

## ハトムギエキス（CRD仕様：賦型剤無）のマウスを用いた小核試験

### **【方法】**

#### 1、試験材料

株式会社 CRD 仕様で作成されたハトムギ分解エキス（賦型剤無し）を被験物質として使用した。陽性対照としてシクロホスファミド水和物（和光純薬工業株式会社製）を使用した。

#### 2、動物

日本チャールズ・リバー株式会社で生産された ICR 雄性マウス（9 週齢）を 1 週間以上予備飼育し、健康な動物を 10 週齢で使用した。オートクレーブで滅菌したホワイトフレーク（日本チャールズ・リバー株式会社製）を入れた樹脂製ケージに動物を 5 匹ずつ収容し、設定温度 24℃、明暗サイクル 12 時間の飼育室で、マウス・ラット・ハムスター用固型飼料 CRF-1（日本チャールズ・リバー株式会社製）と水道水を自由摂取条件で飼育した。

#### 3、動物の群分け

動物を陰性対照群（蒸留水を投与）、ハトムギ分解エキス 500 mg/kg 投与群、1000 mg/kg 投与群、2000 mg/kg 投与群および陽性対照群（シクロホスファミドを 100 mg/kg 投与）に群分けした。各群の個体数はそれぞれ 5 匹とし、群分けは無作為に行った。

#### 4、検体の調整および投与

被験物質の所要量を正確に測定し蒸留水に溶解し検体とした。検体をマウス体重 kg あたり 10 mL 投与した。胃ゾンデを用いて検体を 24 時間間隔で 2 回経口投与した。陰性対照群には蒸留水を上記と同様の方法で経口投与した。陽性対照群には採血の 24 時間前にシクロホスファミドを 1 回経口投与した。

#### 5、採血および染色

最終投与の 24 時間後にエーテル麻酔下で心臓から全身血を採取した。その際抗凝固剤としてヘパリンを使用した。血液の染色には小核の検出キットである

gTOX Flow (ベックマン・コールター株式会社製) を用いて操作法通りに行った。

## 6、赤血球および小核含有赤血球の計数

BD FACSCalibur フローサイトメーター (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製) を使用して、赤血球および小核含有赤血球の計数を下記の通りに実施した。すなわち、FSC および SSC により赤血球集団をゲートし、CD71 抗体および Propidium Iodide により成熟赤血球と幼若赤血球および小核含有赤血球と小核を含有しない赤血球に分離した (Fig.)。そして、幼若赤血球に占める小核含有幼若赤血球の割合 (以下、小核出現頻度) を算出した。また、被験物質が標的細胞を曝露した証拠を得るために、細胞毒性の指標として赤血球に占める幼若赤血球の割合を算出した。赤血球の計数は 1 個体あたりの幼若赤血球数が 2000 個以上になるように行った。

## 7、有意差検定

小核出現頻度について陰性対照に対する t 検定を実施し、片側検定で有意確率が 0.025 以下の場合を有意差ありとした。なお、小核出現頻度が陰性対照よりも低かった場合は検定を実施しなかった。

赤血球に占める幼若赤血球の割合について陰性対照に対する t 検定を実施し、片側検定で有意確率が 0.025 以下の場合を有意差ありとした。なお、赤血球に占める幼若赤血球の割合が陰性対照よりも大きかった場合は検定を実施しなかった。

統計処理には KaleidaGraph を使用し、両側検定の有意確率を半分にした値を片側検定の有意確率とした。

### 【結果】

いずれの被験物質投与群においても小核出現頻度は陰性対照と比較して有意に高い値ではなかった。また、被験物質の投与濃度依存的に小核出現頻度が高くなることもなかった。一方、陽性対照は陰性対照と比較して小核出現頻度が有意に高い値であった (Table)。

いずれの被験物質投与群においても赤血球に占める幼若赤血球の割合が陰性対照と比較して有意に低い値ではなかった (Table)。

### 【考察】

小核試験を実施した結果、ハトムギ分解エキス (賦型無し) は小核誘発作用を示さないと考えられた。

小核試験において小核を誘発すると判断するためには、被験物質の濃度依存的に小核出現頻度が高くなること、または被験物質のいずれかの濃度投与群で小核出現頻度が明らかに高くなることが認められることが必要である (Hayashi et al., 2000)。しかし、本試験下においてはハトムギ分解エキスが小核を誘導すると判断するための上記のような結果は得られなかった。

赤血球に占める幼若赤血球の割合はいずれの被験物質投与群においても陰性対照と比較して有意に低くなることはなかった。この結果からハトムギ分解エキスの細胞毒性が非常に低いと考えられたが、ハトムギ分解エキスが標的細胞を十分に暴露した証拠は得られなかった。しかし、最高容量を 2000 mg/kg とし て試験を実施していることから十分に評価に耐え得る結果であると考えられた。

#### 【参考文献】

Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A. and Sutou, S. (2000); In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. □. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35, pp. 234-252.

Table

Percent PCE and incidence of MNPCE in peripheral blood of mice orally administered adlay extract

| Group               | Animal No. | Cell Counts |         |       | PCE/<br>(PCE+NCE) | MNPCE/<br>PCE | p-value<br>for MNPCE*** |
|---------------------|------------|-------------|---------|-------|-------------------|---------------|-------------------------|
|                     |            | PCE         | NCE**** | MNPCE |                   |               |                         |
| Negative control    | 1          | 3155        | 105106  | 10    | 2.91%             | 0.32%         |                         |
|                     | 2          | 3103        | 148060  | 7     | 2.05%             | 0.23%         |                         |
|                     | 3          | 3088        | 114443  | 4     | 2.63%             | 0.13%         |                         |
|                     | 4          | 3202        | 98686   | 4     | 3.14%             | 0.12%         |                         |
|                     | 5          | 2854        | 155587  | 4     | 1.80%             | 0.14%         |                         |
|                     | Mean       |             |         |       | 2.51%             | 0.19%         |                         |
|                     | S. E.      |             |         |       | 0.23%             | 0.03%         |                         |
| Test (500 mg/kg)    | 1          | 3300        | 393961  | 5     | 0.83%             | 0.15%         |                         |
|                     | 2          | 2826        | 129606  | 6     | 2.13%             | 0.21%         |                         |
|                     | 3          | 2668        | 168003  | 4     | 1.56%             | 0.15%         |                         |
|                     | 4          | 3979        | 115275  | 5     | 3.34%             | 0.13%         |                         |
|                     | 5          | 2327        | 168856  | 8     | 1.36%             | 0.34%         |                         |
|                     | Mean       |             |         |       | 1.84%             | 0.20%         | 0.4347                  |
|                     | S. E.      |             |         |       | 0.38%             | 0.04%         |                         |
| Test (1000 mg/kg)   | 1          | 2881        | 141272  | 5     | 2.00%             | 0.17%         |                         |
|                     | 2          | 4414        | 112599  | 3     | 3.77%             | 0.07%         |                         |
|                     | 3          | 2397        | 173106  | 1     | 1.37%             | 0.04%         |                         |
|                     | 4          | 2298        | 120773  | 3     | 1.87%             | 0.13%         |                         |
|                     | 5          | 2859        | 114696  | 5     | 2.43%             | 0.17%         |                         |
|                     | Mean       |             |         |       | 2.29%             | 0.12%         | *                       |
|                     | S. E.      |             |         |       | 0.37%             | 0.02%         |                         |
| Test (2000 mg/kg)   | 1          | 2619        | 69843   | 3     | 3.61%             | 0.11%         |                         |
|                     | 2          | 2941        | 348188  | 5     | 0.84%             | 0.17%         |                         |
|                     | 3          | 3624        | 100807  | 3     | 3.47%             | 0.08%         |                         |
|                     | 4          | 3251        | 106675  | 4     | 2.96%             | 0.12%         |                         |
|                     | 5          | 2659        | 109137  | 5     | 2.38%             | 0.19%         |                         |
|                     | Mean       |             |         |       | 2.65%             | 0.14%         | *                       |
|                     | S. E.      |             |         |       | 0.45%             | 0.02%         |                         |
| Positive control ** | 1          | 2717        | 130511  | 63    | 2.04%             | 2.32%         |                         |
|                     | 2          | 2332        | 123121  | 57    | 1.86%             | 2.44%         |                         |
|                     | 3          | 3864        | 237556  | 75    | 1.60%             | 1.94%         |                         |
|                     | 4          | 3947        | 261083  | 55    | 1.49%             | 1.39%         |                         |
|                     | 5          | 2448        | 82216   | 43    | 2.89%             | 1.76%         |                         |
|                     | Mean       |             |         |       | 1.98%             | 1.97%         | 0.0003                  |
|                     | S. E.      |             |         |       | 0.22%             | 0.17%         |                         |

\* Since mean value of treatment group was lower than or equal to negative control, the t-test was not done.

\*\* Cyclophosphamide was used as positive control and was dosed 100 mg/kg by oral gavage.

\*\*\* The results are considered statistically significant if the p-value is less than or equal to 0.025.

\*\*\*\* PCE is the acronym for "polychromatic erythrocyte", NCE is the acronym for "normochromatic erythrocyte" and MNPCE is the acronym for "micronucleated polychromatic erythrocyte".

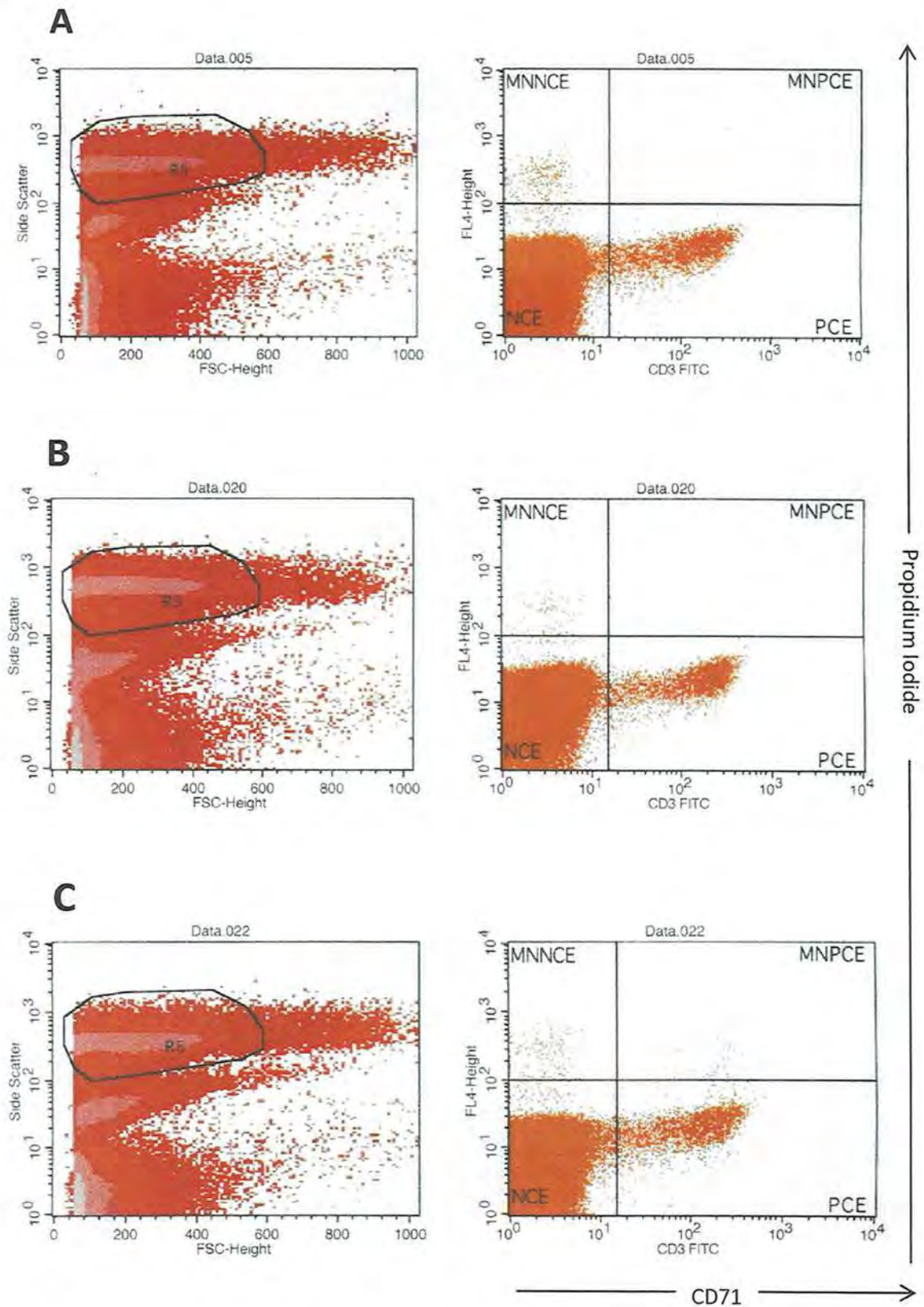


Fig. MNPCE, PCE, MNNCE and NCE population in peripheral blood analyzed by flow cytometry

A : Negative control, B : Adlay extract was dosed 2000 mg/kg by oral gavage, C : Positive control.  
 PCE is the acronym for "polychromatic erythrocyte", NCE is the acronym for "normochromatic erythrocyte", MNPCE is the acronym for "micronucleated polychromatic erythrocyte" and MNNCE is the acronym for "micronucleated normochromatic erythrocyte".