

## P-017

### Induction of large micronuclei by the formation of multiple spindle poles.

Shigeki Motoyama, Kenji Tanaka, Akira Takeiri, Asako Harada and Masayuki Mishima  
Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Fuji Gotemba Reserch Labs.

It is generally supposed that micronuclei (MNs) induced by aneugens will be larger than those induced by clastogens. However, the correlation between MN size and the induction mechanism remains unclear. Here we found that compound A (comp A) induced large MNs with diameters more than one-third the size of the main nuclei. To reveal the induction mechanisms of the large MNs, we investigated further.

An *in vitro* MN assay and FISH analysis using centromeric probes in TK6 cells revealed that comp A is an aneugen, indicated by the significant induction of centromere-positive MNs. Intriguingly, the large MNs had multiple centromeric signals and the formation of multiple spindle poles was found by mitotic spindle staining using an anti- $\alpha$ -tubulin antibody. However, these phenomena were not found in a different aneugen that disturbs tubulin functions. Thus, it was suggested that the large MNs induced by comp A were the result of the formation of multiple spindle poles. In such a mechanism, the conventional criterion in which a MN diameter is less than one-third of the nucleus is not necessarily applicable to all cases.

### 紡錘体極の多極化による大型小核の誘発

本山茂記、田中健司、竹入 章、原田麻子、三島雅之  
中外製薬株式会社富士御殿場研究所

一般的に aneugen により誘発される小核は clastogen によるものと比較して大型であると考えられているが、そのサイズと誘発メカニズムの関連性については未だ不明な点が多い。今回我々は compound A (comp A) が主核の 1/3 以上の大型小核を誘発することを見出し、その誘発機序を明らかにするための検討を行った。

TK6 細胞を用いた *in vitro* 小核試験及びセントロメアプローブを用いた FISH 解析を行った。その結果、comp A により誘発された小核では centromere-positive micronucleus のみが有意に増加し、comp A は aneugen であることが示された。興味深いことに、誘発された大型小核は複数の centromere シグナルを有しており、また、抗  $\alpha$  チューブリン抗体を用いた紡錘糸の染色結果からも、comp A は紡錘体極の多極化を誘発することが明らかとなった。一方でチューブリン機能阻害をメカニズムとする別の aneugen では上記のような事象は見出されなかった。

以上から、comp A による大型小核の誘発は、紡錘体形成時における紡錘体極の多極化に起因することが示唆された。このようなメカニズムで誘発される小核においては、主核の 1/3 未満を小核とする従来の小核判別基準が必ずしも適用できない場合があることが示された。

## P-018

### Aneugen-induced loss of chromosomal FISH signals in human lymphoblastoid cells

Mika Yamamoto<sup>1,2</sup>, Akihiro Wakata<sup>1</sup>, Michio Fujiwara<sup>1</sup>, Jiro Seki<sup>1</sup>, Seiji Kodama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Asurellas Pharma Inc. Drug Safety Research Laboratory;  
<sup>2</sup>Radiat. Biol. Lab, Fron. Sci. Inno. Cent., Org. Univ.-Indust.-Govern.Coop., Osaka Pref. Univ.

We established an assay system to detect the gain or loss of chromosomes induced by chemical mutagens using the centromere FISH in interphase human lymphoblastoid TK6 cells. In this assay, a loss of FISH signals from two to one per nucleus implies a loss of a whole chromosome or an overlap of two signals. However, we could not distinguish one from the other. In the present study, to distinguish a chromosome loss from a signal overlap, we investigated the number of FISH signals and the fluorescent intensity of signals per nucleus using a probe specific for whole chromosome 2 in binucleated TK6 cells treated with Colcemid. As expected, the number of cells with unequal chromosome segregation and a loss of signals from a nucleus increased in a dose-dependent manner. In addition, the analysis of the signal intensity revealed that almost 20% of cells showed an overlap of two signals in a nucleus. This suggests that a whole chromosome 2 is lost by the treatment with Colcemid in the remaining 80% of cells, supporting our former result that was obtained using the centromere FISH.

### ヒトリンパ球における染色体数異常誘発物質による染色体 FISH シグナルの消失

山本美佳<sup>1,2</sup>、若田明裕<sup>1</sup>、藤原道夫<sup>1</sup>、関 二郎<sup>1</sup>、  
児玉靖司<sup>2</sup>

<sup>1</sup>アステラス製薬株式会社 安全性研究所、<sup>2</sup>大阪府立大学  
産学官連携機構 先端科学イノベーションセンター放射線  
生命科学研究室

我々はこれまでに、ヒトリンパ芽球由来 TK6 細胞の間期動原体数について FISH 法を用いて計測し、化学変異原物質による染色体数異常を検出する実験系を構築した。この実験系では、核当たりの FISH シグナル数の 2 個から 1 個への減少は、染色体そのものの消失、または 2 個のシグナルの重なりを意味するが、そのいずれかの判別は不能であった。そこで本研究では、その判別を目指して、Colcemid 処理した TK6 細胞の細胞質分裂を止めて 2 核細胞を形成させた後、FISH 法を用いて 2 番染色体全体を染色し、核当たりの FISH シグナル数に加えてそのシグナル強度も測定した。その結果、シグナルが不均等に分配された細胞、及び一方の核からシグナルが 1 個消失している細胞が、用量依存的に増加した。さらに、シグナル強度の解析により、2 個のシグナルが重なることによって見かけ上 1 個にみえる細胞の割合は、約 20% であることが分かった。以上の結果は、残りの約 80% の細胞では Colcemid 処理により 2 番染色体 1 本が核から消失していることを示唆しており、動原体 FISH 法を用いて得られた我々の以前の結果を支持している。