In vitro 小核試験を用いた数値的異常誘発物質の高感度検出とその作用機序の簡便な推定

中村 哲^{1*}, 高野 智好¹, 松岡 厚子², 加藤 幸彦¹

¹キヤノン株式会社化学安全部 〒146-8501 東京都大田区下丸子 3-30-2

²国立医薬品食品衛生研究所療品部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Sensitive detection of aneugens and convenient prediction of the mechanisms of action using the in vitro micronucleus test

Tetsu Nakamura¹, Tomoyoshi Takano¹, Atsuko Matsuoka² and Yukihiro Katoh¹

¹Chemicals Safety Division, Canon Inc., 3-30-2 Shimomaruko, Ohta-ku, Tokyo 146-8501, Japan

²Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Aneuploidy can have significant impact upon human health including reproductive problems and cancer. However, there is no test method currently that is widely used in routine screening assay for aneuploidy detection. In this study, in order to develop a routinely available screening assay, we evaluated the efficacy of our in vitro micronucleus (MN) test protocol. The MN test with a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU) without cytochalasin B was conducted on seven chemicals, namely, five potential aneugens which induced polyploidy in the in vitro chromosomal aberration (CA) test and whose mechanism of action is unknown, and two well-known aneugens (colcemid and diethylstilbestrol). Besides micronucleated (MN) cells (parameter widely used for detecting clastogens and aneugens in the existing protocols), polynuclear (PN) cells and mitotic (M) cells were used for assessment of aneuploidy induction. In vitro CA tests were also performed to compare with the MN test. All seven chemicals induced polyploidy in the CA tests. While three chemicals significantly increased the frequency of MN, PN, and M cells in the MN tests, the other four chemicals increased only the frequency of PN cells. Based on the patterns of appearance of aberrant cells induced by test chemicals, the seven chemicals could be classified into two groups. It is thought that the difference in the patterns between the two groups reflects the difference in mechanisms of action. Our results indicate a possibility that aneuploidy and polyploidy can be distinguished by the analysis of patterns of appearance of aberrant cells in the MN test. We have concluded that our MN test protocol, easier-to-perform, and more sensitive for detecting potential aneugens as compared with the existing protocols, may be useful for routine screening.

Keywords: in vitro micronucleus test, numerical aberration, aneugens

緒 言

異数性（染色体の数値的異常）は、ヒトの胚喪失あるいは先天性染色体異常疾患に大きく関与していることがこれまで知られている（Hassold and Jacobs, 1984;

Griffin, 1996）。また、ほとんどのがん細胞が異数性を示すことから、異数性と発がんとの関わりも古くから指摘されてきた。現在のところ異数性誘発物質ががん原性を示す証拠は限られたものであるが、従来考えられていたようながん関連遺伝子の変異だけで発がん過程を説明することは難しいことから、がん化の初期過程における異数性の関与が再評価されてきている（Li et al., 1997; Duesberg et al., 1999; Li et al., 2000）。一方、英国の遺伝毒性諮問委員会（UK COM, Committee on Mutagenicity

* E-mail: nakamura.tetsu@canon.co.jp

受付: 2004 年 4 月 26 日 改訂稿受領: 2004 年 6 月 28 日

受理: 2004 年 6 月 28 日

© 日本環境変異原学会

of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment) は、異数性がヒトの健康へ与える影響を憂慮し、化学物質の異数性誘発能を検討する試験を遺伝毒性試験ストラテジーに含めるべきだと結論付けている (COM, 2000)。以上のように近年、異数性に対する関心が高まっており、異数性誘発物質の簡便で効率的な検出法の開発およびその作用機序の解明が強く望まれている (Parry, 1996; Marzin, 1997)。

しかし、現在、数的異常誘発物質の日常的なスクリーニングを目的として広く使用されている試験系はない。In vitro 染色体異常試験では、倍数体 (polyploid) の出現などにより数的異常誘発物質をある程度検出することができるが、一般に異数性 (aneuploidy) の検索は困難である。一方、小核試験では、紡錘体形成阻害剤などの異数性誘発物質も検出できることが知られている。但し、構造異常と異数性の両方で小核が誘発されることから、その区別が必要になる。異数性を起こす物質により誘発された小核は、構造異常を起こす物質によって誘発された小核よりも大きいことが知られており (Yamamoto and Kikuchi, 1980; Hogstedt and Karlsson, 1985)、一般的に、誘発された小核が異数性誘発物質により誘発されたものかどうかは、その小核の大きさより推定することになる。この場合、小核の大きさによる推定のため、明確に区別することは難しい。そこで、染色体の動原体を特異的に染め分ける方法 (キネトコア染色あるいはセントロメア染色) を併用することにより、異数性を明確に区別して検出し (Degrassi and Tanzarella, 1988; Miller et al., 1991; Maki-Paakkanen et al., 1995)、さらにその作用機序を解明する試みも進められている (Kirsch-Volders et al., 1997; Cimini et al., 1999)。しかし、これらの方法は、必要とするプローブの入手が困難な場合もあり、また高価であるなど、現時点では一般的なスクリーニング法として簡単に利用できる状況にはないと考えられる。

Matsuoka et al. (1999) は、in vitro 小核試験において、小核を有する単核細胞の他に、多核細胞および分裂期細胞を観察指標とすることにより、構造異常を誘発する物質と数的異常を誘発する物質を簡便に区別できることを示した。また、数的異常誘発物質処理により、異常細胞の異なった出現パターンが得られ、これが数的異常誘発機序の違いによる可能性を示唆した (Matsuoka et al., 1999; 2000)。彼等の方法は、簡便かつ迅速であることから、この方法により数的異常誘発物質の検出が可能であれば、効率的にスクリーニングを行うことができると期待された。また、数的異常誘発機序に関する情報も得られる可能性があり、有用な方法であると考えられた。

そこで我々は今回、自社で使用する材料のスクリーニング試験として in vitro 小核試験に着目し、小核を有する単核細胞の他に、多核細胞および分裂期細胞を観察指

標に加え、数的異常誘発機序が未知の5物質 (in vitro 染色体異常試験で倍数体を誘発した物質) および既知の異数性誘発物質2物質について、その検出が可能かどうかを検討した。また、有意な上昇を示した細胞の出現パターンを解析し、数的異常誘発機序との関わりについても検討した。観察指標とする細胞に関しては、Matsuoka et al. (1999) の方法を若干変更した。主な変更点は多核細胞の分類および記録方法である。ここでは、なるべく分類を単純にしたいという考えから、変形細胞 (karyorrhectic cell, 変形した主核を有する細胞) は評価対象から除外した。均等二核細胞は、細胞質分裂阻害剤で処理した場合に顕著に誘発され (Carter, 1967; Antoccia et al., 1993)、細胞質分裂阻害の指標になると考えられることから (Matsuoka et al., 2000)、その他の多核細胞とは区別し、別途記録した。小核試験の結果と比較する目的で、染色体異常試験も併せて実施した。

実験材料および方法

1. 細胞

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 CHL/IU 細胞 (大日本製薬より購入) を用いた。CHL/IU 細胞は、Eagle's minimum essential medium (MEM) (Gibco) に非働化 (56℃, 30分) した10%仔牛血清 (tissue culture biologicals) を添加した培養液中で、37℃, CO₂ 濃度5%の条件下培養した。

2. 被験物質およびS9 mix

社内で実施した in vitro 染色体異常試験で倍数体を誘発したため開発を中止した自社検討物質5物質、塩基性マゼンタ染料 (BMD)、シアン直接染料 (CDD)、ジスアゾイエロー顔料A (DYPA)、ジスアゾイエロー顔料B (DYPB) およびアルキルジアミン (ADA) に加え、既知の数的異常誘発物質であるコレセミド (COL) (CAS no. 477-30-5, Gibco) およびジエチルスチルベストロール (DES) (CAS no. 56-53-1, Sigma) の合計7物質を用いた。DYPAおよびDYPBは混合物であるが、その組成は不明である。その他の物質については純物質を用いた。

COL, BMD, CDD, DYPA, DYPBは生理食塩液に溶解させた。DESはジメチルスルホキシドに溶解させた。ADAは1%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液に懸濁させた。S9 (キッコーマン) は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンで誘導した雄のラット肝より調製したものを使用した。S9 mix (10 mL当たり) は以下に示す組成で調製した。S9分画3 mL, 20 mM HEPESバッファー (pH 7.2) 2 mL, 50 mM MgCl₂, 330 mM KCl, 50 mM G-6-P, 40 mM NADP および H₂O についてはそれぞれ1 mLとした。

Fig. 1 Categories of cells scored for micronucleus (MN) test. MN preparations were stained with acridine orange, so that yellow indicates nucleus and red indicates cytoplasm. **a:** a normal cell, **b:** a cell with small MN (smaller than one-fourth of the main nucleus in diameter), **c:** a cell with large MN (between one-fourth and half the size of the main nucleus), **d:** a multiple MN cell (with both small MN and large MN), **e:** a polynuclear cell (with one or more nuclei more than half the size of the main nucleus), **f:** a equal-sized binucleate cell, and **g:** a mitotic cell.

3. In vitro 小核試験

1.4×10^4 個の CHL/IU 細胞をプラスチックシャーレ (FALCON, 直径 60 mm) に播種し, 3 日間前培養した. 前培養が 2 日間の場合は, 播種細胞数を 3.0×10^4 個とした. 各用量につき, 2 枚のプレートを用いた. 前培養後, 短時間処理 (代謝活性化による場合および代謝活性化によらない場合の 6 時間処理: 18 時間回復) および連続処理 (24 時間処理, 48 時間処理: 回復時間なし) を実施した. 濃度設定は, 原則として, 被験物質の溶解性にかかわらず, 細胞増殖が明らかに 50% 以上抑制される濃度を最高濃度とした. 50% 以上の細胞増殖抑制が認められない場合は, 5 mg/mL または 10 mM のいずれか低い方を最高濃度とした.

小核標本作製は以下のように行った. 0.02% EDTA を含む 0.05% トリプシン溶液を用いて細胞を回収し, 細胞懸濁液を 0.075 M 塩化カリウム溶液 5 mL で室温, 10 分間低張処理した. 処理後, 水中保存しておいた固定液 (メタノール: 氷酢酸 = 3:1) 0.5 mL を徐々に加え半固定した. 続いて, 全ての溶液を固定液で置換する操作を 2 回繰り返した後, 1% 氷酢酸を含むメタノール溶液に懸濁させた. 遠心後, もう一度少量の 1% 氷酢酸を含むメタノール溶液に細胞を懸濁させ, 細胞浮遊液とした. 最後に, 固定細胞の浮遊液を脱脂洗浄済みスライドガラス上に滴下し, 風乾した.

細胞をアクリジンオレンジ (40 μ g/mL) で染色し, 蛍光顕微鏡 (カールツァイス Axioplan 2 imaging および Axioskop 2 MOT; 励起フィルター BP365/12, 吸収フィルター LP397, ダイクロイックミラー FT395) を用いて 400 $\times$ で観察した. 1 プレート当たり 1000 個, 合計 2000 個の間期細胞を観察し, 小核を有する単核細胞の出現数を記録した. 小核を有する単核細胞は, 小さな小核 (直径が主核の 1/4 未満の小核) を有する細胞 (Fig. 1b), 大きな小核 (主核の 1/4 以上 1/2 以下の小核) を有する細胞 (Fig. 1c), Multi (小さな小核と大きな小核の両方を有する) 細胞 (Fig. 1d) の 3 つに分類し, 別々に記録した. また, 多核細胞 (直径が主核の 1/2 よりも大きい核が主核以外に 1 つ以上含まれる細胞 [Fig.

1e]; 均等二核細胞 [Fig. 1f] を含む) および分裂期細胞 (Fig. 1g) の出現数も別途記録した. 均等二核細胞は別途記録したが, 結果の評価の際には多核細胞として集計した. 小核を有する単核細胞の出現頻度は, 多核細胞 (均等二核細胞を含む) および分裂期細胞を除外した間期細胞 1000 個 (1 プレート当たり) を用いて算出した. 多核細胞および均等二核細胞に含まれる小核については, 計数しなかった. 細胞質が不明瞭な細胞, 主核が変形した細胞, 核同士が接着した細胞, 染色が不良な細胞などは観察対象から除外した. また, 非常に小さな小核は真の小核ではない可能性があるため, 小核としては評価しなかった. 観察に際しては, 2 人の観察者が 1 プレートにつきそれぞれ 500 個観察した.

小核を有する単核細胞, 多核細胞および分裂期細胞の陰性対照群における当研究施設 (キヤノン株式会社) での出現頻度はそれぞれ, $8.34 \pm 3.04/1000$ 個 ($n = 160$, 最大値 15/1000 個), $3.34 \pm 2.63/1000$ 個 ($n = 160$, 最大値 13/1000 個) および $26.87 \pm 7.06/1000$ 個 ($n = 160$, 最大値 43/1000 個) である. 結果の評価の際には, 統計手法は用いず, 以下のように判断した. 上記の陰性対照群のヒストリカルデータにおける出現頻度の最大値に基づき, 小核を有する単核細胞, 多核細胞および分裂期細胞の出現頻度がそれぞれ, 4%, 4% および 10% 以上を有意な上昇とし, その上昇傾向に用量依存性もしくは再現性が認められた場合, 陽性と判定した.

4. In vitro 染色体異常試験

細胞の播種, 被験物質処理条件および濃度設定方法は小核試験と同じとした. 但し, 小核試験と染色体異常試験は, 別々に実施した.

染色体標本作製は以下のように行った. 標本作製する 2 時間前にコルセミド (0.2 μ g/mL) を添加した. 0.02% EDTA を含む 0.05% トリプシン溶液を用いて細胞を回収し, 細胞懸濁液を 0.075 M 塩化カリウム溶液 5 mL で 37 $^{\circ}$ C, 20 分間低張処理した. 処理後, 水中保存しておいた固定液 (メタノール: 氷酢酸 = 3:1) 0.5 mL を徐々に加え半固定した. 続いて, 全ての溶液を固定液で

Fig. 2 Dose-response curves of the in vitro micronucleus (MN) test and the in vitro chromosomal aberration (CA) test with 7 test chemicals. The number of micronucleated (MN) cells, polynuclear (PN) cells and mitotic (M) cells per 1000 intact cells was scored in MN test. The frequency of aberrant cells and polyploid cells was investigated in CA test. The cells were treated for 6 h with or without S9 mix followed by 18 h recovery time (indicated as +6 h [●], -6 h [○], 24 h [■], 48 h [□]).

Table 1 Summary of results

Chemical ^a	MN test ^b			CA test ^c	
	MN	PN	M	SA	NA
COL	+(32.0)	+ [30.5]	+	-	+
DES	+(48.9)	+ [11.1]	+	-	+
BMD	+(32.8)	+ [32.2]	+	+	+
CDD	-	+ [93.6]	-	+	+
DYPA	-	+ [95.9]	-	-	+
DYPB	-	+ [80.1]	-	+	+
ADA	-	+ [84.5]	-	-	+

^a COL, colcemid; DES, diethylstilbestrol; BMD, basic magenta dye; CDD, cyan direct dye; DYPA, disazo-yellow pigment A; DYPB, disazo-yellow pigment B; ADA, alkylidiamine

^b MN, micronucleated cells; PN, polynuclear cells; M, mitotic cells

^c SA, structural aberration; NA, numerical aberration

(): Maximum percentage of cells with large micronucleus in MN

[]: Maximum percentage of equal-sized binucleate cells in PN

置換する操作を3回繰り返し、遠心した後、もう一度少量の固定液に細胞を再懸濁させ、細胞浮遊液とした。最後に、固定細胞の浮遊液を脱脂洗浄済みスライドガラス上に滴下し、風乾した。

細胞をギムザ溶液で染色し、光学顕微鏡（ニコン Optiphot oおよび Optiphot o-2）を用いて600×で観察した。1プレート当たり100個、合計200個の分裂中期像を観察した。但し、BMDについては各用量につき1プレートとし、100個の分裂中期像を観察した。観察に際しては、2人の観察者が1プレートにつきそれぞれ50個観察した。構造異常の観察は、染色体数が23～27本の像のみを観察対象とし、染色体の重なりやゴミ、きず、あるいは形態の不鮮明などで、異常の有無の判定ができない部分がある場合には、対象外とした。ギャップは染色体分岐幅以下の非染色性部位と定義し、構造異常には含めず、別途記録した。数値異常の観察は、倍数体（核内倍加を含む）の出現数を記録し、異数性細胞は対象外とした。倍数体の出現頻度がほぼ100%に達した場合には、当該濃度の構造異常の解析は不能とし、構造異常の評価対象から除外した。

結果の評価には統計手法は用いず、構造異常を持つ細胞および倍数体の出現頻度がそれぞれ10%以上を有意な上昇とし、その上昇傾向に用量依存性もしくは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

結 果

小核試験および染色体異常試験の用量反応曲線を Fig. 2に示す。

今回検討した7物質全てにおいて染色体異常試験で倍数体の誘発が認められた。一方、小核試験では、COL、DESおよびBMDの3物質において、小核を有する単核

細胞、多核細胞および分裂期細胞の出現頻度が有意に上昇した。これら3物質とは対照的に、CDD、DYPA、DYPB、ADAの4物質では、小核を有する単核細胞および分裂期細胞の増加は認められず、多核細胞の出現頻度のみが有意に上昇した。COL、DES、DYPAおよびDYPBでは、染色体異常試験において倍数体が誘発された処理条件と小核試験において多核細胞が誘発された処理条件は全て一致していた。一方、BMDでは染色体異常試験の連続処理（24時間処理および48時間処理）で倍数体が誘発されたが、小核試験では連続処理条件の他に代謝活性化による場合の6時間処理においても多核細胞の有意な上昇が認められた。CDDでは染色体異常試験の48時間処理でのみ倍数体が誘発されたが、小核試験では短時間処理および連続処理の4条件全てにおいて多核細胞の有意な上昇が認められた。ADAでは染色体異常試験の短時間処理2条件で倍数体が誘発されたが、小核試験では代謝活性化によらない場合の短時間処理および連続処理の3条件において多核細胞の有意な上昇が認められた。上記のように、BMD、CDDおよびADAにおいて、倍数体が誘発された処理条件と多核細胞が誘発された処理条件に違いは認められるものの、これら2つの異常細胞が共に誘発された処理条件において両者を比較した場合、ADAを除いた6物質では、染色体異常試験における倍数体の増加傾向は、小核試験における多核細胞の増加傾向と類似していた。一方、ADAでは、両試験における処理濃度の違いも影響してか、その類似傾向は弱かった。また、小核を有する単核細胞の増加も同時に認められる場合（COL、DESおよびBMD）には、その上昇傾向も倍数体の上昇傾向と同じような特徴を示した。CDDおよびDYPBは、染色体異常試験において構造異常の誘発も認められたが、小核試験では、小核を有する単核細胞の増加が観察されなかった。

今回検討した7物質は、小核試験において、小核を有する単核細胞、多核細胞および分裂期細胞の出現パターンに基づき、大きく2つの物質群に分類することができた（Table 1）。1つ目のパターンは3つの指標全てで有意な上昇が認められる場合であり、COL、DESおよびBMDの3物質がこのパターンに該当した。これら3物質により誘発された小核を有する単核細胞の中で、大きな小核を有する細胞の割合は、それぞれ最大で32.0%、48.9%および32.8%であった。また、多核細胞中の均等二核細胞の割合は、それぞれ最大で30.5%、11.1%および32.2%であった。2つ目のパターンは多核細胞のみが有意に上昇する場合であり、CDD、DYPA、DYPB、ADAの4物質がこのパターンに該当した。これら4物質の特徴として、多核細胞中の均等二核細胞の割合が顕著に高く、全ての物質で最大値が80%以上であった。

考 察

本研究では、数的異常誘発物質の検出および作用機序の簡便な識別法の開発を目的に、染色体異常試験で倍数体を誘発する7物質をモデル化合物として、サイトカラシンBを用いないin vitro小核試験の有用性について検討した。今回、一般的に観察指標として用いられている小核を有する単核細胞の他に、多核細胞および分裂期細胞を観察指標に加えた。我々が指標とした細胞の一つである多核細胞（均等二核細胞を含む）は検討した7物質全てにおいて有意な上昇を示したことから、数的異常誘発物質を検出する指標としての有効性が確認された。Matsuoka et al. (1999, 2000) は、in vitro小核試験において多核細胞および分裂期細胞が数的異常誘発物質を検出する上で有効な指標となることを示した。我々の結果は、彼等の報告を支持するものである。一方、今回の検討試験で、数的異常誘発物質の検出という点において、分裂期細胞は必ずしも必要ではなかった。しかし、既知の数的異常誘発物質ジアゼパムにおいて、多核細胞の上昇は認められず、分裂期細胞の顕著な上昇が確認されたという報告（Matsuoka et al., 1999）があること、また、数的異常誘発機序を推定できる有効な指標になると考えられることから、分裂期細胞を観察指標とすることは有用であると考えられる。

今回検討した7物質は、小核試験において、小核を有する単核細胞、多核細胞および分裂期細胞の出現パターンに基づき、大きく2つの物質群に分類することができた。この2群間の出現パターンの相違は、数的異常誘発機序、すなわち、異数性誘発および倍数性誘発の違いを反映したものと考えられる。

COLおよびDESなどの紡錘体形成阻害剤は、その作用により分裂期でアレストを引き起こすことが知られている。今回の小核試験でのこれら物質における分裂期細胞の出現頻度の増加は、この機構を反映したものである。また、紡錘体形成阻害作用により、染色分体の分離がうまくいかないため、異数体が誘発され、小核、多核を有する細胞が増加したと考えられる。紡錘体形成阻害作用が既知のビンクリスチン、ベンゾ[*a*]ピレンおよびジメチルベンゾ[*a*]アントラセン（前の1物質はCHL細胞、後の2物質はV79-MZ細胞でのデータ）において、小核を有する細胞、多核細胞および分裂期細胞が顕著に増加したという報告があり（Matsuoka et al., 1999）、我々の結果はこの報告と一致する。一方、構造異常誘発物質に比べ紡錘体形成阻害剤は大きな小核を高頻度に誘発することが、マウスの骨髓細胞（Yamamoto and Kikuchi, 1980）、ヒトリンパ球培養細胞（Hogstedt and Karlsson, 1985）およびチャイニーズ・ハムスターの培養細胞（Matsuoka et al., 1999）を用いた試験で報告されている。Matsuoka et al. (1999) の報告によれば、構造異常誘発

物質の*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンおよびマイトマイシンC処理により誘発された小核を有する細胞の内、大きな小核を有する細胞の割合は最大でそれぞれ、9.5%および3.3%であった。今回我々がCOL、DESおよびBMDにおいて得た値はそれぞれ、32.0%、48.9%および32.8%であり、これらの値は上記の構造異常誘発物質で得られている値よりも明らかに大きかった。この結果は、これまでの報告と一致している。BMDは、上述の紡錘体形成阻害剤と同様な異常細胞の出現パターンを示し、また、大きな小核を高頻度に誘発したことから、紡錘体形成阻害作用を有すると推定された。

CDD, DYPA, DYPBおよびADAは、COL, DESおよびBMDとは異なり、小核を有する単核細胞および分裂期細胞の出現頻度は上昇させず、多核細胞の中の特に均等二核細胞を顕著に（全ての物質で80%以上）誘発した。このような異常細胞の出現パターンは、紡錘体形成阻害剤のものとは明らかに異なることから、別の機序によって数的異常が誘発されていると考えられた。Matsuoka et al. (2000) は、既知の細胞質分裂阻害剤であるサイトカラシンBについてin vitro小核試験を行い、我々がCDD, DYPA, DYPBおよびADAで得たのと同様な異常細胞出現パターンを見出した。その場合も多核細胞中の均等二核細胞の割合が顕著に高かった（最大で93.0%）ことを報告している。また、西高瀬川（京都）から汚染物質として検出された2-フェニルベンゾトリアゾール（PBTA）-タイプの一つPBTA-2（Oguri et al., 1998）についても同様な結果を得、さらに、サイトカラシンBと同じようにPBTA-2が細胞質分裂に必須のアクチンフィラメントに異常を引き起こすことも確認している。彼等の報告は、細胞質分裂阻害作用を有する物質は、in vitro小核試験において同様な異常細胞の出現パターンを呈することを示唆している。細胞質分裂阻害剤の作用機序と異常細胞の出現パターンについては、以下のように説明することができる。一般的に細胞質分裂阻害剤は細胞質分裂は阻害するが、核分裂は阻害しない（Wright and Hayflick, 1972）。その結果、紡錘体形成阻害剤のような分裂期でのアレストが起こらないため、分裂期細胞の出現頻度が上昇しないと考えられる。一方、核分裂後の細胞質分裂は阻害されるため均等二核細胞が顕著に増加する（Carter, 1967; Antoccia et al., 1993）。分裂期を通過したほとんどの細胞は均等二核細胞もしくは多核細胞になると考えられることから、多くの単核細胞は分裂期を経ていない細胞と推定される。小核は分裂期を経ないと形成されないことから、これが単核細胞で小核の誘発が認められない原因と考えられる。CDD, DYPA, DYPBおよびADAは、サイトカラシンBと同様な異常細胞の出現パターンを示し、また、均等二核細胞を高頻度に誘発したことから、細胞質分裂阻害作用を有すると推定された。

CDD および DYPB は、染色体異常試験において構造異常を誘発したにも関わらず、小核試験では構造異常の指標となる小核を有する単核細胞の出現頻度を上昇させなかった。このことについて我々は以下のように考えている。両物質は、おそらく小核試験において小核を誘発している可能性が高い。しかし、前述のようにこれらの物質は細胞質分裂阻害作用を有すると考えられることから、形成された小核は多核細胞（均等二核細胞を含む）の中に含まれると推察される。一方、今回の試験では多核細胞中の小核についてはカウントしなかったため、小核の出現を検出できなかったと考えられる。このことから我々は、少なくとも細胞質分裂を阻害し、かつ構造異常を誘発するような物質については、多核細胞内の小核についても評価する必要があると考えている。但し、その場合には小核を有する細胞の出現頻度がかなり低くなり、定量性に問題が出てくることが考えられる。そういった場合には、別途、サイトカラシン B を用いた小核試験で行われているように、多核細胞のみを評価対象とし、その中で小核を有する細胞の出現頻度を算出するといったことが必要になるかもしれない。

BMD, CDD および ADA において、染色体異常試験で倍数体が誘発された処理条件と小核試験で多核細胞が誘発された処理条件に違いが認められた点についての原因は不明である。構造異常の検出において、両試験の結果は高い一致率を示すことが知られているが (Matsuoka et al., 1993; Matsushima et al., 1999), その場合も一部に一致しない事例が認められている。このような両試験における結果の相違は、異常検出に最適な処理時間あるいは回復時間が両試験間で異なることが影響しているのかもしれない。この点については、今後両試験を同時に実施するなどして詳細な検討を行う必要がある。

結 語

我々のプロトコルは、染色体の動原体を特異的に染め分ける方法などを併用することなく数的異常誘発物質を簡便かつ高感度に検出できたこと、また、その観察指標によって構造異常誘発物質と異数性誘発物質を区別できたという報告 (Matsuoka et al., 1999) もあることから、ルーチンで使用するスクリーニング試験として有用であると考えられる。加えて、染色体異常試験では、異数性と倍数性を区別して検出することは困難であるが、本プロトコルを用いることによりそれができる可能性が示唆されたことから、その点においてもその有用性が期待される。

In vitro 小核試験に関する標準化されたガイドラインはまだなく、現在、国際的にハーモナイズする方向でその作成作業が進められている (Kirsch-Volders et al., 2003)。その中で、サイトカラシン B を用いるべきかど

うかが議論されている。今回の我々の結果は、有益な付加情報が得られるという観点から、ヒトのリンパ球を使用するような場合を除いて、サイトカラシン B を用いないプロトコルの有用性を支持している。

数的異常は、紡錘体形成阻害あるいは細胞質分裂阻害以外の作用機序によっても誘発されることが知られている (Aardema et al., 1998)。例えば、細胞分裂装置の一つである中心小体に作用するもの (ジアゼパム) (Andersson et al., 1981; Hsu et al., 1983; Izzo et al., 1998) あるいは核膜に作用するもの (ミコナゾール) (Bellincampi et al., 1980) なども報告されている。我々は、今回とは作用機序が異なる既知の数的異常誘発物質についても、本プロトコルで検出が可能かどうかを検討中である。また、それらの物質によって誘発される異常細胞の出現パターンが、作用機序に特異的なものかも併せて検討する予定である。

謝 辞

小核試験および染色体異常試験の実施に際してご協力頂いた、キヤノン株式会社化学安全部の八城友子、彦坂重友、両氏に心から感謝の意を表します。

参考文献

- Aardema, M.J., S. Albertini, P. Arni, L.M. Henderson, M. Kirsch-Volders, J.M. Mackay, A.M. Sarraf, D.A. Stringer and R.D. Taalman (1998) Aneuploidy: a report of an ECETOC task force, *Mutat. Res.*, 410, 3-79.
- Andersson, L.C., V.P. Lehto, S. Stenman, R.A. Badley and I. Virtanen (1981) Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation, *Nature*, 291, 247-248.
- Antoccia, A., C. Tanzarella, D. Modesti and F. Degrossi (1993) Cytokinesis-block micronucleus assay with kinetochore detection in colchicine-treated human fibroblasts, *Mutat. Res.*, 287, 93-99.
- Bellincampi, D., G. Gualandi, E. la Monica, C. Poley and G.P. Morpurgo (1980) Membrane-damaging agents cause mitotic non-disjunction in *Aspergillus nidulans*, *Mutat. Res.*, 79, 169-172.
- Carter, S.B. (1967) Effects of cytochalasins on mammalian cells, *Nature*, 213, 261-264.
- Cimini, D., C. Tanzarella and F. Degrossi (1999) Differences in malsegregation rates obtained by scoring ana-telophases or binucleate cells, *Mutagenesis*, 14, 563-568.
- COM (2000) Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity, Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COM), London, UK.
- Degrossi, F. and C. Tanzarella (1988) Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy, *Mutat. Res.*, 203, 339-345.
- Duesberg, P., D. Rasnick, R. Li, L. Winters, C. Rausch and R. Hehlmann (1999) How aneuploidy may cause cancer and genetic instability, *Anticancer Res.*, 19, 4887-4906.
- Griffin, D.K. (1996) The incidence, origin, and etiology of aneuploidy, *Int. Rev. Cytol.*, 167, 263-296.
- Hassold, T.J. and P.A. Jacobs (1984) Trisomy in man, *Annu. Rev.*

- Genet., 18, 69-97.
- Hogstedt, B. and A. Karlsson (1985) The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used, *Mutat. Res.*, 156, 229-232.
- Hsu, T.C., J.C. Liang and L.R. Shirley (1983) Aneuploidy induction by mitotic arrestants. Effects of diazepam on diploid Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, 122, 201-209.
- Izzo, M., A. Antocchia, F. Degrassi and C. Tanzarella (1998) Immunofluorescence analysis of diazepam-induced mitotic apparatus anomalies and chromosome loss in Chinese hamster cells, *Mutagenesis*, 13, 445-451.
- Kirsch-Volders, M., A. Elhajoui, E. Cundari and P. Van Hummelen (1997) The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.*, 392, 19-30.
- Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate Jr., S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surralles, A. Vanhauwaert and A. Wakata (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Mutat. Res.*, 540, 153-163.
- Li, R., G. Yerganian, P. Duesberg, A. Kraemer, A. Willer, C. Rausch and R. Hehlmann (1997) Aneuploidy correlated 100% with chemical transformation of Chinese hamster cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14506-14511.
- Li, R., A. Sonik, R. Stindl, D. Rasnick and P. Duesberg (2000) Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 3236-3241.
- Maki-Paakkanen, J., M. Hayashi, T. Suzuki, H. Tanabe, M. Honma and T. Sofuni (1995) Analysis by fluorescence in situ hybridization with a mouse gamma satellite DNA probe of isolated micronuclei induced in mice by two clastogens and two spindle poisons, *Mutagenesis*, 10, 513-516.
- Marzin, D. (1997) The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines, *Mutat. Res.*, 392, 175-181.
- Matsuoka, A., N. Yamazaki, T. Suzuki, M. Hayashi and T. Sofuni (1993) Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test, *Mutat. Res.*, 272, 223-236.
- Matsuoka, A., K. Matsuura, H. Sakamoto, M. Hayashi and T. Sofuni (1999) A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the in vitro micronucleus test, *Mutagenesis*, 4, 385-389.
- Matsuoka, A., H. Sakamoto, S. Tadokoro, A. Tada, Y. Terao, H. Nukaya and K. Wakabayashi (2000) The 2-phenylbenzotriazole-type water pollutant PBTA-2 has cytochalasin B-mimetic activity, *Mutat. Res.*, 464, 161-167.
- Matsushima, T., M. Hayashi, A. Matsuoka, M. Ishidate Jr., K.F. Miura, H. Shimizu, Y. Suzuki, K. Morimoto, H. Ogura, K. Mure, K. Koshi and T. Sofuni (1999) Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 6, 569-580.
- Miller, B.M., H.F. Zitzelsberger, H.U. Weier and I.D. Adler (1991) Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.
- Oguri, A., T. Shiozawa, Y. Terao, H. Nukaya, J. Yamashita, T. Ohe, H. Sawanishi, T. Katsuhara, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1998) Identification of a 2-phenylbenzotriazole (PBTA)-type mutagen, PBTA-2, in water from the Nishitakase River in Kyoto, *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 1195-1200.
- Parry, J.M. (1996) Research on the mechanisms of action of aneugenic chemicals and regulatory approaches for their control in the European Communities, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 248-253.
- Yamamoto, K.I. and Y. Kikuchi (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, *Mutat. Res.*, 71, 127-131.
- Wright, W.E. and L. Hayflick (1972) Formation of anucleate and multinucleate cells in normal and SV 40 transformed WI-38 by cytochalasin B, *Exp. Cell Res.*, 74, 187-194.