

ーザンプロット法で調べたところ、精巣で特に高い発現が観察された。また、生後、日を追って精巣での発現を調べると、両者ともパキテン期の細胞が増加する時期に増加し、これらのタンパク質が減数分裂期の組み換えの過程に関与する可能性が示唆された。

また、ヒト RecQ1、RecQ2、RecQ3 の部分ペプチドに対するモノクローナル抗体を作製して抗体による免疫染色を行ったところ、三者が異なった存在様式を示し、特に RecQ2 は核内で比較的大きなドット状に分布することを見出した。このドットは核小体とは一致せず、また、SUMO-1 化されて核内にドット状に存在する PLM とも一致しなかった。種々の抗体を使って調べたところ、このドットは mitocin や Rb タンパク質のドットと一致し、核内の特殊な構造体に局在することが明らかになった。

3. RecQ3 の解析

酵母の two-hybrid 系を用いて RecQ3 と相互作用するタンパク質の検索を試みた。その結果、Ubc9 と SUMO1 が相互作用することが明らかになった。Ubc9 は SUMO1 を他のタンパク質に結合させる反応に関与する。この Ubc9 との相互作用は RecQ2 でも観察されたが、RecQ1 では観察されなかった。さらに、RecQ3 と相互作用するタンパク質 (Werner interacting protein 1) をコードする新規な遺伝子 WIP1 をクローニングした。Wip1 は大腸菌の RuvB タンパク質に部分的に相同性をもつタンパク質であり、酵母にも WIP1 の相同遺伝子が存在した。そこで酵母の Wip1 遺伝子破壊株を作製してその表現型を観察したところ、この遺伝子の単独破壊株では特別な表現型は観察されなかったが、SGS1 遺伝子との二重破壊株にすると、SGS1 遺伝子単独破壊株のメチルメタンサルホン酸 (MMS) に対する感受性が消失した。この結果は、Wip1 の機能が Sgs1 の機能、高等真核細胞では RecQ3 の機能と関連していることを示して

おり、ウエルナー症候群の原因遺伝子産物の機能と関連するタンパク質が初めて明らかになった。

4. 出芽酵母を用いた解析

酵母を用いて姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange, SCE) を測定する系を導入し、SGS1 遺伝子破壊株の SCE の頻度を調べ、ブルーム症候群患者由来の細胞と同様に SCE の頻度が上昇していることを明らかにした。この遺伝子破壊株に、野生型の SGS1 遺伝子を導入すると MMS やヒドロキシウレア (HU) に対する感受性が相補され、SCE の頻度が下がり、胞子形成能が回復したが、ブルーム症候群の患者で見出された変異と同じ missense 変異をもつ遺伝子を導入した場合にはそのような現象は観察されなかった。この観察から、SGS1 遺伝子破壊株がブルーム症候群の細胞のよいモデルになることがさらに確認された。

次に、ATP 結合ドメインに変異を入れヘリカーゼ活性をもたない Sgs1 をコードする遺伝子を SGS1 遺伝子破壊株に導入したところ、MMS や HU に対する感受性は相補されず、SCE の頻度も下がらなかったが、胞子形成は回復した。このことから、胞子形成にはヘリカーゼ活性が必須でないことがわかった。

さらに、SGS1 の様々な欠失変異体を作製し、SGS1 遺伝子破壊株に導入して種々の表現型を観察することによりその機能ドメインを解析した。MMS や HU の感受性や SCE の抑制には主として、ヘリカーゼドメインと RecQ タイプのヘリカーゼの間で保存されている領域が関与し、胞子形成にはヘリカーゼドメインより N 末側が重要であることが明らかになった。

C. 考察

ブルーム症候群 (BS) は、発育不全、免疫不全、男性における不妊、種々の悪性腫瘍の若年での発生 (発症する平均年齢 20 歳) 等を呈する常染色体劣

性の遺伝病で、患者由来の細胞では染色体が不安定になり SCE が高頻度に観察され、エチルメタンスルホン酸 (EMS) などのアルキル化剤に高感受性になる。我々は酵母の相同遺伝子をクローニングし、その遺伝子破壊株を作成してその表現型を解析することにより、破壊株が BS 細胞の非常によりモデルになることを明らかにしてきたが、本年度の研究により、その有用性をさらに確認することができた。BS の患者で観察された変異と同じ変異を SGS1 に導入することにより、酵母が MMS に感受性になり、SCE の頻度が上がり、胞子形成能が低下したことは、このモデル系の有用性を端的に示している。

このモデル系により、胞子形成 (ヒトでは精子形成) にはヘリカーゼ活性が必須ではないことが明らかになった。一方、アルキル化剤や HU に対する感受性の相補や、SCE の頻度を低下させるためには、ヘリカーゼ活性が必須であることが明らかになり、RecQ2 はヘリカーゼ活性を必要とする機能と、しない機能の少なくとも 2 つの機能をもつことが示唆された。さらに、SGS1 の欠失変異体による解析から、RecQ2 の精子形成における役割にはヘリカーゼドメインより N 末側が重要であることが示唆された。

また、マウスの RecQ2 の精巣での高い発現は BS 患者の不妊に対応するものであり、パキテン期の細胞が増加する時期での発現の増加は、Blm の減数分裂への関与を示唆している。

一方、酵母の two-hybrid system による解析では RecQ2、RecQ3 が Ubc9 と相互作用することが明らかになった。Ubc9 はタンパク質の SUMO-1 化に関与する酵素で、DNA の修復や組み換えに関与する酵素・タンパク質 (poly(ADPribose)polymerase、p53、Rad51 等) に結合していることが報告されている。したがって SUMO-1 化はゲノムの安定性にかかわる機構の調節に関与している可能性が考えられ

る。抗体を用いた解析では、Blm が mitocin や Rb タンパク質と同じ核内の特殊な構造体に局在することが明らかになった。今後、この構造体がどのようなものであるのかその実体を明らかにするとともに、その構造体に局在するために、SUMO-1 化が必要であるかどうか検討する必要がある。

two-hybrid 系によるスクリーニングで、RecQ3 と相互作用するタンパク質 (Werner interacting protein 1) をコードする新規な遺伝子 WIP1 をクローニングした。酵母の相同遺伝子破壊株の解析から、Wip1 の機能が Sgs1 の機能、高等真核細胞では RecQ3 の機能と関連していることがわかり、ウエルナー症候群の原因遺伝子産物の機能と関連するタンパク質が初めて明らかになった。現在酵母の WIP1 遺伝子破壊株の分裂寿命が短縮するかどうか検討中である。

RecQ1 に関しては、その mRNA の発現パターンから精子形成の過程への関与を示唆することはできたが、その機能を明らかにするために、DT40 細胞の Q1 遺伝子破壊株の作製が急務である。この遺伝子破壊株はごく近いうちに作製できる予定である。

D. 結論

本研究により、RecQ1、RecQ2、トポ III が精子形成の特定の時期で機能していることが明らかになった。また、酵母の Sgs1 の機能の解析により、MMS や HU の感受性や SCE の抑制には主として、ヘリカーゼドメインと RecQ タイプのヘリカーゼの間で保存されている領域が関与し、胞子形成にはヘリカーゼドメインより N 末側が重要であることが明らかになった。Sgs1 と RecQ2 の構造と機能の類似性から、RecQ2 に関しても同様であると考えられる。また、two-hybrid 系によるスクリーニングでみつかった Wip1 は RecQ3 と関連して働くタンパク質であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seki, T., Seki, M., Katada, T., and Enomoto, T. Isolation of a cDNA encoding mouse DNA topoisomerase III which is highly expressed at the mRNA level in the testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1936, 127-131, 1998.
- 2) Seki, T., Wang, W.-S., Okumura, N., Seki, M., Katada, T., and Enomoto, T. cDNA cloning of mouse BLM gene, the homologue to human Bloom's syndrome gene, which is highly expressed in the testis at the mRNA level. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 377-381, 1998.
- 3) Seki, T., Seki, M., Onodera, R., Katada, T., and Enomoto, T. Cloning of cDNA encoding a novel mouse DNA topoisomerase III (TopoIII β) possessing negatively supercoiled DNA relaxing activity, whose message is highly expressed in the testis. *J. Biol. Chem.* 273, 28553-28556, 1998.
- 4) Wang, W.-S., Seki, M., Yamaoka, T., Seki, T., Tada, T., Katada, T., Fujimoto, H., and Enomoto, T. Cloning of two isoforms of mouse DNA helicase Q1/RecQL cDNA: α form is expressed ubiquitously and β form specifically in the testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1443, 198-202, 1998.
- 5) Siratori, M., Sakamoto, S., Enomoto, T., Sugimoto, M., Goto, M., Matsumoto, T., and Furuichi, Y. Detection by epitope-defined monoclonal antibodies of Werner DNA helicases in nucleoplasm and their upregulation by cell transformation and immortalization. *J. Cell Biol.* 144, 1-9, 1999.

2. 学会発表

- 1) 小野田文俊、宮島敦子、佐藤友里恵、関政幸、榎本武美 出芽酵母の RecQ ホモログ、Sgs1 の機能の解析 ワークショップ「DNA repair and Mutagenesis '98」 仙台

- 2) 川辺洋一、関剛彦、今村幸、菅原稔、古市泰宏、関政幸、榎本武美 マウス・ウエルナー症候群原因遺伝子産物と相互作用する蛋白質の解析 ワークショップ「DNA repair and Mutagenesis '98」 仙台
- 3) 関剛彦、関政幸、榎本武美、堅田利明 DNA トポイソメラーゼ III およびブルーム症候群原因遺伝子の発現の解析 日本薬学会第 118 年会 京都
- 4) 川辺洋一、関剛彦、今村幸、菅原稔、古市泰宏、関政幸、榎本武美 マウス・ウエルナー症候群原因遺伝子産物と相互作用する蛋白質の解析 日本薬学会第 118 年会 京都
- 5) 川辺洋一、Branzei Dana、関剛彦、関政幸、榎本武美 マウス・ウエルナー症候群、ブルーム症候群原因遺伝子産物 SUMO-1、Ubc9 の相互作用の解析 日本薬学会東北支部会第 151 回例会 仙台
- 6) 鈴木裕史、吉村明、関政幸、益子高、榎本武美 モノクローナル抗体による RecQ ファミリーヘリカーゼの解析 日本薬学会東北支部会第 151 回例会 仙台
- 7) 鈴木裕史、吉村明、関政幸、益子高、榎本武美 RecQ ファミリーヘリカーゼタンパクの正常及び癌細胞での発現：抗ペプチドモノクローナル抗体による解析 日本癌学会第 57 回総会 横浜
- 8) 榎本武美 ブルーム症候群・ウエルナー症候群の原因遺伝子産物 RecQ ファミリーヘリカーゼの機能 広島大学遺伝子実験施設第 13 回公開学術講演会「細胞増殖・分化と遺伝病」 広島
- 9) 榎本武美 RecQ・トポイソメラーゼ 第 13 回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」 横浜
- 10) 宮島敦子、関政幸、小野田文俊、大田邦史、大野泰雄、榎本武美 出芽酵母 SGS1 の減数分裂における機能の解析 第 13 回ワークショップ

- プ「遺伝的組換えとその制御」 横浜
- 11) 小野田文俊、佐藤友里恵、小野寺涼子、宮島敦子、関政幸、榎本武美 出芽酵母 SGS1 の機能ドメインの遺伝学的解析 第13回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」 横浜
- 12) 関剛彦、関政幸、堅田利明、榎本武美 マウス DNA トポイソメラーゼ III の cDNA クローニングと発現及び性状解析 第21回日本分子生物学会年会 横浜
- 13) 宮島敦子、関政幸、小野田文俊、大田邦史、大野泰雄、榎本武美 減数分裂における出芽酵母 SGS1 の機能の解析 第21回日本分子生物学会年会 横浜
- 14) 小野田文俊、佐藤友里恵、小野寺涼子、宮島敦子、関政幸、榎本武美 出芽酵母 SGS1 の遺伝学的解析 第21回日本分子生物学会年会 横浜
- 15) 佐藤友里恵、小野寺涼子、小野田文俊、宇井彩子、宮島敦子、関政幸、榎本武美 出芽酵母 Sgs1 の機能ドメインの解析 第21回日本分子生物学会年会、横浜
- 16) 王文成、関政幸、関剛彦、多田周右、堅田利明、藤本弘一、榎本武美 2種のマウス DNA ヘリカーゼ Q1cDNA クローニング及びその発現解析 第21回日本分子生物学会年会 横浜
- 17) 川辺洋一、関剛彦、関政幸、今村宰、菅原稔、古市泰宏、榎本武美 マウス・ウエルナー症候群原因遺伝子産物と SUMO-1 化蛋白質との相互作用の解析 第21回日本分子生物学会年会 横浜

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療）
分担研究報告書

Human REcQ1 ヘリカーゼの正常発達と異常発現

分担研究者 高嶋幸男
国立精神神経センター疾病研究第2部

研究要旨

RecQ1 ヘリカーゼの中枢神経系における正常発達と異常発現を免疫化学的に検討した。大脳皮質の神経細胞とプルキンエ細胞では持続的に発現していたが、プルキンエ細胞では胎生期後半に一過性の発現増強がみられ、premyelination glia では顆粒状の強い発現が胎生期後半に一過性に出現した。RecQ1 ヘリカーゼは神経細胞やグリア細胞の発達に関連していると考えられた。また、myelination の遅延する疾患では myelination の遅延に伴い premyelination glia での発現も遅れると推測された。Western blotting で Hutchinson-Gilford progeria syndrome 例では発現が低下しており、本疾患が RecQ1 遺伝子発現と関連すると思われた。

A. 研究目的

RecQ ファミリーに属するヒト DNA ヘリカーゼはこれまで5種類がクローニングされ、Bloom 症候群、Werner 症候群はそれぞれ、RecQ2 (BLM)、RecQ3 (WRN) が原因遺伝子であることが明らかとなっている。一方、RecQ1、Q4、Q5 ではその遺伝子の異常に対応する疾患はこれまで報告されていない。一方、DNA 修復障害や染色体不安定性を示す疾患のうち Hutchinson-Gilford progeria syndrome と neonatal progeroid syndrome では原因遺伝子は判明していない。我々は、RecQ1 ヘリカーゼの中枢神経系における正常発現を検討し、ついで Hutchinson-Gilford progeria syndrome や neonatal progeroid syndrome を含めた各種疾患での発現異常について検索を行った。

B. 研究方法

正常コントロールとして胎生 13 週から 31 歳までの 27 例を用い、発達に伴う発現の変化を検討した。また、早発老化や脳腫瘍、先天奇形症候群など

の 19 の疾患群、計 34 例においても検索を行い正常群と比較した。免疫組織化学には streptavidin-biotin peroxidase 法を用いた。また、一部の症例で RecQ1 の発現を確認する目的で Western blotting を行った。

C. 研究結果

1. 胎生臓器での発現

胎生 35 週および 12 歳、32 歳で検討を行った。とくに強い発現は気管と腸管の粘膜上皮、および精巣の精母細胞でみられた。一部の精母細胞では核に強い発現がみられた。

2. 中枢神経系での発達に伴う発現の変化

大脳皮質のニューロンでは胎生初期より年齢に関係なく弱い発現が持続してみられた。一方、premyelination glia で胎生 13 週から 40 週にかけて一過性に強い顆粒状の発現がみられた。premyelination glia での RecQ1 の発現は一過性で胎生 40 週を境に消失した。小脳プルキンエ細胞では年齢に関係なく発現が持続していたが、胎生 24

週から月齢4か月までに一時的な発現の増強がみられた。

3. DNA 修復障害や早発老化を示す疾患等での検討

Ataxia-telangiectasia 1 例、Cockayne syndrome 2 例、Hutchinson-Gilford progeria syndrome 1 例、neonatal progeroid syndrome 1 例で検討を行った。コントロールで発現のみられない時期である生後 3 か月の neonatal progeroid syndrome の premyelination glia に強い発現がみられた。一方、他の 3 疾患ではコントロールとの差は明らかではなかった。

Zellweger syndrome 3 例、Holoprocencephaly 2 例、Lissencephaly 3 例では、何れの疾患においてもコントロールでは発現のなかった乳児期において premyelination glia に RecQ1 の発現の増強がみられた。

4. Western blotting

以上のように免疫染色では Neonatal progeroid syndrome では乳児期での明らかな過剰発現が観察されたが、Hutchinson-Gilford progeria syndrome ではコントロールと比較して RecQ1 の発現が低下しているか否かの判定は困難と考えられた。そのため Hutchinson-Gilford progeria syndrome の RecQ1 の発現を知る目的で Western blotting を行った。コントロールでは胎生 19 週から 32 歳までの何れの年齢でも 73kDa の RecQ1 の band が一様に検出された。一方、Hutchinson-Gilford progeria syndrome ではコントロールと比較して明らかな RecQ1 の発現の低下を認めた。

D. 考察

胎生臓器のなかでとくに強い発現のみられた気管と腸管の粘膜上皮、および精巣の精母細胞は、いずれも細胞回転率が高い部位であり、本蛋白の作用は細胞分裂後の分化に関与していると考えられた。

神経細胞における発現では大脳皮質の神経細胞と小脳プルキンエ細胞

では弱い発現が持続していたが、小脳プルキンエ細胞では胎生期後半から乳児期初期にかけて発現の増強がみられた。この時期はプルキンエ細胞の primary dendrigenesis が起こっている時期に相当する。また、premyelination glia での顆粒状の強い発現も一過性であり、形態上は premyelination glia のなかでも oligodendroglia に発現していると考えられ、発現の見られた年齢は oligodendroglia が分化していく時期に相当すると考えられた。以上のことから RecQ1 ヘリカーゼは中枢神経系においては神経細胞やグリア細胞の分化・発達に関連していると考えられた。

過剰な RecQ1 の発現の見られた neonatal progeroid syndrome、Zellweger syndrome、holoprocencephaly、lissencephaly ではいずれの疾患においても KI 殻 er-Barrera 染色で myelination の遅延が観察された。したがってこれらの疾患における premyelination glia での RecQ1 の過剰発現は、髄鞘化が遅延しているために本来胎生期後半にみられる premyelination glia での発現が遅延して出現したものと考えられた。

Hutchinson-Gilford progeria 症候群での western blotting での発現量の低下は、本疾患が RecQ1 ヘリカーゼ蛋白の発現に異常をきたす疾患である可能性を示唆する。今後、本疾患における RecQ1 ヘリカーゼ遺伝子のクローニングや、RecQ1 関連蛋白などについて検討を行う必要がある。

E. 結論

1. RecQ1 ヘリカーゼは中枢神経系においては神経細胞やグリア細胞の分化・発達に関連していると考えられた。
2. myelination の遅延する疾患では myelination の遅延に伴い premyelination glia での RecQ1 ヘリカーゼも遅れて発現すると考えられた。
3. Hutchinson-Gilford progeria syndrome では RecQ1 ヘリカーゼの発現が低

下しており、本疾患が RecQ1 遺伝子発現と関連すると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Obonai T, Mizuguchi M, Takashima S: Developmental and aging changes of Bak expression in the human brain. *Brain Research* 783:167-170, 1998
- 2) Kato M, Mizuguchi M, Hattori S, Nakamura S, Takashima S: Loss of neurofibromin in the leptomeningeal astroglial heterotopia of NF-1. *Pediatr Neurol* 18:227-230, 1998
- 3) Isumi H, Takashima S, Ikeda K, Mizuguchi M: Expression of a 45K subunit of platelet-activating factor acetyl-hydrolase in the developing mouse cerebellum. *Anat Embryol* 197:415-419, 1998
- 4) Oka A, Takashima S: Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development. *Neuroscience Letters* 252:195-198, 1998
- 5) Oka A, Kurachi Y, Mizuguchi M, Hayashi M, Takashima S: Expression of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2) gene product in human brains. *Neuroscience Letters* 257:113-115, 1998
- 6) Takashima S, Mizuguchi M, Arii N : Neuronal migration disorder: expression of gene products in the neocortex. *Neuropathology* 18:427-432, 1998

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療）
分担研究報告書

小核誘発を指標とした、健常人および Werner 症候群患者由来 B 細胞株の薬剤感受性の比較

分担研究者 林 真
国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部部長

研究要旨

EBV でトランスフォームした健常人由来の B 細胞 4 株、Werner 患者由来の B 細胞 3 株について、camptothecin, etoposide, 4NQO の 3 種の化学物質に対する感受性を、小核の誘発を指標に検討した。その結果、camptothecin については、健常人由来の細胞株の方が高頻度の小核を誘発する傾向を示した。Etoposide についても Werner の 1 株をのぞいては、健常人由来細胞株の方が高頻度の小核を誘発した。4NQO については、Werner 患者由来の細胞株 2 株が比較的高い小核誘発頻度を示した。しかしながら、今回の研究では、被験物質での処理時間が各細胞株に適切に設定されなかったため、正確な比較をする事は出来なかった。今後、異なる倍加時間を持つ細胞株群について、処理時間を含めた実験プロトコールの改良が大きな課題として残された。

A. 研究目的

RecQ3 変異の解明の一貫として、健常人及びウエルナー症候群患者由来の EBV で形質転換した B 細胞を用いて薬剤の染色体異常誘発性に対する感受性の比較を、小核の誘発を指標に検討する。

WS11701 (56 才、女性、Mutation 8/8)

被験物質

Camptothecin (topoisomerase I 阻害剤)
0.625-10 nM
Etoposide (topoisomerase II 阻害剤)
0.125-4 μM
4NQO (アルキル化剤) 0.125-2 μM

B. 研究方法

細胞は分担研究者であるエイジーン古市から分与されたものを用いた。細胞の内訳は以下の通り。

健常人由来細胞

N0003 (95 才、女性)
N0007 (35 才、男性)
N0008 (51 才、男性)
N0012 (25 才、女性)

ウエルナー症候群患者由来細胞

WS25401 (47 才、女性、Mutation 5/5)
WS6201 (40 才、女性、Mutation 7/7)

培養は、10%牛胎児血清を添加した RPMI1640 培養液を用い、37°C、飽湿、5%CO₂ の炭酸ガス培養器で行った。フラスコ当たり 5 x 10⁵ 細胞を播種し、すぐに所定濃度の被験物質溶液を添加、約 25~40 時間処理した後、小核の標本作製した。標本作製は以下の要領で行った。処理を終了した懸濁培養細胞を遠心管に移し、1000 rpm 5 分遠心後、細胞を回収した。前もって 37°C に温めておいた 0.075 M KCl 溶液約 4 ml に懸濁し、室温で 3 分間放置した後、固定液（氷酢酸：メタノール = 1 : 3）

数滴を加えて軽く攪拌後、遠心した。2回の固定を繰り返したのち、1%酢酸を含むメタノール液で1回固定し、細胞を回収し、1%酢酸を含むメタノール液で適切な濃度の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を1滴、スライドガラスの中央に滴下し、空気乾燥させた。小核の観察は、標本をすべてコード化し、観察直前に40 µg/ml アクリジンオレンジ溶液をスライドガラスに滴下後、カバーガラスをのせ、B励起照明系を備えた蛍光顕微鏡で40倍の対物レンズを用いて行った。

細胞は染色状態が良好で、細胞質が完全に保存されているもののみを観察対象とした。1000個の間期細胞を観察して、小核細胞の出現頻度を求めた。判定は下記の分類に従った。

- 1) 主核の直径の1/3までの直径の小核を持った単核細胞
- 2) 主核の直径の1/3から1/2までの直径の小核を持った単核細胞
- 3) 複数個の小核を持った単核細胞

C. 研究結果

図1~3に化学物質毎に各細胞株の小核誘発頻度を示した。縦軸に1000個の間期細胞を観察した時にみられた小核を持つ細胞数を示している。各棒の中は下から、主核の直径の1/3までの直径の小核を持つ細胞、1/3~1/2までの直径の小核を持つ細胞、複数個の小核を持つ細胞を示している。横軸には化学物質の処理濃度を示しており、右端のMMCは同時に処理した陽性対照物質 mitomycin C 0.05 µg/ml での小核を持つ細胞の頻度を示している。すべての細胞株を同時に処理することができなかつたため、処理時間が異なり、グラフの右上に処理時間 / 倍加時間を示した。倍加時間は処理直前に測定されたものを記載した。各図の上段に健常人由来細胞株の結果を、下段にウエルナー症候群患者由来細胞株の結果を示している。

図1に topoisomerase I 阻害剤 campto-

thecin 処理の結果を示した。健常人由来細胞株では、すべて明らかな陽性結果を示した。ウエルナー症候群患者由来細胞株では、WS25401 と WS6201 は明らかな陽性結果を示したが、WS11701 は弱い陽性結果を示した。

図2に topoisomerase II 阻害剤 etoposide 処理の結果を示した。健常人由来細胞株では、明らかな陽性結果を示した。WS25401 は低用量2用量で、強い小核誘発性を示したが、WS11701 は弱い陽性結果を示した。

図3にアルキル化剤 4NQO 処理の結果を示した。健常人由来細胞株では、いずれも同程度の弱い陽性結果を示した。ウエルナー症候群患者由来細胞株のうち、WS25401 と WS6201 は健常人由来細胞株よりも強い小核誘発性を示した。

D. 考察

健常人とウエルナー症候群患者由来の細胞株で染色体異常誘発性を小核の誘発を指標として比較検討したが、系統だった顕著な差は検出できなかった。各細胞株で倍加時間が大きく異なるため、細胞株によって被験物質に暴露される期間が1細胞周期より長いものや、1細胞周期に達していないものもあった。従って、今回の試験結果より、両群に差がないと結論するのは早計であると考えられる。しかし、前述の点を考慮しても、全体を通して WS11701 株は薬剤に対する感受性が低い傾向が認められた。現時点においてこれを説明することは出来ないが、暴露の絶対時間と細胞周期を考慮に入れた相対時間と小核誘発の関係を明確にする必要があり、試験手法の確立が急務である。今後、サイトカラシン B を組み込み、2核細胞を観察対象とすることにより被験物質暴露の細胞周期に対する相対時間を考慮に入れた試験法について検討する予定である。

E. 結論

3種の被験物質 camptothecin, etoposide, 4NQO について、小核試験を行った結果、すべて陽性結果を示したが、その感受性において健常人由来細胞と Werener 患者由来細胞との間に顕著な差は認められなかった。全細胞株を通して、WS11701 が3種の薬剤に対して、感受性が低い傾向にあった。今回弱い反応しか示さなかった細胞株についても実験プロトコル、特に処理時間の設定に問題があり、今後、異なる倍加時間の細胞について比較できるような改良が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi, M., T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, K. Kinoue, K. Saotome, N. Tanaka, A. Takai, Y.F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni and Y. Ojima Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.*, 399, 125-133 (1998)
- 2) Suzuki, T., Y. Miyata, K-i. Saeki, Y. Kawazoe, M. Hayashi and T. Sofuni In vivo mutagenesis by the hepatocarcinogen quinoline in the lacZ transgenic mouse: Evidence for its in vivo genotoxicity. *Mutat. Res.*, 412, 161-166 (1998)
- 3) Hayashi, M., M. Honma and T. Sofuni Dilution series for test chemicals in the mouse lymphoma mutation assay. *Mutat. Res.*, 415, 165-166 (1998)
- 4) Asano, N., Y. Katsuma, H. Tamura, N. Higashikuni and M. Hayashi An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitaly stained peripheral blood cells. *Mutat. Res.*, 404, 149-154 (1998)
- 5) Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo and M. Hayashi Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: The summary of the 9th collaborative study by CSGMT/MMS·JEMS. *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 84-100 (1998)
- 6) Adler, I.-D., J. Bootman, J. Favor, G. Hook, G. Schriever-Schwemmer, G. Welzl, E. Whorton, I. Yoshimura and M. Hayashi Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat. Res.*, 417, 19-30 (1998)
- 7) Morita, T. and M. Hayashi 1,4-Dioxane: Induction of micronuclei in mouse liver but not in peripheral blood and lack of in vitro genotoxicities. *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 269-280 (1998)
- 8) Miyamae, M., M. Yamamoto, Y.F. Sasaki, H. Kobayashi, M. Igarashi-Soga, K. Shimoi and M. Hayashi Validation of in vivo single cell gel electrophoresis (Comet) assay using the homogenate derived from mouse organs (liver, kidney, spleen, lung and bone marrow) *Mutat. Res.*, 418, 131-140 (1998)
- 9) Matsuoka, A., M. Hayashi and T. Sofuni In vitro clastogenicity of 19 organic chemicals found in contaminated water and 7 structurally related chemicals. *Environ. Mutagen Res.*, 20, 159-16 (1998)

Camptothecin



図1 Camptothecin の in vitro 小核試験結果

Etoposide

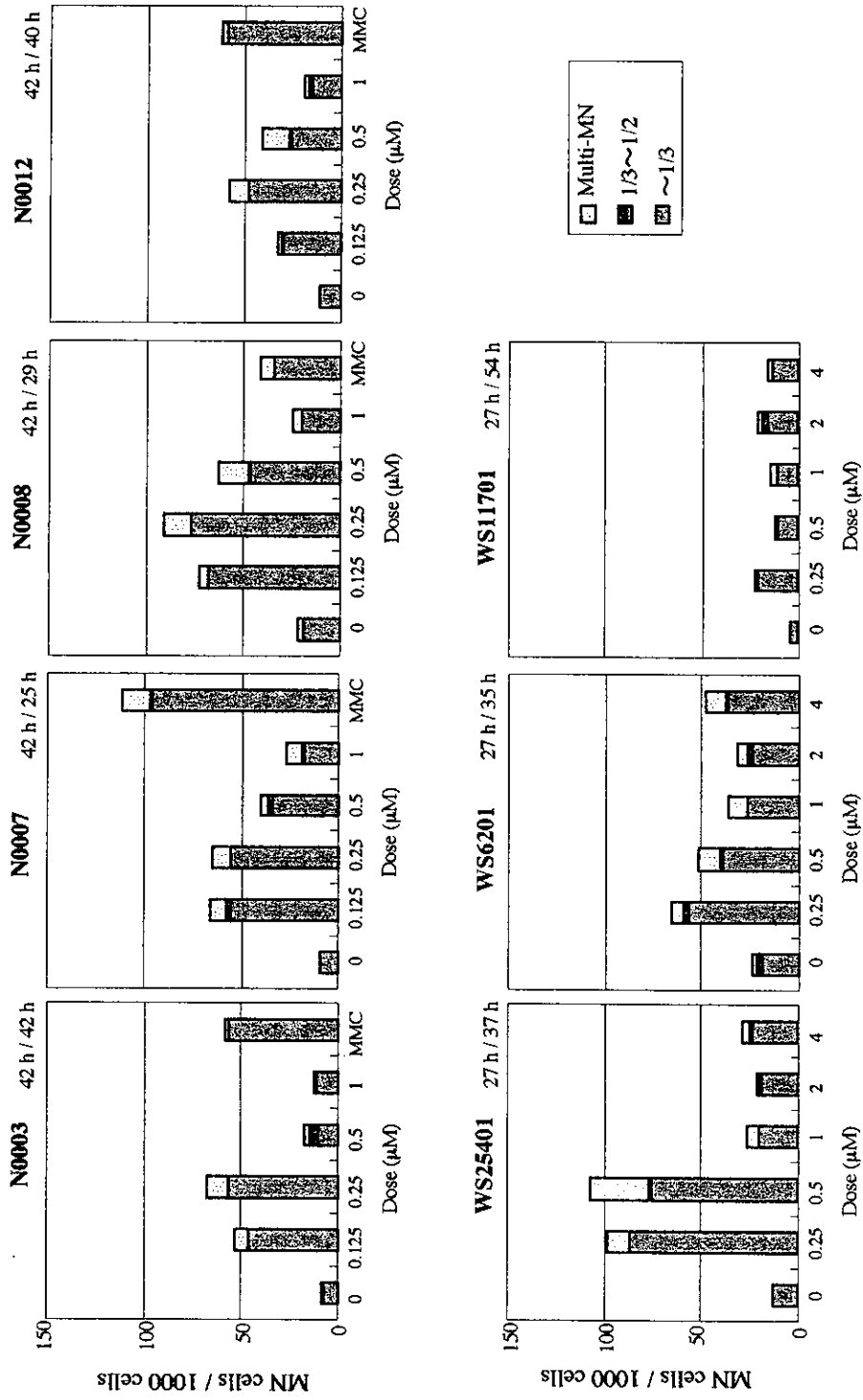


図 2 Etoposide の in vitro 小核試験結果

4NQO

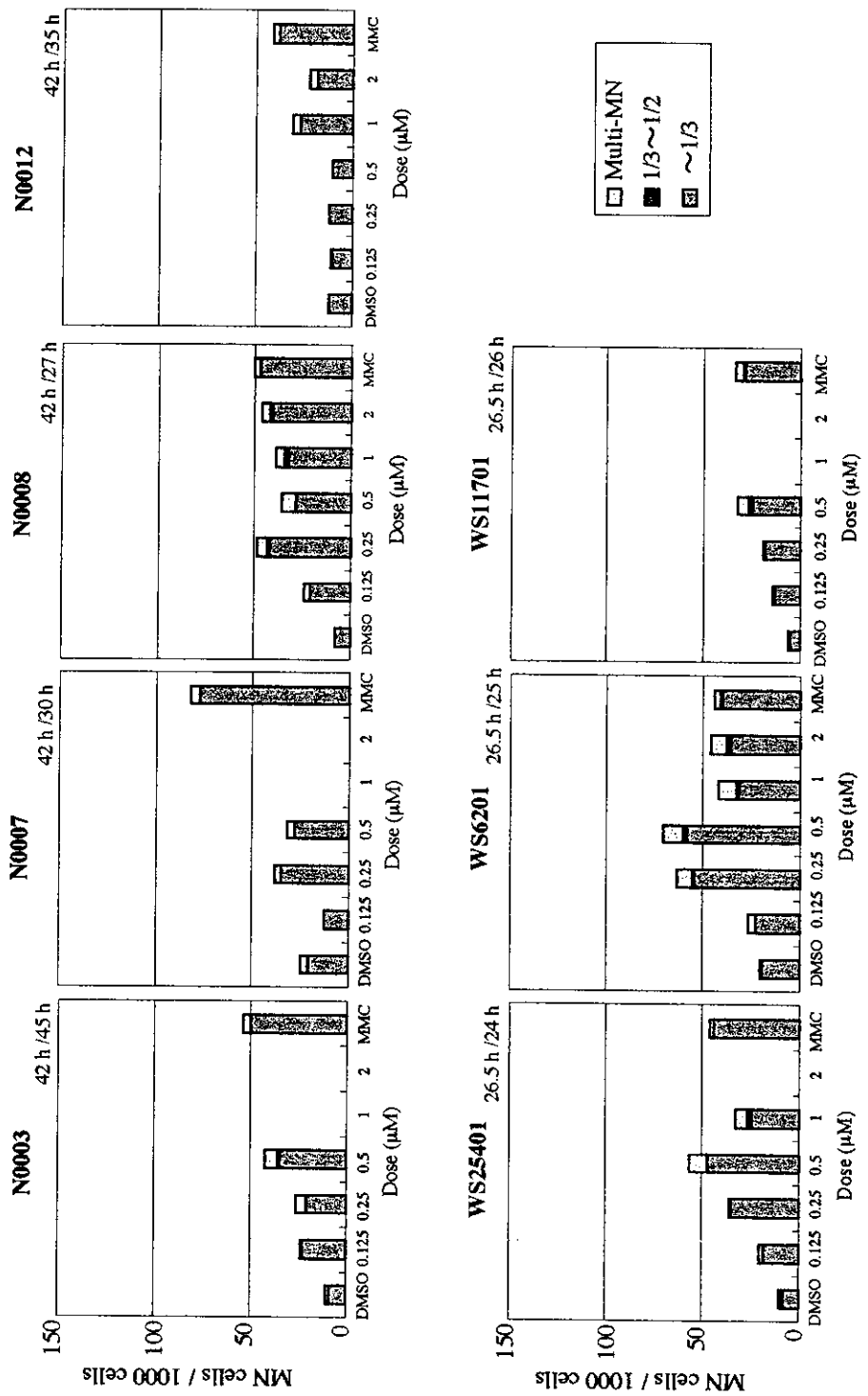


図3 4NQO の in vitro 小核試験結果