

論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 265 号		学位申請者	木村 葵
審 査 委 員	主 査	堀内 正久	学 位	博士 (医学)
	副 査	岸田 昭世	副 査	武田 泰生
	副 査	橋口 照人	副 査	池田 龍二

A Combination of *in Vitro* Comet Assay and Micronucleus Test Using Human Lymphoblastoid TK6 Cells

(ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた *in vitro* コメットアッセイと小核試験の組み合わせの有用性に関する研究)

In vitro 遺伝毒性試験としてコメットアッセイと小核試験がある。小核試験は試験法ガイドラインが 2009 年に発行されているが、コメットアッセイには標準的な方法がない。以前に学位申請者は、コメットスライド標本を 3 層ゲルから 1 層ゲルへ改良するとともに新生チャイニーズハムスター肺 (Chinese Hamster Lung) 由来の細胞株 CHL を用いた検討で、コメットアッセイを標準化した。*In vitro* で DNA 損傷を検出するコメットアッセイと染色体異常を検出する小核試験を同時に組み合わせて行う手法 (組み合わせ法) は、様々な遺伝毒性の特徴を持つ化学物質のスクリーニング試験として期待できる。そこで、本研究で学位申請者は、この組み合わせ法で、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 において 4 つの遺伝毒性物質 [DNA 付加体形成のメタンスルホン酸エチル (EMS) とメタンスルホン酸メチル (MMS)、酸化損傷誘発の過酸化水素 (H_2O_2)、DNA 複製阻害 (鎖間 DNA 架橋) のマイトマイシン C (MMC)] および DNA 鎖切断と酸化損傷誘発のガンマ線 (γ ray)、ならびに 1 つの非遺伝毒性物質 [Triton X-100 (TRX)] を用いた場合に、DNA 損傷と染色体異常が同時検出されるか否かを検討した。また、細胞毒性はトリパンブルー色素の細胞外への排出を指標とした細胞の生死 (相対生存率: RV) および細胞増殖性 (相対細胞増加数: RICC) で評価した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 3 種の遺伝毒性物質 (EMS、MMS、 H_2O_2) および γ ray は、用量依存的にコメット像と小核を持つ細胞を増加させたことから、組み合わせ法で DNA 損傷と染色体異常が同時に検出できた。また、コメットアッセイで陽性反応を示した最小用量 (Lowest Observed Genotoxic Effect Level: LOGEL) は、小核試験のそれと比較すると 2~4 倍高かった。
- 2) 細胞毒性については、RV は Day 0 では高用量でもほとんど変化しなかったが、1 および 2 日後 (Day 1 および 2) には用量依存的に減少した。RICC は Day 1 および 2 ともに用量依存的に減少した。
- 3) MMC は小核を持つ細胞を明らかに増加させたが、コメットアッセイでは陰性であった。MMC は鎖間 DNA 架橋作用を持つため、アルカリ処理条件下での DNA の細切断化が阻害されたことがコメットアッセイ陰性の原因と考えられた。
- 4) TRX の最高用量 200 μ g/mL ではコメット像が増加したが、本用量での RV は 25% と低く、また、コメット像もヘッジホッグ (針鼠) と呼ばれる小さな Head と大きな Tail を持つ形態であった。これらの結果から、このコメット像増加は、TRX による直接的な DNA 損傷ではなく細胞死による非特異的なものと判断された。

予想に反して、コメットアッセイの LOGEL が小核試験のそれよりも高かったが、近年、*in vitro* コメットアッセイの低い感受性が、TK6 を用いた遺伝子突然変異や CHL を用いた染色体異常との比較でも報告されており、*in vitro* コメットアッセイは必ずしも感度の高い試験法ではないことが示唆された。また、MMC の結果は、化学物質の DNA 架橋作用の有無が、コメットアッセイと小核試験の組み合わせ法によって判定できることを示した。本研究から、この組み合わせ法を用いて細胞毒性を適切に評価することで DNA 損傷と染色体異常の同時検出が可能であることが判明した。今後、遺伝毒性作用の異なる物質についても検討を重ねることにより、遺伝毒性のメカニズム解析にコメットアッセイと小核試験の組み合わせ法が利用できると考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。