
環境変異原物質のブルーム症候群患者細胞の姉妹染色分体交換に及ぼす影響

Effect of various environmental mutagens on sister chromatid exchanges in Bloom syndrome cells

代表研究者 高知医科大学助教授 白石 行正

Assoc. Prof., Dept. of Anatomy, Kochi Medical School
Yukimasa SHIRAISHI

協同研究者 国立遺伝学研究所名誉研究員 吉田 俊秀

Honorary Member of National Institute of Genetics
Toshihide H. YOSIDA

高知医科大学(解剖学)技官 尾沢 美千代

Res. Assist., Dept. of Anatomy, Kochi Medical School
Michiyo OZAWA

A staining technique that detects sister chromatid exchanges (SCEs) is useful for the implementation of environmental mutagen-carcinogen testing programs using cultured mammalian cells. On the other hand, the Ames test, which measures mutagenicity in *Salmonella typhimurium*, is widely used for determining carcinogenic agents. However, conflicting results have been reported on the effect of some carcinogens between the SCE and the Ames tests. These discrepancies may be due to differences in the basic nature of mammalian cells and microorganisms. Moreover, the evaluation of mutagenicity with SCE tests using normal human lymphocytes and Chinese hamster cells seems difficult because of the comparatively low SCE increase and the necessity of careful statistical analysis. A sensitive cell system using human cells is now needed to detect carcinogens and mutagens. Recently we have established B-lymphoblastoid cell lines (LCLs) from Bloom syndrome (BS) patients and classified them into three types according to their chromosomal properties: type I with normal SCE and normal karyotype; type II with high SCE and normal karyotype and type III with high SCE and abnormal karyotype. We have shown that carcinogen-treated BS type II and III cells are highly susceptible to malignant transformation, when their SCE rate is raised above a certain critical level (increase of 70 SCE/cell over the baseline), as evidenced by tumor production in nude mice and high colony formation (CF) rates in soft agar. In order to demonstrate the effectiveness of using BS B-LCLs as a sensitive system to detect carcinogens we have studied the effects of 20 chemicals including indirect and direct carcinogens (with and without S9 mix) on SCE and chromosome abnormalities. BS type III cell was highly susceptible to both direct and indirect carcinogens with respect to high SCE increase without S9 mix (c. 140 SCE/cell), though some carcinogens produced SCE rated in the medium (c. 120 SCE/cell) range. Therefore BS type III is a unique cell line which can metabolize indirect carcinogens without S9 mix in *in vitro* culture, and are usable to establish a sensitive human cell system to detect carcinogens. A stable staining procedure of sister chromatid differentiation (SCD) using monoclonal anti-Bromodeoxyuridine (BrdU) antibody was newly established by combining it with the immunoperoxidase reaction (3, 3'-diaminobenzidine, DAB reaction). This procedure enabled detection of SCD and SCE under very low BrdU concentrations. SCD was not usually observed below 2.0 µg/ml BrdU with flame dried chromosome slides. SCE levels were evaluated under low BrdU concentrations using the antibody technique and endomitotic analysis with FPG (10.0, 5.0, 1.0, 0.5, 0.3, 0.2 µg/ml) in two BS B-lymphoblastoid cell lines (LCLs). Even though the BS SCE level was approximately 70 per cell at 10 µg/ml, the value decreased to the

level of 20–30 SCE per cell at 0.1 µg/ml with the antibody technique. In BrdU labeled BS endomitoses, single SCEs highly decreased with BrdU concentrations (130–140 level at 10 µg/ml; 38–60 level at 0.2 µg/ml), when compared to the rare twin SCE values (3–6 SCE level) in all BrdU concentrations. This finding strongly supports our previous notion that most of BS SCEs are caused by BrdU, when BrdU containing DNA is used as template for replication; BrdU template effect is most critical condition for the increased SCE in Bloom syndrome.

研究目的

環境変異原、発癌物質などに非常に高感受性を示す遺伝性疾患ブルーム症候群 (Bloom syndrome, BS), ファンコニー貧血 (Fanconi's anemia, FA), 毛細血管拡張性失調症 (ataxia telangiectasia, AT) 患者 (常染色体劣性遺伝病) 由来 B リンパ細胞株を用い、鋭敏な環境変異原物質検定法を確立しようとするものである。これらの細胞株は、患者末梢血リンパ球細胞に Epstein Barr (EB) ウィルスを感じて樹立した B リンパ性細胞株で患者のオリジナルな特徴を備え、環境変異原に高感受性という点では非常に貴重なものである。環境変異原物質の中には、人体中の特定臓器などに蓄積し、細胞の DNA レベルに変化を与える、癌、白血病など悪性腫瘍、体細胞突然変異あるいは、生殖細胞 DNA に影響を与えることにより、次代への遺伝的影響をもたらすなどの多くのケースが知られている。したがって、これらの疾病の予防には、我々が飲食ならびに大気中から摂取する物質から、より鋭敏に生物学的手法により原因物質を見つけ出すことである。本研究では、従来行なわれてきた微生物を用いた突然変異検定法の基本をヒト細胞に応用し、環境変異原物質の影響をヒト細胞の DNA、染色体異常ならびに姉妹染色分体交換のレベルでより的確に検定するものである。また、多くの環境変異原、発癌物質は、正常細胞において姉妹染色分体交換を引き起こすことが知られているが、これらの機構は現在、不明な点が多く、本研究では姉妹染色分体交換機構解明をもめざすものである。

1. BS 細胞の高頻度 SCE 機構

SCE を調べるために、プロモデオキシウリジン (BrdU) を 2 細胞世代継続的に細胞に取り込ませることが必要である。したがって、2 細胞代

目でカウントされる SCE は、1 回目サイクルで生じた (SCE_1) ものと 2 回目サイクルで生じたもの (SCE_2) の加算されたものである。また、最近、アルキル化剤などの chemical agents を正常細胞に処理して引き起こした SCE 解析では、 SCE_1 と SCE_2 はほぼ 1:1 で起こっていることが一般的にも知られており、BrdU のみで引き起こされる SCE も頻度は低いが、正常細胞では 1:1 であることが確かめられている。したがって、BrdU のみで高頻度 SCE を呈する BS 細胞（細胞当たり 80 SCE/cell）でも当然 SCE_1 と SCE_2 は 1:1 ではないかと考えられていた。しかしながら、もし BS 細胞で SCE_1 と SCE_2 が 1:1 で起こっているものであるとするならばこれまで我々が観察してきた細胞融合による BS SCE の正常化を考えがたく、これを裏付けるためには、BS 細胞の実際の SCE_1 と SCE_2 を解析することが最も重要な決め手である。幸い、 SCE_1 と SCE_2 を解析する方法として Endomitosis という方法が知られており、1 回目で生じた SCE は、Endomitosis の M₂ 期では Twin SCE とし現れ、2 回目で生じた SCE は、M₂ 期では常に Single SCE として現れるというものである。そこで、代表研究者らの樹立した BS B リンパ細胞株を用い調べた結果、BS 細胞では SCE_1 と SCE_2 が 1:1 (40:40) ではなく、Twin SCE が約 5 に対し、Single SCE が約 150 (diplochromosome 当たり) (diploid 当たり 75) という異常に不均等に起こっていることを見いだした。これは初めての事実であり、BS 細胞が BrdU に高感受性であり、BrdU を鉄型に 2 回目の DNA 合成を行なうときに SCE が誘発されたことを示すものである。言い替えれば、BrdU なしの状態では、BS といえども SCE の頻度は正常レベルと考えられる。

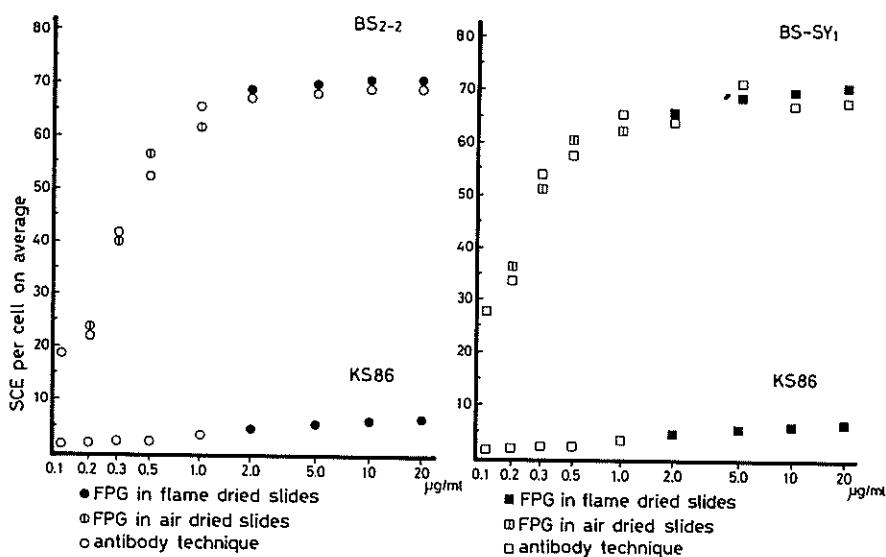


図 1. BS B リンパ細胞株 (BS₂₋₂, BS-SY₁) に種々の濃度の BrdU (0.1–20 µm/ml) を取り込ませた後の SCE を示したものである。図にも示されているように FPG 法では BrdU 濃度としては 2.0 µg/ml が限度であるが、BrdU モノクローナル抗体を用いた本方法では 0.1 µg/ml BrdU 濃度まで姉妹染色分体分染が可能であった。

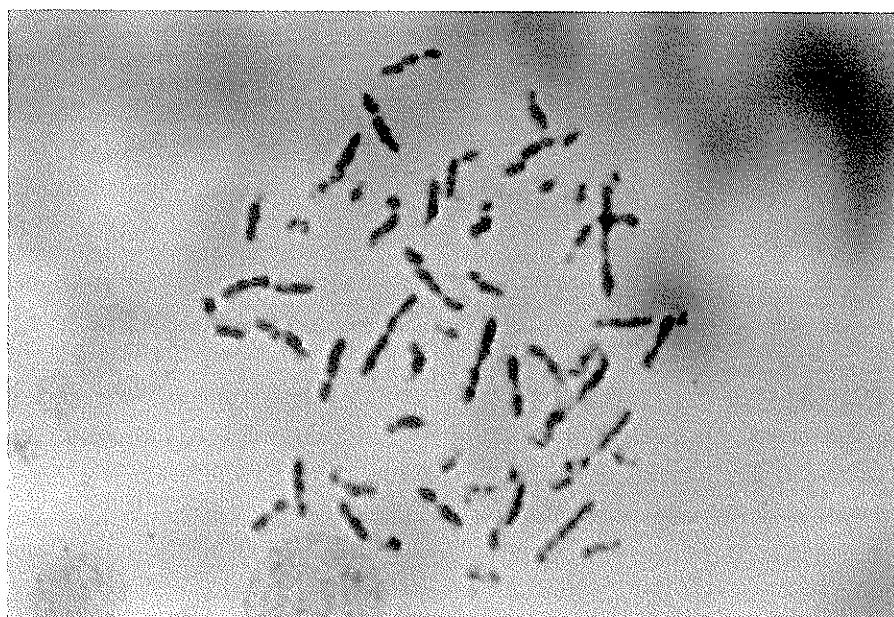


図 2. BrdU モノクローナル抗体法によって分染された BS₂₋₂ 細胞 (取り込まれた BrdU 濃度: 0.1 µg/ml) の SCE.

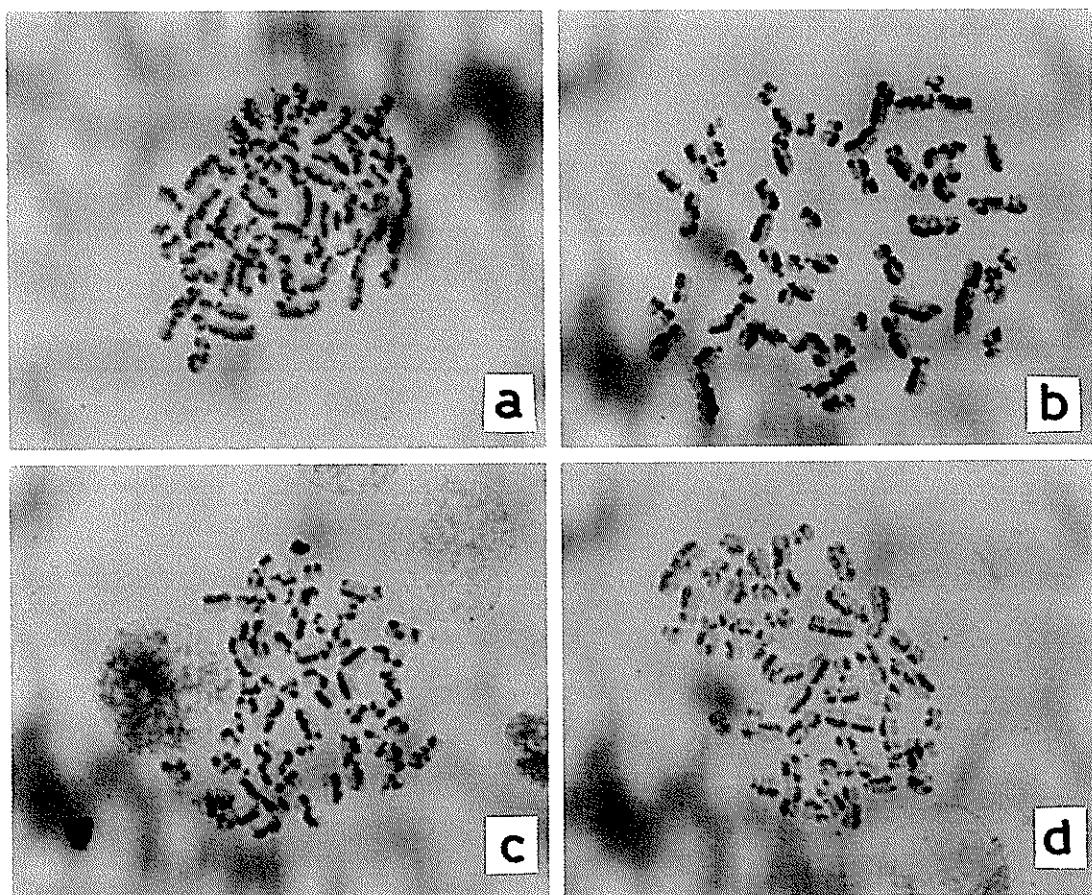


図 3. BrdU モノクローナル抗体法によって分染された BS₂₋₂ 細胞の SCE. 取り込まれた BUdR 濃度は, a, 1.0 µg/ml, b と c, 0.3 µg/ml, d, 0.2 µg/ml である.

2. BrdU モノクローナル抗体を用いた極低濃度 BrdU ラベル姉妹染色分体分染法

これまでの SCE 研究は主に FPG 法で行なわれており、細胞に取り込ませる BrdU の濃度は通常の 10.5 µg/ml がもっともよく用いられ、姉妹染色分体分染の最少量としては約 2 µg/ml であった。しかも細胞当たりの SCE 値としては、図 1 にも示されているように 10 µg/ml と 2 µg/ml の間では有意差が認められないのが現状であった。そこで我々の研究で極低濃度 BrdU ラベル下での SCE 値に興味をもっていたので BrdU モノクローナル抗体を用いた極低濃度 BrdU ラベル下における新方法を開発した。我々の開発した新方

法では細胞に取り込ませる BrdU 濃度を 10, 5.0, 3.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.3, 0.2, 0.1 µg/ml と下げ、BrdU モノクローナル抗体を用いたペルオキシダーゼ酵素抗体染色法の開発により 70 SCE ベースラインを平均で約 17-20 SCE (BrdU 濃度 0.2 µg/ml) とほぼ正常に近いレベルまで下げる事ができた。すなわち、図 1 にも示されているように通常の FPG 法では、BrdU 2 µg/ml が分染の下限であったが、BrdU モノクローナル抗体を用いたこの方法では、BrdU 0.1 µg/ml まで分染が可能であった。しかも、0.1 µg/ml BrdU では細胞当たり 10 SCE 以下とほぼ正常レベルの SCE がしばしば観察された。これは高濃度 BrdU

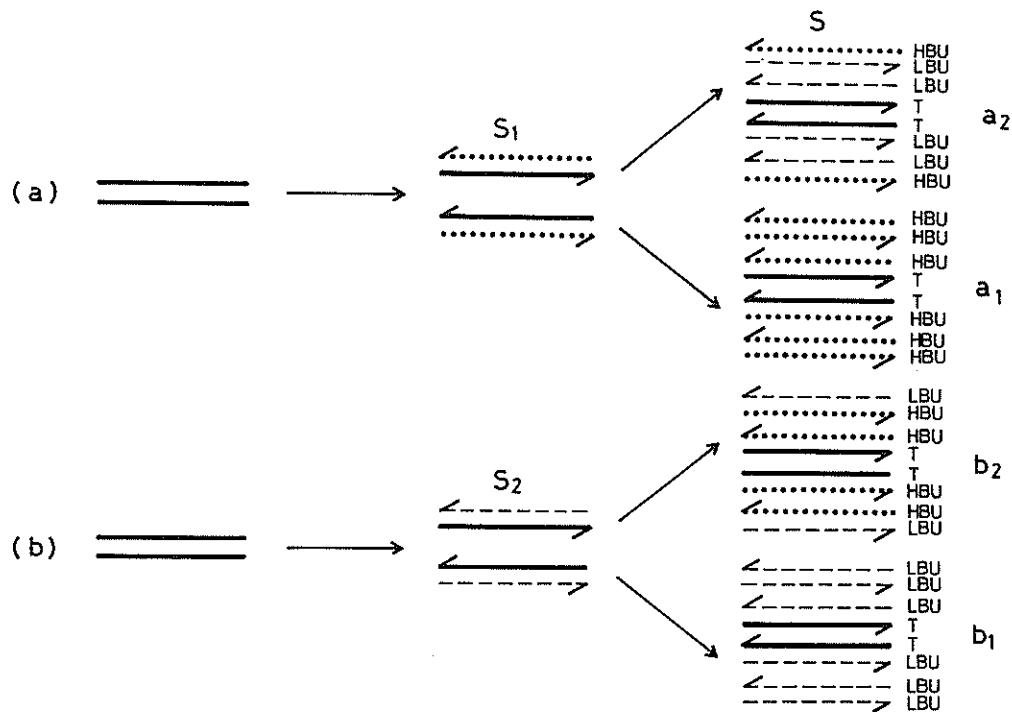


図 4. BS 細胞における BrdU template 効果を示す分子モデル。第 1 回目サイクルにおける高濃度 (HBU), 低濃度 (LBU) BrdU ラベル下で Endomitosis を誘発し, 2 回目サイクルにおける低濃度 (LBU), 高濃度 (HBU) BrdU の取り込みモデル。

(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) における SCE と比べると著しく減少しており, BS における高頻度 SCE は BrdU により引き起こされたことを強く裏付けるものである。

次に我々が開発した BrdU モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法による分染法について述べる。BS 細胞に BrdU を種々の濃度で取り込ませ, 48 時間培養後, 染色体標本を作製する。染色体標本は火炎法ではなく, 37°C のぬるま湯の上で染色体を広げる自然乾燥法により作製する。この標本を 0.07 N NaOH で 3~5 分間室温で処理し, 0.02 M PBS 5 分間, 0.3% H_2O_2 -メタノールで 15 分間, そして 0.02 M PBS で洗浄し, 1 次抗体としての抗マウス BrdU モノクローナル抗体 (1/10 希釈) と 37°C, 30 分反応させる。この反応標本を 0.02 M PBS で 30 分間洗浄し, 2 次抗体としてのベルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス Ig(1/

20 希釈) と 30 分間反応処理する。DAB 反応 (3,3'-ジアミノベンチジン-4 HCl, 20 mg/100 ml トリツマ pH 7.4~7.6, 5% H_2O_2 100 μl 添加) を室温暗室で 10 分間行ない, 0.02 M PBS で洗浄後, 脱水乾燥して検鏡する。反応しておれば, 図 2, 3 および 4 のように茶褐色に染色される。図 2 は BrdU モノクローナル抗体を用いた低濃度 BrdU (0.1 g/ml) における BS₂₋₂ の SCE を示し, 約 9 個が観察される。図 3 は BrdU モノクローナル抗体を用いた姉妹染色分体新分染法を示し, BrdU (0.2~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を BS 細胞に取り込ませた後染色体標本を作製し, 酵素抗体法により染色したものである。この写真において, 染色分体のうち DNA の両方の鎖に BrdU を取り込んだものは淡染されるがもともとのオリジナル DNA 鎖を 1 本有し, BrdU を 1 本の鎖にのみ取り込んだ方が褐色に染まっている。ギムザ法で強く染まる

表1. 細胞における BrdU template 効果、第1回目サイクルにおける高濃度、低濃度 BrdU ラベル下で Endomitosis を誘発し、第2回目サイクルにおける低濃度、高濃度 BrdU 取り込み下の single, twin SCE 値を示す。

BrdU concentration		BS B-lymphoblastoid cell lines					
First cell cycle	Second cell cycle	BS ₂₋₂			BS-SY ₁		
		Cells counted	Twin SCE	Single SCE	Cells counted	Twin SCE	Single SCE
10	10	40	5.9	139.3	30	5.7	132.6
10	0.2	40	5.7	131.1	30	5.5	129.8
0.2	0.2	40	3.7	38.9	30	4.3	49.1
0.2	10	40	3.8	40.1	30	4.4	52.4
0.3	0.3	40	4.4	57.6	30	4.0	57.9
0.3	10	40	4.6	59.4	30	4.2	59.4

方が褐色に染まっている。本方法は、永久染色法であり、方法的に確立されたものでは初めてのものであり、今後幅広く用いられるであろう。

3. BS 細胞における BrdU template 効果の分子機構について

上記の BrdU モノクローナル抗体を用いた新方法により、極低濃度 BrdU ラベル下での BS SCE 値を検索したが、BrdU 10 µg/ml での 70 SCE から BrdU 0.1 µg/ml での約 20 SCE レベルまでの著しい減少を証明してきたが、姉妹染色分体分染法には原理的には BrdU の 2 細胞世代取り込みが必須であり、BrdU 濃度ゼロ値での SCE は検定不可能であったので我々は、さらに第1回目サイクルで極低濃度 BrdU (0.2 µg/ml) ラベル下で Endomitosis を誘発し、第2回目サイクルで同じ低濃度 BrdU (0.2 µg/ml) あるいは、高濃度 BrdU (10 µg/ml) でラベルし、いわゆる第1回目サイクルで取り込まれた BrdU 量に対する2回目サイクルにおける BrdU template 効果を分子レベルに従って（図4）解析した。実験条件としては、極低濃度 BrdU ラベル下で Endomitosis を誘発し、姉妹染色分体分染を得ることは技術的にかなり困難な面も考えられたが、我々の樹立した BS B リンパ細胞株は十分な増殖能を有し、十分満足すべき結果が得られた。表1にも示されているように極低濃度 BrdU (0.2 µg/ml) を template ストランドとして BrdU を取り込んだ BS

細胞は第2回目サイクルで取り込まれた 0.2 µg/ml と 10 µg/ml (高濃度) ラベル条件下では single SCE (第2回目 SCE) の値には有意な差がなく低値を呈しており、これは第1回目に取り込まれた BrdU 量が BS SCE の高値には最も重要な条件であることを決定付する証拠と考えられる。しかも、表1にも示されているように 0.2 µg/ml BrdU 下での Twin SCE は、3.8, 4.4 とほぼ正常レベルを呈しており、これまでの研究でも指摘している BS 細胞の高 SCE は BrdU により引き起こされたものであることを決定的に裏付けるものである。BrdU モノクローナル抗体法を用いた Endomitosis 法の確立により、BS 細胞における BrdU template 効果が分子レベルでも強く裏付けた点が 3 年間の研究成果としても重要なもののひとつと考えている。現在も研究は新しい方向に日進月歩であり、さらに新しい事実が証明できると確信している。

4. ブルーム症候群 B リンパ細胞株の癌化（ヌードマウス皮下移植）

正常ならびに BS B リンパ細胞株 BS₂₋₂, 47, XY, 2p+, t(3; 15) (p25; q15), t(7; 11) (q11; p15), +m₁ を通常の培養中 (RPMI 1640, 8.5 ml+牛胎児血清, FCS, 1.5 ml) に 4 NQO, MNNG (0.3~0.5 µg/ml) を各々加え、24 時間処理を行ない、24 時間後、RPMI 1640 培地で細胞を洗い、さらにもとの培地で約 2 週間の培養を行ない、2 週間後、1×

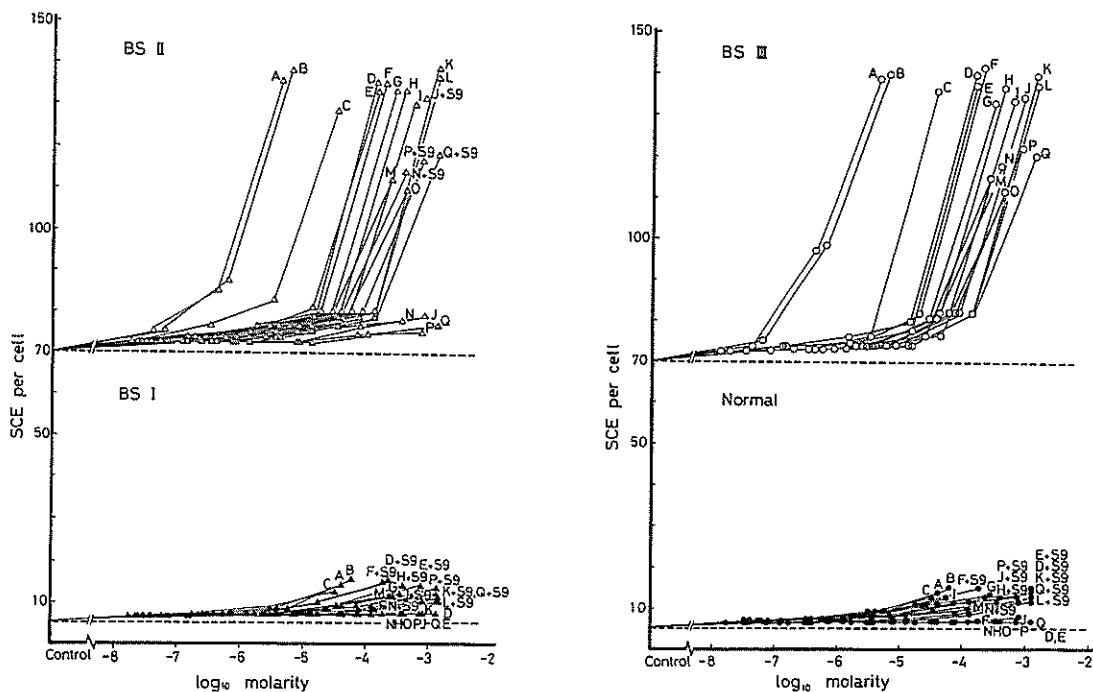


図 5, 6. 種々の発癌物質の正常および BS タイプ I, II, III 細胞 SCE に及ぼす影響. (濃度は 10^{-2} M~ 10^{-8} M)

10^7 個細胞をヌードマウスに皮下移植した。対照としては、正常および BS の未処理 B リンパ細胞株も 1×10^7 個をヌードマウスに皮下移植した。約 3 週間位で 4 NQO ならびに MNNG で処理された BS₁₋₂, BS₂₋₂ 細胞株を移植したヌードマウス皮下に Tumor が確認された。4 NQO ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 処理では、3/7 匹に Tumor を発症した。興味あることに発癌剤処理なしの BS 細胞株を移植した場合は、Tumor の発症は見られず (0/10 匹), 正常 B リンパ細胞では、4 NQO, MNNG 処理ならびに未処理は、いずれも Tumor を発症したものはなかった (未処理 0/5, 4 NQO 0/10, MNNG 0/10)。この事実は、BS 細胞は正常細胞と比べて発癌剤に高感受性であるという点では、これまでの研究成果と一致しており、遺伝性高発癌疾患 BS といえども発癌にはなんらかの環境因子のかかわりを強く示唆するものである。ヌードマウスにできた Tumor を作った時点では明らかに付加的な染色体異常が観察された。Tumor の染色体分析は、1 日培養で行なわれ、上記の orig-

inal の核型に明らかに変化が認められており、4 NQO 処理された BS₂₋₂ 腫瘍では、48, XY, 2p+, +3, t(7; 11) (q11; p15), +11; 48, XY, 2p+, +3, t(3; 15) (p25; q15), t(7; 11) (q11; p15), +7; 47, XY, 1p21-, 2p+, t(3; 15) (p25; q15), +7, 7q+ 核型, MNNG 処理された BS₂₋₂ 腫瘍では、47, XY, 1p21-, 2p+, t(3; 15) (p25; q15), t(7; 11) (q11; p15); 47, XY, t(1; 3) (p21; q41), 2p+, t(3; 15) (p25; q15), 7p+; 47, XY, 1p21-, t(3; 15) (p25; q15), 14q+ 核型が、それぞれ major clone を呈するという興味ある所見を得ている。注目される点は、BS₂₋₂ はもともと核型変化をもっているが、もともとの核型のみで Tumor を形成したもののがなく、この点においても発癌剤処理後に得られた染色体変化が癌化に強くかかわっているものと考えられる。興味ある所見としては、もともと構造異常の染色体に付加染色体 (部分トリソミー) が No. 2, No. 3, No. 7, No. 11 に見られる点、No. 1, 2 染色体に Marker 染色体などが見られる点である。

これまでの研究で、正常および BS 患者由来 B リンパ細胞株に発癌剤を作用させ、癌化を試みたが、BS B リンパ細胞株と比べ、正常 B リンパ細胞株からは、発癌剤処理後にヌードマウス皮下移植を行なっても腫瘍を形成させることはできなかった。BS B リンパ細胞株は、正常 B リンパ細胞と比べて、発癌剤に高感受性を呈し、4 NQO ($0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$) による SCE 上昇に関して、BrdU による baseline レベル (70 SCE/cell) をはるかに越えて、平均で細胞当たり約 150 SCE まで上昇が得られる非常に興味ある所見を呈した。さらに BS 細胞でもともと存在していた細胞表面イムノクロブリン (IgG) が消失し、これらの細胞が高率にヌードマウス皮下に腫瘍を形成した。これまで調べた限りでは、同じ処理を受けた正常 B リンパ細胞は、核型変化も見られず、イムノグロブリンも残っており、ヌードマウス皮下腫瘍形成も見られなかった。したがって、本研究結果より得られた BS B リンパ細胞株に発癌剤処理により異常に高頻度 SCE が引き起こされ、その結果、イムノグロブリンマーカーの消失、付加的染色体変化を起こし、これらの変化が発癌遺伝子を活性化し、癌化をもたらしたものと考えられる。今後、BS の染色体ならびに SCE 変化がいかにして発癌遺伝子活性化に関与したか追求する計画である。

5. BS B リンパ細胞系を用いた鋭敏な変異原・発癌物質検定法の確立

発癌物質の検出法としてはサルモネラ菌に対する突然変異発現性を指標として行なう Ames (アメス) テストが最も一般的な方法として用いられている。しかしながら、最近ヒト体細胞の癌原性を議論するに当たり、サルモネラ菌を用いたシステムが最良であるか否かに大きな疑問が持たれ始めている。すなわち、サルモネラ菌は微生物細胞であり、動物細胞であるヒト体細胞と基本的に相違し、したがって、物質の微生物細胞への突然変異発現性をそのすべてについてヒト体細胞への癌原性に対応させてよいかどうかという点である。また、最近 SCE による研究によれば、種々の発癌剤がヒト・哺乳動物細胞の SCE 頻度を有意に増加させることから、SCE を指標にした発癌剤検定

システムが研究されている。しかしながら、正常形質を有したヒト細胞系では、統計的には SCE の有意な増加が認められても増加率が必ずしも高値ではないため、スクリーニングに当たっては多数の細胞を調べる必要性があるなど、今一つ鋭敏性に欠ける点があり、さらに発癌剤の多くは、培養系では癌原性を示さず、肝ミクロソーム系酵素 (以下、S9 mix という) の添加により初めて活性化されるため、正常ヒト培養細胞系を用いた SCE 検定システムには S9 mix の添加が必要とされ、方法論的にも処理の複雑さが指摘されている。そして、これまで正常形質を有した細胞における SCE 検定法と、サルモネラ菌による突然変異性に関しては、6-mercaptopurine (6 MP) はアメステストで陽性であるが、正常形質細胞 SCE テストでは陰性であり、また、Urethane は SCE テスト陽性であるのに対し、アメステストでは陰性であり、その矛盾点が指摘され、信頼性に疑問が持たれている。

本研究では、従来の SCE を指標とした物質の癌原性を検定するに当たって、BS 患者由来の B リンパ細胞株を用い、より簡単で、かつ鋭敏な方法を開発すべく研究を行なった。これまで、BS 患者末梢血リンパ球に Epstein Barr (EB) ウィルスを感作して多数の B リンパ細胞株を樹立してきたが、SCE 頻度、染色体構成により、3 種類に分類した。タイプ I は、BS 由来でありながら、正常レベル SCE 頻度、正常染色体構成 (核型) を有する。タイプ II は、高頻度 SCE 形質は保有しながら正常核型を有する。タイプ III は、高頻度 SCE 形質、異常核型を有する。これらの細胞株を用い、種々の発癌剤を検索した結果、BS タイプ I の細胞は発癌物質に対する感受性は正常細胞とほぼ同じ程度であり、BS タイプ II 細胞は培養下で S9 mix を必要としない発癌剤については有効であったが、S9 mix を必要とする発癌剤については必ずしも有効ではなかった。興味ある事実は、BS タイプ III の細胞株はこれまで調べた 17 種類のうち、SCE 増加の程度の少し弱いものも認められるものの、すべて S9 mix の存在なしに検定ができる利点があることを突き止めた。

検定方法としては、BS ならびに正常 B リンパ細胞 ($1\text{--}2 \times 10^7$ cells) に BrdU $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、24 時間後に被測定物質もしくは既知の発癌物質 $0.004\text{--}400 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、さらに 24 時間培養した後、染色体標本を作製した。なお、ヒトの細胞世代時間は、24 時間であるので BrdU 存在下で 2 細胞世代目に被測定物質を入れるのが最も効果的であることが判明した。この染色体標本について SCE の分染を行ない、ヘキスト、ギムザ染色された標本で SCE をカウントし、BS と正常細胞について比較する。BS タイプ I と正常細胞は BrdU による SCE が細胞当たり 5.0 個程度であるのに対し、BS では約 70 個の SCE が見られる。そして、発癌物質処理では正常ならびに BS タイプ I ではたかだか 10 ぐらいであるのに BS タイプ II, III では 70 個の SCE の上にさらに細胞当たり 70 個 SCE の増加がみられる。検定にあたり S 9 mix 添加、無添加の BS タイプ II, III 細胞株に及ぼす影響について詳細に調べた結果、BS タイプ III では調べられた 17 種類すべての発癌物質について S 9 mix 添加、無添加にはほとんど差はない、図 5, 6 にも示されているように SCE の大幅増加が認められ、発癌物質検定には非常に有益な細胞株であることが判明した。BS タイプ II は III と異なって、2-Acetylaminofluorene (AAF), 3,3'-Dichlorobenzidine (DCB), 3,3'-Dimethylbenzidine (DMB), *N*-Nitrosodi-*n*-propylamine (DPN) のように S 9 mix 無添加の条件下では SCE がほとんど増加はみられず、S 9 mix が検定に際し、必要であった。この方法により、4-Nitroquinoline-1-oxide (4 NQO), Aflatoxin G₁ (AFLG₁), Aflatoxin B₁ (AFLB₁), 6-Mercaptopurine (6 MP), 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG), *N*-Nitroso-*N*-methylurea (MNU), Ethylmethanesulfonate (EMS), Propylenimine (PI), 2-Aminofluorene (AF), Urethane (U), Benzo[a]pyrene (BP), 7,12-Dimethyl-benz[a]anthracene (DMBA), 2-Acetylaminofluorene (AAF), Ethylenimine (EI), 3,3'-Dichlorobenzidine (DCB), 3,3'-Dimethylbenzidine (DMB), 1-Naphthylamine (1NA),

N-Nitrosodi-*n*-propylamine (DPN) の BS B リンパ細胞の SCE に及ぼす影響について調べたが、図 5, 6 にも示されているように BS B リンパ細胞株は、正常細胞と比べて SCE 増加数は有意に高く、BS 細胞系を用いての発癌物質検定の有効性が判明した。調べられた発癌物質の中には DCB, DMB, DPB, U, 6 MP のように SCE の確認できる最高濃度での SCE 增加数の多少低いものも見られたが、他の 13 種類の発癌物質はいずれも最高濃度で BrdU のみによる 70 ベースラインよりさらに 60-70 の増加数を観察した。

次に BS 細胞に対する発癌剤・変異原による染色体異常についても調べたが、BS B リンパ細胞株を発癌剤 (4-nitro-quinolineoxide, 4NQO; *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, MNNG) ならびに変異原 (Ethylmethanesulfonate, EMS; Mitomycin C, MMC; Bleomycin, Bleo) の $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 24 時間処理し、培養 24 時間後の染色体異常を調べ、正常細胞と比較したところ、正常 B リンパ細胞では、いずれの処理でも 7% から 10% ぐらいの染色体異常 (未処理では約 3%) が見られた程度であったが、BS B リンパ細胞では 4 NQO 処理では染色体異常 (染色体切断および染色分体交換を含めて) が 59%, MNNG では 64%, EMS で 42%, MMC で 55%, Bleo で 29% と正常細胞と比べると異常が高頻度であった。4NQO, MNNG 処理の方が EMS, Bleo 処理より高頻度であった。観察された染色体異常のタイプとしては、染色体、染色分体切断がいずれも高頻度であったが、4NQO, MNNG, MMC 処理では、染色分体交換有意な増加が見られた (4 NQO, 9%; MNNG, 10%; MMC, 11%)。BS 細胞は、未処理の細胞でも約 1% の頻度で染色分体交換が見られ、いずれも相同染色体間の交換 (Homologous Chromatid Interchange; HCl) が現れるのが特徴であるが、4NQO, MNNG, MMC 処理では、染色分体交換の頻度が増加し、25/35 個が HCl であったという興味がある所見が得られた。 $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の 4NQO, MNNG, MMC で処理された正常細胞では、約 1% の染色分体交換が見られた程度であり、BS 細胞が約 10 倍染色分体交

換に関しても高感受性であった。正常ならびに BS 細胞を 4NQO, MNNG, MMC (0.3 µg/ml, 24 時間) で処理し、さらに試験管内で培養を続けて行き、1, 2 週間後に染色体分析を行なったところ、正常細胞では、処理 24 時間目で観察された染色体異常はほとんど残っておらず、1, 2 週間後には常に 46, XY; 46, XX の正常核型になっていたが、処理された BS 細胞は、1, 2 週間後には、染色体転座が多く確認され、バンド分析では Nos. 1, 2, 3, 4, 7, 11, 14 などの染色体に転座マーカー染色体が見られた。これは、正常細胞には修復系が完全であるが、BS では何らかの修復系の欠陥があるため、染色体異常が大量に残るのであろうと考えられる。

本研究では、発癌物質の他、発癌プロモーター TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate ならびに 4M-TPA, 4-O-methyl-12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; PHB, phorbol の BS B リンパ細胞株 SCE に及ぼす影響について調べたが、正常細胞ならびに BS タイプ I 細胞は、いずれも TPA による SCE 増加は見られなかった。興味ある事実は、高頻度 SCE 形質を有する BS 細胞株で正常核型を有するタイプ II (BS-SY₁, BS-SY₂) 細胞は、TPA には全く反応しなかったが、核型異常を既に有しているタイプ III (BS₁₋₂, BS₂₋₂) は、いずれも TPA 濃度 (1, 10, 100 ng/ml) とともに SCE 頻度増加を認め、BrdU (Bromodeoxyuridine) による 70 baseline レベルと比べ、約 30-40 SCE の増加が観察された。これは、非常に興味ある事実であり、BS タイプ III 細胞株による環境中の種々のプロモーター類の検索に利用できる可能性を示すとともに、核型正常な BS タイプ II 細胞より、タイプ III 細胞の方が癌化過程において、より一段階進んでいることを暗示するものであると考えられる。

Control として用いた 4 M-TPA, PHB では、いずれも SCE の上昇は認められなかった。これまで TPA の SCE に及ぼす影響については、SCE を有意に上昇するという報告と全く影響がないという報告があるが、細胞の性質によって、すなわち、悪性に近い状態では反応し、正常形質細胞は

反応しないと考えることができる。

高頻度 SCE 形質保有 BS タイプ III 細胞株は多くの発癌剤に高感受性を示しており、SCE 増加を指標にした検索法は、BS 細胞における SCE 増加値に変異が少なく、少數細胞数での短時間スクリーニングが可能である点を考慮にいれると、今後さらに発展するものと期待されている。BS 細胞 (タイプ III) は、S 9 mix factor の存在なしでも種々の発癌剤で SCE 増加が見られており、これが BS 細胞の癌化しやすい性質によっているものか、あるいは、発癌剤を活性化するなんらかの機構が BS 細胞に備わっているためのものか、今後追求する必要があると思われる。さらに、最近、BS タイプ II, III 細胞株は、発癌剤処理により容易に癌化も生じ、発癌遺伝子も容易に活性化する事実も得ているので、今後の課題として、BS 細胞における高頻度 SCE ならびに染色体異常誘発に与する遺伝子ならびに発癌遺伝子活性化機構についても追求する計画である。

研究の総まとめおよび今後の問題点

3 年間の研究により、BS 細胞における高頻度 SCE メカニズムならびに BS 細胞系を用いた SCE による鋭敏な環境変異原、発癌物質検定法については一応完成することができたと言える。これまでの研究で微生物 (サルモネラ菌株) を用いた Ames テストの結果と注意深く比較検討してきたが、少なくとも BS タイプ III 細胞株は S 9 mix は全く要求せず、しかも、正常細胞系を用いた SCE 検定法よりはるかに結果が鋭敏であり、今後、BS タイプ III のシステムを用い、未知の物質についても Ames テストと比較しながら試みる計画である。また、我々の最近の研究では、BS タイプ III の細胞抽出物に間接発癌物質 (AAF, BP...など) を代謝し、Ames 系において S 9 mix とほぼ同じ効果を呈する事実を得ていることも付け加えておきたい。その他、今後の問題点としては、これらのシステムを用いた応用面をよりいっそう発展させ、BS 細胞自身の欠損因子の高頻度 SCE 誘発機構への分子レベルの関与、発癌物質、とくに間接発癌剤の培養下における代謝活性機構、さらに BS 細胞の発癌機構についてのもっと詳細な

機構解明がなされる必要がある。

著　　書

- 1) Shiraishi, Y.: Analysis of sister chromatid exchanges (SCEs) in Bloom syndrome (BS) by use of endomitotic and three-way differentiation procedures. Allan R. Lis Incorporation 150 Fifth avenue, N. Y. 29 B, 729-740, (1984).
- 2) 阿部達生, 鎌田七男, 桜井雅温: 腫瘍染色体アトラス, 10. 高発癌性遺伝病および先天異常, (10-A). 染色体切断症候群, 317-327, 南江堂, (1986).
- 3) 小泉 明, 森本兼義: SCE-姉妹染色分体交換と環境科学, 第1部第1章, SCE生成とその意義, 第5節, Bloom症候群における高頻度SCEの機作, 65-69, 第3部第2章, 好発癌性遺伝病とSCE, 第3節, 各種遺伝病のBリンパ細胞株-Bloom症候群, 543., サイエンスフォーラム, (1986).

学術論文

- 1) 白石行正: Bloom症候群—最近の知見一, 組識培養, 9 (10), 369-374, (1983).
- 2) 白石行正: 前白血病性疾患における染色体的検査の臨床的意義, Oncologia, 5, 29-38, (1983).
- 3) Shiraishi, Y., Fujishita, M., Miyoshi, I., Kondo, N. and Orii, T.: Transformation of Bloom syndrome T-lymphocytes by co-cultivation with a lethally irradiated human T-cell line carrying type C virus particles. Gann, 74, 213-218, (1983).
- 4) Shiraishi, Y., Yoshimoto, S., Miyoshi, I., Kondo, N., Orii, T. and Sandberg, A. A.: Dimorphism of sister chromatid exchange in Bloom's syndrome B- and T-cell lines transformed with Epstein Barr and adult T-cell leukemia viruses. Cancer Res., 43, 3836-3840, (1983).
- 5) Shiraishi, Y., Tanaka, Y., Kato, M., Miwa, M. and Sugimura, T.: Effect of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors on the frequency of sister chromatid exchanges in Bloom syndrome cells. Mutat. Res., 122, 223-228, (1983).
- 6) Ishihara, T., Sasaki, M., Oshimura, M., Kamada, N., Yamada, K., Okada, M., Sakurai, M., Sugiyama, T., Shiraishi, Y. and Kohno, S.: A summary of cytogenetic studies on 534 cases of chronic myelocytic leukemia in Japan. Cancer Genet. & Cytogenet., 9, 81-92, (1983).
- 7) Miyoshi, I., Taguchi, H., Ohtsuki, Y. and Shiraishi, Y.: Isolation of ATL virus from healthy ATL carriers by mixed lymphocyte culture. Oncogenes and Retroviruses: Evaluation of Basic Findings and Clinical Potential, 243-

249, (1983).

- 8) Shiraishi, Y. and Yosida, T. H.: Analysis by the three-way differentiation of Bloom syndrome sister chromatid exchanges in Bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. Proc. Japan Acad., 59, 227-230, (1983).
- 9) Shiraishi, Y., Yosida, T. H. and Sandberg, A. A.: Analyses of bromodeoxyuridine-associated sister chromatid exchanges (SCEs) in Bloom syndrome based on cell fusion: Single and twin SCEs in endoreduplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 4369-4373, (1983).
- 10) Taguchi, T. and Shiraishi, Y.: Radiation sensitivity and chromosomal changes human leukemic T-cell lines. Jpn. J. Genet., 58, 393-403, (1983).
- 11) Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Fujishita, M., Ohtsuki, Y., Taguchi, H., Shiraishi, Y., Akagi, T. and Minezawa, M.: Isolation in culture of a type C of virus from a Japanese monkey seropositive to adult T-cell leukemia-associated antigens. Gann, 74, 323-326, (1983).
- 12) Shiraishi, Y. and Yosida, T. H.: Remarkable difference on frequency of single and twin sister chromatid exchanges in endoreduplicate Bloom syndrome cells. Annual Report of Natl. Inst. Genet., 33, 4041 (1983).
- 13) 森本兼義, 西 義介, 白石行正, 三浦邦彦: 姉妹染色分体交換の研究の現状—国際シンポジウム報告—放射線生物研究, 19 (1), 9-21, (1984).
- 14) 白石行正: ブルーム症候群患者細胞での高頻度SCE,—その機作と応用—キシクロジーフォーラム, 7 (4), 33-39, (1984).
- 15) 白石行正: 高発癌性遺伝病ブルーム症候群. 臨床婦人科産科, 38 (10), 781-785, (1984).
- 16) 白石行正: 好発癌性遺伝病—Bloom症候群, Fanconi貧血, Ataxia telangiectasia, 色素性乾皮症—. 臨床科学, 20 (5), 572-578, (1984).
- 17) Shiraishi, Y., Yosida, T. H. and Sandberg, A. A.: Malignant transformation of Bloom syndrome B-lymphoblastoid cell lines by carcinogens (Carcinogenesis/nude mice/colony formation/SCE/immunoglobulin). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 5102-5106, (1985).
- 18) Shiraishi, Y.: Bloom syndrome B-lymphoblastoid cells are hypersensitive towards carcinogen and tumor promoter-induced chromosomal alterations and growth in agar. EMBO J., 4 (10), 2553-2560, (1985).
- 19) Shiraishi, Y., Taguchi, T., Ohta, Y. and Hirai, K.: Chromosome localization of Epstein-Barr virus (EBV) genome in Bloom syndrome B-lymphoblastoid cell lines transformed with EBV. Chromosoma, 93, 157-164, (1985).

- 20) Taguchi, T. and Shiraishi, Y.: Analysis of DNA chain growth rates in Bloom syndrome B-lymphoblastoid cell lines using DNA fiber autoradiography. *Jpn. J. Genet.*, 60, 335-345, (1985).
- 21) 白石行正: ブルーム症候群患者由来 B リンパ細胞株の発癌物質に対する高感受性形質について. *Oncologia*, 14, 143-145, (1985).
- 22) 金 鎮敬, 白石行正: ブルーム症候群 B リンパ細胞株の発癌剤による癌化と細胞形質の変化について. *Oncologia*, 15, 120-123, (1985).
- 23) Shiraishi, Y., Yosida, T. H. and Sandberg, A. A.: Inhibition of bromodeoxyuridine-associated sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome cells with cycloheximide. *Cancer Genet. & Cytogenet.*, 17, 43-54, (1985).
- 24) Shiraishi, Y., Taguchi, T., Kubonishi, I., Taguchi, H. and Miyoshi, I.: Chromosome abnormalities, sister chromatid exchanges, and cell cycle analysis in phytohemagglutinin-stimulated adult T cell leukemia lymphocytes. *Cancer Genet. & Cytogenet.*, 15, 65-77, (1985).
- 25) Bamezai, R., Shiraishi, Y. and Taguchi, H.: Centromere spreading in case of megaloblastic anemia cured under TC 199 culture conditions. *Cancer Genet. & Cytogenet.*, 20, 1-4, (1986).
- 26) Bamezai, R. and Shiraishi, Y.: Cell cycle progression and SCE-rate of Bloom syndrome cells with/without co-cultivation in the presence/absence of normal cells. *Exp. Cell Res.*, 164, 163-173, (1986).
- 27) Shiraishi, Y.: SCE levels in Bloom syndrome cells under very low Bromodeoxyuridine (BrdU) concentrations: Monoclonal anti BrdU antibody. *Mutat. Res.*, (1986) in press.
- 28) Shiraishi, Y.: Hypersensitive character of Bloom syndrome B-lymphoblastoid cell lines usable for sensitive carcinogen detection. *Mutat. Res.*, (1986) in press.
- 29) 田口尚弘, 白石行正: DNA ファイバーオートラジオグラフィーによるブルーム症候群 B リンパ細胞の DNA 鎮伸長速度について. 細胞, 18 (8), 35-39 (1986).
- 学会発表**
- 1) 白石行正, 田口尚弘: ヒト B リンパ細胞株の染色体異常, 日本解剖学会総会, 1982, 4, 岐阜.
 - 2) 白石行正: 染色体異常・姉妹染色分体交換に及ぼす細胞融合の影響について, 日本解剖学会総会, 1982, 4, 岐阜.
 - 3) 白石行正: Endomitosis 法によるブルーム症候群細胞の SCE 解析, 1982, 8, 大阪.
 - 4) 田口尚弘, 白石行正: X 線に高感受性のヒト T 細胞株から分離された X 線抵抗性変異株について, 日本遺伝学会, 1982, 11, 福岡.
 - 5) 白石行正: ブルーム症候群の高頻度 SCE の Endomitosis による解析, 日本遺伝学会, 1982, 11, 福岡.
 - 6) Miyoshi, I., Kubonishi, I. & Shiraishi, Y.: Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-culturing normal human cord leukocytes and human leukemic T cells. American Cancer Society, 1982, 4, Saint Louis.
 - 7) 白石行正: 高発癌性疾患ワークショップ. ニューヨーク州立ロズウェルパーク記念研究所, 1982, 4, パッファロー.
 - 8) 白石行正: 細胞融合によるブルーム症候群細胞形質の変化. 日本解剖学会総会, 1983, 4, 大阪.
 - 9) 白石行正, 田口尚弘: 性腺発育不良と染色体異常. 日本解剖学, 1983, 4, 大阪.
 - 10) 白石行正: ブルーム症候群 B リンパ細胞株の各種発癌剤に対する感受性. 日本癌学会, 1983, 10, 名古屋.
 - 11) 白石行正: 3 段階姉妹染色分体分染法によるブルーム症候群 SCE の解析. 日本癌学会, 1983, 10, 名古屋.
 - 12) 田口尚弘, 白石行正: X 線高感受性ヒト急性リンパ性白血病由来 BS 細胞株のブレオマイシン感受性. 日本遺伝学会, 1983, 10, 仙台.
 - 13) 白石行正: ブルーム症候群細胞の Three-way Differentiation による SCE の解析. 日本遺伝学会, 1983, 10, 仙台.
 - 14) Shiraishi, Y.: Analysis of SCEs in Bloom syndrome by use of endomitotic and three-way differentiation techniques. International Symposium on sister chromatid exchange. 1983, 12, Long Island, USA.
 - 15) Shiraishi, Y.: Extreme sensitivity of Bloom syndrome (BS) lymphoblasts to Bromocompounds, alkylating and carcinogenic agents. International Symposium on DNA repair and chromosome aberrations. Banaras Hindu University, 1983, 12, Varanasi, India.
 - 16) 白石行正: ブルーム症候群の高頻度姉妹染色分体交換機構の解析. 文部省がん特別研究総括班公開シンポジウム, 1984, 2, 東京.
 - 17) 田口尚弘, 白石行正: ヒト急性リンパ性白血病 (ALL) 患者由来 T 細胞株 (CCRF-HSB 2, CCRF-HSB 2-M) と正常 B 細胞株 (CCRF-SB) の薬剤感受性. 日本遺伝学会第 57 回大会, 1985, 10, 神戸.
 - 18) 白石行正, 田口尚弘: ブルーム症候群 (BS) B リンパ細胞株における DNA 鎇伸長速度について. 日本遺伝学会第 57 回大会, 1985, 10, 神戸.
 - 19) 白石行正: S 9 mix 存在下, 非存在下におけるブルーム症候群 B リンパ細胞株の発癌剤に対する高感受性について. 第 44 回日本癌学会総会,

- 1985, 10, 東京.
- 20) 白石行正, 大朏祐治: 悪性リンパ腫完全覚解時に樹立されたブルーム症候群 B リンパ細胞株の特性. 第 44 回日本癌学会総会, 1985, 10, 東京.
- 21) 白石行正: ブルーム症候群の高頻度姉妹染色分体交換の機構について. 日本人類遺伝学会第 29 回大会, 1985, 11, 富山.
- 22) 田口尚弘, 白石行正: 高頻度姉妹染色分体交換形質を有する Bloom 細胞の DNA 鎮伸長速度の解析. 日本人類遺伝学会第 29 回大会, 1985, 11, 富山.