紫外線照射を用いた小核試験法による DNA 傷害の 定量化と栄養学的研究への応用

飯野直美¹, 遠藤香², 梅垣敬三³
大家千枝子¹, 木村典代^{*1}

(2009年8月4日受付; 2010年2月27日受理)

要旨: 本研究の目的は, DNA 酸化傷害測定法として, 紫外線照射を用いた小核試験法を確立すること, さらに本法が栄養学的研究に応用できるかを検討することを目的とした。WIL2-NS 細胞を用いて紫外線照射時の小核出現率を求め, DNA 酸化傷害の指標として用いた。その結果, UVA420 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ では小核の有意な増加は認められず, 一方 UVB300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ では 0-5 秒間で照射時間依存的に小核が増加した。さらに, ヒトリンパ球を用いた試験でも同様の結果が得られた。以上の結果から, UVB 照射は, 小核試験法への応用が可能であることが示唆された。また, 女子高校生における血中 β -カロテン濃度と紫外線照射法によって得られた小核出現率の間には有意な負の相関関係が認められた ($r = -0.443$, $p < 0.05$)。したがって, UVB 照射によって増幅させた酸化傷害は β -カロテンなどの抗酸化栄養素の評価に応用できることが示唆された。

キーワード: 小核試験法, 紫外線照射, DNA 傷害, β -カロテン, 抗酸化能

DNA の酸化傷害は発ガンをはじめとする種々の疾病に関与するとされている¹⁻³⁾。DNA の酸化傷害を評価することは, これらの疾病の機序を明らかにし予防する意味で重要である。DNA 酸化傷害の測定にはこれまでに主として SCG 法⁴⁾, 8-OHdG 法⁵⁾ などが用いられているが, Fenech⁶⁾ によって確立された小核試験法は, 動物やヒトの幼若赤血球やリンパ球に生じるわずかな酸化傷害を増幅させて検出できるため, 栄養因子の有効性や安全性の検証に多く応用されている⁷⁻¹⁰⁾。この方法では, 細胞分裂時に何かしらの刺激や損傷により生じた小核の出現頻度を顕微鏡下で数え染色体損傷度として評価するが, その際, 酸化傷害を増幅させるために X 線や酸化用の薬剤, たとえば過酸化水素や *tert*-ブチルヒドロペルオキシドなどを用いる。しかし, X 線装置は高価であり汎用性に乏しく, また, 薬剤は濃度や溶剤の調整や操作が煩雑になる欠点がある。一方, 紫外線による増幅法であれば, 装置も安価で簡便であり, 薬剤を用いた時のような細胞の wash out 作業等の手間が省けるという利点がある。Fenech & Neville は 1992 年に酸化損傷の増幅因子として紫外線 UVC (254 nm) を用いた研究を行っている¹¹⁾。しかしながら, 彼らが用いた UVC は波長が短く, 細胞が死滅しやすいため, 照射時間のレンジの調節が難しい。そこで, 本研究では, UVC よりも波長が長く, 細胞毒性

の少ない UVA (315-400 nm) と UVB (280-315 nm) を用いた小核試験法を確立することを第一の目的とした。

これまでに X 線照射による小核試験法にて, 血中の β -カロテンやカテキンの濃度依存的にヒトリンパ球における小核の出現率が低下することを報告されている¹⁰⁾。紫外線照射によっても同様の結果が得られれば, 抗酸化栄養素などの栄養学的研究への応用も簡便にできるようになる。そこで, 本研究では若年女性における血中の β -カロテン濃度とリンパ球中の小核出現率の関係を観察し, 紫外線照射法による小核試験が栄養学的研究に応用できるかどうかを検討することを第二の目的とした。

方 法

1. 紫外線照射による DNA 酸化傷害の定量化

1.1 WIL-2NS 細胞を用いた小核試験法¹¹⁾ WIL-2NS 細胞 (American Type Culture Collection) は実験前日まで 5% FBS (Gibco), 1% 抗生物質 (Gibco), 2 mM L-グルタミン (Sigma) 含有 RPMI1640 培地に 0.3×10^6 個/mL の条件で培養し, 37℃, 5% CO₂ で維持した。実験当日に細胞を HBSS (Gibco) で洗浄後, HBSS 中に 0.5×10^6 個/mL になるように懸濁した。この WIL-2NS 細胞液 950 μL に直接, 紫外線 (EL Lamp, 6 W, UVLM-26 (2UV), 302/365 nm, 100 V (UVP Upland, フナコシ), UVA

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: kimura@takasaki-u.ac.jp)

¹ 高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科 (370-0033 群馬県高崎市中大類町 37-1)

² 新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科 (950-8680 新潟県新潟市東区海老ヶ瀬 471)

³ (独) 国立健康・栄養研究所情報センター健康食品情報プロジェクト (162-8636 東京都新宿区戸山 1-23-1)

365 nm-420 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, UVB 302 nm-300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ を照射した。照射時間は 0, 3, 5, 10, 15, 20 秒 (それぞれ $n=8$) であった。その後、5 分間の遠心を行い、上清を除去し、RPMI1640 培地に再懸濁し、サイトカラシン B を 80 μL 添加し、44 時間培養した。集細胞遠心装置 (サイトスピン SHANDON 社) にてスライド調整を行い、Diff Quick (国際試薬) にて染色を行った。このスライド標本を 1,000 倍の顕微鏡下で 1,000 個の 2 核細胞を数え、そのうち小核を有する細胞の割合を小核出現率として算出し、評価を行った。

1.2 ヒトリンパ球を用いた小核試験法 被験者は 21-38 歳の女性 7 名 (A-G) であった。対象者の早朝空腹時血液を同量の HBSS で希釈し、Ficoll (ファルマシア) に重層し、遠心分離した。分離したリンパ球層を HBSS 中に回収、洗浄し、リンパ球数を 1×10^6 個/mL に調整した。リンパ球液 750 μL に UVB (302 nm, 300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 5 秒) を照射した。その後、RPMI1640 培地に懸濁し、PHA (Gibco) 10 μL を添加し、37°C, CO_2 5% で 44 時間培養した。44 時間後、サイトカラシン B を 56.2 μL 加え、さらに 24 時間培養した。スライド調整、評価法は WIL-2NS 細胞を用いた小核試験法と同様に行った。

2. 紫外線照射によるヒトリンパ球を用いた小核試験法の栄養学的研究への応用

2.1 ヒトリンパ球中 β -カロテン濃度と血中 β -カロテン濃度の関係 成人女性のべ 13 名分の血液を試料とし、リンパ球中、血中それぞれの β -カロテン濃度を測定した。 β -カロテン濃度の測定に際し、リンパ球を解凍し、リンパ球膜を超音波波砕機にて破壊した。ヘキサニンにてカロテノイドを抽出し濃縮乾固後、メタノール:アセトニトリル:クロロホルム (7.5:1.7:0.8) の展開溶媒を用いて HPLC により測定した¹³⁾。リンパ球中の β -カロテン濃度はタンパク質量あたりで算出した。なお、タンパク質量の測定には BCA Protein Assay Kit (Pierce) を用いた。

また、血中 β -カロテン濃度の測定のための血漿は、解凍後、リンパ球中 β -カロテン濃度測定と同様に HPLC により測定を行った。

2.2 栄養学的研究への応用 女子高校生 31 名から、早朝空腹時採血を行い、上記と同様の方法を用い、リンパ球を用いた小核試験法 (UVB302nm-300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 5 秒照射) を行った。同時に血漿中の β -カロテン濃度の測定のため、血漿を -80°C にて保存し、HPLC により先に述べた方法にて測定を行った。

なお、ヒトを対象としたすべての実験はヘルシンキ宣言の精神を遵守し、高崎健康福祉大学倫理委員会より承諾を得て行った。被験者にはあらかじめ、実験の目的、内容、およびそれに伴う危険性を説明し、同意を得た上で実施した。また未成年者には保護者の同意を得た。

3. 統計処理

統計処理には SPSS for Windows ver.13.0 を用いた。そ

れぞれの測定成績は mean $\pm$ SD で表した。2 変量間の相関関係はピアソンの積率相関分析を行い、いずれも有意水準は 5% で検定した。

結 果

1. 紫外線照射による DNA 酸化傷害の定量化

1.1 WIL-2NS 細胞を用いた小核試験法 WIL-2NS 細胞を用いた小核試験法において紫外線による DNA 傷害の結果を Figure 1 に示した。UVA420 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ では、20 秒間照射しても小核の有意な増加は認められなかった。一方、UVB300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の照射は 10 秒以上の照射によって細胞が死滅してしまい、小核出現率を算出することができなかった。そこで UVB の照射時間 0, 3, 5 秒の 3 段階で小核出現率は照射時間依存的に増加するか、また、それぞれの照射時間における小核出現率の再現性を求めた。その結果、小核出現率は 0 秒では $16.3 \pm 1.4\%$, 3 秒では $28.0 \pm 5.8\%$, 5 秒では $41.6 \pm 3.4\%$ であり照射時間依存的に増加した (Figure 1)。また変動係数はそれぞれ、8.4, 20.3, 8.5% であり、5 秒照射では安定した再現性が得られた。

1.2 ヒトリンパ球を用いた小核試験法 小核試験法における紫外線 UVB によるヒトリンパ球中の DNA 傷害の結果を Table 1 に示した。非照射時に小核の出現率が高い者は、3 秒間の UVB 照射と 5 秒間照射で小核の出現率は頭打ちになる傾向がみられるが、WIL-2NS 細胞を用いた小核試験と同様に各被験者で照射時間依存的に小核出現率が増加した。5 秒照射時の小核出現率の増加は非照射時の 1.9-5.3 倍程度であり、WIL-2NS 細胞の 2.55 倍と同等であった。

2. 紫外線照射によるヒトリンパ球を用いた小核試験法の栄養学的研究への応用

2.1 ヒトリンパ球中 β -カロテン濃度と血中 β -カロテ

Figure 1 Correlation between UVB-induced Mned BN cells/1000BN cells (%) and UVB (300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ -s) irradiation time. Values are means $\pm$ SD. Mned BN cell, micronucleated binucleate cells. UVB intensity was 300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ -s.

Table 1 The DNA oxidation damage induced by UVB irradiation in human lymphocyte.

Subject	Mned BN cells/1000BN cells (%)			Pearson product-moment correlation coefficient	Significance level *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$
	UVB 300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$				
	0	3	5		

A	3.6 ± 3.4	4.6 ± 4.1	9.7 ± 3.2	0.885	**
B	3.8 ± 0.9	6.9 ± 4.0	19.1 ± 5.2	0.902	**
C	4.2 ± 2.0	10.7 ± 6.9	22.6 ± 3.2	0.959	***
D	6.0 ± 0.8	28.0 ± 4.8	23.6 ± 2.5	0.825	*
E	6.6 ± 0.9	21.0 ± 3.8	32.4 ± 2.1	0.998	***
F	24.5 ± 4.1	64.6 ± 2.9	62.5 ± 0.8	0.898	**
G	25.7 ± 4.6	60.0 ± 7.0	50.5 ± 8.6	0.779	*

Values are means $\pm$ SD. Mned BN cell, micronucleated binucleate cells.

Figure 2 Correlation between plasma and lymphocyte β -carotene concentrations.

ン濃度の関係 ヒトリンパ球中 β -カロテン濃度と血中 β -カロテン濃度を測定し、両者の関係を Figure 2 に示した。両者の相関係数は $r = 0.821$ ($p < 0.001$) であり、高い相関関係を示した。

2.2 栄養学的研究への応用 UVB 照射後の小核出現率に及ぼす血中 β -カロテン濃度の関係を Figure 3 に示した。 β -カロテン濃度と小核出現率の間には指数関数的な減衰を示す相関関係がみられた ($r = -0.443$ ($p < 0.05$)). なお、非照射時にはこのような結果はみられなかった。

考 察

ヒトリンパ球様細胞である WIL2-NS 細胞を用いた方法は、X 線照射による小核試験法に適した、高感度な活性酸素誘発性の DNA 酸化傷害検出法であることが Umegaki & Fenech¹²⁾ により報告されている。この WIL2-NS 細胞を用いることにより、UVA 照射では酸化傷害を検出することはできなかったが、UVB 照射では 0-5 秒間の照射時間依存的に小核出現率が上昇することを確認した (Figure 1)。UVB が直接 DNA に傷害を引き起こす一方で、UVA は DNA にほとんど吸収されない¹⁴⁾。さらに UVA は細胞内の酸素や光増感剤の存在下において活性

Figure 3 Correlation between plasma β -carotene concentration and UVB-induced Mned BN cells/1000BN cells (%).

Mned BN cell, micronucleated binucleate cells.

酸素により作用し¹⁵⁾、慢性的な DNA 変異には UVA の方が有効であるとされる¹⁴⁾。したがってこの結果は UVA と UVB の波長とエネルギー量の違いや細胞内の光増感剤の有無などにより、DNA 傷害への経路や速度が異なるためと考えられる。

Sugisawa & Umegaki¹⁶⁾ は、WIL2-NS 細胞を用いた小核試験法において、X 線照射に容量依存的な小核出現率を示し、さらに H_2O_2 や *tert*-BuOOH などの酸化剤によって一時的に増幅された微弱な酸化傷害が、二次的に X 線照射を行ったことで、さらに増幅され容易に検出可能であることを報告した。われわれの結果でも WIL2-NS 細胞に対し、X 線と同様に UVB が容量依的に小核出現率を増加させた。紫外線は X 線と比較すると酸化傷害の増幅は微弱である¹¹⁾ が、今回用いた UVB は容易に細胞内に入り込み直接 DNA に損傷を与えることができるため X 線と同様に増幅因子として有用であると思われる。さらに、UVB 照射は 5 秒間と短時間であることから、より簡易な方法といえる。また、WIL2-NS 細胞と同様にヒトリンパ球においても同条件下で UVB 照射時間依的に小核出現率の増加が確認できたことから (Table 1)、栄

養学的研究への応用が十分に期待できる。

次に、UVB 照射により増幅された DNA 損傷度と抗酸化栄養素の酸化抑制作用との関係を証明するためには、細胞内外の抗酸化栄養素濃度と本法を用いた小核出現率との関係を調べる必要があった。われわれは、細胞内に入り込む UVB の特性を考えて、リンパ球中に存在している抗酸化物質 (β -カロテン) の濃度依存的に小核の出現率が抑えられるか否かを明らかにしたいと考えた。これまでに小核試験法を用いて β -カロテンの抗酸化効果を示した報告がある。その手法は、唾液の細胞を用いたもの¹⁷⁾、全血を用いて摂取量との関係を示したもの¹⁸⁾、細胞に γ 線照射後に β -カロテンを添加し、保護作用を検討したもの⁹⁾ など多様であり、リンパ球中の β -カロテン濃度に限らない。しかし、リンパ球中の β -カロテン濃度を測定するためには大量の血液を要する。したがって、本研究では、まず、ヒトの血中 β -カロテン濃度とリンパ球中 β -カロテン濃度の関係を検討した。その結果、血中 β -カロテン濃度とリンパ球中 β -カロテン濃度の間に明らかな相関関係が認められた (Figure 2)。さらに、Figure 3 の結果をみても明かなように、リンパ球中の β -カロテン濃度を反映する血中 β -カロテン濃度と UVB 照射後の小核出現率には有意な負の相関が得られた。したがって、これらの結果から、リンパ球中の β -カロテン濃度が小核出現率の減少に濃度依存的に影響している可能性が示唆された。これまでに 17 名の対象者に対して 1 日 30 mg の β -カロテンサプリメントを 5 日間飲ませ、その前後で血中 β -カロテン濃度が上昇することと、それに伴い X 線照射後の小核の出現率が低下することが報告されている¹⁰⁾。その小核の出現率は血中 β -カロテン濃度依存的であり、 β -カロテンの血中濃度が 0.3–0.8 $\mu\text{mol/L}$ に上昇したときに小核出現率は約 4% の低下がみられている。今回のわれわれの結果では、 β -カロテンの血中濃度が 0.3–0.8 $\mu\text{mol/L}$ に上昇したときには小核の出現率は 9.7% 低下した。先行研究の結果と比較すると倍以上の差が生じた要因としては、使用している試料が全血ではなくリンパ球であったため、より鋭敏に酸化傷害が増幅されたことが考えられる。また、血中 β -カロテン濃度の平均値も先行研究の結果よりも 2 倍近かったことなどから、 β -カロテン濃度の測定法の差異などが考えられる。

ま と め

UVB 照射は DNA 酸化傷害を照射依存的に増幅させることが明らかとなり、小核試験法へ応用できることが明らかとなった。また、UVB 照射によって増幅させた酸化傷害は β -カロテンなどの抗酸化栄養素の評価にも応用できることが証明された。今後は本法による簡便な抗酸化栄養素の評価や DNA 酸化傷害の測定が期待できる。

文 献

- 1) Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P (2002) Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med* **33** : 192–200.
- 2) Cerutti P, Ghosh R, Oya Y, Amstad P (1994) The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect* **102** : 123–9.
- 3) Poulsen HE, Prieme H, Loft S (1998) Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* **7** : 9–16.
- 4) Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* **339** : 37–59.
- 5) Kasai H (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* **387** : 147–63.
- 6) Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* **455** : 81–95.
- 7) Premkumar K, Bowlus CL (2003) Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutat Res* **542** : 99–103.
- 8) Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P, Fenech M (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr* **134** : 48–56.
- 9) Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J (2001) Antioxidant vitamins C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes *in vitro*. *Mutat Res* **491** : 1–7.
- 10) Umegaki K, Ikegami S, Inoue K, Ichikawa T, Kobayashi S, Soeno N, Tomabeche K (1994) Beta-carotene prevents x-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* **59** : 409–12.
- 11) Fenech M, Neville S (1992) Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* **19** : 27–36.
- 12) Umegaki K, Fenech M (2000) Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* **15** : 261–9.
- 13) 木下伊規子, 木村典代, 加藤達雄 (1994) 血清カロテノイド測定法の検討とくにカロテノイド分画の影響について. *臨床検査* **38**, 1087–94.
- 14) Dahle J, Kvam E (2003) Induction of delayed mutations and chromosomal instability in fibroblasts after UVA-, UVB-, and X-radiation. *Cancer Res* **63** : 1464–9.
- 15) Arimoto-Kobayashi S, Ando Y, Horai Y, Okamoto K, Hayatsu H, Lowe JE, Green MH (2002) Mutation, DNA strand cleavage and nitric oxide formation caused by N-nitrosoproline with sunlight: a possible mechanism of UVA carcinogenicity. *Carcinogenesis*

- 23** : 1537–40.
- 16) Sugisawa A, Umegaki K (2002) Detection of oxidant-induced slight chromosomal damage in cells by subsequent exposure to X-rays. *Biol Pharm Bull* **25** : 803–5.
- 17) van Poppel G, Kok FJ, Hermus RJ (1992) Beta-carotene supplementation in smokers reduces the frequency of micronuclei in sputum. *Br J Cancer* **66** : 1164–8.
- 18) Smolková B, Dusinská M, Raslová K, Barancoková M, Kazimírová A, Horská A, Spustová V, Collins A (2004) Folate levels determine effect of antioxidant supplementation on micronuclei in subjects with cardiovascular risk. *Mutagenesis* **19** : 469–76.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **63**: 115–119 (2010)

Research Note

An Ultraviolet Radiation-based Micronucleus Assay for Measurement of DNA Damage and Its Application to Nutrition Research

Naomi Iino,¹ Kaori Endo,² Keizo Umegaki,³ Chieko Oie,¹
and Michiyo Kimura^{*,1}

(Received August 4, 2009 ; Accepted February 27, 2010)

Summary: The aims of this study were to develop an ultraviolet (UV) radiation-based micronucleus assay for measurement of oxidative DNA damage levels and to examine its applicability to nutrition research. WIL2-NS cells were exposed to UV radiation, and the frequency of micronucleated cells was determined as an indicator of oxidative DNA damage. UVA radiation at 420 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ did not significantly increase the number of micronucleated cells, whereas UVB radiation at 300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ for 0–5 s induced an increase in the count of micronucleated cells that was proportional to the period of exposure. Similar results were obtained when WIL2-NS cells were substituted with human lymphocytes, indicating that UVB radiation can be applied to the micronucleus assay. Furthermore, analysis of blood samples collected from female high school students demonstrated a significant negative correlation between the blood β -carotene level and frequency of UV-induced micronucleus formation ($r = -0.443$, $p < 0.05$). These observations suggest that UVB-enhanced oxidative damage can be used for evaluating the antioxidant properties of certain nutrients such as β -carotene.

Key words: CBMN assay, ultraviolet radiation, DNA damage, β -carotene, antioxidant capacity

* Corresponding author (E-mail : kimura@takasaki-u.ac.jp)

¹ Department of Health & Nutrition, Faculty of Health & Welfare, Takasaki University of Health and Welfare, 37-1 Nakaorui, Takasaki, Gunma 370-0033, Japan

² Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life Studies, University of Niigata Prefecture, 471 Ebigase, Higashi, Niigata, Niigata 950-8680, Japan

³ Project for Information Network of Health Food, Information Center, National Institute of Health and Nutrition, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan