

P-041

Evaluation of DNA damages on cells in different parts of glandular stomach in a comet assay using rats

R. Matsuyama, S. Kitamoto, K. Ogata, K. Miyata, M. Ota, S. Uwagawa, K. Nishioka
Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co. Ltd.

AIM: To investigate which cells should be collected to detect direct mutagenic effects of chemicals in glandular stomachs, we measured DNA damages on cells from different parts of a glandular stomach in a comet assay.

METHOD: Male SD rats were treated twice orally with vehicle only, with EMS or with 2,6-DAT. The mucosal layer was divided into three zones in fundal glands and pyloric gland, respectively. 1. Surface epithelial cell zone (SEpC) 2. Proliferating cell zone in isthmus (PrCI) 3. Differentiated secretory cell zone (DSeC). Three target cells of each zone were tested in an alkaline comet assay.

RESULT: As for the sensitivity of the layers in fundal glands, the comet tail intensity of the SEpC in the vehicle control group was higher than those of PrCI and DSeC. Treatment with EMS showed a marked increase of the tail intensity in any part of mucosa. There is no difference in reactivity between cells from fundal and pyloric glands. 2,6-DAT showed no significant increase of the tail intensity in the PrCI, however, that of the SEpC was significantly increased. Cytotoxicity was not observed in 2,6-DAT treatment group by the histopathological analysis.

CONCLUSION: Our research and proposed method of cell collection will contribute to improve the sensitivity to detect the DNA damage in a stomach appropriately.

ラットを用いた *in vivo* コメット試験 -腺胃各部位の DNA 損傷性の比較

松山良子、北本幸子、緒方敬子、宮田かおり、太田美佳、宇和川賢、西岡和彦
住友化学株式会社 生物環境科学研究所

目的: *in vivo* コメット試験は DNA 傷害性を検出する新たな試験として期待されているが、妥当性が実証された試験ガイドラインはまだなく、手法も十分に最適化されていない。腺胃は化合物の直接的な作用を評価するための代表臓器であるが、腺胃における DNA 損傷性を正しく評価するにはどの部位の腺胃細胞を採取すべきか調べるため、腺胃の各部位より採取した細胞を用いてコメット試験の検討を行った。

方法: SD 系雄ラットにエチルメタンスルホン酸(EMS)あるいは 2,6-ジアミノトルエン (2,6-DAT)を経口で 2 回投与し、腺胃を摘出した。胃底腺および幽門腺から、1.被覆上皮細胞を含む部位(SEpC)、2.峽部の増殖性の未分化細胞を含む部位(PrCI)、3.分化した分泌細胞を含む部位(DSeC)を採取し、コメット試験により DNA 傷害度 (tail intensity) を測定した。

結果:胃底腺の溶媒対照群において SEpC の tail intensity は PrCI や DSeC よりも高い値を示した。胃底腺の EMS 処理群ではいずれの部位においても tail intensity の顕著な増加が認められた。胃底腺と幽門腺の PrCI の比較では EMS の反応性に差は認められなかった。2,6-DAT 処理群の PrCI では tail intensity の増加は認められなかったが、SEpC では有意な増加が認められた。病理組織学的検査では、2,6-DAT 処理群において細胞毒性の兆候は認められなかった。

結論:以上の結果に基づき、腺胃の DNA 傷害性を評価するための適切な細胞の採取部位を提案する。

P-042

High incidence of chromatid exchange and DNA damage induced in freeze-dried spermatozoa preserved under heat condition

Hirokazu Kusakabe
Dept. of Biological Sciences, Asahikawa Medical College

Mouse spermatozoa were freeze-dried and preserved for 3 to 8 days under heat condition set at the approximate maximum temperature (50°C) around the world. Alkaline comet assay revealed significant migration of damaged DNA in the spermatozoa. Neutral comet assay revealed no significant migration. These results suggest that single-strand breaks (SSBs) and/or primary DNA lesions are accumulated in the spermatozoa. Types of structural chromosome aberrations formed from the damaged DNAs were also analyzed at the first cleavage metaphase after injection of the spermatozoa into oocytes. Chromatid exchanges increased and showed more frequent type of structural chromosome aberrations than any other types. To my knowledge, main type of sperm chromosome aberrations induced by known mutagens is chromosome-type. In this study, high incidence of chromatid exchanges is regarded as a peculiar event seen in freeze-dried spermatozoa preserved under heat condition. It is still unknown how the stressful environments spoil the spermatozoa dried and vacuumed within glass ampoules. To study on the induction mechanism(s) of the SSBs and/or chromatid exchanges may contribute to improve the sperm preservation techniques without cryostorage.

高温 (50°C) で保存した凍結乾燥精子における DNA 損傷と染色分体交換の高頻度誘発

日下部博一
旭川医科大学生物科学教室

本研究では、マウスの凍結乾燥精子を世界の最高気温付近である 50°C で 3~8 日間保存し、高温保存が凍結乾燥精子の DNA に与える影響をコメットアッセイにより調べた。その結果、アルカリ法では DNA 損傷の増加が認められたが、ニュートラル法ではそれを検出できなかった。このことから、高温保存した凍結乾燥精子には DNA 損傷が増加するが、それは二本鎖切断ではなく一本鎖切断 (SSB) か、あるいはそれにつながる初期の損傷であることが示唆された。加えて、保存後の精子を未受精卵に注入し、第一卵割中期で染色体分析を行ったところ、染色分体交換 (cte) をもつ受精卵の頻度が 40% にまで増加した。これまでの報告から、哺乳類精子をいかなる変異原で処理しても、誘発される構造的染色体異常の多くは染色体型であることが知られている。従って、染色分体型の異常である cte の高頻度誘発は、高温保存した凍結乾燥精子にみられる特異な現象と思われる。真空のガラスアンプル内で保存された乾燥精子が、保存環境 (温度や光) によってどう変質するのかについてはまだよくわかっていないが、本研究でみとめられた SSB や cte の誘発機序がわかれば、精子の非凍結条件による保存法の改良につながるかもしれない。