

## 最終試験の結果の要旨

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

主査および副査の5名は、平成 25 年 10 月 10 日、学位申請者 木村 葵 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) 多くの遺伝毒性試験からコメットアッセイと小核試験を選択して組み合わせた理由は何か。また、その組み合わせが今回の研究のオリジナリティーか。

(回答) 小核試験は試験法ガイドラインがあるが、コメットアッセイは新しい試験法であり、それらを組み合わせることで異なる遺伝毒性作用が検出可能となるためである。また、組み合わせることにオリジナリティーがあると考ええる。

質問 2) コメットアッセイのデメリットであるデータの施設間のばらつきの原因は何か。

(回答) コメットアッセイは実施条件が様々であり、また感度が高いために実験誤差によるデータのばらつきがみられ、再現性に乏しいとされている。

質問 3) コメット像の Tail が長いと遺伝毒性があるということか。また、この Tail が長くなるということとアポトーシスとは異なるのか。

(回答) Tail が長いと遺伝毒性 (DNA 損傷) があるということである。そのコメット像が小さな Head と大きな Tail を持つ形態であるヘッジホッグ様となればアポトーシスと判断してよい。

質問 4) マイトマイシン C (MMC) 以外のクロスリンカーとしてシスプラチンがあるが、組み合わせ法では MMC と同様の結果が得られるのか。

(回答) シスプラチンには鎖間や鎖内のクロスリンク作用があるため、同様の結果が予測される。

質問 5) メタンスルホン酸エチル (EMS) のコメットアッセイで 125  $\mu\text{g/mL}$  の濃度条件がデータなしであるのは、1 回の実験によるものか。

(回答) そうである。追加実験では 125  $\mu\text{g/mL}$  の濃度条件にて陽性の結果が得られた。

質問 6) コメットアッセイの棒グラフに SD 表示があるが、1 回の実験なのか。

(回答) その通りで、100 細胞を解析した結果の平均値と SD である。

質問 7) EMS のコメットアッセイで 500  $\mu\text{g/mL}$  の濃度条件では 50%に Tail 増加がみられるが、50%の細胞が DNA を損傷したにもかかわらず、小核が 7%しか増加しないのはなぜか。そのときの細胞生存率 (Day 2) は 20%だが、その中の 7%に小核があるということか。

(回答) コメットアッセイの 500  $\mu\text{g/mL}$  の濃度条件では 100 細胞中の Tail に存在する DNA 量の平均が 50%であり、細胞生存率は 100%であった。Day 2 の小核試験では 1000 細胞中の小核頻度が 7%で、細胞生存率は 20%であった。コメットアッセイではすべての細胞で 50%程度の Tail 増加がみられ、その細胞の約 20%が Day 2 まで生存し、その 7%に小核がみられたことを示している。

質問 8) コメットアッセイは小核試験と比較して感度が低いとのことだが、コメットアッセイと小核試験では評価した細胞集団が異なるので、一概に感度比較はできないのではないか。

(回答) コメットアッセイと小核試験は異なるサンプリングポイントで評価するため細胞集団は異なるが、同じ処

理を行った細胞を用いて遺伝毒性に対する検出感度を試験法として比較することはできると考える。

質問 9)  $\text{H}_2\text{O}_2$  は細胞障害性のイメージが強いが、遺伝毒性と細胞障害性のどちらの作用を持つのか。また、用量に依存してそれらの毒性に違いはあるのか。

(回答)  $\text{H}_2\text{O}_2$  では、まずフリーラジカルが生じて、それが DNA を切断するため遺伝毒性を持つと考える。用量によって毒性発現が異なり用量が高いときに細胞障害性（細胞死）が現れると考える。

質問 10) TK6 細胞の p53 機能が正常であるとする根拠は何か。

(回答) TK6 細胞は、遺伝性球状赤血球症の患者から樹立された WIL-2 細胞を改変したもので、Ultra violet (UV) により p53 タンパク蓄積や p21、GADD45 遺伝子が誘導されるとの報告があることから p53 機能は正常と考えられる。

質問 11) げっ歯類とヒト由来の細胞で感受性の差はあるのか。

(回答) ヒト細胞 TK6 は、p53 機能に異常を持つチャイニーズハムスター由来の CHL 細胞と比較し、同程度の感度であり、感受性の差はないと考えている。

質問 12) 体細胞を用いているが、生殖細胞への作用をみる必要はないか。

(回答) 遺伝毒性の発現に両者で差はないとの報告があり、生殖細胞への作用はあえてみる必要はないと考えている。

質問 13) 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の遺伝毒性への感度が、予想とは逆に小核試験の方がよいが、その理由は何か。

(回答) DNA 損傷は 15 分までにその 50%が修復されるとの報告があるため、4 時間の化学物質処理中にある程度の DNA 損傷が修復され、コメットアッセイの感度が低いようにみえたと推測する。イベントとしては染色体異常よりも DNA 損傷の頻度が高いと考える。

質問 14) DNA 損傷が修復されないようにしたらどうなるのか。

(回答) DNA 修復阻害剤であるシタラビン (AraC) と Hydroxyurea (HU) を加えるコメットアッセイ、さらに先に細胞質を除去した細胞核でのコメットアッセイでは小核試験よりも感受性が高くなるとの報告があることから、何らかの形で DNA 修復がコメットアッセイの感度の低下に関与していると考えられる。従って、DNA 損傷修復を抑制した場合、コメットアッセイの感度が高まると思われる。

質問 15) 血清なしの培養液で細胞培養すると簡単にアポトーシスを誘導できるので、この細胞を対照にヘッジホッグがアポトーシス細胞かどうか検証できるのではないか。

(回答) 今後の検討課題としたい。

質問 16) 抗がん剤の開発で遺伝毒性を検出した場合はどうなるのか。

(回答) 抗がん剤はその作用機序から遺伝毒性が予測されるため、遺伝毒性の評価法であるエームス試験が陽性となっても開発は進むことがある。

質問 17) 遺伝毒性試験の結果は、薬の開発においてどのような位置づけなのか。

(回答) 通常は、エームス試験で陽性であれば開発は進まない。ただし、抗がん剤の様に、その作用機序から陽性結果が予測されるものについては別である。

質問 18) 今回はハザード評価だが、ハザードとリスクの違いは何か。

(回答) ハザード評価とは、検査対象の化学物質の有害性や毒性の種類および質を明らかにするという定性的な毒性評価で、これに用量反応評価と暴露評価を加え、化学物質がヒトの健康に影響を及ぼすかどうかを総合的かつ定量的に解析するのがリスク評価である。

質問 19) コメットアッセイのアルカリ処理で DNA の壊れやすい特定部位はあるのか（アダクト形成に特異性のある部位はあるか）。

(回答) 化学物質の特性によると考える。

質問 20) MMC が DNA 鎖間で架橋することを確認しているのか。

(回答) 本研究で確認はしていないが、MMC の DNA 鎖間への架橋を構造解析した報告があるため、その架橋作用はあると考える。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。