

食品由来抗酸化物質の安全性・有効性評価に関する研究（その5）：

コメットアッセイの検討

Evaluation of the safety and effectiveness of food origin antioxidants (5th report) : Comet assay analysis of DNA damage in whole blood

池田紗南*, 今井莉奈*, 村田英里紗*, 森菜々花*, 伊藤貴美子**

Sana IKEDA, Rina IMAI, Erisa MURATA, Nanaka MORI, Kimiko ITO

はじめに

現在、酸化ストレスはがん、虚血性心疾患、糖尿病、アルツハイマー病、パーキンソン病、白内障等の眼疾患、および老化現象などに広く関わっていると考えられている。一方、多くの人を対象にして行われた疫学研究から、野菜や果物の多い食事を摂る人では心血管系疾患やがん、白内障などに罹るリスクが低下することが示されている。野菜や果物には微量成分として、ビタミン、カロテノイド、ポリフェノールなどの、生体内酸化ストレスを弱める可能性のある抗酸化物質が豊富に含まれることから、これらの抗酸化物質に病気の予防効果が期待され、抗酸化物質を多量に含むサプリメントや食品が数多く商品化されている。しかしながら、高用量の抗酸化サプリメントの健康効果については、これまでに科学的根拠に基づいて証明されているものはほとんどない。また、一般に食品成分は安全性が高いとみられているが、喫煙者を対象とした大規模介入研究では、食品由来の抗酸化物質β-カロテンの多量摂取により肺がん罹患率が上昇したとの報告がある^{1), 2)}。また、高用量のビタミンEの摂取が前立腺がん³⁾や脳卒中^{1), 4)}のリスクを高める可能性を示唆する報告もある。生体は、酸化ストレスを制御するため、さまざまな内因性、外因性の抗酸化システムを構築している。したがって、特定の抗酸化物質の多量摂取については、このバランスを崩し生体に悪影響を及ぼす可能性もあり、生体内の功罪を慎重に検討する必要がある。

我々は、種々の食品由来抗酸化物質の健康影響について遺伝子損傷性を指標として評価を行っている。

これまでにDNA塩基の一つであるデオキシングアノシンの8位が酸化された8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG)の尿中排泄量をバイオマーカーとして、数種のサプリメント(還元型CoQ10⁵⁾、ビタミンC⁶⁾など)について健康影響を解析した。8-OHdGはDNAの酸化損傷を示す感度良い指標の一つであり、尿サンプルは入手が容易であることから、尿中8-OHdG量は食品由来抗酸化物質のヒトでの健康影響を調べる場合に有力な評価法の一つとなる。しかし、染色体DNAに形成された8-OHdGは修復酵素により切り出されて尿中に排出されることから、尿中8-OHdG量は修復酵素の活性に影響を受ける可能性がある。また、尿中8-OHdGが染色体DNAに由来するものか、細胞内ヌクレオチドプールに由来するものかも特定できない。したがって、食品由来抗酸化物質の健康影響評価には、尿中8-OHdG以外の試験法も確立して、複数の試験を組み合わせるにより、信頼性の高い有益な情報を得ることが望ましい。

コメットアッセイ(単細胞ゲル電気泳動法)は、様々な要因によって誘発されるDNAの損傷を検出する試験の一つであり、他の検出法と比べて、DNA損傷を単一細胞レベルで検出できる、検出感度が良い、比較的操作が簡便で安価におこなえる、などの利点を有する。そこで、今回、食品由来抗酸化物質の健康影響評価法の一つとして、コメットアッセイの実験プロトコルの検討を行ったので、その概要を報告する。

*津市立三重短期大学 生活科学科 食物栄養学専攻

Life and Environmental Science at Tsu City College

**津市立三重短期大学 生活科学科 食物栄養学専攻

Life and Environmental Science at Tsu City College

コメットアッセイのプロトコール

コメットアッセイには最初に報告された中性コメットアッセイ⁷⁾と、その後 Singh らが開発したアルカリコメットアッセイ⁸⁾があるが、現在はアルカリコメットアッセイが広く用いられている。アルカリコメットアッセイ (以下、コメットアッセイと略) では、図 1 に示したように、アガロースゲルに包埋した細胞を界面活性剤と高濃度の塩で溶解したあと、得られたスーパーコイル状の DNA をアルカリ溶液 (pH >13) に浸して一本鎖化し、アルカリ性条件 (pH >13) で電気泳動する。DNA を pH 12 以上の強アルカリに暴露すると、二重鎖間の水素結合が壊れて開裂するため、一本鎖切断を持つ DNA が断片化する。さらに pH 12.6 以上にすると、アルカリ感受性部位 (アルキル化部位、付加体形成部位など) からの切断が起こり、DNA の断片化が促進される⁹⁾。アルカリ処理後に電気泳動すると、負に荷電している DNA は陽極に移動しようとするが、このとき分子量の小さい DNA (断片化した DNA) ほど陽極側に移動しやすく、分子量の大きい DNA は移動しにくい。そのため、電気泳動後に DNA を染色して個々の細胞を顕微鏡で観察すると、DNA 損傷がない細胞の場合、核そのままの丸い形を呈するが、DNA 損傷がある場合は、損傷により生じた DNA 断片が核から遊離し、大きさに応じて移動するため、コメット (彗星) に似た長く尾を引いた像が得られる。コメット像を頭 (Head) と尾 (Tail) に分け定量することにより、DNA 損傷の程度を評価するこ

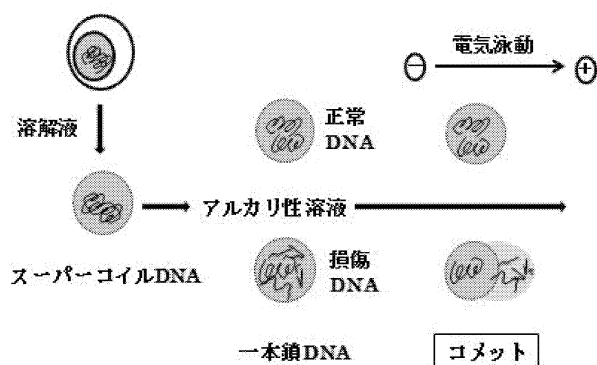


図 1. コメットアッセイの原理

とができる。また、電気泳動を行う前に細胞を修復酵素 (例えば formamidopyrimidine glycosylase, 8-oxoguanine DNA glycosylase など) で処理することにより、酸化損傷を特異的に検出することも可能である。

1. 血液細胞の準備

本研究は、三重短期大学倫理委員会の承認を得て実施した。血液の採取は、穿刺器具 (21 ゲージ針、BD セーフティランセット) を用いて、指先から自己採血により行った。また、キャピラリー (EDTA 含、Greiner Bio-One) を用いて約 80 μ L をマイクロチューブ内へ移した。

コメットアッセイに血液試料を用いる場合、採取した血液から単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMCs) を分離して使用方法と全血液をそのまま使用方法がある¹⁰⁾。本研究では、まず PBMCs の単離を Histopaque1077 (Sigma-Aldrich) を用いて検討したが、採血量が微量であるため操作に習熟を要すること、および単離操作に時間がかかるなどの問題点が判明した。一方、全血液を使用する方法では、ヘモグロビンが DNA 損傷を誘発する恐れがあるが、血液必要量が 5 μ L という極めて微量であること、また操作を簡便かつ迅速に行えることから、ヒトを対象にしたバイオモニタリングでは大きなメリットになることを考慮し、全血液を使用する方法で検討を進めた。

2. 細胞溶解および電気泳動

コメットアッセイの電気泳動による DNA 移動パターンは様々な要因により変化する。本研究では、これまでにゲルのアガロース濃度、電気泳動時のアルカリ性溶液の組成、温度、電流量について検討し、以下の手順で良好な結果が得られることを確認した。①血液 5 μ L を予め溶解しておいた 0.6% 低融点アガロース (37 $^{\circ}$ C) 200 μ L に加えてよく混ぜ、その 50 μ L をスライドガラス (Trevigen, Inc.) 上に均一に広げ、冷蔵庫内で固めた。②スライドを予冷した細胞溶解液 (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO) に浸し、4 $^{\circ}$ C で 40 分間処理した。③スライドを取り出し、過剰な溶解液を除いたあと、アルカリ性溶液 (200mM NaOH and 1mM EDTA, pH >13) に浸し、室温暗所で 20 分間放置した。④電気泳動槽 (ATTO AE6111) にスライドを静置し、ア

ルカリ電気泳動バッファー（200mM NaOH and 1mM EDTA, pH >13）を加え、1volt/cm で電流量が 300mA になるようにバッファー量を調整し、4℃で 20 分間電気泳動を行った。⑤電気泳動後、スライドを純水に 10 分間、2 回浸漬してアルカリバッファーを洗い流した後、80%冷エタノールで約 5 分間処理して脱水した。

3. 染色及び判定

コメットアッセイでは、DNA 損傷を定量的に評価するため、一般的には電気泳動後にエチジウムブロマイドなどの蛍光色素で DNA 染色を行い、蛍光顕微鏡および画像解析装置を用いてコメット像の蛍光強度を測定する。定量的評価は、コメット像を Head と Tail に分けてそれぞれの蛍光強度を測定し、%Tail DNA（Tail intensity : [Tail の染色強度 / コメットの全染色強度] x 100）を算出する。しかしこの方法は、蛍光顕微鏡などの高価な実験装置を必要とし経済的な制約があるため、今回は銀染色法（銀染色キット、Trevigen, Inc.）を用いて DNA を染色し、コメット像を光学顕微鏡下で観察した。DNA の損傷程度の判定は、Tail の状態を長さ、面積、濃さによりタイプ別に分類して評価する方法で行った。

ビタミン C 摂取による短期介入予備試験

ビタミン C は抗壞血病因子として発見された水溶性ビタミンで、コラーゲンやカタコールアミン、L-カルニチンの生合成などに関与するほか、水溶性の抗酸化物質として生体内の活性酸素の消去にも重要な役割を果たしている。また、ビタミン E などの他の抗酸化物質と相互に補完し合って他の抗酸化物質を再生することもよく知られている。そのため、ビタミン C はさまざまな疾患の予防や治療に対する効果が期待され、ビタミン C を含有するサプリメントは広く一般に摂取されている。しかし、現在までに行われた多くの臨床介入研究においては、疾病予防に有効性があるとする結果とないとする結果の両方が存在する^{11), 12)}。また、ビタミン C が体内で酸化促進作用を示す可能性も示唆されている^{13), 14)}。

そこで、今回、ビタミン C の遺伝子損傷性を指標

とした健康影響評価の予備試験として、若年健常女性 4 名を被験者として、以下の介入試験を実施した。

試験スケジュールは、摂取前期間（2 週間）と摂取期間（4 週間）に分け、試験食として日本薬局方アスコルビン酸末（>99%，岩城製薬）を朝食後と夕食後に 500mg ずつ、すなわち 1 日当たり 1g を 4 週間摂取した。採血は、摂取前期間の第 1 週、第 2 週に各 1 回、摂取期間の第 3 週、第 4 週に各 1 回実施した。なお、被験者はヘルシンキ宣言に則りあらかじめ研究の目的、内容、試験方法などについて詳細な説明を受け、同意文書を提出した。

コメットアッセイは上述したプロトコールに沿って行ったが、今回の予備実験では、採取した血液細胞に DNA の酸化損傷を引き起こす過酸化水素を負荷し、ビタミン C の摂取前期間と摂取期間において影響が見られるかについても検討した。その方法は、血液細胞をアガロースゲルに包埋する段階で各検体について 2 サンプル作成し、一方は 0.5mM 過酸化水素（過酸化水素処理群）で、もう一方は PBS（過酸化水素無処理群）で 5 分間室温処理した。その後、過酸化水素を除き、洗浄後、細胞溶解液で処理した。結果の判定は、本予備試験ではコメット像を図 2 に示すように、Class 0（尾がないもの）、Class 1（僅かに尾があるもの）、Class 2（明らかな尾が観察されるもの）の 3 つに分類した。1 サンプル当たり約 150 個のコメットを観察し、各タイプのコメットの出現割合を求めた。

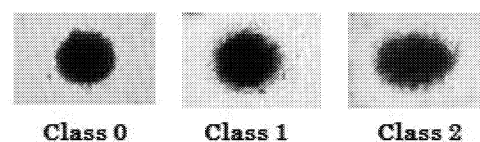


図 2. 銀染色によるコメット像のタイプ別分類

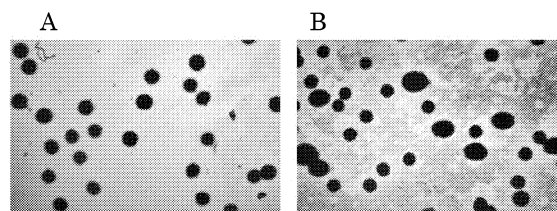


図 3. ヒト白血球の銀染色によるコメット像
A 無処理、B 過酸化水素 0.5mM

おわりに

今回、我々は、食品由来抗酸化物質の健康影響評価法の一つとして、遺伝子損傷性を個々の細胞で比較的簡便かつ高感度に検出できるコメットアッセイについて実験プロトコルの検討を行った。その結果、実験操作について若干の見直しが必要であるが、有用な解析法となる可能性が示唆された。今後、尿中 8-OHdG 測定にコメットアッセイを追加することで、より信頼性の高い解析が可能になると考える。

参考文献

- 1) N Engl J Med. 1994 330:1029-1035.
- 2) Omenn GS et al. N Engl J Med. 1996 334: 1150-1155.
- 3) Klein EA et al. JAMA. 2011 306:1549-1556.
- 4) Sesso HD et al. JAMA. 2008 300: 2123-2133.
- 5) Ito K et al. J Med Food. 2015 18:835-840.
- 6) Ikemiya H et al. 三重短期大学生生活科学研究会紀要. 2009 57: 7-9.
- 7) Ostling O, Johanson KJ. Biochem Biophys Res Commun. 1984 123:291-298.
- 8) Singh NP et al. Exp Cell Res. 1988 175: 184-191.
- 9) Miyamae Y. Environ Mutagen Res. 1999 21:225-230.
- 10) Al-Salmani K et al. Free Radic Biol Med. 2011 51:719-725.
- 11) Bjelakovic G et al. Cochrane Database Syst Rev. 2008 (3):CD004183.
- 12) Willcox BJ et al. Am J Cardiol. 2008 101: 75D-86D
- 13) Podmore ID et al. Nature. 1998 392 (6676): 559.
- 14) Chen Q et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2008 105(32):11105-11109.

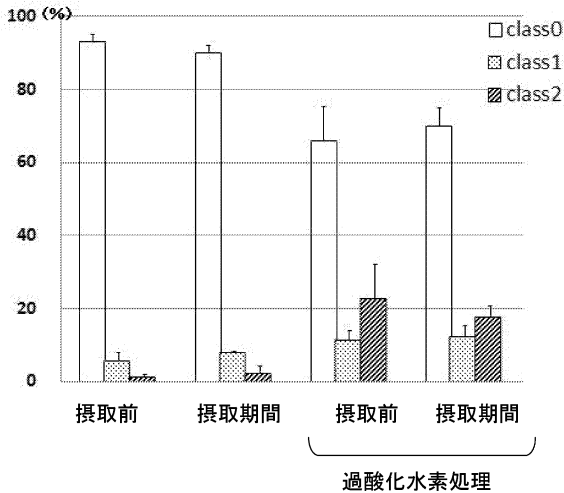


図 4. ビタミン C 短期介入予備試験におけるコメットのタイプ別割合

図 3 に今回の予備試験で得られたコメット像を示す。過酸化水素で処理すると、全ての検体で Class 0 の割合の低下と Class 1 および Class 2 の割合の増加が認められた。

次に、被験者 4 名のビタミン C 摂取前期間と摂取期間におけるコメット像の各タイプ別出現割合（平均値±標準偏差）を過酸化水素無処理群と処理群に分けて図 4 に示す。今回の試験は被験者数が少なく、また電気泳動後に得られたコメット像は尾の部分が短く、更に銀染色では染色ムラが生じ染色性が一様でなかったことなどから、統計処理は行っていない。しかし、各被験者のビタミン C 摂取前期間と摂取期間のそれぞれ 2 回の検体で、コメットのタイプ別出現割合はほぼ同様の結果を示したこと（data not shown）、また過酸化水素無処理群では全検体でコメットの大半が Class 0 に分類され、過酸化水素処理群では同様に全検体で Class 0 の割合の低下と Class 1 および Class 2 の割合の増加が認められた（図 3）ことから、今回検討したプロトコルを用いて信頼性のある結果が得られることが示唆された。今後、実験方法について、特に電気泳動時間や銀染色方法などを再検討した後、再度被験者数を増やして短期介入試験を実施する予定である。