

(2) FADU法による環境微量汚染物質のDNA損傷性の評価

FADU ASSAY FOR EVALUATION OF DNA DAMAGE CAUSED BY ENVIRONMENTAL MICROPOLLUTANTS

松田知成^{*} , 八木孝司^{**} , 武部 啓^{**} , 松井三郎^{*}
TOMONARI MATSUDA, TAKASHI YAGI, HIRAKU TAKEBE, SABURO MATSUI

ABSTRACT; FADU (Fluorometric Analysis of DNA Unwinding) is one of the most simple and sensitive methods to detect DNA strand breaks. We tried to apply this method as a short-term test which detects DNA-damaging environmental agents. An SV40-transformed human fibroblast cell line WI38-VA13 was used, and the original FADU protocol was modified in this study. DNA strand breaks induced by physical and chemical carcinogens such as γ -rays, ultraviolet light, MNNG, 4NQO were detected efficiently by using the modified protocol. We also tried to detect DNA strand breaks caused by the effluent of a waste water treatment plant. About 5.6 strand breaks per 10^8 base pairs were induced when cells were exposed for 1 hr to water sample which was concentrated 200 fold. This represents DNA damages equivalent to approximately 11.2 strand breaks per average human chromosome. We conclude that the FADU assay using VA13 human fibroblast cells is useful for detecting DNA damaging substances in the environmental water.

KEYWORD; FADU, human fibroblast cells, γ -rays, UV light, MNNG, 4NQO, effluent of a waste water treatment plant

1. はじめに

環境中の微量汚染物質の遺伝毒性を検出、評価するために、様々なバイオアッセイが用いられている。人間の健康に対する影響を評価するためにヒトの細胞を使った系が求められているが、突然変異や染色体異常を指標とする系は、非常に重要な情報を与えてくれるものの、技術的な困難が多く、短期のスクリーニングには向かないとされている。一方DNA鎖切断は測定が容易でしかも生物学的な障害の要因となるDNA損傷を評価するのに非常に良い指標となり得る。多くの発癌物質は哺乳類の培養細胞にDNA鎖切断を引き起こすことが知られている¹⁾。DNA鎖切断数を定量するFADU(Fluorometric Analysis of DNA Unwinding)法は、現在最も簡単で、最も感度の良い方法の一つである²⁾。今回我々は、ヒト培養線維芽細胞株にこの方法を適用し、放射線や化学物質、環境水中のDNA損傷性物質の検出に本方法が有用であるかどうか検討した。

2. FADU法の原理

二本鎖DNAをアルカリ溶液に暴露すると、水素結合が壊れ、二重らせんが巻戻されて一本鎖になる。哺乳類細胞の染色体などの非常に長いDNAでは、この過程はゆっくりと進行する。この時DNAに切断があると切断点から巻戻しが進行するので、巻戻しの速度は速くなる。従ってDNAの巻戻し速度を測ることによって、DNA鎖切断数を定量することができるのである。

*; 京都大学工学部附属環境微量汚染制御実験施設 Lab. for Control of Environmental Micropollutants, Kyoto Univ., **; 京都大学医学部放射能基礎医学教室; Dep. of Experimental Radiology, Fac. of Medicine, Kyoto Univ.

巻戻しの速度を測定するためには、古くからヒドロキシアパタイトカラムで二本鎖DNAと一本鎖DNAを分離して、それぞれを定量する方法が取られてきたが³⁾、この方法は煩雑な上に時間もかかり、高い感度を得るためにはあらかじめ細胞を放射性あるいは安定アイソトープでラベルしておく必要があった⁴⁾。

BirnboimとJevcakらはDNAの巻戻し速度を測定するのに、ヒドロキシアパタイトカラムもアイソトープも用いない非常に簡単に迅速な方法—FADU法—を開発した²⁾。臭化エチジウムはある条件下、すなわち二本鎖DNAの塩基間水素結合は壊れないが、一本鎖DNAやRNAの部分的な二重らせん構造は壊れるような弱アルカリ性の条件下では、二本鎖DNAに特異的に結合し、520nmの励起光を受けて590nmの蛍光を発する。従って、このような条件下では二本鎖DNAの量だけを特異的に測定することが可能である。

まず細胞の浮遊液を三つのグループの試験管に分注する。二本鎖DNA以外の細胞構成物及び遊離の臭化エチジウムによって生じる蛍光は、対照区の試験管(Bチューブ)から読み取る。Bチューブは最初に細胞抽出物を超音波処理し、DNAを短い断片にし、アルカリで完全に一本鎖に変性する。二番目の試験管(Tチューブ)では全体の蛍光、すなわち(二本鎖DNAによる蛍光)+(他の構成物による蛍光)を測定する。従って(T-B)は二本鎖DNAによる蛍光を表している。三番目の試験管(Pチューブ)はDNAの巻戻し速度を調べるために使用する。細胞抽出物をアルカリ溶液中で一定時間インキュベートすると、二本鎖DNAが部分的に巻戻されて一本鎖になる。巻戻される度合はDNA鎖の切断数と関連している。(P-B)は巻戻されずに残った二本鎖DNAによる蛍光を表している。巻戻されずに残った二本鎖DNAの割合を%Dとし、以下の式で表す。

$$\%D = (P - B) \div (T - B) \times 100$$

3. 実験方法

1) 試薬

仔牛血清はHAZLETON社の製品、Dulbecco改変MEM培養液は(株)日研生物医学研究所の製品、PBSはTaKaRaの製品、トリプシンはDIFCO社の製品をそれぞれ使用した。

使用した試薬の組成を以下に示す。なお、D液の組成はBirnboimらの報告²⁾とは異なっている。

araC-HU 培養液; Dulbecco改変MEM培養液, 10%仔牛血清, 10 μ M arabinofuranosyl cytosine,
2 mM hydroxyurea

PBS-EDTA液; PBS(Phosphate Buffered Salts,Dulbecco改変)にEDTAを0.54mMになるように加えたもの。

トリプシン-EDTA; 0.05%(W/V in PBS)トリプシン, 0.05%(W/V in PBS)EDTA

A液; 9M 尿素, 10mM 水酸化ナトリウム, 2.5mM シクロヘキサンジアミン四酢酸, 0.1%SDS

B液; 0.2N水酸化ナトリウムとA液を11.5:8.5の割合(体積比)で混ぜる。

C液; 1Mグルコース, 14mMメルカプトエタノール

D液; 2 μ g/ml臭化エチジウム, 13.3mM水酸化ナトリウム

A, B, C液は室温で、D液は冷暗所で保存する。

2) 細胞株

SV40というウイルスで形質転換したヒト線維芽細胞株 WI-38-VA13を用いた⁵⁾。親株である WI-38 は、白人の3カ月胚の肺組織由来であり形質転換により永久継代可能となった系統がWI-38-VA13である。DNA修復能は正常で、紫外線照射後の不定期DNA合成も正常である。細胞は、Dulbecco改変MEM培養液に仔牛血清を10%加えた培養液中で培養した。

3) γ 線照射

培養フラスコ(75cm²,FALCON社)に飽和状態(コンフルエント)になった細胞を、PBSで一回洗い、トリプシン-EDTAで処理し、5mlのMEM培養液(10%血清)を加え、数回ピペッティングして細胞を浮遊させ、細胞数をCOULTERCOUNTERで測定した。細胞を遠沈し、上澄みを取り除き、0℃に冷やしたPBS-EDTA液に、細胞

濃度が 8×10^5 cells/ml となるように再浮遊させた。細胞浮遊液を 1.4ml ずつポリプロピレン製バイアル (2ml, CORNING) に入れ、 γ -線照射装置 (^{137}Cs , 4Gy/min) でそれぞれの線量照射した。照射後、修復による DNA 一本鎖切断の再結合を防ぐために、細胞を氷冷し、できるだけ速やかに FADU を行なった。

4) 紫外線照射、化学発癌物質処理

前日に培養ディッシュ (100mm, CORNING) に 1.1×10^6 個ずつ細胞を撒き、10% 血清入りの MEM 培養液で一晩インキュベートした。紫外線は、細胞を PBS で一回洗い、速やかに紫外線ランプ (254nm) で各線量照射した。化学発癌物質 4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide) 及び MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) は和光純薬から購入した。発癌物質の暴露は、各濃度の物質を無血清 MEM 培養液 5ml に溶解させ、細胞を 1 時間処理することによって行った。紫外線、あるいは発癌物質で処理した細胞は、処理後すぐに araC-HU 培養液を加え、37°C、5% CO_2 の条件下で各時間インキュベートした。続いて PBS で一回洗い、トリプシン-EDTA でシャーレから細胞をはがした後、遠沈して細胞を集め、1.5ml の PBS-EDTA 液に再浮遊し、できるだけ速やかに FADU を行った。

5) FADU 法

FADU のプロトコルを以下に示す。本実験では、材料の供給を容易にする目的で Birnboim らのオリジナルプロトコル²⁾よりも細胞数を少なくしているため条件が微妙に異なる。そこでオリジナルプロトコルと同等の感度を得るために、あるいは実験の操作条件を容易にするために P チューブと B チューブのインキュベーション温度と時間をそれぞれ変更した。

放射線、あるいは化学発癌物質で処理した細胞の浮遊液を、0.2ml ずつ 6 本のポリスチレン製チューブ (15ml, FALCON) に分注する。二本一組とし、それぞれ T、P、B の 3 グループに分ける。各々のチューブに 0.2ml の A 液を加え、0°C で 10 分間静置する。この間に細胞膜が溶け、染色体 DNA が溶液中に広がる。次に P チューブと B チューブに 0.2ml の氷冷した B 液を静かに加える。この時 P チューブは絶対に攪拌してはならない。0°C で 30 分間インキュベートし、DNA の変性を開始する。この間溶液の pH は約 12.9 (23°C で測定) になる。B チューブは完全に変性させるため、B 液を加えた後よく攪はんし、超音波処理し (密閉式超音波細胞破碎装置 UCD-130 型、東湘電機)、平均 1 kilobase pair (以下 kbp と省略) 長ぐらいまで DNA をせん断する。引き続いて、P チューブを 28°C で 45 分間、B チューブを 60°C で 60 分間インキュベートする。時間が来たら、0.4ml の氷冷した C 液を加え、よく攪はんし、pH を約 11 (24°C で測定) に下げて、アルカリ変性を止める。P チューブを超音波処理し、B チューブと条件をそろえる。次に 1.5ml の D 液を加え、蛍光分光光度計 (RF-5000, SHIMADZU) で蛍光を測定する (excitation, 520 nm; analyzer, 590 nm)。T チューブには A 液を加え 10 分間静置した後、B 液 0.2ml と C 液 0.4ml をあらかじめ混ぜ合わせた液を加え、超音波をかけ、D 液を加えるまで 0°C で静置しておく。従って T チューブでは DNA の変性は起こらない。% D 値を次式、 $(P - B) \div (T - B) \times 100$ から計算する。

6) 下水処理水の濃縮

地方中堅都市 O 市の下水処理場は主として家庭排水及び小規模事業所からの廃水を処理対象としており、標準活性汚泥処理、引き続いて塩素処理をした後処理水を放流している。1993 年 2 月 22 日午後 1 時頃、塩素処理後の放流水を 20 l 採水した。今回は、生物濃縮され安い脂溶性の有機物質を濃縮する目的で、Sep-pak Plus C18 カートリッジ (WATERS) を用いて濃縮した。採水した水は濾紙 (5A, ADVANTEC) で濾過し、硫酸で pH 2 に調整した後、ジエチルエーテル 10ml、ジクロロメタン 10ml、エタノール 50ml、精製水 100ml を順次通して洗浄した Sep-pak Plus C18 カートリッジに 4ml/min の流速で通水した。Sep-pak カートリッジは 5 l に付き 1 個、計 4 個使用した。通水の終了したカートリッジ 1 個につき、2ml ずつの精製水を通して水溶性物質を洗い流し、穏やかな空気流で樹脂を乾燥させた後、ジエチルエーテルとジクロロメタンを順次 10ml ずつ通して、吸着した有機物を溶出させた。溶出液はロータリーエバポレーターで蒸発乾固し、残留物を 1ml の DMSO (dimethyl sulfoxide) で再溶解し試料とした。また同様の操作を精製水 20 l に対して行い、これ

をブランク試料とした。

3. 実験結果

Fig.1に ^{137}Cs γ -線照射でVA13線維芽細胞に引き起こされたDNA一本鎖切断の線量-効果曲線を示す。 ΔD は照射群と対照群の% D値の差である。1 Gy照射時の ΔD 値が21で、Birnbomらの実験とはほぼ同程度の高い感度が得られた。Fig.1の ΔD 値は線量に正比例しないで、線量をさらに上げるとグラフは飽和曲線を描く(データは示さない)。この実験条件で測定した γ 線の引き起こすDNA鎖切断は、物理的な衝突による損傷、あるいはフリーラジカルの生成に伴う化学的な損傷であるので、線量と細胞に引き起こされるDNA鎖切断の数は正比例すると仮定できる。その仮定に基づいて、本論文ではFig.1のグラフをDNA鎖切断の検量線として用い、様々なDNA損傷性物質によって引き起こされるDNA鎖切断の量を、同じ ΔD 値を与える γ 線の線量で表すことによって、DNA鎖切断数を定量する事を試みた。

電離放射線の場合とは違い、紫外線や多くの化学発癌物質は直接DNA鎖切断を引き起こすわけではなく、多くの場合、細胞のDNA修復機構が紫外線や化学発癌物質によって生じた修飾塩基を取り除く過程で、DNA鎖切断が生じると考えられている。従って、この場合DNA鎖切断は、一瞬にして起こるのではなく、修復酵素が働くまでの時間がかかると考えられる。また、修復の過程で生じる鎖切断であるので、切断点は短時間のうちに再結合するであろうと考えられる。Fig.2に紫外線を6 J/m²照射した後、araC-HU培養液 [◆]、あるいは通常のMEM培養液(10%血清) [□]で各時間インキュベートした後の ΔD 値を示す。紫外線照射後、arabinofuranosyl cytosineとhydroxyureaで細胞を処理すると、除去修復におけるDNA合成反応が阻害される⁶⁾⁷⁾。しかし紫外線損傷を切り出す活性は阻害されないので、DNA鎖切断が蓄積し、紫外線によるDNA鎖切断を容易に検出することができた。通常の培養液で処理した細胞では、6時間インキュベートしても、DNA鎖切断は増加しなかった。Fig.3では、様々な線量の紫外線を細胞に照射した後、araC-HU培養液で3時間インキュベートした時に生じるDNA鎖切断を示す。グラフの縦軸は、紫外線照射によって得られた ΔD 値と、Fig.1において同じ ΔD 値を与える γ 線の線量(Gy)で表している。2 J/m²という比較的低線量の紫外線によるDNA鎖切断も楽に検出することができた。Fig.4, Fig.5では、代表的な化学発癌物質であるMNNGと4NQOの引き起こすDNA鎖切断を示す。細胞を様々な濃度の化学発癌物質を含む無血清培養液中で1時間処理し、引き続いてaraC-HU培養液で3時間インキュベートした後、DNA鎖切断を定量した。MNNG, 4NQOいずれの場合にも、濃度に依存的なDNA鎖切断の上昇が観察された。またどちらも高濃度になるにつれ、グラフの傾きが穏やかになる現象が観察された。

Fig.6に下水処理水中の遺伝毒性物質が引き起こすDNA鎖切断を示した。〇市下水処理場の放流水中の疎水性の有機物を濃縮した試料を、MNNG, 4NQOの場合と同様の方法で細胞に1時間暴露し、araC-HU培養液で3時間インキュベートした後DNA鎖切断を定量した。グラフの横軸は水の濃縮倍率を表している。濃度依存的にDNA切断数が上昇しているのが観察された。濃縮倍率200倍に置けるDNA鎖切断は、 γ 線換算で約0.56 Gyであった。

4. 考察

Birnbomらのオリジナルプロトコル²⁾では、ボランティアから採ったヒトの白血球を使っているのに対し、我々の実験では、材料の供給が容易なヒト線維芽細胞株VA13を使用した。さらに材料の供給を容易にするために、我々の実験ではオリジナルプロトコルの細胞濃度(5~10×10⁶ cells/ml)の約1/10の濃度(8×10⁵ cells/ml)で実験を行った。従って、オリジナルとは条件が微妙に異なり、プロトコルの変更を余儀なくされた。変更した点はPチューブのインキュベーション温度と時間、Bチューブのインキュベーション温度、及びD液の臭化エチジウムの濃度である。まずオリジナルプロトコルでは、P、Bチューブ共に、0℃、30分の後で、15℃、1時間インキュベートしているが、我々の用いた条件では、15℃、1時間ではBチュー

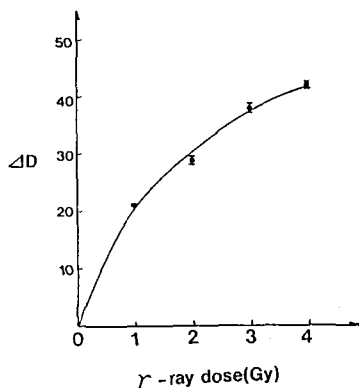


Fig.1 DNA strand breaks induced by ^{137}Cs γ -ray
 $\Delta D = (\% \text{ of unirradiated group}) - (\% \text{ of irradiated group})$
 Each plots are mean of three independent experiments. Bar : SEM

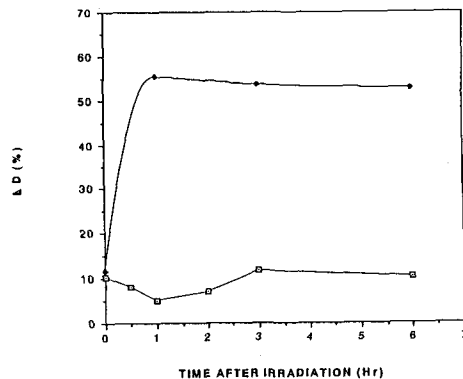


Fig.2 DNA strand breaks induced by UV light
 After irradiated $6\text{J}/\text{m}^2$ 254nm UV light, cells were incubated in araC-HU medium (◆) or normal MEM medium (10% Fetal Bovine Serum) (□).

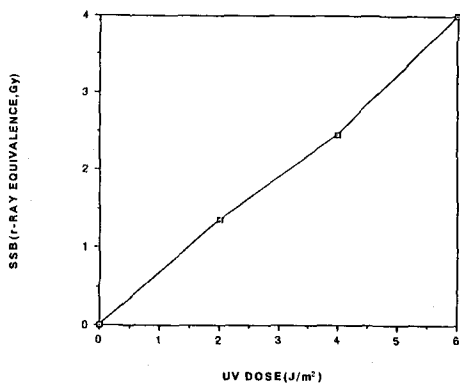


Fig.3 DNA strand breaks induced by UV light
 After irradiation, cells were incubated in araC-HU medium for 3 hours.
 The numerical value at the vertical axis is almost equal to the number of DNA strand breaks per 10^7 base pairs.

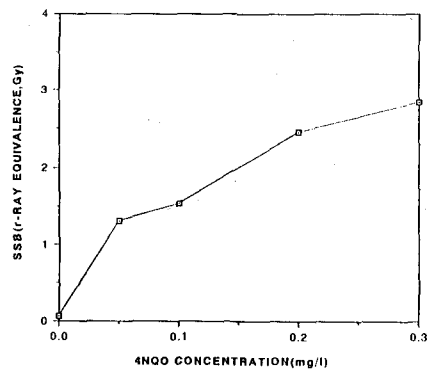


Fig.5 DNA strand breaks induced by 4NQO
 After 1 hour treatment with 4NQO, cells were incubated in araC-HU medium for 3 hours.
 The numerical value at the vertical axis is almost equal to the number of DNA strand breaks per 10^7 base pairs.

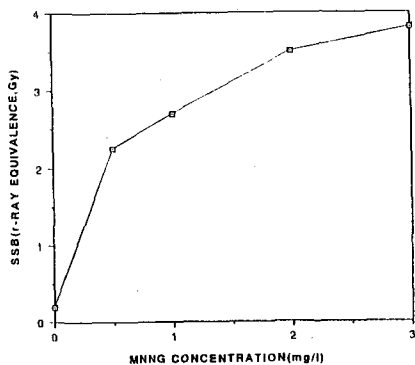


Fig.4 DNA strand breaks induced by MNNG
 After 1 hour treatment with MNNG, cells were incubated in araC-HU medium for 3 hours.
 The numerical value at the vertical axis is almost equal to the number of DNA strand breaks per 10^7 base pairs.

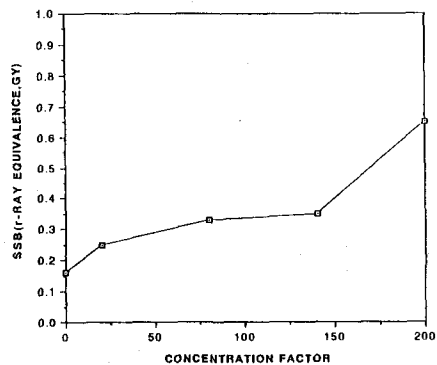


Fig.6 DNA strand breaks induced by the effluent of a waste water treatment plant stands in O city
 After 1 hour treatment with water sample, cells were incubated in araC-HU medium for 3 hours.
 The numerical value at the vertical axis is almost equal to the number of DNA strand breaks per 10^7 base pairs.

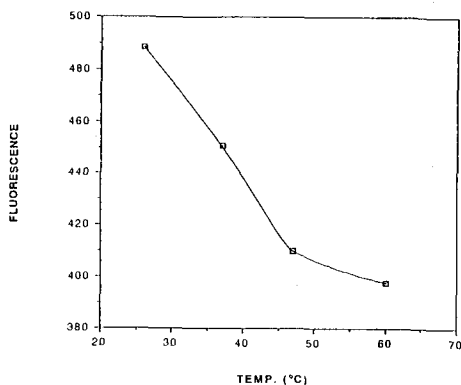


Fig. 7 Relationship between the incubate temperature and the fluorescence of B tube

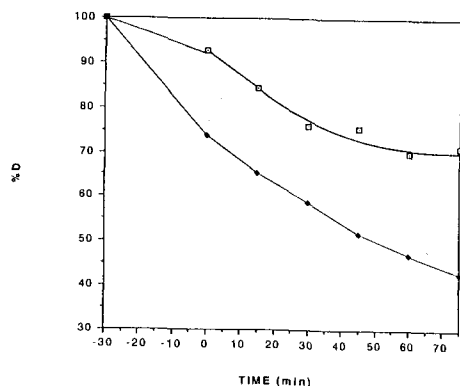


Fig. 8 Kinetics of unwinding of control (□) and γ -irradiated (1 Gy) (◆) human WI38-VA13 fibroblast cell line
Extracts were maintained at 0°C for 30 min prior to transfer to a 28°C bath.

ブのDNAの変性が不十分であり、完全に変性させるために、Bチューブは60°C、1時間インキュベートすることにした (Fig. 7)。また、15°Cという温度を作るには特別なウォーターバスを必要とするため、通常のウォーターバスで、真夏時にも温度設定を可能にするために、Pチューブのインキュベート温度を28°Cに設定した。VA13に γ 線をそれぞれ0 Gyと1 Gy照射した時のDNAの巻戻しの様子をFig. 8に示した。1 Gyの γ 線照射によるDNA一本鎖切断を十分な感度で検出でき、しかも対照群 (0 Gy) における巻戻しが余り進行しないという点から、Pチューブのインキュベート時間を45分間に設定した。

次にD液の臭化エチジウムの濃度であるが、我々の実験では細胞濃度をオリジナルプロトコルの1/10に設定しているので、当然DNA量も約1/10になっているはずである。従って、臭化エチジウムの濃度を、オリジナルよりも低く設定しなければ、遊離の臭化エチジウムを出す蛍光が高いバックグラウンドとなることが予想された。ところが、臭化エチジウムの濃度を低く設定し過ぎると蛍光量が減少するため、蛍光分光光度計の検出感度を高くしなければならず、実験の精度が低下することが懸念された。結局D液の臭化エチジウム濃度はオリジナルの6.7 μ g/mlから2 μ g/mlに変更することで良好な結果を得るに至った。

γ 線が細胞中のDNAに引き起こす鎖切断の数についてはいくつかの文献があるが⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾、それらによると $1.35 \sim 2.5 \times 10^{-10}$ single strand breaks (以下ssbと略) /Gy/daltonである。LOONらの値 2.5×10^{-10} ssb/Gy/daltonを引用すると⁽¹⁰⁾、これは1 Gyの線量が約 10^7 base pair (以下bpと略) に一個のDNA鎖切断を引き起こすということと同値であるから、Fig. 3~6の縦軸の数値はそのまま 10^7 bpあたりのDNA鎖切断数として読むことができる。ヒトの染色体一本は平均して 2×10^8 bpからなっているので、 γ 線1 Gyあたり平均20個のDNA鎖切断を引き起こすと見積ることができる。このような見積をすることによって、放射線や化学発癌物質によって引き起こされるDNA鎖切断の量を、厳密ではないが直感的に把握することができる。

紫外線照射によって生成する損傷の大部分はピリミジンダイマーである。紫外線は1 J/m²で約 10^7 bpあたり15個のピリミジンダイマーを生成する⁽¹¹⁾。ピリミジンダイマーは細胞中の除去修復酵素によって切り出されるので、すべてのピリミジンダイマーが切り出されるとすると、1 J/m²で 10^7 bpあたり約15個のDNA鎖切断が観察されるはずである。ところがFig. 3を見ると、1 J/m²あたり0.67 ssb/ 10^7 bpで、約4.5%のDNA鎖切断しか観察されなかった。このことは、DNAに生じたピリミジンダイマーの4.5%が照射後3時間の間に除去修復を受け、その過程で生じたDNA鎖切断を我々は検出しているのであって、残りの約95%はDNA鎖切断を伴わない修復を受けたか、あるいは修復されずに残っていることを示している。松永らは、ヒト培養線維芽細胞に10 J/m²の紫外線を照射して、72時間後にチミンダイマーの量を測定したところ、約50%が残存していたと報告しており⁽¹²⁾、このデータは我々の実験結果を支持している。従って紫外線や化学物質の場合、我々

が検出しているDNA鎖切断数の数十倍の、DNA鎖切断を伴わないDNA損傷が存在している可能性があることを考慮しなければならないだろう。我々はまた、化学発癌物質であるMNNG、4NQOによって生成したDNA鎖切断も感度良く検出することができた。4NQOが生成する塩基損傷の修復機構は、紫外線の場合とほぼ同じであると考えられているので、4NQOの付加体が除去修復機構によって切り出され、DNA鎖切断を生じると考えられる。また、MNNGは有名なアルキル化剤で、DNAのグアニンをメチル化し、主にN-7メチルグアニンを生成する。この修飾塩基は糖との間のグリコシド結合が不安定で、自然に脱プリンを起こしたり、あるいはDNAグリコシラーゼによって切断され、結果的にAPサイトを生成する。APサイトはAPエンドヌクレアーゼや除去修復酵素によってDNA鎖切断を誘発する¹³⁾。Fig.4, 5で、高濃度になるに連れて、グラフの傾きが寝て来る現象については、発癌物質が高濃度になって来ると、細胞内でなんらかの防御機構が誘発されてDNA損傷が起こり難くなるためか、あるいは高濃度の発癌物質によって、細胞のDNA修復機構がダメージを受けるために、検出できるDNA鎖切断が減少するのではないか等の原因が考えられる。

Fig.6の下水処理場放流水の場合、200倍濃縮した水試料で細胞を1時間処理した後、3時間araC-HU培養液で処理すると、染色体当たり平均11.2個のDNA鎖切断が生じた。実際にはこの何十倍ものDNA損傷が生じているであろうということは、紫外線の例から容易に想像することができる。実際にこれらの水に直接暴露される魚類等の水棲生物に対する影響を考えた場合、化学物質の用量作用曲線は必ずしも直線にはならないので、Fig.6から低濃度域における影響を単純に計算することはできないが、今回濃縮の対象にしたのは生物濃縮され安い脂溶性の物質であったため、これらの微量汚染物質が生物濃縮によって、細胞内に高濃度に蓄積された場合、深刻なDNA損傷が生じる危険性は十分にあると言えるだろう。

5. まとめ

今回得られた結論を以下にまとめる。

- 1) FADU法を、材料供給の容易なヒト培養線維芽細胞株VA13に適用した。さらに材料供給を容易にするために、オリジナルプロトコルの1/10の細胞濃度で実験した。試薬の組成と、実験の手順に少し手を加えることで、1/10の細胞濃度でもオリジナルプロトコルとほぼ同程度の高い感度でDNA鎖切断を検出することができた。
- 2) araC-HU培養液で細胞をインキュベートすることで、紫外線や化学発癌物質によって引き起こされるDNA鎖切断を感度よく検出することができた。またγ線の線量作用曲線を検量線とすることで、生じたDNA切断の量を定量することができた。
- 3) 紫外線の場合は、我々が検出したDNA鎖切断数は、実際に生じていると考えられるピリミジンダイマーの数の約4.5%であった。
- 4) Sep-pak カートリッジを用いて、下水処理水中の微量な脂溶性の有機物を濃縮した。200倍に濃縮した試料ではヒトの染色体あたり平均11.2個のDNA鎖切断が検出された。生物濃縮等を考えると、水棲生物に対する影響が懸念される。また、環境水中のDNA損傷性物質を検出、定量するのにヒト培養線維芽細胞を用いたFADU法は有用な方法であると考えられ、今後様々な環境試料、特に汚染の進んだ地域の河川や水道水のDNA損傷性の評価に威力を発揮するものと思われる。

参考文献

- 1) F.B.DANIEL, D.L.HAAS, AND S.M.PYLE; Quantitation of Chemically Induced DNA Strand Breaks in Human Cells via an Alkaline Unwinding Assay, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 144, 390-402, 1985
- 2) H.C.BIRNBOIM AND J.J.JEVCAK; Fluorometric Method for Rapid Detection of DNA Strand Breaks in Human White Blood Cells Produced by Low Doses of Radiation, CANCER RES., 41, 1898-1892, 1981
- 3) B.RYDBERG; The Rate of Strand Separation in Alkali of DNA of irradiated mammalian cells, RADIAT.RES., 61, 274-287, 1975
- 4) B.RYDBERG; Detection of Induced DNA Strand Breaks with Improved Sensitivity in Human Cells, RADIAT.RES., 81, 492-495, 1980
- 5) A.J.GIRARDI, F.C.JENSEN AND H.KOPROWSKI; SV40-Induced Transformation of Human Diploid Cells: Crisis and Recovery, J.CELL.COMP.PHYSIOL., 65, 69-84, 1965
- 6) T.YAGI, O.NIKAI DO AND H.TAKEBE; Excision Repair of Mouse and Human Fibroblast Cells, and a Factor Affecting the Amount of UV-Induced Unscheduled DNA Synthesis, MUTAT.RES., 132, 101-112, 1984
- 7) W.C.DUNN AND J.D.REGAN; Inhibition of DNA Excision Repair in Human Cells by Arabinofuranosyl Cytocine: Effects on Normal and Xeroderma Pigmentosum Cells, Mol.Pharmacol., 15, 367-374, 1979
- 8) R.ROOTS, G.KRAFT AND E.GOSSCHALK; The Formation of Radiation-Induced DNA Breaks: The Ratio of Double-Stranded Breaks to Single-Stranded Breaks, INT. J. RADIATION ONCOLOGY BIOL. PHYS., 11, 259-265, 1985
- 9) R.E.KRISCH, M.B.FLICK AND C.N.TRUMBORE; Radiation Chemical Mechanisms of Single- and Double-Strand Break Formation in Irradiated SV40 DNA, RADIAT.RES., 126, 251-259, 1991
- 10) A.A.W.M.VAN LOON et al.; Detection of Base Damage in DNA in Human Blood Exposed to Ionizing Radiation at Biologically Relevant Doses, INT.J.RADIAT.BIOL., 59, 651-660, 1991
- 11) 武部啓 著; DNA修復, 東京大学出版会, 1983
- 12) 松永司, 森俊雄, 二階堂修; 紫外線による細胞死の原因となるDNA損傷, 日本放射線影響学会第三十二回大会 講演要旨集, P227, 1989
- 13) 林裕造, 黒木登志夫 編; 新しい発癌のメカニズムと評価, サイエンスフォーラム社, 1984