

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究
—アポトーシスを指標とした毒性評価のための
動物組織・細胞の利用法に関する研究—

研究代表者：川崎 靖（国立医薬品食品衛生研究所）

平成 10 年度厚生科学研究費補助金
（医薬安全総合研究事業）の事業実績報告書

平成 11 年 4 月 9 日

分担研究者	井上 達	（国立医薬品食品衛生研究所）
〃	小野 宏	（食品薬品安全センター）
〃	香川 順	（東京女子医科大学）
〃	今田中伸哉	（化学品検査協会）
〃	山中すみへ	（東京歯科大学）
研究協力者	菅野 純	（国立医薬品食品衛生研究所）
〃	平林 容子	（国立医薬品食品衛生研究所）
〃	田中 憲穂	（食品薬品安全センター）
〃	山野 優子	（東京女子医科大学）
〃	大塚 雅則	（化学品検査協会）
〃	野村登志夫	（東京歯科大学）

様式 A (4) 別添 2

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)

総括研究報告書

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究

ーアポトーシスを指標とした毒性評価のための動物組織・細胞の利用法に関する研究ー

主任研究者：川崎 靖(国立医薬品食品衛生研究所・室長)

研究要旨

本研究の巨視的な目的は、LD50 という「死」を基準とした、「毒物性、劇物性の強さの指標」に対して、死に頼らない「毒物性、劇物性の強さの指標」を探索することであり、毒性概念の深化を目指すことにある。この意義として、1)亜致死性毒性、即ち、死に至らないが、蓄積性もしくは時間の経過とともに、その延長線上で死に達するような、これまでの定義から外れていた「毒性」の把握を可能とする(「非パラケルス型毒性」)、また、2)潜在性低用量毒性、即ち、毒性と薬効の裏合わせになった物質や、毒性と薬効性が狭い閾値で裏合わせになったような化学物質(例えばセレンウムなど)に対して、低用量の潜在性毒性の如何を評価することを可能とする、さらに3)潜在性慢性毒性、即ち、「障害」と「個体の生死」の相互関係の中間指標に位置づけ可能な概念、例えば日常的な潜在的毒物摂取を対象とする方途が開ける、等が挙げられ、究極的に1)から3)の種々のレベルの毒性を一元的な共通軸で把握する見通しが期待される。

今年度は、上記の「加齢の促進」、「アポトーシス」が新たな「毒物性、劇物性の強さの指標」となり得るか否かを、主として遺伝子改変動物を用いたアポトーシスやその他の指標(8OHdG など)との関連性の検討[in vivo の系](井上、香川)および培養細胞を用いた従来の細胞毒性とアポトーシスとの関連性の検討[in vitro の系](小野、今田中、山中)に取り組んだ。

その結果、急性毒性とアポトーシス、酸化的ストレスとアポトーシスの関連性に関する新知見とその解析に向けた遺伝子改変動物の有用性を示すことができ、また in vitro の系では、従来の細胞毒性試験とアポトーシスを指標とした細胞毒性試験との関連についていくつかの新知見が得られた。

研究目的

本研究の目的は、LD50 という「死」を基準とした、「毒物性、劇物性の強さの指標」に対して、死に頼らない毒物概念の深化を目指すことにある。この新たな指標としてアポト

ーシスを取り上げ、この検討を in vivo の系及び in vitro の系で行った。

研究方法・結果・

以下、各分担研究者について記す。

井上 達：アポトーシスを指標とした、遺伝子改変動物による毒性評価

平成9年度の実験結果を鑑み、平成10年度では以下の実験を行った。

実験1. 「p53 ノックアウトマウスにおける吸入毒性試験での感受性の変化について」

発ガン感受性並びにその背景にある生物反応性を検定することにより、本マウスの毒性試験系あるいは早期発ガン試験系への有用性検討の基盤を作ることにある。

9-16週齢の雄p53 ノックアウトマウスの野生型、ヘテロ、ホモにベンゼンを0, 33, 100, 300 ppmを全身暴露(1日6時間、週5日間、26週間)し、回復期間中である。なお、一群各々24匹とした。測定項目は、一般状態及び体重測定を行っている。

実験2. 「チオレドキシシン・トランスジェニックマウスにおけるパラコート誘発アポトーシスの標的臓器の解明と、その急性毒性に対する感受性の変化についての確認実験」

平成9年度において予備試験を行った。チオレドキシシン・トランスジェニックマウスにおけるの感受性変化を再確認することにある。平成10年度の実験での変更点は、1)パラコート誘発アポトーシスが、より早く進行していることが示唆されたため、パラコート投与3時間後に解剖する。2)一群6匹とする。3)精巣における病理学的検索をより正確にするため、固定法としてブアン固定を行う。4)精巣での増殖分化程度への影響を詳細に検討するため、セルソーターを用いた解析を行う。また、骨髄での増殖分化程度への影響も in vitro colony assay 等を用いて詳細に検討する。

10-12週齢の雌雄チオレドキシシン・トランスジェニックマウスのヘテロ及び野生型にパラコートを0, 8, 20, 50 mg/kgを投与用量10 ml/kgBWで単回腹腔内投与し、投与3時間後に解剖する。対照群(0mg/kg投与群)は溶媒である滅菌生理食塩水を投与した。なお、群構成は一群6匹とした。

これまでの検索の結果、以下の事が示唆された。

実験1.

その結果、各群のホモマウスは21-39週でほぼ全例が死亡し、死亡曲線はホモ、ヘテロ及び野生型の各群で特異な移動を示した。現在、病理組織学的検索中である。また、「急性毒性」の指標としてのLD50に替わる指標を模索する過程で、「急性暴露」が生体(個体)の寿命にどの程度影響するか、その程度を指標とすることが、その一つの候補として考えられた。寿命の表記に関してはゴンペルツ関数(各時点での、その時点での死亡率の対数)を用い、寿命に対する「急性暴露」の影響をゴンペルツ関数の勾配(直線部分)の増減で現すことを考える。そうした場合、例えば、ベンゼン暴露を受けたp53遺伝子欠失動物の寿命の短縮は、ベンゼン処置濃度に依存して顕著となり、また、p53遺伝子の欠失の割合に依存して顕著となることが示された。このことから、LD50に替わる指標として、ゴンペルツ関数の勾配の変化が使用可能であることが示唆された。次の段階として、もしも、実験に供する動物の数の減少と実験期間の短縮、あるいは試験管内実験への完全移行を目指すには、ゴンペルツ関数の勾配変化に最も

直結するバイオマーカーを模索する必要がある。これには、まず第一に、実験動物の特定標的臓器や、試験管内培養細胞を対象としたアポトーシスを取り上げてきた。今後、アポトーシスあるいは増殖調節に関連する遺伝子群の発現に対する影響を引き続き検討する。

実験 2.

1. 全ての群において、死亡例は認められなかった。
2. 一般状態の変化は、雌雄チオレドキシントランスジェニックマウスの野生型ヘテロともに 50 mg/kg 投与群で、投与 2 時間後からうずくまり、努力性呼吸が弱く認められた。
3. 血液学的検査では、雌雄の野生型、ヘテロともに 50 mg/kg 投与群で白血球の減少傾向が認められた。この白血球の減少に関しては、Suntres と Shek らにより血液中の好中球の減少を観察し、肺へのその遊走との関連性を考察している(Biomed Environ Sci 8:289-300 1995)。しかし、我々の検索では血液中の好中球の減少は認められなかった。
4. 血清生化学検査及び臓器重量(絶対・相対)の測定値には、顕著な変化は認められなかった。
5. 現在、病理学的検索及び TUNEL 染色を検討中である。

アポトーシスに関する p53 ノックアウトマウスを用いた解析からベンゼン暴露による生存曲線が、野生型、ヘテロ、ホモで移動することが明らかとなり、遺伝子改変動物の有用性を示唆した。チオレドキシントランスジェニクスを用いてパラコート投与による早期のアポトーシス誘発の変化の有害性を解析中

である。

小野 宏：アポトーシスを指標とした、培養細胞による毒性評価のための基礎的研究

本研究では、細胞死の一つであるアポトーシスに焦点を当て、培養細胞や化学物質の種類を変えることで、培養細胞を用いたアポトーシスの実験系を検討した。

今回調べた化学物質において、DES のみが低血清培地で強力な細胞増殖阻害作用を示したことにより、この作用は DES 特異的と考えられた。さらに、この細胞毒性作用は、細胞の動物種及び組織に関係なく誘導され、さらにエストロゲン受容体を介さない作用であることが示唆された。また、DES による低血清培地における強い細胞増殖阻害作用はアポトーシスであり、細胞の種類によって、アポトーシスに伴って断片化される DNA のサイズが異なることが示唆された。

アポトーシスを指標とした、培養細胞による毒性評価のための基礎的研究

合成エストロゲン(DES)により、低血清濃度の条件下で強力にアポトーシス誘導することが見出され、この作用が受容体非依存性であることを示した。化学物質によっては、通常の培養条件ではアポトーシスが誘導されにくいことが解った。

香川 順：動物を用いたアポトーシスを指標とした毒性評価とその他の指標との比較

ラットにパラコートを単回投与することにより、アポトーシスが誘導されるいわゆる標的臓器を解明するための前実験として各種生

体影響について、従来のデータと比較可能な項目を測定し、検討を加えてきた。今回の実験では、投与量を他機関と同濃度の50mg/kgに下げ、また投与後早期である1時間と4時間について観察することとした。特にそのマーカーとしては、8OHdGを選択した。投与1時間及び4時間後において、明らかなアポトーシスと思われる変化は認められなかった。我々の実験の場合、マーカーとして使用したものは、肺の炎症傷害時に変動するもの及び酸化的損傷が起きた時に増加するものなどである。しかし、一般的には、組織内では散在的に起こり、細胞の内容物はほとんど漏れ出さないために、通常の炎症反応はみられないと言われている。一方、ネクローシスの場合は、細胞の膨潤、融解、流出、崩壊などの炎症反応がしばしばみられる。今回アポトーシスに関連した現象としては、PSの多少の増加傾向がみられたことと、貪食細胞の有意の増加のみであった。以上のことから、本研究に使用したマーカーは、アポトーシスのマーカーとしては不適當であったのかもしれない。今後、もしアポトーシスを用いて毒性評価をしていくのであれば、アポトーシス過程のどの段階を捕え、それが実際の、いわゆる『個体の死』への評価につながるのかを明らかにしなくてはならないと考える。

ラットにパラコートを投与した際の主として酸化的ストレスの指標である8OHdG, SOD, GSHなどの変化を検討し、気管支肺胞洗浄液BALFのGSHが増加し、SODが低下することを見出した。

今田中伸哉：アポトーシスを指標にしたほ乳類培養細胞による毒性評価

本研究では、毒性物質を細胞に暴露した後、細胞の生存率とアポトーシスによる細胞死を定量的に調べ、アポトーシスを毒性影響の早期指標として適用できるか否かを検討した。今回の実験でアポトーシス誘発細胞数の定量的な計測が毒性評価に有用であることを示唆する結果が得られたが、形態学的観察では識別することが困難であった正常細胞と初期のアポトーシス細胞、アポトーシス小体とネクローシス細胞の境界を明確にすることが今後の課題である。定量化の精度を高めるには、細胞単位でアポトーシスを検出できる Tear drop assay を形態学的観察と組み合わせることが有効と考える。また、実験に用いたCHL細胞の感受性が低いことも考えられ、アポトーシスの検出により高感度な細胞株を検索する必要があると思われる。

ames(-), carcinogenesis(+)の数種の化学物質を培養細胞に暴露した際の従来の細胞毒性とアポトーシス誘導との関係を示し、アポトーシス誘発細胞数の定量的計測の有用性を示した。

山中すみへ：培養細胞を用いた化学物質の毒性評価法に関する基礎的研究

3種の細胞を用いた一般細胞毒性試験により化学物質のIC50(50%細胞死)を求め、げっ歯類における急性毒性や膜障害性との関係から細胞毒性試験の意義を検討した。さらに細胞死の一つであるアポトーシスに焦点を当て、化学物質によるアポトーシスの誘発を指標と

した毒性評価を試みる。それらの結果を哺乳動物を用いた *in vivo* 系での結果と比較検討することによって、*invitro* 系における毒性評価法として確立する。

1. 細胞種による IC50 値の比較：3 種の細胞を用いて、25 化学物質の細胞増殖抑制試験を行い、50%阻害濃度(IC50 値)を求め、細胞間の比較を行った。一般細胞毒性試験に用いる細胞としては、細胞の特異性が比較的少なく、継代培養の容易な CHL 細胞や Hela 細胞が適当であろう。

2. 試験法による IC50 値の比較：ニュートラルレッド(NR)法及びギムザ染色法、LDH 法の 3 種の細胞毒性試験法で IC50 値を求め、比較検討した。3 種の試験法のうち、LDH 法は水銀などのように直接活性阻害をもたらす被験物質では不適當であった。さらにフローサイトメトリーを用いて細胞の大きさや PI 染色によって細胞の生死の判定を試みた。CHL 細胞での NR 法、LDH 法、ギムザ染色法には大きな差はなかったが、フローサイトメトリーでは高値となり、試験法による違いがみられた。

3. 細胞毒性試験とげっ歯類での急性毒性試験との関係：*in vitro* での細胞毒性を *in vivo* での毒性と比較するために、げっ歯類で求めた経口 LD50 値との関係を検討した。刺激性物質を含めた場合には LD50 値と IC50 値とは相関性がみられなかったが、刺激性物質を除いた場合には有意な相関性がみられた

($r=0.814$, $r=0.84$)。

4. アポトーシスの誘導による毒性評価：水銀及びパラコートが CHL 細胞培養液中に添加して 24~96 時間培養後に、アガロースゲル電気泳動で分離したフラグメント化した DNA を紫外線下にてアポトーシス細胞の存在を調べた。水銀及びパラコートのこの濃度では細胞の生存率には影響がみられず、しかし水銀及びパラコートを添加して 48 時間以上培養した場合には、フラグメント化した DNA がみられ、アポトーシスの誘導を示唆した。

いくつかの化学物質と培養細胞を組み合わせ LD50 と IC50 との関係を、また細胞毒性として検出されない条件でのアポトーシス誘導を検出、アポトーシスが細胞毒性の高感度検出系である可能性を示唆した。

結論

急性毒性とアポトーシス、酸化ストレスとアポトーシスの関連性に関する新知見とその解析に向けた遺伝子改変動物の有用性を示すことができ、また *in vitro* の系では、従来の細胞毒性試験とアポトーシスを指標とした細胞毒性試験との関連についていくつかの新知見が得られた。本年度行われた成果から、*in vivo* では遺伝子改変動物の有用性、*in vitro* では IC50 とアポトーシス誘発濃度との関係で用いる培養細胞とアポトーシス誘発との関係等についてのデータが得られた。

様式 A (4) 別添 3

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)

分担研究報告書

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究

－アポトーシスを指標とした、遺伝子改変動物による毒性評価－

井上 達、菅野 純、平林容子、北嶋 聡、斎藤 実、松島裕子、宮城恵理、佐井君江、

金子豊蔵、川崎 靖

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・毒性部

研究要旨

本研究の巨視的な目的は、LD50 という「死」を基準とした、「毒物性、劇物性の強さの指標」に対して、死に頼らない「毒物性、劇物性の強さの指標」を探索することであり、毒性概念の深化を目指すことにある。この意義として、1)亜致死性毒性、即ち、死に至らないが、蓄積性もしくは時間の経過とともに、その延長線上で死に達するような、これまでの定義から外れていた「毒性」の把握を可能とする(「非パラケルス型毒性」)、また、2)潜在性低用量毒性、即ち、毒性と薬効の裏合わせになった物質や、毒性と薬効性が狭い閾値で裏合わせになったような化学物質(例えばセレンウムなど)に対して、低用量の潜在性毒性の如何を評価することを可能とする、さらに3)潜在性慢性毒性、即ち、「障害」と「個体の生死」の相互関係の中間指標に位置づけ可能な概念、例えば日常的な潜在的毒物摂取を対象とする方途が開ける、等が挙げられ、究極的に1)から3)の種々のレベルの毒性を一元的な共通軸で把握する見通しが期待される。

ここでは、この新たな「毒物性、劇物性の強さの指標」として、1)個体レベルでは、「加齢の促進」、即ち、即座に死に至らないが、時間の経過とともに寿命が短縮する「毒性」を、2)分子レベルでは、「DNAの死」とも考えられる「アポトーシス」により「DNAの断片化」を取り上げる。最近、黒尾らにより発見された、老化を抑制する遺伝子、クロート遺伝子の挙動もその一環として挙げる事ができる。この報告によれば、遺伝子改変動物を用いた解析から、このクロート単一遺伝子で、動脈硬化などの複合的な加齢変化が制御されていることが明らかになっている(Kuro-o M et al., Nature 390:45-51 1997)。従って、おそらく個体死を左右する細胞群において、分子レベルでのクロート遺伝子の変異は、アポトーシスを引き起こし、この加齢変化という個体のレベルの毒性を引き起こす可能性を示唆している。生体内のレドックスを司る遺伝子の一つであるチオレドキシシン遺伝子などの変異も、このクロート遺伝子と相互に関連している可能性が考えられる。

今年度は、上記の「加齢の促進」、「アポトーシス」が新たな「毒物性、劇物性の強さの指標」となり得るか否かを、主として遺伝子改変動物を用いたアポトーシスやその他の指標(8OHdG など)との関連性の検討[in vivo の系](井上、香川)および培養細胞を用いた従来の細胞毒性とアポトーシスとの関連性の検討[in vitro の系](小野、今田中、山中)に取り組んだ。

その結果、急性毒性とアポトーシス、酸化的ストレスとアポトーシスの関連性に関する新知見とその解析に向けた遺伝子改変動物の有用性を示すことができ、また in vitro の系では、従来の細胞毒性試験とアポトーシスを指標とした細胞毒性試験との関連についていくつかの新知見が得られた。

A. 研究目的

本研究の目的は、LD50 という「死」を基準とした、「毒物性、劇物性の強さの指標」に対して、死に頼らない毒物概念の深化を目指すことにある。この新たな指標としてアポトーシスを取り上げ、この検討を in vivo の系及び in vitro の系で行った。

B. 研究方法

平成9年度の実験結果を鑑み、平成10年度では以下の実験を行った。

[実験 1] 「p53 ノックアウトマウスにおける吸入毒性試験での感受性の変化について」

本実験は、発ガン感受性並びにその背景にある生物反応性を検定することにより、本マウスの毒性試験系あるいは早期発ガン試験系への有用性検討の基盤を作ることにある。

9-16 週齢の雄 p53 ノックアウトマウスの野生型、ヘテロ、ホモにベンゼンを 0, 33, 100, 300 ppm を全身暴露(1日6時間、週5日間、26 週間)し、回復期間中である。なお、一群各々24 匹とした。測定項目は、一般状態及び体重測定を行っている。

[実験 2.] 「チオレドキシシン・トランスジェニ

ックマウスにおけるパラコート誘発アポトーシスの標的臓器の解明と、その急性毒性に対する感受性の変化についての確認実験」

本実験は、平成9年度において予備試験を行った、チオレドキシシン・トランスジェニックマウスにおけるの感受性変化を再確認することにある。平成10年度の実験での変更点は、1) パラコート誘発アポトーシスが、より早く進行していることが示唆されたため、パラコート投与3 時間後に解剖する。2) 一群6 匹とする。3) 精巣における病理学的検索をより正確にするため、固定法としてブアン固定を行う。4) 精巣での増殖分化程度への影響を詳細に検討するため、セルソーターを用いた解析を行う。また、骨髄での増殖分化程度への影響も in vitro colony assay 等を用いて詳細に検討する。

10-12 週齢の雌雄チオレドキシシン・トランスジェニックマウスのヘテロ及び野生型にパラコートを 0, 8, 20, 50 mg/kg を投与用量 10 ml/kgBW で単回腹腔内投与し、投与3 時間後に解剖する。対照群(0mg/kg 投与群)は溶媒である滅菌生理食塩水を投与した。なお、群構成は一群6 匹とした。

C. 研究結果

[実験 1.] 各群のホモマウスは 21-39 週でほぼ全例が死亡し、死亡曲線はホモ、ヘテロ及び野生型の各群で特異な移動を示した。現在、病理組織学的検査を検索中である。また、「急性毒性」の指標としての LD50 に替わる指標を模索する過程で、「急性暴露」が生体(個体)の寿命にどの程度影響するか、その程度を指標とすることが、その一つの候補として考えられた。寿命の表記に関してはゴンペルツ関数(各時点での、その時点での死亡率の対数)を用い、寿命に対する「急性暴露」の影響をゴンペルツ関数の勾配(直線部分)の増減で現すことを考える。そうした場合、例えば、ベンゼン暴露を受けた p53 遺伝子欠失動物の寿命の短縮は、図 1 のようにベンゼン処置濃度に依存して顕著となり、また、図 2 のように p53 遺伝子の欠失の度合いに依存して顕著となることが示された。このことから、LD50 に替わる指標として、ゴンペルツ関数の勾配の変化が使用可能であることが示唆された。次の段階として、もしも、実験に供する動物の数の減少と実験期間の短縮、あるいは試験管内実験への完全移行を目指すには、ゴンペルツ関数の勾配変化に最も直結するバイオマーカーを模索する必要がある。これには、まず第一に、実験動物の特定標的臓器や、試験管内培養細胞を対象としたアポトーシスを取り上げてきた。今後、アポトーシスあるいは増殖調節に関連する遺伝子群の発現に対する影響を引き続き検討する。

[実験 2.]

1.. 全ての群において、死亡例は認められな

かった。

2. 一般状態の変化は、雌雄チオレドキシシ・トランスジェニックマウスの野生型ヘテロともに 50 mg/kg 投与群で、投与 2 時間後からうずくまり、努力性呼吸が弱く認められた。
3. 血液学的検査では、雌雄の野生型、ヘテロともに 50 mg/kg 投与群で白血球の減少傾向が認められた。この白血球の減少に関しては、Suntres と Shek らにより血液中の好中球の減少を観察し、肺へのその遊走との関連性を考察している(Biomed Environ Sci 8:289-300 1995)。しかし、我々の検索では血液中の好中球の減少は認められなかった。
4. 血清生化学検査及び臓器重量(絶対・相対)の測定値には、顕著な変化は認められなかった。
5. 現在、病理学的検索及び TUNEL 染色を検討中である。

D. 考察

アポトーシスに関する p53 ノックアウトマウスを用いた解析からベンゼン暴露による生存曲線が、野生型、ヘテロ、ホモで移動することが明らかとなり、遺伝子改変動物の有用性を示唆した。チオレドキシシ・トランスジェニックスを用いてパラコート投与による早期のアポトーシス誘発の変化の有害性を解析中である。

E. 結論

急性毒性とアポトーシス、酸化的ストレスとアポトーシスの関連性に関する新知見とその解析に向けた遺伝子改変動物の有用性を示

すことができた。本年度行われた成果から、
in vivo では遺伝子改変動物の有用性について
のデータが得られた。

Benzene toxicity to accelerate the mortality

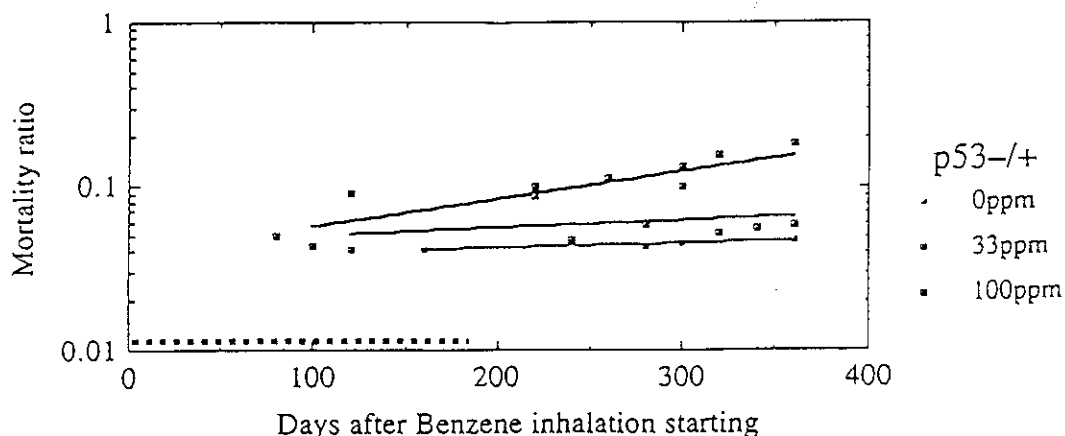


図1. ベンゼン吸入濃度によるゴンペルツ関数の変化

Characteristics of p53 K.O. mouse

p53 deficiency

to accelerate the mortality

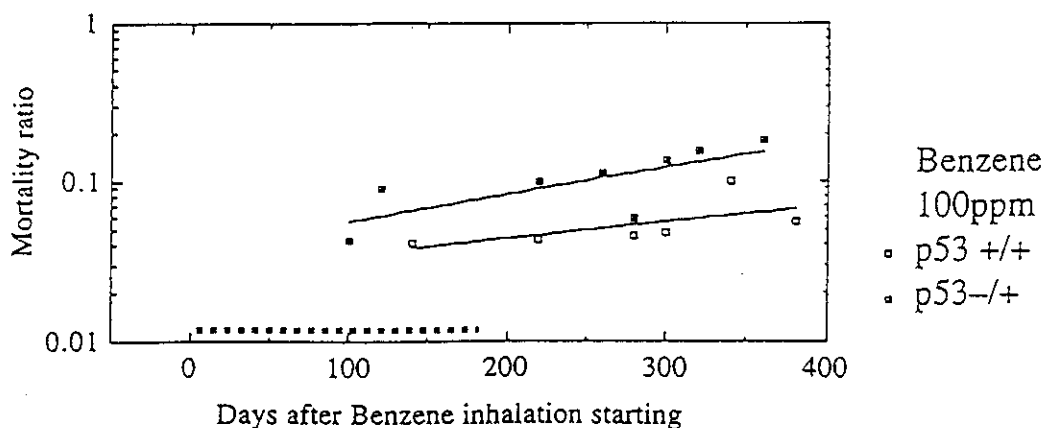


図2. ベンゼン暴露における p53 遺伝子欠損マウスによるゴンペルツ関数の変化

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)
分担研究報告書

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究

アポトーシスを指標とした培養細胞による毒性評価のための基礎的検討

小野 宏、田中憲穂、佐々木澄志

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨

細胞毒性の結果からヒトに対するおよその毒性を予知出来るのであれば、当然、細胞死のメカニズムについても調べる必要がある。本研究では、細胞死の一つであるアポトーシスに焦点を当て、培養細胞や化学物質の種類を変えることで、培養細胞を用いたアポトーシスの実験系を検討した。本年度は、これらの薬剤のうち特に、内分泌攪乱物質の一つとして注目されている合成エストロゲンであるDiethylstilbestrol (DES) が、低血清濃度の条件下で強力にアポトーシス誘導作用を示すことを見出した事から、その作用の特異性に焦点を当てた。この結果から、低血清培地における細胞毒性作用は、DES特異的であり、細胞の動物種及び組織に関係なく誘導され、さらにエストロゲン受容体を介さない作用であることが示唆された。また、DESによる低血清培地における強い増殖阻害作用はアポトーシスであり、細胞の種類によって、アポトーシスに伴って断片化されるDNAのサイズが異なることが示唆された。また、血清中にアポトーシスを阻害する物質が含まれていることが示唆され、化学物質の種類によっては、通常の培養条件においてアポトーシスが誘導されにくいことが分かった。また、DNAラダーを指標としてアポトーシスを解析する場合、用いる細胞の選択が重要であることが見い出された。

A. 研究目的

細胞毒性、いわゆる1個の細胞死が組織を経て個体レベルでの死亡に結びつくには、化学物質固有の作用機序もからみ機構的に解明されるべき多くの課題が残されている。最近、スウェーデンの研究者が、細胞毒性で急性毒性をどの程度予知出来るかというねらいで、世界中の細胞毒性の研究者に呼び掛けて、ヒトに対する毒性が明らかになっている50種類の化学物質を用いて、それぞれの細胞毒性試験系でIC50値(50%細胞死)の提出を求めた。その結果、ヒト血中濃度と各試験系におけるIC50値の間には、極めて高い相関関係が得られることが分かっ

た。

この様に、細胞毒性の結果からヒトに対するおよその毒性を予知出来るのであれば、当然、細胞死のメカニズムについても調べる必要がある。細胞毒性の発現メカニズムは、化学物質により多くのパターンがある。細胞内諸器官の機能に影響を与える物質、例えば、ミトコンドリア酵素の発現などを阻害して毒性を示す物質、細胞分裂を阻害する物質、DNAに傷害を与える物質、界面活性剤の様に細胞膜を容易に溶かす物質、その他に、浸透圧やpHなどにおいて、細胞にとって非生理的な条件を生じさせる事により細胞死を起こす物質など様々である。もちろ

ん、この細胞死にはアポトーシスによる場合も含まれる。

シスプラチンに代表される抗癌剤などがアポトーシスを誘導し、その結果、細胞を死滅させることが培養細胞を用いた実験から分かってきた。さらに、このようなDNA傷害物質のみならず、ある培養条件によってもアポトーシスが誘導されることが分かりつつある。例えば、低血清濃度の培地において癌遺伝子であるmyc遺伝子を発現させるとアポトーシスが誘導されることが示され、また増殖因子であるIGF-1、HGF、TGF- β 1がアポトーシスに影響を与えることが明らかとなってきた。これらのことから、培養細胞のアポトーシスが毒性評価の新しい指標と成り得るかどうか検討する場合の要件として、用いる細胞の特性、及び培養条件が結果に大きな影響を与えることが考えられる。また、増殖因子に代表されるタンパク質のみならず、種々の化学物質もアポトーシスを誘導することが見出されている。

本研究では、細胞死の一つであるアポトーシスに焦点を当て、培養細胞や化学物質の種類を変えることで、培養細胞を用いたアポトーシスの実験系を検討した。

初年度は、v-H-ras遺伝子をBALB 3T3細胞に導入した細胞を用い、作用機序が異なるアポトーシス誘導物質を幾つか添加し、H-rasの細胞毒性作用に与える影響を調べたが、対照であるBALB 3T3細胞と比較してあまり大きな違いは認められなかった。

本年度は、これらの薬剤のうち特に、内分泌攪乱物質の一つとして注目されている合成エストロゲンであるDiethylstilbestrol (DES) が、低血清濃度の条件下で強力にアポトーシス誘導作用を示すことを見出した事から、その作用の特異性に焦点を当てた。DESは、ヒトに対して発癌性を示すが、細胞では微小管の重合を阻害し、倍数性及び異数性の染色体数を誘導することから、これが腫瘍形成の要因の一つと考えられている。DESによるアポトーシスの誘導機

構を調べるため、DES以外の作用機序の異なるアポトーシス誘導物質を用いて、その作用を比較した。また、エストロゲン受容体を持つ細胞と持たない細胞を含む種々の細胞を用いて、DESがエストロゲン受容体を介してアポトーシスを誘導するのかどうか検討した。

B. 研究方法

細胞

BALB 3T3 A31-1-1細胞 (マウス全胎児)、V79 (チャイニーズハムスター肺)、Vero (アフリカミドリザル腎臓)、HeLa (ヒト子宮頸癌、エストロゲン受容体欠如)、MRC-9 (ヒト正常線維芽細胞)、MDA-MB-231 (ヒト乳癌、エストロゲン受容体欠如)、MCF7細胞 (ヒト乳癌、エストロゲン受容体所有) は、牛胎児血清 (FCS) を10%含むイーグルMEM培地を用いて培養した。

化学物質

DES (微小管重合の阻害)、actinomycin D (RNA合成の阻害)、cisplatin (DNAへの結合)、taxol (微小管重合の促進、さらに微小管の安定化および過剰形成の誘導)、paraquat (ラジカル生成)、VP-16 (topoisomerase II の阻害) を用いた。

生存細胞数の測定

細胞 (2~20×10⁴個) を6穴プレートに播種した。血清不含のMEM培地で1回洗った後、FCSを0.5または10%含むMEM培地と交換すると同時に各化学物質を添加した。0.25%トリプシン溶液で剥がした後、0.02%エリスロシンB溶液で染色し、生存細胞数を数えた。

細胞核の観察

ラブテックチャンバーに培養した細胞をメタノールで固定後、Hoechst 33258 (0.5 mg/ml)

で核を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

DNAラダーの検出

細胞 (1~5×10⁶個) を0.4 mlの細胞融解液 (10 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、0.5% Triton X-100) で融解し、氷上に10分放置した後、10000 rpmで10分遠心した。DNA断片を含む上清をRNase A (50 mg/ml、37°C、1時間)、さらにProteinase Kで処理した後 (50 mg/ml、37°C、1時間)、フェノール・クロロホルム抽出を行った。これをエタノール沈殿した後、18 mlのローディングバッファーに溶かし、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。ゲルをエチジウムブロマイド 1 mg/mlで染色後、UVトランスイルミネーターでDNAラダーを観察した。

C. 研究結果

BALB 3T3細胞 (マウス全胎児) にDES (5 mg/ml) を処理すると、増殖はFCSの濃度が低くなるに従って抑制され、36時間後における細胞増殖は、10% FCSでは約50%抑制されたが、FCS 0.5%では殆どの細胞が死滅した。またFCS 0.5%の培地では、細胞はDESを添加してから3時間後には委縮し球形となり、核の凝縮が観察された。このような、低血清の条件下における強い細胞毒性作用は、他の細胞 (V79: チャイニーズハムスター肺、Vero: アフリカミドリザル腎臓、HeLa: ヒト子宮頸癌でエストロゲン受容体欠如、MRC-9: ヒト正常線維芽細胞、MDA-MB-231: ヒト乳癌でエストロゲン受容体欠如、MCF7細胞: ヒト乳癌でエストロゲン受容体所有) を用いても見られたが、DES以外の化学物質 (cisplatin、taxol、paraquat、VP-16) では認められなかった。

FCS 0.5%の培地にDESを添加し、24時間後の細胞からDNA断片を抽出したところ、V79細胞において明瞭なDNAラダーが検出された。一方、他の細胞では、DNAスメアは観察されるもののDNAラダーはわずかに確認されるか

(BALB 3T3細胞など)、または全く認められなかった (MRC-9細胞など)。しかし、このような細胞によるDNAパターンの違いは、actinomycin D (0.5 mg/ml) 及びcisplatin (10 mg/ml) を用いても確認された。

これら一連の結果から、低血清培地における細胞毒性作用は、DES特異的であり、細胞の動物種及び組織に関係なく誘導され、さらにエストロゲン受容体を介さない作用であることが示唆された。また、DESによる低血清培地における強い増殖阻害作用はアポトーシスであり、細胞の種類によって、アポトーシスに伴って断片化されるDNAのサイズが異なることが示唆された。

DESのBALB 3T3細胞における増殖阻害作用

BALB 3T3細胞を10% FCS添加培地で培養後、0~10% FCSの培地と交換し36時間後の細胞数を測定すると、血清濃度の低下とともに細胞数が減少し、1%以下のFCS添加培地では、10% FCSと比較して40%以下の細胞増殖を示した。一方、培地交換時にDES (5 mg/ml) を添加すると、10% FCSの培地では対照群と比較して約50%の増殖阻害が見られたが、0.5% FCS以下の培地においては殆どの細胞が死滅した (図1A)。

またDESは、0.5または10% FCSの両方の培地において用量に依存して細胞の増殖を阻害したが、FCS 0.5%の培地では強い細胞毒性作用を示し、5 mg/ml以上の濃度において殆どの細胞が死滅した (図1B)。

アポトーシス誘導物質のBALB 3T3細胞における増殖阻害作用

低血清濃度の条件下において、DESが強い細胞毒性作用を示したことから、DES以外の化学物質においても同様の現象が見られるかどうか検討した。アポトーシスを誘導すると報告されており、またそれぞれ作用機構が異なっている4種類の化学物質 (cisplatin、paraquat、taxol

、VP-16) とDESを用い、BALB 3T3細胞の増殖に対する影響を調べた。経時的に細胞数を測定するため、各化学物質の濃度は10% FCSの培地に添加した場合、3日間処理後も細胞を完全に死滅させない濃度とした。

BALB 3T3細胞を10% FCS添加培地に播種した翌日、0.5% FCSの培地と交換すると、細胞数は翌日までは増加したが、培地交換2日目には減少した(図2A)。一方10% FCSにおいては、細胞は増殖を続け、培地交換2日目には飽和密度状態となり、その後細胞数は緩やかに減少した(図2B)。このように0.5と10% FCSの培地における対照群では増殖のパターンが異なるが、DES以外の化学物質では両方の培地において、3日間処理後も細胞の生存が確認された。DESのみが0.5% FCS添加培地において急激な細胞死を誘導し、DESを添加してから12時間後には殆どの細胞が死滅した(図2)。

DESの種々の細胞における増殖阻害作用

DESのみが、低血清濃度の培地にすることで強力な細胞毒性作用を誘導し、他の化学物質ではそのような作用は見られなかったことより、この作用はDES特異的であることが分かった。そこでDESは、BALB 3T3細胞以外の細胞に対しても低血清濃度の条件下にすると早く細胞を死滅させるのかどうかを調べるため、BALB 3T3細胞と異なった動物種及び組織の6種の細胞(V79、Vero、HeLa、MRC-9、MDA-MB-231、MCF7細胞)を用いて検討した。なお、DESは細胞内のエストロゲン受容体に結合し、さまざまな作用を有することが知られている。さらに細胞の種類においては、エストロゲン受容体を持っている細胞と持っていない細胞があることが報告されている。このことから、エストロゲン受容体を持っていない細胞としてHeLa及びMDA-MB-231細胞を、持っている細胞としてMCF7細胞を用い、DESによる細胞毒性作用がエストロゲン受容体を介したのかどうかを検討した。

各細胞は、播種後4日目に50%からsubconfluentの状態になるように播種数を変えた。0.5または10% FCSの培地と交換と同時にDES(5 mg/ml)を処理し、36時間後に細胞数を測定した。その結果、動物種及び組織、さらにエストロゲン受容体の有無に関らず、DESは0.5% FCSの培地において、全ての細胞に対して強い増殖阻害作用を示した(図3)。

DESによるDNAラダーの誘導

DESは、細胞の動物種及び組織、さらにエストロゲン受容体の有無に関係なく、低血清濃度の培地において急激に細胞を死滅させた。またBALB 3T3細胞の形態及び核を観察すると、FCS 0.5%の培地において、DES(5 mg/ml)を添加してから30分後に細胞の形態変化が始まり、3時間後には殆どの細胞が委縮し球形となった。この時、核の凝縮が観察された。これらの結果は、DESによる細胞死はアポトーシスであることを強く示唆している。そこで、アポトーシスに伴う最も特徴的な変化と考えられているDNA断片化について、DNAラダーを観察することで検討した。

FCS 0.5%の培地にDESを添加し、24時間後の細胞からDNA断片を抽出したところ、V79細胞において明瞭なDNAラダーが検出された(図4)。一方、他の細胞では、DNAスメアは観察されるもののDNAラダーはわずかに確認されるか(BALB 3T3細胞など)、または全く認められなかった(MRC-9細胞など)。典型的なDNAラダーはV79細胞にしか観察されなかったことにより、DESによる細胞死は各細胞において異なる機構によるものなのか、それともアポトーシスによるDNA断片化は細胞の種類によって違うのかどうか調べるために、FCS 10%の培地において、各細胞にactinomycin D(0.5 mg/ml、24時間処理)及びcisplatin(10 mg/ml、48時間処理)を添加しDNAラダーを観察した。その結果、DES処理で見られたような細胞によるDNAパターンの違いは、

actinomycin D及びcisplatinにおいても確認された。

D. 考察

今回調べた化学物質において、DESのみが低血清培地で強力な細胞増殖阻害作用を示した事により、この作用はDES特異的と考えられた。さらに、この細胞毒性作用は、細胞の動物種及び組織に関係なく誘導され、さらにエストロゲン受容体を介さない作用であることが示唆された。また、DESによる低血清培地における強い細胞増殖阻害作用はアポトーシスであり、細胞の種類によって、アポトーシスに伴って断片化されるDNAのサイズが異なることが示唆された。

本研究により、血清中にアポトーシスを阻害する物質が含まれていることが示唆され、化学物質の種類によっては、通常の培養条件においてアポトーシスが誘導されにくいことが分かった。また、DNAラダーを指標としてアポトーシスを解析する場合、用いる細胞の選択が重要であることが見いだされた。

E. 結論

この系において、低血清培地における細胞毒性作用は、DES特異的であり、細胞の動物種及び組織に関係なく誘導され、さらにエストロゲン受容体を介さない作用であることが示唆された。また、血清中にアポトーシスを阻害する物質が含まれていることが示唆され、化学物質の種類によっては、通常の培養条件においてアポトーシスが誘導されにくいことが分かった。また、DNAラダーを指標としてアポトーシスを解析する場合、用いる細胞の選択が重要であることが見いだされた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki, K., Mironov, N., Yilmaz, A., Lahm, H., Odartchenko, N., Yamasaki, H.:

Malignant transformation of simian virus 40-immortalized human milk epithelial cells by chemical carcinogenesis accompanied by loss of heterozygosity on chromosome 1 but not microsatellite instability. *Mol. Carcinog.* 23, 20-24 (1998)

Yamakage, K., Kusakabe, H., Tanaka, N.: Comparative studies of MCL-5 cells and human lymphocytes for detecting indirect-acting clastogens. *Mutation Res.* 412, 55-61 (1998)

2. 学会発表

内分泌攪乱作用の検出のための *in vitro* 試験法 - 受容体結合試験を中心として -

In vitro 発生毒性研究会(1998年11月、大阪)

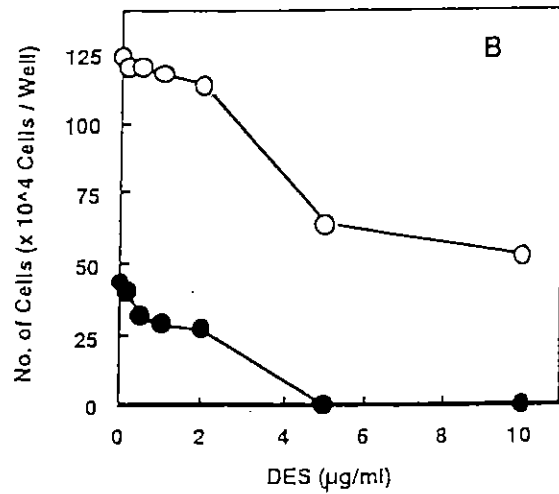
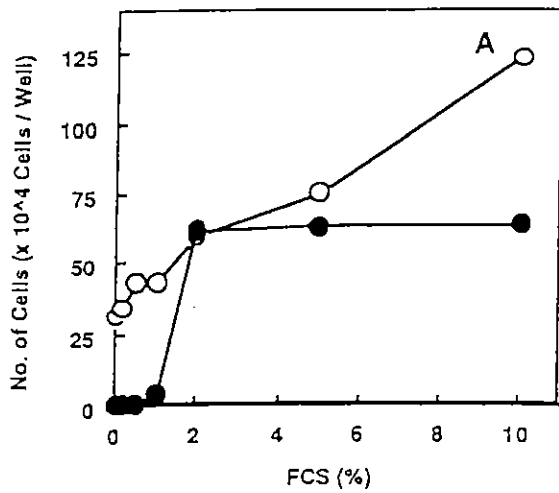


図1 DESのBALB 3T3細胞における増殖阻害作用

細胞を6穴プレートに 2×10^4 個播種し、4日間培養した。FCSを含むMEM培地と交換すると同時にDESを添加した。36時間後に生存細胞数を数えた。

A: FCSの濃度の影響 (○: 対照、●: DES 5 µg/ml)、B: DESの濃度の影響 (○: 10% FCS、●: 0.5% FCS)。

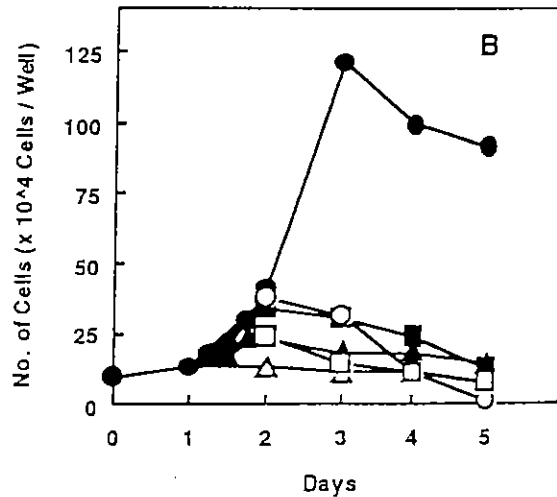
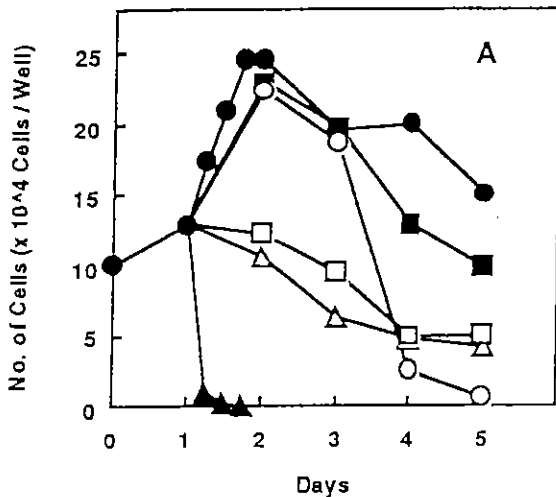


図2 アポトーシス誘導物質のBALB 3T3細胞における増殖阻害作用

細胞を6穴プレートに 10^5 個播種した。翌日、FCSを0.5または10%含むMEM培地と交換すると同時に各化学物質を添加し、経時的に生存細胞数を数えた。

A: 0.5%血清、B: 10%血清、●: 対照、▲: DES 5 µg/ml、■: cisplatin 3 µg/ml、○: paraquat 100 µg/ml、△: taxol 5 µg/ml、□: VP-16 3 µg/ml。

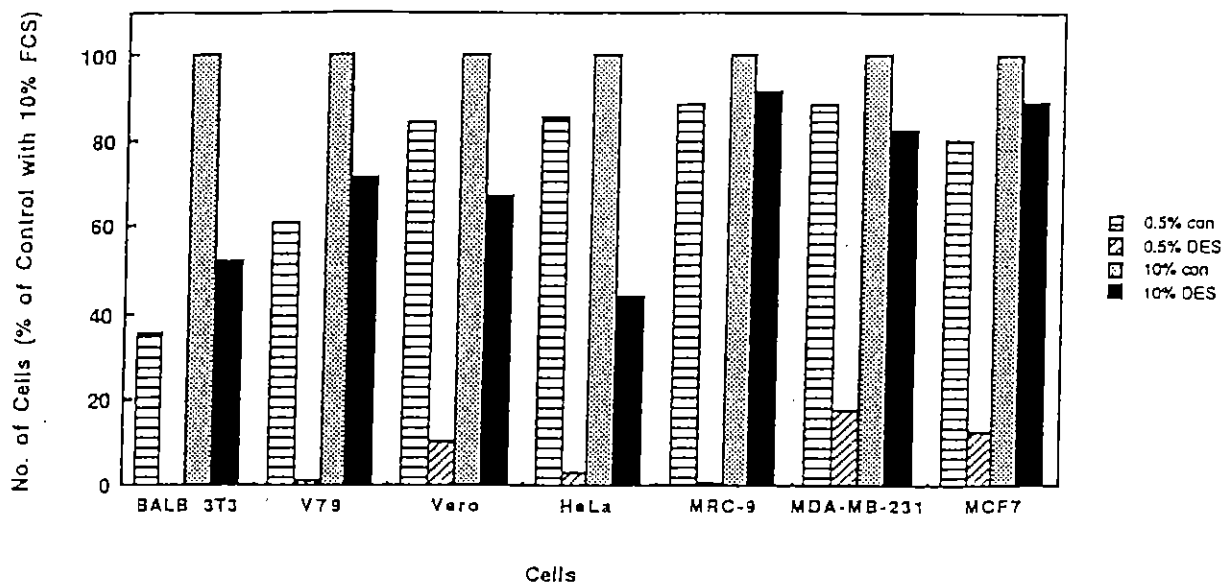


図3 DESの種々の細胞における増殖阻害作用

細胞を6穴プレートに播種し、4日間培養した。0.5または10%FCSを含むMEM培地と交換すると同時にDES (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。36時間後に生存細胞数を数えた。

播種数: 2×10^4 個 (BALB 3T3、V79、Vero、HeLa細胞)、 10^5 個 (MRC-9、MDA-MB-231細胞)、 2×10^5 個 (MCF7細胞)。

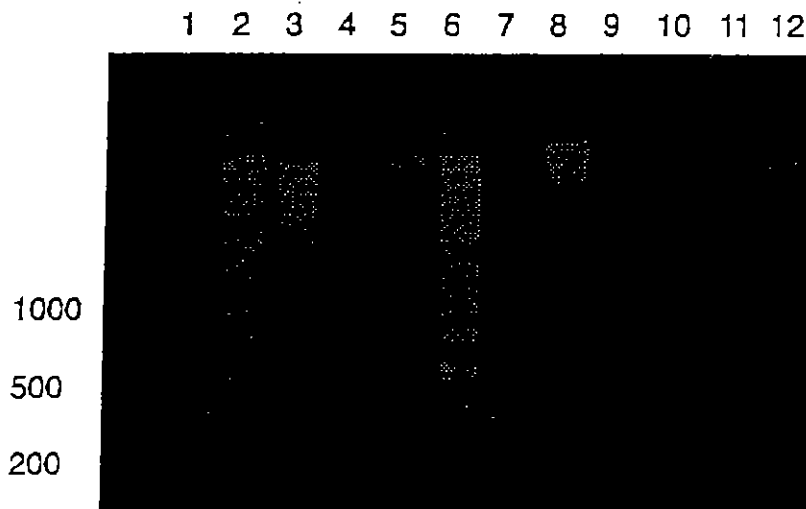


図4 DESによるV79及びMRC-9細胞におけるDNAラダーの誘導

0.5または10%FCSを含むMEM培地と交換すると同時にDES (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及びactinomycin D (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、DNA断片を調製した。

レーン1~6: V79細胞、レーン7~12: MRC-9細胞、レーン1~3及び7~9: 0.5% FCS、レーン4~6及び10~12: 10% FCS、レーン1、4、7、10: 対照、レーン2、5、8、11: DES 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、レーン3、6、9、12: actinomycin D 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)

分担研究報告書

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究

動物を用いたアポトーシスを指標とした毒性評価とその他の指標との比較

香川 順、山野優子、徳武智子、稲村尚子、松村賢一、加藤孝道

東京女子医科大学医学部衛生学公衆衛生学教室

研究要旨

ラットにパラコートを単回投与することにより、アポトーシスが誘発されるいわゆる標的臓器を解明するための前実験として、各種生体影響について検討を加えた。その結果、投与後 4 時間以降 24 時間までにおいては、明らかなアポトーシスと思われる変化は認められなかった。しかし、特に 80mg/kg 高濃度投与群において、BALF 中の PS、SOD、GSH に、また肺、脳、脾臓中の 8OHdG に多少の変化が認められたことから、活性酸素の産生やアポトーシスが起る前段階の変化が起きている可能性が示唆された。今回の実験では、投与量を他臓器と同濃度の 50mg/kg に下げ、また、投与後早期である 1 時間と 4 時間について観察し、特にそのマーカーとしては、8OHdG を選択した。投与後 1 時間および 4 時間後において、明らかなアポトーシスと思われる変化は認められなかった。しかしながら、PQ 群において尿中 8OHdG、蛋白質、CRE の減少傾向が認められたことは、パラコート投与により生体内へ何らかの影響があったものと推測された。今回の実験系では、パラコートによるショックモデルのようになってしまったので、排泄が抑制された可能性はあった。このように、物質により反応の動きが異なるものを、劇毒物の毒性評価として用いるのは難しいのではないかと考える。しかし、アポトーシス過程の、細胞死の寸前、それも不可逆的な時点を捕える手法があるならば、それは従来の LD50 に変わりうる指標になると思われる。今後、もしアポトーシスを用いて毒性評価をしていくのであれば、アポトーシス過程のどの段階を捕え、それが実際の、いわゆる『個体の死』への評価につながるのかを明らかにしなくてはならないと考える。

A. 研究目的

ラットにパラコートを単回投与することにより、アポトーシスが誘発されるいわゆる標的臓器を解明するための前実験として、各種生体影響について、従来の当教室のデータと比較可能な項目を測定し、検討を加えてきた。その結果、投与後 4 時間以降 24 時間までにおいては、明らかなアポトー

シスと思われる変化は認められなかった。しかし、特に 80mg/kg 高濃度投与群において、BALF 中の PS、SOD、GSH に、また肺、脳、脾臓中の 8OHdG に多少の変化が認められたことから、活性酸素の産生やアポトーシスが起る前段階の変化が起きている可能性が示唆された。また、投与量が多かったため、高濃度投与群が 6 時間までに死亡して

しまったことと、従来アポトーシスはもう少し早期に起こるのではないかと考えられていることから、今後の実験では、投与量、観察時間について検討を加える必要があると思われた。

そこで今回の実験では、投与量を他機関と同濃度の50mg/kgに下げ、また、投与後早期である1時間と4時間について観察することとした。特にそのマーカーとしては、8OHdGを選択した。なお、8OHdGはGC→TAのトランスバージョンを引き起こし、またp53遺伝子異常の多くにこの現象がみられることから、8OHdG生成とp53遺伝子変異との関係が示唆されており、正常なp53遺伝子が作り出す蛋白は、遺伝子転写や細胞増殖のレギュレーターや、DNA損傷によるアポトーシスへの関与などが考えられている。

B. 研究方法

- 1) 動物：SPF-Wistar Male Rat 10W
- 2) 被験物質：Paraquat(1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium Dichloride 98%sol.:Code No. D0713, 東京化成)
- 3) 投与濃度：50.0mg/kg 体重、腹腔内投与(PQ群)、control(滅菌生理食塩水 1ml/200g 体重：Cont群)
- 4) 投与期間：投与1時間および4時間後にネブプター麻酔下で解剖。
- 5) 測定項目：投与前後で体重測定、状態を観察。血液検査は、血算、白血球分画、血清AST、ALT、LDH、ALP、TP、PL、Glu、BUN、CRE、SIAL、VE、SOD、Fucose、コルチコステロンの測定。気管支肺胞洗浄液(BALF)検査は、細胞数、LDH、ALP、BUN、ELF、PL、SOD、TP、GSH、Fucose、SIAL、PC、PE、PG、PI、PSの測定。各種臓器(脳、肺、脾臓、胸腺)、末梢白血球中、血清、尿中8OHdG

の測定。

【結果の扱い、検定法】

各群のn数は右表に示したとおりである。

投与後解剖までの時間	PQ群	Cont群
1時間	4匹	4匹
4時間	5匹	4匹

PQ1時間群で一部BALF量の不足したものがあつた。

それらの検体については、2匹を混ぜて測定した。また、PQ1時間群で採尿できなかったものについては測定から省いた。

検定は、投与の有無と屠殺時間の交互作用について二元配置の分散分析を行い(図中*: $p<0.05$ 、**: $p<0.01$)、交互作用があつたものは、パラコート投与による影響ありと評価し、経時的要因を考慮して考察することとした。また、交互作用の認められなかつた項目については、経時的要因は無視できるものと判断し、各時点における投与の有無による2群間の比較を行った(図中 a: $p<0.05$ 、b: $p<0.01$)。

C. 研究結果

(1)一般所見(図1)：

ラットの状態は、Cont群およびPQ1時間群においては、全て異常は認められなかつたが、PQ4時間群で、投与後2時間30分くらいに5匹とも鼻血が漏出した。投与後3時間30分くらいで1匹に喘ぎ呼吸、2匹に歩行異常が認められ、全動物ともうずくまり状態が多くなり動きが鈍くなつてきた。屠殺前には全動物に歩行異常が認められ、さらに2匹が喘ぎ呼吸となつた。体重は、Cont群が投与後約1.6%減少したのに対し、PQ群では約3.9%減少した。

(2)臓器重量(図2)：

臓器重量は、被験物質の影響を客観的に捕えるた