

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2009.03) 9巻1号:77~78.

平成19年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題
マウス精子を用いる単一細胞ゲル電気泳動法(コメットアッセイ)および染色
体分析法による遺伝的傷害の検出感度比較

日下部博一

20) マウス精子を用いる単一細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ) および染色体分析法による遺伝的傷害の検出感度比較

研究代表者 日下部博一

[研究の背景および目的]

コメットアッセイ (comet assay) は、スライドグラス上で細胞をアガロースゲルに包埋し、電気泳動法によって細胞の DNA 損傷のレベルを解析する方法である。近年、哺乳類精子を用いるコメットアッセイが、環境変異原研究や生殖生物学の分野で普及しつつある。

一方、精子の DNA 損傷を検出するための、最も直接的で確実な方法は、受精卵の第一卵割中期で染色体分析を行うことである。ただしこの方法は、多くの未受精卵とその供給原である雌動物個体を多数必要とし、一度の実験で同時に複数の検体を取り扱うことが難しいという側面もある。

コメットアッセイには、細胞 DNA の二本鎖切断のみを検出するニュートラル法¹⁾と、細胞 DNA の一本鎖切断、二本鎖切断および alkali-labile site を検出できるアルカリ法^{1), 2)}がある。本研究の最終的な目的は、コメットアッセイと染色体分析法における精子 DNA 損傷の検出感度の比較であったが、今回はその初段階としてこれら二種類のコメットアッセイの変法を考案した。

[材料と方法]

1. 精子

7 週齢以上の週齢をもつ雄マウス (B6D2F₁) の精巢上体尾部を切除し、1.4 ml の PBS に加えて終え 10

分間 37℃ でインキュベーションした。精子懸濁液を、過酸化水素 (ナカライ) で 1 時間から 2 時間処理 (37℃) した。

2. コメットアッセイ

(1) 包埋

70℃ のホットプレート上で加温したスライドグラス (マツナミ) 上に、PBS で 1% の濃度に調製したアガロース (融点: 35~37℃、LO3 「TAKARA」、タカラバイオ) 溶液を 30 μl 滴下し、スミアした。1% アガロース溶液 (70 μl) に精子懸濁液 (30 μl) を加えてよく混和し、これをスミア済みのスライド (40℃ から 50℃) 上に滴下した後、すぐにカバーグラスをかけ、ゲルを固化させた。

(2) 細胞溶解

カバーグラスを除去したスライド標本を、氷冷した細胞溶解液 [1% Triton X-100 (Sigma)、2.5 M NaCl、10 mM Tris-HCL (pH 10)、100 mM EDTA-Na (pH 8.0)、10 mM Dithiothreitol (DTT, Fluka)、0.1 mg/ml Proteinase K (Sigma)] に加え、2 時間 (4℃) および 1 時間 (37℃) 処理した。

アルカリ法によるコメットアッセイの場合、細胞溶解液には Proteinase K を加えなかった。

(3) 電気泳動

アルカリ法においては、電気泳動前にスライド標本を 300 mM NaOH (1 mM EDTA-Na 入り、pH 12~13) で 1 分間処理し、TAE (Tris-acetate EDTA buffer, Sigma) に加えて中和した。

ニュートラル法およびアルカリ法ともに、電気泳動用緩衝液には TAE を用いた。サブマリンタイプの電気泳動槽 (Model BE-520, BIO CRAFT) に TAE を加え、電圧および電流の強さをそれぞれ 25V、10 mA に設定した。スライド標本を加え、室温下で 2 分~5 分間電気泳動を行なった。

(4) 固定と染色

スライド標本を 100% エタノールに加え、10 分以上固定した後、自然乾燥させた。YOYO-1 iodite (インビトロジェン) で染色した。

3. 第一卵割中期における染色体分析

過酸化水素で処理した精子をマウス未受精卵に ICSI 法³⁾により注入し、第一卵割中期の受精卵の染色体標本を作製⁴⁾した。標本をギムザ染色し、通常の染

色体分析を行った。

[結果および考察]

ニュートラル法の場合、過酸化水素処理の有無や泳動時間の長さに関係なく、他の精子集団とは明らかに異なる「漏斗型」のDNA移動を持つ精子が、低頻度に出現した(図1 a、b)。なお、同一個体からの精子で、電気泳動時間を2分と5分に設定したスライド標本をそれぞれ2枚(計4枚)観察したところ、精子4000個中31精子(0.8%)が「漏斗型」を示した。この「漏斗型」の出現頻度は、精子DNA損傷の自然誘発を部分的に反映していると思われる。

ニュートラル法では、過酸化水素で処理(1 mM)した精子のDNA損傷を検出できなかったのに対し、アルカリ法を用いた場合は、2分間という短い泳動時間であるにもかかわらず、コメットの尾の長さの違いをはっきりと区別できた(図2 a、b)。なお、同濃度で処理した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、受精卵の9割(56個中50個)に構造的染色体異常が認められた(図2 c)。このことから、精子には多くのDNA損傷が生じているにもかかわらず、ニュートラル法ではそれを検出できず、電気泳動前の1分間だけアルカリ処理を行うだ

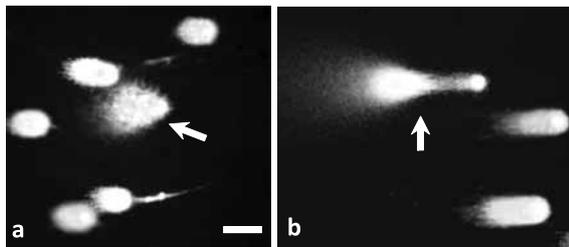


図1 ニュートラル法で観察された「漏斗型」のコメット(矢印)
a : 2分間の泳動 ; b : 5分間の泳動
Bar : 50 μm

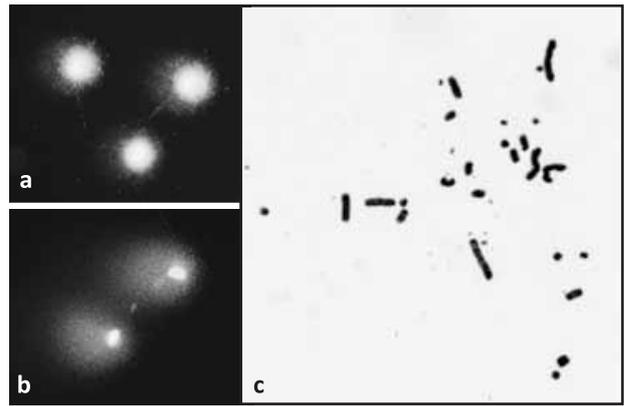


図2 過酸化水素処理(1 mM)した精子の傷害
a : 溶媒対照(アルカリ法、泳動時間: 2分)
b : H₂O₂ 処理(アルカリ法、泳動時間: 2分)
c : H₂O₂ 処理(第一卵割中期染色体の断片化)

けでDNA損傷の検出感度が飛躍的に高まることが確認できた。

[参考文献]

- 1) Baumgartner A, Cemeli E and Anderson D: The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol* 25:81-98, 2009.
- 2) Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF: Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221, 2000.
- 3) Kimura Y and Yanagimachi R: Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 52:709-720, 1995.
- 4) Kamiguchi Y and Mikamo K: An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am J Hum Genet* 38:724-740, 1986.