博士論文

ハイコンテントアナリシスによる化合物の遺伝毒性誘発機序解明系の構築

安藤　雅光

目次

略語 3

第１章　序論 5

第２章　材料と方法 11

第３章　結果 22

第４章　考察 50

第５章　参考文献 58

謝辞 64

略語

ATPase	adenosine triphosphatase
CA	compartment analysis
CC	cell cycle
CCCP	carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone
CV	coefficient of variation
CYP	cytochrome P450
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DSB	DNA double-strand break
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLP	Good Laboratory Practice
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCA	high-content analysis
HCS	high-content screening
HTS	high-throughput screening
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IgG	immunoglobulin G
K	potassium
LC	liquid chromatography
LOAEL	lowest observed adverse effect level

M	mol/L
MEC	minimum effective concentration
MEM	minimum essential medium
MLA	mouse lymphoma assay
MNNG	methylnitronitrosoguanidine
MS	mass spectrometry
Na	sodium
pH3	phospho histone H3
ROS	reactive oxygen species
S.D.	standard deviation
SOP	standard operating procedure
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
tk	thymidine kinase
VMS	visual mining studio
γ-H2AX	phospho histone H2AX

第１章　序論

遺伝毒性試験について

医薬品の申請には、厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（GLP 省令）に従って実施された以下の毒性試験の試験結果が必要とされている。

・単回投与毒性試験（急性）

・反復投与毒性試験（亜急性、慢性）

・生殖発生毒性試験

・遺伝毒性試験

・がん原性試験

・依存性試験

・安全性薬理試験

・トキシコキネティクス（TK）

・その他の毒性（抗原性, 局所刺激性試験、 皮膚（光）感作性試験など）

遺伝毒性とは、遺伝毒性物質に生体が曝露されることで、DNA 損傷を起こしたり、染色体分裂異常等を起こす毒性を意味している。遺伝毒性物質により DNA や染色体に異常が生じると、発癌性が誘発されると考えられている。また生殖細胞に突然変異が生じると、遺伝的な障害が生じる可能性があり、生殖発生の異常にも関与していると考えられている。

上記した通り、医薬品の申請には遺伝毒性の総合的な評価が求められている。しかし、1 つの試験ですべての遺伝毒性物質を検出することは現在の技術では不可能と考えられている。そのため、*in vitro* 及び *in vivo* での複数の遺伝毒性試験を実施して遺伝毒性物質の検

出を行っている。

日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）では、日米及び EU の規制当局による新薬承認審査の基準を国際的に統一することを目的に設立された機関であり、非臨床安全性試験に関しても各種ガイドラインを発行している。2012 年に改訂された ICH S2（R1）ガイドラインでは、遺伝毒性の評価に関するガイドラインが策定されており、以下の標準的試験の組み合わせが推奨されている[1]。

i）細菌を用いる遺伝子突然変異試験（Ames 試験）

ヒスチジンもしくはトリプトファン要求性突然変異を持つサルモレラ菌及び大腸菌を用いる試験である。これらの菌株の生育にはヒスチジンもしくはトリプトファンが必要だが、変異原物質による復帰突然変異によりヒスチジンもしくはトリプトファンを含まない培地でも生育できるようになる特性を用いて遺伝毒性の検出を行っている。ヒスチジン合成酵素遺伝子及びトリプトファン合成遺伝子への変異の入り方により、フレームシフト型と点変異型の菌株が存在し、5 菌株を用いた試験を行っている。

ii）ほ乳類細胞を用いて染色体損傷を細胞遺伝学的に評価する *in vitro* 試験

in vitro 小核試験、*in vitro* 染色体異常試験、マウスリンフォーマ tk 試験（MLA）の 3 試験が広く使用されている。*in vitro* 小核試験を例に挙げると、哺乳類細胞に被験物質を曝露して細胞分裂を起こす程度の一定期間培養した後、細胞中の DNA を染色、固定して細胞を観察する。細胞毒性が 50%を超さない被験物質濃度付近で観察を行い、核の他に、染色体が分断された断片（小核）を持つ細胞の割合を数えることで、遺伝毒性を検出している。この系は、哺乳類細胞を用いることができるため、よりヒト細胞の反応に近い結果が得られるという利点がある反面、使用する細胞によっては偽陽性が多くなるなどの欠点が指摘されている。

iii）げっ歯類造血細胞を用いる染色体損傷検出のための *in vivo* 試験

in vitro だけでは検出することができない変異原物質の検出のため、また *in vitro* 試験での偽陽性を排除するために用いられている。*in vivo* 小核試験では、ラットもしくはマウスに被験物質を投与し、骨髄細胞を採取する。採取した骨髄細胞の DNA を染色し、幼若赤血球に存在する小核の頻度を数えることで、遺伝毒性を検出する。

遺伝毒性誘発のメカニズムには、大きく分けて 2 種類ある。DNA アルキル化や DNA アダクト（付加体）形成など、DNA に直接作用するものと、微小管重合阻害/脱重合阻害、DNA 合成酵素阻害など DNA に直接作用しないものである。DNA に直接作用するメカニズムを持つ化合物は、作用に閾値がないと考えられており、それ以後の研究開発は困難である。一方、DNA に直接作用しないものに関しては、その作用に閾値があると考えられており、*in vivo* 遺伝毒性試験の結果から、十分な安全域が担保されると考えられる場合は、それ以後の研究開発も可能である [2,3]。そのため、哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験で陽性の結果を得た場合は、追加の機序解明試験を行うことによって、DNA に直接作用する物質かどうかを明らかにすることで、最終的な遺伝毒性の総合的な評価を行うこととなる。上記理由により遺伝毒性の作用機序を解明するための試験の重要性は増してきている。

現在、遺伝毒性作用機序を解明するための試験として、動原体染色試験と DNA アダクトーム試験などが用いられている。動原体染色は、細胞の動原体を染色して染色体の構成を観察することで、構造的な染色体異常が生じているのか、異数体が生じているのかを選別できる [4]。一方、DNA アダクトーム試験は、被験物質を曝露した細菌、哺乳類細胞もしくは被験物質を投与したげっ歯類の臓器などから DNA を抽出し、その DNA に被験物質またはその代謝物等が付加体として結合しているかどうかを LC/MS/MS 等を用いて解析する技術である [5]。DNA アダクトーム試験は、DNA に直接作用する化合物を高感度で検出できるという利点がある。しかし、動原体染色試験や DNA アダクトーム試験などは、熟練した観

察者、技術者等が必要なこと、一度に 1～数個の化合物しか処理できないなど比較的ロースループットな実験系である。

以上のことから、遺伝毒性機序解明のための試験系も十分に揃っているとは言えない状況にある。また、製薬企業では、日々非常に多くの化合物が合成されており、遺伝毒性試験や遺伝毒性機序解析もよりハイスループットに行うことができる系の構築が期待されている。

ハイコンテントスクリーニングについて

High-content screening（HCS）は、オルガネラ、核、細胞質やそこに存在するタンパク質の状態を蛍光顕微鏡画像を用いてハイスループットに把握する Cellomics という思想に基づいて開発された技術である [6]。1996 年に米国の Cellomics 社によって機器が開発され、その後、他のメーカーも機器開発に参入した。現在もっとも用いられている HCS 用機器は、Cellomics の技術を受け継いだ Thermo scientific 社の Array Scan と General Electrics 社の In Cell Analyzer である。

用いられる蛍光顕微鏡の解像度の向上、解析技術の向上などにより、近年国内製薬メーカーなどでも導入する会社が増えている。HCS の利点は、遺伝子発現解析などと異なり、DNA 切断、リン酸化タンパク質の検出、細胞周期の状態など、遺伝子発現の解析では分かりづらい変化を捉えることができることである。逆に、1 回に染色できるタンパク質やオルガネラが限られているため、遺伝子発現解析ほど網羅的な解析ができないことが欠点として挙げられる。以上より、私は HCS という技術を用いれば、よりハイスループットに遺伝毒性機序解明を行うことができると考え、系の構築を目指し実験を行った。本試験では、γ-H2AX と細胞周期停止を指標とすることとした。以下にその理由を説明する。

γ-H2AX に関して

ヒストン H2AX は、ヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質の一種である。H2AX タンパク質は、DNA 二本鎖切断が生じたときに Ser139 が迅速にリン酸化され、γ-H2AX と呼ばれるフォームになることが報告された[7]。その後、DNA 鎖切断を起こす様々な化合物（DNA を損傷させる化合物、DNA に結合する化合物、DNA トポイソメラーゼ阻害剤などの酵素阻害剤等）によってもγ-H2AX の産生が誘導されることが報告され[8]、遺伝毒性のマーカーとして注目を浴びている。そのため、遺伝毒性機序として DNA 鎖切断を検出するマーカーとして最適であると判断した。

細胞周期停止に関して

細胞は、細胞周期の各ステージにチェックポイントがあり、DNA や細胞環境などに異常が生じたときにチェックポイントが働き細胞周期を停止させる。多くの化合物も、その作用機序によって細胞周期停止を生じることが報告されている。放射線や DNA の損傷を生じるような化合物は、S 期もしくは G2 期で細胞周期を停止させる[9,10]。一方、微小管に作用する化合物は、M 期で細胞周期を停止させる[11]。以上のような現象を利用することで、細胞周期停止が遺伝毒性機序解明のマーカーになると考えた。

本試験の意義

これまで実用化できる段階で HCS 系が用いられている遺伝毒性試験としては、*in vitro* 小核試験のみであった。HCS を用いた *in vitro* 小核試験はハイスループットに遺伝毒性の有無を判別できるが、遺伝毒性の作用機序を明らかにすることはできない。

本研究では、γ-H2AX と細胞周期停止をマーカーとした HCS 系を構築することで、遺伝毒性機序解明に用いることができる系の構築が行えるかを目的とした。遺伝毒性機序解明のために HCS を用いる系の開発を実用フェーズで行うことは新規的な取り組みである。ま

た、γ-H2AX は遺伝毒性のマーカーとして注目されているが、HCS で定量的に測定した前例はなく、細胞周期停止を遺伝毒性のマーカーとして HCS で用いる研究も前例がない。そのため、γ-H2AX と細胞周期をマーカーとして HCS 系を用いて検出することで遺伝毒性機序解明を行うことのできる系の構築に成功すれば、医薬品の遺伝毒性機序解明の効率性を高め、早期に開発を進めるか、もしくは中止するかを決定できる革新的な技術となりうると考えられる。

第２章　材料と方法

構築した HCS 系について

本試験で用いた HCS 系は、Apredica 社（旧 Cellumen 社）から技術供与を受けたものである[12]。本来は生体における肝毒性を予測するシステムとして Apredica 社（旧 Cellumen 社）社が開発したものを、遺伝毒性機序解明を目的として使用できるかどうかを検討した。Apredica 社（旧 Cellumen 社）社はその後、CellCiphr panel1 と命名してこのシステムをキット化して販売した。現在は販売を終了しており、個々の試薬を購入して試験を行った。

実験のスケジュール

HCS を用いた実験は 1 週間単位で行い、以下のスケジュールで行われた。

月曜日	火曜日	水曜日	木曜日	金曜日
・384well プレートに細胞播種	・被験物質暴露 ・1 時間処理プレートの染色 ・1 時間処理プレートの画像取得	・24 時間処理プレートの染色 ・24 時間処理プレートの画像取得	・画像取得予備日 ・結果解析	・結果解析

細胞培養

本試験には、American Tissue Culture Collection（ATCC）より購入した HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞は、10%の仔ウシ血清（FBS, ライフテクノロジーズ）、nonessential amino acid solution、sodium pyruvate 及び penicillin-streptomycin を加えた MEM 培地（ライフテクノロジーズ）で培養した。培養は、37℃、5% CO_2 のインキュベータの中で行

った。また、細胞密度が 80～90%コンフルエントに達した段階で、培養液を除いて PBS（ライフテクノロジーズ）で洗い、0.25% trypsin-1mmol/L EDTA を加えて 37℃で約 10 分間インキュベーションした後、培養フラスコをたたいて細胞をはがした。ウォーターバスを用いて 37℃に温めた培地を適量加え、2×10^5 個/フラスコとなるように 75cm^2 フラスコに播種し、継代維持した。

ラット尾部からのコラーゲン抽出

細胞培養プレートをコラーゲンコートするために、ラット尾部よりコラーゲン溶液を調製した。他試験などで用いたラットの尾を切断し、5～6 本集めた。手術用ハサミでラットの尾の根本に切れ目を入れ、皮を剥いた。皮を剥いた尾の先端を、フォーセップを用いてつかみ、繊維質を引き抜いた。この操作を尾が短くなるまで続けた。引き抜いた繊維質より、肉片を取り除き、室温で一晩乾燥させた。繊維質の重量を測定し、0.25g / 500mL の割合になるように、0.1%酢酸溶液を加え、さらに一晩、4℃の冷蔵庫で保存した。50mL の遠沈管に移し、10,000rpm で 1 時間遠心を行った。上清を 15mL 遠沈管に 10mL/Tube となるように分注し。-20℃で凍結して保存した。コラーゲンコート時に自然解凍して用いた。

被験物質の入手

被験物質は、各メーカーから購入して使用した。Actinomycin D、Aphidicolin、Colcemide、Cycloheximide、Erythromycin、Etoposide、Famotidine、Kanamycin sulfate、Lidocaine、Ouabain octahydrate 及び Saccharin sodium salt hydrate は、Sigma-Aldrich より購入した。Caffeine、Campthotecin, Cytarabine、Hydralazine hydrochloride、Hydroxyurea、Menadione、Methylnitronitrosoguanidine（MNNG）、Paclitaxel 及び Sodium chroride は、和光純薬工業より購入した。Naloxone hydrochloride は、Enzo Life Science 社より購入した。Alpha-methyl-L-dopa は東京化成工業より購入した。Lovastatin は、Tocris

Bioscience 社より購入した。Ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA）は、同仁化学研究所より購入した。Ofloxacin は、LKT Laboratories 社より購入した。Paroxetine maleate は、田辺三菱製薬内で合成されたものを用いた。

被験物質ストック溶液の調製

試験に用いる最高濃度の 100 倍の濃度の被験物質溶液をストック溶液として調製した。被験物質を秤量し、DMSO（和光純薬）または大塚蒸留水（大塚製薬工場）を添加して溶解させた。1.5mL チューブに分注し、-20℃で冷凍して保存した。必要時に解凍して試験に用いた。

384 well プレートのコラーゲンコーティング

上記で調製したコラーゲンを 0.1%酢酸溶液で 10 倍に希釈し、ディープウェルプレートに移した。自動液体分注ワークステーション（JANUS）にコラーゲン溶液と 384 well プレート（BD Falcon）をセットし、20 μL/well となるように分注した。分注後に 384 well プレートを遠心し、クリーンベンチ内で 5 分間静置した。384 well プレート内のコラーゲン液を転倒して廃棄し、キムワイプでプレート上面の水分を除去した。ウェルが乾燥するまで蓋を外した状態でクリーンベンチ内に 3～4 時間ほど静置した。ウェルの乾燥を確認した後、アルミホイルで遮光して、冷蔵保存した。384 well プレートのコラーゲンコーティングは、細胞播種の前日に行った。

384 well プレートへの細胞播種

HepG2 細胞を PBS でリンス後、0.25%トリプシン-1mmol/L EDTA を 2mL 添加し、37℃で 10 分間インキュベーションして細胞を剥がした。培養液 8mL を添加し、細胞を回収した。10mL の注射筒（20G 注射針）で細胞懸濁液を 4～5 回出し入れすることで、単細胞化

を行った。0.4%トリパンブルー（ライフテクノロジーズ）を用いて生細胞数を計測した。細胞懸濁液を培養液で希釈し、被験物質 1 時間処理群には 1.68×10^5cells/mL、24 時間処理群には 0.96×10^5cells/mL の細胞浮遊液を調製した。調製した細胞浮遊液とコラーゲンコートした 384 well プレートを自動液体分注ワークステーション（JANUS）にセットし、25μL/well となるように細胞浮遊液を分注した。384 well プレートに播種された細胞は、CO2 インキュベータの中で一晩培養した。

被験物質処理

前日に 384 well プレートに播種した細胞に被験物質を曝露するため、被験物質の処理を行った。このシステムでは、一度に 16 化合物を曝露することができる。各被験物質について、ストック溶液の濃度を最高濃度として公比 2、10 濃度の希釈系列を媒体で希釈して調製した。培養液を用いて 50 倍希釈して被験物質処理溶液を調製した。自動液体分注ワークステーション（JANUS）に被験物質処理溶液と細胞培養 384 well プレートをセットし、25μL/well となるように被験物質処理溶液を分注した。1 処理時間あたり、2 プレートを使用した（プレート 1 及びプレート 2 とする）。プレート 1 の陽性対照として Camptothecin 及び Anisomycin を、プレート 2 の陽性対照として Paclitaxel と Carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone（CCCP）を同時に曝露した。また、プレートの四隅に溶媒対照を 6well ずつ（計 24well）設定した。これは、プレートの前後左右で染色の程度に差がないかを確認する役目も持つ（図 1 参照）。被験物質が曝露された 384 well プレートは、処理時間（1 時間及び 24 時間）終了まで CO2 インキュベータ内で培養した。

MitoTracker 染色

1 時間及び 24 時間処理したプレート 2 に、400nmol/L の MitoTracker Red を 50μL/well となるように自動液体分注ステーション（JANUS）を用いて分注した。CO2 インキュベー

タで 30 分間インキュベーションした後、MitoTracker Red 含有培地をウェルから除き、50 μL の培養液を加えてさらに CO2 インキュベータで 30 分間インキュベーションした。

細胞固定

細胞固定には、未染色のプレート 1 と、MitoTracker Red で染色したプレート 2 を用いた。7.2%のホルマリンと 2μg/mL の Hoechst33342 を含有する HBSS（ライフテクノロジーズ）を調製し、50μL/well となるように、プレート 1 及びプレート 2 に添加した。室温で 30 分間静置した後、ウェル内の溶液を除いた。HBSS を 80μL/well となるように添加した。

細胞浸透化

細胞を固定しただけでは、染色用抗体が効率よく細胞質まで浸透しない。界面活性剤を用いて細胞膜に穴をあけることで、効率よく染色を行えるようにした。

ウェル内の HBSS を除いた後、0.5% (v/v) Triton X-100 を 20μL/well となるようにプレート 1 及びプレート 2 に添加した。室温で 5 分間静置した後、ウェル内の溶液を除いた。HBSS を 80μL/well となるように添加した。再度ウェル内の溶液を除いた後、HBSS を 80μL/well となるように添加した。抗体染色をする直前にウェル内の液体を除いた。

抗体染色

プレート 1 及びプレート 2 用 1 次抗体カクテル溶液（表 1-1）を調製した。96well ディーププレートに 60μL/well となるように分注し、自動液体分注ワークステーションにセットした。また、細胞浸透化をした 384well プレートもセットし、10μL/well となるように抗体カクテル液を分注した。室温で 1 時間静置した後、ウェルから抗体溶液を除いた。HBSS を 80μL/well となるように添加した。2 次抗体処理前にウェル内の HBSS を除いた。

プレート 1 及びプレート 2 用 2 次抗体カクテル溶液（表 1-2）を調製した。96well ディ

ーププレートに 60μL/well となるように分注し、自動液体分注ワークステーションにセットした。また、細胞浸透化をしたプレートもセットし、10μL/well となるように抗体カクテル液を分注した。室温で 1 時間静置した後、ウェルから抗体溶液を除いた。HBSS を 80μL/well となるように添加し、除く作業を 2 回繰り返して染色済みプレートとした。染色済みサンプルプレートは、透明なプレートシールでシールして画像スキャン用サンプルとした。

蛍光顕微鏡画像

染色済みのプレートは、Array Scan VTI を用いて蛍光顕微鏡画像を取得した。Array Scan VTI は、蛍光顕微鏡画像を取得すると同時に、画像解析ソフトウェアのアルゴリズムを選択して数値解析を行う。各プレートとも、compartment analysis（CA）及び cell cycle（CC）のアルゴリズムを用いて蛍光顕微鏡画像を取得した。Compartment analysis は、核内や細胞質内など細胞の区画（compartment）の平均蛍光強度などを算出するために使用された。また、Cell cycle アルゴリズムは、細胞周期の状態を Hoechst の染色から算出するために使用された。各ウェル 6 視野の画像を取得した。各パラメータとその意味を表 1-3 に示した。

数値解析

画像解析より算出された数値は、専用の解析ソフト（Visual Mining Studio / VMS）を用いて行われた。この専用の解析ソフトは、株式会社数理システム（現 NTT データ数理システム）へ委託して作製した。この解析ソフトは、画像解析から得られた数値データを Array Scan サーバーから抽出する機能、抽出したデータからグラフを作成する機能、グラフから AC_{50} 及び最少反応濃度（MEC）を算出する機能、AC_{50} と MEC からヒートマップを表示する機能等を持つ。また、他の試薬を用いて新しい系を構築しても使用できるよう、汎用性

を持たせた仕様になるようにした。実際の解析イメージについては、結果の項を参照のこと。

Luminex システムを用いた Caspase9 と Cleaved PARP の検出

6 ウェルプレートで HepG2 細胞を 24 時間培養した後、被験物質を暴露した。暴露後、1、3、6、24 時間後にそれぞれ細胞を PBS で洗浄し、Cell lysis buffer(シグマ社)を 200μL/well 添加して細胞懸濁液を調製した。その後、MILLIPLEX MAP Apoptosis 3plex kit を用いてサンプルの調製を行った。細胞懸濁液 25μL に抗体が結合したビーズ溶液 25μL を添加して、2 時間室温でゆっくり振盪しながらインキュベーションした。その後、フィルタープレートを用いて洗浄液でビーズを洗浄して測定サンプルとした。Luminex200（ルミネックス社）を用いて Caspase 9、cleaved PARP と GAPDH を測定した。測定した caspase 9 と cleaved PARP の値は、GAPDH の値で補正した。試験は n=2 で行った。

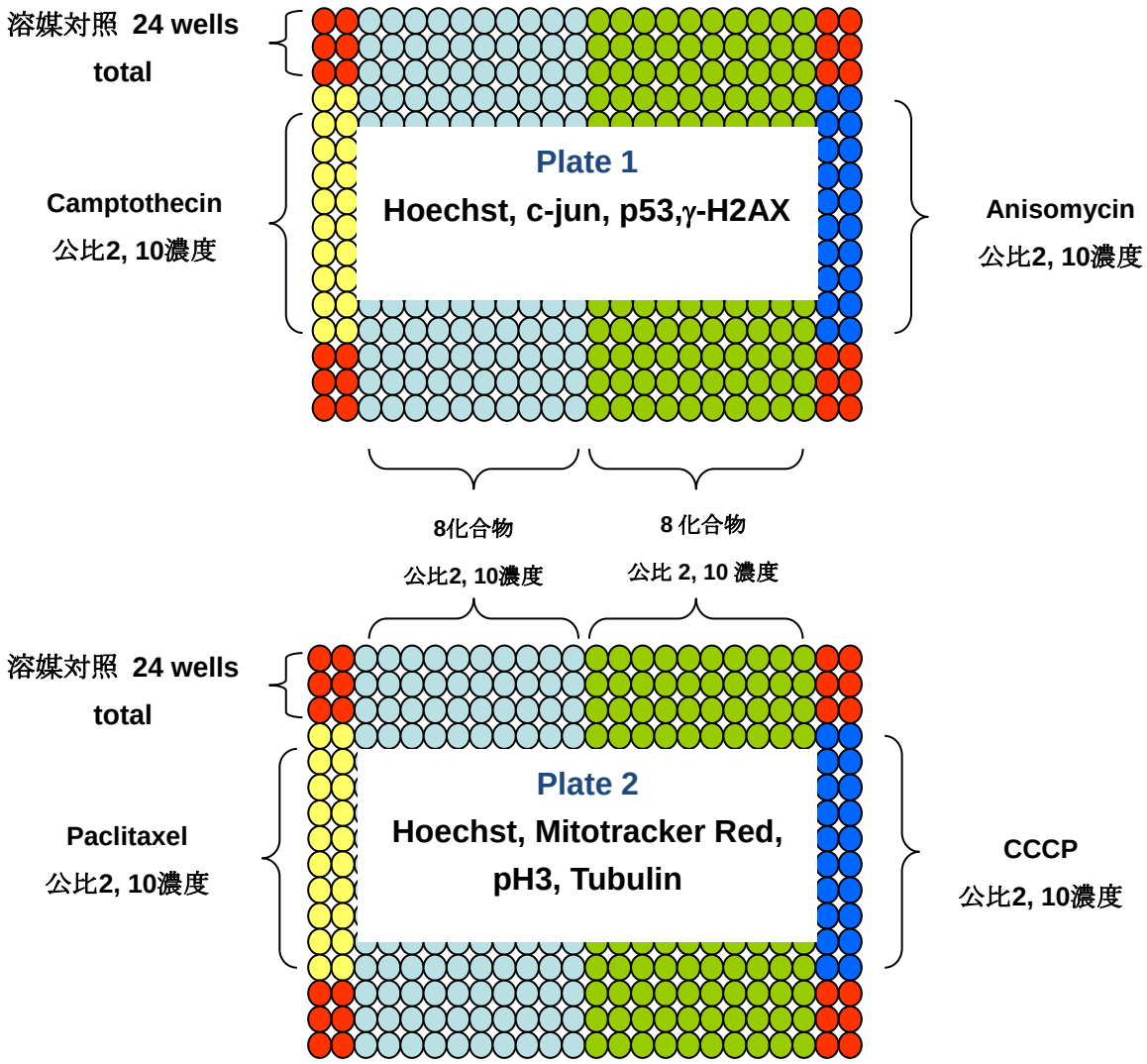


図１．プレート１及びプレート２のレイアウト（Apredica 社 SOP より引用、改編）

384 ウェルプレートの配置図を示す。左右 2 列は、四隅の溶媒対照（DMSO コントロール）と陽性対照からなる。四隅の溶媒対照は、染色むらができていないかを確認するため、及び MEC を算出するときの DMSO コントロールの平均値±2S.D.を算出するために用いられた。3～12 列及び 13～22 列は化合物の暴露に用いられた。

表 1-1. 1 次抗体溶液

プレート 1 用 パラメータ	染色試薬名	メーカー カタログ番号	ストック溶液の 調整方法	抗体カクテル溶 液の希釈倍率
核	Hoechst 33342	Sigma B2261	10mg/mL に調 製	10000 倍
DNA 鎖切断	抗γ-H2AX 抗体	Millipore 05-636	そのまま使用	200 倍
ストレスキナーゼ	抗リン酸化 c-jun 抗体	Millipore 06-659	そのまま使用	200 倍
DNA 損傷	抗 p-53 抗体	Millipore PC35	試薬と等量のグ リセロールを添 加	400 倍
プレート 2 用 パラメータ	染色試薬名	メーカー カタログ番号	ストック溶液の 調整方法	抗体カクテル溶 液の希釈倍率
核	Hoechst 33342	Sigma B2261	10mg/mL に調 製	10000 倍
M 期マーカー	抗リン酸化 ヒストン H3 抗体	Millipore 06-570	試薬と等量のグ リセロールを添 加	400 倍
チューブリン	抗チューブリ ン抗体	Millipore 05-829	試薬と等量のグ リセロールを添 加	1000 倍

表 1-2. ２次抗体溶液

プレート１用パラメータ	染色試薬名	メーカー カタログ番号	ストック溶液の調整方法	抗体カクテル溶液の希釈倍率
核	Hoechst 33342	Sigma B2261	10mg/mL に調製	10000 倍
DNA 鎖切断	FITC 標識抗マウス IgG 抗体	Millipore AP192	500μL の 50%グリセロール溶液に溶解	300 倍
ストレスキナーゼ	Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体	Millipore AP182	500μL の 50%グリセロール溶液に溶解	300 倍
DNA 損傷	Cy5 標識抗ヒツジ IgG 抗体	Millipore AP184S	500μL の 50%グリセロール溶液に溶解	300 倍
プレート２用パラメータ	染色試薬名	メーカー カタログ番号	ストック溶液の調整方法	抗体カクテル溶液の希釈倍率
核	Hoechst 33342	Sigma B2261	10mg/mL に調製	10000 倍
M 期マーカー	FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体	Millipore AP182F	試薬と等量のグリセロールを添加	300 倍
チューブリン	Cy5 標識抗マウス IgG 抗体	Millipore AP192S	500μL の 50%グリセロール溶液に溶解	300 倍

表 1-3. Array Scan による解析システム

パラメータ	プレート	アルゴリズム	染色試薬	認識領域	パラメータ数値
細胞生存率 (Cell loss)	1、2 共通	CC	Hoechst 33342	核	核数
核サイズ (Nucear size)	1、2 共通	CC	Hoechst 33342	核	核の長径
細胞周期 (Cell cycle)	1、2 共通	CC	Hoechst 33342	核	2N/4N 比
DNA 鎖切断 (DNA strand break)	1	CA	抗γ-H2AX 抗体	核	平均蛍光強度
ストレスキナーゼ (Stress kinase)	1	CA	抗リン酸化 c-jun 抗体	核	平均蛍光強度
DNA 損傷 (DNA damage)	1	CA	抗 p-53 抗体	核	平均蛍光強度
ミトコンドリア膜電位 (Mitochondrial potential)	2	CA	MitoTracker Red	細胞質	閾値よりも蛍光強度の強い細胞の割合
ミトコンドリア量 (Mitochondrial mass)	2	CA	MitoTracker Red	細胞質	蛍光強度の面積
M 期マーカー (Mitotic arrest)	2	CA	抗リン酸化ヒストン H3 抗体	核	平均蛍光強度
チューブリン (Microtubule stability)	2	CA	抗チューブリン抗体	核	平均蛍光強度

第３章　結果

陽性対照及び溶媒対照を用いた系の構築の確認

Apredica 社（旧 Cellumen 社）からこの系の技術移管を受けるに当たって、陽性対照及び溶媒対照を用いて測定系がうまく移管されているかを 3 回実験して確認した。Apredica 社が各パラメータ基準としている化合物と、AC_{50} の背景値の平均を表 2-1 に示す。Apredica 社の背景値の分布から、この AC_{50} の 1/5～5 倍の範囲に測定値が収まることをクライテリアとして実験を行った。グラフ作成及び AC_{50} 算出には XL fit（CTC ラボラトリーズ）を用いた。また、プレートの四隅に配置された溶媒対照（DMSO コントロール）の各パラメータの値の CV 値が、20%以下であることを同様に系構築のクライテリアとした。

3 回繰り返し実験を行ったところ、各パラメータの AC_{50} は、Apredica 社の示した AC_{50} に近い値が再現性良く得られた（表 2-2）。また、溶媒対照（DMSO コントロール）の CV 値も再現性良く 20%に抑えられていた（表 2-3）。以上の結果より、適切な系の構築に成功したと結論した。

解析ソフトの開発

系の導入当初、Apredica 社（旧 Cellumen 社）のソフトを使用して解析を行っていた。このソフトは、XLfit を用いて 4-parameter logistic model でカーブフィッティングを行い、AC_{50} を算出するというものであった。しかし実際に使用してみると、以下のような問題があることが明らかになった。

①カーブフィッティングの問題

濃度依存的にシグモイドカーブを描くような反応が得られる化合物では 4-parameter logistic model でうまくカーブフィッティングができた。しかし、化合物によってはベルシェイプのようなカーブを描くものもあり、4-parameter logistic model でフィッティングで

きない例があった（図 2-1）。

②AC_{50}に関する問題

上記で述べたとおり、パラメータに明らかな反応があった化合物でもフィッティングがうまくいかない場合、AC_{50}が算出されないという問題があった。また、化合物によってパラメータの最大反応値が違うため、化合物ごとに最大反応値を目視で確認して概略値を設定してグラフを書かせる必要があった。また、毒性試験では一般的にAC_{50}などの値よりも毒性が発現する最小毒性量（LOAEL）が大事であることから、AC_{50}に代わる指標が必要であった。

上記の 2 点の問題点の解決案として、以下のように改善案を考えた。

①カーブフィッティングの問題

4-parameter logistic model は残し、AC_{50}は算出させることとした。これは主に、Cell loss のIC_{50}を算出させるためであった。4-parameter logistic model でうまくフィッティングできないカーブを描くために、kernel smoothing method を別途採用した。Kernel smoothing method は、曲線が通る濃度に近いポイントほど高い重み付けをすることで、ベルシェイプを描く化合物などでもその形に追従するカーブを描くことができる方法である（図 2-2）。

②AC_{50}に関する問題

上記で述べたとおり、AC_{50}は算出させることとした。これとは別に、Kernel smoothing method で描かせた曲線が、溶媒対照（DMSO コントロール）の平均値±2S.D.と接する点を最少反応濃度（MEC）と定めて算出させた（図 2-2）。

上記改善案を採用し、株式会社 NTT 数理システム（旧株式会社数理システム）に開発を依頼し、新しい解析システムを完成させた。

HCS 解析システムを用いた遺伝毒性メカニズムの解明

構築した HCS 実験系及び解析システムを用いて、遺伝毒性メカニズムの機序解明にこの系が使用できるかどうかを検証した。検証には様々な作用機序を持つ 19 個の遺伝毒性物質（Ames 試験陽性化合物 5 個、Ames 試験陰性化合物 14 個）と 7 個の非遺伝毒性物質を用いた[13-17]。本試験で用いた化合物を表 3-1 に示す。また、各化合物の作用機序を表 3-2 に示す。

γ-H2AX による DNA 損傷の検出

序論で述べたとおり、ヒストン H2AX は DNA 鎖リン酸化されたときに迅速にリン酸化され、γ-H2AX となる。DNA 鎖切断を誘発すると考えられる 10 化合物（Ames 陽性 5 化合物、Ames 陰性遺伝毒性物質 5 化合物）及び DNA 鎖切断を誘発しないと考えられる 16 化合物（Ames 陰性遺伝毒性物質 9 化合物、非遺伝毒性物質 7 化合物）を 1 時間及び 24 時間処理して HCS 系で検出、解析を行った。

DNA の二本鎖切断を誘発するトポイソメラーゼ I 阻害薬の Camptothecin を 1 時間暴露した蛍光顕微鏡画像例を図 3-1 に示す。溶媒対照と比較し、Camptothecin（1μmol/L）を暴露した HepG2 細胞の核領域は、抗γ-H2AX 抗体の染色濃度が高いことがわかる。また、プロットしたグラフを図 3-2 に示す。グラフでは、横軸に化合物の濃度を、縦軸に抗γ-H2AX 抗体の核内の平均蛍光強度をプロットした。グラフでは、γ-H2AX が Camptothecin の濃度依存的に上昇していることがわかる。

各化合物の 1 時間処理及び 24 時間処理後の最少反応濃度（MEC）のグラフを図 3-3 に示す。点線の左側が DNA 鎖切断を誘発する化合物、点線の右側が DNA 鎖切断を誘発しない化合物である。1 時間処理の Ames 陽性化合物では、Naloxone 以外の化合物でγ-H2AX の上昇が観察された。Ames 陰性で DNA 鎖切断を誘発する化合物（Camptothecin、Etoposide、Cytarabine、Aphidicolin、Actinomycin D）では、Actinomycin D 以外の化合

物でγ-H2AX の上昇が観察された。DNA 鎖切断を誘発しない遺伝毒性物質及び非遺伝毒性物質 16 化合物のうち、Cycloheximide 及び Alpha-methyl-L-dopa でγ-H2AX の上昇が観察されたが、それ以外の化合物では上昇は観察されなかった。1 時間処理での DNA 鎖切断を誘発する化合物を検出する検出感度は、80%（8 化合物/10 化合物中）、特異度は 87.5%（14 化合物/16 化合物中）であった。一方、24 時間処理後では、Ames 陽性化合物及び Ames 陰性の DNA 鎖切断を誘発する化合物はすべてγ-H2AX の増加が観察された。DNA 鎖切断を誘発しない遺伝毒性物質及び非遺伝毒性物質 16 化合物のうち、8 化合物でγ-H2AX の増加が観察された。24 時間処理での DNA 鎖切断を誘発する化合物を検出する検出感度は、100%（10 化合物/10 化合物中）、特異度は 50%（8 化合物/16 化合物中）であった。

以上の結果より、高い感度及び特異度で DNA 鎖切断を検出するには、1 時間処理の方が 24 時間処理よりも優れていると考えられた。

<u>Luminex による caspase9 及び cleaved PARP の検出</u>

γ-H2AX の検出にあたり、24 時間処理よりも 1 時間処理のほうが高感度、高特異度で DNA 鎖切断を検出できた。24 時間処理の特異度が低かったのは、化合物によるアポトーシスにより DNA の断片化が起こり、γ-H2AX が上昇していると考えられた。実験手技上、1 時間処理よりも処理時間を短くするのは困難であった。一方、アポトーシスが起こらない範囲で長時間処理した方が検出感度よく検出できる可能性が考えられた。そのため、Luminex システムを用いて代表的な化合物（Menadione/10μmol/L、Nocodazole/0.2μmol/L、Etoposide/2μmol/L ）を 1、3、6、24 時間 HepG2 細胞に暴露した細胞懸濁液中の caspase 9 及び cleaved PARP を検出した。Caspase 9 及び cleaved PARP は、代表的なアポトーシスのマーカータンパク質である。その結果のグラフを図 4 に示す。グラフは、caspase 9 及び cleaved PARP をそれぞれ GAPDH で補正し、1 時間処理時の caspase 9 及び cleaved PARP の値を 1 として表示してある。その結果、caspase 9 は。3 時間処理後の Menadione

で 1.78 倍、Nocodazole で 1.1 倍、Etoposide で 1.23 倍に増加していた。6 時間処理後では、Menadione で 2.0 倍、Nocodazole で 1.7 倍、Etoposide で 2.1 倍に増加していた。24 時間処理後では、Menadione で 9.7 倍、Nocodazole で 7.9 倍、Etoposide で 7.4 倍に増加していた。一方、cleaved PARP は、3 時間処理後の Menadione で 2.3 倍、Nocodazole で 1.4 倍、Etoposide で 1.4 倍に増加していた。6 時間処理後の Menadione で 2.3 倍、Nocodazole で 1.5 倍、Etoposide で 2.0 倍に増加していた。24 時間処理後の Menadione で 20.0 倍、Nocodazole で 22.5 倍、Etoposide で 13.7 倍に増加していた。以上の結果より、3 時間処理から徐々に caspase 9 及び cleaved PARP が増加していた。

細胞周期解析による遺伝毒性作用点の解明

遺伝毒性物質はその作用機序により、DNA 鎖切断を起こすもの、チューブリンなどに作用して正常な紡錘体形成を阻害し有糸分裂の異常を起こすものなどがある。それらの作用機序によって、細胞周期の中で化合物特有の作用点があると考えられた。例えば、DNA 鎖切断を起こす化合物は、DNA を複製する S から G2 期にかけて細胞周期停止を起こし、紡錘体形成阻害を起こす化合物は有糸分裂を行う M 期で細胞周期停止するという報告がある。また、高浸透圧や細胞内イオン濃度変化などは G1 期停止を起こすという報告もある。この特性を生かして、化合物による細胞周期停止期を観察することは、遺伝毒性機序の推定に役立つと考えた。細胞周期停止期の観察には、Cell cycle（2N/4N 比）, phospho histone H3 及び tubulin のパラメータを用いた。Cell cycle が上昇している場合は、2N 細胞の比率が上昇しているので G1 期停止、cell cycle が低下している場合は 4N 細胞の比率が増加しているので S/G2 期もしくは M 期停止と考えられた。また、cell cyle が低下している状態で、phospho histone H3 に変化がないものは S/G2 期停止、上昇しているものは M 期停止と分類された。

様々な作用機序を持つ遺伝毒性物質 19 化合物、非遺伝毒性化合物 7 化合物を HCS システ

ムを用いて細胞周期解析を行った。

S/G2 期停止を起こす代表的な化合物である Cytarabine（0.1μmol/L）と、M 期停止を起こす Colcemide（0.0625μmol/L）で処理した HepG2 細胞の蛍光顕微鏡画像を例として示す（図 5-1）。Cytarabine 処理細胞と比較して、Colcemide 処理細胞は phospho-histone H3 の蛍光強度が強く観察された。チューブリンも同様に、Colcemide 処理細胞で蛍光強度が強く観察された。また、Cytarabine と Colcemide 処理群の cell cycle、phospho-histone H3、Tubilin のグラフを図 5-2 に示す。横軸は被験物質濃度、縦軸は核内の蛍光強度から算出した各パラメータの数値を示す。Cell cycle は、Cytarabine も Colcemide も濃度依存的に低下している。これは、2N/4N 比が低下し、4N 細胞の割合が増加していることを表している。そのため、Cytarabine と Colcemide は、S/G2 期停止もしくは M 期停止を起こしていることを示している。一方、phospho-histone H3 は、Cytarabine では変化していないが、Colcemide では濃度依存的に増加している。これは、Cytarabine は、S/G2 期停止、Colcemide は M 期停止を起こしていることを示している。核内の tubulin を測定することで、紡錘体の異常を検出できると考え測定を行った。しかしながら、tubulin に作用する Colcemide においても濃度依存的に上昇するグラフは得られなかった。また、後述する全化合物の結果でも、tubulin は色々な化合物で反応してしまい、細胞周期を検出するパラメータとしては不適であると結論した。

すべての化合物のヒートマップを図 5-3 に示す。Naloxone 以外の Ames 陽性化合物処理群は、S/G2 期停止を起こした。DNA 合成を阻害する Camptothecin、Etoposide、Cytarabine、Aphidicolin、Actinomycin D 処理群で S/G2 期停止を起こした。そのほかにも、Ouabain octahydrate、Kanamycin sulfate、Ofloxacin 処理群も S/G2 期停止を起こした。チューブリンに作用する化合物である Colcemide と Paclitaxel は、M 期停止を起こした。Caffeine、Sccharin sodium salt、Sodium chloride、Erythromycin、Lidocaine 処理群は G1 期停止を示した。

試験再現性の確認

本試験で用いた被験物質のうち、代表的な化合物を用いて試験再現性の確認を行った。各作用機序を考慮し、Ames 陽性化合物である Menadione、DNA 鎖切断を誘発し、S/G2 期停止を生じる Camptothecin と Epoposide、紡錘体形成を阻害して M 期停止を生じる Colcemide 及び遺伝毒性陰性化合物の Famotidine を用いて試験を行った。再現性を確認したパラメーターは、γ-H2AX の 1 時間処理、cell cycle 及び mitotic arrest の２４時間処理とした。それぞれ２回試験を行い、グラフの形及び MEC の値に乖離がないかを確認した。結果を図 6-1、図 6-2 及び図 6-3 に示した。

γ-H2AX に関しては、Menadione、Etoposide 及び Camptothecin で再現性良く上昇が観察され、MEC も 5 倍以内に納まっていた。DNA 鎖切断作用のない Colcemide と Famotidine では、２回の試験共にγ-H2AX の上昇は観察されず、MEC も算出されなかった。Cell cycle に関しては、Menadione、Etoposide、Camptotechin 及び Colcemide において 2N/4N 比の低下が観察された。MEC も 5 倍以内に納まっていた。細胞周期に影響がない Famotidine では、２回とも変化が見られなかった。Mitotic arrest に関しては、Colcemide のみで２回の試験とも上昇が観察された。MEC もほぼ同じ値を示した。他の被験物質に関しては、２回の試験とも変化が観察されなかった。以上の結果、それぞれの化合物の２回の試験結果のグラフの形、及び MEC の値は極めて近似したものであり、再現性の高い系であると考えられた。しかし、今回の試験では、予算と時間の関係上すべての化合物の再現性を確認することはできなかった。

表 2-1. 系構築のクライテリア（陽性対照）

パラメータ	陽性対照	プレート	タイムポイント（時間）	Apredica 社 AC_{50} (μmol/L)
Cell loss	Camptothecin	1	24	0.28
Nuclear size	Camptothecin	1	24	0.0063
DNA strand break	Camptothecin	1	1	0.074
Stress kinase	Anisomycin	1	1	0.031
DNA damage response	Camptothecin	1	24	0.039
Cell cycle arrest	Paclitaxel	2	24	0.070
Mitochondrial potential	CCCP	2	1	26
Mitochondrial mass	CCCP	2	24	13
Mitotic arrest	Paclitaxel	2	24	0.34
Microtube stability	Paclitaxel	2	24	0.21

表 2-2. 陽性対照結果

パラメータ	Apredica 社 AC_{50} (μmol/L)	実験 1 回目 AC_{50} (μmol/L)	実験 2 回目 AC_{50} (μmol/L)	実験 3 回目 AC_{50} (μmol/L)
Cell loss	0.28	0.19	0.23	0.29
Nuclear size	0.0063	0.0053	0.0051	0.0019
DNA strand break	0.074	0.170	0.120	0.230
Stress kinase	0.031	0.023	0.033	0.033
DNA damage response	0.039	0.035	0.057	0.052
Cell cycle arrest	0.070	0.100	0.0120	0.0190
Mitochondrial potential	26	78	100	23
Mitochondrial mass	13	10	8	5
Mitotic arrest	0.34	0.12	0.29	0.36
Microtube stability	0.21	0.07	0.08	0.07

表 2-3. 溶媒対照の CV 値

パラメータ	実験 1 回目 CV（%）	実験 2 回目 CV（%）	実験 3 回目 CV（%）
Cell loss	6.9	5.0	6.4
Nuclear size	1.3	1.0	0.8
DNA strand break	8.3	5.8	10.0
Stress kinase	11.0	6.9	11.5
DNA damage response	14.1	9.0	6.4
Cell cycle arrest	9.5	6.9	9.1
Mitochondrial potential	2.6	2.0	0.5
Mitochondrial mass	5.3	6.1	7.9
Mitotic arrest	6.1	4.1	4.1
Microtube stability	14.9	13.0	6.7

表 3-1. 使用した被験物質と各種遺伝毒性試験結果

Compound name	Cas no.	Top conc (μM)	Ames	*in vitro* MN	*in vitro* cytogenetics	Carcinogenicity	Ref
Ames positive compounds							
Menadione	58-27-5	100	Pos/Neg	N/A	N/A	N/A	1
Hydralazine hydrochloride	304-20-1	1000	Pos	N/A	Pos	Pos	1
Hydroxyurea	127-07-1	200	Pos	Pos	Pos	Pos	1
MNNG	70-25-7	200	Pos	Pos	Pos	Pos	1
Naloxone hydrochloride	357-08-4	2000	Pos	N/A	Pos	N/A	2
Ames negative in vitro genotoxic compounds							
Camptothecin	7689-03-4	1	Neg	Pos	Pos	N/A	1, 3
Etoposide	33419-42-0	10	Neg	Pos	Pos	N/A	1
Cytarabine	147-94-4	0.4	Neg	Pos	Pos	Neg	1
Aphidicolin	38966-21-1	0.4	Neg	Pos	N/A	N/A	1
Actinomycin D	50-76-0	0.2	Neg	Pos	Pos	Pos	3
Colcemide	477-30-5	1	Neg	Pos	N/A	N/A	1
Paclitaxel	33069-62-4	1	Neg	Pos	Pos	N/A	1
Cycloheximide	66-81-9	500	Neg	Pos	N/A	N/A	1
Ouabain octahydrate	211-139-3	1	N/A	N/A	N/A	N/A	1
Kanamycin sulfate	25389-94-0	1000	N/A	Pos	N/A	N/A	1
Caffeine	58-08-2	1000	Neg	Pos	Pos	Neg	1
Alpha-Methy-L-dopa	555-30-6	1000	Neg	N/A	Pos/Neg	Neg	4
Saccharin sodium salt hydrate	82385-42-0	40000	Neg	N/A	Pos	Neg	1
Sodium chloride	7647-14-5	200000	Neg	N/A	Pos	Neg	1
Non-genotoxic compounds							
Erythromycin	114-07-8	1000	Neg	N/A	Neg	N/A	5
Lidocaine	137-58-6	2000	Neg	N/A	Neg	Neg	5
Lovastatin	75330-75-5	20	Neg	N/A	Neg	Pos	5
Famotidine	76824-35-6	2000	Neg	N/A	Neg	Neg	5
EDTA	6381-92-6	2500	Neg	N/A	Neg	Neg	1
Ofloxacin	82419-36-1	4000	Neg	N/A	Neg	N/A	5
Paroxetine maleate salt	64006-44-6	200	Neg	N/A	Neg	Pos	5

Pos, positive response; Neg, negative response; N/A, not available

Ames, Ames 試験結果; *in vitro* MN, *in vitro* 小核試験結果, *in vitro* cytogenetics, *in vitro* 染色体異常試験結果; Carcinogenicity, がん原性試験結果

表 3-2. 評価化合物の遺伝毒作用機序及び薬効

Ames positive compounds	
Menadione	活性酸素産生
Hydralazine hydrochloride	アダクト形成
Hydroxyurea	アダクト形成
MNNG	アダクト形成
Naloxone hydrochloride	麻薬拮抗薬（メカニズム不明）
Ames negative in vitro genotoxic compounds	
Camptothecin	トポイソメラーゼ I 阻害
Etoposide	トポイソメラーゼ II 阻害
Cytarabine	DNA ポリメラーゼ阻害
Aphidicolin	DNA 複製阻害
Actinomycin D	RNA ポリメラーゼ阻害、DNA ポリメラーゼ阻害
Colcemide	微小管脱重合
Paclitaxel	微小管安定化
Cycloheximide	タンパク質合成阻害
Ouabain octahydrate	Na^+/K^+ ATPase 阻害
Kanamycin sulfate	細菌のタンパク質合成阻害
Caffeine	抗頭痛薬（メカニズム不明）
Alpha-Methy-L-dopa	α２刺激薬（メカニズム不明）
Saccharin sodium salt hydrate	高浸透圧、イオンバランス変化
Sodium chloride	高浸透圧
Non-genotoxic compounds	
Erythromycin	マクロライド系抗生物質
Lidocaine	局所麻酔薬
Lovastatin	HMG-CoA 還元酵素阻害薬
Famotidine	ヒスタミン H2 受容体拮抗薬（H2 ブロッカー）
EDTA	キレート剤
Ofloxacin	DNA ジャイレース阻害剤
Paroxetine maleate salt	SSRI

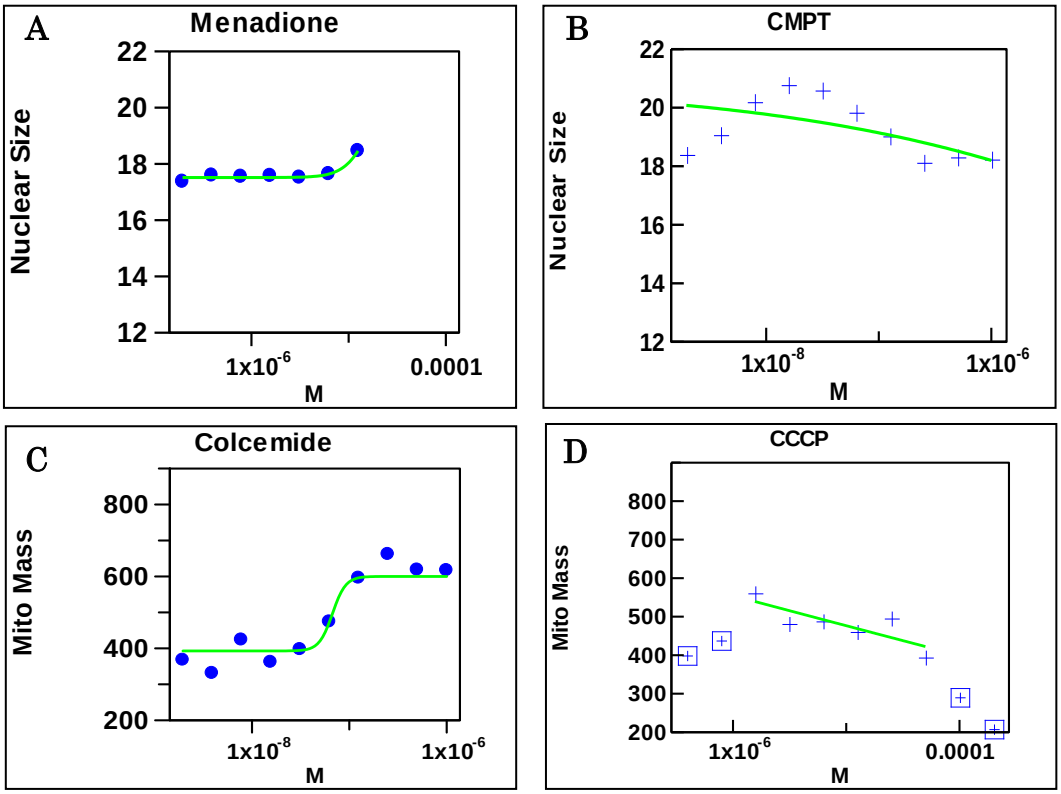


図 2-1.カーブフィッティングの成功例と失敗例（XLfit）

Apredica 社（旧 Cellumen 社）の解析システムで解析時のグラフ例を示す。横軸は化合物濃度、縦軸はパラメータの値を示している。図 A 及び C は、4-parameter logistic model でフィッティングがうまくいった例、図 B 及び D はベルシェイプのプロットパターンであったため、フィッティングがうまくいかなかった例である。図 B 及び D のようなケースが生じた場合、反応はあるが、フィッティングがうまくいかなかったために AC_{50} が算出されない、つまり反応がなかったものとしてカウントされてしまう。

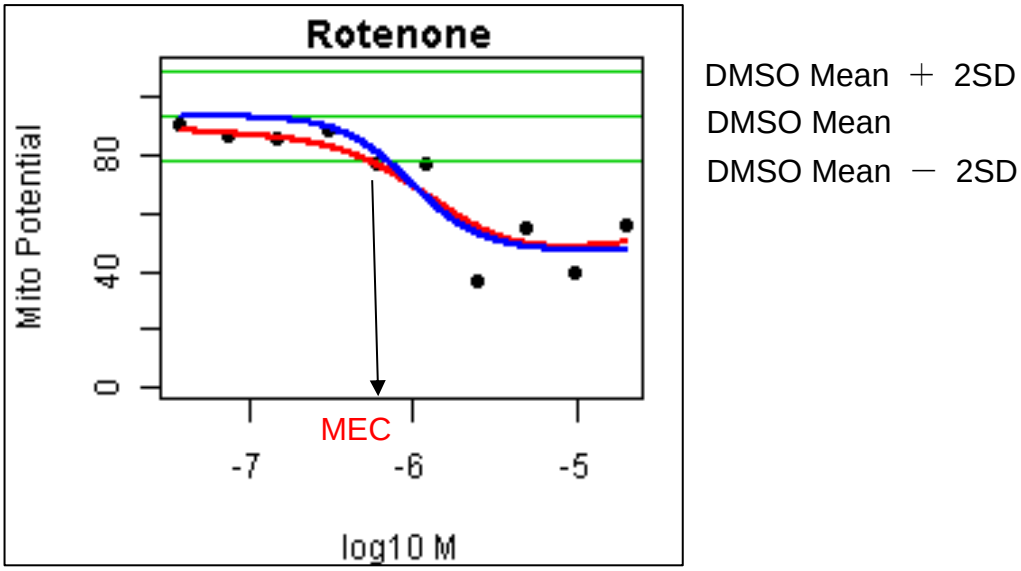


図 2-2. 開発した解析システムのグラフ例

横軸は化合物濃度（$Log_{10}M$）、縦軸は各パラメータ数値を示している。黒点は化合物（10 濃度、公比 2）のプロットを示す。青線が 4-parameter logistic model、赤線が kernel smoothing method でフィッティングした結果を示している。3 本の緑の線は上から溶媒対照（DMSO コントロール/20 ウェル）の平均値＋2S.D.、平均値、平均値－2S.D.を示している。赤線（kernel smoothing method）が DMSO±2S.D.の線と交差する点の濃度を最少反応濃度（MEC）とした。

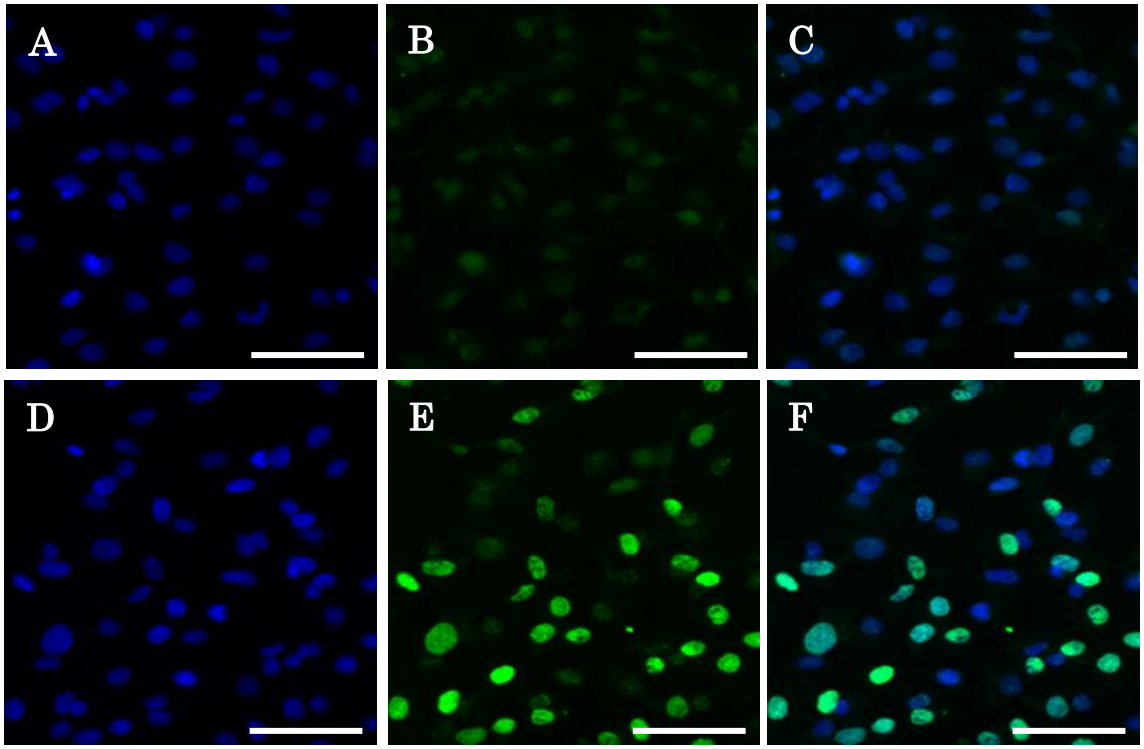


図 3-1. camptothecin（1μmol/L）を 1 時間暴露した後の核とγ-H2AX の染色像

A, B, C: 溶媒対照（DMSO コントロール）、D,E,F: Camptothecin 処理群

A 及び D: Hoechst 33342 染色像（核）、B 及び E: 抗γ-H2AX 抗体染色像、C 及び F: Hoechst 33342 と抗γ-H2AX 抗体染色像のマージ画像。Camptothecin 処理群のγ-H2AX が、溶媒対照と比較して核領域に強い蛍光を有している。Scale bar = 50μm

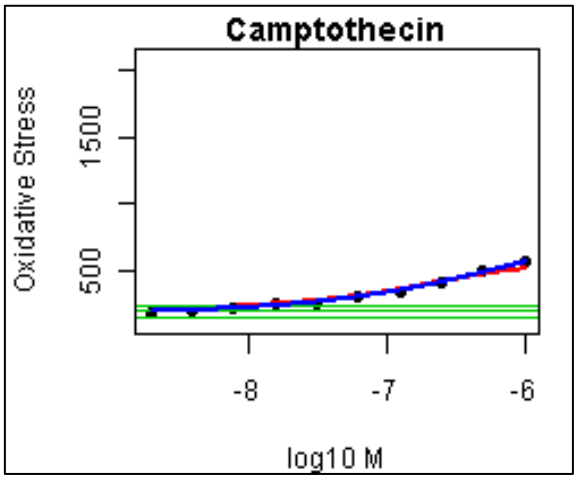
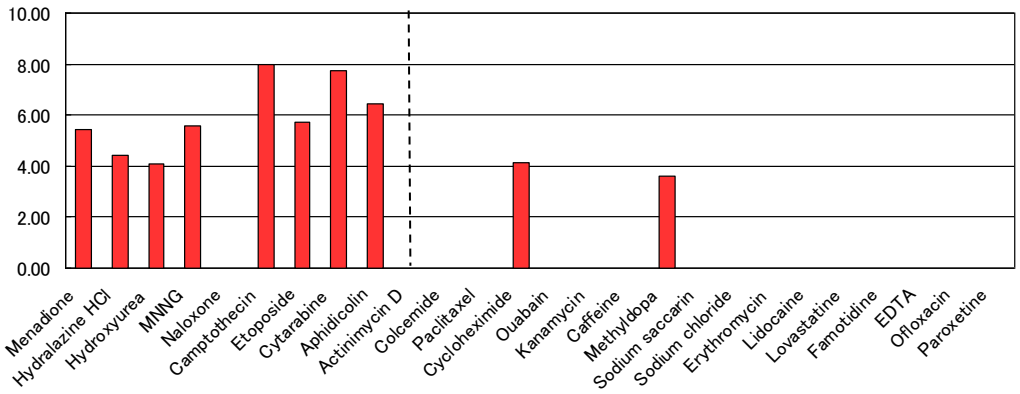


図 3-2.Camptothecin 処理群のグラフ例（1 時間処理）

横軸は化合物濃度（$Log_{10}M$）、縦軸はγ-H2AX の平均蛍光強度を示している。青線が 4-parameter logistic model、赤線が kernel smoothing method でフィッティングした結果を示している。3 本の緑の線は上から溶媒対照（DMSO コントロール/20 ウェル）の平均値＋2S.D.、平均値、平均値－2S.D.を示している。Camptothecin 処理群は、濃度依存的にγ-H2AX が増加していることがわかる。

A



B

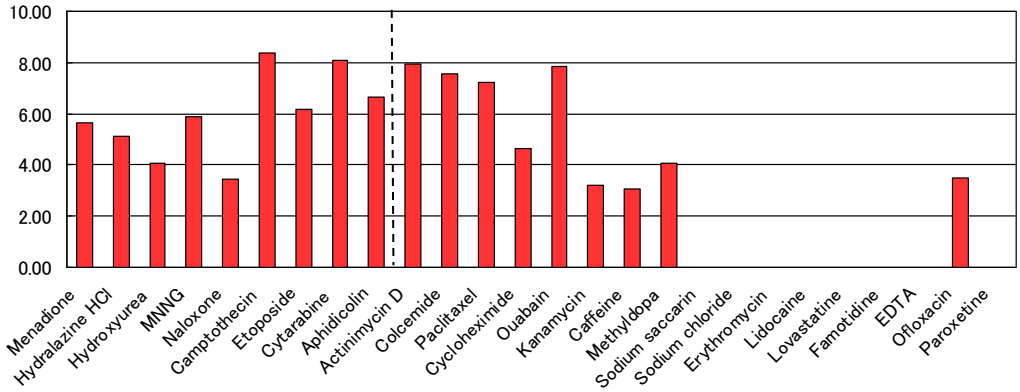


図 3-3. 各化合物のγ-H2AX の MEC

横軸は各化合物を、縦軸は MEC(-Log(M))を示す。グラフ A は 1 時間暴露、グラフ B は 24 時間暴露を示している。点線の左側が DNA 鎖切断誘発のメカニズムを有する被験物質 10 化合物、右側が DNA 鎖切断誘発のメカニズムを有さない被験物質 16 化合物である。

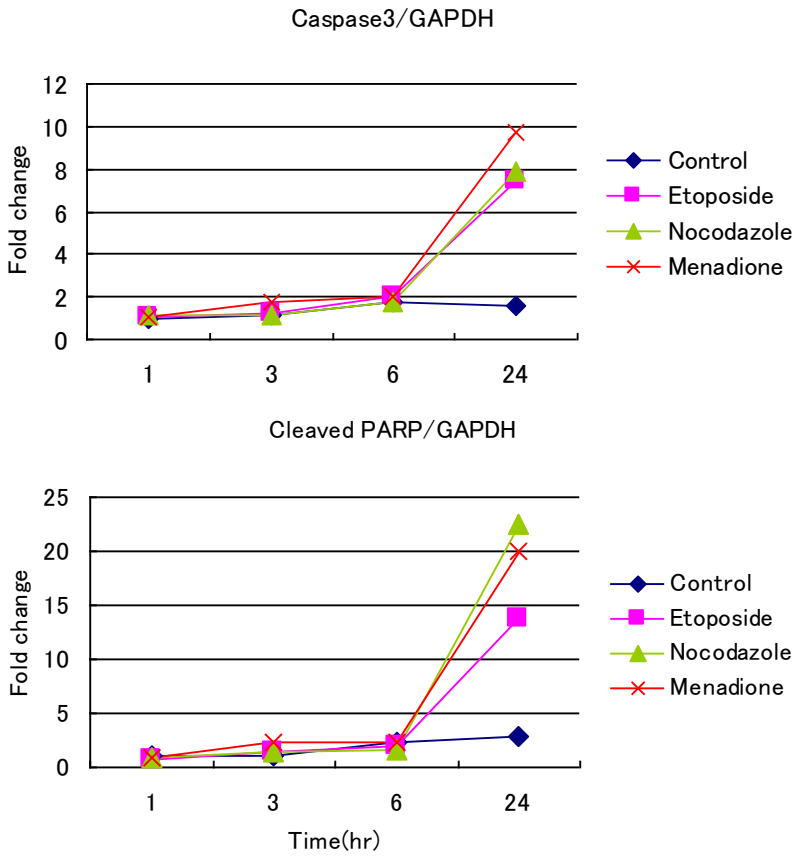


図 4. Luminex を用いた caspase 9 と cleaved PARP の検出

Menadione、Etoposide 及び Nocodazode で 1、3、6、24 時間処理した HepG2 細胞の caspase 9、cleaved PARP の測定を行った。横軸が処理時間、縦軸が 1 時間処理時の caspase 9 及び cleaved PARP を 1 とした時の値を示している。3 時間処理から徐々に caspase 9 と cleaved PARP が上昇していた。

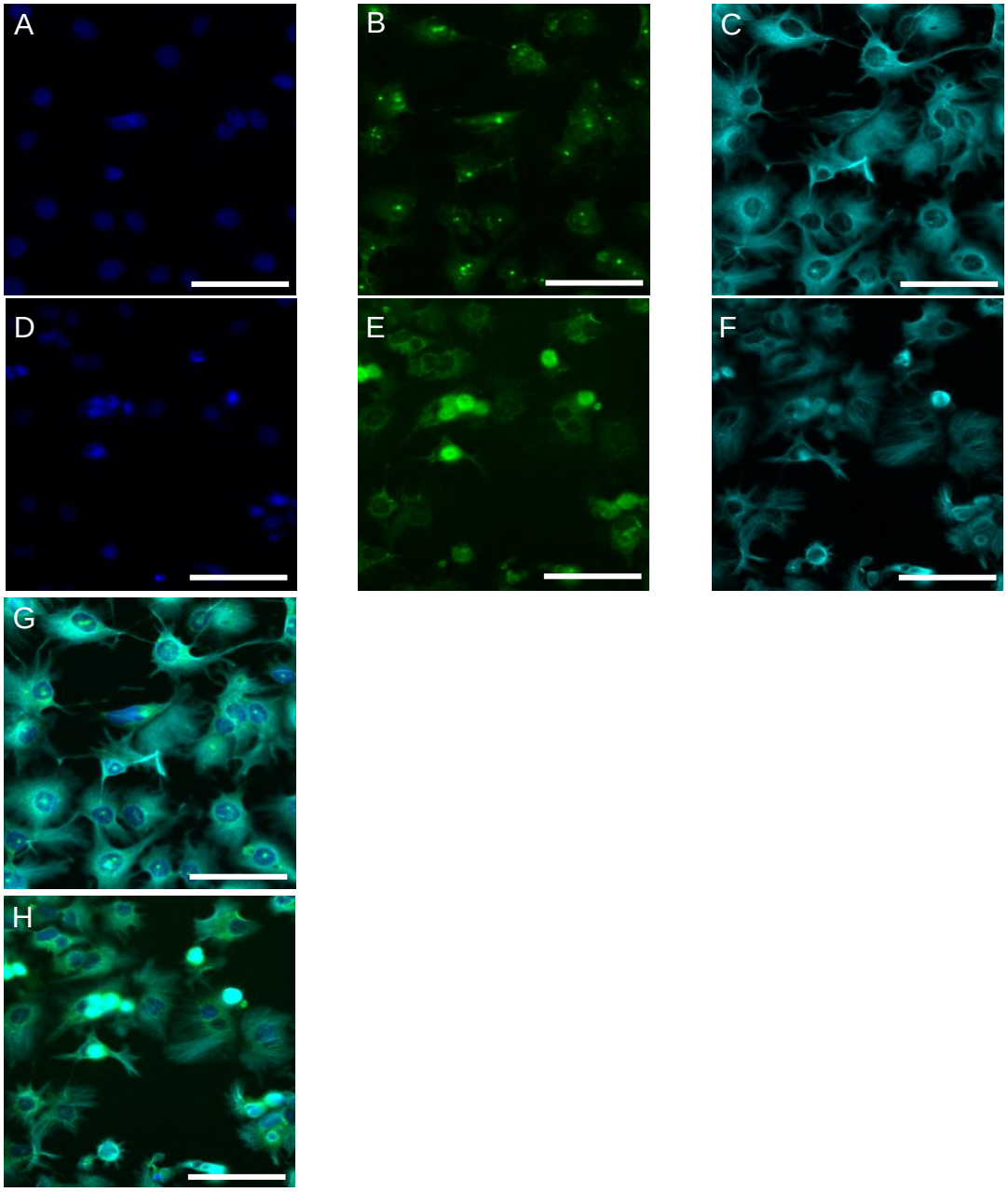


図 5-1.Cytarabine と Colcemide を 24 時間曝露した HepG2 細胞の蛍光顕微鏡画像

A、B、C、G が Cytarabine 処理群の画像、D、E、F、H が Cocemide 処理群の画像を示している。Scale bar = 50μm. A,D: Hoechst33342、B,E: phospho-histone H3、C,F: Tubulin、G,H: merge 画像。

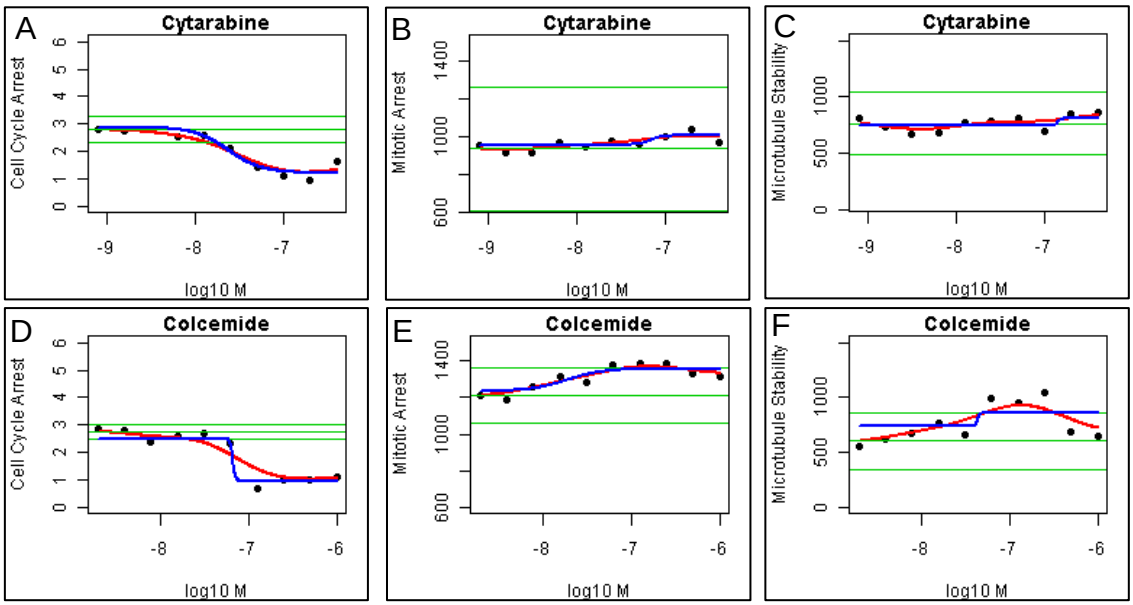


図 5-2. Cytarabine と Colcemide を 24 時間曝露した HepG2 細胞の各パラメータのグラフ

Cytarabine 及び Colcemide を 24 時間処理した後の細胞周期関連パラメータのグラフを示す。横軸は化合物濃度、縦軸は核パラメータの値を示している。A、B、C は Cytarabine 処理群、D、E、F は Colcemide 処理群を示している。Cellcycle（A、D）は Cytarabine、Colcemide ともに濃度依存的に低下している。Pshospho-histone H3 は、Colcemide のみが増加している。Tubulin については、Colcemide で上昇していた。以上の結果から、Cytarabine は S/G2 期停止、Colcemide は M 期停止を誘発していることがわかる。

Compound	Genotoxicity in vitro	Minimum effective concentration (MEC, μmol/L)				Cell cycle judgment
		γ-H2A.X (1 h)	Cell cycle arrest (24 h)	Phospho histone H3 (24 h)	Tubulin (24 h)	
Menadione	+	3.703	5.857			S/G2 arrest
Hydralazine hydrochloride	+	37.559	276.022			S/G2 arrest
Hydroxyurea	+	82.937	421.938			S/G2 arrest
MNNG	+	2.637	1.232	50.712	15.024	S/G2 arrest (low concentration)
Naloxone hydrochloride	+		161.247		552.045	G1 arrest
Camptothecin	+	0.010	0.005		0.076	S/G2 arrest
Etoposide	+	3.703	1.524	8.439	0.144	S/G2 arrest
Cytarabine	+	0.018	0.014			S/G2 arrest
Aphidicolin	+	0.347	0.187			S/G2 arrest
Actinomycin D	+		0.002	0.010	0.001	S/G2 arrest (low concentration)
Colcemide	+		0.040	0.098	0.053	M arrest
Paclitaxel	+		0.012	0.150	0.045	M arrest
Cycloheximide	+	76.188			427.949	-
Ouabain octahydrate	+		0.009		0.007	S/G2 arrest
Kanamycin sulfate	+		7.488			S/G2 arrest
Caffeine	+		218.088			G1 arrest
Alpha-Methyl-L-dopa	+	239.613				—
Saccharin sodium salt	+		36228.947			G1 arrest
Sodium chloride	+		11646.426		46585.703	G1 arrest
Erythromycin	-		101.102		351.062	G1 arrest
Lidocaine	-		504.058		985.954	G1 arrest
Lovastatin	-					—
Famotidine	-		82.937		1135.772	G1 arrest
EDTA	-					—
Ofloxacin	-		1444.542		126.781	S/G2 arrest
Paroxetine	-					—

図 5-3. 評価化合物のヒートマップ

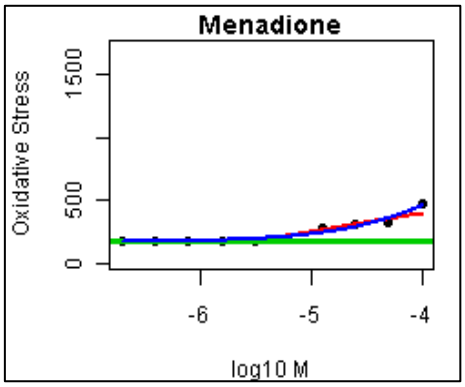
図 5-3. 評価化合物のヒートマップ（注釈）

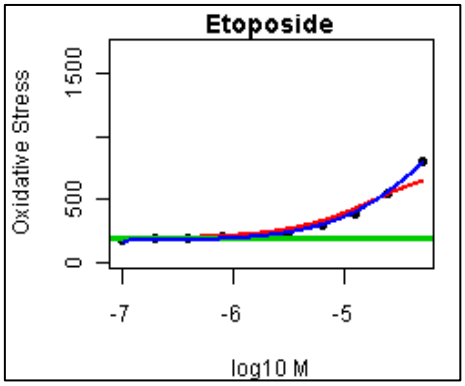
本試験で評価した 26 化合物の g-H2AX と cellcycle の結果をまとめたヒートマップを示す。

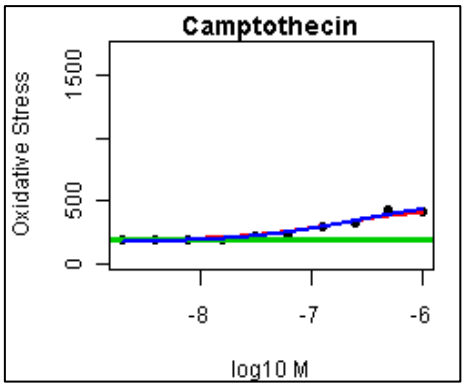
青いボックスはパラメータ値の低下を、赤いボックスはパラメータ値の上昇を示している。

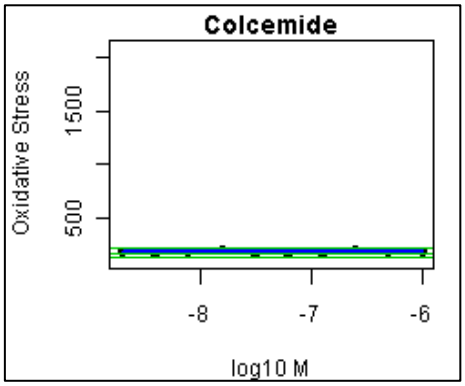
ボックス内の数値は MEC を示している。

１回目試験

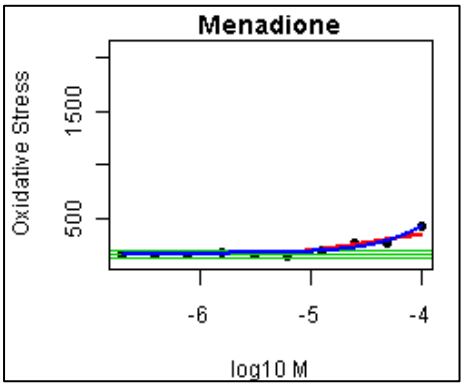

Menadione
Oxidative Stress
0
500
1500
-6
-5
-4
log10 M

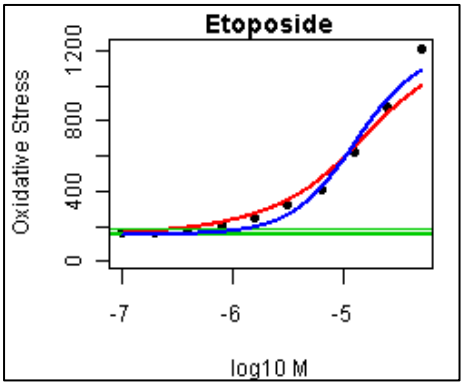

Etoposide
Oxidative Stress
0
500
1500
-7
-6
-5
log10 M

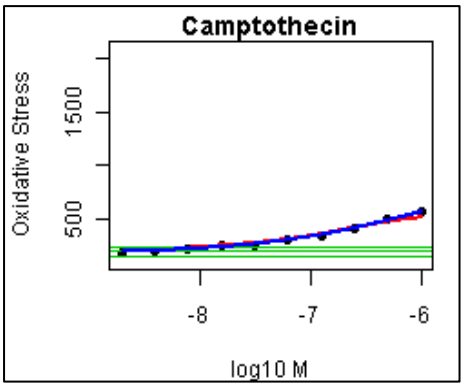

Camptothecin
Oxidative Stress
0
500
1500
-8
-7
-6
log10 M

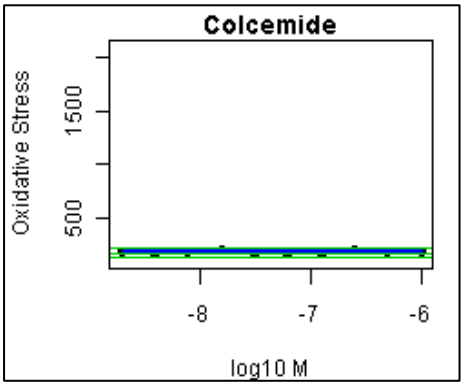

Colcemide
Oxidative Stress
500
1500
-8
-7
-6
log10 M

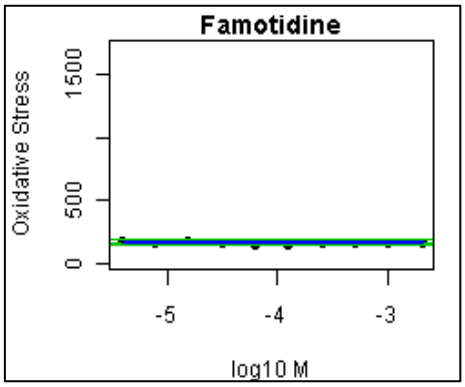
２回目試験

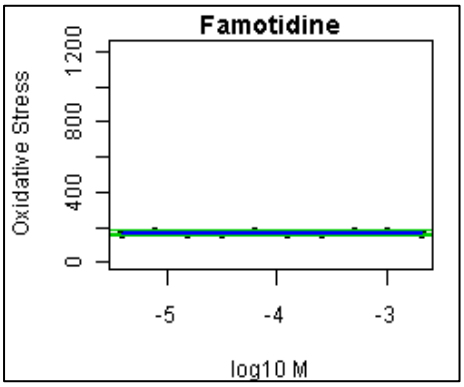

Menadione
Oxidative Stress
500
1500
-6
-5
-4
log10 M


Etoposide
Oxidative Stress
0
400
800
1200
-7
-6
-5
log10 M


Camptothecin
Oxidative Stress
500
1500
-8
-7
-6
log10 M


Colcemide
Oxidative Stress
500
1500
-8
-7
-6
log10 M





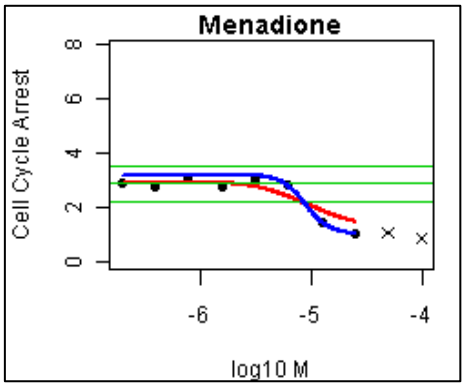
被験物質	MEC（μmoL/L / 1 回目）	MEC（μmoL/L / 2 回目）
Menadione	3.703	1.220
Etoposide	3.703	3.200
Camptothecin	0.010	0.019
Colcemide	N.D.	N.D.
Famotidine	N.D.	N.D.

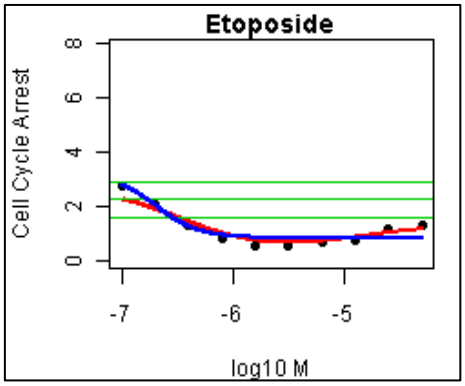
図 6-1. γ-H2AX の再現性の確認（1 時間処理）

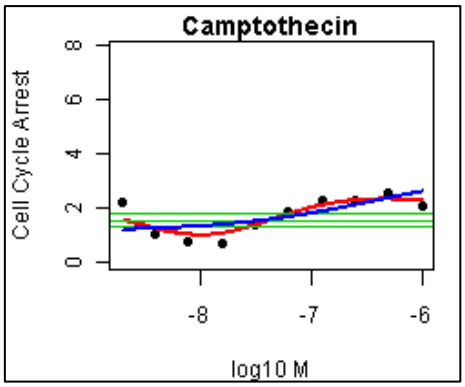
Menadione、Etoposide、Camptothecin、Colcemide 及び Famotidine について再現性の確認を行った。いずれの化合物のグラフと MEC について、非常に近似した結果が得られた。

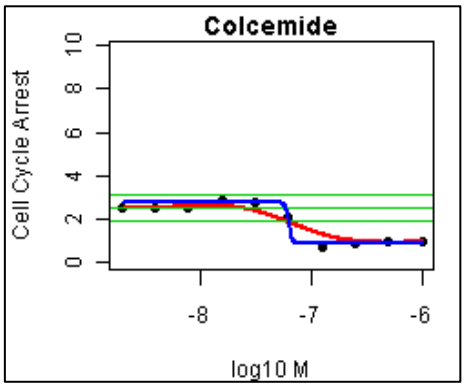
N.D.: Not detected

１回目試験

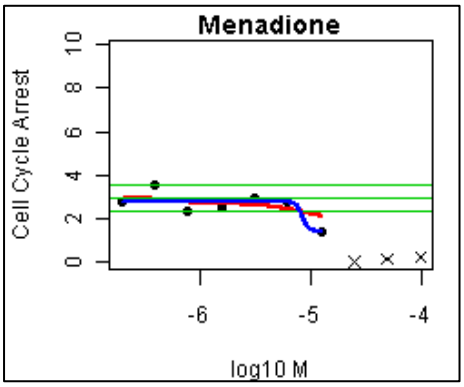

Menadione
Cell Cycle Arrest
0
2
4
6
8
-6
-5
-4
log10 M

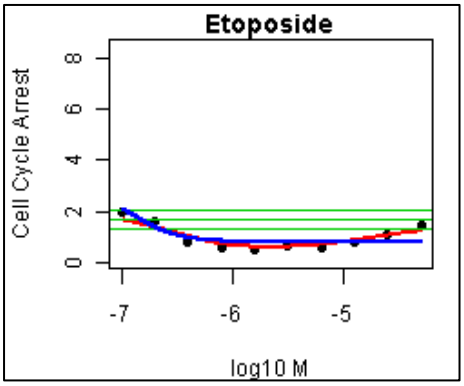

Etoposide
Cell Cycle Arrest
0
2
4
6
8
-7
-6
-5
log10 M

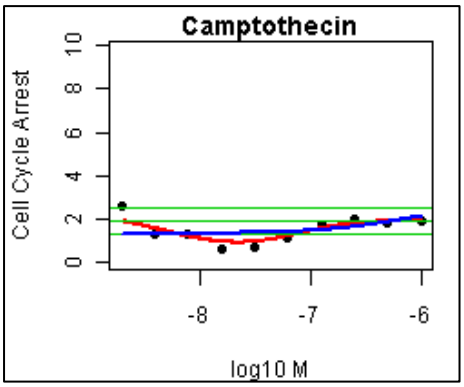

Camptothecin
Cell Cycle Arrest
0
2
4
6
8
-8
-7
-6
log10 M

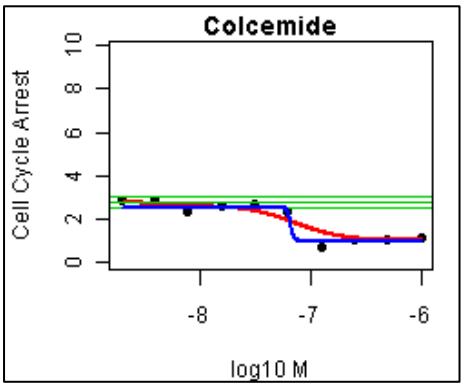

Colcemide
Cell Cycle Arrest
0
2
4
6
8
10
-8
-7
-6
log10 M

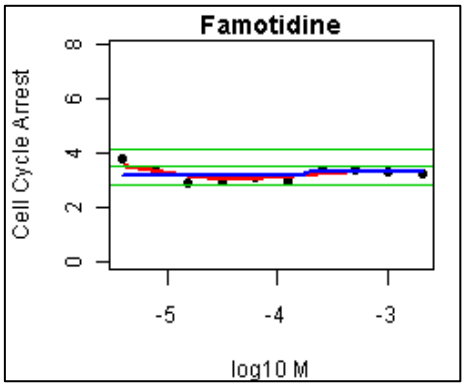
２回目試験

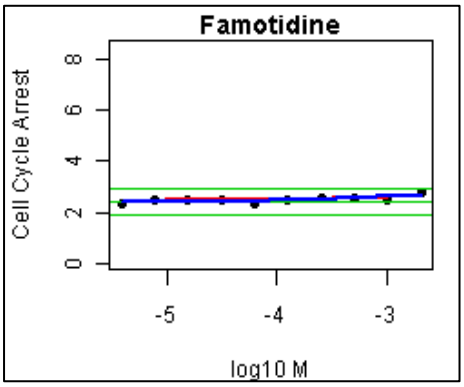

Menadione
Cell Cycle Arrest
0
2
4
6
8
10
-6
-5
-4
log10 M


Etoposide
Cell Cycle Arrest
0
2
4
6
8
-7
-6
-5
log10 M


Camptothecin
Cell Cycle Arrest
0
2
4
6
8
10
-8
-7
-6
log10 M


Colcemide
Cell Cycle Arrest
0
2
4
6
8
10
-8
-7
-6
log10 M





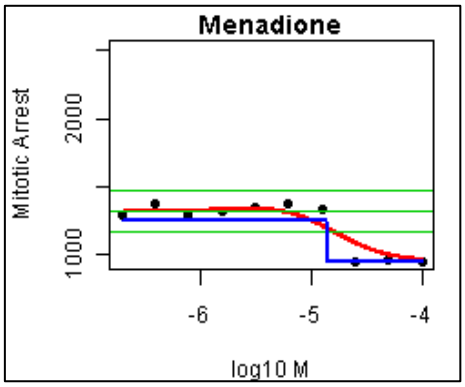
被験物質	MEC（μmoL/L / 1 回目）	MEC（μmoL/L / 2 回目）
Menadione	5.857	4.650
Etoposide	1.524	2.950
Camptothecin	0.005	0.010
Colcemide	0.040	0.037
Famotidine	N.D.	N.D.

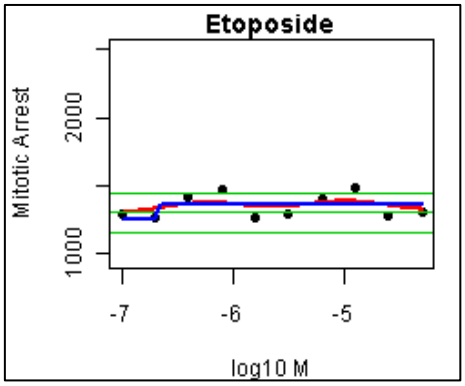
図 6-2. Cell cycle の再現性の確認（２４時間処理）

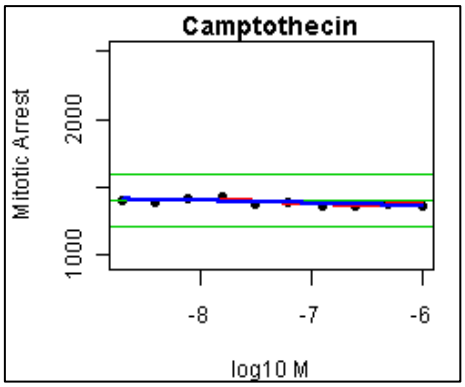
Menadione、Etoposide、Camptothecin、Colcemide 及び Famotidine について再現性の確認を行った。いずれの化合物のグラフと MEC について、非常に近似した結果が得られた。

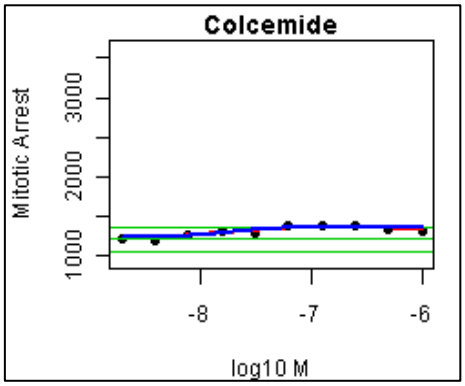
N.D.:Not detected

１回目試験

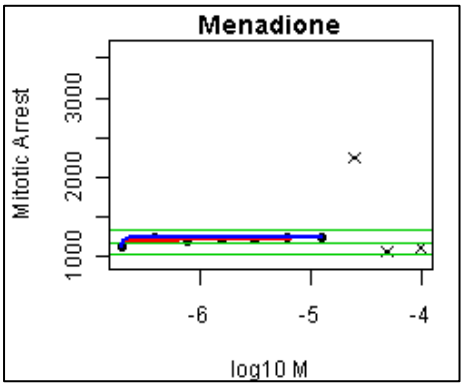

Menadione
Mitotic Arrest
1000
2000
-6
-5
-4
log10 M

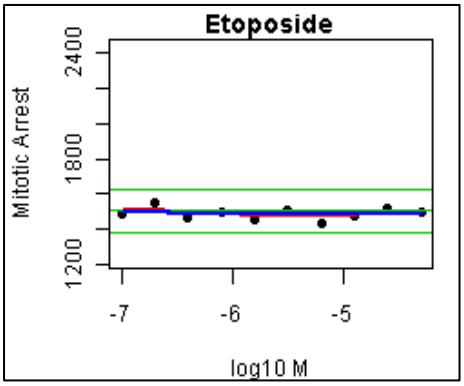

Etoposide
Mitotic Arrest
1000
2000
-7
-6
-5
log10 M

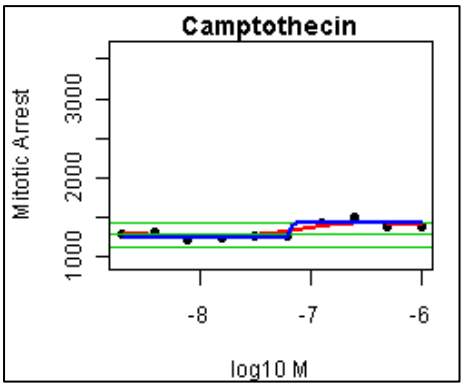

Camptothecin
Mitotic Arrest
1000
2000
-8
-7
-6
log10 M

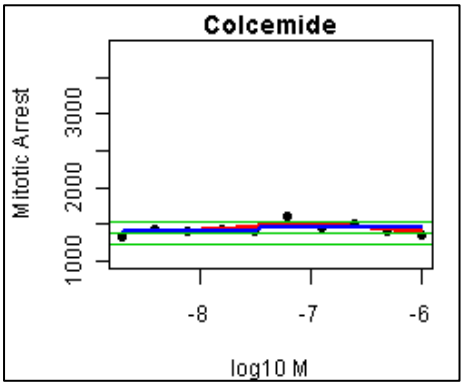

Colcemide
Mitotic Arrest
1000
2000
3000
-8
-7
-6
log10 M

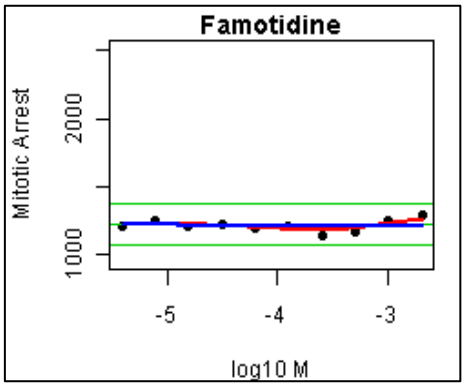
２回目試験

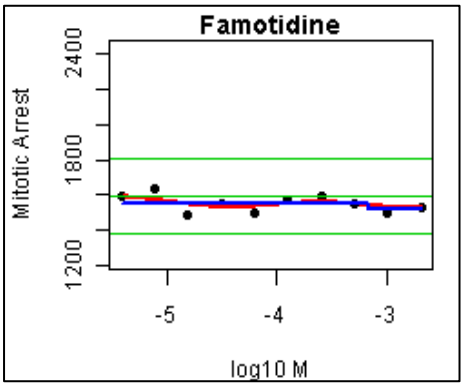

Menadione
Mitotic Arrest
1000
2000
3000
-6
-5
-4
log10 M


Etoposide
Mitotic Arrest
1200
1800
2400
-7
-6
-5
log10 M


Camptothecin
Mitotic Arrest
1000
2000
3000
-8
-7
-6
log10 M


Colcemide
Mitotic Arrest
1000
2000
3000
-8
-7
-6
log10 M





被験物質	MEC（μmoL/L / 1 回目）	MEC（μmoL/L / 2 回目）
Menadione	N.D.	N.D.
Etoposide	N.D.	N.D.
Camptothecin	N.D.	N.D.
Colcemide	0.098	0.089
Famotidine	N.D.	N.D.

図 6-3 Mitotic arrest の再現性の確認（２４時間処理）

Menadione、Etoposide、Camptothecin、Colcemide 及び Famotidine について再現性の確認を行った。いずれの化合物のグラフと MEC について、非常に近似した結果が得られた。

N.D.:Not detected

第４章　考察

γ-H2AX に関して

γ-H2AX は DNA 鎖切断の感度が良いマーカーとして知られており、遺伝毒性物質検出のマーカーとしても使用されている[18,19]。また、近年では In Cell Western 法などを用いて 96 ウェルプレートで比較的ハイスループットにγ-H2AX を検出する手法も開発されている[20]。しかしながら、これまでのγ-H2AX をマーカーとして検出した論文報告では、いくつかの欠点が認められた。ひとつ目として、試験する濃度ポイントが少なく、γ-H2AX が増加したかどうかの定性的な報告がほとんどであった。そのため、どの濃度から毒性が発現するかが曖昧であった。

本試験で構築した HCS の評価系は、公比 2、10 ポイントの濃度を設定でき、また 16 化合物を一度に処理できるという利点がある。また、独自に開発した解析システムで解析することで、短時間にグラフの描画、AC_{50},最少反応濃度（MEC）の算出、ヒートマップ作成、データベースからの類似パターンを示す化合物の検索が可能である。このため、毒性が発現する濃度が MEC という形で算出されるため、他の遺伝毒性試験や遺伝毒性機序解明のための試験結果と毒性発現濃度を比較することができる。その結果、γ-H2AX 産生が遺伝毒性発現の機序に関与しているかどうかを推測することが可能だと考えられた。

また、既報では、アポトーシスによるγ-H2AX の増加を考慮した系の構築がなされていなかった。H2AX はアポトーシスによる DNA の断片化によってもリン酸化されることが知られている[21]。そのため、被験物質曝露による細胞毒性によって、アポトーシスを通じて間接的にγ-H2AX の産生が誘導される可能性が考えられた。

私が構築した評価系では、1 時間、24 時間と時間を振って試験を行った。これは、1 時間であれば被験物質による細胞毒性が非生理条件下（高浸透圧、低 pH など）に置かれた場合以外検出されないことから、1 時間曝露ではアポトーシスによる DNA 鎖切断が起こらない

であろうという予想による時間設定である。実際に DNA 鎖切断を誘発する化合物と誘発しない化合物を評価した結果、高い感度、特異度で DNA 鎖切断を誘発する化合物を検出できた。一方で、アポトーシスによる DNA 鎖切断が起こらない範囲で長い時間曝露したほうがより感度が高くなるとも考えられた。そのため、Luminex を用いて代表的な化合物を 1, 3, 6, 24 時間曝露したところ、3 時間ですでに Caspase 9 及び cleaved PARP の増加が認められた。そのため、1 時間が最適な時間設定であると結論付けた。

また、既報では、γ-H2AX がどの程度の感度、特異度を持って遺伝毒性物質を検出できるのかを検証した報告が少なかった。そのため、DNA 鎖切断を誘発する 10 化合物と誘発しない 16 化合物を用いて感度、特異度の検証を行った。その結果、1 時間曝露における感度は 80%、特異度 87.5%と非常に高い結果が得られた。これは、同じ HepG2 細胞を用いて行われた In cell western 法で報告されている感度、特異度と同等の結果であった。

今回の系構築には HepG2 細胞を用いた。これは、HepG2 細胞が毒性試験でよく用いられること、また *in vitro* 遺伝毒性試験の偽陽性の原因のひとつとされる変異の入った p53 ではなく正常な p53 を発現していることから選択した。また、化合物の遺伝毒性はしばしば代謝酵素による代謝産物によって引き起こされる場合がある。そのため代謝酵素を持つ肝細胞由来である HepG2 を用いた。しかしながら、今回の試験では、代謝産物によって遺伝毒性を誘発する化合物を評価できなかった。また、HepG2 は肝細胞由来であるが、代謝酵素である CYP の活性が弱いことが知られている。そのため、将来的には、代謝活性の高い HepaRG 細胞や iPS 細胞由来肝細胞などを使用した HCS 系の構築を行うことで、代謝を考慮した遺伝毒性の機序を評価ですることが期待される。

<u>細胞周期解析に関して</u>

DNA 損傷を誘発する化合物とチューブリンに作用する化合物は、両方とも細胞周期停止を誘発するが、異なった作用機序を持つ。DNA 損傷誘発化合物は、DNA 複製を阻害する

ため、S もしくは G2 期で細胞周期停止を起こし、チューブリン作用性の化合物は紡錘体の形成が阻害され、M 期で細胞周期停止を起こす。このような特徴から、化合物による細胞周期停止の状態を観察することは、遺伝毒性機序解析に有用と考えて細胞周期評価を行った。このように、細胞周期停止をマーカーとして遺伝毒性機序の解明を行う試みは、現在までに報告はない。化合物の作用時間は、系構築時に陽性対照である Paclitaxel の 24 時間曝露で細胞周期停止が観察されたことから、24 時間曝露での観察とした。構築した系では、G1 期、S 又は G2 期、M 期を分類することができる。

Naloxone を除くすべての Ames 陽性化合物は、S/G2 期で細胞周期が停止した。これらの結果は、論文で報告されている結果と一致していた [22-25]。Naloxone については、Ames 試験は陽性を示すが、γ-H2AX の産生を誘発するという報告はない。γ -H2AX 解析においても、1 時間曝露でγ-H2AX の産生が誘発されていない。Naloxone が *in vitro* で遺伝毒性を持つ機序は不明であるが、代謝が関与している可能性が考えられる。構築した HCS 系では、代謝を加味した評価ができていないと考えられるため、Naloxone がγ-H2AX と細胞周期解析で他の Ames 陽性化合物と違う挙動を示した可能性が考えられた。

Ames 陰性の *in vitro* 遺伝毒性陽性化合物のうち、DNA 複製に関与する酵素を阻害するもの（Camptothecin, Etoposide, Cytarabine, Aphidicolin, Actinomycin D）は、すべて S/G2 期で細胞周期が停止した。Camptothecin と Etoposide は、それぞれ DNA トポイソメラーゼ I 及び II の阻害剤であり、主に DNA 複製時の DNA のねじれを解消するために DNA にニックを入れ、ねじれが解消したときにニックを結合して 2 本鎖 DNA に戻す。そのメカニズムにより、S/G2 期で細胞周期を停止させることが報告されており、試験結果と一致した [26-28]。Cytarabine はシトシンのアナログであり、DNA polymerase による DNA 複製を阻害する。そのため S/G2 期で細胞周期が停止することが報告されている [29,30]。Aphidicolin も DNA polymerase alpha の阻害剤であり、S 期での細胞周期停止が報告されており、試験結果と一致した [31]。 Actinomycin D は、DNA に結合して RNA ポリメラーゼによる転写

や、DNA ポリメラーゼによる DNA 複製を阻害するため、G2 期での細胞周期停止が報告されている[32]。試験結果では、Actinomycin D は、phospho histone H3 も増加させているが、phospho histone H3 増加の MEC(0.01μmol/L)と比較し、cell cycle arrest のパラメータ低下の MEC(0.002μmol/L）が 1/5 倍であったため、低濃度域で S/G2 期停止を起こしたと判断した。また、高濃度域で M 期停止を起こした機序については不明であった。

Ouabain は、Na^+/K^+ ATPase 阻害剤であるが、遺伝毒性物質でとして知られている。また、S/G2 期で細胞周期を停止させることが知られており[33]、本試験の結果とも一致した。このように、DNA 複製に直接関与しないと考えられる作用機序を持った化合物が細胞周期停止という形で検出できるのも、この HCS 系の強みと考えることができる。Kanamycin は、アミノグリコシド系抗生物質の一種で、細菌のリボソームに結合してタンパク質合成を阻害する。本試験結果では、S/G2 期で細胞周期停止を起こしたが、今までのところこのような作用機序の化合物が、S/G2 期で細胞周期を停止させるという報告はない。そのため、詳細な機序は不明だが、哺乳類細胞においてリボソーム以外のターゲット分子が存在することが考えられた。Colcemide は、チューブリンに脱重合を引き起こし、紡錘体の形成を阻害することで有糸分裂の前中期で細胞周期を停止させることが報告されている[34].本試験でも M 期で細胞周期が停止しており、報告と一致している。また、Colcemide は、細胞質の微小管にも結合して脱重合を誘発するため、図 5-1 で示したように細胞自体も丸くなってしまう。Paclitaxel は、チューブリンに結合してチューブリン構造を安定化させる。そのため、有糸分裂期に正常に紡錘体が形成できず、M 期で細胞周期が停止することが報告されている[35,36]。本試験でも M 期で細胞周期停止が見られ、報告と一致した結果を得た。

Cycloheximide は、哺乳類細胞でタンパク質合成を阻害し、遺伝毒性物質でもある。しかし、細胞周期停止を起こすという報告はなく、本試験でも細胞周期停止は起こさなかった。Caffeine, Saccharin sodium salt 及び Sodium chloride は、本試験で G1 期停止を起こした。Caffeine は、G1 期停止を起こすことが報告されており[37]、また Saccharin sodium salt

及び Sodium chloride は、高浸透圧や細胞内イオンバランスを変化させることで G1 期停止を誘発することが知られている[38,39]。本試験でも高濃度域で G1 期停止を起こした結果と一致する。

一方、非遺伝毒性物質では、Erythromycin, Lidocaine 及び Famotidine が G1 期停止を起こした。これらの作用機序は不明であるが、比較的高濃度で G1 期停止が起こっていることから、細胞におけるターゲット、もしくはオフターゲットに結合して刺激が入ることで、細胞が DNA 複製、細胞増殖に適した環境にないと判断したのかもしれない。また、Ofloxacin は、唯一 S/G2 期停止を起こしている。Ofloxacin は、抗生物質であり、哺乳類のトポイソメラーゼに相当する細菌の DNA ジャイレースの阻害剤である。1444μmol/L という高濃度で S/G2 期停止を起こしていることから、ヒト型のトポイソメラーゼを阻害して S/G2 期停止を起こした可能性がある。

本試験では、化合物の作用機序によって S/G2 期停止、M 期停止に細胞周期を分類できた。G1 期停止は、イオンバランスの変化などの作用機序を反映して使用できると考えられたが、非遺伝毒性物質でも観察された現象であったため、G1 期停止は遺伝毒性の検出には用いられないと考えられた。しかし、化合物が遺伝毒性物質と分かっている場合には遺伝毒性機序解析には用いることができる可能性がある。

以上の結果より、遺伝毒性の検出及び遺伝毒性機序の推定に用いる試験として、γ-H2AX と細胞周期を指標とした HCS 評価系の構築に成功した。しかしながら、明確な機序の特定には、他の試験と組み合わせて使用することがより有用であると考えられる。例えば、遺伝毒性機序解明を目的として、1 次スクリーニングとして、ハイスループット性を活かして本試験を行う。γ-H2AX が検出され、さらに S/G2 期で細胞周期停止を示していたら、その化合物を DNA adductome 試験や ROS の検出などで評価を行い、化合物が直接的に DNA を損傷しているかどうかを判断する。また、M 期停止という結果が得られたら、化合物へ

のチューブリンへの結合の評価、有糸分裂に関与するキナーゼの阻害試験などによってより詳細なメカニズムを検討してゆくという方法が考えられる。このようにうまく他の評価系と組み合わせることによって、より詳細に遺伝毒性の機序解明が可能になると考えられる。遺伝毒性機序解明のための評価系スキームの例を図 7 に示す。

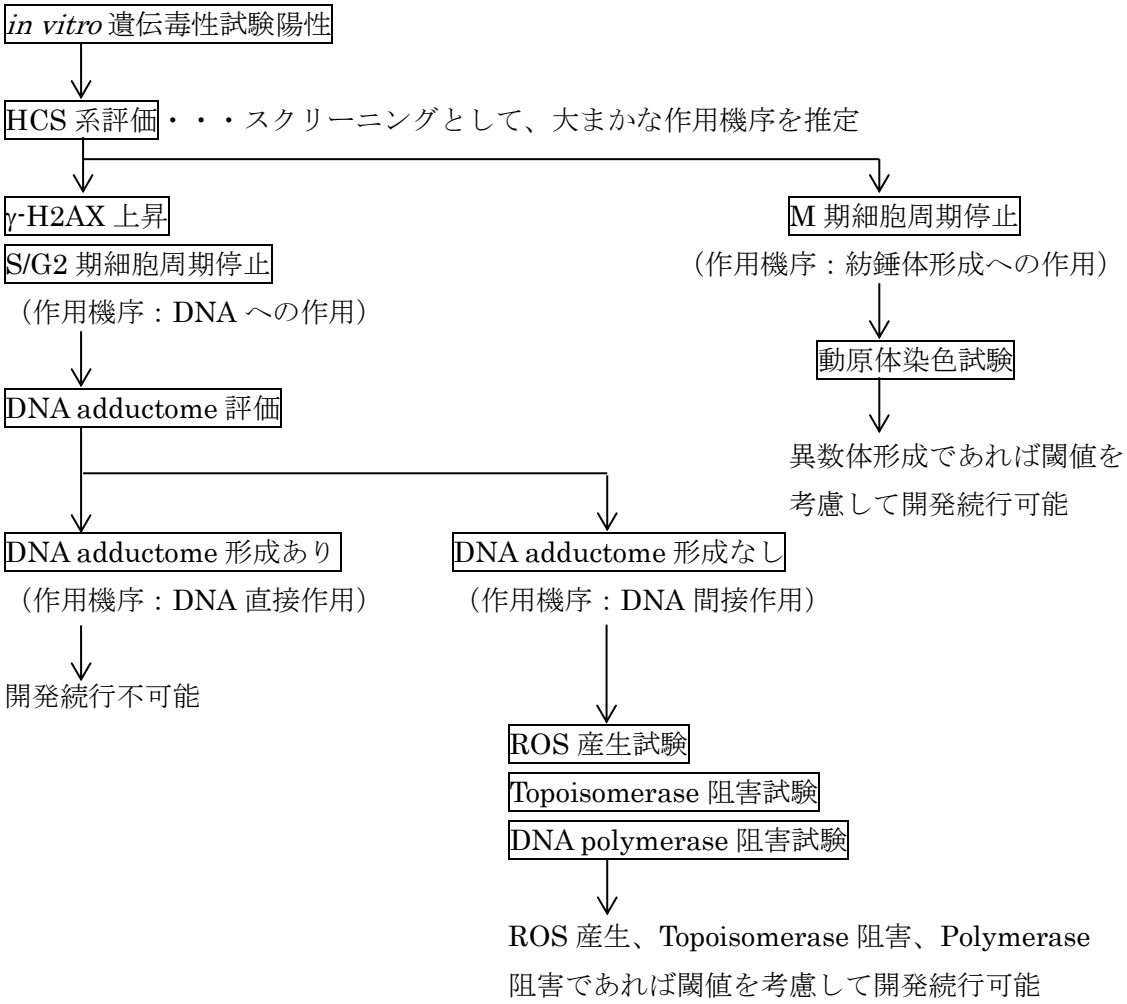


図 7.遺伝毒性機序解明のスキーム例

遺伝毒性陽性の機序として、直接的に DNA を損傷する化合物は医薬品として開発することはできない。一方、酵素阻害などによる DNA 損傷（間接的な DNA 損傷）を起こす化合物及び異数体形成であれば、毒性が発生する閾値を考慮して医薬品の開発が可能である。本試験で構築した HCS 系をスクリーニング系として用い、DNA に作用しているのか、もしくは紡錘体形成に作用しているのかというおおまかな作用機序の推定を行うことができる。DNA に作用することが明らかになった場合には、DNA adductome 試験を行って、DNA 直接作用か間接作用かを分類することができる。また、紡錘体形成阻害を起こした被験物質については、動原体染色試験を行い、異数体形成かどうかを明らかにすることができる。

このように HCS 系をファーストスクリーニングとして導入することで、その後行う試験を絞ることができ、効率的に作用機序の解明を行うことができる。

第５章　参考文献

1. ICH S2 (R1), step4, Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, 2011.

2. Decordier I, Dillen L, Cundari E, Kirsch-Volders M.; Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis*. 2002,17,337-344.

3. Kirkland DJ, Aardema M, Banduhn N, Carmichael P, Fautz R, Meunier JR, Pfuhler S.; In vitro approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive in vitro genotoxicity results. *Mutagenesis*. 2007, 22, 161-175.

4. Manshian BB, Singh N, Doak SH.; The in vitro Micronucleus Assay and Kinetochore Staining: Methodology and Criteria for the Accurate Assessment of Genotoxicity and Cytotoxicity. *Methods Mol. Biol*. 2013, 1044, 269-289.

5. Kato K, Yamamura E, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Sugiyama A, Uno Y.; Application of the DNA Adductome Approach to Assess the DNA-damaging Capability of in vitro Micronucleus Test-positive Compounds. *Mut Res*. 2011, 721, 21-26.

6. Taylor DL, Giuliano KA.; Multiplexed high content screening assays create a systems cell biology approach to drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2005, 2, 149-54.

7. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM.; DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 5858-5868.

8. Akihisa Takahashi, Takeo Ohnishi, Does γ-H2AX Foci Formation Depend on the Presence of DNA Double Strand Breaks?. *Cancer Letters*. 2005, 229, 171-179.

9. Lücke-Huhle C, Blakely EA, Chang PY, Tobias CA.; Drastic G2 Arrest in Mammalian Cells After Irradiation with Heavy-ion Beams. *Radiat. Res*. 1979, 79, 97-112.

10. Cliby WA, Lewis KA, Lilly KK, Kaufmann SH.; S Phase and G2 Arrests Induced by Topoisomerase I Poisons Are Dependent on ATR Kinase Function. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 1599-1606.

11. Giuliano KA, Gough AH, Taylor DL, Vernetti LA, Johnston PA.; Early safety assessment using cellular systems biology yields insights into mechanisms of action.*J Biomol Screen*. 2010, 15, 783-797.

12.Flores M.L, Castilla C, Ávila R, Ruiz-Borrego M, Sáez C, Japón MA.; Paclitaxel Sensitivity of Breast Cancer Cells Requires Efficient Mitotic Arrest and Disruption of Bcl-xL/Bak Interaction. *Breast Cancer Res.* Treat. 2012, 133, 917-928.

13. TOXNET Toxicology Data Network; http://toxnet.nlm.nih.gov/index.html.

14. Ronald DS.; An Update on the Genotoxicity and Carcinogenicity of Marketed Pharmaceuticals with Reference to in silico Predictivity. *Environ Mol Mutagen.* 2009, 50, 435-450.

15. Lee M, Kwon J, Chung MK.; Enhanced Prediction of Potential Rodent Carcinogenicity by Utilizing Comet Assay and Apoptotic Assay in Combination. *Mutat. Res.* 2003,541, 9-19.

16. Giovanni Brambillia, Antonietta Martelli.; Update on Genotoxicity and Carcinogenicity Testing of 472 Marketed Pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 2009, 681, 209-229.

17. Ronald DS, John W Green.; A Review of the Genotoxicity of Marketed Pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 2001, 488, 151-169.

18. LJ Mah, A El-Osta, TC Karagiannis.;□-H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia.* 2010, 24, 679-686.

19. Gallmeier E, Winter JM, Cunningham SC, Kahn SR, Kern SE.; Novel genotoxicity assays identify norethindrone to activate p53 and phosphorylate H2AX.*Carcinogenesis.* 2005,26, 1811-20.

20. Khoury L, Zalko D, Audebert M.; Validation of high-throughput genotoxicity assay screening using γH2AX in-cell western assay on HepG2 cells. *Environ Mol Mutagen.* 2013, 54,737-46.

21. Rogakou EP, Nievesn Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM.; .Initiation of DNA Fragmentation During Apoptosis Induces Phosphorylation of H2AX Histone at Serine 139.*J. Biol. Chem.* 2000, 275, 9390-9395.

22. Wu FY, Sun TP.; Vitamin K3 Induces Cell Cycle Arrest and Cell Death by Inhibiting Cdc25 Phosphatase. *Eur. J. Cancer.* 1999, 35, 1388-1393.

23. Brian HM, Sharon EM, Ronald CS.; Hydralazine and Other Hydrazine Derivatives and the Formation of DNA Adduct. *Toxicology and applied pharmacology.* 1994, 127, 91-98.

24. Osterman GS, Czene S, Gokarakonda A, Haghdoost S.; Intracellular Deoxyribonucleotide Pool Imbalance and DNA Damage in Cells Treated with Hydroxyurea, An Inhibitor of Ribonucleotide Reductase. *Mutagenesis.* 2013, 28, 653-660.

25. Noonan EM, Shah D, Yaffe MB, Lauffenburger DA, Samson LD.; O6-Methylguanine DNA Lesions Induce an Intra-S-phase Arrest From Which Cells Exit into Apoptosis Governed by Early and Late Multi-pathway Signaling Network Activation. *Integr. Biol.* 2012, 4, 1237-1255.

26. Li LH, Fraser TJ, Olin EJ, Bhuyan BK.; Action of Camptothecin on Mammalian Cells in Culture. *Cancer Res.* 1972, 32, 2643-2650.

27. Del BG, Lassota P, Darzynkiewicz Z.; The S-phase Cytotoxicity of Camptothecin. Exp. *Cell Res.* 1991, 193, 27-35.

28. Nam C, Yamauchi H, Nakayama H, Doi K.; Etoposide Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Neuroepithelial Cells in a p53-related Manner. *Neurotoxicol. Teratol.* 2006, 28, 664-672.

29. Sugimoto K, Tamayose K, Takagi M, Yamada K, Sasaki M, Mizutani S, Oshimi K.; Activation of an Ataxia Telangiectasia Mutation-dependent Intra-S-phase Checkpoint by Anti-tumour Drugs in HL-60 and Human Lymphoblastoid Cells. *Br. J. Haematol.* 2000, 110, 819-825.

30. Tobey RA.; Effects of Cytosine Arabinoside, Daunomycin, Mithramycin, Azacytidine, Adriamycin, and Camptothecin on Mammalian Cell Cycle Traverse. *Cancer Res.* 1972, 32, 2720-2725.

31. Cordeiro Stone M, Kaufman DG.; Kinetics of DNA Replication in C3H 10T1/2 Cells Synchronized by Aphidicolin. *Biochemistry.* 1985, 24, 4815-4822.

32. Ma H, Pederson T.; The Nucleolus Stress Response is Coupled to an ATR-Chk1-mediated G2 Arrest. *Mol. Biol. Cell.* 2013, 24, 1334-1342.

33. Xu ZW, Wang FM, Gao MJ, Chen XY, Hu WL, Xu RC.; Targeting the Na+/K+ -ATPase a Subunit of Hepatoma Hep G2 Cell Line to Induce Apoptosis and Cell Cycle

Arresting. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33, 743-751.

34. Jha MN, Bamburg JR, Bedford JS.; Cell Cycle Arrest by Colcemid Differs in Human Normal and Tumor Cells. *Cancer Res.* 1994, 54, 5011-5015.

35. Horwitz SB.; Taxol (paclitaxel): Mechanisms of Action. *Ann. Oncol.*1994, 5 Suppl 6:S3-6.

36. Conly LR.; Colcemid and The Mitotic Cycle. *Journal of Cell Science.* 1992, 102, 387-392.

37. Hashimoto T, He Z Ma WY, Schmid PC, Schmid PC, Bode AM, Yang CS, Dong Z.; Caffeine Inhibits Cell Proliferation by G0/G1 Phase Arrest in JB6 Cells. *Cancer Res.* 2004, 64, 3344-3349.

38. Kishi H, Nakagawa K, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Taya Y, Yamaizumi M.; Osmotic Shock Induces G1 Arrest Through p53 Phosphorylation at Ser33 by Activated p38MAPK Without Phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 39115-39122.

39. Tao GZ, Rott LS, Lowe AW, Omary MB.; Hyposmotic Stress Induces Cell Growth Arrest via Proteasome Activation and Cyclin/cyclin-dependent Kinase Degradation. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 19295-19303.

謝辞

本研究にあたり、数多くの方々に御協力や御助言をいただきました．田辺三菱製薬株式会社 安全性研究所の岩瀬 裕美子マネージャーには、HCS 系の導入、構築、解析システムの開発及び遺伝毒性機序解析において全般的に助言を頂きました。また、岩瀬マネージャーと宇野所長には、社会人大学院生として大学院で学ぶ機会を与えていただいたことを大変感謝しております。同僚の吉川佳佑さんとは、より良い系を構築するためによくディスカッションをし、また実験を手伝っていただきました。厚く御礼申し上げます。

また、１２年間という長いブランクを経て社会人大学院生として入学し、研究することを前向きにとらえていただき、快適な学業及び研究環境を与えてくださった東京大学総合文化研究科 石浦章一教授に心より感謝申し上げます。先生のポジティブで建設的な助言は、私が社会人として研究を続けてゆく上で、今後も心の支えになってゆくものと確信しております。

また、この３年間が充実した学生生活となったのは、石浦研究室の助教の周防さん、三橋さん、そして学部生及び大学院生の皆さまが、アラフォーのおじさんを自然体で受け入れてくださったおかげだと思っております。久々にゼミなどに参加し、発表をしたり、ディスカッションをしたりしたことは、とても刺激になりました。また、大学院の仕組みがよくわかっていない私に色々と教えていただき、大変感謝しております。

最後に、これまで私のチャレンジの背中を押し、暖かく見守り、つねにポジティブストロークを与えつづけてくれた石浦研の同期であり先輩でもある妻、安藤二香に心より感謝いたします。また、仕事と学業の両立が難しいと感じたときでも、息子の大峩と遊び、笑顔を見るととても癒されました。ありがとう。