

同一個体を用いたマウス皮膚コメット・小核組み合わせ試験の有用性

豊泉友康¹, 川上久美子¹, 中川ゆづき², 野口 聡³, 白見憲司³,
桑形麻樹子³, 須井 哉¹, 太田 亮⁴, 山影康次²Usefulness of combined with skin comet assay and
skin micronucleus test using same mouseTomoyasu TOYOIZUMI¹, Kumiko KAWAKAMI¹, Yuzuki NAKAGAWA², Satoshi NOGUCHI³, Kenji USUMI³,
Makiko KUWAGATA³, Hajime SUI¹, Ryo OHTA⁴, Kohji YAMAKAGE²

The aim of the present study was to explore the usefulness of the new test method. Three carcinogens (*N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine: MNNG, 4-nitroquinoline 1-oxide: 4NQO, benzo[a]pyrene: B[a]P) were evaluated using the combined *in vivo* skin comet assay and *in vivo* skin micronucleus test. In the 4NQO, significant increases in the percent of DNA (%DNA) in the tail and frequency of MN (%MN) were observed in epidermal skin cells. In the MNNG, significant increases in the %DNA in the tail were observed, however there were no significant increases of %MN. In the B[a]P, significant increases in the %DNA in the tail and %MN were observed. This combined test can evaluate different genotoxicity in same the sampling time. And this test also would lead to reduce the number of animals required.

諸言

遺伝毒性試験は、遺伝子への傷害を指標として、化学物質の発癌性の有無をスクリーニングする試験法である。細菌、培養細胞および動物を用いた遺伝毒性試験があり、*in vivo*試験では、DNA損傷を検出するアルカリコメットアッセイ(以下、コメットアッセイ)、不定期DNA合成試験、染色体異常を検出する小核試験、遺伝子突然変異を検出するトランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験などがある¹⁻⁴⁾。これらの試験の中で、コメットアッセイは、①少数の細胞で評価するため臓器の一部があれば解析が可能、②試験時間が短時間のため迅速な結果の収集が可能、③対象臓器の細胞増殖性に依存せず、細胞単離が可能であればすべての臓器を評価対象とすることが可能などの利点を有する。一方、小核試験は、染色体異常に起因して生じる小核を数えることで染色体異常誘発性を調べる試験で、直接染色体を観察

する染色体異常試験と比較して、異常の判断および試験法が容易などの利点を有する。

*In vivo*試験で汎用されている小核試験は、染色体異常の誘発を指標とするため、細胞増殖性の高い臓器を評価対象とし、限られた部位での遺伝毒性評価となる欠点を有する。しかし、上述の通り、コメットアッセイは、対象臓器の細胞増殖性に依存しない試験であるため、小核試験と組み合わせることで、その欠点を補完できる可能性がある。そこで、最近コメットアッセイおよび小核試験の組み合わせ試験が用いられるようになってきている^{5,6)}。この組み合わせ試験は、同一個体の異なる臓器での組み合わせがよく用いられるが、同一臓器でも試験が可能である。しかし、同一臓器の場合は、上述の小核試験の特徴から必ずしも容易とされない場合がある。皮膚に関しては、既に小核試験の有用性が報告されており⁷⁾、コメットアッセイとの組み合わせが容易であると考えられた。

本研究では、遺伝毒性物質であり、かつ、皮膚で発癌性を示す物質でもある、4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO)^{8,9)}、*N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG)^{10,11)} およびbenzo[a]

1 代替法試験部遺伝学研究室

2 代替法試験部細胞毒性学研究室

3 毒性部病理学研究室

4 毒性部毒性学研究室

pyrene(B[a]P)¹²⁾を用いて、同一個体の皮膚表皮細胞を用いるコメットアッセイおよび小核試験の組み合わせ試験の有用性を検討したので報告する。

材料および方法

1. 使用動物

日本エスエルシーから6週齢で購入した雄ヘアレスマウス(Hos:HR-1, 星野試験動物飼育所, 茨城)を、入荷後6日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間の一般状態に異常の認められなかった動物を試験に使用した。なお、実験では各群3匹を使用した。全ての実験操作は、「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 動物実験に関する指針」に基づいて実施した。

2. 投与検体の調製および投与

4NQO, MNNGおよびB[a]Pのそれぞれの濃度は、既報の論文¹³⁻¹⁵⁾を参考に設定した。4NQO(CAS番号:56-57-5, 和光純薬工業), MNNG(CAS番号:70-25-7, 関東化学, 東京)およびB[a]P(CAS番号:025-01113, 和光純薬工業)はそれぞれ秤量後、アセトン(和光純薬工業)およびオリブ油(小堺製薬, 東京)を4:1で混合した媒体(AOO)を加えてボルテックスミキサーで攪拌溶解させた。4NQOは0.05, 0.1および0.2 w/v%, MNNGは0.01, 0.02, 0.05および0.1 w/v%, B[a]Pは0.2, 0.5, 1および2 w/v%となるようAOOで調製した。なお、これらはいずれも用時調製した。

投与期間および投与回数について、西川らは、解剖の72, 48および24時間前の計3回反復経皮塗布が皮膚小核試験の検出力を増加させるために有用であることを報告している⁷⁾。また、我々は、解剖の24あるいは3時間前の単回経皮塗布が皮膚コメットアッセイでDNA損傷を検出するために有用であることを確認している¹³⁾。そこで、本試験では、これら2つの報告を組み合わせた、解剖72, 48, 24および3時間前の反復経皮塗布を採用した。投与検体は、動物の背部皮膚(約3×4 cm)に塗布し、1回塗布量は、1個体につき0.2 mL/匹とした。

3. 実験方法

1) 皮膚片の摘出, 皮膚表皮細胞の単離

最終塗布の約3時間後に動物を安楽死させ、塗

布部位を消毒用エタノール含浸綿で軽く拭いた後、投与範囲(約3×4 cm)の皮膚を、カミソリ刃を用いて摘出した。摘出した皮膚は氷冷したPBS(-)で洗い、脂肪等の余分な組織を除去した。その際、一部(約1×1 cm以上)の皮膚は、病理組織標本用として、10 v/v%中性ホルマリン溶液で固定した。真皮側が濾紙に接するように貼り付けた皮膚片付き濾紙をキムタオルで挟み、手で軽く押し水分を除いた後、皮膚片を濾紙ごとカミソリ刃で1~3 mm幅の短冊状に細切した。細切した皮膚片付き濾紙を0.02 w/v% EDTA溶液に浸し、氷上で静置した。10分後、皮膚片付き濾紙を0.25 w/v%トリプシン溶液に浸し、冷蔵・遮光下で1晩静置した。静置後、皮膚片付き濾紙を氷冷したPBS(-)に浸し、軽く洗った皮膚片から表皮を剥離し、ウシ血清(Invitrogen, Carlsbad, CA)を10 v/v%含む約10 mLのMEM(以下MEM)が入った15 mLチューブに移した。表皮を集めた15 mLチューブは、ロータリーシェーカーを用いて約4°Cで1時間緩やかに攪拌した。攪拌後のMEMをポアサイズ70 μmのセルストレーナーで濾過し、濾過した細胞浮遊液をコメットアッセイおよび小核試験用として、それぞれ以下の手順でスライド標本を作製した。

2) コメットアッセイ

(1) スライド標本の作製

標本作製の前に、スライドガラスを1.0 w/v%電気泳動用アガロース液(Type Iアガロース, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に浸し、自然乾燥させて、アガーコートスライドガラスを作製した。

最高用量群で最も小さい動物番号の細胞浮遊液から採取した10 μLを10 μLの20 μg/mL臭化エチジウム液と混合し、蛍光顕微鏡下で、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。その値を基に細胞浮遊液の希釈率を決定した。他の動物から単離した細胞浮遊液についても、同じ希釈率を適用した。細胞浮遊液の一部を遠心(510×g, 5分間, 4°C)し、上清を除いた後、氷冷したミンズ緩衝液(20 mM EDTA 2Na, 10 v/v% DMSO in Hanks' Balanced Salt Solution, pH 7.5)を加え、1.5×10⁶細胞/mLの細胞浮遊液を調製した。360 μLの0.5 w/v%低融点アガロース液(NuSieve GTG, Lonza, Basel, Swiss)に40 μLの細胞浮遊液を加

えて数秒間ボルテックスミキサーで混合した。ブラインド番号を記したアガーコートスライドグラスに150 μ L滴下し、24 \times 60 mmのカバーガラス(IWAKI, 東京)をかけ、氷上に置いたステンレストレーの上に置き、固化させた。1個体あたり、2枚のスライド標本を作製した。

(2) 細胞溶解および電気泳動

標本のカバーガラスを除去し、予冷しておいた細胞溶解液(100 mmol/L EDTA 2Na, 2.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L tris, 1 v/v% triton-X100, 10 v/v% DMSO)に浸し、冷蔵で4~6時間静置した。細胞溶解液から標本を取り出し、予冷しておいた精製水でリンス後、電気泳動槽(BE-540, バイオクラフト, 東京)のゲルトレー上に標本をランダムに並べた。アルカリ電気泳動液(0.3 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA 2Na)を1 L注ぎ、20分間静置して、アンウインドした後、約26 V(約0.7 V/cm)に設定し、4°Cで20分間電気泳動した。電気泳動終了後、予冷しておいた精製水で標本をリンス後、中和液(0.4 mol/L Tris)に20分間浸して中和した。中和後、標本をエタノールに10分間浸して脱水し、自然乾燥し、室温で保管した。

(3) 標本染色および観察

標本観察の直前に、SYBR Gold染色液(Invitrogen, 原液の10,000倍希釈)を標本に50 μ L滴下し、カバーガラスをかけて染色した。観察は、蛍光顕微鏡下で200倍の倍率で行った。まず、標本あたり50細胞(1個体あたり2枚の標本により100細胞)について、ヘッド部位が小さい細胞(ヘッジホッグ)の出現数を記録した。次に、標本あたり50細胞(1個体あたり2枚の標本により100細胞)について、デジタルカメラ(A312f-VIS, Basler, 東京)を用いて標本観察像を取り込み、コメット分析ソフト(Comet assay IV, バージョン番号: 4.11, Perspective Instruments, Bury St Edmunds, UK)を用いて解析を行った。前述したヘッジホッグは死細胞の可能性があるので、画像解析の対象外とした。DNA損傷性の評価は、%DNA in tail(Comet assay IVのパラメーターではTail intensity : Tail中のDNA蛍光強度/全体のDNA蛍光強度 \times 100)を用いた。観察終了後、カバーガラスを除去し、標本をエタノールに10分間浸し、自然乾燥させた後、室温で保管した。

3) 小核試験

(1) スライド標本の作製

単離した細胞浮遊液を遠心し(310 \times g, 5分間, 室温), 上清を除去して細胞をほぐした後, 冷却した約10 mLのMEMを加えて再浮遊させた。再度遠心し, 上清を除去して細胞をほぐした後, 37°Cに保温した10 mLの75 mmol/L KClを少しずつ加えて軽く転倒混和した。37°Cのウォーターバス中に15分間静置し, 低張処理した。その後, 冷却した1.25 mLのカルノア液(酢酸:メタノール=1:3)を少しずつ加えて軽く転倒混和し, 遠心した。上清を除去して細胞をほぐした後, 冷却した10 mLのカルノア液を加えて, 軽く転倒混和した後, 遠心する操作を2回繰り返した。上清を除去して細胞をほぐした後, 冷却した10 mLの1 v/v%酢酸メタノール液(酢酸:メタノール=1:99)を加えて軽く転倒混和した。細胞浮遊液を遠心し, 上清を除去して細胞をほぐした後, 1 v/v%酢酸メタノール液を適量加えて細胞懸濁液を得た。スライドグラスに細胞懸濁液を滴下して, 1個体あたり2枚のスライド標本を作製した。

(2) 標本染色および観察

標本観察の直前に, ゼーレンゼンの1/15 mol/Lリン酸緩衝液に溶解した40 μ g/mLのアクリジンオレンジをスライド標本に数滴滴下してカバーガラスをかけた。標本あたり1,000細胞(1個体あたり2枚の標本により2,000細胞)を蛍光顕微鏡下で400倍の倍率で観察し, そのうち, 小核を有する表皮細胞の数を記録した。

4) 病理組織学および免疫組織化学検査

コメットアッセイのみが陽性の時には, 常法に従ってハマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製して病理組織学検査を実施した。また, 陰性対照群とMNNGの最高用量群(0.1 w/v%投与群)の各3例においては細胞分裂マーカーであるKi67抗体による免疫組織化学観察を行い, 表皮の分裂能を評価した。各標本5視野を無作為に選択して表皮細胞中のKi67陽性細胞を数え, 表皮単位面積あたりのKi67陽性細胞数を算出した。

データ解析

1) コメットアッセイ

・多群間での比較の場合

個体ごとの%DNA in tailおよびヘッジホッグ

表1 4NQOのマウス皮膚コメット・小核組み合わせ試験結果

Group	No. of animals	Skin comet assay				Skin micronucleus test	
		% DNA in tail		Frequency of hedgehogs		Observed cells	No. of MN cells
		Observed cells	Average (S.D.) of 100 cells	Observed cells	% of hedgehogs		
Negative control AOO	1	100	14.9 (18.4)	100	10	2000	1
	2	100	16.8 (19.8)	100	27	2000	0
	3	100	16.3 (18.2)	100	16	2000	2
	Total	—	—	—	53	—	3
	Average ± S.D.	300	16.0 ± 0.9	300	17.7 ± 8.6	6000	0.05 ± 0.05
4NQO 0.05 w/v%	1	100	25.0 (18.1)	100	16	2000	2
	2	100	20.3 (17.5)	100	15	2000	9
	3	100	23.6 (21.6)	100	15	2000	5
	Total	—	—	—	46	6000	16
	Average ± S.D.	300	22.9 ± 2.3	300	15.3 ± 0.6	—	0.27 ± 0.18 ^{††}
4NQO 0.1 w/v%	1	100	38.3 (21.4)	100	25	2000	21
	2	100	36.1 (21.9)	100	16	2000	18
	3	100	35.9 (24.3)	100	20	2000	16
	Total	—	—	—	61	6000	55
	Average ± S.D.	300	36.8 ± 1.5 ^{**}	300	20.3 ± 4.5	—	0.92 ± 0.13 ^{††}
4NQO 0.2 w/v%	1	100	21.0 (23.1)	100	65	Toxicity	
	2	100	34.8 (26.3)	76	82		
	3	100	38.4 (23.8)	80	63		
	Total	—	—	—	210		
	Average ± S.D.	300	31.4 ± 1.7 [*]	256	70.0 ± 10.4 ^{**}		

AOO, Acetone:olive oil (4:1); 4NQO, 4-Nitroquinoline 1-oxide

^{*}, ^{**}, Significantly higher than the negative control at 5 or 1% level (Dunnett's test, two-tailed).

^{**}, Significantly higher than the negative control at 1% level (Dunnett's test, one-tailed).

^{††}, Significantly different from the negative control at 5 or 1% level (Kastenbaum and Bowman's table).

の平均値について、陰性対照群と各投与群(0.05～0.2 w/v% 4NQO, 0.01～0.1 w/v% MNNGおよび0.2～1 w/v% B[a]P投与群)との間で、それぞれ有意水準5%でDunnett検定(両側検定, パラメトリック)およびDunnett検定(片側検定, パラメトリック)を行った¹⁶⁾。

・2群間での比較の場合

個体ごとの%DNA in tailおよびヘッジホッグの平均値について、陰性対照群と2 w/v% B[a]P投与群との間で、それぞれ有意水準5%でStudent's *t*検定(両側検定)およびStudent's *t*検定(片側検定)を行った¹⁷⁾。

2) 小核試験

小核出現頻度について、陰性対照群と各投与群との間で、有意水準5%で条件付二項検定(Kastenbaum and Bowmanの表)を行った¹⁸⁾。

3) 免疫組織化学検査

個体ごとのKi67陽性細胞数の平均値について、陰性対照群と0.1 w/v% MNNG投与群の間で、有意水準5%でStudent's *t*検定(両側検定)を行った¹⁷⁾。

結果

4NQO(表1)については、コメットアッセイの結果、0.1および0.2 w/v%投与群において、%DNA in tailの有意な増加が認められた。また、0.2 w/v%投与群においては、ヘッジホッグの有意な増加が認められた。小核試験の結果、0.05および0.1 w/v%投与群において、小核出現頻度の有意な増加が認められた。0.2 w/v%投与群においては、強い細胞毒性により、既定の細胞数を観察することが不可能であった。

表2 MNNGのマウス皮膚コメット・小核組み合わせ試験結果

Group	No. of animals	Skin comet assay				Skin micronucleus test	
		% DNA in tail		Frequency of hedgehogs		Observed cells	No. of MN cells
		Observed cells	Average (S.D.) of 100 cells	Observed cells	% of hedgehogs		
Negative control AOO	1	100	12.0 (21.0)	100	10	2000	1
	2	100	16.8 (24.0)	100	11	2000	0
	3	100	9.3 (15.1)	100	9	2000	3
	Total	300	—	300	30	6000	4
	Average ± S.D.	—	12.7 ± 3.8	—	10.0 ± 1.0	—	0.07 ± 0.08
MNNG 0.01 w/v%	1	100	12.2 (17.1)	100	28	2000	0
	2	100	12.1 (18.6)	100	10	2000	0
	3	100	9.3 (15.6)	100	11	2000	0
	Total	300	—	300	49	6000	0
	Average ± S.D.	—	11.2 ± 1.7	—	16.3 ± 10.1	—	0.00 ± 0.00
MNNG 0.02 w/v%	1	100	21.8 (15.5)	100	10	2000	3
	2	100	17.5 (19.1)	100	16	2000	2
	3	100	8.8 (13.4)	100	4	2000	2
	Total	—	—	300	30	6000	7
	Average ± S.D.	300	16.0 ± 6.6	—	10.0 ± 6.0	—	0.12 ± 0.03
MNNG 0.05 w/v%	1	100	25.1 (18.7)	100	10	2000	6
	2	100	20.5 (16.8)	100	12	2000	1
	3	100	28.2 (15.8)	100	9	2000	0
	Total	300	—	300	31	6000	7
	Average ± S.D.	—	24.6 ± 3.9*	—	10.3 ± 1.5	—	0.12 ± 0.16
MNNG 0.1 w/v%	1	100	39.4 (16.3)	100	14	2000	4
	2	100	48.0 (15.0)	100	17	2000	3
	3	100	45.7 (13.7)	100	7	2000	4
	Total	300	—	300	38	6000	11
	Average ± S.D.	—	44.3 ± 4.5**	—	12.7 ± 5.1	—	0.18 ± 0.03

AOO, Acetone: olive oil (4:1); MNNG, *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

*, **, Significantly higher than the negative control at 5 or 1% level (Dunnett's test, two-tailed).

MNNG(表2)については、コメットアッセイの結果、0.05および0.1 w/v%投与群において、%DNA in tailの有意な増加が認められた。また、ヘッジホッグ分析および小核試験においては、いずれの投与群においても有意な差は認められなかった。病理組織学検査の結果、0.1 w/v%投与群において、軽度ではあったが限局性のびらん(図1, A, B)が観察された。免疫組織化学検査の結果、統計学的に有意な差は認められなかったが、細胞分裂マーカーであるKi67陽性細胞の減少傾向(図1, C, D)が観察された(陰性対照: 18.1 ± 2.1細胞/2,500 μm², MNNG: 14.1 ± 2.7細胞/2,500 μm²)。

B[a]P(表3)については、コメットアッセイの結果、いずれの投与群においても%DNA in tailの有意な増加は認められなかった。ヘッジホッグ分析の結果、いずれの投与群においても有意な差は認められなかった。小核試験の結果、0.5, および1 w/v%投与群において、小核出現頻度の有意な増加が認められた。コメットアッセイで2 w/v% B[a]P単回塗布24時間後、DNA損傷性が検出されていることから¹³⁾、同濃度を用いて追加検討(表4)を行った。その結果、%DNA in tailおよび小核出現頻度の有意な増加が認められた。ヘッジホッグについては、2 w/v%投与群において有意な差は認められなかった。

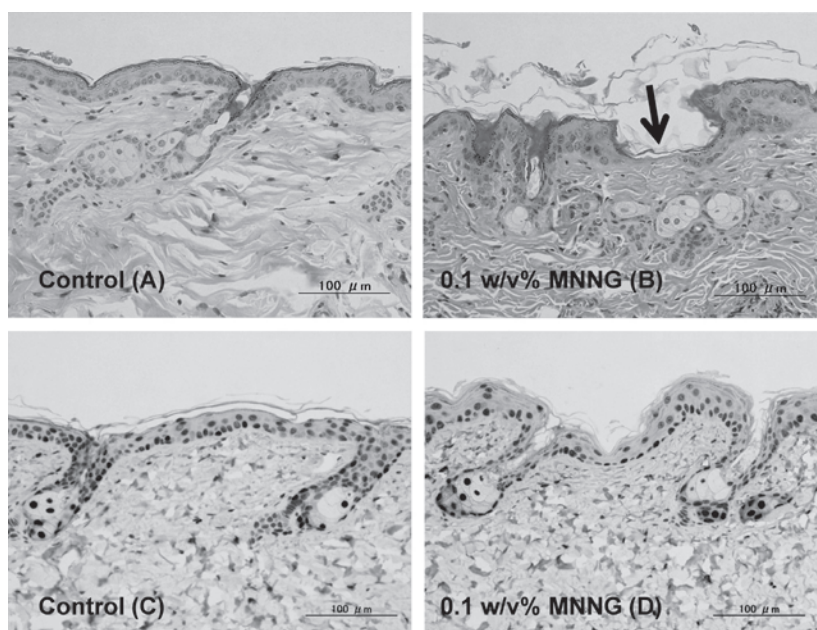


図1 MNNG塗布後の皮膚組織像

A：陰性対照物質の4回反復塗布後のHE染色像，B：0.1 w/v% MNNGの4回反復塗布後のHE染色像，C：陰性対照物質の4回反復塗布後のKi67染色像，D：0.1 w/v% MNNGの4回反復塗布後のKi67染色像。

表3 B[a]Pのマウス皮膚コメット・小核組み合わせ試験結果

Group	No. of animals	Skin comet assay				Skin micronucleus test	
		% DNA in tail		Frequency of hedgehogs		Observed cells	No. of MN cells
		Observed cells	Average (S.D.) of 100 cells	Observed cells	% of hedgehogs		
Negative control AOO	1	100	12.0 (21.0)	100	10	2000	1
	2	100	16.8 (24.0)	100	11	2000	0
	3	100	9.3 (15.1)	100	9	2000	3
	Total	300	-	300	30	6000	4
	Average ± S.D.	-	12.7 ± 3.8	-	10.0 ± 1.0	-	0.07 ± 0.08
B[a]P 0.2 w/v%	1	100	10.8 (18.0)	100	7	2000	2
	2	100	12.1 (19.4)	100	10	2000	3
	3	100	13.6 (18.4)	100	9	2000	4
	Total	300	-	300	26	6000	9
	Average ± S.D.	-	12.2 ± 1.4	-	8.7 ± 1.5	-	0.15 ± 0.05
B[a]P 0.5 w/v%	1	100	8.4 (15.1)	100	11	2000	11
	2	100	18.3 (23.4)	100	6	2000	5
	3	100	9.5 (12.9)	100	11	2000	5
	Total	300	-	300	28	6000	21
	Average ± S.D.	-	12.1 ± 5.4	-	9.3 ± 2.9	-	0.35 ± 0.17 ^{††}
B[a]P 1 w/v%	1	100	16.4 (23.2)	100	13	2000	5
	2	100	16.4 (18.6)	100	9	2000	16
	3	100	9.4 (17.1)	100	13	2000	13
	Total	300	-	300	35	6000	34
	Average ± S.D.	-	14.1 ± 4.1	-	11.7 ± 2.3	-	0.57 ± 0.28 ^{††}

AOO, Acetone:olive oil (4:1); B[a]P, Benzo[a]pyrene

^{††}, Significantly different from the negative control at 1% level (Kastenbaum and Bowman's table).