[報文]

ガンマ線照射により牛レバーに誘導される 8-hydroxyguanine を指標とする検知法の検討

菊地正博*, 小林泰彦

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター
放射線生物作用研究ディビジョン マイクロビーム細胞照射研究グループ
(〒 370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233)

Study on Detection Method for 8-hydroxyguanine Induced in Bovine Livers by γ -irradiation

Kikuchi Masahiro* and Kobayashi Yasuhiko

*Microbeam Radiation Biology Group, Radiation Biology Research Division,
Quantum Beam Science Center, Sector of Nuclear Science Research, Japan Atomic Energy Agency,
1233 Watanuki-machi, Takasaki, Gunma 370-1292, Japan*

Summary

DNA was isolated from fresh raw bovine livers irradiated with γ -rays. One of oxidative DNA base damage, 8-hydroxyguanine (8-oxoG) was detected using ELISA method. One hundred ng DNA isolated from the liver irradiated on ice showed that signal intensity of ELISA was simply increased according to the increasing absorbed doses. When the livers were irradiated in dry ice, no signal increase of 8-oxoG was observed on ELISA detection against the DNAs isolated from the livers. This means that the induction of DNA base damages by γ -irradiation is suppressed in frozen condition. Therefore, the utilization of dose response of 8-oxoG with ELISA suggests an application to the irradiation detection of bovine liver treated in chilled condition.

Key words: bovine liver (牛レバー), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法),
anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine antibody (抗 8-OHdG 抗体), dose response (線量応答),
irradiated food detection method (照射食品検知法)

はじめに

2011 (平成 23) 年, 生肉を原料とするユッケの喫食に起因した広域集団食中毒が発生し, 複数の死者も出た¹⁾ ことから, 食品衛生上の取扱いが問題になったが, 従前のトリミング²⁾に加えて, 原料

肉の表面加熱³⁾により内部の清浄な生肉部位を生食用食肉に使用するとして取扱いの厳密化が図られた。ところが, 「レバ刺し」として生で食されてきた牛の肝臓に腸管出血性大腸菌が存在する可能性が示唆され, 屠殺後の菌汚染ではなく肥育中から存在していることが指摘された⁴⁾。このことから, 2012

*連絡先: kikuchi.masahiro@jaea.go.jp

年7月以降、安全に生食するための有効な対策が見いだされるまでの間、牛肝臓を生食用として提供することが禁止された⁵⁾。

放射線による食品の照射処理は、発芽防止や殺菌、熟度調整に用いられ、食品の損耗防止の手法として世界的に利用されている⁶⁾。日本では、ジャガイモの芽止めを目的としたガンマ線照射のみが許可されており、その他の食品への適用はない。しかし、放射線の殺菌効果と透過能を考えると、包装後に、牛の肝臓を生状態のまま殺菌することができると考えられる。

今後、牛レバーの照射殺菌が許可される場合は、照射・非照射を判別する手段が必要となると考えられる。我々はこれまでに照射肉類（豚肉・鶏肉・牛肉）の検知法として化学発光 ELISA 法を開発し報告した⁷⁾。この ELISA 法では、放射線照射により DNA の guanine 塩基から生成された 8-hydroxyguanine (8-oxoG) を抗 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体を用いて検出する。このシグナルを化学発光量として検出すると、線量依存的にシグナル強度が増加することから、照射の有無を判別するとともに、吸収線量の推定も可能となるかも知れない。そこで、ELISA 法を照射牛レバーに適用するための手法を検討した。

実験方法

1. 試料

牛レバーは市中で加熱用として販売されている生レバーを購入した。購入した牛レバーをポリエチレン袋に入れ、照射に用いた。照射は、購入後できるだけ早く行うように計画し、購入した当日または翌日には照射した。氷上での照射は、4℃で照射まで保管した。凍結下での照射は、事前に-20℃で凍結させた状態で保管した。

2. γ 線照射

試料は、氷上またはドライアイス中でコバルト 60 の γ 線を照射した。吸収線量は、線源からの距離を一定として照射時間を変えて制御して行い (2.6 kGy/h)、具体的には 1 kGy, 2.6 kGy, 5.2 kGy, 7.8 kGy を照射した。照射処理した牛レバーは-20℃で保存した。

3. 牛レバーからの DNA 調製

牛レバーの小断片を乳鉢に切り取り、液体窒素下で粉碎後、約 20 mg をサンプルチューブに取った。DNA の分離には DNeasy Tissue Kit (Qiagen 製) を用いた。レバーではプロトコルに従った標準的操作に加えて、キットのバッファー ATL 添加後、RNase A (100 mg/ml) を 4 μ l 加えて 37℃で 30 分保温し、Proteinase K (20 mg/ml) を 4 μ l 加えて 56℃でインキュベーションして細胞溶解後に、14000 rpm で 5 分間遠心して残渣を除去した。次に、バッファー AL とエタノールを加えてカラム吸着と洗浄を行ってから、100 μ l の純水を注入し、50℃で 10 分置いて遠心により DNA を溶出した。溶出後の DNA は Sephadex G50 カラム (Roche 製) を用いた精製を行った後、さらに、0℃, 16000rpm で 1h 遠心して不純物を沈殿させ、上清を分取した。

4. DNA の定量

まず 50 μ g/ml の 2 本鎖 DNA 溶液が 260 nm の吸光度 $A_{260} = 1$ となることを利用して、回収した DNA 溶液 2 μ l を用いて NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) で測定して、その吸収スペクトルから DNA 濃度および純度を推測した。

NanoDrop の測定結果に基づき、DNA 溶液を 50 ng/ μ l となるように純水で希釈した。最終的な 2 本鎖 DNA 濃度の決定は、Ethidium Bromide (EtBr) 20 μ g/ml と DNA を混和して、Lumi-Imager F1 Workstation (Roche 製) を用いて紫外線 302 nm に対する発光量を 600 nm で測定することで行なった。具体的には DNA 濃度は、DNA 標準液 (0, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ng/ μ l) 4 μ l を EtBr 4 μ l と混和した時の発光量の検量線を作成して求めた。

5. 化学発光 ELISA 法

化学発光 ELISA 法は、既報⁷⁾に従った。すなわち、ウェル当たりの DNA 量は、発光法で測定された DNA 濃度から求められた 100 ng として、1 検体当たり 5 穴のマイクロウェルを用いた。抗 8-OHdG 抗体を 1 次抗体とし peroxidase 標識された抗マウス IgG 抗体を 2 次抗体として反応させた。化学発光基質は LumiGLO Reserve を用い、化学発光量を Lumi-Imager F1 Workstation で測定した。

実験結果および考察

レバーを試料として DNA 分離した時、分光光度計で測定された DNA スペクトルを Fig. 1 に示した。DNA 純度を示す指標として A_{260}/A_{280} 比と A_{260}/A_{230} 比が使われる。市販の DNA 標品では A_{260}/A_{280} 比は 1.9 であったが、照射した生レバーから分離した DNA では、1.5 ~ 1.8 であった。特に血液が多い試

Fig. 1 Typical spectrophotometer spectra. Specimens were applied (a) after Qiagen column isolation, (b) after purification with Sephadex G50 and centrifugation, and (c) condensed impurity of precipitant by centrifugation.

料から分離した DNA では A_{260}/A_{280} 比が 1.3 となることもあったが、概ね 1.6 以上を示した。

一方、 A_{260}/A_{230} 比は市販の DNA 標品では 3.1 であったが、キアゲンで分離しただけの DNA では 0.8 ~ 1.3 となり共雑物の存在が疑われた。そこで Sephadex G50 によるゲルろ過と遠心分離を行って精製したところ、 A_{260}/A_{280} 比は 1.7 ~ 1.8 程度とほとんど変化なかったが、 A_{260}/A_{230} 比は 2.1 と改善が見られた。

DNA 濃度は、EtBr と結合した DNA の発光量が DNA 量に比例することを利用して、同時に測定した標準 DNA の検量線から求めた (Fig. 2)。成書のプロトコール⁸⁾によると、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の EtBr と DNA (< 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$) を等量ずつ混ぜて発光量を測定する。本実験で分離した DNA は濃度が高く希釈率が高くなるため、10 倍濃度の 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の EtBr を用いたところ、DNA 濃度 70 $\text{ng}/\mu\text{l}$ までほぼ直線的な検量線が得られた。

現在のところ、これ以上の精製法は見出せないの、この DNA を用いて ELISA 法で 8-oxoG の検出を行った。購入日を変えてそれぞれ照射された 3 試行の検体を用いて、調製された DNA で ELISA を行い、非照射のシグナル強度で規格化後に平均値としてプロットした (Fig. 3)。その結果、冷蔵状態で照射された牛レバー DNA に対する ELISA では、線量の増加につれてシグナル強度が増加した。Table 1 に数値データを示した。5.2 kGy では 3 検体ともほぼ同じシグナル強度を示したが、0 kGy の時、1 検

Fig. 2 Calibration curve used for DNA concentration measurement. This plot was performed at each measurement.

体が他の2検体から離れた値を示した。このように非照射検体のシグナル強度にばらつきがあったため、結果的にエラーバーが大きくなり、吸収線量1 kGy 程度では判別が難しいと考えられるが、2.6 kGy を超える吸収線量の牛レバーは、非照射と識別ができると考えられる。一方、ドライアイス中の凍結状態で照射した牛レバーでは、線量が増加してもシグナルの増加は認められなかった。

Fig. 3 Dose response of ELISA detection against DNA isolated from bovine livers. The livers were irradiated (a) on ice and (b) in dry-ice. This plot was obtained from 3 independent experiments of different irradiation.

不純物を除去するため Sephadex G50 によるゲルろ過と高速遠心分離を行ったところ、 A_{260}/A_{230} 比で示される DNA 純度の指標が改善された。DNA 標品と比べると不純物の混在が示唆されたが、この DNA を用いた ELISA の結果は、線量依存性を示していることから、本 ELISA 法に使用可能な DNA 純度を有していると考えられる。

本 ELISA 法で用いた抗 8-OHdG 抗体は、8-oxoG を塩基として持つデオキシヌクレオシドに特異的に結合する抗体である⁹⁾。我々は、本抗体が加水分解されていない高分子 DNA 中に存在する 8-oxoG に対しても定量的に結合することを見出し、照射食肉（鶏肉・豚肉・牛肉）の検知法として利用できることを示した⁷⁾。今回、実験を始めるにあたり、試料とした牛レバーは牛肉の内臓であり、化学発光 ELISA 法を適用することに特段の困難はないだろうと考えた。

しかし、非凍結状態で照射された牛レバーからキアゲンキットを用いて通常の DNA 分離法で調製した DNA では、当初 ELISA の結果が安定せず、線量応答性も得られなかった。この原因として、まず分光光度計による DNA 濃度測定が不正確であったことが考えられる。1 ウェル当たり 100 ng の DNA を用いるつもりで計算したが、サンプル毎にアプラインする量が異なる結果となって ELISA が不正確になったと考えられる。そのため、DNA 濃度測定を分光光度計による測定から EtBr による発光を利用した方法に変更した。この手法は、試薬が DNA の 2 本鎖の間にインターカレートされて紫外光の励起により発光するので、濃度を変えた標準 2 本鎖 DNA を同時に測定することで濃度未知試料の DNA 濃度を推定できる。この DNA 濃度測定法は一般的な手法ではないが、今回のように DNA と同じ波長域で吸収を持つ不純物が混在していた場合、DNA 濃度を決定できる非常に有効な手段であると考えられる。

Table 1 Raw data of ELISA detection for bovine livers irradiated on ice.

Sample	0 kGy	1.0 kGy	2.6 kGy	5.2 kGy	7.8 kGy
No. 1	6.89×10^6	5.09×10^6	7.46×10^6	9.34×10^6	1.30×10^7
No. 2	4.29×10^6	5.49×10^6	5.28×10^6	9.37×10^6	1.06×10^6
No. 3	4.18×10^6	4.99×10^6	7.29×10^6	9.41×10^6	1.03×10^6

このように求めた DNA 濃度から、100 ng に相当する液量を求めて ELISA に使用したが、ELISA の結果は特定の傾向を示さなかった。本来、ELISA 法ではエピトープ特異的な結合を示す抗体を用いるので、放射線による 8-oxoG が線量依存的に生成している DNA を用いた場合、それに依存した傾向を示すと考えられる。そのようなならない理由を、不純物そのものに起因すると予想した。すなわち不純物が反応液中に共存することで DNA-抗体複合体が 96 穴プレートの表面に結合する過程が阻害され、線量依存性を示さないと推測した。

今回、DNA 調製から ELISA 検出に至る過程の中で、様々な改良を行い、冷蔵状態で照射された牛レバー DNA に生じる 8-oxoG が線量依存的に増加することを示した。本 ELISA 法は、放射線照射に無関係に存在する内在性 8-oxoG を排除できないため、非照射検体との比較が必須となる。Fig. 3(a) の線量応答曲線のエラーバーを大きくする要因が非照射検体のばらつきであったことから、実用的な検知法として適用する場合には、1つの非照射検体から複数の DNA 分離を行い、バックグラウンドレベルの厳密な評価が必要と考えられる。さらに、産地の違いによる牛レバーのバックグラウンドレベルの違いを調査する必要があると思われる。

凍結状態で照射された牛レバーでは、8-oxoG が増加しなかった。これは放射線照射による 8-oxoG 生成が、主に水の放射線分解産物による間接作用に起因しているためと考えられる。凍結状態では、OH ラジカルが生成しても動きが制限され、DNA との反応に関与し難いと考えられる。実験では 8-oxoG のみを検出しているが、OH ラジカルの関与は、通常の DNA 塩基の酸化損傷全般に関わるため¹⁰⁾、他の DNA 損傷も増加していないことが示唆される。腸管出血性大腸菌 O157:H7 の D₁₀ が、室温照射では 0.26 kGy であるが、凍結状態では 0.46 kGy であると報告がある¹¹⁾。この放射線殺菌能の変化は、OH ラジカルの関与が減少したためと解釈できる。

まとめ

照射した牛レバーに対して ELISA 検知法の適用を試みた。牛レバーに ELISA 法を適用する場合、分離した DNA 純度と DNA 濃度測定が非常に重要

であると考えられる。これらを改良した結果、本法で照射の有無を識別する検知法として利用できる可能性を示すことができた。しかし、牛レバーの吸収線量を推定するためには、さらに改良が必要と考えられる。

要 旨

照射した牛生レバーから DNA を分離し、DNA 中の酸化的塩基損傷である 8-oxoG を抗 8-OHdG 抗体を用いて ELISA 法で検出した。その結果、冷蔵状態で照射した牛レバーの 100 ng DNA に対する ELISA の発光シグナル強度は、吸収線量の増加とともに増加した。一方、凍結状態で照射された牛レバーを試料とした時、分離精製された DNA に対する ELISA 法では、線量増加による 8-oxoG の増加は見られなかった。このことは、凍結状態では照射による DNA 損傷の誘発が抑えられることを意味する。冷蔵状態で照射された牛レバーについて ELISA 反応のシグナル強度を非照射と比較することにより、照射の有無を判別できる可能性がある。

参考文献

- 1) “資料 2-1 飲食店チェーン店での腸管出血性大腸菌食中毒の発生について。” 食品安全部監視安全課食中毒被害情報管理室。
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000025ttw-att/2r98520000025tz2.pdf> (参照 2015-06-23)。
- 2) 厚生省生活衛生局長。生食用肉等の安全性確保について。生衛発第 1358 号。(1998)。
- 3) 厚生労働省。食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について。平成 23 年厚生労働省告示 321 号。(2011)。
- 4) “資料 2 牛レバー内部における腸管出血性大腸菌等の汚染実態調査(概要)” 岩手大学特任教授・名誉教授 品川邦汎。
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000023s68-att/2r98520000023sao.pdf> (参照 2015-06-23)。
- 5) 厚生労働省。食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件。平成 24 年厚生労働省告示第 404 号。(2012)。
- 6) “食品照射データベース”
<http://foodirra.jaea.go.jp> (参照 2015-06-23)。
- 7) Kikuchi M. et al. Chemiluminescence ELISA for

- the detection of oxidative DNA base damage using anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine antibody: application to the detection of irradiated foods. *Radioisotopes*. **56**(9), p.509-517 (2007).
- 8) Maniatis T. et al. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 545p. (1982).
- 9) Toyokuni S. et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1; Its application to ferric nitriotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab. Invest.*. **76**, p.365-374 (1997).
- 10) Nackerdien Z. et al. DNA base damage in chromatin of γ -irradiated cultured human cells. *Free. Radic. Res. Commun.*. **16**, p.259-279 (1992).
- 11) 伊藤 均, Harsojo. 食肉中での大腸菌 O157: H7 の放射線殺菌効果. *食品照射*. **33**, p.29-32 (1998).
- (2015 年 8 月 10 日受理)