に、トランスジェニック動物を供したげっ歯類遺伝子突然変異試験 (TG 試験) が OECD (経済協力開発機構) の試験ガイドラインとして採択された¹⁰。従って、今後の食品添加物の遺伝毒性評価において、従来 of 組合せの中に TG 試験を加えることで、染色体異常のみならず遺伝子突然変異においても、*in vitro*、*in vivo* の両観点からの評価が可能になると期待される (図 1)。しかし、OECD 試験ガイドラインに準拠し、GLP (優良試験所基準) で実施されたデータを基に、TG 試験を組み入れた段階的な国際評価は未だ実施されておらず、評価手順が確立されていないという課題があった。

そこで、本研究では、ケルセチン配糖体 *alpha*-Glycosyl Isoquercitrin (AGIQ) と AGIQ 製造に使用される配糖化酵素 Cycrodextrin Glucanotransferase (CGTase) を用いて GLP で遺伝毒性試験を実施し、*in vitro*、*in vivo* の両観点から合理的な遺伝毒性の評価手順を提示することを試みた。その結果、食品添加物の遺伝毒性評価におけるこれまでの試験の組合せに TG 試験 (遺伝子突然変異を検出可能な *in vivo* 試験) を加え、国際的にも通用し得る「新たな段階的評価手順」を提案できたため、博士論文として纏めた。

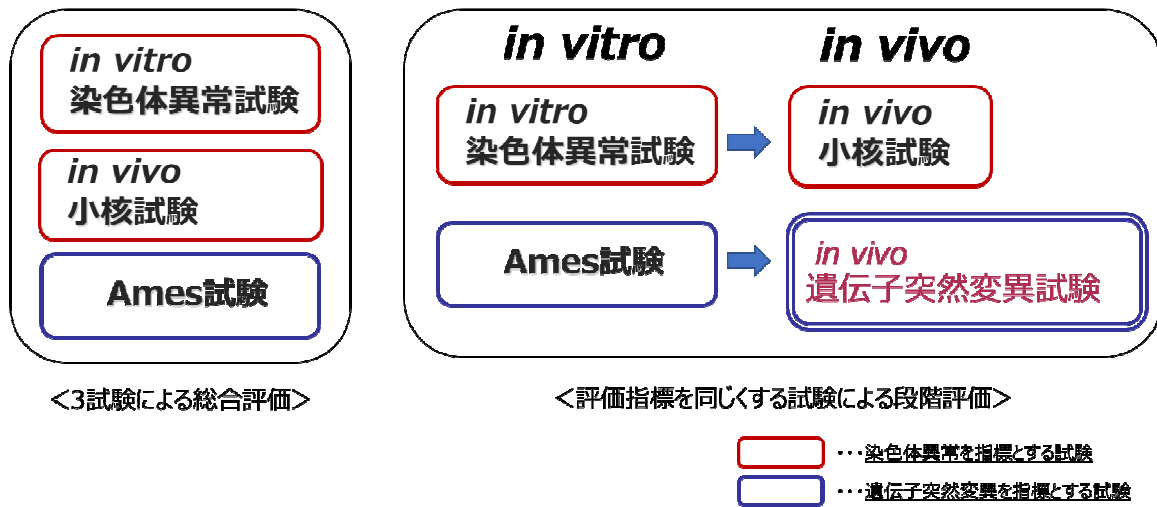


図 1. 遺伝毒性評価のための試験戦略

本 論

alpha-Glycosyl Isoquercitrin (AGIQ) の遺伝毒性の検証

AGIQ は、ケルセチン配糖体イソクエルシトリンを基質として、Cycrodextrin Glucanotransferase (CGTase) によって、イソクエルシトリンの糖部分にグルコースを α -1,4 結合で 0 – 12 個程度配糖化したケルセチン配糖体である(図 2)。

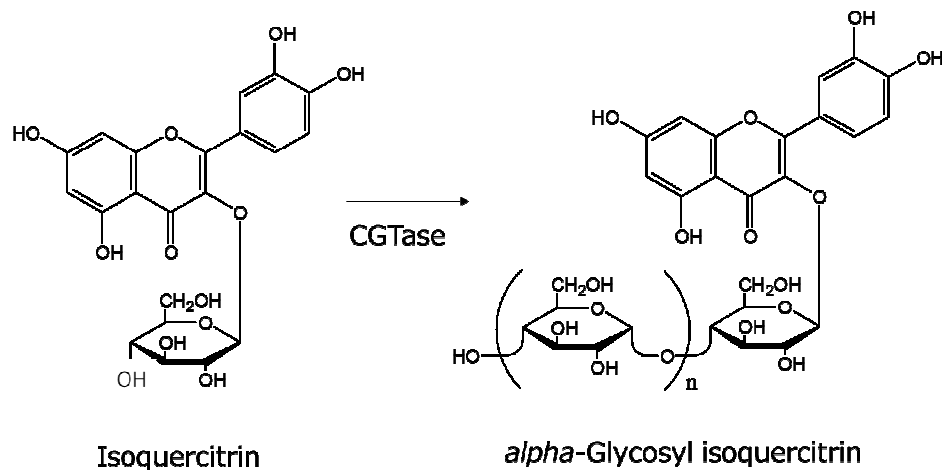


図 2. AGIQ の生成過程

AGIQ の基本骨格のケルセチンは、タマネギやリンゴなどの野菜、果物に配糖体として含まれる抗酸化物質で、慢性炎症に起因する生活習慣病の予防効果が期待されている¹¹⁻¹⁶。しかし、ケルセチンは水に溶けにくいことから飲料に用いるには不向きである。その点、ケルセチンにグルコースが 0 – 12 個程度配糖化している AGIQ はケルセチンやイソクエルシトリンに比べて水溶性が向上しており、食品に応用しやすい。経口摂取された AGIQ は小腸に達した後、イソクエルシトリンやケルセチンとして吸収・代謝されて、結果として、ケルセチンの生体内ばく露量が増えると考えられる¹⁷。一方で、ケルセチンは遺伝毒性¹⁸⁻²⁰や発がん性²¹を有する可能性が指摘されてきたため、AGIQ の経口投与時にはケルセチンの生体内ばく露量増加に伴う毒性影響を十分に評価する必要がある。AGIQ の溶解

性や吸収性向上の詳細なメカニズムはわかっておらず、配糖体の糖の数による水溶性や生体吸収量の違いについては、さらなる検討が期待される。

本研究では、AGIQ の製造に使用される配糖化酵素である CGTase についても遺伝毒性の検証を行った。CGTase は、AGIQ を精製する際に取り除かれるため、最終生成物にはほとんど含まれず、ヒトへの健康影響の懸念は低いと考えられる。しかし、我が国を含め欧米の行政や安全性評価機関は、酵素も食品添加物と位置付けており⁵、AGIQ のみならず同じく既存添加物である CGTase の毒性試験データも必要とされる。我が国で使用されている既存添加物については、行政が安全性を確認したもののみが流通を認められているが、これまでに得られている試験データは non-GLP であった。海外許認可を得るためには GLP による国際的試験ガイドラインに従った GLP での信頼性の高い試験データが必須である。

以上より、本稿では、日本で既存添加物として使用が認められている AGIQ の遺伝毒性の検証を軸に、CGTase の遺伝毒性の検証を加え、1) 染色体異常誘発性（第一節）と、2) 遺伝子突然変異誘発性（第二節）を指標とし、*in vitro* および *in vivo* の遺伝毒性試験を実施した^{22, 23}。最終的に、これらの解析を通じ、遺伝毒性評価における *in vitro*、*in vivo* 試験の段階アプローチの提案を試みた。なお、遺伝毒性試験の実施にあたっては、OECD 試験ガイドライン^{10,24-27} に準拠した。

第一節 染色体異常を指標とする試験

本節では、国内外の規制当局によるリスク管理において汎用され、GLP 試験実施機関での試験実績が豊富な染色体異常試験 (*in vitro*) と小核試験 (*in vitro*、*in vivo*) を用いて、AGIQ および CGTase の染色体異常誘発性の有無を検証した。

第一項 げっ歯類培養細胞を用いた染色体異常試験 (*in vitro* 染色体異常試験)

in vitro 染色体異常試験は、分裂中期の細胞で観察される染色体異常の有無を顕微鏡観察により判定する試験であり、従来から汎用されている試験法²⁸⁻³¹である。本項では、国際的に汎用され、試験施設の実績に基づく背景データが蓄積されているチャイニーズハムスター卵巢由来 CHO-WBL 細胞を用いて、AGIQ による染色体異常誘発性を検討した。

【実験材料および方法】

細胞培養

チャイニーズハムスター卵巢由来 CHO-WBL 細胞 (Merck Research Laboratories, USA) を入手した。培地には、牛胎児血清 (FBS) 10%、2 mM GlutaMAX™、ペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 mg/mL) を含有する McCoy's 5A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。

被験物質

AGIQ (三栄源エフ・エフ・アイ) は、純度 > 97%、黄色粉末である。水に可溶であることから、試験に用いる溶媒として滅菌水を用いた。染色体異常試験の陰性対照は滅菌水とした。陽性対照は、代謝活性化を必要としない染色体異常誘発物質としてマイトマイシン C (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)、代謝活性化を必要とする染色体異常誘発物質としてシクロホスファミド (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を用いた。陽性対照は、OECD 試験ガイドラインで推奨されているもののうち、試験施設の背景データが蓄積されている化学物質を選択した。以降、陽性対照は、各試験に適している感度のよいもので、かつ、背景データを有して

いるものを試験ごとに選択した。

被験物質溶液の調製

AGIQ は、原体を滅菌水に溶解して試験原液（0.5 または 400 mg/mL）を調製し、1–10℃で遮光保存した。使用時に、試験原液を滅菌水で順次希釈して、所定の濃度の被験物質溶液を調製した。細胞に処理する際には、被験物質溶液 0.25 mL を 20 倍希釈で培養液に加えて目的とする処理濃度とした。マイトマイシン C は滅菌水に、シクロホスファミドはジメチルスルホキシド（DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO）に溶解させて、被験物質溶液を調製した。

S9mix の調製

in vitro 試験に用いる細菌やほ乳類培養細胞は、一般にシトクロム P450 を代表とする薬物代謝酵素活性を欠くため、代謝物が遺伝毒性を示す化学物質（例、ベンゾ [a] ピレン）を陽性と判定できない。そのため、代謝物を含めて *in vitro* で被験物質の遺伝毒性を検索する手段として、肝臓ホモジネートの 9000×g 上清（S9）を添加して代謝活性化を行った。本研究で用いた S9（Moltox, Boone, NC）は、酵素誘導剤としてフェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンを投与した Sprague-Dawley 系雄ラット（7 週齢，体重 212～246 g）の肝臓ホモジネートの 9000×g 上清である。試験実施前に、S9（Moltox, Boone, NC）と補酵素 Regensys™ NADPH Regeneration System Reagents（Moltox, Boone, NC）を混合して、S9 10% 含有の S9mix（MgCl₂ 8 mM, KCl 32.6 mM, glucose-6-phosphate 4.7 mM, NADP 4 mM, Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.1 mM）を調製した。

細胞増殖抑制試験（用量設定試験）

5000 µg/mL を最高用量として、CHO-WBL 細胞に AGIQ 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL を処理した。被験物質の CHO-WBL 細胞に対する増殖抑制の指標として、試験開始時と終了時の細胞数を計数し、相対的細胞数増加率 (RICC; Relative Increase in Cell Counts) を次式により算出した。

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{試験終了時の細胞数} - \text{試験開始時の細胞数})}{(\text{溶媒対照群の試験終了時の細胞数} - \text{溶媒対照群の試験開始時の細胞数})} \times 100$$

染色体異常試験 (本試験)

T25 フラスコに CHO-WBL 細胞 0.2×10^6 個/mL を播種し、duplicate で培養した。23 時間後、AGIQ 1250, 2500, 5000 µg/mL、陰性対照 (溶媒)、および陽性対照をそれぞれ処理した。被験物質を 4 時間処理する条件では、ばく露終了後に培地を通常培地に交換し、さらに 20 時間維持培養した。代謝活性化条件では、S9 の培地中の最終濃度が 2% となるように S9mix を添加した。ばく露期間終了後、コルセミド (最終濃度 0.1 µg/mL) を加えて細胞分裂を停止させ、塗抹標本作製してギムザ染色を行った。その後、スライドをコード化し、各濃度あたり 300 個の染色体がよく広がった中期分裂像について顕微鏡観察した。観察結果は、染色体あるいは染色分体のギャップや切断、交換などの染色体異常を分類し、いずれか 1 つ以上構造異常を持つ細胞の個数を記録した。観察した 300 個のうち染色体異常を有する細胞の出現頻度 (Damaged Cells, %) を算出した。

染色体異常試験の試験成立条件

次の 2 つの条件、すなわち、1) 陰性対照群 (溶媒対照群) において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5% を超えないこと、および、2) 陽性対照群において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が統計学的に有意に増加すること、

とした。

染色体異常試験の陽性判定基準

上記の試験成立条件下で、染色体異常を有する細胞の出現頻度が、少なくとも一つの試験濃度で溶媒対照群と比較して統計学的に有意に増加し、かつ、傾向検定により用量依存性の増加が認められる場合に、被験物質は本試験条件下で染色体異常を誘発する（陽性）と判定した。

統計解析

染色体異常を有する細胞の出現頻度については、溶媒対照群と被験物質処理群間、および、溶媒対照群と陽性対照群間において、Fisher's Exact 検定（片側検定）、直線性の傾向検定は Cochran-Armitage 検定を行った。全ての統計解析は Statistical Analysis System Version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC) を使った。

【結果および考察】

細胞増殖抑制試験（用量設定試験）

染色体異常試験における AGIQ の用量を設定するため、細胞増殖抑制試験を実施した。この際、最高用量は、OECD 試験ガイドライン²⁴に基づき 5000 µg/mL として、2 倍希釈系列を設定した。本研究では、細胞周期時間（処理時間）と生体内で代謝活性化されてできる DNA 反応性代謝物の生成可能性を考慮して、3 つの試験条件 [1) 代謝活性化系 (-) / 4 時間処理、2) 代謝活性化系 (+) / 4 時間処理、3) 代謝活性化系 (-) / 20 時間連続処理] で比較解析した。代謝活性化系には、ラットの肝臓から調製した肝代謝酵素 (S9 と称す) に補酵素を加えた S9mix を用いた。長時間 S9mix を添加する群は、S9mix 自身による細胞毒

性の観点から設けていない。以下、代謝活性化系（S9mix）の非添加、添加をそれぞれ‘-S9’、‘+S9’と表す。

細胞増殖抑制の評価の指標には、AGIQ 処理前後の細胞数の増加を陰性対照（溶媒対照）と比較した相対的細胞数増加率（RICC）を用い、RICC が 50%以下の場合に被験物質による細胞増殖抑制がみられる用量であると判定することとした。その結果、すべての試験条件において RICC は 50%を超えており、設定した用量範囲において細胞増殖が著しく抑制されないことを確認した（図 3）。従って、本試験では最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として、AGIQ を段階的（1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に処理することとした。

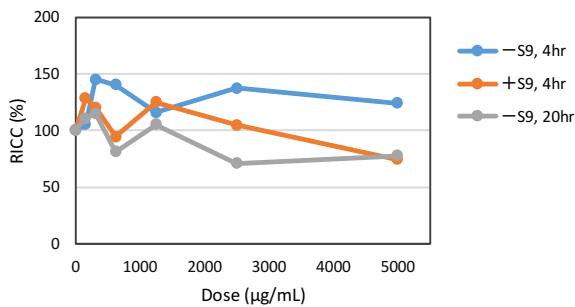


図 3. 細胞増殖抑制試験結果

AGIQ 156~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各用量における CHO-WBL 細胞の相対的細胞数増加率（RICC）を図示した。0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は溶媒対照群である。-S9 で 4 時間処理群を青色、+S9 で 4 時間処理群を赤色、-S9 で 20 時間処理群を灰色で示した。すべての用量において、RICC が 50%を超えていることが確認できる。N = 1。

AGIQ の *in vitro* 染色体異常試験

上述の用量で、AGIQ を CHO-WBL 細胞に添加し、各群の染色体を観察した結果、まず、陰性対照である溶媒対照群（AGIQ 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）では、3 つの試験条件すべてにおいて、染色体異常を有する細胞の出現頻度（Damaged Cells, %）は、0%であった（表 1）。また、マイトマイシン C（MMC 0.15, 0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）またはシクロホスファミド（CP 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を処理した陽性対照群において、染色体異常を有する細胞の出現頻度は、統計学的に有意な増加がみられた（表 1）。本試験における試験成立条件は、1）陰性対照群（溶媒対照群）において、染色体

異常を有する細胞の出現頻度が 5%を超えないこと、および、2) 陽性対照群において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が統計学的に有意に増加することである。従って、本試験は陰性対照群、陽性対照群ともに試験成立条件を満たしており、適切な条件下で試験を行っていることを確認した。さらに、相対的細胞数増加率 (RICC) は、いずれの群においても細胞毒性の指標である 50%を超えており、染色体異常誘発性の判定に影響を与えるような細胞毒性はないと判断した (表 1)。

表 1. AGIQのCHO-WBL細胞を用いた染色体異常試験結果

処理濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RICC (%)	Damaged Cells, %
	平均	平均
-S9, 4時間処理		
0	100	0
1250	92.5	0.3
2500	82.4	0
5000	91.1	0.3
MMC (0.15)	69.7	5.3*
+S9, 4時間処理		
0	100	0
1250	92.1	0
2500	76	0
5000	73.4	0
CP (5)	54.5	40.0*
-S9, 20時間処理		
0	100	0
1250	70.6	0
2500	68.9	0
5000	54.7	0.7
MMC (0.075)	97	4.7*

RICC; Relative Increase in Cell Counts 相対的細胞数増加率

Damaged Cells, % ; 染色体異常を有する細胞の出現頻度

MMC; Mitomycin C CP; Cyclophosphamide

* $p < 0.05$ (Fisher's exact test).

このような試験条件下で、AGIQ 処理群を観察したところ、-S9 で 4 時間処理と、-S9 で 20 時間連続処理のいずれにおいても、染色体異常を有する細胞の出現頻度は全ての用量群で溶媒対照群 (AGIQ 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と比較して用量依存的な

増加はみられなかった。また、+S9 で 4 時間処理においても、染色体異常を有する細胞の出現頻度は、溶媒対照群と比較して用量依存的な増加はみられなかった（表 1）。本試験の陽性判定基準は、染色体異常を有する細胞の出現頻度が、1）溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められることと、2）用量依存的な増加が認められることである。本試験結果をこの基準に照らし合わせたところ、AGIQ 処理群は陽性判定基準を満たしておらず、今回実施した試験条件下において、AGIQ の染色体異常試験は陰性と判定した。*in vitro* 染色体異常試験は、細胞毒性を示すような高い濃度での陽性結果や、あるいは明確な陰性と判断できない結果が得られることが指摘されて問題視されている³²⁻³⁵。その点、本試験結果は、細胞毒性のみられない濃度範囲において明確な陰性の結果が得られ、AGIQ は *in vitro* での染色体異常誘発性はないことが示された。

第二項 ヒト由来培養細胞を用いた小核試験 (*in vitro* 小核試験)

in vitro 小核試験は、分裂間期の細胞で「小核」を検出することにより、被験物質の染色体異常誘発性を検証する試験であり、*in vitro* 染色体異常試験とともに、汎用されている^{36, 37}。本試験では、細胞の分裂機構の異常によって、染色体が切断されたり、紡錘体が阻害されることで生じる小核を解析することで、被験物質による染色体の数的異常と構造異常誘発性の両方を検出することができることから、*in vitro* での染色体異常を包括的に調べるための基盤的試験と位置づけられている²⁵。また、OECD 試験ガイドライン²⁵では、近年、ヒトリンパ芽球由来 TK6 細胞を標準細胞として採用したことから、ヒトへの外挿性を考慮した *in vitro* 試験として有用性が期待できる。

本稿では、ヒトリンパ芽球由来 TK6 細胞を用いた小核試験を実施し、前項のげっ歯類由来の培養細胞を用いた染色体異常試験の陰性結果を詳細に検証した。

【実験材料および方法】

細胞培養

ヒトリンパ芽球由来 TK6 細胞 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) を入手した。培地には、熱非働化ウマ血清 10%、1.0% Pluronic® F-68、0.5% ピルビン酸ナトリウム 2 mM GlutaMAX™、ペニシリン 20 units/mL、ストレプトマイシン 20 µg/mL を添加した RPMI1640 を用い、37℃、6% CO₂ 存在下で培養した。

被験物質

AGIQ は、第一節第一項の *in vitro* 染色体異常試験に用いたものと同じものを

使用した。CGTase 製剤（86.5%のスターチを含む）は、黄みがかった白色の粉末で、水に可溶であることから、溶媒として滅菌水を用いた。陽性対照は、代謝活性化を必要としない染色体異常誘発物質としてビンブラスチン（Acros Organics）、代謝活性化を必要とする染色体異常誘発物質としてシクロホスファミド（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）を用いた。これらの陽性対照は、前項と同様、試験施設の背景データが蓄積されている化学物質を選択した。

被験物質溶液の調製

第一節第一項の *in vitro* 染色体異常試験に準じて、被験物質溶液を調製した。ビンブラスチンとシクロホスファミドはジメチルスルホキシド（DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO）に溶解させて、被験物質溶液を調製した。細胞に処理する際には、被験物質溶液を 20 倍希釈で培養液に加えて目的とする処理濃度とした。

S9mix の調製

第一節第一項の *in vitro* 染色体異常試験における S9mix 調製方法に準じて調製し、培地中の最終濃度が 1% となるように添加した。

***in vitro* 小核試験**

AGIQ を代謝活性化系非添加（-S9）で 4 時間処理、代謝活性化系添加（+S9）で 4 時間処理、および、代謝活性化系非添加（-S9）で 24 時間処理する 3 つの条件を設けた。12 穴プレートに TK6 細胞 2.0×10^5 個/mL を播種し、本試験では triplicate で培養を行った。AGIQ 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、予備試験（用量設定試験）では 39~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （8 用量）を、本試験では AGIQ 156

～5000 µg/mL（6用量）を2倍希釈系列で処理した。CGTaseについては、予備試験では100～6000 µg/mL（8用量）を、本試験では1000～6000 µg/mL（6用量）を処理した。被験物質を4時間ばく露する試験では、ばく露期間終了後に培地交換し、さらに24時間維持培養した後、細胞を採取し、フローサイトメトリーを用いて小核を有する細胞の出現頻度を解析した。24時間連続処理する試験では、ばく露期間終了後に細胞を採取し、フローサイトメトリー解析を行った。

フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析^{38, 39}は、4カラーベンチトップ型フローサイトメーターBD FACSCalibur™（Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA）により、*In Vitro* MicroFlow™ Kit（Litron Laboratories, Rochester, NY）を用いて当該キットの取扱説明書に準じて実施した。20,000個の細胞を散乱光と蛍光（赤色蛍光 Ethidium monoazide、緑色蛍光 SYTOX® Green の2段階染色）を組み合わせて解析し、小核を有する細胞の出現頻度（小核頻度, %）を算出した。

相対的細胞数増加率（RICC）

試験開始時と終了時に TK6 細胞をトリパンブルー染色し、自動計数装置 Cellometer (Nexcelom)を用いて細胞数をカウントした。TK6 細胞の相対的細胞数増加率（RICC; Relative Increase in Cell Counts）は、次式により求めた。

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{試験終了時の細胞数} - \text{試験開始時の細胞数})}{(\text{溶媒対照群の試験終了時の細胞数} - \text{溶媒対照群の試験開始時の細胞数})} \times 100$$

小核試験の試験成立条件

次の2つの条件、1) 陰性対照群 (溶媒対照群) において小核頻度が 2% を超えないこと、2) 陽性対照群において小核頻度が統計学的に有意に増加すること、とした。

小核試験の陽性判定基準

上記の試験成立条件下で、小核を有する細胞の出現頻度 (小核頻度, %) が、1) 少なくとも一つの試験濃度で、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められること、2) 傾向検定により用量依存性の増加が認められること、および、3) いずれも陰性対照の背景データの範囲外であることとし、これらすべてを満たす場合に、被験物質は本試験条件下で小核を誘発する (陽性) と判定した。

統計解析

全ての統計解析は Statistical Analysis System Version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC) を使用した。溶媒対照群の等分散および正規性は、それぞれ Levene's 検定、Shapiro-Wilk 検定を行った。小核を有する細胞の出現頻度については、等分散データは one-way ANOVA で解析し、被験物質投与群と対照群との比較は、Dunnett's 検定を行った。用量依存性は線形回帰モデルを用いて解析した。

【結果および考察】

AGIQ の *in vitro* 小核試験(用量設定試験)

本試験における AGIQ の用量を設定するため 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、2 倍希釈系列で AGIQ 39~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を TK 6 細胞に添加した。これ以上の濃度設定は偽陽性結果が高まることが報告されている^{40, 41} ことから選択しなかった。TK 6 細胞の細胞周期時間 (処理時間) と S9 自身の毒性による影響を考慮し

て、1) -S9 で 4 時間処理、2) +S9 で 4 時間処理、3) -S9 で 24 時間連続処理する 3 つの条件で、相対的細胞数増加率 (RICC) を算出し、細胞毒性を評価した。

その結果、1) -S9 で 4 時間処理群や、2) +S9 で 4 時間処理群では、いずれの処理濃度においても、相対的細胞数増加率は細胞毒性の目安である 50% を上回っていた。そのため、これらの群においては、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量とした。その一方で、3) -S9 で 24 時間連続処理する条件においては、高用量の 2500、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理群で RICC がそれぞれ 39.9、29.9% であり、細胞毒性がみられた (図 4)。

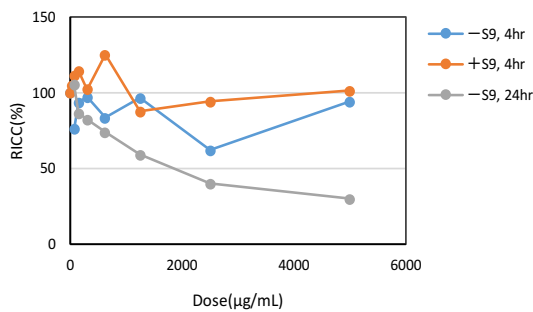


図 4. 用量設定試験結果

AGIQ 39~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各用量における TK6 細胞の相対的細胞数増加率 (RICC) を示した。0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は溶媒対照群である。-S9 で 4 時間処理を青色、+S9 で 4 時間処理を赤色、-S9 で 24 時間処理を灰色で示した。-S9 で 24 時間処理の高用量において RICC が 50% を下回る細胞毒性がみられる。N = 1.

OECD 試験ガイドライン²⁵における細胞毒性に基づく用量設定を行う場合の基準を参考に、-S9 で 24 時間連続処理する条件での用量は、RICC がそれぞれ 39.9、29.9% の細胞毒性がみられた 2500、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含めて、AGIQ を段階的 (156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に処理することとした。

AGIQ の *in vitro* 小核試験

上述の処理条件で、AGIQ を TK6 細胞に添加し、散乱光と蛍光 (赤色蛍光 EMA、緑色蛍光 SYTOX[®] Green) を組み合わせたフローサイトメトリー解析により、小核を有する細胞の出現頻度 (小核頻度, %) を解析した。EMA で染色される死細胞をゲートアウトしたのち、SYTOX[®] Green と散乱光から正常細胞と小核を

持つ細胞を識別することによって、小核頻度を算出した（図 5）。

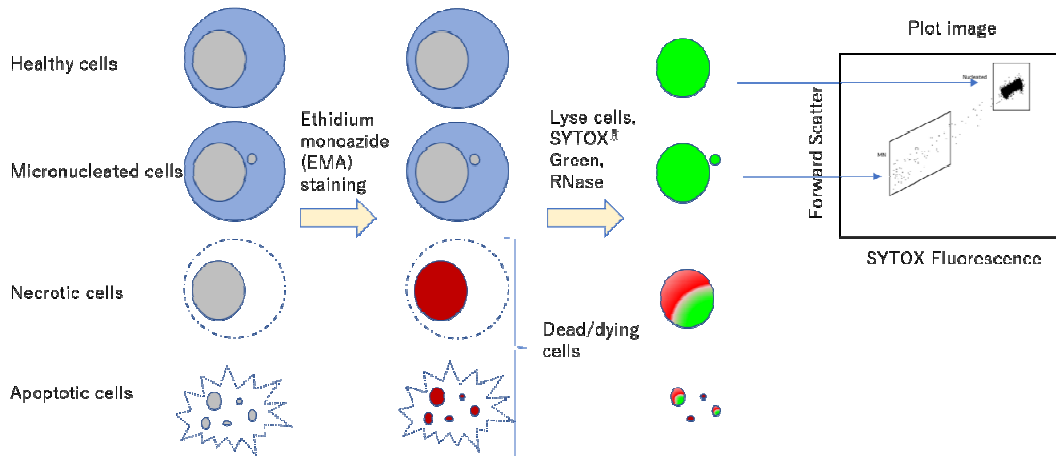


図 5. 培養細胞を用いた小核試験におけるフローサイトメトリーによる小核頻度解析
TK6 細胞に被験物質を処理した後、Ethidium monoazide (EMA) (赤色) と SYTOX[®] Green (緑色) で 2 段階蛍光染色した。EMA 染色される死細胞をゲートアウト (除外) し、SYTOX[®] Green で核・クロマチンを標識した正常細胞と小核細胞を計数し、小核頻度を算出した。

その結果、溶媒対照群 (AGIQ 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) における小核頻度は、-S9 で 4 時間処理、+S9 で 4 時間処理、-S9 で 24 時間連続処理する条件でそれぞれ 0.44、0.53、0.56%であった (表 2)。また、代謝活性化系非存在下 (-S9) でビンブラスチンを、代謝活性化系存在下 (+S9) ではシクロホスファミドを処理した陽性対照群では、それぞれ小核頻度の有意な増加が認められた (表 2)。本試験における試験成立条件は、溶媒対照群で小核頻度が <2% であること、および、陽性対照群で小核頻度が統計学的に有意な増加がみられることと設定される。従って、この試験は試験成立条件を満たしており、適切な条件下で実施されたことを確認した。なお、-S9 で 24 時間処理では、AGIQ 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における相対的細胞数増加率 (RICC) はそれぞれ 35.6, 34.4, 34.4%と、用量設定試験と同様に細胞毒性の再現性がみられたため、これらの用量においては小核頻度の結果の解釈はできなかった。

このような試験条件下で、AGIQ 処理群における小核頻度は、-S9 で 4 時間処理群や+S9 で 4 時間処理群では、溶媒対照群に比べて統計学的に有意な増加はみられなかった。-S9 で 24 時間処理群において、統計学的に有意な小核頻度の用量依存性の増加傾向 (0.56 - 0.84) がみられたが、溶媒対照群に比べると統計学的に有意な増加はみられなかった (表 2)。ここで、試験施設の陰性対照の背景データ (144 例) を参照すると、95%信頼区間は 0.01~1.16 であり、本試験結果は背景データの範囲内であることを確認した。本試験における陽性判定基準は、1) 少なくとも一つの試験濃度で、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められること、2) 用量依存性の増加が観察されること、3) いずれも陰性対照の背景データの範囲外であることである。本試験結果をこの基準に照らし合わせると、AGIQ 処理群における小核頻度はいずれの試験条件においても陽性判定基準を満たしておらず、今回実施した試験条件においては、AGIQ の *in vitro* 小核試験は陰性と判定した。

以上より、前項のげっ歯類由来細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験陰性の結果は、ヒト由来細胞を用いた小核試験においても再現され、これらの試験条件と評価法においては、AGIQ による染色体異常誘発性はないと結論した。

表2. AGIQのTK6細胞を用いた小核試験結果

処理濃度 (μg/mL)	小核頻度 (%)	RICC(%)
- S9, 4時間処理		
DMSO	0.46	100
0	0.44	100
156	0.42	47.3
313	0.36	83.0
625	0.50	83.0
1250	0.51	84.2
2500	0.55	61.7
5000	0.46	45.7
VIN (0.005)	8.22*	11.2
+ S9, 4時間処理		
DMSO	0.59	100
0	0.53	100
156	0.51	76.3
313	0.47	96.3
625	0.56	112.6
1250	0.52	106.1
2500	0.61	100.8
5000	0.65	81.5
CP (3)	2.68*	13.3
- S9, 24時間処理		
DMSO	0.54	100
0	0.56	100
156	0.59	93.1
313	0.58	76.4
625	0.84	52.8
1250	0.77 [†]	35.6
2500	1.23 [†]	34.4
5000	1.51 [†]	34.4
VIN (0.00075)	7.73*	13.8

RICC ; Relative Increase in Cell Counts 相対的細胞数増加率

CP; Cyclophosphamide VIN; Vinblastine

DMSO; Vehicle control for CP and VIN.

* p < 0.05 (t 検定) † p < 0.05 (trend test)

[†]Not analyzed due to excessive cytotoxicity.

CGTase の *in vitro* 小核試験

先述してきたように、AGIQの製造に使用される配糖化酵素であるCGTaseは、AGIQを精製する際に取り除かれるため、最終生成物にはほとんど含まれないが、規制上、酵素も食品添加物と位置付けられており、それらの安全性確保も求められている現状がある。そこで、CGTaseによる染色体異常誘発性を検討するために、異数性誘発性と構造異常誘発性を検出可能な*in vitro*小核試験を実施した。

予備試験において、代謝活性化系非存在下（-S9）あるいは代謝活性化系存在下（+S9）でCGTase 100~6000 µg/mLを4時間処理した結果、いずれも小核試験陰性の結果が得られた。そこで本試験では、処理時間を十分確保するため、-S9ではCGTaseの処理時間を延長し、24時間連続処理をすることとした。+S9では、S9自身に細胞毒性があることから連続処理は行わなかった。また、CGTaseは酵素であることから、力価を考慮した含量補正を加えた6000 µg/mL（溶解限量）を最高用量とした。

以上より、本試験では、TK6細胞にCGTase 1000~6000 µg/mLを、+S9で4時間あるいは-S9で24時間処理し、小核を有する細胞の出現頻度（小核頻度、%）をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、溶媒対照群（CGTase 0 µg/mL）での小核頻度は+S9で4時間処理では0.84%、-S9で24時間処理では0.61%であり、試験成立条件（小核頻度、<2%）を満たしていた。また、陽性対照のシクロホスファミド処理群あるいはビンブラスチン処理群では、いずれも小核頻度の有意な増加が認められた（表3）。従って、本試験は適切な条件下で実施されたことを確認した。

このような試験条件下で、CGTase処理群における小核頻度は、S9の有無に関わらずいずれの処理濃度においても、溶媒対照群に比べて有意な増加はみられなかった（表3）。従って、本試験条件下で、CGTaseのTK6細胞における小核試験は陰性であると結論した。

表3. CGTaseのTK6細胞を用いた小核試験結果

+ S9, 4時間処理		- S9, 24時間処理	
処理濃度(μg/mL)	小核頻度(%)	処理濃度(μg/mL)	小核頻度(%)
0	0.84	0	0.61
1000	0.66	1000	0.66
2000	1.06	2000	0.63
3000	0.83	3000	0.61
4000	0.82	4000	0.66
5000	0.8	5000	0.82
6000	0.89	6000	0.68
Cyclophosphamide (3 μg/mL)	3.53	Vinblastine (0.75 ng/mL)	9.81

第三項 げっ歯類を用いた小核試験 (*in vivo* 小核試験)

in vivo 小核試験は、動物の骨髄あるいは末梢血中に存在する未成熟の幼若赤血球に出現する小核を指標として、被験物質の染色体異常誘発性を評価する試験である⁴²。赤血球の正常な成熟過程では、骨髄赤芽球が幼若赤血球に分化し、末梢血に移行する際に主核が脱核することで、赤血球から核が消失する。その一方で、これらの過程において、染色体が切断されてしまった場合には、動原体を持たない染色体断片となって、小核として取り残される(図6)。そのため、小核を有する幼若赤血球の発生頻度は、被験物質処理による染色体損傷の指標となる。

本項では、AGIQ および CGTase の *in vivo* での染色体異常誘発性を検討するため、マウスの末梢血から採取した赤血球を用いて、小核を有する幼若赤血球の発生頻度をフローサイトメトリーで解析した。

【実験材料および方法】**動物飼育管理**

雌雄各 25 匹の B6C3F1 マウス（8～10 週齢）を Charles River Laboratories（Raleigh, NC）から入手し、温度 22.4-23.6℃、湿度 45.6-71.7%、明暗サイクル 12 時間の動物室で 7 日間以上馴化させた後、試験に用いた。雄は 1 ケージあたり 1 匹、雌は 1 ケージあたり 5 匹のマウスを収容した。馴化期間中、基礎飼料（Certified Purina Pico Chow, Ralston Purina, MO, USA）および水道水を自由摂取させた。その他、動物の飼育管理は、「動物福祉法」（連邦規則集 9CFR 1-4）および「実験動物の扱いおよび使用に関する手引き」（ILAR, 2011）を遵守し適切に管理した。

被験物質

第一節と同様の AGIQ および CGTase を用いた。陽性対照には、メタンサルホン酸エチル（EMS, Ethyl methanesulfonate）（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）を用い、0.9%生理食塩水（Nova-Tech, TX, USA）を媒体として投与原液を調製した。陰性対照はイオン交換水を用いた。

マウス小核試験

2000 mg/kg/day を最高用量として、雌雄各群 5 匹の B6C3F1 マウスに AGIQ あるいは CGTase を 1000, 1500, 2000 mg/kg/day で 3 日間連続強制経口投与した。陽性対照の EMS の用量は、これまでの試験施設の実績に基づき設定した。

体重測定および一般状態観察

動物搬入後 2 日以内と被験物質投与中および終了時に、毎日一般状態（動物ケージの外からの生死確認、外観上の異常や行動異常の有無）を観察し、体重を測定した。投与後 4 時間後にケージの外から状態を観察した。

血液サンプル

CO₂ 吸入後に後大静脈から採血した^{43, 44}。その後すぐに、60~120 μL の血液を抗凝血剤入りの微小遠心管に分注し、確実に均一な懸濁液とするために何度か転倒混和し、固定するまで（6 時間以内）室温で保管した。事前に冷凍しておいた固定液入りの 15 mL チューブを冷凍庫から取り出し、各 180 μL を各チューブに分注し、MicroFlow^{PLUS} Kit (Litron Laboratories, Rochester, NY) の取扱説明書に従って混和した。固定した細胞のチューブはすぐに冷凍庫に戻し、残りのサンプルについても同様の手順を繰り返した。固定した血液サンプルは、フローサイトメトリー解析まで 3 日間、 $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ で保管した。

フローサイトメトリー解析

赤血球のフローサイトメトリー解析は、4 カラーベンチトップ型フローサイトメーターBD FACSCaliburTM (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) により、MicroFlow^{PLUS} Kit (Litron Laboratories, Rochester, NY) を用いて当該キットの取扱説明書に準じて実施した。各末梢血サンプルについて、CD71 陽性の幼若赤血球 20,000 個のうち小核を有する幼若赤血球の出現頻度 (MN-RET, %) を算出した。また、細胞毒性を評価するため、正染性赤血球 (NCE) を測定し、全赤血球あたりの幼若赤血球の割合 (%RET) を算出した。

小核試験の試験成立条件

陽性対照群において、小核を持つ幼若赤血球 (MN-RET) の出現頻度が有意に増加すること、とした。

小核試験の陽性／陰性の判定基準

陰性に対しては、いずれの用量群においても、MN-RET の出現頻度に陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加がみられず、用量依存性がないこと、さらに、全ての結果が陰性対照の背景データの範囲内に収まっていること、と設定した。また、陽性に対しては、少なくとも一つの用量群で陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加があること、用量依存性があること、および陰性対照群の背景データの範囲外であること、と設定した。

統計解析

MN-RET と RET の頻度についての全データは、Statistical Analysis System version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて解析した。等分散は Levene's 検定、正規性は対照データに対して Shapiro-Wilk 検定を用いて評価した。等分散性がなく、正規分布していないデータは、等分散と正規性が分布されるように変換した。等分散データは one-way ANOVA で解析し、被験物質投与群と対照群との比較は、Dunnett's 検定を行った。用量依存性の変化は線形回帰モデルを用いて評価した。陽性対照データは *t* 検定により解析した。

【結果および考察】

AGIQ のマウス小核試験

前項の AGIQ を用いた *in vitro* 染色体異常試験および *in vitro* 小核試験の陰性結果を *in vivo* で検証するため、マウス赤血球を用いた *in vivo* 小核試験を実施した。本試験では、技術的な投与限界量である 2000 mg/kg を最高用量^{26, 45, 46}とし、AGIQ (1000, 1500, 2000 mg/kg) を雌雄各群 5 匹の B6C3F1 マウスに連続 3 日間強制経口投与した。最終投与 3 時間後に末梢血を採取し、フローサイト

メトリーにて小核を持つ幼若赤血球の出現頻度を解析した(図6)。幼若赤血球(網状赤血球)はCD71(トランスフェリン受容体)を発現していることから、幼若赤血球に特異的なCD71 蛍光標識抗体を利用し、小核の有無は Propidium iodide (PI) によって核を染色することで識別した。PI (赤色蛍光) と anti-CD71 – FITC (緑色蛍光) の2次元プロットで、全幼若赤血球 (MN-RET と RET) あたりの、小核を有する幼若赤血球 (MN-RET) の割合を小核頻度とした。

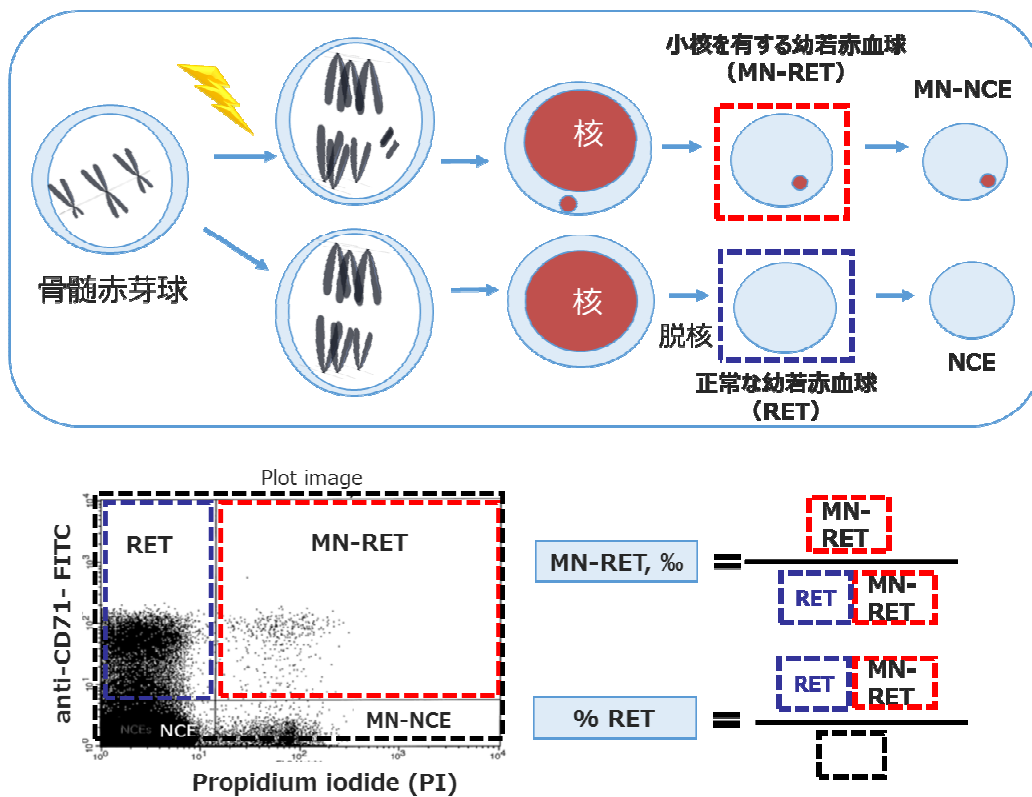


図6. マウス赤血球小核試験におけるフローサイトメトリーによる小核頻度解析
赤血球の成熟過程と小核形成(上図)、および、フローサイトメトリーによる小核頻度解析(下図)を示した。フローサイトメトリー解析では、血液成分のうち赤血球集団にゲートをかけ、Propidium iodide (PI) (赤色蛍光) と anti-CD71 – FITC (緑色蛍光) の2次元プロットで、全幼若赤血球 (MN-RET [赤枠] と RET [青枠]) に対する、小核を有する幼若赤血球(MN-RET [赤枠]) の割合を求めた.%RET ; 全赤血球 [黒枠] あたりの全幼若赤血球 (MN-RET [赤枠] と RET [青枠]) の割合を算出し、骨髄毒性の指標とした。

その結果、Ethyl methansulfonate (EMS) を投与した陽性対照群では、陰性対照群 (AGIQ 0 mg/kg) に比べて、小核を有する幼若赤血球の発生頻度 (MN-RET, %) は有意に高いことが確認された (表4)。また、AGIQ 投与群において、一般状態 (動物ケージの外からの生死確認、外観上の異常や行動異常の有無) や剖検において肉眼的に変化はみられず、試験は適切な条件下で実施されたと判断した。さらに、AGIQ 投与群において、全赤血球あたりの幼若赤血球の割合 (%RET) は、陰性対照群と比較して有意に減少しておらず、小核誘発性の判定に影響を与えるような骨髄毒性はないことを確認した。

このような試験条件下で、AGIQ 投与群における小核を有する幼若赤血球の発生頻度 (MN-RET, %) を解析したところ、雄の 2000 mg/kg 投与群において統計学的に有意な小核頻度の増加がみられたが、用量に相関していなかった。また、雌では、小核頻度が用量に相関して増加する傾向がみられたが、陰性対照群と比較して小核頻度の有意な増加はみられなかった。ここで、試験施設の陰性対照の背景データ (雄 191 例、雌 71 例) (表5) を参照すると、95%信頼区間は雄 1.57~3.73、雌 1.15~3.19 であった。従って、本試験結果は試験施設の背景データの範囲内であったことから、本試験条件における AGIQ のマウス小核試験は陰性と結論した。

表4. AGIQのマウス小核試験結果

Dose (mg/kg)	雄		雌	
	%RET ^a	MN-RET, % ^a	%RET ^a	MN-RET, % ^a
0	1.72±0.10	2.36±0.18	1.54±0.23	2.06±0.21
1000	1.65±0.13	2.52±0.09	1.73±0.25	2.56±0.17
1500	1.74±0.13	2.65±0.29	1.68±0.05	2.81±0.21
2000	1.63±0.06	3.19±0.28†	1.83±0.09	2.80±0.33 [†]
EMS(200)	0.92±0.06	16.27±1.87*	0.88±0.09	25.49.1±1.76*

EMS; Ethyl methansulfonate a. Mean±SEM

*p<0.05 (t-test). †p<0.05 (Dunnett's test). †p<0.05 (trend test).

表5. 試験施設におけるマウス小核試験の陰性対照の背景データ

		MN-RET, % (平均±標準誤差)	95%信頼区間 (平均±2SD)
雄	191	2.65±0.04	1.57–3.73
雌	71	2.17±0.06	1.15–3.19

SD ; Standard Deviation

以上の結果から、AGIQ の染色体異常誘発性がないことは、*in vitro* のみならず *in vivo* においても再現された。

CGTase のマウス小核試験

前項の CGTase を用いた *in vitro* 小核試験の陰性結果を *in vivo* で検証するため、マウス赤血球を用いた *in vivo* 小核試験を実施した。技術的な投与限界用量である 2000 mg/kg を最高用量として、CGTase 1000, 1500, 2000 mg/kg を雌雄各群 5 匹の B6C3F1 マウスに連続 3 日間強制経口投与した。最終投与 3 時間後に末梢血を採取し、フローサイトメトリーで小核を持つ幼若赤血球の出現頻度を解析した。その結果、陽性対照の EMS (150 mg/kg) 群では陰性対照群に比べて、小核を有する幼若赤血球の発生頻度 (MN-RET, %) は有意に高かった (表 6)。また、CGTase 投与群において、全赤血球あたりの幼若赤血球の割合 (% RET) は陰性対照群と比較して有意に減少しておらず、小核誘発性の判定に影響を与えるような骨髄毒性はないことを確認した (表 6)。

このような試験条件下で、CGTase 投与群における小核を有する幼若赤血球の発生頻度 (MN-RET, %) を解析したところ、雌雄ともにすべての用量において、小核を有する幼若赤血球の発生頻度は陰性対照群と比較して有意な増加はみられず、すべて陰性対照の背景データ (表 5) の範囲内であった。従って、本試験条件下で、CGTase のマウス小核試験は陰性と結論した。以上より、*in vitro* における小核試験陰性の結果は *in vivo* においても再現されたことから、CGTase は、*in*

vitro のみならず *in vivo* においても染色体異常を誘発しないことが示された。

表6. CGTaseのマウス小核試験結果

Dose (mg/kg)	雄		雌	
	%RET ^a	MN-RET, % ^a	%RET ^a	MN-RET, % ^a
0	1.5±0.1	2.3±0.2	1.3±0.1	2.4±0.6
1000	1.8±0.2	2.4±0.3	1.3±0.1	2.3±0.4
1500	1.6±0.1	2.5±0.3	1.2±0.1	2.4±0.3
2000	1.7±0.1	2.4±0.2	1.1±0.1	2.1±0.2
EMS(150)	1.1±0.1	10.8±2.4*	0.7±0.1	16.1±0.8*

EMS; Ethyl methansulfonate

a. Mean±SEM

* $p < 0.05$ (*t*-test)

第二節 遺伝子突然変異を指標とする試験

本節では、染色体異常誘発性ととも、被験物質の遺伝毒性を検証するための重要な指標である、遺伝子突然変異誘発性について検証した。

第一項 細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）

細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）は、細菌が生育するのに必要なアミノ酸を自身で合成する生活環に着目した試験である。すなわち、遺伝子操作によって、ヒスチジンなどのアミノ酸が合成できない菌株に、被験物質を添加し、突然変異が生じ、元の野生株と同じように自身でアミノ酸が合成できるようになった際に、最少グルコース寒天培地上で増殖してコロニーが形成される原理を利用している⁴⁷⁻⁵⁰。

本研究では、ヒスチジン要求性のネズミチフス菌株 *S. typhimurium* TA98 株、TA1537 株、TA100 株、TA1535 株、およびトリプトファン要求性の大腸菌株 *E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いて、代謝活性化系非添加（-S9）群と代謝活性化系添加（+S9）群を設け、Ames 試験を行った。これらの菌株の組み合わせは、変異原物質を感度良く検出するため最適な組合せとして、OECD 試験ガイドライン²⁷で推奨されている試験菌株である。

【実験材料および方法】

試験菌株

[AGIQ]

S. typhimurium TA98 株、TA100 株、TA1535 株、TA1537 株（1983 年 9 月 6 日にカリフォルニア大学エイムス教授から分与）、および *E. coli* WP2 *uvrA* 株（1983 年 3 月 16 日に国立衛生試験所（現、国立医薬品食品衛生研究所）から

分与) の 5 菌株を用いた。

[CGTase]

S. typhimurium TA98 株、TA100 株、TA97a 株、TA1537 株、および *E. coli* WP2 *uvrA* pKM101 株 (Moltox から入手) の 5 菌株を用いた。

試験菌株は、超低温フリーザーで -80°C 以下に凍結保存した。試験に際して、各凍結菌株を解凍後、菌株の特性検査を実施して一定の生菌数が得られていることを確認したのち、試験菌液として用いた。

被験物質

第一節第二項で用いた被験物質に準じた。

被験物質溶液の調製

AGIQ は注射用水(日本薬局方注射用水, 大塚製薬工場)に、CGTase は滅菌水に溶解させ、最高用量の被験物質溶液(調製原液 50.0 mg/mL)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の試験液を調製した。試験液は、処理時まで冷蔵、遮光条件下で保存した。使用前に、温浴(設定: 50°C)にて析出を溶解させた。

陽性対照物質

試験菌株の化学物質に対する感受性が異なるため、代謝活性化の存在下あるいは非存在下で使用する菌株毎に最適な陽性対照物質を選択した。試験施設の背景データが蓄積されている化学物質を選択し、確実に陽性結果が得られることを確認した。

[AGIQ]

試験菌株	-S9	+S9
TA1537	9-Aminoacridine	2-Aminoanthracene
TA98	AF-2	2-Aminoanthracene
TA100	AF-2	2-Aminoanthracene
TA1535	NaN ₃	2-Aminoanthracene
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2-Aminoanthracene

AF-2 ; Furylamide

[CGTase]

Strain	-S9	+S9
TA97a	ICR191	2-Aminoanthrazene
TA98	2-Nitrofluorene	2-Aminoanthrazene
TA100	NaN ₃	Benzo(a)pyrene
TA1535	NaN ₃	2-Aminoanthrazene
WP2 <i>uvrA</i> pKM101	4-nitroquinoline- <i>N</i> -oxide	2-Aminoanthrazene

培地

最少グルコース寒天平板培地(プレート); テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業)を使用した。本プレートは、最少グルコース寒天培地 30 mL を無菌的にシャーレに分注した。

アミノ酸添加軟寒天培地(トッパアガー)

0.5 w/v%塩化ナトリウム/0.6 w/v%寒天粉末 (Bacto-agar, BD Diagnostics Systems) の軟寒天を調製した。これに、*S. typhimurium* 用として 0.5 mmol/L L-ヒスチジン/0.5 mmol/L D-ビオチン水溶液、*E. coli* 用として 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を 1/10 加え、トッパアガーとした。

S9mix の調製

AGIQ の Ames 試験では、製造後 6 ヶ月以内のエームス試験用凍結 S9mix (Kikkoman Co., Noda, Japan) を試験に使用した。S9 は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンを投与した Sprague-Dawley 系雄ラ

ット(7週齢, 体重 212~246 g)の肝臓から調製されたものを使用した。CGTaseのAmes試験で用いたS9mixは、第一節第一項の*in vitro*染色体異常試験におけるS9mix調製方法に準じた(10頁参照)。

無菌試験

被験物質調製液ならびにS9mixについては無菌試験を行い、雑菌汚染の有無を確認した。被験物質原液 100 μ L、あるいは、S9mix 500 μ Lにトッパアガー 2 mLを添加し、各2枚のプレート上に注ぎ、37 $^{\circ}$ C、48時間培養した。その結果、いずれにおいても菌の増殖はみられなかった。従って、この条件下では雑菌汚染の懸念はないと判断した。

復帰突然変異試験

試験は、プレインキュベーション法で行った。試験管に溶媒 0.1 mL、被験物質調製液 0.1 mLあるいは陽性対照物質溶液 0.1 mLを入れ、次いで代謝活性化系非存在下(-S9)では 0.1 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を 0.5 mL、代謝活性化系存在下(+S9)ではS9mixを 0.5 mL分注した。さらに、前培養した試験菌液 0.1 mLを加えた後、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪培養した。その後、トッパアガー2 mLを加え、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げ、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株の生育状態を実体顕微鏡で観察し、次いで、復帰変異コロニーをコロニーアナライザーで計数した。プレートは、用量設定試験(予備試験)、本試験ともに各用量3枚を使用した。

本試験での用量設定を行うための予備試験では 5000 μ g/plateを最高用量として、AGIQ 8.19, 20.5, 51.2, 128, 320, 800, 2000, 5000 μ g/plateを設定した。AGIQの本試験では、用量設定試験の結果をもとに、-S9処理および+S9

処理の TA100 株、TA98 株、および TA1537 株においては、最大比活性値を示す可能性のある用量を含めた 7 または 8 用量を設定した。変異原性が認められなかった TA1535 株と WP2uvrA 株については、6 用量を設定した。CGTase は、5000 µg/plate を最高用量として、25, 50, 75, 100, 200, 625, 2000, 5000 µg/plate を処理した。

試験成立条件

次の 2 つの条件、すなわち 1) 陰性対照群の平均復帰変異コロニー数は、背景データの範囲内であること、および、2) 陽性対照群のコロニー数は、陰性対照群のコロニー数の 2 倍を超えること、とした。

陽性判定基準

上記の試験成立条件下で、被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数（平均値）が溶媒対照値の 2 倍以上を示し、用量依存性および結果の再現性が認められること、とした。

比活性

陽性結果が得られた場合、変異原性の強さの相対的比較値として、比活性（mg/plate あたり）を次式により求めた。

$$\text{比活性} = \frac{(\text{当該用量での平均コロニー数}) - (\text{陰性対照でのコロニー数})}{\text{当該用量 (mg/plate)}}$$

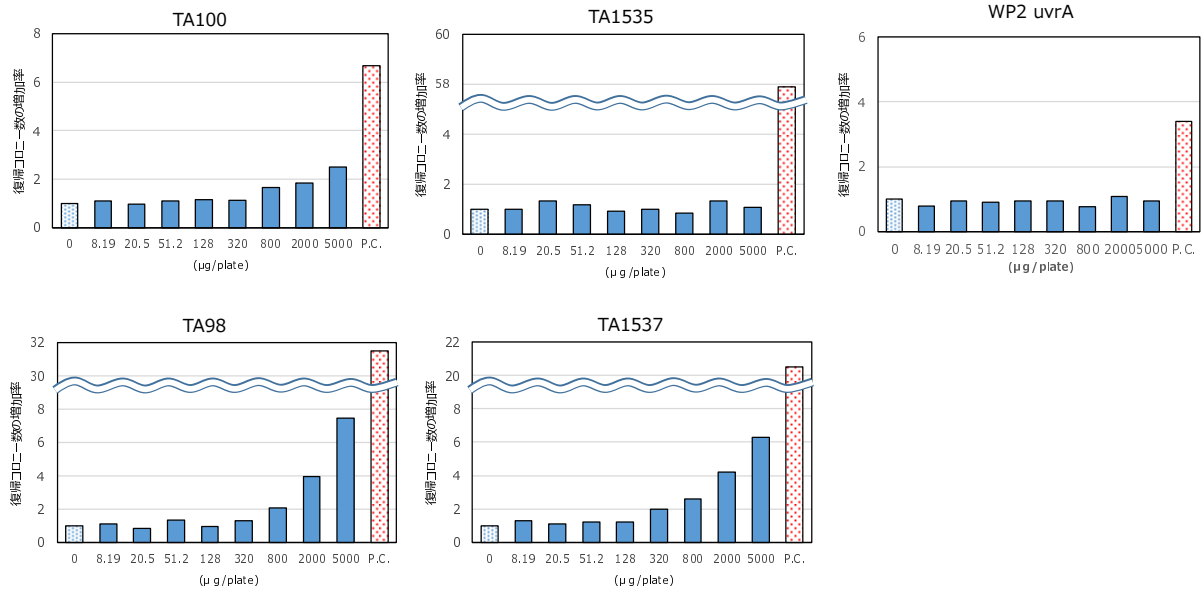
【結果および考察】

AGIQ の Ames 試験（予備試験）

本試験における処理濃度を決定するため 5000 µg/plate を最高用量として、

AGIQ 8.19~5000 µg/plate を処理する Ames 試験（予備試験）を実施した。試験菌株に対する AGIQ の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株の生育状況を実体顕微鏡で観察したところ、いずれの試験菌株においても生育阻害は認められなかった。生育状態を観察した後、コロニー数を計数し解析した結果、AGIQ 処理群では、TA100 株、TA98 株、および TA1537 株において、代謝活性化系非存在下（-S9）と代謝活性化系存在下（+S9）のいずれにおいても、溶媒対照群（AGIQ 0 µg/plate）と比較して復帰変異コロニー数が 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性が認められた（図 7）。そこで、本試験では、上述の予備試験の結果をもとに、生育阻害がみられない 5000 µg/plate を最高用量と設定することとし、変異原性がみられた TA100 株と TA98 株、TA1537 株においては、比活性値（各用量における変異原性強度の相対値、43 頁参照）を示す可能性のある用量を特定するため、予備試験よりも狭い用量段階で 78~5000 µg/plate (TA100 株と TA98 株に対して 7 用量、公比 2) または 39~5000 µg/plate (TA1537 株に対して 8 用量、公比 2) を設定した。変異原性がみられなかった TA1535 株、WP2uvrA 株においては、156~5000 µg/plate (6 用量、公比 2) を設定した。

A)



B)

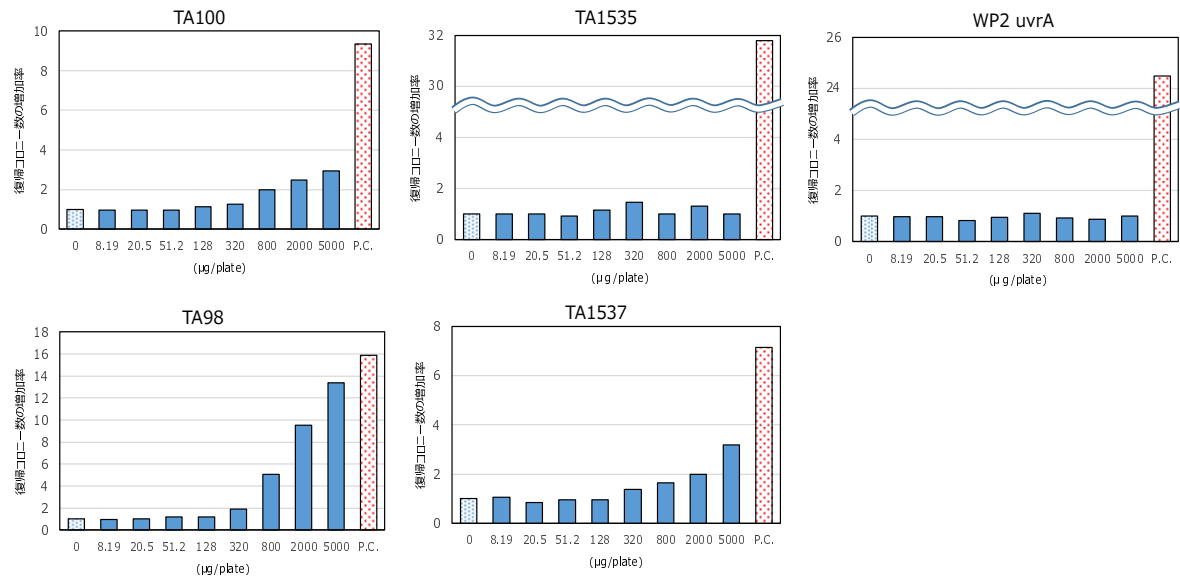


図 7. AGIQ の Ames 試験 (予備試験) 結果

A) S9 非添加、B) S9 添加条件下、TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2*uvrA* における、AGIQ の各用量群または陽性対照群(P.C.; Positive Control)のコロニー数の、溶媒対照群のコロニー数に対する増加率を示した。S9 非添加、S9 添加いずれにおいても、TA100、TA98、TA1537 で、復帰変異コロニー数が溶媒対照の 2 倍以上の増加を示した用量があり、用量依存性の増加がみられる。陽性対照群 ([TA100, -S9] AF-2 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$, [TA98, -S9] AF-2 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$, [TA1535, -S9] NaN_3 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, [TA1537, -S9] 9-Aminoacridine 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$, [WP2 *uvrA*, -S9] AF-2 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$, [TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*, +S9] 2-Aminoanthracene 1.0, 0.5, 2.0, 2.0, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$)では、陽性基準の 2 倍を超える顕著なコロニー数の増加を示した。

AGIQ の Ames 試験 (本試験)

予備試験に基づき Ames 試験を実施した結果、陽性対照群 (34 頁参照) では、すべての試験菌株において溶媒対照群の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が観察された (図 8)。また、溶媒対照群の復帰変異コロニー数は、いずれの試験菌株においても施設の背景データの範囲内であった (表 7)。Ames 試験の試験成立条件は、1) 陰性対照群 (溶媒対照群) の平均復帰変異コロニー数が背景データの範囲内であることと、2) 陽性対照群のコロニー数が陰性対照群 (溶媒対照群) のコロニー数の 2 倍を超えることである。従って、本試験は適切な条件下で実施されたものと判断した。

表 7. 陰性対照の背景データと本試験における復帰コロニー数

試験菌株	S9 mix	例数*	復帰コロニー数 ^a	Range ^a	(A) ^a
TA100	-	192	116.0±13.8	83.8 - 146.2	125±14
	+	178	118.9±15.3	81.8 - 153.7	149±4
TA98	-	197	24.1±5.7	14.4 - 33.8	23±3
	+	178	33.2±5.5	22.2 - 43.9	33±3
TA1535	-	158	13.4±3.3	5.8 - 20.7	18±4
	+	140	12.6±3.0	5.4 - 19.8	12±1
TA1537	-	164	8.5±3.3	1.0 - 15.8	11±3
	+	142	19.4±6.2	5.5 - 32.8	31±2
WP2 <i>uvrA</i>	-	156	27.5±5.6	14.8 - 40.6	31±7
	+	142	29.9±5.9	15.6 - 44.2	38±6

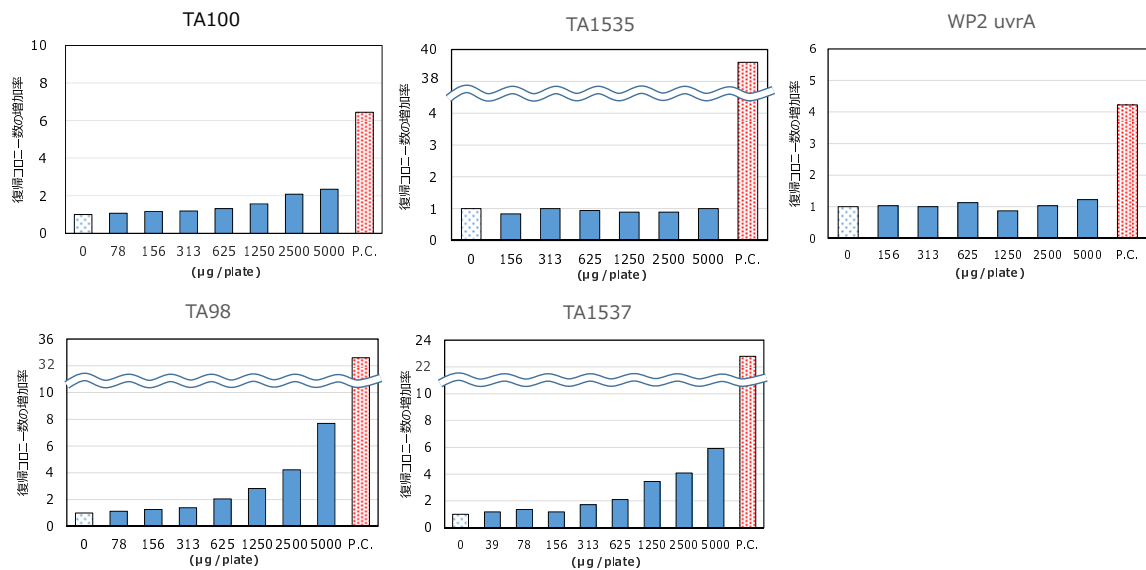
(A) 本試験の溶媒対照群における復帰コロニー数 a. Mean ± SD

* 溶媒対照群 ; 滅菌水, DMSO, 及びアセトンのデータを含む

今回用いた試験菌株は、プラスミド pKM101 を有する高感受性の TA100 株、TA98 株とプラスミドを持たない TA1535 株、TA1537 株が含まれている。-S9 では、高感受性の TA100 株や TA98 株のみならず TA1537 株においても、復帰変異コロニー数が溶媒対照群 (AGIQ 0 µg/plate) の 2 倍以上増加し、その増加には用量依存性が認められた (図 8A)。また、+S9 において、TA100 株、TA98 株と TA1537 株において、復帰変異コロニー数に陰性対照群の 2 倍以上の増加がみられた (図 8B)。本試験の陽性判定基準は、被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数 (平均値) が溶媒対照の 2 倍以上を示し、用量依存性があることである。従って、本試験結果を陽性判定基準に照らし合わせると、AGIQ は今回の試験条件下において、Ames 試験陽性と判定した。

今回、AGIQ に対し Ames 陽性を呈した TA100 株、TA98 株と TA1537 株は、TA100 株が DNA の塩基置換変異を、TA98 株と TA1537 株がフレームシフトを検出する菌株である。これらの菌株は代謝活性化条件の存在下 (+S9) と非存在下 (-S9) の両方で陽性を示し、代謝物を含めて AGIQ の変異原性が示された。

A)



B)

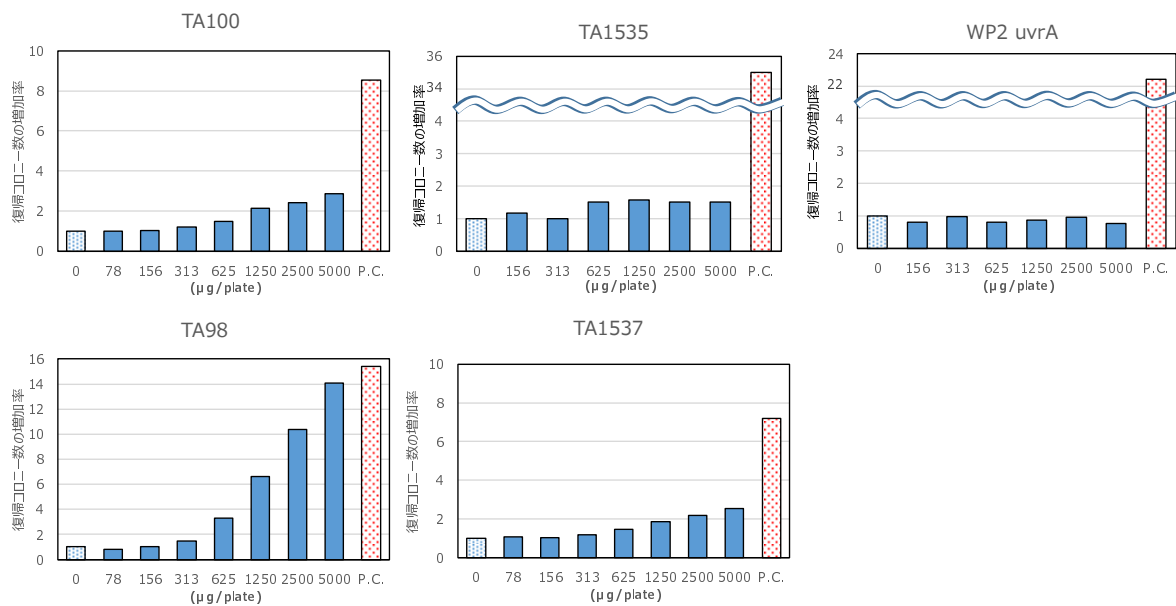


図 8. AGIQ の Ames 試験結果

A) S9 非添加、B) S9 添加条件下、TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 $uvrA$ における、AGIQ の各用量群または陽性対照群(P.C. ; Positive Control)のコロニー数の、溶媒対照群のコロニー数に対する増加率を示した。S9 非添加、S9 添加いずれにおいても、TA100,TA98,TA1537 で、復帰変異コロニー数が溶媒対照の 2 倍以上の増加を示した用量があり、用量依存性の増加がみられる。陽性対照群 ([TA100, -S9] AF-2 0.01µg/plate, [TA98, -S9] AF-2 0.1 µg/plate, [TA1535,-S9]NaN₃ 0.5 µg/plate, [TA1537, -S9] 9-Aminoacridine 80 µg/plate, [WP2 $uvrA$,-S9] AF-2 0.01µg/plate, [TA100,TA98, TA1535,TA1537,WP2 $uvrA$, +S9] 2-Aminoanthracene 1.0, 0.5, 2.0, 2.0, 10 µg/plate)では、陽性基準の 2 倍を超える顕著なコロニー数の増加を示した。

AGIQ は Ames 試験陽性であったので、変異原性強度の相対的比較値として比活性 (mg/plate あたり) を算出した (表 8)。その結果、比活性の最大値は、本試験において +S9、TA98 株の 1250 µg/plate で 148 (mg/plate あたり) であることが示された。比活性値は、日本で化学物質のリスク管理行政において活用されている変異原強度の指標で、1000 を超えた場合に強い変異原性ありと位置付けられる。この基準に照らし合わせると、AGIQ は弱い変異原性物質であることが示された。

表 8 . AGIQ の Ames 試験陽性菌株における比活性の比較

S9mix	陽性の試験菌株	用量 (µg/plate)	比活性* (mg/plate)あたり
-	TA100	2500	54
-	TA98	625	38
-	TA1537	1250	22
+	TA100	1250	135
+	TA98	1250	148
+	TA1537	2500	15

$$* \text{比活性} = \frac{(\text{当該用量での平均コロニー数}) - (\text{陰性対照でのコロニー数})}{\text{当該用量 (mg/plate)}}$$

CGTase の Ames 試験

CGTase の Ames 試験では、CGTase 25～5000 µg/plate を *S. typhimurium* TA97a 株、TA98 株、TA100 株、TA1535 株、および *E. coli* WP2 *uvrA* pKM101 株に、-S9 あるいは +S9 で処理した。これらの試験菌株の組み合わせは、AGIQ の Ames 試験における試験菌株の組み合わせのうち、TA1537 株を TA97a 株（いずれも、フレームシフト変異を検出する菌株）へ、*E. coli* WP2 *uvrA* を *E. coli* WP2 *uvrA* pKM101（いずれも塩基置換を検出する菌株）へと変更したものである。いずれの組み合わせも変異原物質を感度よく検出可能な組み合わせとして、OECD 試験ガイドラインにおいて推奨されており、試験実施機関における背景データが蓄積されているため、本試験に適した組み合わせとして選択した。

その結果、陽性対照（34 頁参照）では、すべての試験菌株において、溶媒対照群に比べて有意な復帰コロニー数の増加がみられており、明確な突然変異誘発作用を示した（図 9 A, 9 B）。また、-S9 あるいは +S9 のいずれの条件においても、最高用量の 5000 µg/plate、一部の菌株では 2000 µg/plate において、overgrowth のためにコロニー数を計数できなかった。そのため、Ames 試験の判定は、overgrowth がみられていない用量範囲で解析した。このような試験条件下で、CGTase 処理群では -S9、+S9 のいずれの条件においても、復帰変異コロニー数に陰性対照群（溶媒対照）の 2 倍以上の増加はみられなかった（図 9 A, 9 B）。従って、CGTase は、今回の試験条件下において、遺伝子突然変異誘発性はない（陰性）と結論した。

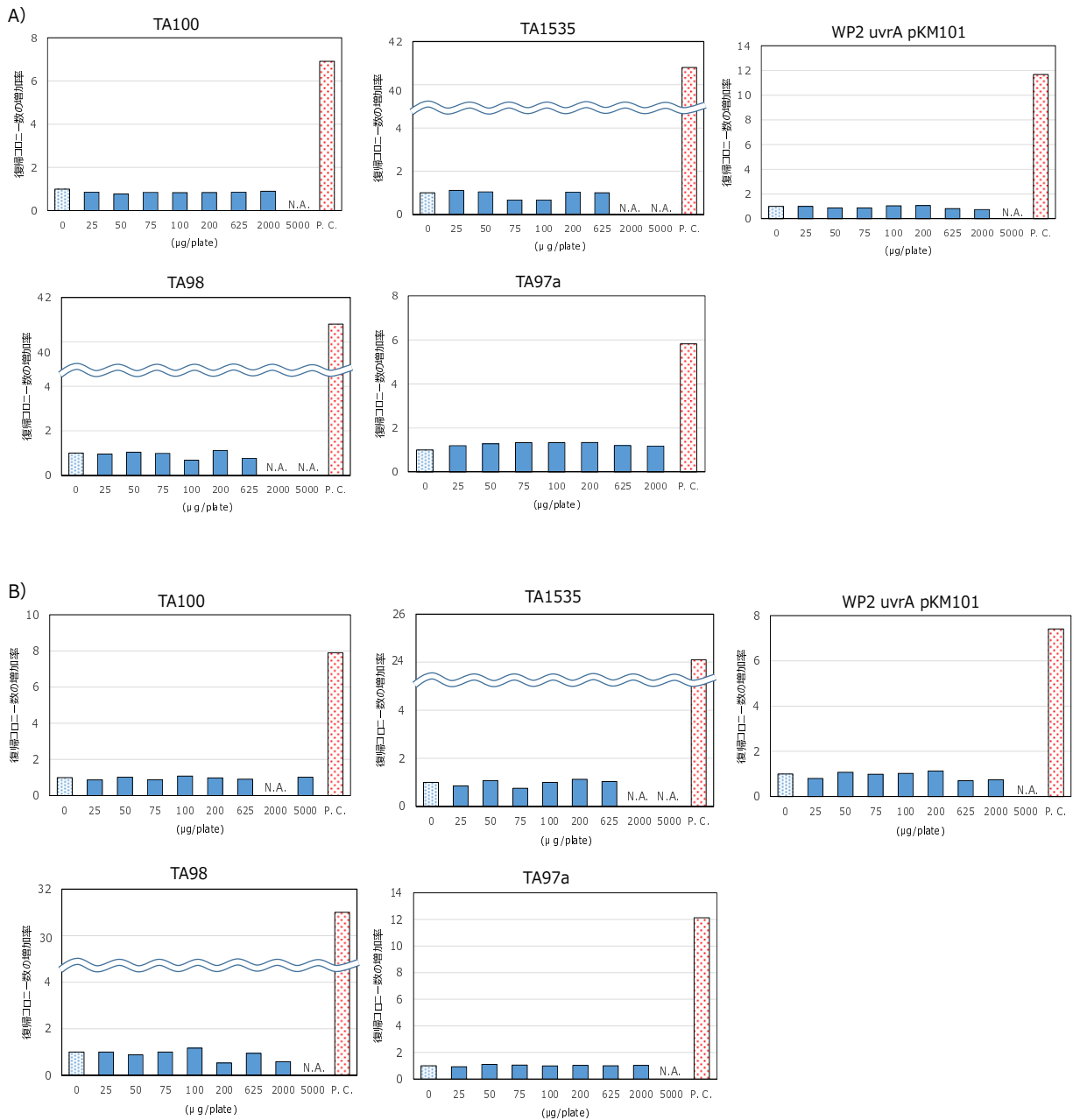


図 9. CGTase の Ames 試験結果

A) S9 非添加、B) S9 添加条件下、TA100, TA98, TA1535, TA97a, WP2uvrA pKM101 における CGTase の各用量群または陽性対照群(P.C.; Positive Control)のコロニー数の、溶媒対照群のコロニー数に対する増加率を示した。N.A.; not analyzable. 陽性対照群 ([TA100, -S9] NaN₃ 1 µg/plate, [TA98, -S9] 2-nitrofluorene 3 µg/plate, [TA1535, -S9] NaN₃ 1 µg/plate, [TA97a, -S9] ICR191 0.25 µg/plate, [WP2uvrA pKM101, -S9] 4-Nitroquinoline-N-oxide 0.25 µg/plate, [TA98, TA1535, TA97a, WP2 uvrA pKM101, +S9] 2-Aminoanthracene 2, 2.5, 2.5, 20 µg/plate, [TA100, +S9] Benzo[a]pyrene 2 µg/plate) では、陽性基準の 2 倍を超える顕著なコロニー数の増加を示した。

第二項 トランスジェニックマウスを用いる遺伝子突然変異試験

これまでの結果から、従来の標準的な組み合わせとして推奨されている各遺伝毒性試験において、CGTase は、染色体異常を指標とする *in vitro* および *in vivo* 試験、および遺伝子突然変異を指標とする *in vitro* 試験（Ames 試験）はいずれも陰性であった。従って、CGTase は、従来の標準的な組み合わせの 3 試験によって遺伝毒性は陰性であると結論付けることが出来る。その一方で、AGIQ については、染色体異常を指標とする試験では *in vitro*、*in vivo* とともに陰性であったのに対し、遺伝子突然変異を指標とする *in vitro* 試験（Ames 試験）では陽性であった。従って、AGIQ は、従来の判断基準にあてると、遺伝毒性の有無を科学的に説明することができないため、1) 開発を断念するか、2) 長期発がん性試験にチャレンジするか、3) *in vivo* 小核試験陰性の Weight of Evidence（証拠の重みづけ）によって総合評価するしかない状況であり、新たな切り口での克服が必要である。そこで本節では、近年、遺伝子突然変異を *in vivo* で評価する方法として、「トランスジェニック動物の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験」（以下、TG 試験）が OECD 試験ガイドライン¹⁰として採択されたことに着目することで、遺伝子突然変異を指標とする *in vitro* 試験（Ames 試験）をフォローアップするための *in vivo* 試験としての有用性を検証し、より精度の高い遺伝毒性試験の組み合わせを検討した。

本節で用いた TG 動物は、MutaTM Mouse（以下、TG マウス）であり、大腸菌 lacZ 遺伝子をレポーターとした λ gt10lacZ ファージベクターがマウスゲノムに導入されている。本試験では、TG マウスに対して、被験物質を一定期間ばく露した後、試験対象の臓器・組織から抽出したゲノム DNA に組み込まれた導入遺伝子を *in vitro* パッケージングによって λ ファージ粒子として回収し、それを宿主の大腸菌に導入することで、突然変異を持ったレポーター遺伝子をファージ・大腸菌の変異体として検出することが可能である。これは、野生型のレポーター遺伝子を持ったファージ・大腸菌は phenyl- β -galactosidase (p-gal) を含む条件下では増幅・生育できないことから、遺伝子突然変異体を p-gal を含む選択培地で変異体プラークとして検出する原理を利用している⁵¹⁻⁵³（図 10）。

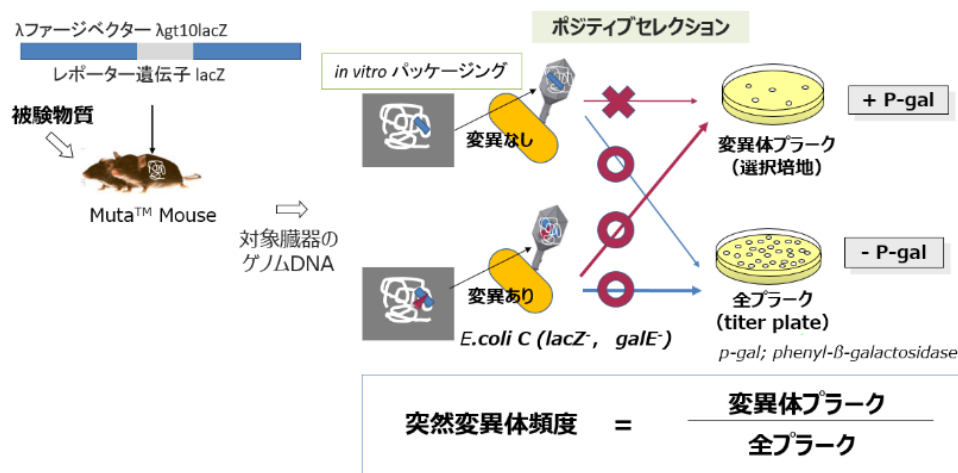


図 10. Muta™ Mouse を用いる遺伝子突然変異試験

【実験材料および方法】

被験物質

AGIQ は、第一節第一項の *in vitro* 染色体異常試験に用いたものと同じものを用いた。陽性対照物質は、試験施設において背景データが蓄積されている *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea (ENU, Toronto Research Chemicals, Inc., Toronto, Canada) を用いた。陰性対照群には、基礎飼料 CRF-1(オリエンタル酵母工業)のみを与えた。

【トキシコキネティクス試験】

雄の Sprague-Dawley 系ラット各群 5 匹に、AGIQ を 250, 500, 750, 1000 mg/kg を単回強制経口投与したのち、0, 1, 3, 6, 12, 24 時間で採血し、ケルセチングルクロニドおよびケルセチンの血漿中濃度を液体クロマトグラフタンデム質量分析 (LC-MS/MS) Applied Biosystems API-3000 (Applied Biosystems, Grand Island, NY) で測定した⁵⁴。検出限界は 20 ng/mL であった。トキシコキネティクスパラメータ (T_{max} ; 最高血中濃度到達時間, C_{max} ; 最高血中濃度, AUC; 血中濃度時間曲線下面積) は、Phoenix WinNonlin® (Pharsight, St. Louis, MO) を用いて解析した。

[Muta™ Mouse を用いる遺伝子突然変異試験]

動物の飼育・管理

試験動物は、9 週齢のトランスジェニックマウス CD₂-LacZ80/HazfBR (Muta™ Mouse) [SPF] (株式会社日本医科学動物資材研究所) を用いた。バリアシステムの動物室で、温度：20～26°C、湿度：35～70%RH、換気回数：12 回以上/時間、明暗サイクル 12 時間の動物室で飼育した。飼育ケージおよび給餌器は、群分け時および週 1 回、給水瓶は 2、3 日に 1 回の頻度で交換した。床敷き中、飼料は放射線滅菌粉末飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業) を、給水は水道水を給水瓶から自由に摂取させた。搬入後、動物の一般状態および体重推移を観察した。一般状態観察は、動物ケージの外からの生死確認、外観上の異常の有無、行動異常の有無を確認した。1 週間動物を検疫・馴化させ、この間一般状態を毎日観察した。体重を、搬入時および検疫・馴化期間終了時に測定し、群分けした。一般状態もしくは体重変化により試験に用いることが不適切と判断した動物は認められなかった。群分け時には、動物を直前に測定した体重によって層別化し、無作為割り付け法により各試験群を構成するように割り付けた。試験に用いた動物の体重範囲は、平均体重±20%以内であった。

用量設定試験

栄養状態に影響しないように配慮し、飼料中の AGIQ 濃度が 5.0%を最高用量とする 4 用量 0.5, 1.5, 3.0, 5.0%を設定した。被験物質の投与経路は、ヒトへのばく露経路を考慮した混餌投与とし、7 日間自由に摂取させた。

・体重測定および一般状態観察

投与期間終了翌日に体重を測定した。投与開始から投与期間終了翌日まで毎日、動物の一般状態を観察した。観察終了後、生存動物は炭酸ガスを用いて速やかに安楽死させた。摂餌量および被験物質摂取量すべての群について、餌重量を投与開始日および投与期間終了翌日に測定した。測定日間の重量差から平均 1 日摂餌量 (g/day) および被験物質摂取量 (mg/kg/day) を算出した。

Muta™ Mouse を用いる遺伝子突然変異試験（本試験）

投与方法、投与期間および発現期間

被験物質の投与経路は混餌投与とし、28 日間自由に摂取させた。陽性対照物質 *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea（ENU）（Toronto Research Chemicals, Inc., Toronto, Canada）は 1 日 1 回、2 日間腹腔内投与とし、投与容量は体重 10 g あたり 0.1 mL で投与開始日の体重に基づいて算出した。

・陰性対照群および被験物質群

28 日間を投与期間、投与期間終了後 3 日間を突然変異の固定期間とし、投与期間終了後 3 日後に臓器を摘出した。

・陽性対照群

陰性対照群および被験物質群の投与開始 3 日および 4 日に投与を行い、最終投与後 10 日に臓器を摘出した。

体重測定および一般状態観察

陰性対照群および被験物質群は、群分け日（投与開始日）、投与開始日から投与終了まで週ごとに、かつ、臓器摘出直前に体重を測定した。陽性対照群については、投与開始日および臓器摘出直前に体重を測定した。

投与期間は 1 日 2 回、突然変異の固定期間は毎日、動物の一般状態を観察した。陽性対照群については、群分け後、投与開始日まで同様に毎日、一般状態を観察した。

摂餌量および被験物質摂取量

陽性対照群を除くすべての群について、給餌器を含めた餌重量を群分け日（投与開始日）、および投与開始日から投与終了まで週ごとに測定した。測定日間の重量差から平均 1 日摂餌量（g/day）および被験物質摂取量（mg/kg/day）を算出した。

臓器の摘出、重量測定、肉眼的観察

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物から肝臓、腎臓、胃および精巣を摘出し、これら臓器の肉眼的観察を行った。肝臓、腎臓および精巣については重量を測定した。また、臓器重量/体重比（相対重量）を算出した [(臓器重量/剖検日の体重) ×100]。

ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに組織破碎用緩衝液（RNase を含む）3 mL を分注し、氷中で冷却しておいた。次に、凍結組織片を入れ、ペッスルを用いてホモジナイズした（組織破碎液）。その後、組織破碎液から常法でゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA 溶液中の DNA 濃度を NanoDrop（AGC TECHNO GLASS）を用いて測定した。DNA 濃度が 100~600 µg/mL 程度の濃度になるように、TE 緩衝液を用いて希釈した。

ゲノム DNA を用いた *in vitro* パッケージング

Transpack（Stratagene, La Jolla, CA）製品に添付の取扱説明書に従ってパッケージングを実施した。

パッケージング溶液のプレーティング

大腸菌懸濁液を総プラーク算出用（タイター用）に 1 mL、突然変異算出用（セレクトション用）に 2 mL、それぞれのチューブに分注しておいた。パッケージング溶液の全量（およそ 700 µL）をセレクトション用チューブに加えた後（およそ 2700 µL になる）攪拌し、室温で 30 分程度放置してファージを大腸菌に感染させた。本溶液 30 µL を 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 270 µL に加えて 10 倍希釈した。本希釈液 30 µL をタイター用チューブに加え攪拌した。タイター用トップアガーの場合は、LB トップアガー 100 容量に対して、1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液 2 容量を加えた。セレクトション用トップアガーの場合は、LB トップアガー 100 容量に対して、P-gal; phenyl β-D-galactoside（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）溶液 2 容量を加えた。タイター用チューブにタイター用トップアガー 17 mL を加え混和し、LB

寒天培地に全量を重層した。セレクション用チューブには、セレクション用トップア
ガー16 mL を加え、タイター用と同様に LB 寒天培地に重層した。各プレート を 37℃
の条件で一晩培養した。1 回のパッケージング操作で総プラーク数が 30 万に達した。

・総プラーク数の算出

タイター用プレートに出現したプラーク数 (N) を計数し、下記の式を用いて総プ
ラーク数を求めた。

$$\text{総プラーク数} = \frac{N \times 300 \mu\text{L} \times 2700 \mu\text{L}}{30 \mu\text{L} \times 30 \mu\text{L}} = 900 \times N$$

・変異プラーク数の算出

セレクション用プレートに出現したプラーク数を計数した。出現したプラーク数を
変異プラーク数とした。

・突然変異体頻度の算出

出現した変異プラーク数を総プラーク数で除して、当該組織での突然変異体頻度を
求めた。

$$\text{突然変異体頻度} = \text{変異プラーク数} / \text{総プラーク数}$$

結果の解析

各被験物質投与群の突然変異体頻度、摂餌量、体重、体重増加量、臓器重量および
臓器重量/体重比について、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散の場合
は、Dunnett の多重比較検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定し、
不等分散の場合は、Steel の検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定
した。陰性対照群と陽性対照群での突然変異体頻度の比較は、最初に F 検定を実施し、
有意差が認められない場合は、Student の *t* 検定を実施した。F 検定で有意差が認め
られる場合は、Aspin-Welch の *t* 検定を実施した。各検定の有意水準は両側 5%とし
た。

試験成立条件

陽性対照群の突然変異頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が1つ以上の対象臓器で認められれば、試験は成立したと判断される。

陽性判定基準

陰性対照群と比較し、被験物質群の突然変異体頻度において統計学的な有意差が認められた場合に、陽性と判定される。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

【結果および考察】

AGIQ のトキシコキネティクス

本試験の実施にあたっては、AGIQ の全身ばく露を支持するデータが前提条件として必要とされている。そこで、まず、AGIQ を経口投与し、その代謝物の血中濃度の経時的变化を解析することで、全身へのばく露を評価した。雄の Sprague-Dawley 系ラット各群5匹に、AGIQ 250, 500, 750, 1000 mg/kg を単回強制経口投与したのち、0, 1, 3, 6, 12, 24 時間で経時的に採血し、血中のケルセチングルクロニドおよびケルセチンを LC-MS/MS で定量した。その結果、ケルセチングルクロニドおよびケルセチンともに、AGIQ のいずれの用量群においても最高血中濃度到達時間 (T_{max}) は1時間であり、3時間以降は徐々に減少した。また、ケルセチングルクロニドの AUC; 血中濃度時間曲線下面積は 750 mg/kg 投与群まで用量依存的に増加し、最高用量 1000 mg/kg では 750 mg/kg 投与時よりも減少した(表 9-A)。ケルセチンの AUC も同様に、750 mg/kg まで用量依存的に増加したが、最高用量では 750 mg/kg 投与時よりも減少した(表 9-B)。従って、AGIQ は経口投与後速やかにグルクロン酸抱合体やケルセチンに代謝されて、24 時間では血中からほぼ消失していることが示された。このことから、AGIQ の代謝物であるケルセチングルクロニドとケルセチンが全身血中で循環していることを確認した⁵⁴ (図 11)。

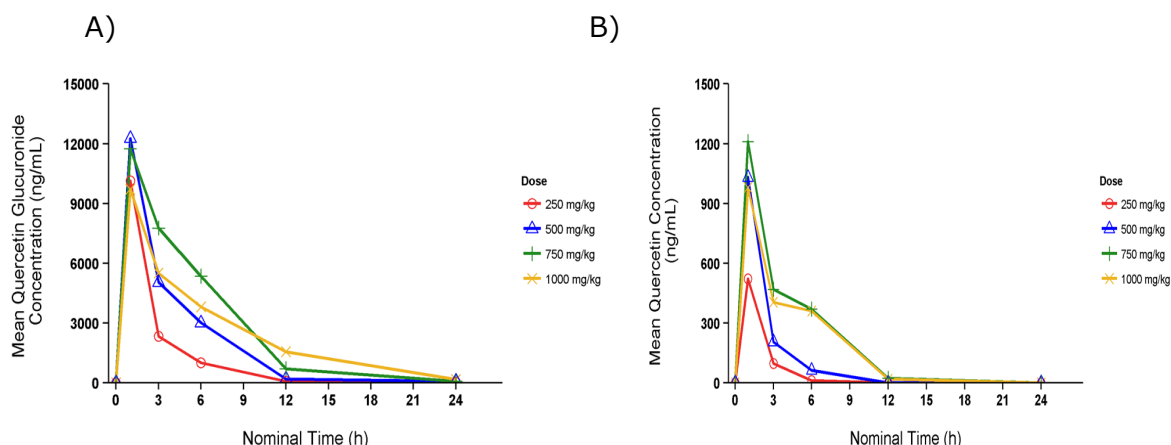


図 11. AGIQ の単回経口投与における代謝物の血中濃度の経時推移

AGIQ 250, 500, 750, 1000 mg/kg 投与後、0, 1, 3, 6, 12, 24 時間におけるケルセチングルクロニド (A) とケルセチン (B) の血中濃度を示した。赤、青、緑、黄色はそれぞれ 250, 500, 750, 1000 mg/kg 投与群を示す。n=5。

表9-A. ケルセチングルクロニドのトキシコキネティクスパラメータ

AGIQ Dose Level (mg/kg)	Median T_{max} (hours)	Mean C_{max} (ng/mL)	Mean AUC (h·ng/mL)
250	1	10100	22400
500	1	12300	41400*
750	1	11800	60500*#
1000	1	9720	53700*#

* Statistically significant compared to 250 mg/kg/day (*t*-test)

Statistically significant compared to 500 mg/kg/day (*t*-test)

T_{max} ; 最高血中濃度到達時間, C_{max} ; 最高血中濃度, AUC; 血中濃度時間曲線下面積。

表9-B. ケルセチンのトキシコキネティクスパラメータ

AGIQ Dose Level (mg/kg)	Median T_{max} (hours)	Mean C_{max} (ng/mL)	Mean AUC (h·ng/mL)
250	1	521	838
500	1	1030	1860
750	1	1210	3970*#
1000	1	987	3260*

* Statistically significant compared to 250 mg/kg/day (*t*-test)

Statistically significant compared to 500 mg/kg/day (*t*-test)

T_{max} ; 最高血中濃度到達時間, C_{max} ; 最高血中濃度, AUC; 血中濃度時間曲線下面積。

TG マウスを用いた遺伝子突然変異試験

AGIQ の全身ばく露が裏付けられたため、TG マウスを用いた遺伝子突然変異試験を実施した。試験に先立って、本試験における用量を設定するため、雄の Muta™ Mouse 各群 3 匹に混餌投与における栄養上の限界用量である飼料中 5.0% を最高用量とし、3.0、1.5 および 0.5% の 4 用量を 7 日間混餌投与し、体重や一般状態、摂餌量および被験物質摂取量から AGIQ 投与による影響を評価した。一般状態観察は、動物ケージの外からの生死確認、外観上の異常の有無、行動異常の有無を確認した。その結果、最高用量の 5.0% 混餌投与群を含む全用量群で、AGIQ 投与によって一般状態の変化、明確な体重増加抑制、摂餌量の減少は認められなかった（表 10）。一方で、AGIQ 0.5 ~ 5.0% 投与群のすべての動物に黄色尿がみられた。しかしこれは、被験物質自体の色調が黄色であることから、被験物質あるいはその代謝由来物が尿中に排泄されたことによるものと推察された。臓器重量／体重比や剖検では腎臓に AGIQ 投与による変化はみられず、黄色着色尿は腎臓への毒性影響とはみなさなかった。

表 10. 用量設定試験における Muta™ Mouse の AGIQ 摂餌量と体重増加量

AGIQ の用量 (%)	AGIQ 平均摂取量 (mg/kg/day)	体重増加量 (g)
0.5	705	1.0±0.4
1.5	1712	0.8±0.2
3.0	4799	1.0±0.3
5.0	7193	0.8±0.3

(n=3)

以上より、本試験では飼料中の AGIQ 5% を最高用量と設定し、雄の Muta™ Mouse 各群 5 匹に 0.5, 1.5, 5.0% を 28 日間混餌投与した。3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいたあと、肝臓、腎臓、腺胃および精巣での遺伝子突然変異体頻度を算出した。解析対象とした臓器は、主要な代謝臓器である肝臓に加え、ケルセチンを用いたラットの毒性試験において標的臓器となっている腎臓²¹、混餌投与で初期に被験物質と接触する腺胃、および生殖細胞への影響を確認するため精巣の 4 臓器を選択した。

その結果、陽性対照の ENU ; *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea (OECD 試験ガイドラインの推奨する陽性対照) 投与によって、肝臓、腺胃および精巣において突然変異体頻度の増

加がみられた。腎臓においては、陽性対照群は陰性対照群と比較して統計学的有意差が認められなかったが、陰性対照群の2倍近い値を示し、試験施設における陽性対照群の背景データ（平均値 120.7、SD=39.4、n=20）と同程度であった。1つ以上の対象臓器で、陽性対照群の突然変異体頻度が陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められたため、試験は成立したと判断した（表 11）。AGIQ 投与群では、体重増加量に陰性対照群に比べて有意な変化はみられなかった（表 12）。さらに、AGIQ の平均摂取量は、0.5、1.5 および 5.0%混餌投与群でそれぞれ、680、2164、6895 mg/kg/day であり、添加濃度にほぼ相関して増加した。本試験では、AGIQ 投与群のいずれの用量においても陰性対照と比較して肝臓、腎臓および精巣の重量および臓器重量／体重比に明確な差は認められなかった（表 12）。剖検時の肉眼的観察では、AGIQ の 0.5%投与群において、腎臓に白色斑点が1例みられたが、用量との関連性がなく偶発的な所見であると判断した。用量設定試験と同様に、AGIQ 投与群のすべてに黄色尿がみられたが、被験物質あるいはその由来物質が尿中に排泄されたことによるものと考えた。以上より、本試験は、適切な試験条件下で実施されたと判断した。

このような試験条件下において、AGIQ 投与群による各対象臓器における突然変異体頻度を解析したところ、いずれの臓器においても陰性対照群と比較して統計学的に有意な突然変異体頻度の増加は認められなかった（表 11）。本試験の陽性判定基準は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な突然変異体頻度が増加することである。従って、AGIQ は、*in vivo* 遺伝子突然変異試験陰性と結論付けた。以上より、*in vitro* でみられた AGIQ による遺伝子突然変異誘発性は、本試験条件下、*in vivo* では再現されないことが明らかになった。

上述のとおり、トキシコキネティクス試験の結果、ケルセチン配糖体である AGIQ は、経口投与後吸収されてケルセチンおよびその代謝物として全身ばく露されることを確認できた。ケルセチンは、NTP（米国国家毒性プログラム）で実施されたラット発がん性試験において腎尿細管上皮腫瘍が報告されている²¹ことから、ケルセチンを基本骨格とする AGIQ の TG 試験において、腎臓における試験結果はとりわけ注目された。そのような中、本試験において、腎臓における遺伝子突然変異体頻度は陰性対

照群と比較して有意な増加はみられず、*in vivo* 遺伝毒性は陰性であった。

表11. AGIQのMuta™ Mouseを用いた遺伝子突然変異試験結果

用量 (w/w%)	突然変異体頻度 ($\times 10^{-6}$) ^a			
	肝臓	腎臓	腺胃	精巣
0	52.6 ± 20.5	55.4 ± 31.3	42.1 ± 4.6	22.7 ± 12.6
0.5	34.4 ± 8.5	54.8 ± 33.5	44.2 ± 15.9	23.1 ± 16.9
1.5	44.0 ± 14.3	40.2 ± 6.6	43.6 ± 9.2	13.4 ± 3.0
5.0	41.1 ± 8.0	35.4 ± 4.0	41.1 ± 8.6	17.3 ± 1.1
ENU	124.3 ± 9.8 ^b	100.4 ± 12.9	441.1 ± 32.6 ^c	48.0 ± 8.6 ^b

陽性対照 ENU ; *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea, 100 mg/kg.

^a 平均 ± 標準誤差.

^b $p \leq 0.05$ (Student's *t*-test) .

^c $p \leq 0.05$ (Aspin-Welch *t*-test) .

陽性対照 : ENU ; *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea 10 mL/kg (100 mg/kg 体重に相当) を 1 日 1 回、
2 日間腹腔内投与後、10 日間の遺伝子発現期間を設けた。

表12. Muta™ MouseのAGIQ平均摂取量、体重増加量、臓器重量/体重比

AGIQ 用量 (%)	AGIQ 平均摂取量 (mg/kg/day)	体重増加量 ^a (g)	臓器重量/体重比		
			肝臓	腎臓	精巣
0	—	1.1±1.4	5.02±0.28	1.53±0.2	0.70±0.08
0.5	680	1.4±0.7	4.96±0.15	1.52±0.09	0.69±0.05
1.5	2164	1.7±1.2	5.08±0.39	1.54±0.22	0.74±0.11
5.0	6895	1.6±0.8	5.26±0.18	1.52±0.09	0.76±0.13
ENU	—	-0.3±0.8	5.03±0.10	1.43±0.12	0.6±0.04

^a Mean ± SD

in vivo 遺伝子突然変異試験に用いられる TG 動物は、Big Blue[®] マウス/ラット、*gpt* delta マウス/ラット、あるいは本研究で用いた Muta™ マウスが開発されている。このうち、Big Blue[®] はエンドポイントの評価手法が煩雑なため、*in vivo* 評価系として積極的に選択されていない。また、*gpt* delta 動物を用いた場合は遺伝毒性判定のエンドポイントが 2 つ (*gpt* アッセイ; 点突然変異検出系と *spi* アッセイ; 欠失変異検出系) あり、相反する結果が得られた場合に行政判断が困難になることが知られている。その点、本研究で用いた Muta™ マウスを用いた遺伝毒性試験は、Ames 試験の結果

が明らかな陰性でなかった場合に適用が期待される *in vivo* 試験系である。

本研究において、Ames 陽性のフォローアップ試験として用いた TG 試験は、1990 年代から一般化学物質を用いて発がん性試験結果と比較したバリデーション試験が実施されてきた⁵⁵。一方、食品添加物については Ames 試験陽性をフォローアップする TG 試験のバリデーション研究は進んでこなかった。そのような中で、本研究は、AGIQ が生体内で「遺伝子突然変異誘発性なし」と明確に示したことで、*in vitro* での遺伝毒性の懸念を払拭した。

結 論

本博士論文では、ケルセチン配糖体 AGIQ および AGIQ 製造用酵素 CGTase の遺伝毒性試験を通じ、以下の知見を得た結果、遺伝毒性評価における *in vitro*、*in vivo* 試験の段階アプローチを総括で提案するに至った。

1. AGIQ は、*in vitro* 染色体異常試験は陰性、かつ、*in vitro*、*in vivo* 小核試験は陰性であることを明らかとし、本試験条件下では、AGIQ に染色体異常誘発性は認められないことを明らかにした。
2. AGIQ は、Ames 試験において陽性であったものの、TG マウスを用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験は陰性であることを明らかにし、本試験条件下では、AGIQ に遺伝子突然変異誘発性は認められないことを示した。
3. CGTase は、*in vitro*、*in vivo* 小核試験は陰性、Ames 試験は陰性であることを明らかとし、本試験条件下では、CGTase に遺伝毒性は認められないことを示した。

これまでは、遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検証できなかったために、*in vitro* での Ames 試験陽性を基に遺伝子突然変異誘発性ありと判断され、1) 当該評価物質の食品添加物開発を断念するか、2) 陰性結果を期待して長期発がん性試験にチャレンジするか、もしくは、3) *in vivo* 小核試験陰性の Weight of Evidence (証拠の重みづけ) によって総合評価するといった判断がされてきた。本博士論文では、Ames 陽性的の場合に、TG 試験でフォローアップにチャレンジすることによって、変異原性を *in vivo* で科学的に検証し開発が継続できる可能性を実証し、これから新たに開発される添加物の精度の高い遺伝毒性評価の道筋を示すとともに、既存の添加物の遺伝毒性の懸念を払拭する道を開いた。

総 括

総合的な遺伝毒性評価のための標準的組合せの新提案

遺伝毒性試験は、ヒトでの発がん性を完全に予測することもできなければ、発がん性を否定することもできない不確実性がある⁵⁶⁻⁵⁸ことは、科学に絶対がないことと同様である。このように、不確実性があるにもかかわらず、遺伝毒性試験は、結果が陽性と出た場合には開発がストップするほどのインパクトを有する。トキシコロジストは、この不確実性を含んだ遺伝毒性試験によって化学物質の‘がん検診’を行なって、開発品の将来を決定しなければならず、必要最低限の試験の組み合わせでシンプルかつ感度の良い方法が望まれている。

そこで本博士論文では、AGIQ をモデルケースに、食品添加物の総合的な遺伝毒性評価のための標準的組合せに「TG 動物を用いる *in vivo* 遺伝子突然変異試験」を加えた段階アプローチを提案した (図 12)。

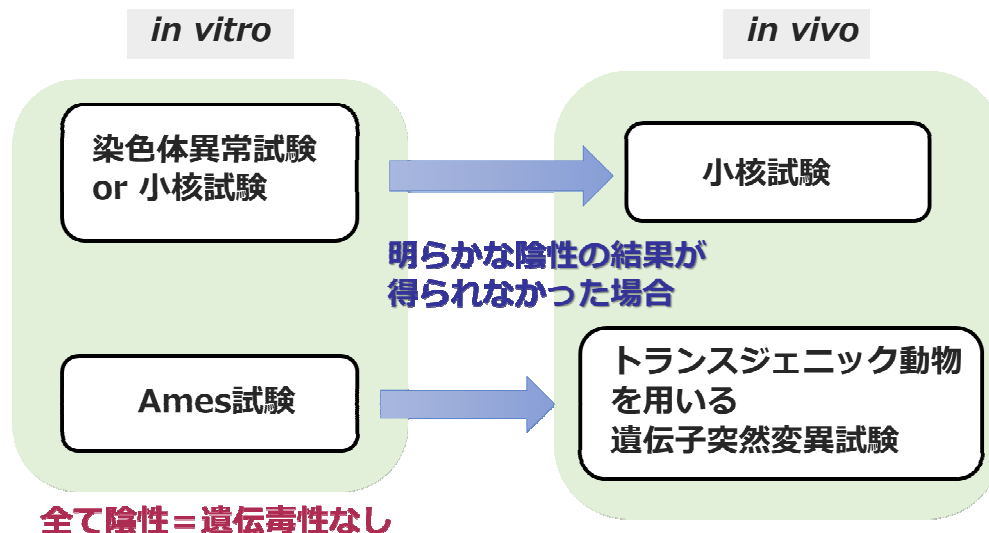


図 12. 総合的な遺伝毒性評価のための標準的組合せの新提案図

最初のアプローチでは、染色体異常を検出可能な試験 (*in vitro* 染色体異常試験または *in vitro* 小核試験)、および、遺伝子突然変異を検出可能な試験 (復帰突然変異

試験‘Ames 試験’)を実施する。染色体異常も突然変異誘発性もどちらも認められなければ、当該試験条件下では、遺伝毒性の懸念はないと判定される。*in vitro* 試験で陰性でなかった場合には、フォローアップの *in vivo* 試験を実施し、総合的な遺伝毒性を判定する。

ここで *in vitro* 試験から始める最大の利点は、迅速かつ簡便に試験を実施できる点にある。前述のとおり、食の安全を守るためのリスク分析において、私たちの健康を守るべき対象となる化学的ハザードは、新規に開発された食品添加物にとどまらず、天然由来とされる既存添加物や化学構造の類似性のみを基に流通している指定添加物 18 類香料約 3,000 物質も含まれる。ヒトへの健康影響を評価するために、その全てを *in vivo* の試験で評価することは現実的ではない。加えて、試験機関において蓄積された背景データの豊富さや動物福祉等を考慮すれば、*in vitro* 試験の実施から始めるのが妥当である。また、各国でのリスク評価の際、試験データの相互受け入れを考慮すると、OECD 試験ガイドラインに従った Ames 試験、ほ乳類培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験あるいはヒト由来培養細胞を用いる *in vitro* 小核試験、そしてげっ歯類赤血球小核試験の有用性が高い。

TG 試験は、遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検証する新たな試験方法として実際の活用が期待されている。しかし、食品添加物の安全性評価においては標準的な組み合わせに加わっておらず、これまで OECD 試験ガイドラインに従って TG 試験を実施した添加物の評価実績がないのが現状である。また、CGTase のように、従来の組み合わせの試験全てで遺伝毒性陰性の既存添加物がある一方で、AGIQ のように Ames 陽性となる既存添加物もあり、より精度の高い遺伝毒性の判定をするためには、*in vivo* 試験での検証が不可欠である。従って、国際的に合意された毒性試験ガイドラインに基づく GLP 試験データが蓄積されることによって、本博士論文で提案する *in vitro*、*in vivo* の段階的アプローチの波及が期待される。

従来、遺伝毒性試験は、発がん性のスクリーニングと位置づけられ、「ある」か「ない」かの定性評価にすぎなかった。しかし、リスク評価には、本来、ばく露量を勘案した定量的観点が必要である。そこで、近年、遺伝毒性と発がん性との相関についての検討に加えて、遺伝毒性の定量的なアプローチが検討されている^{59,60}。このことは、

「変異原性には閾値なし」としてきた遺伝毒性の新たな潮流であり、今後の議論が注目される。今後、食の安全に携わる認定トキシコロジストとして、リスク評価の説明責任を果たしていきたい。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科教授の堤 康央先生に、懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました。ここに衷心より感謝の意を表します。本稿を纏めるにあたり、御指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授の中川 晋作先生、平田 收正先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究成果を纏めるにあたり、終始熱心な御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科准教授の長野 一也先生、同助教の辻野 博文先生、並びに、大阪大学大学院医学研究科特任講師の東阪 和馬先生に心より深謝致します。

本研究を進めるにあたり貴重な御助言を賜りました、Dr. Robert R. MaronpotならびにDr. Cheryl A. Hobbsに心より深く御礼申し上げます。

本研究に多大なるご支援を賜りました三栄源エフ・エフ・アイ株式会社会長兼社長の清水 孝重博士、同副社長の清水 康弘博士、また同常務の井上 健夫博士に厚く御礼申し上げます。

また、本博士論文を纏めるにあたり多大な御協力を賜りました三栄源エフ・エフ・アイ株式会社の望月 温子様、川端 亜弥様、職場の皆様に御礼申し上げます。

最後に、いつも見守ってくださる林 新茂博士に深謝するとともに、どんな時も応援し支えてくれる両親に心より感謝致します。

参考文献

- [1] FAO and WHO. Risk assessment and its role in risk analysis. Environmental health criteria on principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Environmental Health Criteria. 2009; Chapter 2.
- [2] Cimino M. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes, Environmental and Molecular Mutagenesis. 2006a; 47/5: 362-390.
- [3] Cimino M. Erratum to “Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes”. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2006b; 47/9: 746.
- [4] 厚生省. 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について. 衛化第 29 号. 平成 8 年 3 月 22 日 厚生省生活衛生局長通知.
- [5] 内閣府食品安全委員会. 添加物に関する食品健康影響評価指針. 2010.
- [6] Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska-Nikiel B and Lines TC. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. Mutation Research. 2008; 654: 38-44.
- [7] Sekizawa J and Shibamoto T. Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems. Mutation Research. 1982; 101(2):127-40.
- [8] To LP, Hunt TP and Andersen ME. Mutagenicity of trans-anethole, estragole, eugenol, and safrole in the Ames Salmonella typhimurium assay. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 1982; 28(6):647-54.
- [9] Hobbs CA, Taylor SV, Beevers C, Lloyd M, Bowen R, Lillford L, Maronpot R and Hayashi SM. Genotoxicity assessment of the flavouring agent,

- perillaldehyde. *Food and Chemical Toxicology*. 2016; 97: 232-242.
- [10] OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays. TG 488. 2011.
- [11] Kangawa Y, Yoshida T, Abe H, Seto Y, Miyashita T, Nakamura M, Kihara T, Hayashi SM and Shibutani M. Anti-inflammatory effects of the selective phosphodiesterase 3 inhibitor, cilostazol, and antioxidants, enzymatically-modified isoquercitrin and alpha-lipoic acid, reduce dextran sulphate sodium-induced colorectal mucosal injury in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2017a; 69: 179-186.
- [12] Morita R, Shimamoto K, Ishii Y, Kuwata K, Ogawa B, Imaoka M, Hayashi SM, Suzuki K, Shibutani M and Mitsumori K. Suppressive effect of enzymatically modified isoquercitrin on phenobarbital-induced liver tumor promotion in rats. *Archives of Toxicology*. 2011; 85: 1475-1484.
- [13] Nishimura J, Saegusa Y, Dewa Y, Jin M, Kawai M, Kemmochi S, Harada T, Hayashi SM, Shibutani M and Mitsumori K. Antioxidant enzymatically modified isoquercitrin or melatonin supplementation reduces oxidative stress-mediated hepatocellular tumor promotion of oxfendazole in rats. *Archives of Toxicology*. 2010; 84: 143-153.
- [14] Shimada Y, Dewa Y, Ichimura R, Suzuki T, Mizukami S, Hayashi SM, Shibutani M and Mitsumori K. Antioxidant enzymatically modified isoquercitrin suppresses the development of liver preneoplastic lesions in rats induced by beta-naphthoflavone. *Toxicology*. 2010; 268: 213-218.
- [15] Yoshida T, Murayama H, Kawashima M, Nagahara R, Kangawa Y, Mizukami S, Kimura M, Abe H, Hayashi SM and Shibutani M. Apocynin and enzymatically

modified isoquercitrin suppress the expression of a NADPH oxidase subunit p22phox in steatosis-related preneoplastic liver foci of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2017; 69: 9-16.

- [16] Murayama H, Eguchi A, Nakamura M, Kawashima M, Nagahara R, Mizukami S, Kimura M, Makino E, Takahashi N, Ohtsuka R, Koyanagi M, Hayashi SM, Maronpot R, Shibutani M and Yoshida T. Spironolactone in combination with alpha-glycosyl isoquercitrin prevents steatosis-related early hepatocarcinogenesis in rats through the observed NADPH oxidase modulation. *Toxicologic Pathology*. 2018; 46: 530-539.
- [17] Murota K, Matsuda N, Kashino Y, Fujikura Y, Nakamura T, Kato Y, Shimizu R, Okuyama S, Tanaka H, Koda T, Sekido K, and Terao J. *alpha*-Oligoglucosylation of a sugar moiety enhances the bioavailability of quercetin glucosides in humans. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 2010; 501(1): 91-97.
- [18] MacGregor JT and Jurd L. Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*. 1978; 54: 297-309.
- [19] Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45(11):2179-205.
- [20] Engen A, Maeda J, Wozniak DE, Brents CA, Bell JJ, Uesaka M, Aizawa Y and Kato TA. Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides. *Mutation Research*. 2015; 784-785: 15-22.
- [21] National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of

Quercetin (CAS No. 117-39-5) in F344/N Rats (Feed Studies). Technical Report series No.409, 1992.

- [22] Maronpot R, Hobbs CA, Davis J, Swartz C, Boyle M, Koyanagi M and Hayashi SM. Genetic and rat toxicity studies of cyclodextrin glucanotransferase. *Toxicology Reports*. 2016; 3: 381-392.
- [23] Hobbs CA¹, Koyanagi M¹, Swartz C, Davis J, Kasamoto S, Maronpot R, Recio I and Hayashi SM. Comprehensive evaluation of the flavonol anti-oxidants, alpha-glycosyl isoquercitrin and isoquercitrin, for genotoxic potential. *Food and Chemical Toxicology*. 2018; 113: 218-227. * 1 Contributed equally this work.
- [24] OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. TG 473. 2014.
- [25] OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals: *In vitro* Mammalian cell Micronucleus Test. TG 487. 2014.
- [26] OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. TG 474. 2014.
- [27] OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test. TG 471. 1997.
- [28] Evans HJ. "Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London. 1976, 1-29.
- [29] Ishidate M Jr. and Sofuni T. "The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture" in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al. (eds.), Elsevier Science Publishers,

Amsterdam-New York- Oxford. 1985, 427-432.

- [30] Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, Bloom AD, Nakamura F, Ahmed M, Duk S, et al. Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1987; 10/suppl.10, 1-175.
- [31] Galloway SM, Aardema MJ, Ishidate M Jr, Ivett JL, Kirkland DJ, Morita T, Mosesso P and Sofuni T. Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. *Mutation Research*. 1994; 312(3):241-61.
- [32] Morita T, Honma M and Morikawa K. Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*. 2012; 741: 32-56.
- [33] Morita T, Miyajima A, Hatano A and Honma M. Effects of lowering the proposed top-concentration limit in an in vitro chromosomal aberration test on assay sensitivity and on the reduction of the number of false positives. *Mutation Research*. 2014; 769: 34-49.
- [34] Honma M and Morita T. Revision of OECD genotoxicity test guidelines. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*, 2016, 134, 22-32.
- [35] ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use*. 2011, S2(R1).
- [36] Kirsch-Volders, M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*. 1997; 392/1-2: 1-4.

- [37] Parry JM and Sors A. The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*. 1993; 287/1: 3-15.
- [38] Avlasevich SL, Bryce SM, Cairns SE and Dertinger SD. In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 2006; 47: 56-66.
- [39] Bryce SM, Bemis JC, Avlasevich SL and Dertinger SD. In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. *Mutation Research*. 2007; 630: 78-91.
- [40] Fowler P, Smith R, Smith K, Young J, Jeffrey L, Kirkland D, Pfuhler S and Carmichael P. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. II. Importance of accurate toxicity measurement. *Mutation Research*. 2012; 747(1): 104-17.
- [41] Galloway SM. Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2000; 35(3): 191-201.
- [42] Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Blakey DH, Dertinger SD, Abramsson-Zetterberg L, Krishna G, Morita T, Russo A, Asano N, Suzuki H, Ohyama W, Gibson D. In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and*

Environmental Mutagenesis. 2007; 627/1: 10-30.

- [43] Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for Euthanasia of Experimental Animals: Part 1. Laboratory Animals. 1996; 30: 293-316.
- [44] Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth, E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W., Flecknell P., Gregory N., Hackbarth H, Morton D., and Warwick, C.. Recommendations for Euthanasia of Experimental Animals. Part 2. Laboratory Animals. 1997; 31: 1-32.
- [45] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Redbook 2000: IV.C.1.d.
- [46] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. 2009., M3(R2).
- [47] Ames BN, McCann J and Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research. 1975; 31: 347-364.
- [48] Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, Melcion C, Nohmi T, Ohta T, Venitt S, et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. Mutation Research. 1994; 312: 217-233.
- [49] Maron DM and Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research. 1983, 113: 173-215.
- [50] Mortelmans K and Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome

- mutagenicity assay. *Mutation Research*. 2000; 455: 29-60.
- [51] Hoorn AJ, Custer LL, Myhr BC, Brusick D, Gossen J and Vijg J. Detection of chemical mutagens using Muta® Mouse: a transgenic mouse model. *Mutagenesis*. 1993; 8(1): 7-10.
- [52] Jan Gossen and Jan Vijg. Transgenic mice as model systems for studying gene mutations in vivo. *Trend in Genetics*. 1993; 9, 1: 27-31.
- [53] Dean SW and Myhr B. Measurement of gene mutation in vivo using Muta™ Mouse and positive selection for LacZ- phage. *Mutagenesis*. 1994; 9(3): 183-185.
- [54] Nyska A, Hayashi SM, Koyanagi M, Davis J, Jokinen M, Ramot Y and Maronpot R. Ninety-day toxicity and single-dose toxicokinetics study of alpha-glycosyl isoquercitrin in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2016; 97: 354-366.
- [55] Morita T, Hamada S, Masumura K, Wakata A, Maniwa J, Takasawa H, Yasunaga K, Hashizume T and Honma M. Evaluation of the sensitivity and specificity of in vivo erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. 2016; 802: 1-29.
- [56] Kirkland D, Aardema M, Henderson L and Müller L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research*. 2005; 4; 584(1-2): 1-256.
- [57] Kirkland D and Speit G. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III.

Appropriate follow-up testing in vivo. *Mutation Research*. 2008; 654(2): 114-132.

[58] Bemis JC, Wills JW, Bryce SM, Torous DK, Dertinger SD and Slob W. Comparison of in vitro and in vivo clastogenic potency based on benchmark dose analysis of flow cytometric micronucleus data. *Mutagenesis*. 2016; 31(3): 277-85.

[59] Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM). Quantitative approaches to the assessment of genotoxicity data. 2018.