

オルトフェニレンジアミンの皮膚蓄積性と DNA 損傷性に関する検討

豊岡達士*1, 祁永剛*2, 王瑞生*1

オルトフェニレンジアミン (OPDA: *ortho*-Phenylenediamine) は染毛剤の成分として使用される重要な芳香族アミンの一つである。これまでに染毛剤を使用する美容師に膀胱がんの発生が多いことは知られていたが、近年、首や頭皮における皮膚がんのリスクが高くなるという疫学研究が報告されている。一方で、OPDA の皮膚に対する毒性影響を検討した研究はない。本研究では、三次元ヒト表皮培養モデル細胞 (3D 皮膚) を用いて、OPDA の皮膚に与える毒性影響を検討した。3D 皮膚における OPDA の皮膚吸収性を検討したところ、OPDA は 3D 皮膚に吸収された後、3D 皮膚内に高蓄積することを見出した。また、皮膚内に蓄積した OPDA は 3D 皮膚細胞に DNA 損傷を誘導することが、リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) を指標にした検討により確認された。さらに、この DNA 損傷型は OPDA と DNA が結合する付加体損傷であることを明らかにした。本研究で得られた知見は、美容師の皮膚がん増加を報告する疫学研究の解釈に重要な情報を提供するものと考えられる。

キーワード: オルトフェニレンジアミン, 皮膚がん, DNA 損傷性, γ -H2AX, 皮膚蓄積性

1. はじめに

美容師は、職業上の染毛剤の取り扱いに加え、私的使用により、染毛剤へのばく露が一般に比べて高いことが知られている。染毛剤の成分には、芳香族アミン類等が含まれており、染毛剤へのばく露機会が高い美容師の間で、膀胱がんリスクが高いことが国際がん研究機関 (IARC) より指摘されてきた^{1,2)}。しかしながら、近年の疫学研究においては、美容師の膀胱癌リスクは減少しているが、染毛剤に直接ばく露される頭皮、及び首における皮膚がんのリスクが増加しているという報告がなされている^{3,4)}。

オルトフェニレンジアミン (OPDA: *ortho*-Phenylenediamine) は、染毛剤の成分として使用される重要な芳香族アミンの 1 つである^{5,6)} OPDA のヒトに対する発がん性の証拠は不足しているが、動物においては、マウス、及びラットで肝がん、及び膀胱がんの発生率を有意に上昇させることが認められており、2020 年の IARC の再評価で OPDA は、発がん性物質グループ 2B (ヒトに対して発がんの可能性がある) に分類された⁷⁾。DNA 損傷性の有無は、化学物質の発がん性を評価する上で、重要なポイントになる。これまでに OPDA の DNA 損傷性に関するいくつかの研究が行われてきており、その結果は概ね OPDA は DNA 損傷性を有するという見解で一致している。しかしながら、皮膚に着目した OPDA の DNA 損傷性評価、及び、OPDA が生成する DNA 損傷の種類については情報がない。

本研究では、染毛剤にばく露する機会が多い美容師の間で、皮膚がんのリスクが増加していることを示唆する疫学研究の結果を、実験的に検証することを目的に、染毛剤に含まれることがある OPDA をモデルとして、3D 皮膚に対する DNA 損傷性をリン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) を指標に検討した。

2. 実験材料及び方法

1) 3D 皮膚

3D 皮膚には LabCyte EPI-MODEL (J-TEC, Fuji Film) を用いた。LabCyte は、直径 10.5mm の培養カップ (Culture Insert, Corning) にヒト正常表皮細胞を重層培養したものであり、培養 14 日目のもを使用した。使用した 3D 皮膚は、表皮を構成する角質層、顆粒層、有棘層、基底層を有し、角層に特有の構造体、及び各種代謝酵素や炎症関連酵素の保持が確認されている⁸⁾。

2) 3D 皮膚における OPDA の皮膚吸収性評価

3D 皮膚が入った培養カップを PBS (52 mL) が満たされたガラス瓶に装着し、培養カップに、0.1 μ Ci (3700 Bq) の¹⁴C]OPDA (American Radiolabeled Chemicals) を含む PBS を 200 μ L 添加した。培養カップの底面は網目状のポリエチレンメンブレンであり、添加した¹⁴C]OPDA が 3D 皮膚を透過するとガラス瓶の PBS 内で¹⁴C]OPDA が検出される。既定時間ごとに、「添加溶液」、「3D 皮膚」、「ボトル内の溶液」を回収し、¹⁴C]OPDA の放射能を液体シンチレーションカウンター (Perkin-Elmer: Tri-Carb 5110R) で測定した。

3) 3D 皮膚における OPDA の DNA 損傷性評価

3D 皮膚に対する OPDA の DNA 損傷性は、 γ -H2AX を指標に Western blotting 法により評価した。3D 皮膚

*1 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター 有害性評価研究部

*2 Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, China.
連絡先: 〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1
労働安全衛生総合研究所 有害性評価研究部 豊岡 達士
E-mail: toyooka@hjniosh.johas.go.jp

が入った培養カップに OPDA (非 RI : Tokyo Chemical Industry) を 0.1-3 mM の範囲で 24 時間作用した。作用終了後、3D 皮膚を培養カップから剥離回収し、Lysis Buffer を加えた上で、超音波処理、及び熱処理等をし、Western blotting のサンプルを調整した。サンプルを 12.5% SDS-PAGE GEL で電気泳動分離、PVDF membrane に分離されたタンパク質を転写した上で、Western blotting 法において、 γ -H2AX を認識する一次抗体 (ミリポア: clone JBW301)、及び二次抗体を作用し、 γ -H2AX の誘導を化学発光により検出した。ローディングコントロールとして actin を利用した。

4) 3D 皮膚における OPDA-DNA 付加体の検出

3D 皮膚に $[^{14}\text{C}]$ OPDA を 0.1 μCi 含む PBS 溶液を 200 μL 添加し、既定時間後に 3D 皮膚を剥離回収し、Proteinase K を含む Lysis buffer で 3D 皮膚を完全に溶解した。3D 皮膚溶解液から DNA をエタノール沈殿法により回収し、ドットプロット法でニトロセルロース膜に DNA を転写した。DNA を転写したニトロセルロース膜から放出されるベータ線を液体シンチレーションカウンターで計測した。

3. 結果

1) 3D 皮膚における OPDA の皮膚吸収性評価

図 1 のグラフ縦軸は、3D 皮膚に添加した $[^{14}\text{C}]$ OPDA の量を 100% とし、添加後、既定時間における、添加溶液内、皮膚内、ボトル内に存在する $[^{14}\text{C}]$ OPDA の割合を示している。添加溶液内 (●印) の $[^{14}\text{C}]$ OPDA の割合は、時間経過とともに減少していることから、 $[^{14}\text{C}]$ OPDA は速やかに 3D 皮膚に吸収 (皮膚の中に入る) されることが明らかになった。一方で、3D 皮膚を透過し、ボトルの方へ移行した $[^{14}\text{C}]$ OPDA の割合は、24 時間後においてもほとんど認めることができず (×印)、 $[^{14}\text{C}]$ OPDA は 3D 皮膚内に蓄積したままの状態になっていることが判明した (◆印)。なお、 $[^{14}\text{C}]$ OPDA の皮膚蓄積は 72 時間後においても、24 時間後のデータと同様であった (データ示さず)。また、各時間における、添加溶液内、皮膚内、ボトル内に存在する $[^{14}\text{C}]$ OPDA の割合の総和が

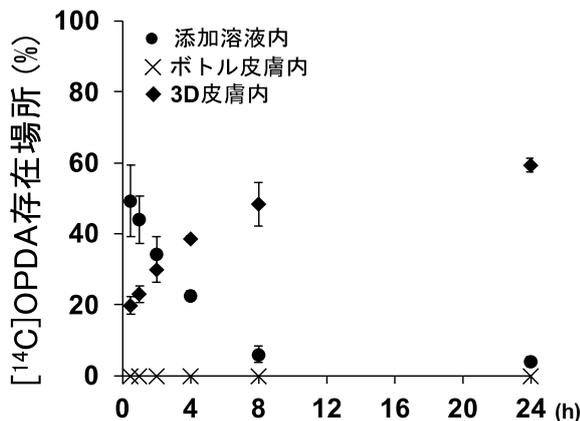


図 1 3D 皮膚における OPDA の皮膚吸収性評価

100% となっていないのは、培養カップ (スチレン性) に OPDA が約 30% 吸着しているためである。

2) 3D 皮膚における OPDA の DNA 損傷性評価

図 2 に 3D 皮膚に OPDA (非 RI) を 24 時間作用した時の γ -H2AX 誘導を示す。OPDA 0.3 mM の作用から γ -H2AX 誘導が検出され、1, 3 mM の作用では、強く γ -H2AX 誘導することが確認された (バンドの太さ、及び濃さで判断される)。なお、アクチンはローディングコントロールであり、Western blotting 法において、各レーンのタンパク質量が均等であったことが示されている。これらの結果から、OPDA が 3D 皮膚に対して DNA 損傷を誘導していることが示唆された。また、この γ -H2AX は、3D 皮膚の基底細胞層で誘導されていることを、3D 皮膚切片における免疫組織染色法で確認している (データ示さず)。なお、3D 皮膚に OPDA を 3 mM で 24 時間作用しても 3D 皮膚を構成する細胞の生存率に影響がないことを確認しており (alamer Blue assay : データ示さず)、図 2 で観察された γ -H2AX 誘導は、細胞死 (アポトーシス) に伴い誘導される γ -H2AX ではない。

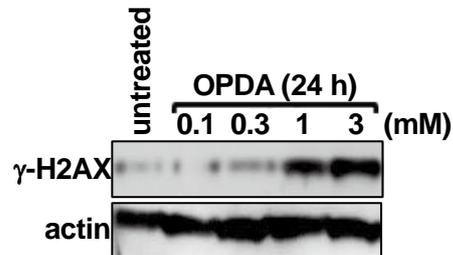


図 2 3D 皮膚における OPDA の DNA 損傷性評価

3) 3D 皮膚における OPDA-DNA 付加体の検出

図 1 より $[^{14}\text{C}]$ OPDA は 3D 皮膚の透過がほとんど認められなかったことから、 $[^{14}\text{C}]$ OPDA は 3D 皮膚を構成する細胞構造物と結合している可能性が考えられた。表 1 に、 $[^{14}\text{C}]$ OPDA を 24 時間作用した 3D 皮膚の DNA と $[^{14}\text{C}]$ OPDA の結合を評価した結果を示す。表中 Control RI+ は、未処理の 3D 皮膚を回収し、3D 皮膚を溶解した後、その溶液に、 $[^{14}\text{C}]$ OPDA を 0.1 μCi 加え、残りの処理を 3D 皮膚に $[^{14}\text{C}]$ OPDA を作用したサンプルと同様に行なったものである。 $[^{14}\text{C}]$ OPDA を作用した 3D 皮膚から抽出した DNA では、 $[^{14}\text{C}]$ OPDA からのベータ線カウントが、Control RI+ に比べて明らかに高いことがわかる。このことより、OPDA は DNA と結合、すなわち付加体を形成することが示唆された。

表 1 3D 皮膚における OPDA-DNA 付加体の検出

条件	サンプル数	カウント範囲 (DPM)	平均カウント数 (DPM)
Background	6	12-21	15.83 \pm 3.31
Control ^{RI+}	6	135-1051	543.00 \pm 428.05
OPDA (24 h)	6	1661-5415	3301.67 \pm 1772.31

4. 考察

本研究では 3D 皮膚における、OPDA の皮膚吸収性、及び、DNA 損傷性を γ -H2AX を指標に検証し、OPDA は 3D 皮膚に速やかに吸収され、皮膚内に蓄積し、DNA 損傷を誘導すること、また誘導される DNA 損傷の種類は DNA 付加体損傷であろうことを初めて明らかにした。

我々は、3D 皮膚に対する物質の吸収性・透過性・蓄積性について、別途研究を実施しており、これら皮膚吸収性等は物質のオクタノール/水分配係数 (Log K_o/w) によってある程度予測することができるという結果を得ている。すなわち、Log K_o/w の値が 0 付近から 3 程度の物質であれば、通常 3D 皮膚を透過するはずである。実際に、OPDA と構造異性体である *p*-phenylenediamine (Log K_o/w : -0.25) や、化学構造が似た Aniline (Log K_o/w : 0.9)、 σ -Toluidine (Log K_o/w : 1.3) では、3D 皮膚に対する透過性が認められている。OPDA の Log K_o/w は 0.15 であることから、3D 皮膚に対する透過性があると予想されたが、実際には、図 1 に示すように皮膚透過性がほとんど認められなかった。この理由としては、表 1 に示すように OPDA が DNA と結合したためであると考えられる。また、72 時間後においても、作用した OPDA がほぼ全量 3D 皮膚内に蓄積したままになっていることは注目すべきことである。すなわち一旦皮膚に吸収された OPDA は長時間皮膚内にとどまり、皮膚を構成する細胞を傷害し続ける可能性があることを示唆するものであり、OPDA の皮膚接触を防止することは労働衛生上重要であると考えられる。

図 2 に示す通り、OPDA は γ -H2AX を誘導する。この γ -H2AX は、細胞内で DNA 二本鎖切断が生成された際に、その切断部位近傍に存在するヒストン H2AX のセリン 139 番が、主に ATM (ataxia-telangiectasia mutated) と呼ばれるセリン/スレオニンキナーゼによって迅速にリン酸化される現象である⁹⁾。すなわち、OPDA が γ -H2AX を誘導したことは、細胞内における DNA 二本鎖切断の生成を意味している。表 1 より、OPDA は DNA 付加体損傷を形成していることが明らかになったが、OPDA 作用が γ -H2AX を誘導したのは、以下の可能性によって、DNA 付加体損傷から二次的に DNA 二本鎖切断が生成したものと考えられる。① OPDA-DNA 付加体損傷が存在する DNA 鎖上において、転写や複製が生じ、RNA ポリメラーゼ転写複合体または DNA 複製フォークが DNA 損傷と衝突し、その衝突ストレスにより DNA 二本鎖切断が生じた。② OPDA-DNA 付加体損の修復の過程で一時的に DNA 二本鎖切断が生じた(損傷部を除去したり、DNA を組み替えたりする等、修復過程で必然的に生じるもの)。DNA 二本鎖切断は、DNA の中でも最も重篤な損傷と考えられており、発がんや密接な関係がある¹⁰⁾。特に DNA 二本鎖切断を修復する際の修復ミスが、細胞の変異(がん化していく過程)につながると考えられている。

本研究により、OPDA は 3D 皮膚に速やかに吸収され、皮膚内に蓄積することが明らかになった。また、皮膚内に蓄

積した OPDA は DNA 付加体損傷を形成し、この損傷から、二次的に DNA 二本鎖切断が生成することが明らかとなった。本研究で得られた知見は、美容師の皮膚がん増加を報告する疫学研究の解釈に重要な情報を提供するものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. Proceedings. Lyon, France, 6-13 October 1992. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1993; 57: 7-398. PMID: 7911535; PMCID: PMC7681392.
- 2) IARC Monographs Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some aromatic amines, organic dyes, and related exposures. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2010; 99:1-658. PMID: 21528837; PMCID: PMC5046080.
- 3) Czene K, Tiikkaja S, Hemminki K. Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. Int J Cancer. 2003 May 20;105(1):108-12. doi: 10.1002/ijc.11040. PMID: 12672039.
- 4) Andersen A, Barlow L, Engeland A, Kjaerheim K, Lynge E, Pukkala E. Work-related cancer in the Nordic countries. Scand J Work Environ Health. 1999; 25 Suppl 2:1-116. PMID: 10507118.
- 5) Wang LL, Li SL, Qin YH, Xu FD, Wang ZS, Song XD, Li J. Studies on the mutagenicity of hair dyes made in China. Biomed Environ Sci. 1991 Sep;4(3):310-6. PMID: 1764222.
- 6) Murata M, Nishimura T, Chen F, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by hair dye components ortho-phenylenediamines and the enhancement by superoxide dismutase. Mutat Res. 2006 Sep 5;607(2):184-91. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.04.014. Epub 2006 Jun 23. PMID: 16798066.
- 7) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some nitrobenzenes and other industrial chemicals. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2020. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 123.) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK561907/>
- 8) Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T, Hata K. Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol. J Toxicol Sci. 2009 Jun;34(3):327-34. doi: 10.2131/jts.34.327. PMID:

19483386.

- 9) Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858–5868.
- 10) Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y (2008) GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:957–967.