

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「コメット法、その変異原性試験としての展望」(企画:佐々木有, 生島隆治)で発表された(座長:佐々木有, 生島隆治)。

コメット法における泳動像の分類と評価

小林 浩¹, 林 真²

¹株資生堂ライフサイエンス研究センター安全性研究所 〒223-8553 横浜市港北区新羽町1050

²国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 〒158-8501 世田谷区上用賀1丁目18番1号

Classification and evaluation of comets in single cell gel electrophoresis assay

Hiroshi Kobayashi¹ and Makoto Hayashi²

¹Safety Research Laboratories, Life Science Research Center, Shiseido Research Center
1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama 223-8553, Japan

²Division of Genetics and Mutagenesis, Biological Safety Research Center, National Institute of
Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

The comet assay detects DNA damage in individual cells. However, the methods of the comet assay are different according to the authors. We summarized the classification and evaluation methods of comets which had been reported by various authors, and compared the performance of computerized image analysis (CIA) with that of manual microscopic analysis (MMA).

We treated human lymphoblastoid cell line TK6 cells with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate. We classified the comets into 5 types according to their appearance. They were undamaged cells without tail (Type 1), cells with a tiny tail (Type 2), cells with a dim tail (Type 3), cells with a clear tail (Type 4) and only tail (Type 5). We analyzed the comets by use of a computerized image analyzer. The various CIA measurements provided the parameters of total length, tail length, percent of DNA in tail and tail moment.

Our MMA was superior to the method distinguishing comets only by the presence of a tail, and it expressed dose-response more clearly. With the CIA, the percent of DNA in tail and tail moment were more sensitive indicators than total and tail length. The comet types in our MMA agreed with the values of percent of DNA in tail and tail moment obtained from the CIA. The comets could be classified more in detail by percent of DNA in tail and tail moment, however the CIA was more time-consuming than the MMA.

It is concluded that our MMA is sufficiently useful for detecting DNA damaging effects of test chemicals in the comet assay.

(This paper, in a session chaired by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, was presented to the symposium "A view of Comet assay as a mutagenicity test system", organized by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords : comet assay, DNA damage, image analysis, manual microscopic analysis, tail moment

受付: 1999年3月18日

受理: 1999年4月20日

©日本環境変異原学会

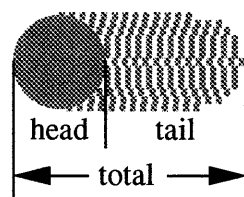


Fig. 1 A shape of comet and names of each part

Table 1 Tail frequencies per 200 cells

Morphine dose (μ M)	Damaged cells (%)
0	1.5
0.005	4.5
0.01	7.0
0.05	8.0
0.1	12.0

緒 言

現在、有核細胞の DNA 損傷を調べる方法の一つとしてコメット法が関心を集めている。コメット法は、個々の細胞レベルにおける DNA 損傷が検出できる高感度な試験法として開発され、*in vivo*, *in vitro* を問わず、いろいろな分野に応用されてきた。

この試験法には、方法にさまざまなバリエーションが報告されており、それが研究者を悩ませる一つの要因となっている。しかし、スライドの作製・染色法、電気泳動等の実験条件については、対象となる細胞や各研究室の状況がそれぞれ異なっており、自ら最適な条件をみつける必要がある。

ここでは、泳動像の分類と評価法について述べるが、どのような方法を取るべきかについては、研究者が自らの研究室の状況や実験の目的を考慮したうえで判断することであり、本報告がその選択の一助となれば幸いである。

コメットの解析法

コメット法の名称は、損傷により切断を起こした核の DNA 断片が電気泳動により陽極側に引っ張られ、その核があたかも彗星のような形態に変化することに由来する。このとき、損傷が激しい、つまり DNA 断片が小さく、多いほど彗星の尾が長くなる。通常、核の部分は **head** と呼ばれ、尾の部分は **tail** と呼ばれる (Fig. 1)。

コメット法におけるコメットの解析法として、最も簡単な方法は、コメット、つまり尾のある核の出現率を求める方法である。データ例を Table 1 (Shafer et al., 1994) に示した。この例では処理群において用量依存的にコメットの出現頻度が増加しており、このように対照の値が小さく、処理群においても出現頻度が大きくない場合、この方法は特に有効である。この方法の長所として

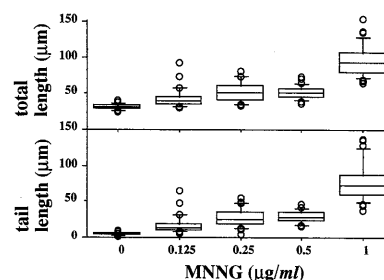


Fig. 2 The box plots of total and tail length obtained by image analysis of TK6 cells treated with MNNG

は、方法が簡単であること、観察細胞数を容易に増やせること、短所としては、各核の損傷の程度が考慮されていないことがあげられる。

次に、よく用いられている解析法として、コメットの長さの測定がある。コメットの長さは、蛍光顕微鏡下で接眼マイクロメーターを用いる方法、コメットの写真を撮影し、その写真やネガ上の像を物差しで測る方法、画像解析による測定方法などにより測定される。通常、コメット全体の長さが測定されることが多いが、画像解析による場合、核を除いた尾の部分のみの長さや、尾と全体の長さの比率なども測定することができる。ヒト B リンパ芽球細胞系の TK 6 細胞を *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, 70-25-7) で処理し、画像解析によってコメットの全長と尾の部分のみの長さを求めた時のデータ例を函ヒゲ図で Fig. 2 に示した (Kobayashi et al., 1995)。この例では用量依存的な長さの値の増加が認められたが、対照と比較した場合の変化量はあまり大きくなかった。これらの方法の長所としては、長さというコメットの特徴を表す数値が得られること、実施例が多いことがあげられ、短所としては、手作業による場合、時間や手間がかかることがあげられる。また、これらの方法を用いた場合、よく研究者が悩まされるのは「どこまでを尾と見なすか?」ということである。コメット中の DNA 断片は小さいものほど遠くまで泳動されるため、尾の先端部分に近くなるほど、その蛍光が小さく弱くなり、「どこまでを尾と見なすか?」という判別が難しくなる。画像解析を用いる場合、予め、その蛍光の強さや大きさを閾値として定めておけるため、「どこまでを尾と見なすか?」という問題について、観察・測定者の主観が入る余地をある程度除くことができるが、手作業による場合、この問題はまさに観察・測定者の主観に依存する。よってコメットの長さの測定を手作業で行う場合、予め、「どこまでを尾と見なす」という基準を明確に定めておき、その基準に基づいて測定が行われる必要がある。

最近では、技術の進歩により、蛍光顕微鏡に取り付けられる CCD カメラも以前と比較してより安価で高性能になってきており、画像解析による測定が多く行われる

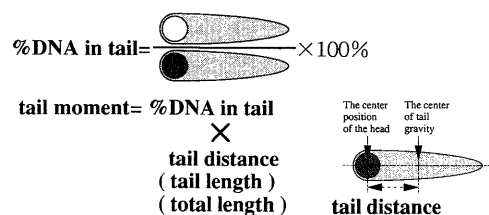


Fig. 3 The calculation methods of % DNA in tail and tail moment

ようになってきた。画像解析を用いた場合、前述の他、尾に含まれる DNA 量や tail moment と呼ばれるパラメーターも求めることができる (Fig. 3)。コメットの尾は、損傷を受けた DNA、つまり DNA の断片で形成されているので、尾に含まれる DNA 量が多いほど、損傷が大きいことになり、画像解析によって、この尾に含まれる DNA 量が求められる。通常、この値はコメットの全 DNA 量を 100 とした割合、つまり、% で表される。また、小さな DNA 断片ほど元の核から遠くへ泳動、つまり、DNA 損傷の激しいものほど尾が長くなる。tail moment は、この % の値と長さの積を求めたものである。ただし、この tail moment の求め方は、解析ソフトにより若干異なり、コメットの全長、尾の部分のみの長さ、重心間距離を用いるものなどがある。これらはいずれを用いても問題ないが、tail moment を求めるのに何を用いたかは明らかにする必要がある。データ例として、TK 6 細胞を hydrogen peroxide (H_2O_2 , 7722-84-1) で処理し、画像解析によって tail moment と尾に含まれる DNA 量を求めたものを Fig. 4 に示した (Kobayashi et al., 1995)。なお、この図の tail moment では重心間距離を用いている。われわれが tail moment の算出に重心間距離を用いるのは、画像解析による場合であっても、コメットの全長や尾の長さの測定には前述の不確定さの問題がつきまとうためである。この例では用量依存的に値が増加しているが、処理群において値のバラツキが大きく、これはコメット法の特徴である個々の細胞レベルにおける DNA 損傷の大きさの違いを反映したものと考えられた。またこれらのパラメーターでは、用量依存性や対照に対する変化量では前述の長さの値よりすぐれており、これらの方がコメットの特徴をよりよく表していた。この方法の長所としては、コメットの特徴をよく表す数値が得られること、損傷が激しい場合でも比較的良い用量相関性が得られることがあげられ、短所としては、以前より安価になったとはいえ、画像解析装置、解析ソフトが必要なことがあげられる。

これらの方法のほか、コメットをその損傷の程度により、いくつかの段階に分類して計数するという方法も取られている。Table 2 に今までに報告されたいくつかの方法を示した。通常、無損傷の核を最下位、最も損傷の激しいコメットを最上位と定め、その間をいくつかに分

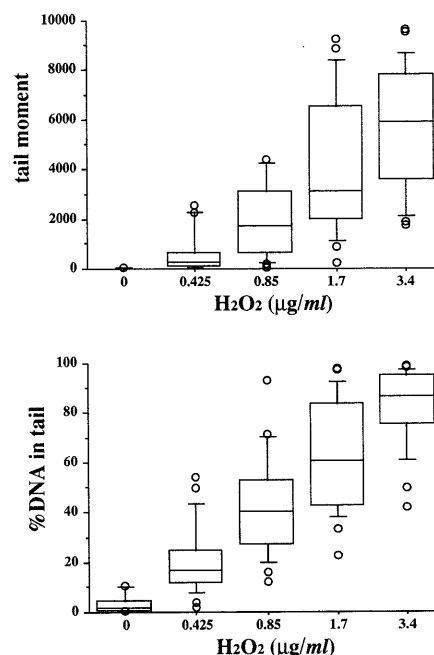


Fig. 4 The box plots of tail moment and % DNA in tail obtained by image analysis of TK6 cells treated with H_2O_2

ラ分けする方法が取られる。これらの方法は、最下位と最上位の間をクラス分けする際に着目する点に違いがあり、a の方法では尾の長さ (Pool-Zobel et al., 1994), b-c の方法では写真で形を示し (b : Gedick et al., 1992, c : Collins et al., 1995), d の方法では尾の DNA 量で分類している (Anderson et al., 1994)。また、c の論文では、画像解析を行い、尾の DNA 量との相関性を検討しており、よい相関性が認められている (Collins et al., 1995)。これらの方法の長所としては、画像解析や長さ測定によらず、比較的良い用量相関性が得られること、観察細胞数を増やせることがあげられ、短所としては、分類に多少の慣れと時間が必要なことがあげられる。

われわれは、画像解析装置がないところでも、コメット法を実施できるようにと考え、コメットをその損傷の程度により分類して計数する方法について、画像解析の結果と比較検討した。

材料と方法

マサチューセッツ工科大学の William G. Thilly 博士より分与されたヒト B リンパ芽球細胞系の TK 6 細胞を用いた。TK 6 細胞は、不活化した馬血清を 10 % 加えた RPMI-1640 培地を用い、5 % 炭酸ガス存在下、37°C で培養した。対数増殖期の細胞を 5×10^5 cells/mL になるように培地に加え、MNNG、 H_2O_2 の場合は 1 時間、methyl methanesulfonate (MMS, 66-27-3) の場合は 4 時間処理した。処理後の細胞は遠心して集め、 $1-2 \times 10^6$ cells/mL になるように培地で調整した。

Table 2 The various methods of manual microscopic analysis of comet

Method	cell number	number of categories	categories				
a	100	3	(Total Length)	intact	moderately	severely	
				<40mm	40–80mm	>80mm	
b	100	4	Stage 0	Stage 1	Stage 2	Stage 3	
			intact	slightly	moderately	severely	
c	100	5	class 0	class 1	class 2	class 3	class 4
			undamaged				maximally
d	100	5	None	Low	Medium	High	Total
		(%DNA in tail)	<5%	5–20%	20–40%	40–95%	>95%

^a: Pool-Zobel et al., 1994, ^b: Gedick et al., 1992, ^c: Collins et al., 1995, ^d: Anderson et al., 1994

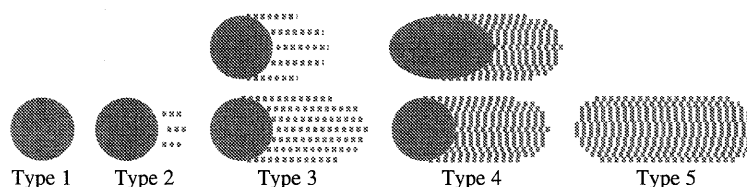


Fig. 5 The classification of comets by visual scoring method

Table 3 The frequencies of each type comet observed microscopically in TK6 cells treated with MNNG, H₂O₂ and MMS

Mutagen	Concentration	Number of cells				
	($\mu\text{g/mL}$)	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5
MNNG	0	497	3	0	0	0
	0.125	78	389	32	1	0
	0.25	0	113	374	13	0
	0.5	0	0	83	414	3
	1.0	0	0	1	379	120
H ₂ O ₂	0	407	66	25	2	0
	0.425	71	209	192	26	2
	0.85	40	155	219	78	8
	1.7	0	11	131	292	66
	3.4	0	0	6	232	262
MMS	0	92	200	201	5	2
	5	0	130	333	35	2
	10	0	2	177	318	3
	20	0	0	1	474	25

スライドの調製法は, Singh らの方法によった (Singh et al., 1988). 全面フロストのスライドガラスを用い, 等張化リン酸緩衝液 (PBS) に 0.65 % の濃度で溶かした normal melting point agarose (ニッポンジーン(株)) の溶液で第 1 層を作製し, 第 2 層として細胞懸濁液 10 μL を加えた 0.5 % low melting point agarose (ニッポンジーン(株)) の PBS 溶液を重ねし, 第 3 層として 0.5 % low meltingpoint agarose の PBS 溶液を重ねした. スライドは, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris (hydroxymethyl) amino-methane (Tris), 1 % sodium *N*-lauroyl sarcosinate, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO を含む pH 10 の細胞溶解液に, 遮光下, 4 $^{\circ}\text{C}$

で 1 時間浸けた.

細胞溶解後のスライドはサブマリン型の電気泳動槽に入れ, 0–10 $^{\circ}\text{C}$ に冷やした 300 mM NaOH, 1 mM EDTA を含む泳動液を加え, 15 分間放置後, 25 V, 300 mA で 20 分間泳動した. 泳動後のスライドは, pH 7.5 の 0.4 M Tris 緩衝液で中和後, 20 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromide で染色した.

観察は, スライドをコード化し, 処理条件がわからないようにして行った. スライド 1 枚につき 500 個の核を Fig. 5 のようにその形態に着目して分類し, 計数した. Type 1 は尾のない無損傷の核, Type 2 は小さな DNA 断片を伴う核, Type 3 は薄い尾を持つ核, Type 4 は明

Table 4 The fold increase against negative control of each parameter obtained by image analysis of TK6 cells treated with MNNG, H₂O₂ and MMS

Mutagen	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Magnifications of median against the control			
		total length	tail length	tail moment	%DNA in tail
MNNG	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.125	1.28	2.63	12.0	3.62
	0.25	1.68	4.94	65.9	9.33
	0.5	1.69	5.57	161	14.5
	1.0	3.08	14.3	712	27.2
H ₂ O ₂	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.425	2.58	10.8	209	11.2
	0.85	3.65	16.8	1493	26.9
	1.7	4.80	24.0	2717	40.7
	3.4	5.02	29.1	5191	58.1
MMS	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	5	2.20	4.42	61.2	5.61
	10	2.31	4.65	93.0	7.15
	20	2.49	6.39	186	11.0

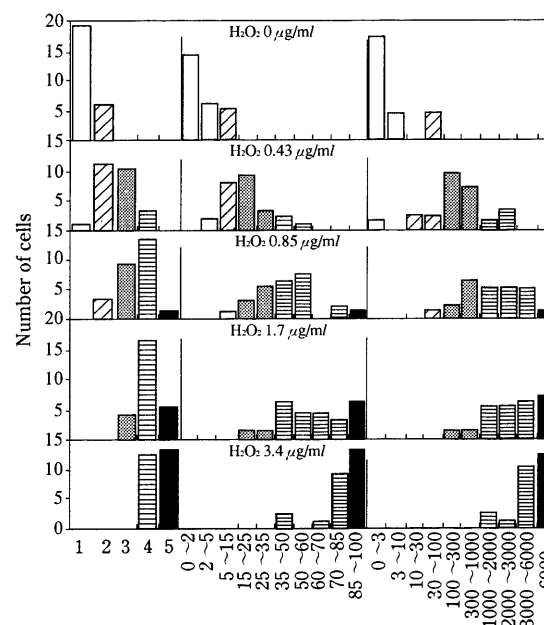
らかな濃い尾を持つ核および核の移動が認められるコメット，Type 5は無核のコメットである。

コメットの画像は，CCD カメラ (HCC-3600，フローベール社，東京) で撮影し，光磁気 (MO) ディスクレコーダー (MV-200，TEAC 社，東京) で MO ディスクに一旦保存した後，画像解析システム (New Vision System，ケイオー電子工業社，大阪，PC-9801 RA，NEC 社，東京) で解析し，コメットの全長 (total length)，尾の部分のみの長さ (tail length)，尾に含まれる DNA の割合 (%) (% DNA in tail)，tail moment を求めた。なお，この tail moment は，核と尾の重心間距離と % DNA in tail の積である。

結果および考察

Table 3 に，TK 6 細胞を MNNG，H₂O₂，MMS で処理後，各用量につき 500 個の核を観察して各 Type に分類して計数した結果を示した。試験した 3 種の変異原すべてで用量依存的により損傷の激しいコメットの出現数が増加していた。仮に，ここで最初に紹介した核を尾の有無のみで分類し，コメットの出現頻度のみを求める方法，つまり，Type 2 から 5 をすべて同一のものと見なす方法を取ったとすると，MNNG 0.25–1.0，H₂O₂ 1.7–3.4，MMS 5–20 $\mu\text{g/mL}$ はすべて 100 % となり，この方法では，この用量間の用量依存性を示すことはできない。また，実際には Table 3 に示したような損傷の程度の違いがあるにもかかわらず，その違いを表すこともできない。よって，これらの点において，コメットをその損傷の程度により分類して計数する方法は，コメットの出現頻度のみを求める方法よりもすぐれた方法であると考えられた。

Table 4 に，Table 3 の各用量から無作為に選んだ 25 個について，画像解析により total length，tail length，



Type % DNA in tail tail moment

Fig. 6 The correlation between visual score and the parameters obtained by image analysis for TK6 cells treated with H₂O₂
□ : Type 1, ▨ : Type 2, ▩ : Type 3, ▨ : Type 4, ■ : Type 5

tail moment，% DNA in tail を求め，その平均値が対照と比較して何倍に増加したかを示した。各変異原において，4 つのパラメーターのうち tail moment の用量依存的な変化が最も大きく，ついで % DNA in tail，tail length，total length の順であった。特に，total length や tail length などの 1 次元的なパラメーターでは，MMS において用量依存性が悪かったが，tail moment や % DNA in tail などの 2 次元的なパラメーターでは，MMS においても用量依存的な増加が認められており，

画像解析においてはこれらのパラメーターがコメットの損傷の程度を表すのに有用であると考えられた。

Fig. 6 に、Table 2 の H_2O_2 の画像解析結果のうち % DNA in tail, tail moment と、画像解析を行ったコメットを Type 分けした結果をヒストグラムで示した。我々が行ったコメットの分類法は画像解析結果の % DNA in tail, tail moment とよく一致した。ただし、我々の分類法ではコメットを 5 種類に分類するが、画像解析を行った場合、どちらのパラメーターを用いてもコメットは 10 段階に分類できた。% DNA in tail を用いた場合、Type 1 : 2 段階、Type 2 : 1 段階、Type 3 : 2 段階、Type 4 : 4 段階、Type 5 : 1 段階に分類でき、tail moment を用いた場合、Type 1 : 2 段階、Type 2 : 2 段階、Type 3 : 2 段階、Type 4 : 3 段階、Type 5 : 1 段階に分類できた。よって、画像解析は、特に損傷の激しい Type 4 のコメットの解析に有用であると考えられた。

結 語

コメット法の報文や発表の数の増加には目を見張るものがあり、また、その可能性に対する期待も大きく、コメット法について一度検討してみたいと考えている研究者は多い。しかし、さまざまな理由、特に方法の多様さから、実際にはどのようにしたらいいのかわかりにくく、手を出しそびれていた人も多いのではなからうか。

ここでは、その中から特にコメットの解析法を取り上げた。我々の方法は、画像解析の装置やソフトも必要としない¹⁾、画像解析結果と相関性を持つ²⁾、単にコメットの出現率を求める方法よりもすぐれている³⁾、画像解析装置やソフトを持たない研究者がコメット法を検討する際に行う解析法として適している⁴⁾、といえる。

われわれの方法では 500 個の核を分類して計数したが、このコメットを分類して計数するという方法の場合、観察核数は 100 個でも充分という考えもあり、試験の目的により、あるいは、観察しなければならないスライド数が多い等の場合には、この程度までであれば、観察核数を減らすことも可能である。500 個を分類して計数するのに要する時間は約 15 分間であるので、100 個であれば約 3 分間で計数できる。

また、この方法を取った場合の統計解析法については、

Type 1=1, Type 2=2, ……Type 5=5 のようなスコアを与えて、各スライドごとに DNA 損傷の程度を数値化してから行う方法が取られる。しかし、もし画像解析を行える環境であるならば、一度観察結果と画像解析結果の対応を検討し、例えば、% DNA in tail で、Type 1=平均 2.5 %, Type 2=平均 10 %, ……Type 5=平均 90 % のような関係をそのままスコアにあてはめる方法も考えられる。

画像解析には、細かい分類ができる等のメリットもあるが、細かい解析値の必要のない、被験物質の DNA 損傷性の有無を検討するような目的の試験の場合には、我々の提案した方法のメリットは大きいといえる。

参考文献

- Anderson, D., T.-W. Yu, B.J. Phillips and P. Schmezer (1994) The effect of various antioxidant and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay, *Mutat. Res.*, 307, 261-271.
- Collins, A.R., Ma Ai-guo and S.J. Duthie (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells, *Mutat. Res.*, 336, 69-77.
- Gedick, C.M., S.W.B. Ewen and A.R. Collins (1992) Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 313-320.
- Kobayashi, H., C. Sugiyama, Y. Morikawa, M. Hayashi and T. Sofuni (1995) A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay, *MMS Commun.*, 3, 103-115.
- Pool-Zobel, B.L., N. Lotzmann N., M. Knoll, F. Kuchenmeister, R. Lambertz, U. Leucht, H.G. Schroder and P. Schmezer (1994) Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal-mucosa cells isolated from biopsy samples, *Env. Mol. Mutagen.*, 24, 23-45.
- Shafer, D.A., Y. Xie and A. Falek (1994) Detection of opiate-enhanced increases in DNA damage, HPRT mutants, and the mutation frequency in human HUT-78 cells, *Env. Mol. Mutagen.*, 23, 37-44.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice and E.L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.