

Comet assay を用いた DNA 損傷の検出

——既知変異原物質を用いた試験原理の検証——

宮前陽一（藤沢薬品工業株式会社・安全性研究所）

コメットアッセイは Singh, N.P. らにより開発された個々の細胞の DNA 損傷を検出する試験である¹⁾。コメットアッセイの試験原理は、DNA が持つ三つの性質をうまく組み合わせたものである。その性質を以下に示した。

- 1) 二本鎖 DNA を強アルカリ ($\text{pH} > 12$) に暴露すると一本鎖にほどける。
- 2) DNA を強アルカリ ($\text{pH} \geq 12.6$) に暴露するとアルカリ感受性部位 (ex. アルキル化部位, 付加体形成部位) から切れる。
- 3) アガロースゲルなどに封入した DNA に電圧をかけると、荷電の違いにより分子量の小さいものほど陽極側に移動し、ほうき星 (コメット) のような像を描く。

したがって、コメットアッセイで化合物を評価する際に、これら原理どおりの反応が起きるならば、一本鎖切断、アルキル化あるいは架橋形成といった DNA 損傷の違いを反映し、次のような成績が得られるはずである。

- 1) **一本鎖切断が起きた DNA**： 強アルカリ ($12.6 > \text{pH} > 12$) 条件下で一本鎖にほどけ (DNA 開裂)、さらに一本鎖切断部位から切れて断片化が起きるため、(電気泳動により) コメット像を示す。
- 2) **アルキル化や付加体形成が起きた DNA**： 強アルカリ ($\text{pH} \geq 12.6$) 条件下で開裂し、さらにアルキル化あるいは付加体形成部位から切れて断片化が起きるため、コメット像を示す。
- 3) **架橋形成が起きた DNA**： 強アルカリ条件下でも架橋形成部位で開裂できず、低分子化が阻害されるため、コメット像を示さない。
- 4) **化合物がインターカレートした DNA**： 強アルカリ条件下で開裂するが、それ以上の低分子化は起こらないため、コメット像を示さない。
- 5) **一本鎖切断と架橋形成が起きた DNA**： 一本鎖切断が架橋形成より優位であれば、強アルカリ条件下で断片化が起き、コメット像を示す。また、その逆に架橋形成が一本鎖切断より優位であれば、コメット像を示さない。
- 6) **上述の損傷が生きた細胞の DNA で起きている場合**： DNA 修復や細胞死によりコメット像を呈する細胞は経時的に減少していく。

そこで、作用機序の明らかな既知変異原物質を用いてこれらの仮説を確認し、コメットアッセイが試験原理を反映した成績を示すことを検証した²⁾³⁾ので紹介する。

- 1) N. P. Singh, et al.: Exp. Cell Res. 175 (1988) 184-191
- 2) Y. Miyamae, et al.: Mutation Res. 393 (1997) 99-106
- 3) Y. Miyamae, et al.: Mutation Res. 393 (1997) 107-113