

## コメット・アッセイを用いた食肉資源の DNA 損傷抑制効果に関する研究

岩崎 智仁・阿部 茂\*・山本 克博・三輪 操\*\*

Inhibitory effect of the proteolytic hydrolysate of muscle and hot water extracts from organs on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced degradation of DNA

Tomohito IWASAKI, Tsutomu ABE\*, Katsuhiko YAMAMOTO and Misao MIWA\*\*  
(June 2002)

### 緒 言

生物のエネルギー産生過程において、酸素から毒性の強い還元分子種が形成される。これら酸素の分子種は生物にとって“酸化ストレス”となる。酸化ストレス、つまり、酸素の分子種である活性酸素等のラジカルがDNAの塩基や糖を著しく損傷させ、DNA鎖切断を誘発する。損傷が広範にわたれば修復不能となり、細胞は死に至り、生存可能な程度の損傷でも遺伝子転座や染色体異常などが起こるとされている。

最近では医食同源の考えを基に食品中の機能性成分に関する研究が盛んに行われている。例えば、野菜等に含まれるフラボノイドがベンゾ[ $\alpha$ ]ピレンによる肺ガンの発生を抑制すること<sup>22)</sup>や、豆類等に含まれるプロテアーゼインヒビターがTPA (tetradecanoylphorbol 13-acetate)によるマウス皮膚の発ガンプロモーション活性を抑制すること<sup>21)</sup>などが報告されている。

一方、動植物タンパク質より生成するペプチドにもラジカルを捕捉する機能があることが明らかにされつつあり<sup>4,9,19)</sup>、食肉由来ペプチドにもラジカル捕捉機能が期待されている。DNA損傷を検出する高感度な試験法は化学物質の遺伝毒性、発ガン、あるいは老化の研究に有用なものである。今日まで、さまざまな原理に基づいた多くの試験法が開発されており、その中でも、alkaline sucrose gradients sedimentation法<sup>14,23)</sup>は細菌や哺乳類細胞のDNA損傷により生じた1本鎖DNAを測定する標準的な方法

として、長年使われてきた。しかし近年、DNAの切断とアルキル化部位などのアルカリ易溶出部位を、細胞レベルで検出可能な単一細胞ゲル電気泳動法 (Single cell gel electrophoresis: 通称コメット・アッセイ)が開発された<sup>20)</sup>。本研究ではこのコメット・アッセイを用いて、食肉由来ペプチドならびに食肉副生物の熱水抽出物のラジカル捕捉によるDNA損傷抑制効果について検討した。

### 実験材料ならびに方法

#### 試料の調製

#### (1) 牛半腱様筋由来のタンパク質加水分解物

牛半腱様筋由来のタンパク質加水分解物は、8歳齢前後で屠殺後1週間程度の乳用廃用牛から調製した。冷凍保存された半腱様筋は試験時に解凍し、ミキサーにてミンチ状にした。これを50gずつ300mlビーカーに量り取り、0.5% (w/w)となるようにタンパク質分解酵素を加えた後、よく攪拌して、50℃で5時間インキュベートした。用いたタンパク質分解酵素はパパイン (和光純薬)、プロテアーゼS (天野純薬)、アルカラゼ (ノボルディスクイニングストリー)、フレーバーザイム (同)、レンネット (クリスチャンハンセン)、ビオブラーゼSP-10 (ナガセ生化学工業)である。また、プロテアーゼ無添加の試料を meat extract として用いた。

これらに4倍量の熱水を加えた後、電子レンジにて加熱、沸騰させることによりタンパク質分解酵素の活性を完全に失活させ、4℃で一晩放置後にろ過し、ろ液を凍結乾燥した。調製したタンパク質加水

酪農学園大学食品科学科、応用生化学研究室

Department of Food Science, Applied Biochemistry, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

\* 北海道立食品加工研究センター

\* Hokkaido Food Processing Research Center, Ebetsu, Hokkaido, 069-0836, Japan

\*\* 独立行政法人食品総合研究所

\*\* National Food Research Institute, Tsukuba, Ibaragi, 305-8642, Japan

分解物は室温でデシケーター中に保存した。

## (2) 食肉副生物の熱水抽出物

屠殺直後の豚の内臓類(腎臓, 脾臓, 肝臓, 膵臓)ならびに脳に2倍量(w/w)の蒸留水(100℃)を加え, さらに5分間加熱処理を行った。4℃で一晩放置した後, 表層の脂肪を取り除き, 遠心分離(18000 rpm, 30 min)して得られた上清を凍結乾燥して熱水抽出画分とした。試料は使用時までデシケーター中に保存した。

### アミノ酸組成分析とアミノ酸量の測定

凍結乾燥試料を蒸留水に溶解させ, 0.05 mg/ml となるように調整後, 孔径0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過した。これらをアミノ酸分析計(日立 L-8500)を用いてアミノ酸組成の分析を行った。加水分解物試料の場合は, 約15~25 mg の凍結乾燥試料を試験管に精秤し, 6 N HCl を5 ml 加えて120℃で4時間保持して加水分解し, 濃縮乾固した後, 同様の操作を行った。アミノ酸量の測定は TNBS (トリニトロベンゼンスルホン酸)法によって行った。すなわち, 上述した未分解試料ならびに加水分解試料の乾燥粉末を蒸留水に溶解させ, 0.1 mg/ml となるように調整後, 0.1% TNBS 溶液 0.5 ml, 0.01 M 亜硝酸溶液 0.5 ml, 0.15 M ホウ酸カリウム緩衝液を2 ml 加えて混合して37℃で60分間放置した後, 420 nm での吸収を測定し, ロイシンを用いた検量線から, 残存アミノ酸量ならびに総アミノ酸量を算出した。

### Ferric thiocyanate 法による抗酸化活性の測定

牛半腱様筋加水分解物を0.01% (w/w) となるように水に溶解させ, その0.75 ml と0.2 M ナトリウムリン酸緩衝液 0.75 ml ならびに50 mM リノール

酸(99.5%エタノール中) 1.0 ml を試験管(1.0×10.0 cm)中で混合し, ゴム栓をした。反応液は暗所で60℃で保管した。酸化の程度は ferric thiocyanate 法<sup>4)</sup>により7日間経日的に測定し, 加水分解物未添加のコントロールが最大の値を示した4日目の値を1とした相対値で抗酸化活性を示した。

### コメット・アッセイ (単一細胞ゲル電気泳動)

#### (1) 原理<sup>6,15)</sup>

コメット・アッセイは DNA の1本鎖切断部位およびアルカリ易溶出部位を検出するゲル電気泳動を応用した手法である。DNA 損傷処理を行った有核細胞をスライドガラス上のアガロースに包埋し, アルカリ条件下で電気泳動を行うと, 断片化した DNA がそのサイズに依存して泳動され, 「彗星の尾」のように観察される (Fig. 1)。このことから, コメット・アッセイと呼ばれることが多い。「尾」の大きさと DNA 損傷の程度との間に相関関係があると考えられている。

#### (2) 細胞

厚生労働省細胞バンク (JCRB Cell Bank) より分譲されたヒト前骨性白血病細胞である HL-60 細胞株 (JCRB 番号: JCRB0085) を用いた。滅菌済 RPMI 1640 培地 (IWAKI) に非働化処理済み牛胎児血清 (FBS; SIGMA) を15%となるように添加したものを培養液として用いた。細胞は, 径100 mm シャーレに  $1.5\sim 2.0 \times 10^6$  cells/ml に達した HL-60 細胞を15% FBS+RPMI 1640 と1:10になるように調整し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内に37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 湿潤下の条件で静置して培養した。HL-60 細胞は4日後に  $1.5\sim 2.0 \times 10^6$  cells/ml に達したことか

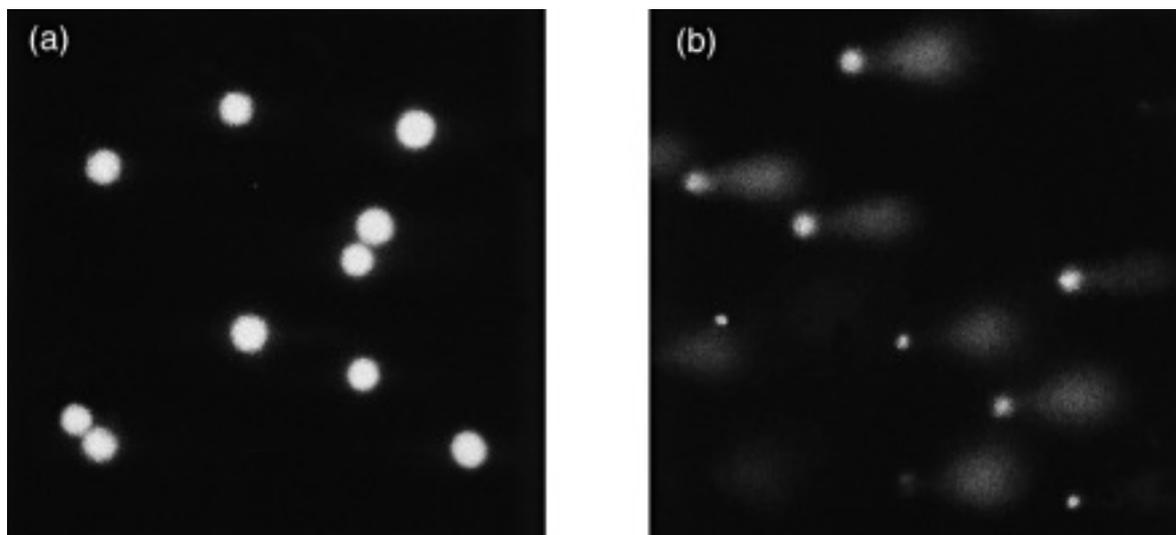


Fig. 1 Fluorescence images of undamaged DNA (a) and damaged DNA (b).

ら3日毎に継代を行った。これらの操作は他の一般細菌からの汚染を防ぐために、全てクリーンベンチ内で行った。また、コメット・アッセイに使用したHL-60は対数増殖期にあるものを用いた。

### (3) ラジカル発生剤の濃度

ラジカル発生剤として $H_2O_2$ を用いた。条件設定のための予備試験として、DNA損傷の $H_2O_2$ 濃度依存性と暴露時間依存性を検討したところ、ほぼ全ての細胞がコメット像を呈する濃度は15 ppm、暴露時間は1時間であった。濃度ならびに時間が上記の条件を超えるとDNAの断片化が過度に進行し、コメット像が得られなかった。そこで、本研究では15 ppm  $H_2O_2$  添加群をpositive controlとし、 $H_2O_2$  添加後に1時間培養することとした。

### (4) 試験方法

凍結乾燥試料を必要に応じてRPMI 1640を用いて希釈して、試料濃度0.02~2% (w/w)、30 ppm  $H_2O_2$  となるように溶液を作成し、ろ過滅菌した。これを96穴蓋付プレートに100  $\mu$ lずつ添加して、 $CO_2$  インキュベーター内に37°C、5% $CO_2$ 、湿潤下の条件で1時間静置した。その後、 $2.0 \times 10^6$  cells/ml程度のHL-60を等量加えて、ピペッティングにより緩やかに混和した後、同条件の $CO_2$  インキュベーター内で1時間インキュベートした。このときの試料濃度は0.01~0.1%、 $H_2O_2$  濃度は15 ppm、細胞密度は $1.0 \times 10^6$  cells/mlである。その後、各細胞懸濁液の一部を採取し、すみやかにコメット・アッセイに供した。

### (5) 細胞スライドの作成と電気泳動

あらかじめメタノール(99.7%)で洗浄し乾燥させた全面フロスト処理済みスライドガラス(24×50 mm)に、100  $\mu$ lの0.75%通常融点アガロース(BioRad)を全面に延ばし、50°Cのインキュベーター内で乾燥させた。前処理を施したスライドガラスに100  $\mu$ lの0.75%通常融点アガロースを載せ、気泡が混入しないようにポリエチレンまたはポリプロピレン製のシートを被せ、アガロースの様な薄層を作成し、これを4°Cの金属板上で冷却して固化させ第1層目とした。冷却時間は15分以上とした。40°Cに保った1%低融点アガロース(BioRad)と採取した細胞懸濁液を等量混合し、シートを取り除いた第1層目のアガロースゲルの上に75  $\mu$ l載せて再びシートを被せて第2層目とした。冷却は第1層目と同様に行った。次いでシートをはずした第2層目のゲル上の水分をドライヤーを用いて蒸発させた後に、0.75%通常融点アガロース100  $\mu$ lを滴下してシートを被せて均一の厚さとして固化させた。冷却

は第1層目と同様に行った。作成した細胞スライドのゲルを1~1.5 mmカットして、スライドガラスの内側に収まるようにし、あらかじめ4°Cに冷却した細胞溶解液(2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-2 Na, 1% sodium lauroyl sarcosinate, 10 mM Tris, pH 10.0, 1% Triton X-100, 10% DMSO)に細胞スライドを浸し、4°Cの冷蔵庫内で1時間放置して細胞の溶解を行った。4°Cの電気泳動溶液(300 mM NaOH, 1 mM EDTA-2 Na, pH 13.5)をサブマリン型電気泳動層に槽底から約6 mmの深さになるように注ぎ、これに細胞溶解液から取り出した細胞スライドを浸した。4°Cの冷却水を循環させ30分間放置してDNAを巻き戻し、続いて200 mAの定電流、20 Vで30分間の電気泳動を行った。なお、泳動中の電圧の変化を補正するために泳動bufferを加えることにより電圧を一定に保持した。泳動終了後、細胞スライドを中性緩衝液(0.4 M Tris-HCl, pH 7.4)を入れた染色バットに泳動後の細胞スライドを浸して中和処理を行った。この操作を5分間、3回行った。

### (6) 染色および検鏡

0.1 M Tris-EDTA buffer (pH 8.0) を用いて10,000倍に希釈したSYBR green I DNA Stains (BMA) の入った染色バットに、中和した細胞スライドを浸して15分間染色した。染色後の細胞スライドは蛍光顕微鏡(480 nm 励起フィルター, 535 nm バリアフィルター装着)により、目視による観察とデジタルカメラによる画像取得を行った。蛍光顕微鏡下で観察されたDNA未損傷の像をFig. 1aに、損傷したDNAの像(コメット像)をFig. 1bに示した。

### (7) DNA損傷度の検定

本研究での検出結果はコメット率から算出したコメット指数と画像解析ソフト(IDL 5.4, RESEARCH SYSTEMS)を用いて解析したtail momentにて示した。以下にそれぞれの算出法を示した。

#### ・コメット指数(Comet index)

検鏡した細胞の総数に対する損傷細胞の割合をコメット率とした。15 ppm  $H_2O_2$  を添加したときものをpositive controlとして、そのコメット率をA、未処理の細胞をnegative controlとして、そのコメット率をBとし、加水分解物あるいは熱水抽出物と15 ppm  $H_2O_2$  を添加したときのコメット率をCとして以下の式によってコメット指数を算出した。

$$\text{コメット指数} = (A - C) / (A - B)$$

なお、一枚の細胞スライドあたりおよそ 100 個の細胞をカウントし、3~4 枚のスライドを観察して、合計で 300~400 の細胞を調べた。

#### ・ Tail moment

スライドを蛍光顕微鏡下で観察し、デジタルカメラで撮影した画像を解析ソフト (IDL 5.4) にて解析した。Tail moment は DNA の 1 本鎖の切断を表すパラメーターであり<sup>16)</sup>、下記の式によって算出されたものである。

$$\text{Tail moment} = \text{Tail percent} \times (\text{Head center と Tail center 間の距離}) / 100$$

ここで、Tail percent は全体の蛍光強度値の和に対する tail 部分の蛍光強度値の比率を示し、Head center は全体像中で最も蛍光強度が高くなる位置、Tail center とは、全体像中の tail 部分で左右の蛍光強度の総和が等しくなる位置を示している。なお、解析には 250 個以上の細胞を用いた。

#### 細胞生存率の測定

コメット・アッセイに供した細胞懸濁液の一部を採取し、PBS に溶解させた 0.4% (w/v) のトリパンブルー溶液と混合して、改良型ノイバウエル血球計算盤を用い、同一区画内の全細胞数と染色されていない細胞数をカウントし、以下の式にて生存率を算出した。なお、算出値は同様の操作を 3 回繰返した平均値で示した。

$$\text{生存率 (\%)} = \text{染色されていない細胞数} / \text{全細胞数} \times 100$$

#### 増殖率 (Growth rate) の測定

コメット・アッセイに供した細胞懸濁液の一部を採取して、15%FBS を含む RPMI 1640 を 1:10 とするよう混合し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿潤下の条件で静置して 4 日間培養した。その後、改良型ノイバウエル血球計算盤を用いて細胞数をカウントし、次式によって増殖率を算出した。なお、算出値は同様の操作を 3 回繰返した平均値で示した。

$$T = \text{4 日間培養後の処理細胞の細胞数} / \text{培養開始前の処理細胞の細胞数}$$

$$C = \text{4 日間培養後の未処理細胞の細胞数} / \text{培養開始前の未処理細胞の細胞数}$$

$$\text{増殖率 (\%)} = T / C \times 100$$

## 結果と考察

### 1. 牛半腱様筋由来のタンパク質加水分解物

牛半腱様筋の加水分解物中の遊離アミノ酸とペプチド量をアミノ酸分析計の結果から算出し、乾燥物中の重量割合 (%) として Fig. 2 に示した。各試料中に含まれるペプチドの割合はパパイ、ビオブラーゼ SP-10、プロテアーゼ S ならびにアルカラーゼで処理した場合、それぞれ 70~75% がペプチド成分であり、レンネット処理では 55%、フレーバーザイム処理では 33% がペプチド成分であった。また、プロテアーゼ未添加の場合 (meat extract) では 22% がペプチド成分であった。

Ferric thiocyanate 法で牛半腱様筋由来の酵素加水分解物の酸化活性を測定し、加水分解物未添加の control が最も高い酸化値を示した 4 日目の値を 1 とした相対値で酸化活性を表した (Fig. 3)。SP-10、プロテアーゼ S、フレーバーザイム、レンネット、ならびにアルカラーゼ処理分解物添加試料の酸化活性は、0.1~0.16 であり、リノール酸の自動酸化を 80% 以上抑制した。パパイ処理分解物添加試料は、0.61 となり、最も低い酸化活性であった。

プロテアーゼ分解物を 0.1 または 1% 添加した場合の DNA 損傷抑制効果を Fig. 4 に示した。なお、0.01% の添加濃度では、全ての試料において DNA 損傷抑制効果は認められなかった。最も DNA 損傷

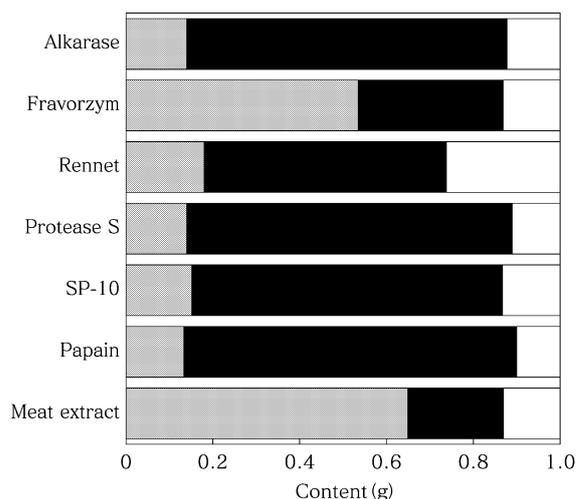
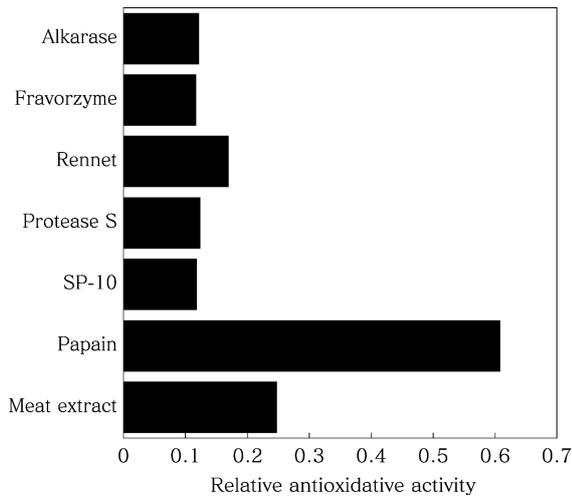
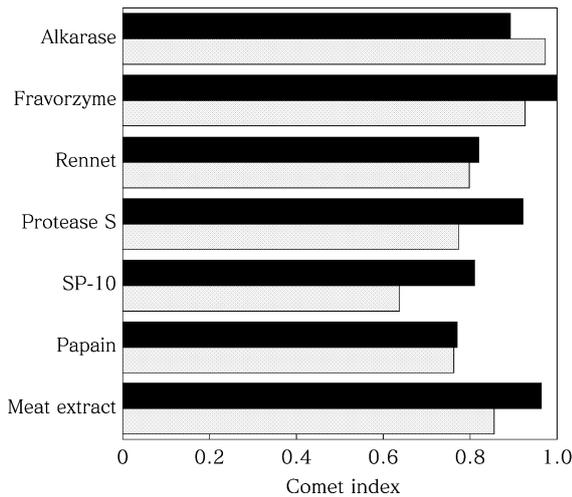


Fig. 2 The contents of amino acids and peptides in one gram of proteolytic hydrolysates of bovine semitendinosus muscle. The result was calculated from amino acid analysis. Dotted, closed and open bars indicate amino acids, peptides, and others, respectively.



**Fig. 3** Antioxidative activities of proteolytic hydrolysates of bovine semitendinosus muscle. The activity was measured by the ferric thiocyanate method.



**Fig. 4** Comet index of the HL-60 cells exposed to 15 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of hydrolysate of bovine semitendinosus muscle. Data were expressed as the mean of three to four experiments. Open and closed bars indicate 0.1 and 1% hydrolysate, respectively.

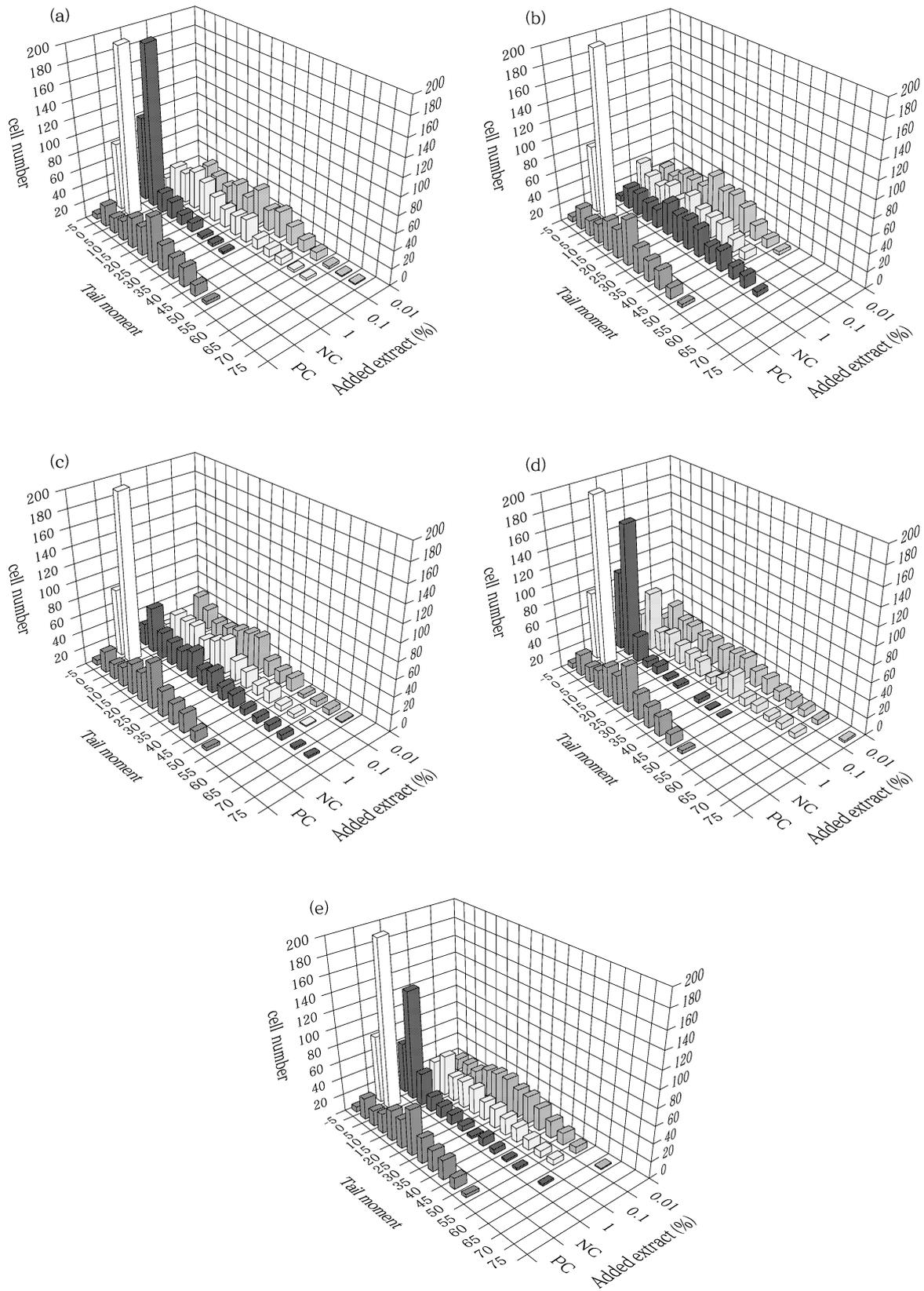
抑制効果が高かったのは、バイオプラーゼ SP-10 処理試料を 0.1% 添加したときであり、コメット指数は 0.64 であった。パパイン、レンネット、ならびにプロテアーゼ S 処理試料は、それぞれ 0.76, 0.8, 0.77 のコメット指数を示した。この結果は、ferric thiocyanate 法での抗酸化能の結果とは対応しなかった。すなわち、抗酸化活性は、SP-10, プロテアーゼ S, フレーバーザイム, レンネット, ならびにアルカラーゼ分解産物で同程度であったのに対し、パ

パイン処理試料はそれらの 6 分の 1 の活性しか示さなかった。しかしながら、コメット・アッセイでは、0.01% の添加濃度では DNA 損傷抑制は認められず、0.1% のパパイン、レンネットならびにプロテアーゼ S 処理分解産物添加試料で同程度の DNA 損傷抑制効果を示していた (Fig. 4)。この結果は、分解産物試料の抗酸化活性と、ラジカル捕捉による DNA 損傷抑制効果とは必ずしも一致しないことを意味している。また、分解産物を 1% 添加した場合、コメット・アッセイでは DNA の損傷が促進される傾向が認められた。特にバイオプラーゼ SP-10 ならびにプロテアーゼ S 処理分解産物を添加した場合には、コメット指数がそれぞれ 0.8, 0.92 となり、DNA 損傷の促進が顕著であった。データは示していないが、プロテアーゼ処理分解産物のみを 1% 添加しても分解産物自体の DNA 損傷作用は認められなかったことから、試料中に存在する成分が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応してヒドロキシラジカル等のラジカル生成量が増加して、DNA の損傷が促進された可能性が考えられた。このような試料の細胞毒性的な知見は理化学的抗酸化活性測定法では検出できないことから、コメット・アッセイの抗酸化試験としての優位性が示唆された。

Meat extract を 0.1% 添加したときのコメット指数は 0.86 であり、DNA 損傷抑制効果が認められた (Fig. 4) が、バイオプラーゼ SP-10 処理試料はそれ以上の抑制効果を示し、このプロテアーゼによって生成したペプチド成分がラジカル捕捉能を有していると考えられた。食肉由来ペプチドの抗酸化活性は、これまでに豚筋原線維タンパク質の加水分解物にその存在が確認されている<sup>24)</sup>ものの、その他の食用タンパク質に比べて検索が遅れている。本研究は食肉由来の新規抗酸化ペプチドの存在の可能性を示したものである。

## 2. 食肉副生物由来の熱水抽出物

脳、すい臓、肝臓、腎臓ならびに脾臓からの熱水抽出成分の DNA 損傷抑制効果を tail moment を指標に Fig. 5 に示した。Tail moment は、DNA の損傷度を示すパラメーターの一つであり<sup>16)</sup>、数値が高くなると損傷が大きいことを意味している。肝臓抽出物を 0.01 ならびに 0.1% 添加することで、濃度依存的に tail moment の低い細胞が多くなり、1% 添加試料では、94.1% の細胞の DNA は未損傷であった (Fig. 5a)。同様に、脾臓抽出物 (Fig. 5d) ならびに脳抽出物 (Fig. 5e) においても、添加濃度に依存して DNA の損傷が抑制されており、1% 添加



**Fig. 5** Distributions of tail moment of the HL-60 cells exposed to 15 ppm of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of hot water extract of hog organs. a; liver, b; pancreas, c; kidney, d; spleen, e; brain. NC and PC stand for negative and positive controls, respectively.

した場合には、それぞれ、87.2、72.5%の細胞でDNAの損傷は認められなかった。一方、すい臓(Fig. 5b)ならびに腎臓の抽出物(Fig. 5c)においては、1%添加してもDNA損傷の抑制効果は認められなかった。

次いで、各熱水抽出成分を15 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下で1%添加したときの細胞の生存率をトリパンブルー色素排除法を用いて測定した(Table 1)。DNA損傷抑制効果の高かった肝臓、脾臓ならびに脳において、それぞれ96.8、86.8ならびに67.9%の生存率を示したが、腎臓およびすい臓ではpositive controlと同様に20%程度の生存率であり、コメット・アッセイでの結果とほぼ一致していた。さらに、処理後の生細胞が正常に増殖できるかどうかを調べるため、同様の処理を行った細胞の一部を採取して4日間培養を行い、増殖率を算出した。その結果、肝臓熱水抽出物を添加した試料のみ17.8%を示し、その他の試料では増殖は認められなかった(Table 2)。この結果から、肝臓熱水抽出物には高いラジカル捕捉能があり、増殖可能な細胞が残存していたと考えられた。

**Table 1.** Effect of hot water extracts of entrails (liver, pancreas, spleen, kidney) and brain on cell viability in the presence of 15ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Sample	Viability
NC	97.66±1.62
PC	19.07±6.07
Liver	96.77±3.03
Pancreas	23.37±6.92
Kidney	22.23±2.03
Spleen	86.80±14.1
Brain	67.90±8.66

Trypan blue exclusion was used for measurement of cell viability (mean±standard errors, n=3). The concentration of extracts was 1% (w/w). NC and PC stand for negative and positive control (15ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

**Table 2.** Growth rate of water extracts from entrails (liver, pancreas, spleen, kidney) and brain.

Sample	Growth rate (%)
NC	100
PC	N.D.
Liver	17.8
Pancreas	N.D.
Kidney	N.D.
Spleen	N.D.
Brain	N.D.

N.D.; not detectable.

肝臓、脾臓ならびに脳熱水抽出物中のDNA損傷抑制効果がどのような物質に由来しているかを調べるために、抗酸化活性があるとされるタウリン<sup>8)</sup>ならびにカルノシン<sup>2,3)</sup>の抽出物中での含有量を比較した(Table 3)。肝臓抽出物と腎臓抽出物中でのカルノシンならびにタウリン含量は類似していたが、腎臓抽出物にはDNA損傷抑制効果は認められなかった。また、脳の抽出物にはDNA損傷抑制効果が認められたにもかかわらず、カルノシンは含有されていなかった。このことから、本研究で用いた試料のDNA損傷抑制効果は熱水抽出物中のタウリンやカルノシン含量には依存していないと判断した。結果は図示していないが、試料中に比較的多く存在していたアミノ酸(アラニン、グルタミン、ロイシン、グリシン)や核酸関連物質(ATP、AMP、IMP)についても、DNA損傷抑制効果を検討したが、その効果を確認できず、本研究ではDNA損傷抑制効果を示す物質の同定はできなかった。しかしながら、肝臓と脾臓ならびに脳の熱水抽出物には、ラジカル捕捉によるDNAの損傷抑制効果があり、食肉副生物の機能性食品としての利用の可能性が示唆された。

コメット・アッセイを用いた食品成分のDNA損傷抑制効果についての報告は、これまでにビタミン類<sup>12,13)</sup>やフラボノイド類<sup>1)</sup>についてなされており、その測定手法が有効であるとされている。本研究においても、コメット・アッセイは食肉資源のDNA損傷抑制効果の測定に有効であることが示された。

### 3. 抗酸化試験へのコメット・アッセイの適用の可能性

本研究で用いたヒト前骨性白血病細胞であるHL-60細胞株によるコメット・アッセイでは、ラジカル発生剤として用いたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度ならびにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との暴露時間を検討し、最も確実に試料のDNA損傷抑制効果が確認できる条件として、15 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、暴露時間を1時間という条件を採用した。コメット・アッセイを用いることにより、Ferric thiocyanate法などの理化学的抗酸化活性試験とは

**Table 3.** Carnosine and taurine contents (mg/g dry weight) in the entrails and brain of hog.

Sample	Carnosine	Taurine
Liver	0.687	29.46
Pancreas	N.D.	5.91
Kidney	0.280	30.66
Spleen	0.150	25.11
Brain	N.D.	6.21

N.D.; not detectable.

異なる指標で試料の抗酸化活性の測定が可能になり、理化学的抗酸化試験では得られない試料の細胞毒性についての知見が得られた。しかし、異なる細胞株やラジカル発生剤を用いる場合には、その度に最適な条件を検討する必要があると考えられた。また、本研究での実験条件は Singh ら<sup>20)</sup>の原法に類似しているため、ラジカルによる直接的な DNA 鎖切断に加えて、アルカリ易溶出部位や DNA 切断修復部位なども一様に検出されていることに留意しなければならない。また、近年の変法では DNA の 2 本鎖切断の検出<sup>17)</sup>や修復酵素の添加などにより特定種類の DNA 損傷のみを検出することが可能<sup>5)</sup>になっており、より精密な検査手法としてこれらの方法の適用の可能性が検討されている。コメット・アッセイが抱える大きな問題は、研究者によってその手法や細胞種が多岐にわたっており<sup>7,10,18)</sup>、個々の研究の結果を単純には比較できないことである。また、操作面においては、細胞スライドの作成に習熟を要するほか、細胞溶解や電気泳動の際の温度などによっては擬陽性を示す場合があり、留意すべき点が少なくない。さらに画像解析においては、個々の細胞の損傷の程度を 1 個単位で測定する必要があるため解析に相当の時間を要することも問題点の一つにあげられる。

以上のような課題点があるものの、微小な DNA 損傷の差異を検出できるコメット・アッセイは、ラジカルによる DNA 損傷を指標として試料の抗酸化能を測定できる有力な測定法となると考えられた。

## 要 約

廃用乳用牛と食肉副生物として豚の内臓ならびに脳の有効利用のため、牛半腱様筋の酵素加水分解物ならびに食肉副生物の熱水抽出物のラジカル捕捉による DNA 損傷抑制効果を調べた。牛半腱様筋の加水分解物ではバイオプレーゼ SP-10 で処理した加水分解物を 0.1% 添加した時に最も高い DNA 損傷抑制効果があり、添加濃度が高くなると逆に DNA 損傷を促進する傾向が認められた。肝臓、脾臓、脳の熱水抽出物を 1% 添加すると、高い DNA 損傷抑制効果が観察されたが、それらの中でも、最も高い DNA 損傷抑制効果を示したのは肝臓の熱水抽出成分であった。本研究により、牛肉のプロテアーゼ分解物ではバイオプレーゼ SP-10 処理試料に、また、内臓類の熱水抽出物では肝臓抽出物に高い DNA 損傷抑制効果が確認され、食肉資源の機能性食品としての利用の可能性が示唆された。また、コメット・アッセイは抗酸化活性測定法として有効であることが示

された。

## 謝 辞

本研究は 2001 年度酪農学園大学・酪農学園短期大学部共同研究の助成(採択 No. 3)を受けたものである。

## 参 考 文 献

- 1) Anderson, D. A., A.Y. Dhawan, C.J. Ioannides and J. Webb. Effect of antioxidant flavonoids and a food mutagen on lymphocytes of a Thalassemia Patient without chelation therapy in the comet assay. 2001. *Teratogenesis Carcinog Mutagen*, 21: 165-174.
- 2) Chan, W. K. M., E.A. Decker, C.K. Chow and G.A. Boissonneault. Effect of dietary carnosine on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid oxidation in rat skeletal muscle. 1994. *Lipids*, 29: 461-466.
- 3) Chan, W. K. M., E.A. Decker, J.B. Lee and D. A. Butterfield. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. 1994. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1407-1410.
- 4) Chen, H. M., K. Muramoto, F. Yamauchi and K. Nokihara. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. 1996. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2619-2623.
- 5) Collins, A. R., S.J. Duthie and V.L. Dobson. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. 1993. *Carcinogenesis*, 14: 1733-1735.
- 6) 平井収, R.R. Tice, 細胞レベルでの高感度な DNA 損傷検出法. 1994. *変異原性試験*, 3, 1-11.
- 7) Jalosynski, P., M. Kujawski, M. Wasowic, R. Szulc and S. Krzysztow. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. 1999. *Mutation Res.*, 439: 199-206.
- 8) Keys, S. A. and W.F. Zimmerman. Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. 1999. *Exp. Eye Res.*, 68. 693-702.

- 9) Kim, S. K., Y.T. Kim, H.G. Byun, K.S. Nam, D.S. Joo, and F. Shahidi. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelation hydrolysate of alaska pollack skin. 2001. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1984-1989.
- 10) Kindelskii, A. L., and H.R. Petty. Ultrasensitive detection of hydrogen peroxide-mediated DNA damage after alkaline single cell gel electrophoresis using occultation microscopy and TUNEL labeling. 1999. *Mutation Res.*, 426: 11-22.
- 11) Klein, A., A.G. Kessel, G. Grosveld, C.R. Bartram, A. Hagemeyer, D. Bootsma, N.K. Spurr, N. Heisterkamp, J. Groffen and J.R. Stephenson. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. 1982. *Nature*, 300: 765-767.
- 12) Konopacka, M., M. Widel and J.R. Wolny. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. 1998. *Mutation Res.*, 417: 85-94.
- 13) Lehmann, J., D. Pollet, S. Peker., V. Steinkraus and U. Hoppe. Kinetics of DNA strand breaks and protection by antioxidants in UVA- or UVB-irradiated HaCaT keratinocytes using the single cell gel electrophoresis assay. 1998. *Mutation Res.*, 407: 97-108.
- 14) Lett, J. T., E.S. Klucis and C. Sun. On the size of the DNA in the mammalian chromosome. Structural subunits. 1970. *Biophys. J.*, 10: 277-292
- 15) Mckelvey-Martin, V. J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobe, M.P. Demeo and A.R. Collins. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay). 1993. *Mutation Res.*, 288: 47-63.
- 16) Olive, P. L., J.P. Banath and R.E. Durand. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. 1990. *Radiat. Res.*, 122: 86-94.
- 17) Olive, P. L., J.P. Banath and H.S. MacPhail. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. 1994. *Cancer Res.*, 54: 3939-3946.
- 18) Panayiotidis, M. and A. Collins. *Ex vivo* assessment of lymphocyte antioxidant status using comet assay. 1997. *Free Rad. Res.*, 27: 533-537.
- 19) Rival, S. G., C.G. Boerin and H.J. Wichers. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxigenase inhibition. 2001. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 295-302.
- 20) Singh, N. P., M.T. McCoy. R.R. Tice and E. L. Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. 1988. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
- 21) Troll, W., A. Klassen and A. Janoff. Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic inhibitors of proteases. 1970. *Science*, 169: 1211-1213.
- 22) Wattenberg, L. W. and J.L. Leong. Inhibition of the carcinogenic action of benzo(a)pyrene by flavones. 1970. *Cancer Res.*, 30: 1922-1925.
- 23) Wheeler, K. T., J.D. Linn, R. Franklin and E. L. Pautler. Characterization of large mammalian DNA species sedimented in a reorienting zonal rotor. 1975. *Anal. Biochem.*, 64: 329-342.
- 24) 雑賀愛, 西村敏英. 抗酸化活性を有する筋原線維タンパク質由来ペプチドの単離. 2000. 日本畜産学会第97回大会講演要旨, 77.

### Summary

The inhibitory effects of the proteolytic hydrolysate of bovine semitendinosus muscle and hot water extracts from pig organs on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced degradation of DNA were studied. The hot water extracts were obtained from liver, pancreas, spleen, kidney, and brain. The biopraser SP-10-treated hydrolysate at 0.1% reduced DNA damage to HL60 treated with 15ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the comet index was 0.64. On the other hand, treatment with 1% hydrolysate promoted DNA strand breaks, and the comet index at this value was 1.25-fold higher than it was at 0.1%. A significant reduction of DNA damage of HL60 exposed to 15ppm H<sub>2</sub>

O<sub>2</sub> was observed at 1% of the hot water extract from entrails (liver and spleen) as well as brain. The cell viability and growth rate of HL-60 after exposure to 15ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of 1% liver extract were higher than they were with the other samples. These results indicate that the bioprase SP-10-treated hydrolysate of semitendinosus muscle and liver extract had high antioxidative activity.

This study shows that meat resources have potential as functional foods, and that the comet assay is a useful method for measuring antioxidative activity.