銀染色法を用いた簡便な DNA 損傷検出法としての コメットアッセイ

田 山 寿美子, 中 川 好 男

Comet Assay Attempted with Silver Staining Method and Manual Microscopic Analysis Using CHO-K1 Cells

Sumiko TAYAMA^{*}, Yoshio NAKAGAWA^{*}

Keywords: コメットアッセイ comet assay, CHO-K1 細胞 CHO-K1 cells, 銀染色 silver staining

はじめに

コメットアッセイは Singh 等(1988)¹⁾により個々の細胞 での DNA 損傷を検出する簡便で高感度な試験法として開 発された. 非分裂の細胞にも適用でき、in vivo では薬物の 標的臓器での DNA 損傷の検出にも用いられている 2). そ の原理は有核細胞をスライドグラス上の Ager に包埋し、 界面活性剤と高濃度の塩を含むアルカリ溶液で細胞を融解 した後、アルカリ条件下で DNA の 2 重鎖間の水素結合を 壊して開裂させ、DNAの一本鎖切断とアルカリ易溶出部位 (塩基のアルキル化や付加体形成などにより塩基の欠損し た部分)を断片化する. これを電気泳動にかけて断片化し た DNA を移動させ蛍光染色して検鏡すると、断片化を起 こしたものは彗星(コメット)のように長く尾を引いた像を 呈する(図1). この尾の状態が DNA 損傷の程度を表す(小 さい DNA 断片ほど大きく移動する). その定量的評価に は、画像解析により算出した DNA の移動距離と移動した DNA 量(%)から DNA 断片化の程度を数値化する方法 3)が 一般に行われている. しかしこれには時間的(蛍光色素の 早い褪色), 経済的 (画像解析装置の設備)制約がある. そ こで我々はこれらの点を克服すべく, 染色に褪色しにくい 銀染色を用いることと尾の状態をグレードに分けた分類表 を作ることによって、顕微鏡下の肉眼判定で評価する方法を工夫した. 今回 DNA 損傷を起こすことが知られている 過酸化水素を用いて検討した結果を報告する.

材料および方法

細胞および培養: CHO-K1 細胞を用い, Ham の F-12 培地に, 10 %牛胎児血清(FBS), ペニシリン(100 unit/mL)及 びストレプトマイシン(100 μ g/mL)を加えた培地で, 37°C のインキュベーター内でガラス角瓶中で培養した.

コメットアッセイ:角形培養瓶(底面 $35 \times 90 \,\mathrm{mm}$)に培地 $4 \,\mathrm{mL}$ を加え, 4×10^5 個の細胞を播種し, $48 \,\mathrm{時間密}$ 栓培養した. 培地を血清無添加培地 $(2 \,\mathrm{mL})$ に換えて過酸化水素を加え, $1 \,\mathrm{時間培養した}$. 処理液を捨て, Dulbecco の燐酸緩衝液 (Ca, Mg-free, pH 7.3) で細胞を洗った後, $0.5 \,\mathrm{mL}$ の $0.25 \,\%$ トリプシン液を加えて 細胞面に行き渡らせて余分を捨て, $2-3 \,\mathrm{分間}$ インキュベートした. $10 \,\%$ FBSの入った培地 $1 \,\mathrm{mL}$ を加えて反応を止め, 細胞を剥がして試験管に集めた. 細胞数を数えて, その一部でトリパンブルーの取り込み阻害から細胞生存率を調べた. これ以降はコメットアッセイキット(TREVIGEN Inc.)を用い, その手順に従った. 血清無添加の培地で $1 \times 10^5 \,\mathrm{mm}$ に調整し

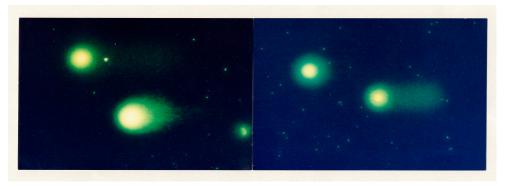


図 1. CHO-K1 細胞の過酸化水素処理によるコメットの蛍光染色像 A: 1.2 mM, B: 0.6 mM

^{*}東京都健康安全研究センター環境保健部薬理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*} Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 3-24-1, Hyakunin-cho, shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

た細胞浮遊液の 50 μL を, 500 μL の予め溶かしておいた Ager に加え、その 50 uL をスライド上のサークルに落と して広げ、冷蔵庫内で固めた. そのスライドを細胞溶解 (Lysis) 液 Alkali 液(1.2% 水酸化ナトリウム液に EDTA (TREVIGEN Inc.)を加えて作製した)の順に浸し、 Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (SIGMA Inc.) で洗い、 同 buffer を入れた電気泳動装置中で 25 volt, 9分間通電 した. その後蛍光染色または銀染色を行った. 蛍光染色は SYBR 液 (TREVIGIN Inc.) を希釈し、スライド上に滴下 して蛍光顕微鏡で観察した. 銀染色は泳動後の標本あるい は観察が終了した蛍光染色標本を乾燥させてからキット (TREVIGIN Inc.)の手順に従い、固定 水洗 染色操作 5% 酢酸液による停止 水洗 乾燥により行った.

観察及び判定: DNA 損傷の程度は DNA 断片の移動距離 と移動した DNA 量に依存している. コメットの判定及び 評価に、定性のみでなく定量的要素も加えるため、コメッ トの分類表(図2)を作成した. コメットは丸い頭部(DNA が移動していない核の部分)長く伸びた尾(DNA 断片)の部 分から成る. DNA 損傷のないものは丸い頭部のみだが, DNA 損傷が起こると損傷の程度を反映した種々のタイプ の尾を生じる(図3). 尾 の長さ,面積,濃さにより,尾 の無いもの()から、核内のDNA全てが断片化した頭部の)まで - の5 無いものあるいは頭部の極微少なもの(つに分けた. これに点数を与えて(

3) 細胞あたりの平均点数を コメット値 として求め に分類した頭部の微少なもの及び全くないものは た. 細胞毒性やアポトーシスなどの細胞死に起因することが示 唆されている 4)ので、別に集計してコメットの点数には加 えなかった.300以上の細胞を観察判定して2 検定した.

結果と考察

過酸化水素(0.075 - 1.2 mM)で CHO-K1 細胞を1時間 処理した後の、各グレードのコメットの出現率および コ メット値 を表 1,2 に示した.過酸化水素を処理していな い対照群では、尾のない のタイプが大部分であった (77 %, 表 2, 図 3). この のタイプの割合は過酸化水素 の濃度の増加と共に低下し、最高濃度の 1.2 mM では 26.4 % と約 1/3 に減少した. 反対に尾のあるタイプ 以 上のグレードの出現は、過酸化水素の濃度が高まるに従い 増加した. 各タイプの出現率の推移を図 4 に示した. 最も 軽度の損傷(+)のタイプ は 0.3 mM でピークとなり, こ れ以上の濃度では幾分低下した. 尾の有るものの総出現率 は、このタイプ の低い濃度からの増加によって、0.075 mM 以上で対照より高く(p<0.05) なった. 過酸化水素の 濃度が増加するに従い、損傷の重篤なものの出現が増えた. 尾の明瞭なタイプ (++)では 0.9 mM の濃度での出現率 が最も高く、尾の長く太く濃いタイプ (+++)では最高 濃度 1.2 mM で 11.4 % の最高値を示した(表 2 ,図 3) 損 傷が中~高度のこのとのタイプの合計は過酸化水素の

Ⅰ型:(-) 尾がないもの



Ⅱ型:(+) 長くても薄い尾、明瞭だが短い尾





Ⅲ型:(++) 明瞭な中程度または長い尾





Ⅳ型: (+++) 長い尾で頭部より尾の幅が 太とく濃いもの





(V型:頭部が全くないか極微少なもの)



図2. コメットのタイプ別分類表

濃度の増加と共に増え(図 5A), 0.15 mM 以上から対照に 比べ高く(p<0.01)なった. 各グレードのコメット像を点数 化して求めた コメット値 の過酸化水素濃度の上昇に伴 う推移(図5B)は、これらの特徴を良く反映しており、コ メット値 が DNA 断片化の定量的評価に有効であること

表 1. CHO-K1 細胞への過酸化水素処理によるコメットのタイプ別 出現数と DNA 損傷の強さ (コメット値)及び細胞生存率

過酸化水素	コメッ	小のタイ	プ別出	現数	合計	コメット値 ¹	生存細胞2)
(mM)	IV	Ш	Π	Ι			(%)
0	0	12	75	297	384	0.26	87. 0
0.075	1	5	85	218	309	0.32	89. 1
0.15	6	19	108	223	356	0.46^{**}	83.5
0.3	3	71	145	164	383	0.77**	88.3
0.6	5	80	116	117	318	0.92**	87. 2
0.9	21	105	114	93	333	1. 16**	82. 1
1.2	44	113	127	102	386	1. 26**	85.4

^{*} p<0.05, ** p<0.01

表 2. 過酸化水素を1時間処理したCHO-K1細胞における コメットのタイプ別出現割合

過酸化水素	コメット	のタイプ	コメッ	コメット (%)		
(mM)	IV	III	II	Ι	合計	IV+III
0	0	3. 1	19.5	77.3	22.7	3. 1
0.075	0.3	1.6	27.5	70.6	29.5^*	1.9
0.15	1.7	5.3	30.3	62.6	37. 4**	7. 0**
0.3	0.8	8.5	37.9	42.8	57. 2**	19. 3**
0.6	1.6	25. 2	36. 5	36.8	63. 2**	26. 7**
0.9	6.3	31.5	34. 2	27.9	72. 1**	37. 8**
1.2	11.4	29.3	32.9	26.4	73. 6^{**}	40. 7^{**}

^{*} p<0.05, ** p<0.01

¹⁾ Ⅳ:3,Ⅲ:2,Ⅱ:1,Ⅰ:0 でコメットを得点化し,総得点/細胞数を算出して コメット値とし、DNA損傷の強さの指標とした. 2) トリパンブルー液で染まらない細胞.

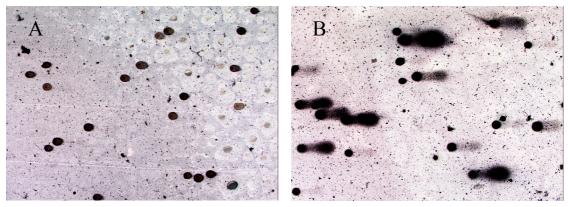


図 3. CHO-K1 細胞の銀染色によるコメット像 A: 対照, B: 過酸化水素 1.2 mM

本試験では細胞生存率は過酸化水素の最高濃度1.2 mM でも低下せず(表1), 別に集計したタイプ の DNA 損傷の 激しいもの(頭部が微少なものや全く無いもの)の出現もほ とんど見られなかった (1.2 mM でも0.78 %). 今回使用し た DNA 損傷作用の強い過酸化水素の場合、その作用の検 出に細胞毒性や細胞死を生じるまでの高い濃度での処理は 必要なかったが、一般に高濃度で DNA 損傷物質のスクリ ーニングが行われた場合、細胞毒性や細胞死が原因で二次 的に DNA の断片化を起こすことも考えられ^{4,5)}, 薬物の作 用の正しい評価のためにはこれをデータから除外する必要 がある.これについては細胞生存率が70 %6 あるいは 75 %7 以下に低下した濃度を用いないこと、及び細胞死を 起こしている像の特徴とされる、頭部の無い全てが断片化 した損傷の極めて激しいもの4) や特徴的なアポトーシスの 形態(涙的状)8·10)を示すものを別に数えてコメットのデ ータから除外すること6,11)及びこの値が 15 % を超えるも ののコメットのデータは評価に加えないこと60などで対処 できるとされている6). しかし一方で、細胞毒性による細 胞死はコメットの成績には影響しないことを示す報告¹²⁾も ある.

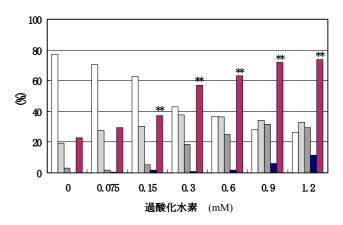
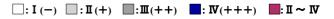
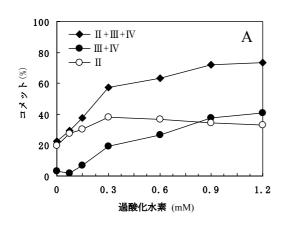


図 4. CHO-K1 細胞への過酸化水素処理で出現した コメットのタイプ別割合



今回の結果は、コメットアッセイにおいて画像解析を用いなくても、DNA 損傷を定性的にだけでなく定量的にも判定評価出来ることを示した、小林と林 $(1999)^{13}$ は DNA 損傷作用のある過酸化水素などの物質を TK6 細胞に曝露し、コメットの形態を 5 つのタイプに分類して得た成績と、画



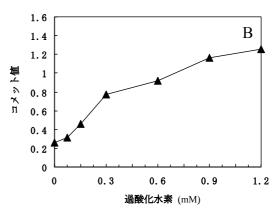


図 5. 過酸化水素による CHO-K1 細胞へのコメットの誘発

A: コメットのタイプ別出現率.

B: コメットのタイプ別出現頻度を数値化してコメット値 として表したもの.

 $I \to 0$, $II \to 1$, $III \to 2$, $IV \to 3$ で得点化し,総得点/細胞数を算出してコメット値とし,DNA損傷の指標とした.

像解析により、尾に含まれる DNA 量(%)と DNA 断片の移動距離(tail moment)から得た値とは良く一致することを報告している。 CCD カメラなしで顕微鏡下でコメットのグレードを判定し記録した今回の方法においては、蛍光色素による染色に換えて褪色しにくい銀染色の採用が必須であった。 銀染色では標本を乾燥させてから観察するので同一平面でピントの移動が少なくて済み、観察中の褪色変化もないので、カメラや画像解析ソフトを用いた場合にも利便性が高いと思われる。

コメットアッセイではその検出原理からマイトマイシン C などの架橋形成剤は感知できないが, DNA 一本鎖切断剤を前処理しておくことによって DNA 断片化の抑制反応としてこれを検出できる ¹⁴⁾. DNA 損傷物質のスクリーニングは普通いくつかの方法を組み合わせて行われている. コメットアッセイでの結果が陰性で他の試験法でのそれと異なった場合には, これにより架橋形成作用の有無を判別することはできる. 我々は当所において CHO-K1 細胞を用いて染色体異常試験および SCE (姉妹染色分体交換)試験を行ってきた. これにコメットアッセイを加えることで,より多方面からのアプローチを目指し,データ評価を信頼性の高いものにしていきたい.

文 献

 Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.: Exp. Cell. Res., 175, 184-191, 1988.

- Sasaki, Y.F., Tsuda, S., Izumiyama, F., Nishidate,
 E.: Mutat. Res., 388, 33-44, 1997.
- 3) Collins, A.R., MaRi-guo, Duthie, S.J. : *Mutat. Res.*, **336**, 69-77, 1995.
- 4) Tice, R.R., Agirell, E., Anderson, D., et al.: Environ. Mol. Mutagen., **35**, 206-221, 2000.
- 5) Kirkland, D.J., Muller, L. : *Mutat. Res.*, **464**, 137-147, 2000.
- 6) Hartman, A., Kiskinis, E., Fjällman, A., Stuter, W.: Mutat. Res., 497, 199-212, 2001.
- 7) Henderson, L, Wolfreys, A., Fedyk, J., et al. : *Mutagenesis* **13**, 89-94, 1998.
- 8) Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. : *Mutat. Res.*, **339**, 37-59, 1995.
- 9) Olive, P.L., Frazer, G., Banáth, J.P.: *Radiat. Res.*, **136**, 130-136, 1993.
- 10) 大山八ルミ, 山田武: Environ. Mutagen Res., **21**, 237-241, 1999.
- 11) Hartman, A., Speit, G.: *Toxicol. Lett.*, **90**, 183-188, 1997.
- 12) Hartman, A., Speit, G.: Mutat. Res., **346**, 49-56, 1995.
- 13) 小林浩, 林真: Environ. Mutagen Res., **21**, 231-236, 1999.
- 14) 宮前陽一: Environ. Mutagen Res., 21, 225-230, 1999.