

再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部新規試験法評価室

小島 肇夫、新井 晶子、北條 麻紀

【Objective】 To evaluate a risk assessment of genotoxicity when human skin is affected by chemicals, we tried to perform a Comet assay using a 3-dimensional human epidermal model (LabCyte EPI-MODEL, Japan).

【Materials & Methods】 Mitomycin C, methylmethanesulfonate (MMS) and 4-NQO (4-Nitroquinoline 1-Oxide) were utilized as test chemicals. Each test chemical solution was applied directly to the surface of the models and treated for 4 hours, then washed off and incubated for 20 hours after the treatment and maximal dosage was calculated according to the cytotoxicity. As to the Comet assay, each test chemical solution refer to the cytotoxicity was applied to them and treated for 4hr. Cells were detached by Liberase solution (Roche) or Trypsin solution (GIBCO), and an adequate cell suspension was obtained.

【Results】 More single cells could be efficiently retrieved using Trypsin solution, especially with treatment for 25min, than using Liberase solution. Comet signals mediated by Mitomycin C (150 μ M<) and 4-NQO were shown by our protocol. However, those by MMS were not clear response.

【Discussion】 We established a practical, rapid and easy Comet assay protocol using a 3-dimensional human epidermal model. To define the difference in genotoxical action between the epidermal model and *in vivo*, it is necessary to perform additional researches for minimal dosage of unknown chemicals that show genotoxicity to the human epidermis.

1. 緒言

安全性試験の中でも大きな比重を占める遺伝毒性試験には、遺伝子突然変異を評価する微生物を用いるエイムス試験や哺乳類の培養細胞を用いるマウスリンフォーマアッセイがある。また、染色体突然変異の評価には、分裂中期の染色体構造を観察する哺乳類の培養細胞や実験動物を用いる染色体異常試験や小核試験がある。これらの試験の中から、医薬品の安全性評価には、微生物を用いる復帰突然変異試験、哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験やマウスリンフォーマ試験ならびにげっ歯類を用いる小核試験の三試験が必須と定められている¹⁾。

一方、医薬部外品の有効成分又は添加剤については、遺伝子突然変異および染色体異常の有無の確認を目的とした微生物および哺乳類の培養細胞を用いる *in vitro* 試験が求められる。ただし、これらの試験で遺伝毒性が疑われた場合には、各々の目的に応じ動物の個体を用いる *in vivo* 試験の提出が求められるとされている^{2,3)}。しかし、*in vitro* 試験の中で特に、哺乳類の培養細胞を用いるマウスリンフォーマ試験および染色体異常試験は発がん性試験と比較して疑陽性が検出されやすい⁴⁾。今後、EUにおける化粧品規制第7次改正により⁵⁾、動物実験代替法が開発された

試験法は2009年以降、化粧品原料の開発に実験動物を用いた小核試験が利用できなくなる。その場合、多数検出される *in vitro* 試験の結果を受け入れ、新成分の開発を断念するならともかく、その検証を行うには、より実験動物に近いモデルを用いてリスクを評価する必要がある。

そこで、より実験動物に近いモデルとして化粧品の安全性を考慮した場合、成分が皮膚に直接暴露した際の遺伝毒性の検出を、3次元培養表皮モデルを用いて調べられれば、リスクを評価できると考えた。評価系としては、作用機構が明確なコメットアッセイを用いることとした。コメットアッセイとは、培養細胞や動物組織をシングルセルに分散し、アガロースゲルに包埋してアルカリ電気泳動にかけることにより、個々の細胞が受けたDNA初期傷害を検出する手法である。図1に示すように、障害を受けたDNAの電気泳動像によりすい星が流れるように見えることから、コメットアッセイと名づけられた。この試験法では、非分裂細胞に対する遺伝毒性が評価できることや、感受性の異なる細胞が混在する細胞集団でも細胞レベルで評価可能なこと、また、近年では、Honmaら⁶⁾により培養細胞を用いた簡便な *in vitro* コメットアッセイが考案されるなど、



Evaluation of genotoxicity using 3-dimensional human epidermal model

Hajime Kojima, Ph.D.

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Center for Biological Safety and Research National Institute of Health Sciences (NIHS)



図1 細胞に生じたコメット

有用な遺伝毒性試験として注目を集めている。

本研究では、3次元培養ヒト表皮モデルを用いたコメットアッセイの試験法開発を目的として、実験を行った。

2. 材料および方法

2・1 材料

2・1・1 3次元培養表皮モデル

ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) 株式会社が製造販売している3次元培養ヒト表皮モデル LabCyte EPI-MODEL12 または 24 を実験に用いた。図2に示すように、本モデルは表皮構造を呈しており、培養液と合わせキットとなっている。

本キット到着日あるいはその翌日から実験を開始した。

2・1・2 被験物質

マイトマイシンC (和光純薬株式会社)、メチルメタン sulfonate (MMS: 和光純薬株式会社) および 4-ニトロキノリン N オキシド (4-NQO: 和光純薬株式会社) を溶媒に溶解してモデルに供した。

MMC および MMS の溶媒としては蒸留水、4-NQO の溶媒としてはエタノール溶液を用いた。

2・2 試験法

2・2・1 コメットアッセイ基本操作

6 ウェルプレート (Falcon) の各ウェルの中に、キットに付いている培養液を加え、LabCyte EPI-MODEL12 を置いた後、37℃のCO₂ インキュベーター中で1時間培養した。培養後、すぐに酵素処理してセルストレイナー (Falcon) を通して単一細胞を得た。1×10⁶ 細胞/mL に PBS で調整した細胞懸濁液 10 μL を寒天 0.5% 液 80 μL とともに、スライドグラス (マツナミ) にのせ、Lysis 緩衝液中で1時間処理後に電気泳動を行った。電気泳動条件は、pH 13 の泳動液 (4℃) で 15 分放置した後、300 mA/90 V で 15 分間とした。得られた細胞を 70% エタノール溶液で洗浄し、乾燥後、SYBR gold (1 : 10000) で染色し、スライド当たり 100 個観察した。コメットシグナルの検出には、『COMET ASSAY IV (PERCEPTIVE, UK)』という解析ソフトを使用し、% Tail Intensity (コメット部分の蛍光強度 / 1 細胞あたりの DNA 蛍光強度) を求めた。つまり、



図2 Labcyte EPI-MODEL24 の HE 染色

% Tail Intensity の値が高いほど遺伝毒性が強いことになる。

2・2・2 条件検討

2・2・2・1 細胞解離条件の検討

培養皮膚モデルにリベラーゼ (Roche) で 30 分間処理すればコメットを検出できるとの報告がある⁷⁾。

一方、培養皮膚モデルからの小核誘発の検出にはトリプシンが使われている⁸⁾。どちらの条件がラボサイトに適しているのか、リベラーゼ (0.28 Wunch Unit/HBSS) およびトリプシン (0.25%/0.02% EDTA リン酸緩衝液 : PBS) 溶液で 30 ~ 50 分処理後の①得られる細胞数、②解離溶液が細胞に及ぼす遺伝毒性の有無を調べた。

次に、それぞれの解離条件から得られた細胞を用いてコメットアッセイを行い、解離溶液がモデルに及ぼすコメット出現頻度を調べた。

2・2・2・2 溶媒濃度の検討

非水溶性物質の溶媒として用いるエタノールの細胞毒性およびコメットアッセイに及ぼす影響を検討した。細胞毒性試験の条件を 2・3・3 に示す。エタノール溶液の濃度 3、6、12.5 および 25% で 4 時間処理した場合の条件を検討した。

2・2・3 被験物質を用いた細胞毒性の検出

LabCyte EPI-MODEL24 を 37℃ の CO₂ インキュベーター中で 1 時間培養した後、溶媒および被験物質溶液 100 μL を加え、4 時間処理後さらに 20 時間培養した。

マイトマイシンC においては、限界溶解度である 1500 μM を最高濃度として、10 倍希釈系列を調整して細胞毒性を検出した。MMS においては、1800 μM を最高濃度として、10 倍希釈系列を調整した。4-NQO においては、100% エタノールに溶解した 10 mM 溶液をエタノールの最終濃度が 2% になるように加え (最高処理濃度 200 μM)、10 倍希釈系列を調整した。

PBS で LabCyte EPI-MODEL24 を 4 回洗浄し、MTT (sigma) 0.5 mg/mL を含む培養液で 3 時間処理した後、モデルをイソプロパノールで抽出した。溶媒および被験物質の抽出液 0.2 mL を 96 ウェルに移し、OD570 および OD650 における吸光度を測定し、以下の式から細胞生存率を求めた。

$$OD = [570nm \text{ OD}_{\text{被験物質}} - 570nm \text{ OD}_{\text{フランク}}] \\ - [650nm \text{ OD}_{\text{被験物質}} - 650nm \text{ OD}_{\text{フランク}}]$$

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \frac{OD_{\text{被験物質}}}{OD_{\text{溶媒}}} \times 100$$

2・2・4 被験物質を用いたコメットの検出

図3に試験法の概略を示す。LabCyte EPI-MODEL12 に溶媒および被験物質溶液 200 μL ウェルを加え、4 時間処理した後、PBS で 3 回洗浄した。細胞毒性で得られた

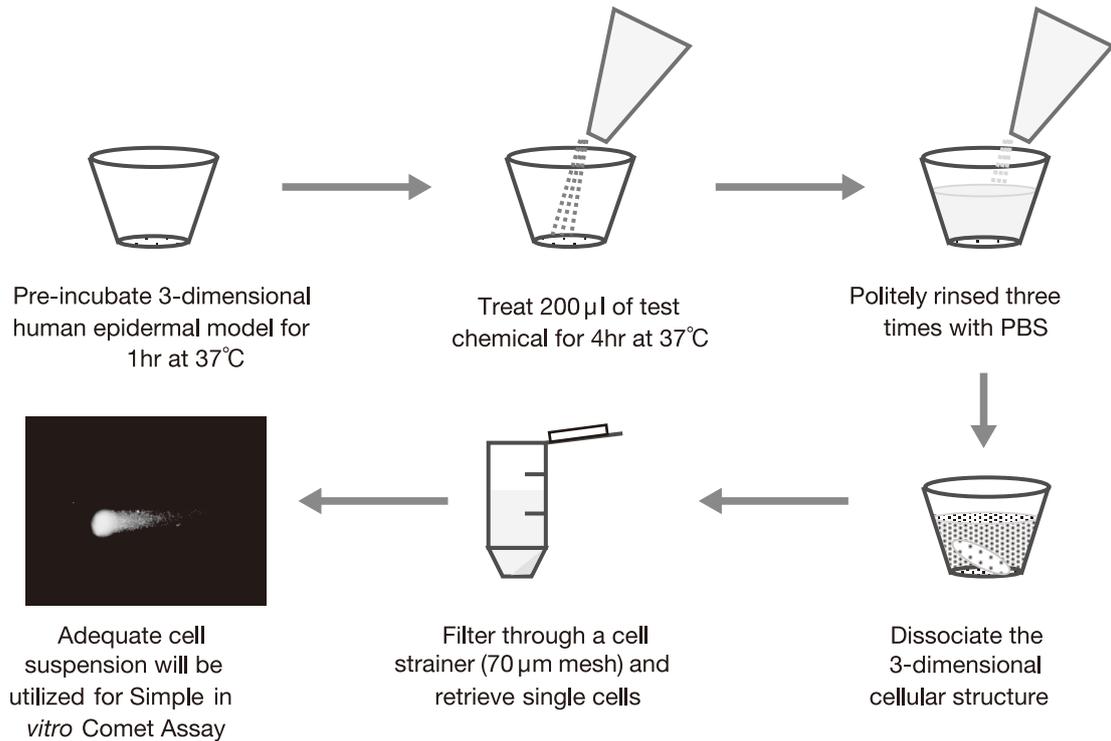


図3 試験方法概略

結果から最高適用濃度を決定し、それぞれ10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを実施した。

3. 結果

3・1 解離条件の検討

それぞれの解離条件でラボサイトを処理し、1ウェルから回収することのできた細胞数をカウントした。その結果、図4に示すように、トリプシン処理によりリベラーゼよりも20倍以上多くの単一細胞を得ることができた。また、トリプシンの処理時間を35分、50分と延長しても得られる細胞数に差はなかった。また、リベラーゼ、トリプシン共に細胞毒性を誘導することはなかった。しかし、図5に示すように、トリプシンの処理時間を50分に延長するとコメットシグナルが検出されるようになった。

以上の結果から、ラボサイトの細胞解離には、トリプシンの短時間（25分）処理が適していることが明らかとなった。

3・2 溶媒濃度の検討

エタノールの細胞毒性は25%まで検出されなかった（データは示していない）。しかし、図6に示すように、12.5%以上の濃度で中央値に変化はないものの、コメットを引き起こす細胞を認めた。以上の結果から、溶媒の最適濃度は6%以下、可能な限り薄くすることを目指し、2%と設定した。

ちなみに、箱ひげ図は、最小値、第1四分位点、中央値、第3四分位点と最大値を示している。母集団は実際には

様々なタイプの確率分布に従うわけだが、箱ひげ図はそのような仮定に関係なく、データの分布を表現している。箱の各部分の間隔から分散や歪みの程度、また外れ値を示している。

3・3 被験物質を用いた細胞毒性の検出

図7～9に3物質の細胞生存率の結果を示した。

図7に示すように、マイトマイシンCの限界溶解度は1500µMであり、4時間暴露後、20時間培養しても細胞毒性は全く検出されなかった。よって、コメットアッセイでは1500µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整して検出することにした。

MMSは180µM以上の濃度において、図8に示すように強い細胞毒性を認めた。よって、18µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを行うこととした。

4-NQOは最高濃度200µMのみにおいて、図9に示すように細胞毒性を認めた。よって、20µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを行うこととした。

3・4 被験物質を用いたコメットの検出試験

コメットアッセイを実施する被験物質の最高処理濃度は、4時間処理後、さらに20時間培養した場合、細胞が50%以上生存している濃度でなければいけないと設定した。その最高濃度から公比10で希釈して得られた3被験物質に

おけるコメットアッセイの結果を求めた。その結果、図10に示すようにマイトマイシンCでは150 μ M以上の濃度で濃度依存的なコメット出現頻度の増加が明らかとなっ

た。一方、図11に示すように、MMSのコメット出現頻度の増加は検出されなかった。また、図12に示すように、4-NQOのコメット出現頻度は20 μ Mでわずかに増加した。

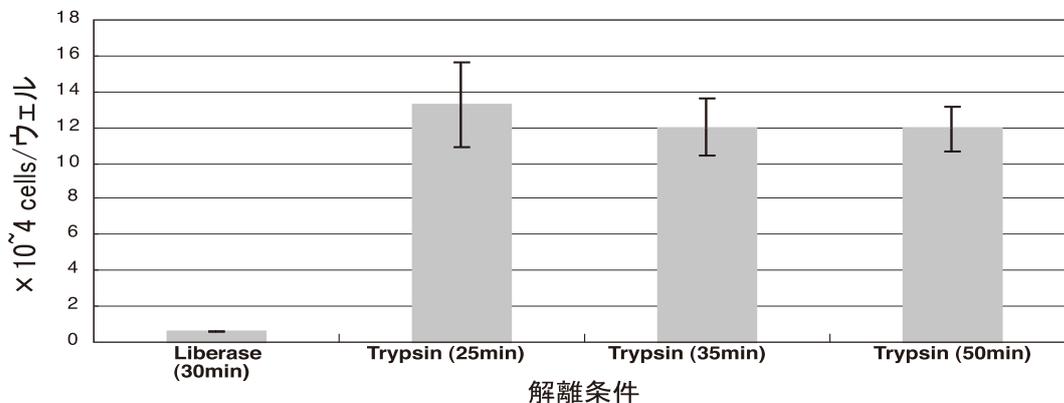


図4 解離条件の検討 酵素処理による単一細胞出現頻度

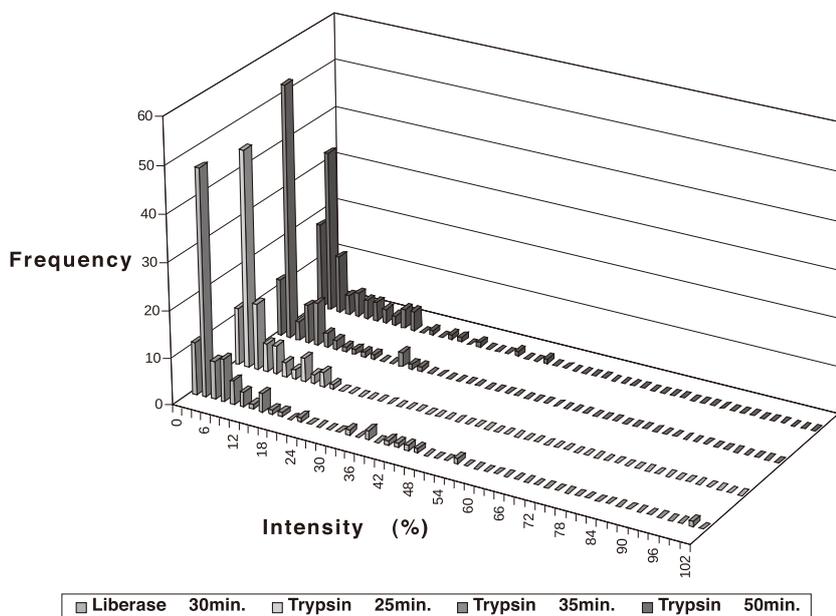


図5 解離条件の検討 酵素処理によるコメット出現頻度

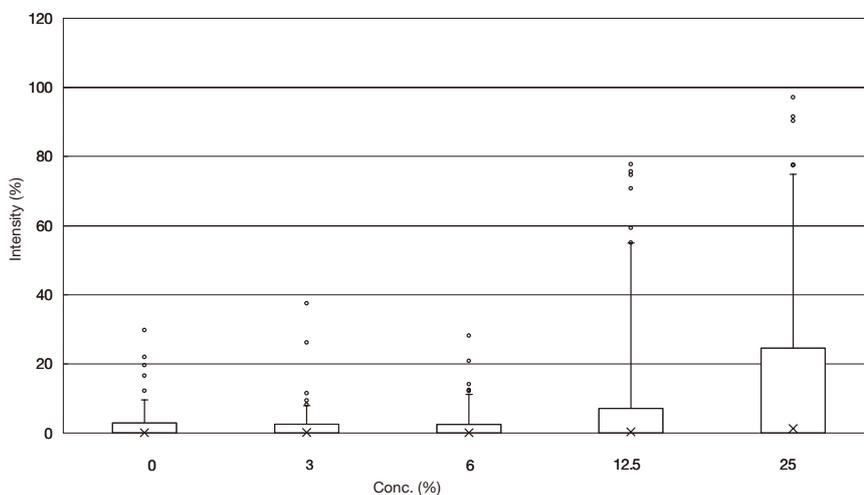


図6 エタノールのコメット出現頻度

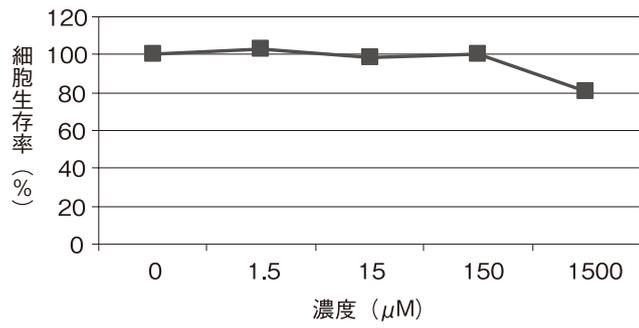


図7 マイトマイシン C の細胞毒性試験結果

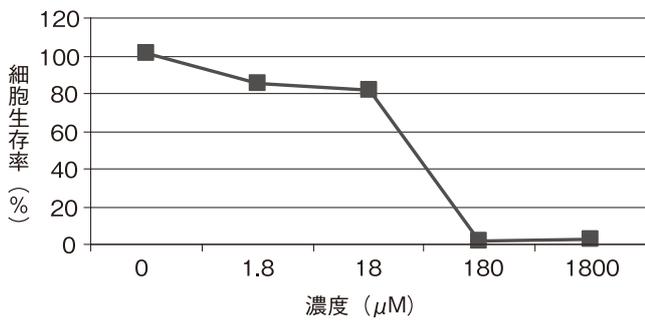


図8 MMS の細胞毒性試験結果

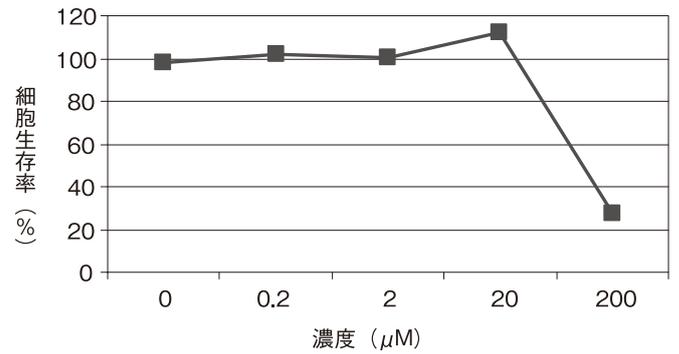


図9 4-NQO の細胞毒性試験結果

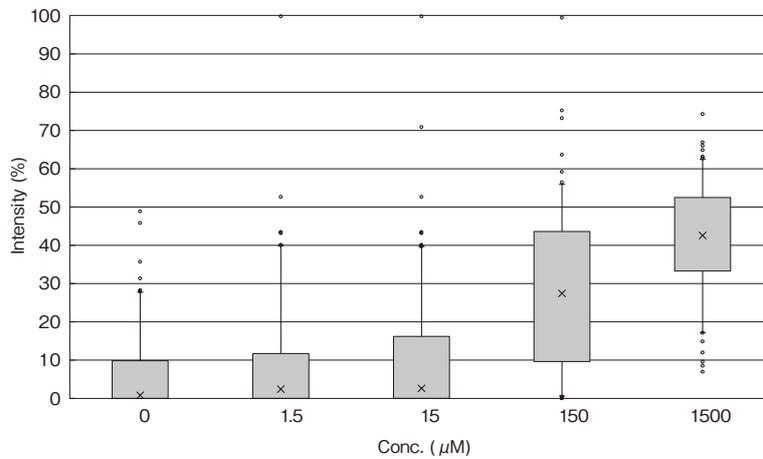


図10 マイトマイシンCによるコメット出現頻度

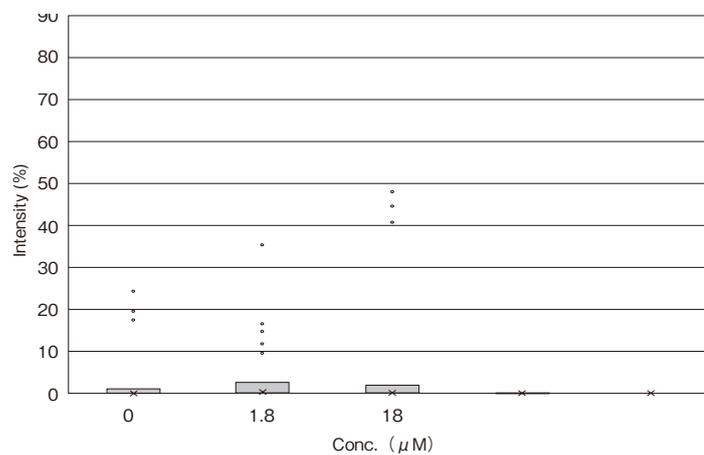


図11 MMS によるコメット出現頻度

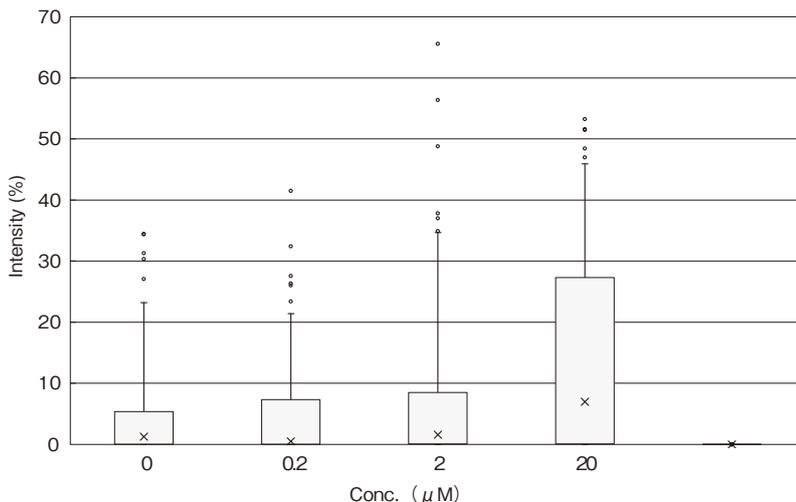


図 12 4-NQO によるコメット出現頻度

4. 考 察

酵素処理条件、最適な溶媒濃度を決定でき、3次元培養表皮モデルを用いたコメットアッセイの試験法開発という目的を達成できた。マイトマイシンCはDNAのクロスリンカーとして遺伝毒性を起し、MMSや4-NQOはDNAをアルキル化して遺伝毒性を引き起こす著名な遺伝毒性物質である。しかし、得られた結果からマイトマイシンCおよび4-NQOはコメット出現頻度を増加させるが、MMSはその強い細胞毒性からコメットを明確に引き起こさないと判断した。

以上の結果から、遺伝毒性物質の検出感度における課題も明らかになった。今後は、マイトマイシンC、MMS、4-NQO以外の遺伝毒性物質についても、同様の検討を行うとともに、小核の検出を行う予定である。得られたデータベースから他の *in vitro* および *in vivo* データと比較して、遺伝毒性に対する感受性にどの程度違いがあるのかを明らかにする予定である。

なお、これらの成果の一部は日本環境変異原学会第36回年次大会(2007年11月、北九州)にて発表した⁹⁾。

(参考文献)

- 1) 医薬品非臨床試験研究会監修(2002) 医薬品非臨床試験ガイドライン解説、薬事日報社
- 2) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック2008、薬事日報社
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課(2006) 医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集(Q&A)について
- 4) Kirkland D, Pfuhrer S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M, Kasper P, Kirchner S, Lynch A, Marzin D,

Maurici D, Meunier JR, Müller L, Nohynek G, Parry J, Parry E, Thybaud V, Tice R, van Benthem J, Vanparrys P, White P.(2007) How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res.* 628 (1) : 31-55

- 5) Commission Staff Working Documents (2004) ; Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC) ; EN, SEC (2004) 1210
- 6) Honma M. (2007) A Multi-endpoints *in vitro* Genotoxicity Test SAYstem Consisting of Comet, Micronuclei and Gene Mutation Test, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, abstract pp.88.
- 7) Flamand N, Marrot L, Belaidi JP, Bourouf L, Dourille E, Feltes M, Meunier JR. (2006) Development of genotoxicity test procedures with Episkin, a reconstructed human skin model: towards new tools for *in vitro* risk assessment of dermally applied compounds? *Mutat Res.* 606 (1-2) : 39-51.
- 8) Curren RD, Mun GC, Gibson DP, Aardema MJ. (2006) Development of a method for assessing micronucleus induction in a 3D human skin model (EpiDerm). *Mutat Res.* 607 (2) : 192-204.
- 9) Arai S, Saitoh M, Tajashima Y, Honma M, Kojima H (2007) A new trial for *in vitro* Comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Abstracts, p111.