

In vitro および in vivo における 6 価クロムによる DNA 損傷の検出  
- Comet assay とアルカリ溶出法、カリウム-SDS 沈殿法の比較 -

上野 俊治 (北里大学獣医公衆衛生学教室)

6 価クロムは IARC により Overall rating level 1 (Carcinogenic to human) に分類されている化合物であり、培養細胞や実験動物などを用いた実験から、DNA に Single strand breaks(SSB)、DNA protein crosslinks(PCL)などを引き起こすことが証明されている。6 価クロムの DNA 損傷機序は、その代謝過程で発生する hydroxyl radical と密接に関連しているとされるが、in vivo の実験系での証明はほとんどない。そこで我々は、in vivo の実験系における 6 価クロム代謝と DNA 損傷の関係を研究するための基礎データを得ることを目的として、in vitro および in vivo の実験系で 6 価クロムに誘起された DNA 損傷を、アルカリ溶出法、カリウム-SDS 沈殿法(K-SDS assay)およびアルカリ単細胞電気泳動法(Comet assay)によって検出し、その成績を比較した。

【材料および方法】 In vitro の実験系として初代培養ラット肝細胞を用いた。定法で分離培養した細胞に最終濃度  $5 \mu\text{M}$  となるよう重クロム酸カリウムを添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、1 時間培養して各実験に供した。また、in vivo の実験系には  $20\text{mg Cr/kg}$  の重クロム酸カリウムを腹腔内投与して 15 分後のマウス肝臓を用いた。肝臓は採材後ホモジナイズし、アルカリ溶出法には定法に従い核画分を調整して、また K-SDS assay および Comet assay では 1 回遠心分離後再懸濁した試料を供した。アルカリ溶出法は、Kohn らの原法を若干改良して用いた。即ち、孔径  $5 \mu\text{m}$  の SM フィルター上に試料をのせ、Proteinase K を含まない Lysis buffer(pH10)あるいは含んだ同 buffer を添加して 45 分間室温で反応後、 $20\text{mM}$  EDTA 溶液 (pH10) で洗浄した。次いで、Alkaline elution buffer(pH12.2)を加えて  $0.4\text{ml/min}$  の流速で溶出させた。

K-SDS assay は、Costa らの方法で行った。試料  $100 \mu\text{l}$  に 2% SDS 含有 Tris-HCl buffer(pH7.5)を加えて  $65^\circ\text{C}$ 、10 分間反応後、 $200\text{mM}$  KCl 含有同 buffer を添加して混和して 5 分間氷冷下で冷却した。遠心分離して得られた沈殿を  $100\text{mM}$  KCl 含有同 buffer に再懸濁して  $65^\circ\text{C}$ 、10 分間反応後 5 分間冷却して遠心分離した。この操作を 2 回繰り返して沈殿を得た。別に、Blank および Standard 用として BSA 溶液  $100 \mu\text{l}$  を数本分注し、同様に操作した。得られた沈殿を  $100\text{mM}$  KCl,  $10\text{mM}$  EDTA 含有同 buffer に懸濁し、Standard 用には既知濃度の DNA を添加した。試料溶液に proteinase K を添加して  $50^\circ\text{C}$ 、3 時間反応後、BSA を添加、冷却して SDS を沈殿させ、遠心分離によって得られた上澄中の DNA 濃度を求め、総 DNA 量に対するタンパク質結合 DNA 量の比率を求めた。Comet assay は佐々木らの方法で行った。全面フロストスライドガラス上に 1% Agarose GP-42(nacalai)の薄層を作成し、試料懸濁液を等量の 1% Agarose-LGT(低融点アガーコース、nacalai)と混和して第 2 層とした後、1% Agarose GP-42 で第 2 層を覆った。作成したゲルを細胞溶解液に 1 時間以上浸漬し、氷冷アルカリ変性液で 10 分間 unwind 後、電気泳動 ( $1\text{V/cm}$ , 15 分)した。臭化エチジウムでゲルを染色して蛍光顕微鏡で核の像を観察し、核の長径から短径を減じた値を migration として DNA 損傷程度を表した。

【結果および考察】 アルカリ溶出法を培養細胞および肝臓試料に適用した場合を比較した。培養細胞では対照でほとんど DNA が溶出されず、6 価クロム処理群では Proteinase K 非処理では DNA 溶出促進は認められなかったが、Proteinase K 処理試料で有意な DNA 溶出促進が観察された。肝臓を用いた場合は、6 価クロム未処理群でもかなりの量の DNA が溶出してしまい、6 価クロム処理試料との有意差を検出するのは困難であった。K-SDS assay では、培養細胞を用いると対照では総 DNA 量の  $0.97 \pm 0.09\%$  程度がタンパク質と結合した形で検出され、6 価クロム処理細胞では同 DNA 量が  $1.66 \pm 0.26\%$  と有意に増加した。これに対して、肝臓試料の対照では総 DNA 量の  $8.27 \pm 4.58\%$  程度がタンパク質と結合した形で検出され、6 価クロム処理細胞では  $12.50 \pm 2.63\%$  と有意な増加は観察できなかった。

Comet assay では、培養細胞を用いると対照の Migration は  $0.478 \pm 0.089 \mu\text{m}$  で Comet 像を示す細胞も  $4.5 \pm 1.6\%$  と少なかったが、6 価クロム処理細胞では Migration が  $18.670 \pm 5.139 \mu\text{m}$ 、Comet 像を示す細胞も  $27.9 \pm 6.2\%$  と有意に増加した。肝臓試料でも、対照では Migration  $1.337 \pm 0.894 \mu\text{m}$ 、Comet 像が観察された核は  $6.2 \pm 3.2\%$  程度であったのに対して、6 価クロム投与群では Migration で  $7.36 \pm 4.29 \mu\text{m}$ 、Comet 像が観察された核も  $28.6 \pm 9.3\%$  と有意に増加した。以上の成績から、培養細胞において 6 価クロムが誘起する DNA 損傷は、アルカリ溶出法、K-SDS assay および Comet assay で検出できるが、生体に 6 価クロムを投与した場合の肝臓に誘起される DNA 損傷は Comet assay によって効率的に検出できると考えられる。