

コメットアッセイにおけるDNA損傷評価指標の標準化

岩堀恵祐¹、宮田直幸¹、中村裕紀²、○青山光太郎²

¹ 静岡県立大学環境科学研究所

² 日立プラント建設(株) 松戸研究所

概要: コメットアッセイのDNA損傷評価には、これまでに様々な指標が適用されてきた。本研究では、ミドリムシ藻を用いたコメットアッセイを行い、まず、各指標の特性や有用性を検討した。また得られた数値データの標準化を試み、試験結果の比較を容易にするとともに、統一した評価指標の提案を検討した。Tail momentを指標としたとき、細胞の個体差が感度よく表され、個体差による散布度を評価することができた。Ratioを指標とすると、個体差が抑制され、化学物質濃度に応じたDNA損傷度合いを評価できた。標準化したTail momentの標準偏差とRatioのコントロールに対する平均値の比を併用した新規の指標を導入することで、種々の化学物質で得られたデータの相互比較が可能となり、新規指標の有用性を確認することができた。

キーワード: コメットアッセイ、DNA損傷、標準化、Tail moment、Ratio

1. はじめに

近年、下水、埋立地浸出水、産業廃水、河川中から様々な化学物質が検出され、それらによる環境汚染や産業労働者の健康障害の危険性が指摘されている。その有害性を評価するため、従来の化学分析とともに、水そのものの毒性を評価するという観点から、種々のバイオアッセイが適用されるようになってきた¹⁾。コメットアッセイ²⁾はそのバイオアッセイのひとつであり、利点として、理論上すべての有核細胞が実験材料となる、DNA損傷の検出感度が高い、個々の細胞レベルでの損傷を定量可能、非常に少ないサンプルで試験が可能、短時間で測定可能などが挙げられる。

しかし、コメットアッセイには様々な評価指標があり、研究者により適用される指標も異なるため、測定結果の相互比較が困難な状況にある。さらに、処理細胞群単位でDNA損傷評価を行っているため、細胞の個体差による測定値のばらつきが、評価に大きな影響を与える、などの問題点が挙げられる。従って、コメットアッセイを環境水の毒性評価に適用するには、これらの問題点を検討しておく必要がある。

そこで本研究では、ミドリムシ藻を用いたコメットアッセイを行い、得られた数値データの標準化を試み、試験結果の比較を容易にするとともに、統一した評価指標の提案を試みた。

2. 実験材料並びに方法

2.1 供試微生物

供試微生物には、ミドリムシ藻 *Euglena gracilis* (NIES-49) を用いた。Hutner 培地 (KH₂PO₄ 20 mg/L, MgSO₄ · 7H₂O 25 mg/L, Sodium acetate 400 mg/L, Vitamin B₁₂ 5.0 × 10⁻⁴ mg/L, Thiamine HCl 0.4 mg/L [pH6.4]) に *E. gracilis* を植菌し、対数増殖期中期 (培養3日後) および後期 (培養6日後) まで培養した細胞を実験に供試した。

2.2 供試化学物質

コメットアッセイで明確なDNA損傷を与える化学物質として、アルキル化剤である1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG) を用い、*E. gracilis* の細胞懸濁液に100 μM 以下になるよう

に添加した。暴露時間は2時間とし、このときの細胞の生存率は約100%であった。

2.3 コメットアッセイ

コメットアッセイの操作手順は、岩堀ら³⁾の方法に従った。

全面フロストガラス (Dakin Micro Slides No. 2958, Esco 製) 上に0.5%普通寒天溶液90 μ L滴下し、直ちにカバーガラス (24 mm \times 50 mm) をかぶせ、氷上 (4 $^{\circ}$ C) で凝固後、カバーガラスを静かに取り去り寒天層を作製した。つぎに、37 $^{\circ}$ Cで保温した1%低融点寒天溶液にMNNGで処理した等量の細胞試料を混合し、この混合液75 μ Lを先に調製した寒天層上に滴下し、直ちにカバーガラスをかぶせた。これを凝固させてからカバーガラスを静かに取り去り、さらに低融点寒天溶液75 μ Lを滴下し、同様の操作で寒天を凝固させた。

MNNG処理細胞標本と未処理標本(コントロール)をそれぞれ細胞溶解液(300 mM NaOH, 30 mM Na₂EDTA, 0.01% SDS)中に5分間浸漬し、核以外の細胞質を溶解させた。つぎに4 $^{\circ}$ Cに冷却した水平型電気泳動槽中に細胞標本を静置し、DNAの巻き戻し(unwinding)を20分間行った後、電気泳動(電圧25 V、電流300 mA)を20分間行った。電気泳動終了後、細胞標本を5分間隔で2回、Tris-HCl buffer (pH 7.5) で洗浄・中和し、最後に60 μ Lの20 μ g/mL Ethidium bromideで核DNAを染色した。

落射蛍光顕微鏡で1処理群当たり約30個の細胞(核)を観察し、蛍光顕微鏡に装着したCCDカメラと自動画像解析ソフト(SCGソフト:ケイオー電子機)により核DNAのコメット像を解析し、DNA損傷性を評価した。SCGソフトによる評価指標をFig.1に示す。

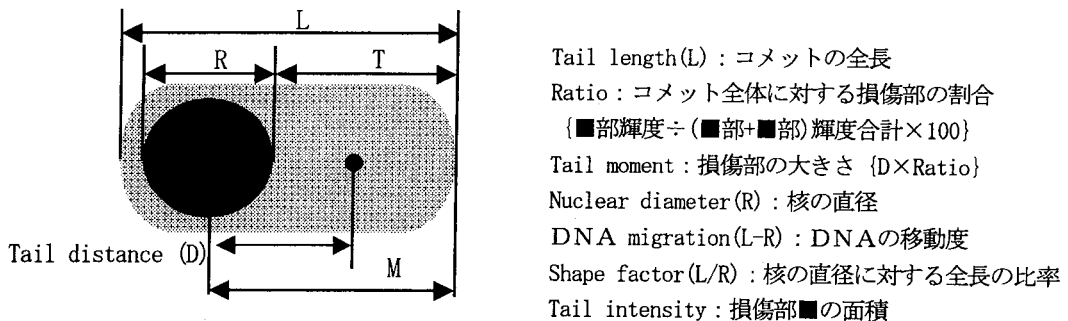


Fig.1 コメットアッセイにおけるDNA損傷評価

3. 実験結果並びに考察

3.1 DNA損傷評価指標の比較

Tail moment を指標としたとき、処理濃度0.5 μ Mと1 μ Mではコントロールとの有意差は認められなかったが、5 μ M以上で $p < 0.001$ となり有意差が確認された (Fig. 2)。

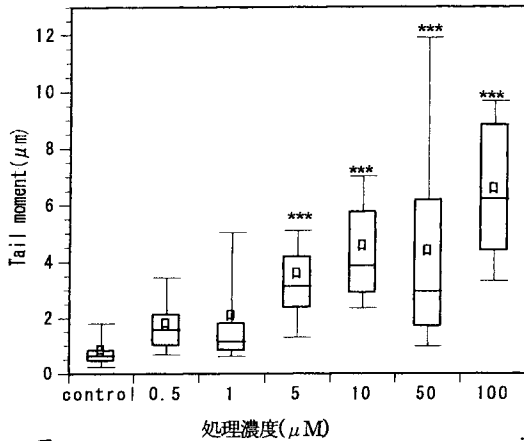
Tail lengthとDNA migrationは、算出法が類似しており、これらのグラフパターンはよく一致していた。両指標とも0.5 μ M以上でコントロールとの有意差が確認された。

Ratio では (Fig. 3)、他の評価指標とは異なり、各処理濃度において分散度合いが小さく、この指標により、個体差を抑えた評価が可能であると推察された。

その他の指標については、高濃度処理時のみ有意差が確認されたものや、濃度依存的なDNA損傷性がみられないなどの結果が得られ、適した指標であるとは言えなかった。

上記4指標の中では、DNA migrationとTail lengthが、各処理濃度における分散度合いが最も大きく、DNA損傷性の個体差が強調される指標であった。しかし、個体差による影響が大きいため、MNNG濃度に依存したDNA損傷度合いを得ることは困難であった。Tail momentは、個体差を感度よく評価でき、しかも濃度依存的な損傷度合いの変動を得ることができた。一方、Ratioは個体差による影響を抑制でき、処理濃度に応じたDNA損傷を評価するには、最も適した指標であった。Tail momentとRatioの相関係数を

求めたところ、対数増殖中期の細胞では0.734、対数増殖後期では0.726となり、これら2つの指標間には正の相関があることがわかった。従って、Tail momentとRatioは有効な指標であり、コメットアッセイにおけるDNA損傷性の評価には、これら2指標を併用することが効果的であると推察された。



ボックスの上、中、下の線でそれぞれ値の大きい順から最初の四分位数、最後の四分位数、中間値を示している。下部のホイースカは最後の十分位数、上部のホイースカは最初の十分位数を示しており、□は平均値を示している。

Fig.2 MNNG処理時のTail momentによるDNA損傷評価

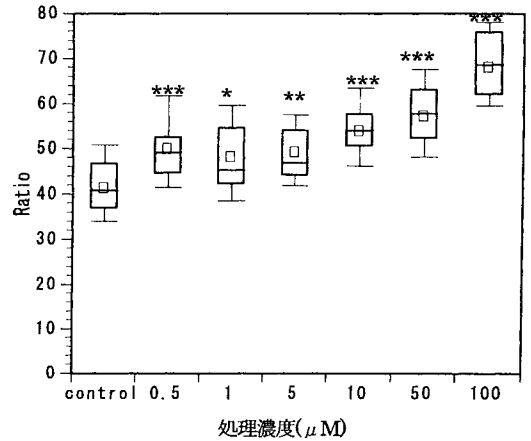


Fig.3 MNNG処理時のRatioによるDNA損傷評価

3.2 DNA損傷評価指標の標準化

Tail momentでの個体差とRatioでの損傷度合いの関係を表すため、散布図による比較を試みた。個体差による散布度の指標として、Tail momentの範囲、標準偏差、分散、変動係数を用い、Ratioの平均値との相関を各々求めたところ、散布度指標には標準偏差が最も適していることが明らかになった。

最後に、Tail momentでの評価時に、実験ごとに得られるデータの比較を容易にするため、コントロール群の数値を基準とする標準化式(次式)を導入した。

$$T=(X_i - \mu_{\text{control}}) / \sigma_{\text{control}} \quad (i=1, 2, \dots, n)$$

ここで、 X_i : 個々の細胞での実測値

μ_{control} : コントロール群における平均値

σ_{control} : コントロール群における標準偏差

これより、どの試験においてもコントロール群では平均値が0、標準偏差が1に標準化されるため、コントロール群だけは全く同様の分布を示すことになる。また単位が無次元化され、データ変換前と比べて、異なる処理条件で得られるデータの比較が容易となる。

本研究では、Tail momentの標準化数値における標準偏差(TM_{SD})と、Ratioのコントロール群に対する各処理群の平均値の比($Ra_{\text{cont比}}$)をとり、数値データをレベル化することとした。すなわちTable1のように、 TM_{SD} の値をA: 0~2、B: 2~4、C: 4~の3段階に、 $Ra_{\text{cont比}}$ の値を1: 0.8~1.0、2: 1.0~1.2、3: 1.2~の3段階に区分し、個体差による散布度(TM_{SD})と処理濃度に応じたDNA損傷度合い($Ra_{\text{cont比}}$)の組み合わせで

評価を試みた。*E. gracilis*およびヒトリンパ球を用いて得られたデータを、Table 1 に従って区分した結果をTable 2 に示す。

Table 1 TM_{SD} と Ra_{cont} 比の区分表

		TM_{SD}		
		0~2	2~4	4~
Ra_{cont} 比	0.8~1.0	1A	1B	1C
	1.0~1.2	2A	2B	3B
	1.2~	3A	3B	3C

Table 2 コメットアッセイ各種データの TM_{SD} と Ra_{cont} 比による評価

細胞	処理事物質	処理濃度 (μ M)						
		Control	0.5	1	5	10	50	100
対数中期 Eg*	MNNG	1A	2A	2C	2C	3B	3C	3C
対数後期 Eg	MNNG	1A	2A	3B	3C	3C	3C	3C
Eg	MMC	1A	2A	3B	2A	2A	2B	-
Eg	AMD	1A	1A	1B	2A	2A	1A	1A
Eg	BAP-	1A	1A	1B	2B	2B	-	-
Eg	BAP+	1A	2A	2A	3A	2B	-	-
Ly*	MNNG	1A	2A	1A	2B	2C	3C	3C
Ly	BAP-	1A	2A	2C	2B	2C	-	-
Ly	BAP+	1A	2A	2A	2A	2A	-	-

注) MMC: Mitomycin C, AMD: Actinomycin D, BAP: Benzo(a)pyrene (-: S9mix 無添加, +: S9mix 添加), *: Eg, *E. gracilis*; Ly, ヒトリンパ球

この結果、各処理条件における細胞集団の2つの応答（個体差による分散度合いと濃度に応じた損傷度合い）を1つの指標で表すことが可能であった。コントロール群を基準とした標準化を行うことで、個体差による影響が軽減され、実験結果の相互比較が容易になったと考えられる。

今後は、*E. gracilis*を用いたコメットアッセイと他のバイオアッセイとの比較検討や、実際の環境水への適用を行い、コメットアッセイを用いた環境水の生態毒性の評価法を確立していく予定である。

参考文献

- 1) 浮田正夫、河原長美、福島武彦、長祥隆：環境保全工学、技報堂出版、p.108 (1997)
- 2) Ostling, O., Johanson, K. J.: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 123, 291-298 (1984)
- 3) 岩堀恵祐、宮田直幸、梅田泰史、青山光太郎、下位香代子、木苗直秀：環境微生物を用いたコメットアッセイ操作条件の実験的検討、日本水処理生物学会誌、35(4)、261-270 (1999)