

めに、病理組織学的検索同様、非常によい毒性評価のパラメーターである。

本実験では、急性期における影響ではあるが、各臓器の実測値および、相対重量（対体重および対脳重量）について観察した。なお、相対重量については、通常は、対体重について行うが、最近では脳重量に対する対脳重量値についても合わせて算出し、両者を総合して評価した方がよりその被験物質の毒性を評価できると言われているので両者について示した。

その結果、肺のみが、絶対量および相対体重量ともに低下したが、この理由は不明である。

また、ショック状態に陥った場合、急性期に脾臓重量が減少すると言われており、前回の実験においても、投与 24 時間後において 12.8 および 32mg/kg 投与群で、有意ではないが濃度依存的に低下した。しかし、今回の観察期間は 4 時間までであるので、より早期である。後述するように、他の一般症状や生化学データから、ショック状態に陥った可能性が示唆されてはいるが、臓器重量からは、特にショック状態のような変化は認められなかった。

(3)血液（図 3）、尿所見（図 4）：

性状は、血液、尿ともに PQ1 時間群が、非常に粘調であった。血液検査においては、Ht、Hb に、曝露の有無と時間との間に交互作用が認められた。白血球分画では、急性炎症反応において最も速やかに反応し、食食能も示す T-Neu が、PQ 群 4 時間で有意に増加した。一般生化学検査においては、TP が PQ4 時間群において有意な増加が認められた。Glu は、PQ1 時間群において有意に増加した。Glu の顕著な増加は、肝機能障害があるか、または中枢神経系への障害が起きた時にみられるもの

である。しかし AST や ALT の有意な変化はなかったことから肝機能への影響は考えにくい。痙攣等も観察されてはいないが、中枢神経系への影響が起きた可能性もあった。活性酸素の消去作用がある SOD や VE には顕著な変化は認められなかった。また重篤な腎機能障害が起こると、血清中の CRE や BUN の増加が認められるが、BUN には変化がなく、CRE に交互作用はあったが一定の傾向はなく、PQ4 時間群でむしろ有意な低下した。また、尿中においても CRE や TP が、PQ 投与群で有意に低下した。腎機能に障害が起きた場合、通常は尿中 CRE が増加する傾向にあり、排泄系に傷害が起これば血清中 CRE が増加するはずである。また肝機能の異常も認められていない。パラコート投与により、この両者ともが急性期に有意に減少したことは、通常ヒトの場合では考えにくい。多臓器不全や、細胞死までいかないが細胞が非常に弱った状態になった時などに、Na が細胞内に入ってしまう現象がある。今回 Na などの電解質や CK の測定は行っていないが、もしかしたら、同様の現象が起きて、細胞内などのサードスペースに CRE が滞留してしまった可能性も示唆された。また、いわゆるショック状態に陥ったとしたら、副腎皮質ホルモンが増加するはずである。現在ラットにおいて測定可能な項目としては、ACTH とコルチコステロンがあり、コルチコステロンがヒトでいうところのコルチゾールの最終産物で、ショック時の比較的急性期に増加するとされている。その結果、PQ1 時間群において有意に増加し、4 時間では多少戻る傾向が認められた。この結果は一般症状や他の所見を裏付けているものと思われた。

(3)気管支肺胞洗浄液 BALF 所見(図 5)：

回収率は、PQ 群で有意差はないが低下傾向にあった。特に投与 1 時間後においては気管支攣縮があったのか約 20%にまで減少したものがいた。また、血清と BALF 中の BUN 値から、回収された BALF 中の末梢気道と肺胞に存在する上皮被覆液 (ELF) 量を算出したところ、PQ 群で低下傾向はみられたが有意ではなく、その他細胞傷害と肺胞/毛細血管バリアの透過性亢進を示す TP、ALP、LDH にも変化はみられなかったことから、血管透過性はあまり亢進していないものと推測できた。また、細胞数にも変化はみられず、肺胞への炎症細胞などの遊走はなかったことが推測された。細胞分画では、すべての細胞において有意差は認められなかった。しかし、PQ4 時間群において、PMN が低下し、Lym が増加する傾向はみられた。Type-II 細胞から分泌される肺サーファクタント (PL、PC、PE、PG、PI、PS) は、一部有意ではないが、PQ1 時間群で増加し 4 時間では低下する傾向がみられた。アポトーシスとの関連において、細胞膜上で PS が漏出する現象がみられることが報告されており、この結果は興味深い。その組成の割合は、ほとんどの物質で変化はなかったが、PE で PQ4 時間群で有意に低下した。気道の炎症時に招来され、気道粘液の過分泌に伴い高濃度を示すことが報告されている SIAL と Fucose については、Fucose は PQ1 時間群で有意に増加した。また、Fucose は分泌液由来の成分であるが、SIAL は血液由来との混合物として測定している可能性があるため、SIAL と Fucose の比をみると、PQ4 時間群で有意ではないが増加傾向がみられ、多少の血液の漏れ出しがあったことが示唆された。抗酸化物質である SOD、GSH については、SOD は PQ4 時間群で有意に低下し、GSH は PQ 群で

時間とともに増加した。BALF 中 GSH の由来や増加のメカニズムは不明である。しかし、細胞外に存在する GSH は、被検物質やその刺激により貪食細胞で産生・放出された活性酸素から肺組織を保護するために作用している可能性があることから、活性酸素が産生された可能性も示唆された。

(4)白血球、組織、血清、尿 8OHdG(図 6) :

8OHdG は、活性酸素によって DNA が損傷を受けた結果生じることが明らかにされている物質で、活性酸素発生に伴う DNA の酸化的損傷マーカーのひとつである。今回、尿中 8OHdG のみが、PQ 群で有意に低下した。その他血清および白血球、各組織においては顕著な変化は認められなかった。尿中 8OHdG の意義および血清、白血球中との関係については不明の点も多く、まだ明らかになっていない。しかし、尿中に排泄されてくる 8OHdG は、理論的には核酸がゲノムにのる前に酸化され、それが排泄されたものであり、ゲノム上以外の体内で生成された 8OHdG の全量を反映しているとも考えられている。また白血球中 8OHdG は、ゲノムにのってから酸化ストレスを受けたものと言われている。しかし、8OHdG が生成された後の修復能の違いによっても排泄の程度が異なってくると思われるので解釈は難しい。今回、尿量の測定はできなかったが、それを補正する意味で、CRE 補正を試みた。その結果、低下傾向はあるものの有意ではなくなった。活性酸素産生毒性があると思われるパラコートを投与することで、生体内の、特にゲノムにのる前の、プールされた核酸の酸化を減少させるということは考えにくい。この結果は、生体内での 8OHdG の生成量が減ったのではなく、パラコート投与により何らかの急性腎機能障害が起きたのかもしれない。しかし、ヒト

の場合は、腎機能が低下するのは、摂取後 12 時間以降であるとの報告もある。事実、クレアチニン補正をしてみると、その減少の程度は有意ではなくなる。しかし、腎機能に異常が起きたならば、単純にクレアチニン補正して評価することにも疑問は残る。または他の組織へ何らかの障害が起きた結果、多臓器不全のようなショック状態となり、修復能の低下、または排泄が遅れた可能性も示唆された。

D. 考察

ラットへのパラコート単回投与早期について観察した。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。実際に尿中 8OHdG が減少したのであれば、8OHdG による p53 遺伝子変異は起こりにくく、通常通りのアポトーシス過程をたどると思われる。つまりパラコートにより何らかの影響が出れば、その傷害を持った細胞を排除すべくアポトーシス現象が誘導されるはずである。しかし、活性酸素を発生すると言われていたパラコート投与により、8OHdG の生体内生成量が減少することは考えにくい。事実、補正した値で捕えてみると、有意差はなくなっている。但し、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。それでは、逆に、8OHdG の生成量が増加したとしたならば、仮説ではあるが p53 遺伝子変異の頻度を高めることになり、p53

遺伝子に変異が起きれば、むしろアポトーシスを抑制する方向に働くはずである。すなわち、本実験のようなパラコート投与の場合、アポトーシスの促進ではなく、間接的な抑制をみているのかもしれない。アポトーシス抑制による疾患には、がんや自己免疫疾患やウイルス感染などがあり、発がん物質以外のパラコートのような化学物質でも、抑制的に働くことがあるものと思われた。

本研究班では、化学物質の毒物性、劇物性の毒性の強さを LD50 値（動物の死）だけから評価するのではなく、死に至るそれ以前に生体内に起こりうる影響の程度をアポトーシスを指標として、細胞レベル、遺伝子レベルで捕えることを目的とすることで始まった研究である。アポトーシス機能としては、発生過程や成熟個体において、生体の中で不要になった細胞を除去することや、突然変異や傷害を受けて異常をきたし有害となる細胞を、積極的に排除する生体防御的な役割などが考えられている。つまり、正常状態でもこの現象は起きるし、また何らかの傷害が起きてもアポトーシスは実行されるわけである。さらには、ある物質の場合は、前述したように、生体防御のために抑制的に働き、またある物質の場合は逆に促進的に働いたりもする。このように、物質により反応の動きが違うものを、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。

E. 結論

われわれの実験の場合、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、および

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、一般的にアポトーシスは、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、貪食細胞の有意な増加のみであった。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いけないと考える。

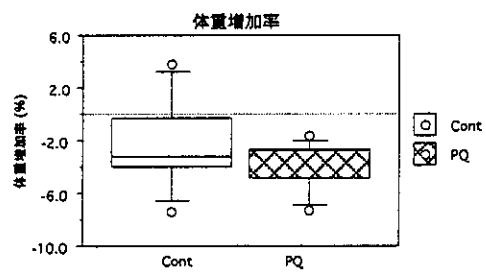


图1 体重增加率

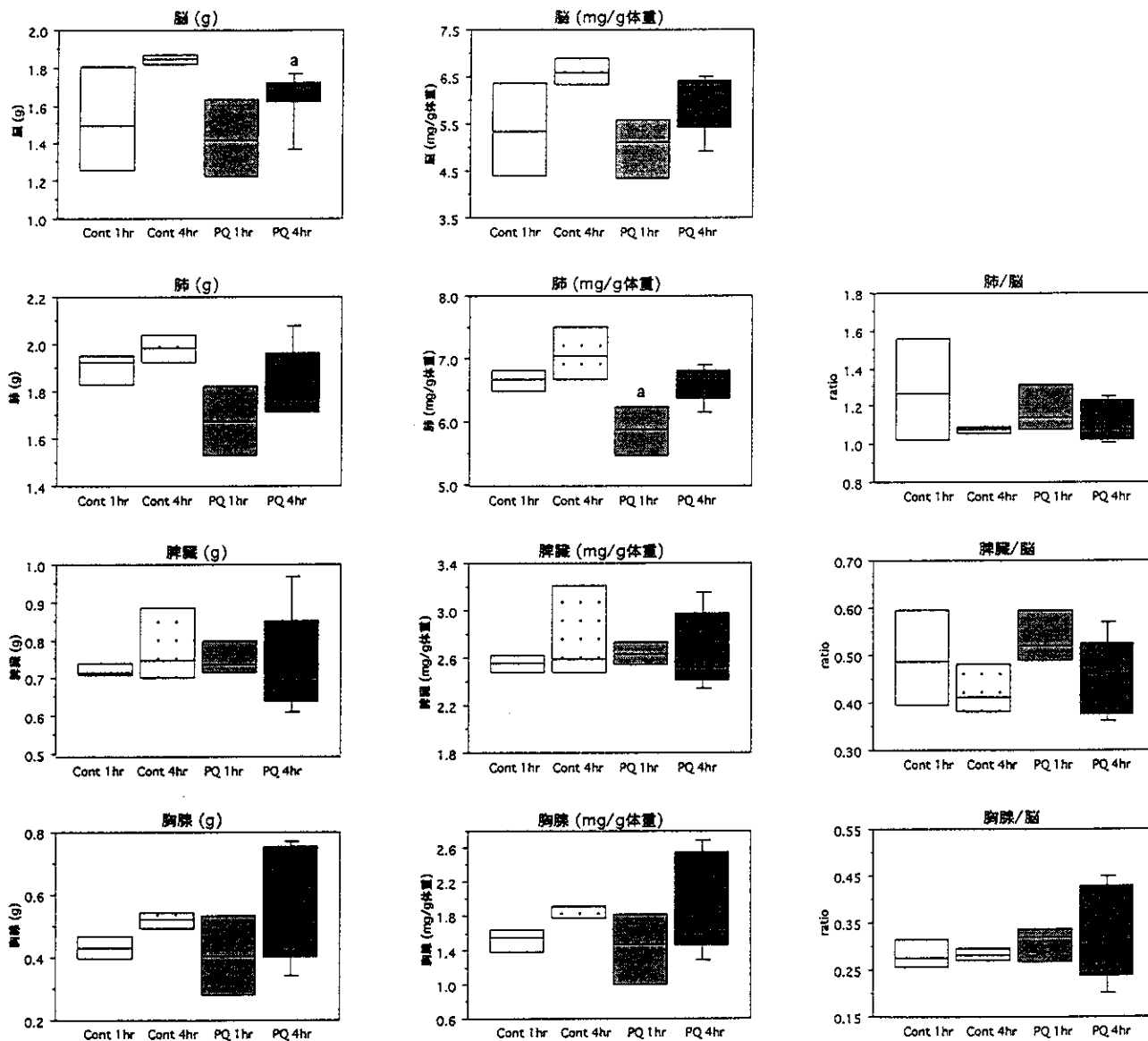


図2 臓器重量

□ Cont1時間群
 □ Cont4時間群
 ■ PQ1時間群
 ■ PQ4時間群

*; p<0.05

**; p<0.01

a; p<0.05

b; p<0.01

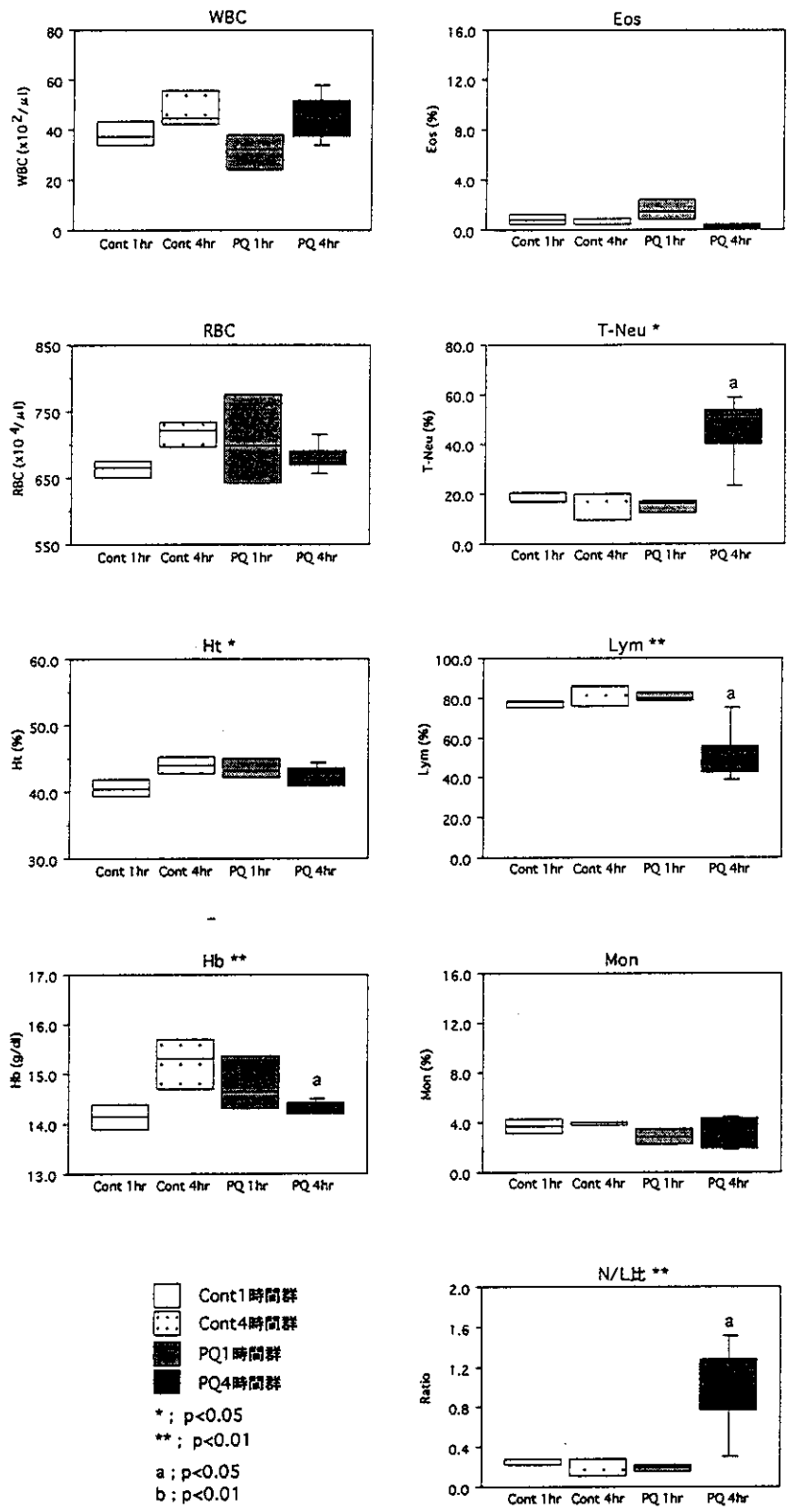


図3-1 血液一般所見

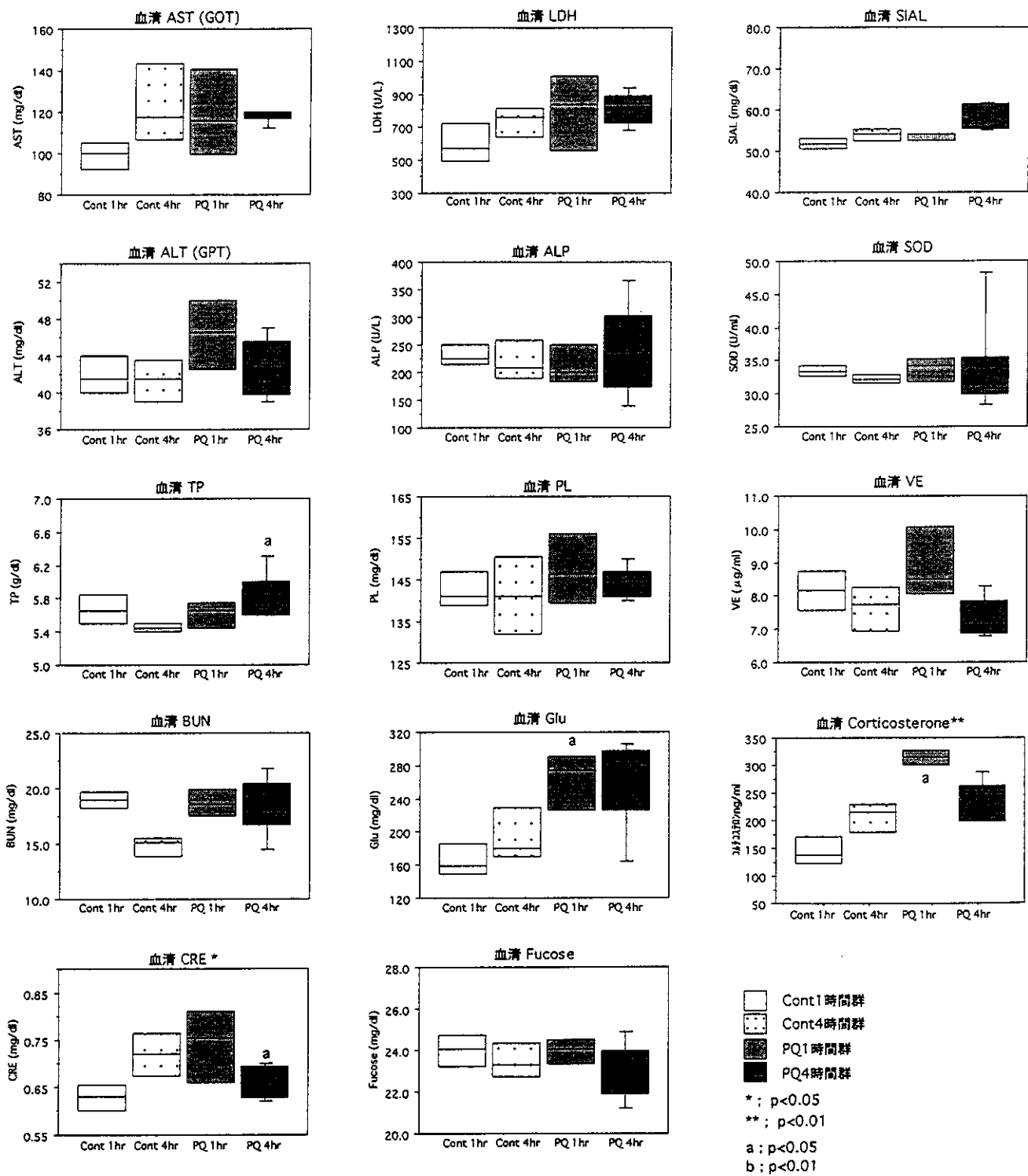


図3-2 血液一般所見

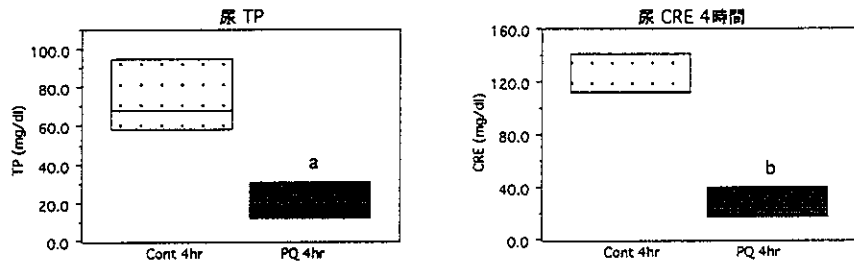


図4 尿所見

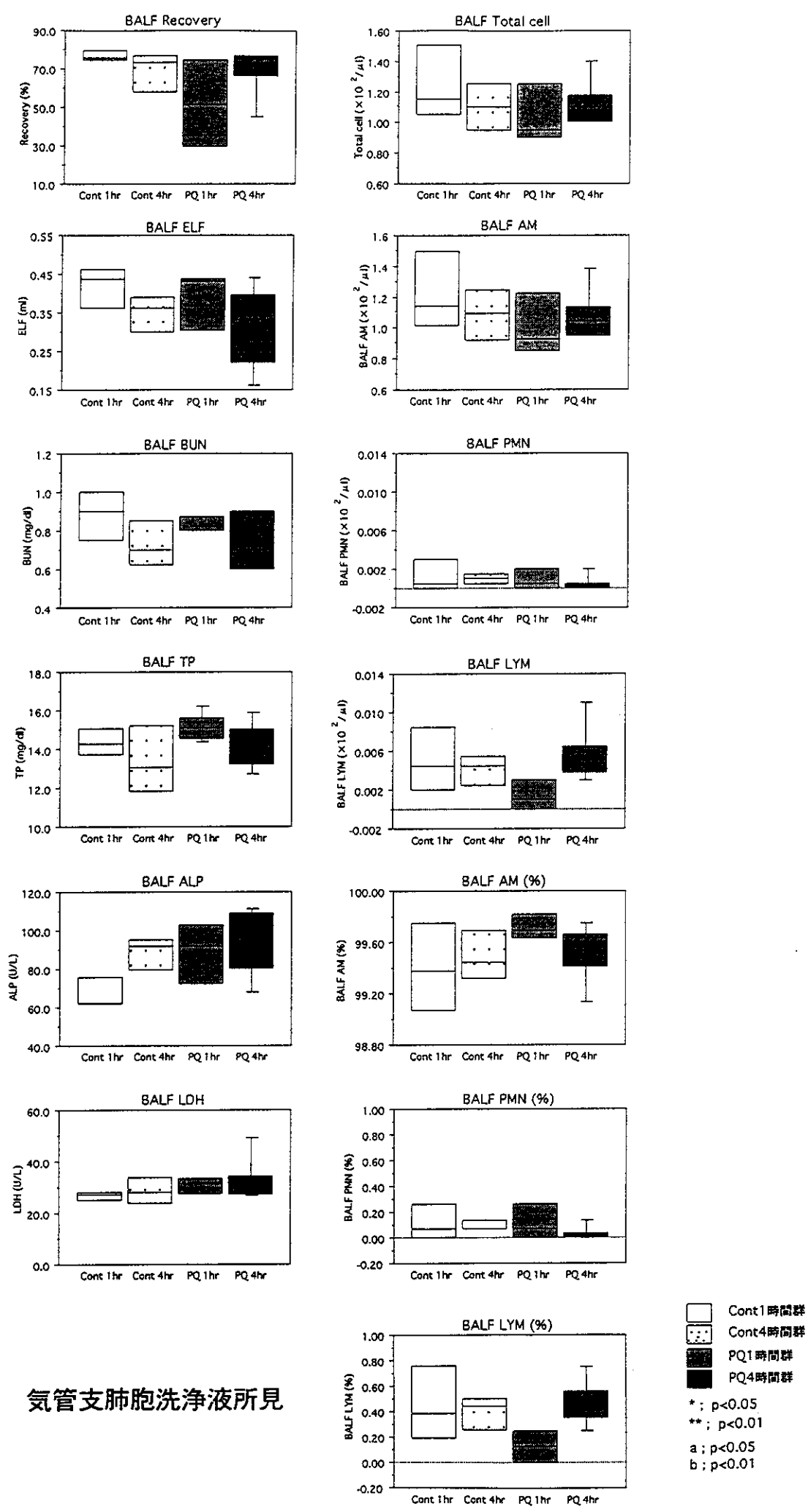


図5-1 気管支肺胞洗浄液所見

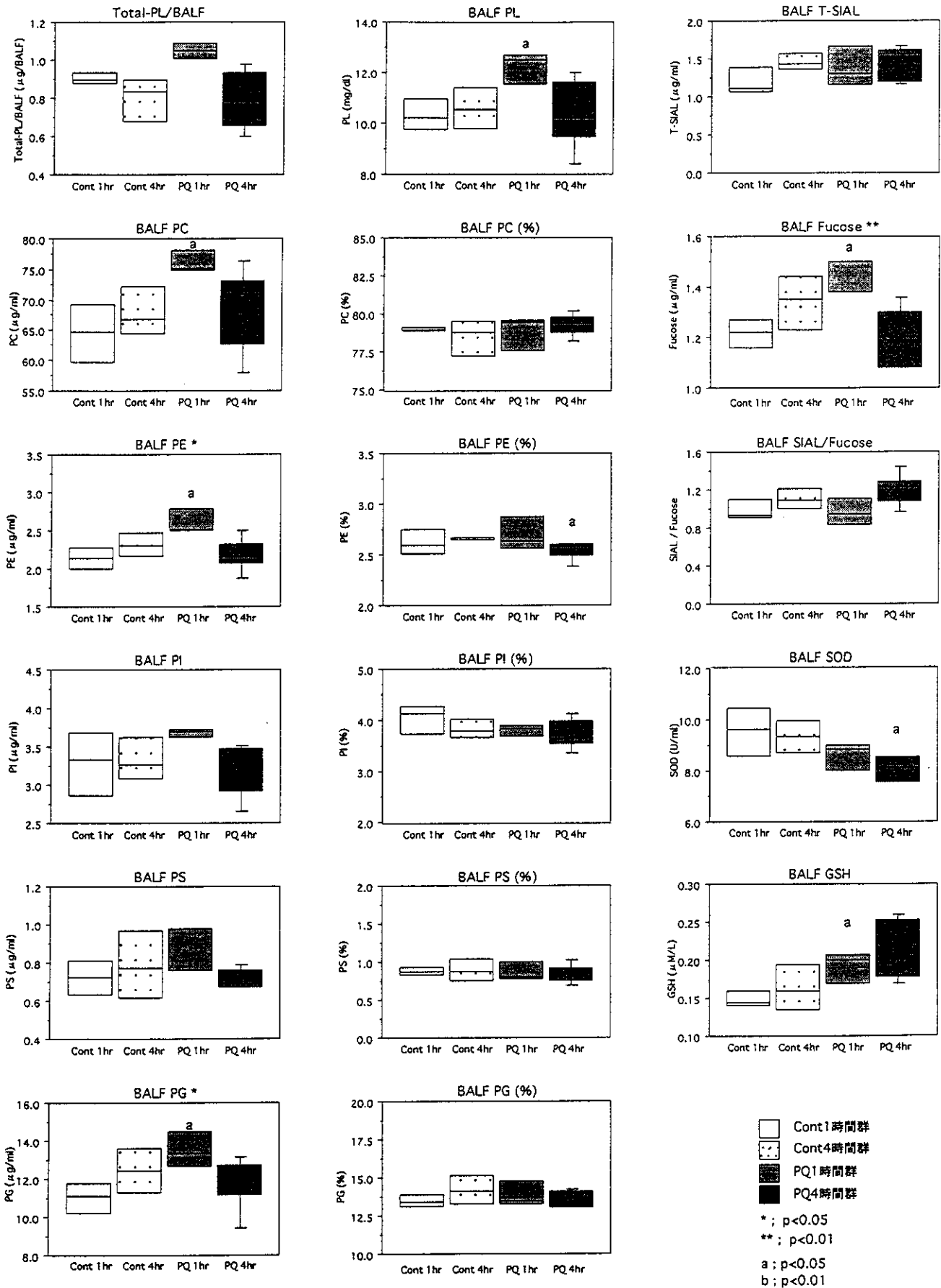


図5-2 気管支肺胞洗浄液所見

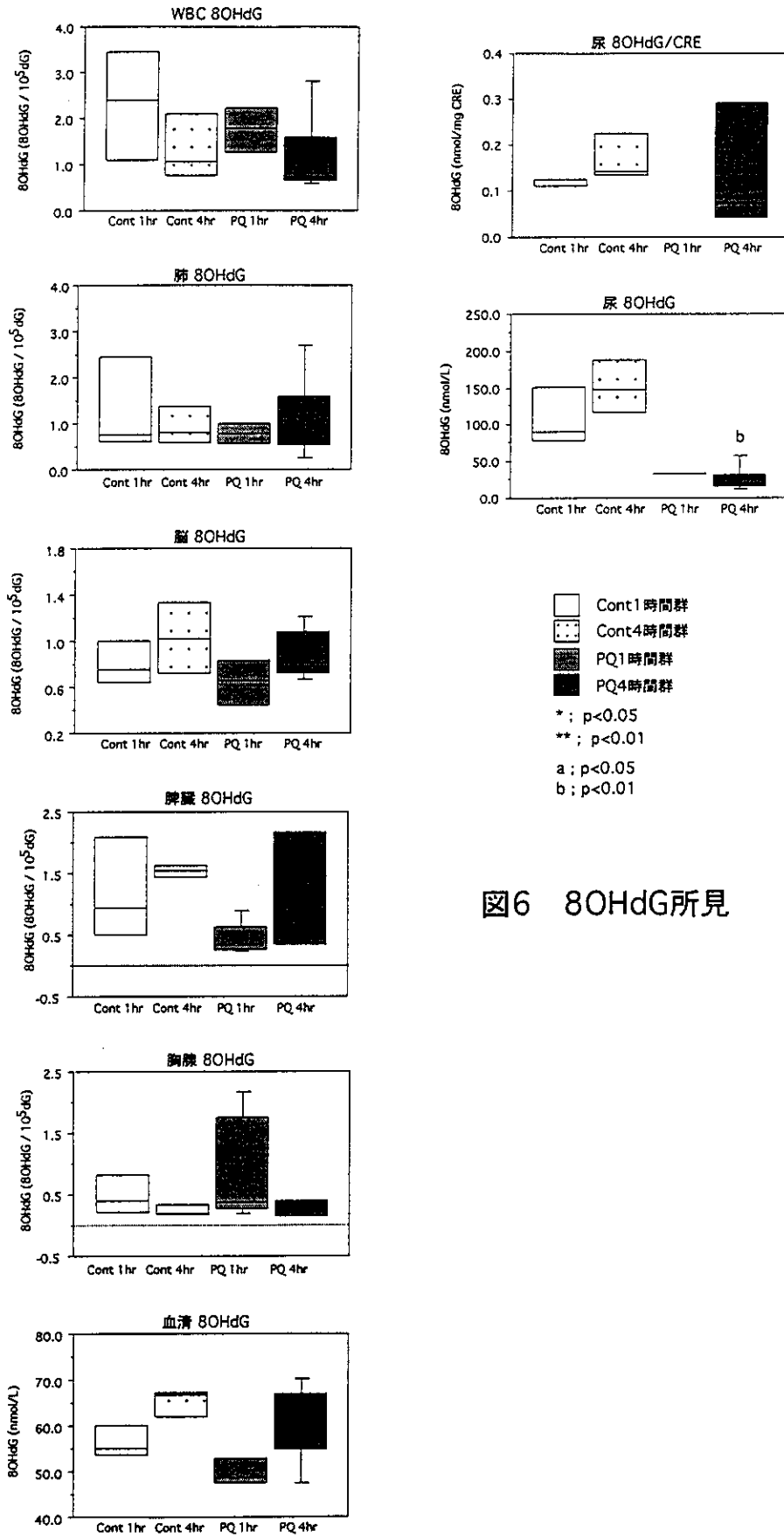


図6 8OHdG所見

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にしたほ乳類培養細胞による毒性評価

斎藤文代、安心院祥三、大塚雅則、今田中伸也
財団法人化学品検査協会 化学品安全センター日田研究所

研究要旨

アポトーシスは、増殖、分化とともに生体の恒常性を制御するため、ゲノムにコードされている生理的な細胞死である。しかし薬剤や毒性物質による細胞傷害、温度変化、酸素欠乏などの非生理的状況下でもアポトーシスが引き起こされることが知られている。

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。

毒性物質には Actinomycin D、Trichloroethylene、Thioacetamide を用いた。細胞毒性は MTT アッセーにより、アポトーシスは Hoechst33258 により蛍光染色した細胞の核濃縮、クロマチン凝縮、アポトーシス小体など形態学的特徴を観察して定量的に計測した。DNA の断片化の生化学的判定も行った。その結果、Actinomycin D では 20 nM からアポトーシスが誘導され、IC₅₀ の 30 nM に近い 40 nM でピークの 27% の誘発率を示した後漸減していった。Trichloroethylene では、5 mM と 15 mM の付近に 2 つのアポトーシス誘発のピークが認められた。第一のピークは低値であったが、細胞毒性がみられない濃度域でみられた。一方、第二のピークは IC₅₀ を超える致死領域で認められ、約 20% の誘発率であった。Thioacetamide においても、15 mM と 25 mM の付近に 2 つのピークがみられた。Trichloroethylene と Thioacetamide でみられた第二のアポトーシス誘発ピークは、一般に 10 mM を超えると細胞に対する浸透圧が変化するため、非生理的状況のもとで誘導されたアポトーシスを反映している可能性がある。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。

A. 研究目的

アポトーシスは、増殖、分化とともに生体の恒常性を制御するため、ゲノムにコードされている生理的な細胞死である。しかし薬剤や毒性物質による細胞傷害、温度変化、酸素欠乏などの非生理的状況下でも誘導され、薬剤や毒性物質では、低濃度暴露や暴露初期にアポトーシスが引き起こされることが知られている。

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。

毒性物質には Actinomycin D、Trichloroethylene、Thioacetamide を用いた。細胞毒性は MTT アッセーにより、アポトーシスは Hoechst33258 により蛍光染色した細胞の核濃縮、クロマチン凝縮、アポトーシス小体など形態学的特徴を観察して定量的に計測した。アポトーシスについては、DNA の断片化を検出して生化学的判定も行った。

B. 研究方法

1) 細胞毒性

10%の新生仔牛血清（三菱化学）を添加したイーグル MEM 培地（日水製薬）で培養したチャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞由来の CHL/TU 細胞を 2.5×10^4 個播種した 96 穴プレートに、種々の濃度の Actinomycin D (CAS No. 50-76-0、和光純薬)、Trichloroethylene (CAS No. 79-01-6、和光純薬)そして Thioacetamide (CAS No. 62-55-5、和光純薬)を添加した。37℃、5%炭酸ガスインキュベーターで 6 時間、24 時間、48 時間培養した後、細胞の生存率を MTT アッセー（Cell Counting Kit-8, 同仁化学）により計測した。

2) アポトーシスの形態学的観察

各物質で処理した CHL 細胞をカルノア液（メタノール：酢酸 = 3 : 1）で固定した後、DNA の蛍光標識試薬 Hoechst 33258（和光純薬）により染色した。

クロマチンの凝縮、核の断片化などアポトーシスに特徴的な形態的变化を指標にアポトーシスを起こしている細胞を蛍光顕微鏡下で判定し、処理濃度区ごとに 500 細胞中に占めるアポトーシス誘発細胞の割合を算出した。

3) DNA 断片化の検出

アポトーシスの形態学的観察を行うとともに、アポトーシスラダー検出キット（和光純薬）を用いて処理した細胞から DNA を抽出しアガロースゲル電気泳動を行った。

C. 研究結果

1, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM の Actinomycin D を 24 時間、1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 15, 20 mM の Trichloroethylene を 6 時間または 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mM の Thioacetamide を 48 時間 CHL 細胞に暴露した後、MTT アッセーにより生存曲線を求めて細胞毒性を評価した（図 1-3）。無添加の細胞数を 100%として算出した 50%細胞増殖抑制濃度（IC₅₀）は、それぞれ 30 nM、7 mM そして 17 mM であった。

アポトーシスの誘導と細胞毒性の関係を調べるため、それぞれの処理濃度区ごとに細胞を Hoechst 33258 で蛍光染色し（図 5）、形態学的観察に基づいて 500 細胞中に占めるアポトーシス誘発細胞の割合を算出した。

Actinomycin D では 20 nM からアポトーシスが誘導され、IC₅₀ の 30 nM に近い 40 nM でピーク

の 27%の誘発率を示した後漸減していった。アガロースゲル電気泳動によっても、20 nM から 60 nM の範囲で DNA の断片化が顕著に検出された (図 1)。80 nM 以上の濃度ではスメアーな DNA の泳動像を生じ、アポトーシスからネクローシスへ細胞死が移行することを示唆していた。

Trichloroethylene では、5 mM と 15 mM の付近に 2 つのアポトーシス誘発のピークが認められた (図 2)。第一のピークは低値であったが、細胞毒性がみられない濃度域でみられた。一方、第二のピークは IC50 を超える致死領域で認められ、約 20%の誘発率であった。

Thioacetamide においても、15 mM と 25 mM の付近に 2 つのピークがみられ (図 3)、15-20 mM で DNA ラダーも確認された (図 4)。

D. 考察

Trichloroethylene と Thioacetamide でみられた第二のアポトーシス誘発ピークは、一般に 10 mM を超えると細胞に対する浸透圧が変化するため、非生理的状況のもとで誘導されたアポトーシスを反映している可能性がある。

E. 結論

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ためには、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であると考えられる。また、

今回の実験には CHL 細胞を用いたが、アポトーシスの検出により高感度な細胞株を検索することも重要であると考えられる。

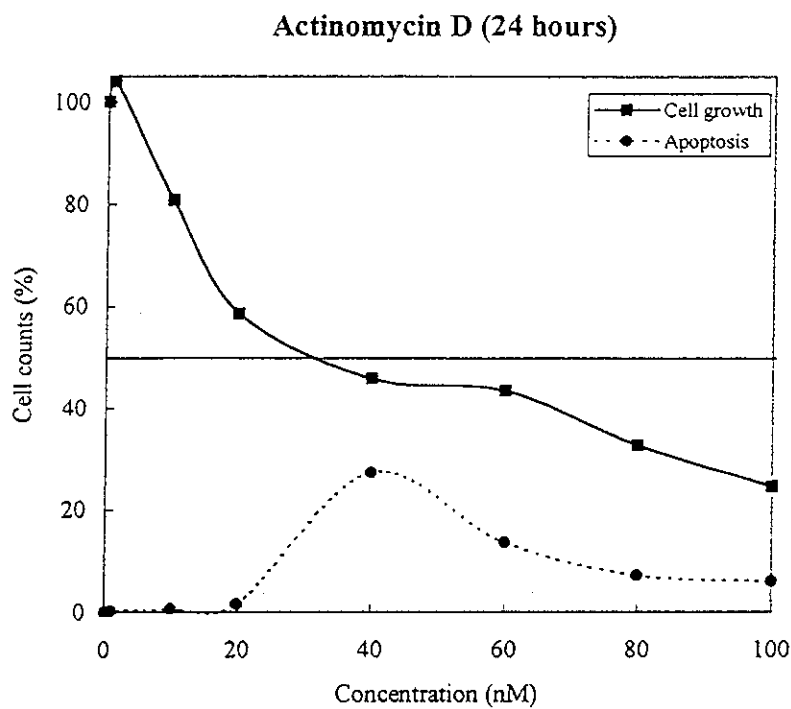


図 1. Actinomycin D の CHL 細胞に対する細胞毒性とアポトーシスの誘発

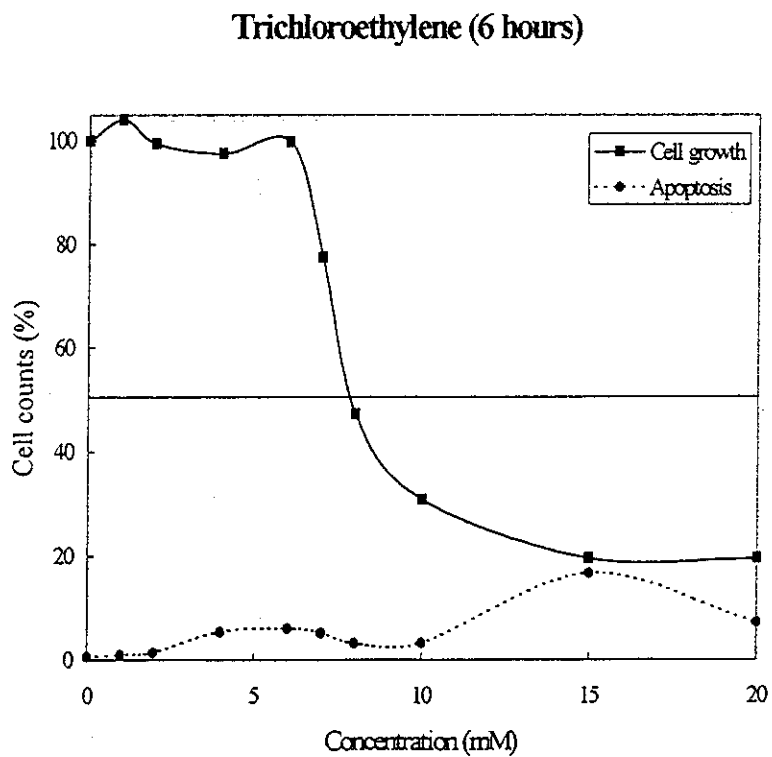


図 2. Trichloroethylene の CHL 細胞に対する細胞毒性とアポトーシスの誘発

Thioacetamide (48 hours)

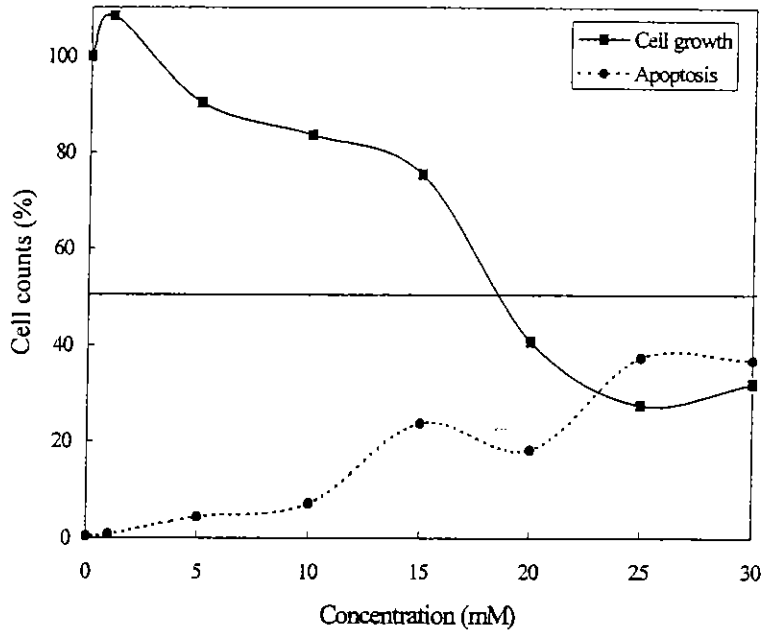


図 3. Thioacetamide の CHL 細胞に対する細胞毒性とアポトーシスの誘発

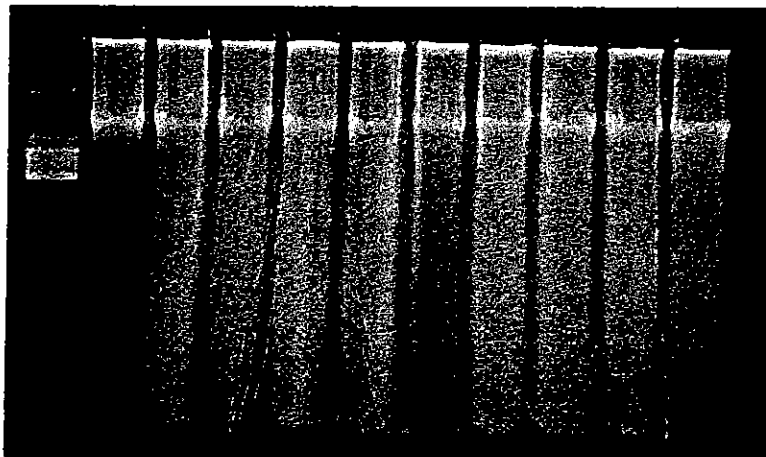


図 4. アガロースゲル電気泳動像

左から DNA 分子量マーカー, 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 mM の thioacetamide で 48 時間処理した CHL 細胞から抽出した DNA



A 正常細胞



B アポトーシス細胞

図 5. Hoechst 33258 で蛍光染色したアポトーシス細胞
20 mM の thioacetamide を 48 時間暴露した CHL 細胞

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
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

山中すみへ、野村登志夫、太田 薫、高江洲義矩
東京歯科大学・衛生学教室

研究要旨

培養細胞を用いて、化学物質の毒性を評価する方法として、一般細胞毒性試験とともに、アポトーシスの誘発を指標とした毒性評価を試みる。そのために、1. 化学物質の急性毒性評価のための細胞毒性試験及び 2. 細胞のアポトーシスによる毒性評価の試みの二つの実験を行った。前者は、CHL/TU、KB、MCF-7 細胞を用い、水銀やパラコート、クロム、フェノールなど 21 物質を培養液に添加して培養した。その際、ニュートラルレッド法、LDH 法、ギムザ染色法、フローサイトメトリー法、アガロースゲル電気泳動法などの方法によって IC50 値を算出した。In vivo LD50 値は NIOSH の RTECS から採用し、比較した。その結果 CHL 細胞と MCF-7 細胞、KB 細胞と CHL 細胞の IC50 値間に相関関係が認められた。また 3 種の細胞毒性試験法のうち、ギムザ染色法と NR 法では相関関係が認められた。さらに細胞毒性試験による IC50 値と経口 LD50 値との関係では、ホルマリンなどの皮膚・粘膜刺激性物質を除いた物質では高い相関関係を示した。後者は、CHL/TU 細胞に水銀およびパラコートを処置し、アポトーシスの検出を行った。その結果、水銀およびパラコートの添加量は IC50 値に比して低く、細胞の生存率には影響が認められなかった。また水銀やパラコートを添加して 24 時間の培養では、アポトーシスに伴う DNA のフラグメントは認められなかったが、48 時間以降では検出された。以上より、細胞毒性試験による IC50 値は、急性毒性や膜障害性など個別には相関性が高いと考えられるので、目的に応じて個別に評価する必要がある。今後、反応時間の設定や DNA 断片化率の定量など検討することによって、アポトーシスによる毒性評価の可能性がみえるものとする。

A. 研究目的

化学物質の毒性評価法として、従来実験動物の生死や症状の発現、組織・臓器の異常などの検索により行ってきたが、動物愛護の観点から使用する動物数を減らした簡易な毒性評価スクリーニン

グ法を提案してきた。また一方、毒性学も従来の急性毒性や催奇性、発癌性、蓄積性の領域だけでなく、免疫毒性や生殖毒性までを含めた毒性評価が必要となり、分子生物学的な手法が求められている。そのような背景にあって、より鋭敏で、か

つ簡便な毒性試験法の確立を目的として、培養細胞を用いた毒性評価法を検討した。

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1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、*in vitro* 系における毒性評価法として確立する。

B. 研究方法

●用いた細胞：CHL/TU（肺線維芽細胞）、KB細胞（口腔内類表皮癌由来細胞）、MCF-7（乳癌細胞）

●化学物質：水銀やパラコート、クロム、メチルメタクリレート、フェノールなど23物質を各種濃度（0.05～5000ppm）で培養液に添加して培養した。

●ニュートラルレッド（NR）法：各々の被験物質を添加し培養後、NRを加え、細胞内に取り込まれたNR量からIC₅₀値を求めた。

●LDH法：細胞内から遊離したLDH活性からIC₅₀値を求めた。

●ギムザ染色法：生細胞をギムザ染色することによってIC₅₀値を算出した。

●フローサイトメトリーによる検索：Becton Dickinson製のImmunocytometry Systemを用いて細胞の大きさや構造、PI(Propidium Iodide)やAnnexin-Vによる特異染色から細胞の生死、細胞周期、アポトーシス細胞の検出などを行った。

●：アガロースゲル電気泳動によるアポトーシスの検出：水銀（1～30ppm）およびパラコート（10、

30ppm）を添加して4～72時間培養した後、DNAを抽出し、フラグメント化したDNAを紫外線（312nm）にて検出した。

●*in vivo*での経口LD₅₀値：ラットまたはマウスで求められた経口LD₅₀値をNIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health)のRTECS(Registry of Toxic Effect of Chemical Substances)から引用した。

C. 研究結果

1. 細胞種によるIC₅₀値の比較

2. 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、細胞間での比較を行った。ニュートラルレッド法におけるCHL細胞とMCF-7細胞、KB細胞とのIC₅₀値の相関関係を図1～3に、またギムザ染色法におけるCHL細胞とKB細胞のIC₅₀値の関係を図4に示した。CHL細胞とKB細胞とのIC₅₀値は $r=0.945$ 、 0.905 と有意な相関関係が認められたが($p < 0.001$)、ほとんどの化学物質でKB細胞の方がIC₅₀値が大きく、毒性が低く現れるという細胞の特異性がみられた。またMCF-7細胞のIC₅₀値は、CHL細胞やKB細胞のIC₅₀値と有意な相関関係ではあったが($p < 0.001$)、その関係は低く($r=0.798$, $r=0.843$)細胞の特異性を示唆するものであった。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）法およびギムザ染色法、LDH法の3種の細胞毒性試験法でIC₅₀値を