

報 文

コメットアッセイを用いたアクリルアミドのDNA損傷作用の評価

三輪 操, 松丸裕之, 内藤成弘

DNA-damaging Activity of Acrylamide Evaluated by Comet Assay

Misao MIWA, Hiroyuki MATSUMARU and Sigehiro NAITO

National Food Research Institute

Abstract

Acrylamide is a potential cancer-causing agent, and it is present in fried and oven-cooked foods. We evaluated DNA-damaging activity of acrylamide using comet (single-cell gel electrophoresis) assay. HL60 (human promyelocytic leukemia cell line, 1×10^6 cells/ml) were treated with acrylamide at various concentrations such as 1, 10, 100, 1000, 10000 ppm for 30 min in a CO₂ incubator (5% CO₂, 95% air, 37°C). Among 6 indexes of comet assay including tail length, shape factor, nuclear diameter, tail intensity, tail moment, and DNA migration, tail moment properly reflected DNA damage of HL60 cell by acrylamide. In every case more than 95% of cells were alive after 30 min incubation. Two hour treatment of HL60 with acrylamide (0.01-10 ppm) brought highly sensitive detection of the activity with a dose dependent manner.

(Received Dec. 24, 2002 ; Accepted Feb. 12, 2003)

生体は活性酸素や活性窒素などのラジカル, 放射線, 紫外線, 化学物質などの攻撃を受け, DNA, 膜脂質, タンパク質などが損傷を受ける. 生体にはこれらの損傷を修復する機能があるが, 修復機能が損傷を上回ったとき, あるいは疾患, 高齢などにより修復機能が低下したときには, 損傷を修復することができず様々な疾病を引き起こす原因となる^{1,2)}.

コメットアッセイ (single cell gel electrophoresis) は放射線照射によるDNA 2本鎖の切断を検出する方法として開発されたものである³⁾. その後さまざまな改良がなされ, DNAの1本鎖切断, アルカリ条件下で不安定なDNA損傷なども高感度で検出できるようになり, 変異原物質の作用機作, 抗変異原物質の検索などにも使われるようになってきた⁴⁾. 我々はコメットアッセイを用いて, 食肉・臓器抽出物やみそ・醤油由来のメラノイジンに, 強力な変異原であるヘテロサイクリックアミン, 一酸化

窒素, 過酸化水素などによるDNA損傷を抑制する作用があることを明らかにしてきた^{5,6,7)}.

本研究では, 食品の調理加工中にアミノカルボニル反応により生成し^{8,9)}, 発がん性が疑われているアクリルアミド¹⁰⁾について, コメットアッセイによる遺伝子損傷の検出を試みた.

実験方法

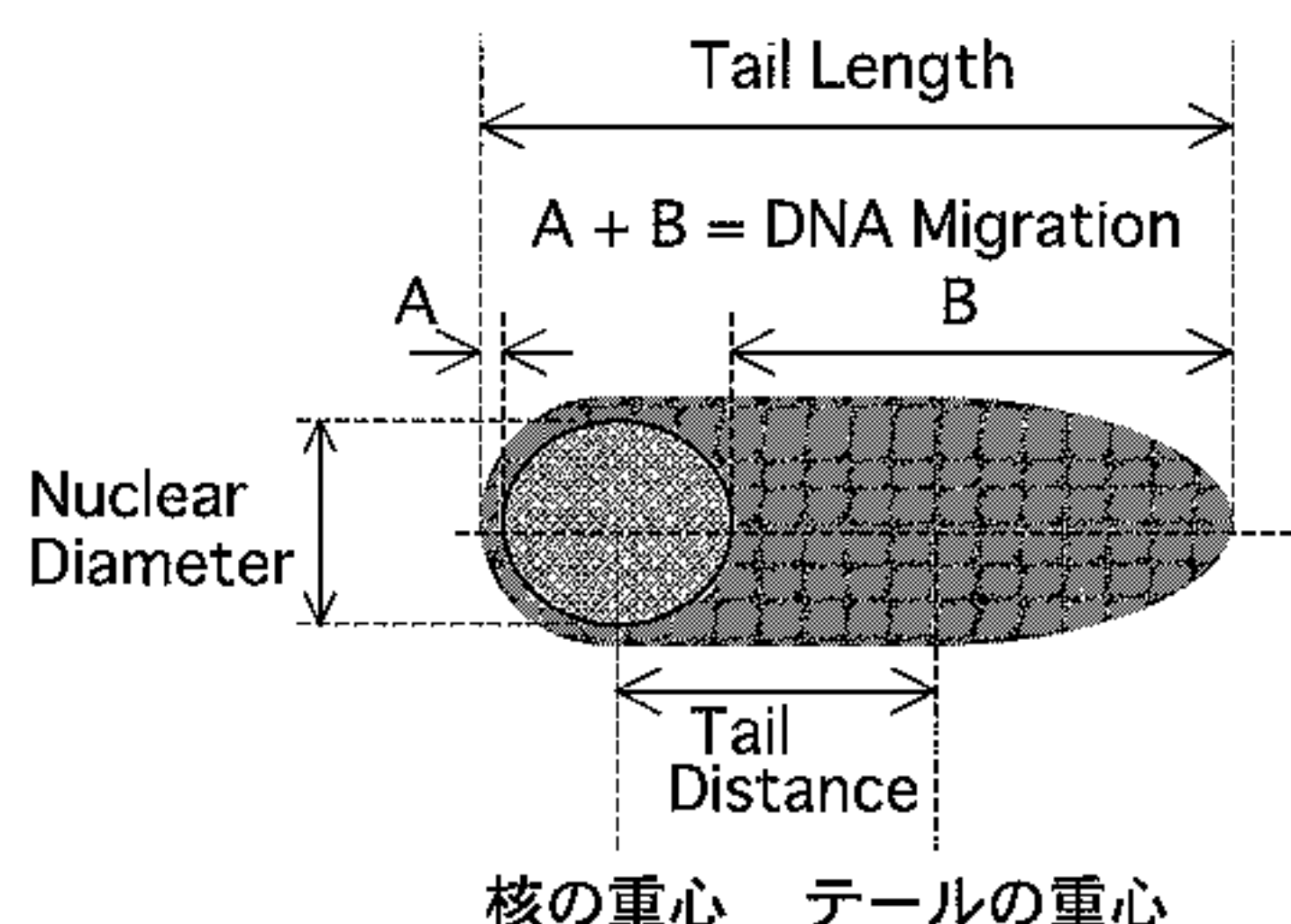
1. 細胞および培地

本実験では, 理研ジーンバンクから分譲された, ヒト白血病由来細胞HL60を用いた. 細胞は, 10%牛胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を用いて炭酸ガスインキュベーター中 (5%炭酸ガス, 37°C) で継代培養した. 細胞は実験前に1,000rpmで5分間遠心して上清をのぞき, 血清を含まないDMEM培地に交換した.

2. 試薬の調製と細胞培養

アクリルアミドはまず純水に溶解してからDMEMで段階希釈して20,000ppmから0.2ppm溶液を調製した。細胞のDNA損傷を評価するポジティブコントロールは、一酸化窒素発生剤である3-(2-hydroxy-1-methyl-2-nitroso-hydrazino)-N-methyl-1-propanamine (NOC7, DOJINDO) を用いた。NOC7は、0.1M水酸化ナトリウムで溶解し、1M溶液を調製し、使用時まで-30℃で保存した。

無血清DMEM培地で 2×10^6 cells/mlに調製した細胞けん濁液1 mlとアクリルアミド溶液(最終濃度0.1～10,000ppm) 1mlをシャーレに入れ、炭酸ガスインキュベーター中で30分間あるいは2時間培養した。アクリルアミド溶液の代わりにDMEM 1mlと0.1M水酸化ナトリウム50 μ lを加えたものをネガティブコントロール(NC), DMEM 1mlと1Mまたは2.5M NOC7を50 μ l加えたものをポジティブコントロール(PC)とした。



- ・ Tail Length 細胞の全長
- ・ Nuclear Diameter 核の直径
- ・ DNA Migration DNAの移動量
- ・ Shape Factor 核の直径に対する全長の比率
- ・ Tail Intensity 損傷部の面積
- ・ Tail Moment 損傷の度合い
(Tail Distance × 全輝度に対する損傷部輝度の比率)

図1. コメットアッセイ解析に用いた指標

解析に使用したソフトウェアは本文参照

3. コメットアッセイ

アクリルアミドとともに培養した細胞をSingh らの方法³⁾に従って電気泳動をおこなった。すなわち、培養後の細胞を37℃に保温したアガロース溶液(0.5% in P B S)にけん濁し、その一部をあらかじめ0.75%のアガロースを塗布したスライドガラス上に均一に塗り広げた。アガロースを0℃で固めた後、スライドガラスをsodium sarcosinate溶液(pH10, 4℃)に1時間浸漬し、cell lysisを行った。次に、スライドガラスをpH13の電気泳動バッファーで満たしたサブマリーン型電気泳動槽に20分間浸漬した後、電気泳動を行った(30分間, 20 V)。スライドガラスを0.4 M トリスバッファー(pH7.5)で3回洗い50 μ g/mlのpropidium iodide で10分間染色した。染色後スライドガラスを水洗し、中央部にカバーガラスを

載せて蛍光顕微鏡(BX50, オリンパス)で観察した。

4. DNA損傷度の評価

蛍光顕微鏡で観察した画像を、1実験区につき最低50個、CCDカメラでコンピューターに取り込み、画像解析ソフト(SCG画像解析支援ソフト, ケイオー電子工業)で解析し、tail length, shape factor, nuclear diameter, tail intensity, tail moment, DNA migrationの6種類の指標を求めた。図1に本実験で使用した各指標の定義を示す。DNA損傷度の指標としてtail moment 値について、データ解析ソフトウェアR¹¹⁾(<http://www.r-project.org/>よりフリーソフトウェアとして入手可能)を用いて、処理間のノンパラメトリック検定(Wilcoxonの順位和検定、ただし対比較の組み合わせ数で危険率を調整)を行った。

実験結果及び考察

1. アクリルアミド30分間処理

アクリルアミドがHL60細胞のDNAに障害を与える濃度を知るため、細胞とアクリルアミドとの培養時間を30分に固定し、アクリルアミドの濃度を1から10,000ppmに大きく変化させてDNAに対する影響を調べた。いずれの濃度においても、培養後の生細胞の割合は95%以上

であった。表1に測定した各指標（試料数50の中央値）を示す。顕微鏡下での目視および6種の指標値で、nuclear diameterはほとんど変化がないこと、shape factorの増加割合に比べてtail intensityの増加割合が大きいことなどより、アクリルアミドによるDNA損傷のコメット像は、核の大きさはほとんど変化がなく、尾（tail）は比較的短く広がった形状であることを示している。図2にアクリルアミド処理したDNAのtail momentの分布を示した。ネガティブコントロール（NC、無処理）とくらべ、

表1. アクリルアミド濃度とコメットアッセイの各指標との関係

濃度(ppm)	Tail Length	Shape Factor	Nuclear Diameter	Tail Intensity	Tail Moment	DNA Migration
0	86.2	1.7	44.8	2,930	1.30	37.2
1	85.8	1.8	44.8	2,470	1.50	37.1
10	81.4	1.9	42.4	2,270	2.00	38.0
100	90.9	1.9	44.8	2,660	2.60	42.5
1000	101.7	2.3	42.3	2,570	5.20	58.0
10000	131.6	2.7	48.7	5,520	9.98	84.2
PC*	125.3	2.7	44.2	4,830	12.90	77.1

アクリルアミドをHL60細胞に添加し30分間培養後アッセイ

値は本文中に示した解析ソフトを用いて得られた値（相対値）の中央値（n = 50）

*PC：ポジティブコントロール(2.5 mM NOC 7)

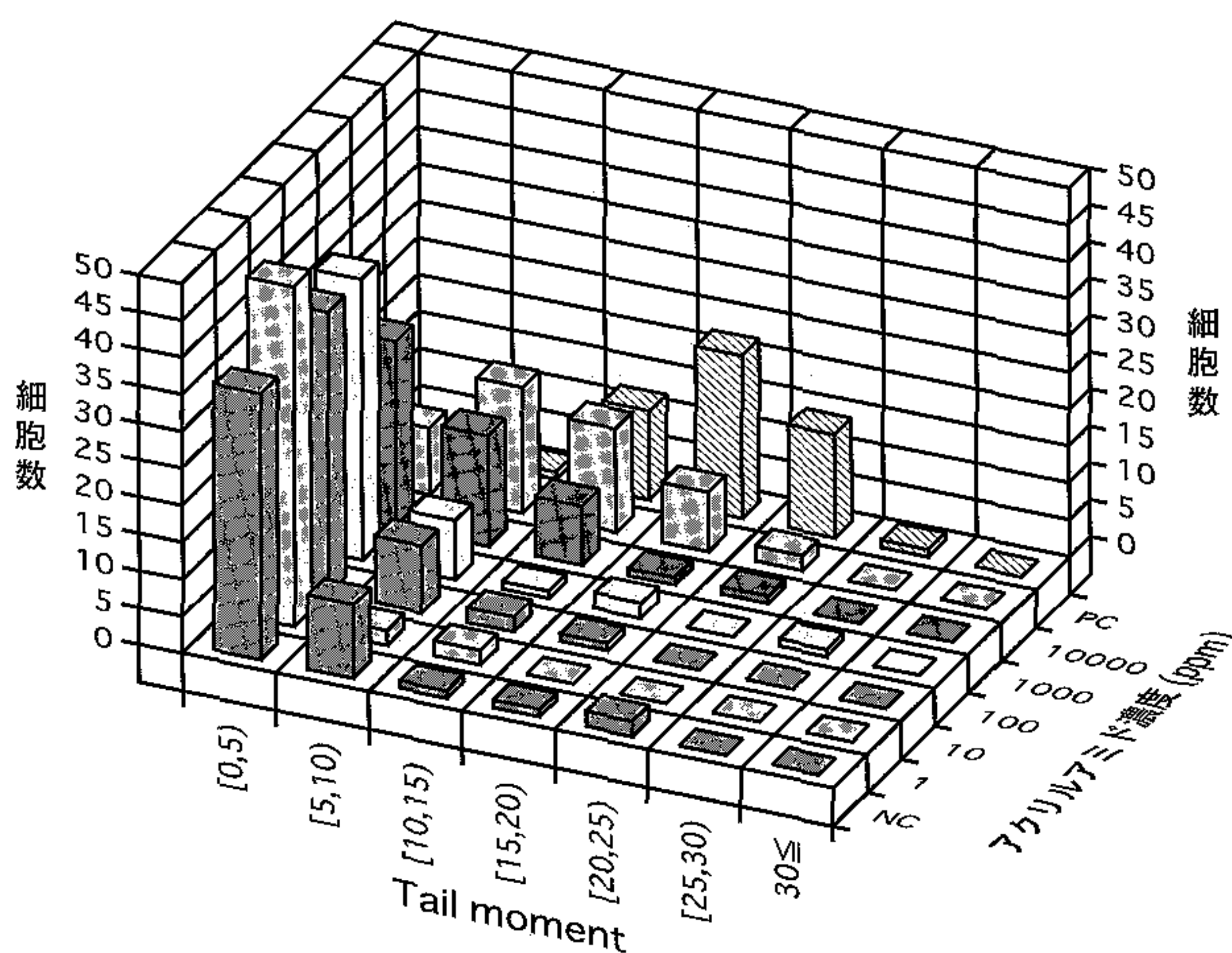


図2. アクリルアミドとHL60細胞を30分間培養したときのTail momentの分布

NC：ネガティブコントロール（アクリルアミド無添加）

PC：ポジティブコントロール（2.5 mM NOC7 添加）

アクリルアミドは100 ppmまでは類似のパターンを示したが、それ以上の濃度では細胞数のピークがtail momentが長い区分にシフトしていった。Tail moment値を用いてWilcoxonの順位和検定を行った結果、無添加と1,000 ppmでは $P < 0.1$ で、10,000 ppmでは $P < 0.001$ で有意な差が認められた。

表2. コメットアッセイによるアクリルアミドの検出感度

濃度(ppm)	Tail Moment	Tail Length
0	1.43 ^{a**}	78.1
0.01	1.36 ^a	74.2
0.1	1.72 ^a	76.9
1	3.21 ^b	96.2
10	5.33 ^c	110.5
PC*	15.82 ^d	138.1

培養時間：2時間

数値は中央値 (n=50), 表1の脚注参照

*PC: ポジティブコントロール (1 mM NOC7)

** 異符号間には有意差有り ($P < 0.001$)

2. アクリルアミド 2 時間処理

コメットアッセイによるアクリルアミドの検出感度を上げるためにHL60細胞とアクリルアミドとの培養時間を30分から2時間に延長した。アクリルアミド濃度は0.01から10 ppmとした。このときのTail momentの分布を図3に示す。アクリルアミド0.01 ppmでは無添加の場合とほぼ同様のパターンを示したが、0.1 ppm以上では細胞数のピークがtail momentが長い区分にシフトしていった。表2に2時間培養時のtail momentとtail lengthの測定結果を示した。Tail moment値を用いてWilcoxonの順位和検定を行った結果、表2に示すように1 ppm以上で無処理区と有意差が認められた ($P < 0.001$)。

アクリルアミドによるDNA障害をコメットアッセイで検出可能な濃度は、*in vitro* で10-100 μ g/ml, *in vivo* で10-100 μ g/kg¹²⁾と報告されている。本研究では、HL60細胞と2時間培養することにより1 ppm (1 μ g/ml)のアクリルアミドを検出することができた。0.1ppm以上1 ppm未満の濃度設定を行えば1 ppm以下の濃度でも検出される可能性がある。用いる細胞の種類、培養時間などを工夫することにより検出感度がさらに上がる可能性がある。

本実験ではポジティブコントロールとしてNOC 7を用いたが、我々がすでに報告しているように、食肉臓器類・

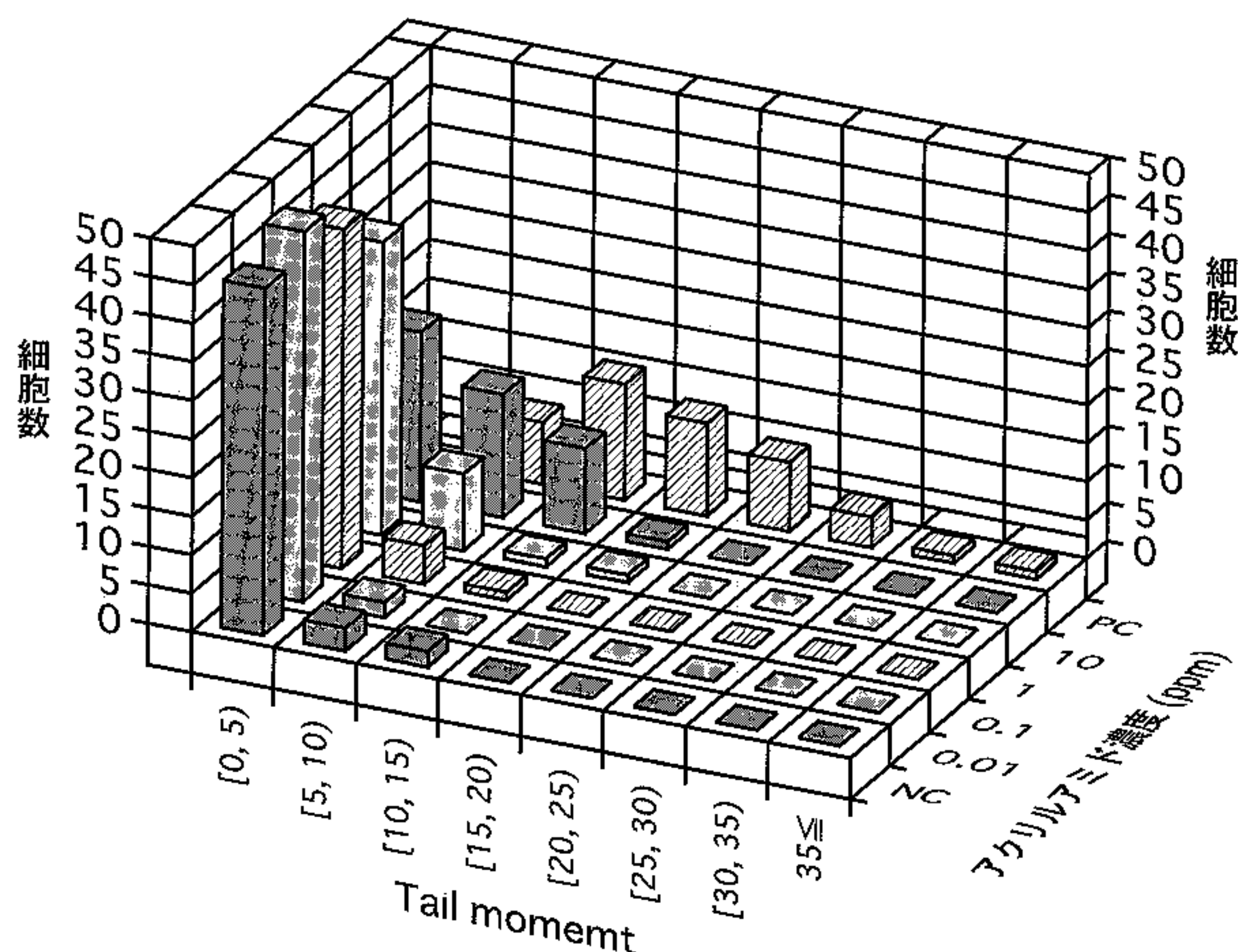


図3. アクリルアミドとHL60細胞を2時間培養したときのTail momentの分布

NC: ネガティブコントロール (アクリルアミド無添加)

PC: ポジティブコントロール (1 mM NOC7 添加)

醤油・みそ由来メラノイジンはNOC7 (1mM)によるDNA障害を抑制する作用がある⁷⁾。これまでの報告と本実験の結果から、1mM NOC7によるDNA損傷作用の強さは、アクリルアミド1000 ppm程度に相当すると思われる。したがって、食品中で加熱中に生成する数百から数千 ppmのアクリルアミドのDNA損傷作用は、食肉臓器、醤油・みそ由来メラノイジンなどによって抑制される可能性が十分考えられる。今後、これらの可能性について研究を進めていきたい。

要 約

コメットアッセイ (single-cell gel electrophoresis) を用いて、食品の加熱中にアミノカルボニル反応により生成し、発がん性が疑われている化合物、アクリルアミドのDNA損傷作用を調べた。ヒト由来HL60細胞とアクリルアミドを30分間培養したとき、コメットアッセイの6つのインデックスはアクリルアミド濃度が1-10000 ppmまで濃度に依存して増加した。tail moment をインデックスとして検出感度を上げるための条件を検討した結果、2時間の培養でアクリルアミドのDNA損傷作用は、0.1~10 ppmまで濃度依存的に増加し、1 ppm以上 で有意差が認められた ($P<0.001$)。

文 献

- 1) 二木鋭雄, 生体の酸化的傷害とそれに対する防御システム, 「抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御」, 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃 真編, (学会出版センター, 東京), pp.3-11(1996).
- 2) Calini, V., Urani, C. and Camatini, M., Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells, *Cell Biol. Toxicol.*, **18**, 369-379 (2002).
- 3) Singh, N.P., A Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell. Res.*, **175**, 184-191 (1988).
- 4) Plewa, M.J., Wagner, E.D., Kirchoff, L., Repetny, K., Adams, L.C., and Rayburn, A.L., The use of single-cell gel electrophoresis and flow cytometry to identify anti-mutagens from commercial soybean byproducts, *Mutation Res.*, **402**, 211-218 (1998).
- 5) Miwa, M. and Hongo, Y., Application of a single-cell gel electrophoresis (comet) assay to screen the anti-mutagenic activity in foods, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1292-1294 (2000).
- 6) Miwa, M., Watanabe, T., Kawasumi, T. and Hayase, F., Protective effects of melanoidins derived from soy sauce and soy paste on NO-induced DNA damage, *Food Sci. Technol. Res.*, **8**, 231-234 (2002).
- 7) 岩崎智仁, 阿部茂, 山本克博, 三輪操, コメット・アッセイを用いた食肉資源のDNA損傷抑制効果に関する研究, 酪農学園大学紀要, **27**, 85-94 (2002).
- 8) Mottram, D.S., Wedzicha, B.L. and Dodson, A.T., Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, **419**, 448 (2002).
- 9) Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P.A., Robert, M. and Riediker, S., Acrylamide from Maillard reaction products, *Nature*, **419**, 449 (2002).
- 10) IARC, *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, **60**, 389 (1994).
- 11) Ihaka, R. and Gentleman, R., R: A language for data analysis and graphics, *J. Comput. Graph. Stat.*, **5**, 299-314 (1996).
- 12) Fairbrain, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., The comet assay: a comprehensive review, *Mutation Res.*, **339**, 37-59 (1995).