

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。ギムザ染色法とNR法のIC50値の関係では図5に示すように、CHL細胞では有意な相関関係がみられ($r=0.955$)、KB細胞では相関係数 $r=0.714$ と少し低いが有意な相関関係であった($p < 0.05$)。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。図6にはCHL細胞の正常状態を、また図7には水銀20ppmを添加して20時間培養した場合を示した。フローサイトメトリーにより求めた水銀のIC50値は、CHL細胞のNR法やギムザ染色法に比べて大きいといえる。また表1には各試験法による水銀のIC50値をまとめて示した。CHL細胞でのNR法、LDH法、ギムザ染色法には大きな差がなかったが、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。ラットまたはマウスで求められた経口LD50値(RTECSの文献値)と今回の細胞毒性試験で求めたIC50値との関係を図8および9に示した。左図には25化学物質のすべての場合について、また右図にはヨードやホルマリン、メチルメタクリレートのような皮膚・粘膜刺激性の7化学物質を除いた場合を示している。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関係がみられた($r=0.814$, $r=0.84$)。このような皮膚・粘膜刺激性物質は、in vivoでの

毒性が低く経口LD50値が大きいのに比して、直接的な膜障害性作用により細胞毒性が強くと現れin vitroでのIC50値が低くなることを示した。したがって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。

4. アポトーシスの誘導による毒性評価

水銀の1,5ppmおよびパラコート10,30ppmを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フラグメント化したDNAを紫外線〔312nm〕下にてアポトーシス細胞の存在を調べた。水銀およ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、また24時間の培養ではアポトーシスにともなうDNAのフラグメント化は認められなかった。しかし水銀およ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(図10)、アポトーシスの誘導を示唆した。また70時間培養後のCHL細胞の接着細胞のみならず、浮遊細胞も別々に集め、同様の方法でアポトーシス細胞の検出を試みたところ、化学物質の無添加の場合でもフラグメント化したDNAの存在がみられた。この点については、さらに検討していく必要がある。

さらにアポトーシスの誘導をフローサイトメトリーを用いて検索するために、PI染色して蛍光強度のヒストグラムから細胞周期を調べた。CHL細胞に水銀無添加、5ppm添加、15ppm添加で20時間培養後の解析を図11に示した。水銀15ppmの添加では明らかな細胞死により蛍光強度が低くなり、左に局在している。水銀無添加の場合に比べ、水銀5ppmの添加で明らかに細胞周期が変化しているが、その意義づけやアポトーシスの誘導との

関係は今後の課題である。さらに PI 染色とともに Annexin- V によりアポトーシス細胞のみを分離染色して、解析中である。

D. 考察

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。フローサイトメトリーにより求めた水銀の IC50 値は、CHL 細胞の NR 法やギムザ染色法に比べて大きいといえる。また表 1 には各試験法による水銀の IC50 値をまとめて示した。CHL 細胞での NR 法, LDH 法、ギムザ染色法には大きな差がなかったが、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。皮膚・粘膜刺激性物質は、in vivo での毒性が低く経口 LD50 値が大きいのに比して、直接的な膜障害性作用により細胞毒性が強く現れ in vitro での IC50 値が低くなることを示した。したがって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。

E. 結論

培養細胞での一般細胞毒性と、アポトーシスの誘導にみられる毒性との比較、方法別のアポトーシスによる毒性評価の基準の設定が更に必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

● 野村登志夫、太田 薫、山中すみへ、高柳篤史、高江洲義矩：化学物質の急性毒性評価のための細胞毒性試験、産業衛生学雑誌 40、S 504、1998

● 野村登志夫、太田 薫、山中すみへ、高江洲

義矩：細胞毒性試験による歯科用素材の安全性評価、口腔衛生学会雑誌 48、578-579、1998

● 野村登志夫、山中すみへ、太田 薫、高江洲義矩：培養細胞を用いた化学物質の毒性評価の検討、日本衛生学雑誌 54、 、1999

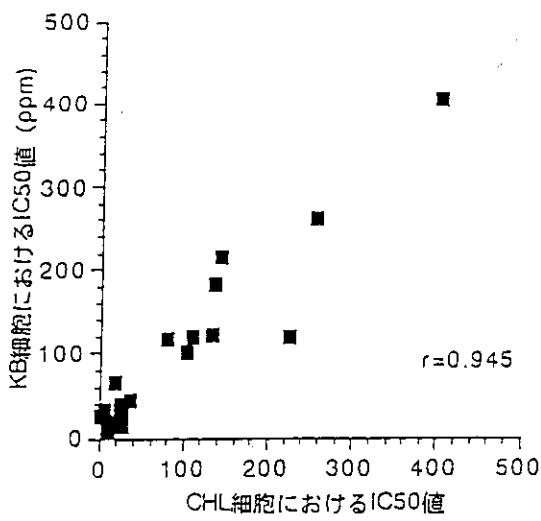


図1 CHL細胞とKB細胞におけるIC₅₀値の関係 (ニュートラルレッド法)

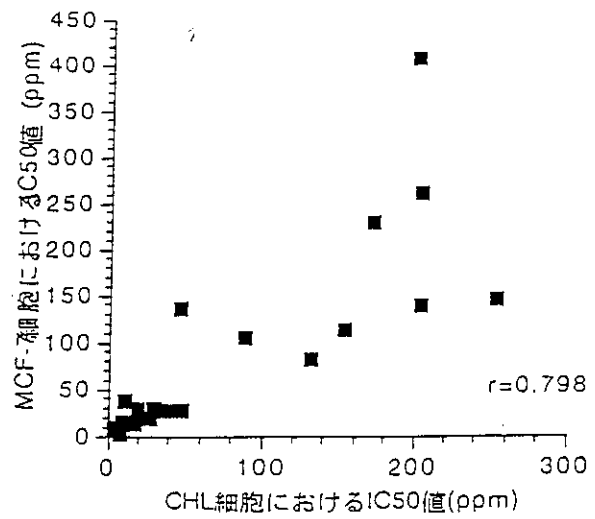


図2 CHL細胞とMCF-7細胞のIC₅₀値の関係 (ニュートラルレッド法)

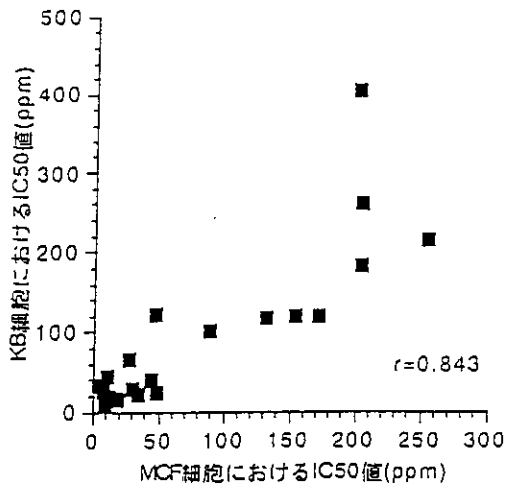


図3 KB細胞とMCF-7細胞におけるIC₅₀値の関係 (ニュートラルレッド法)

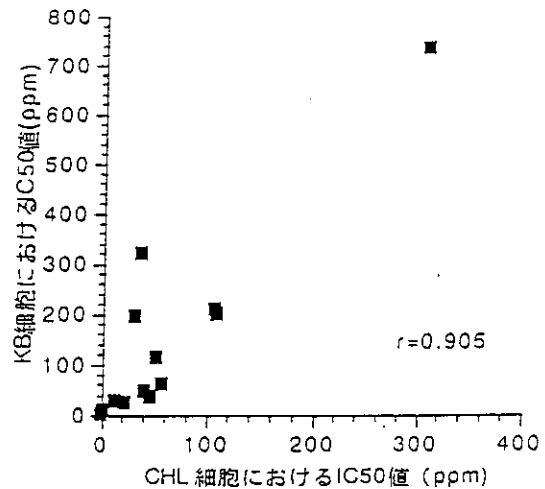


図4 CHL細胞とKB細胞におけるIC₅₀値の比較 (ギムザ染色法)

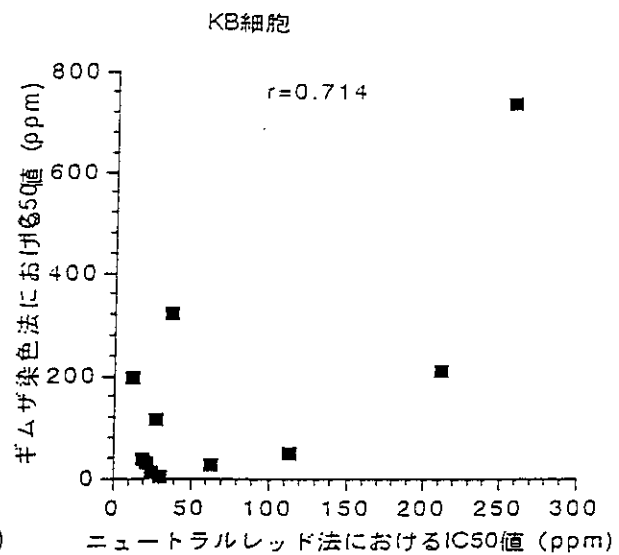
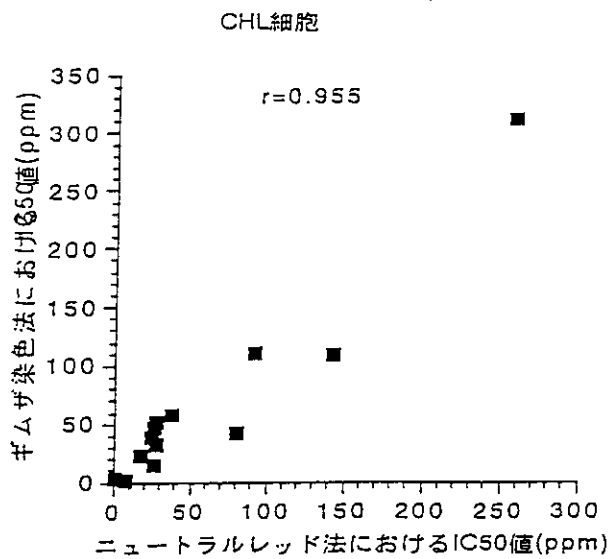
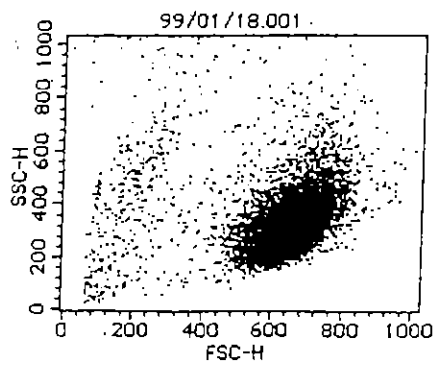


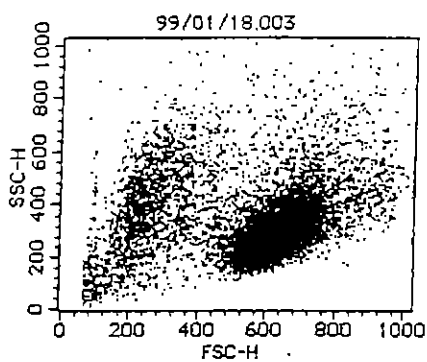
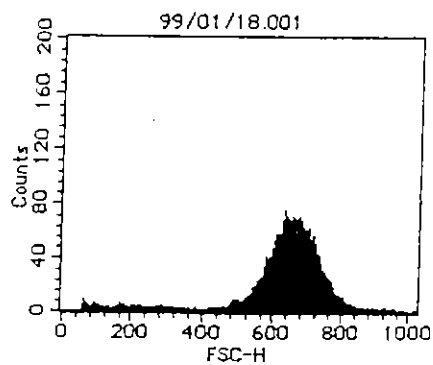
図5 ニュートラルレッド法とギムザ染色法のIC₅₀値の比較

表1 各細胞毒性試験における水銀のIC₅₀値の比較

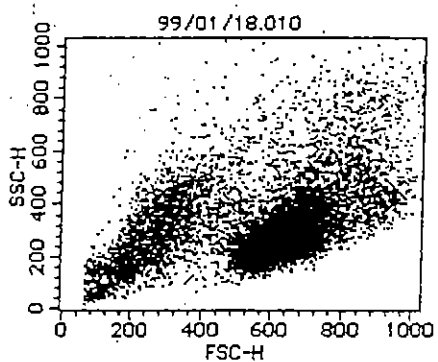
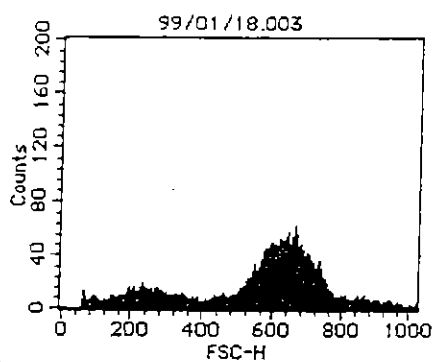
| 細胞 | LDH法 | ギムザ染色法 | | ニュートラルレッド法 | | | フローサイトメトリー | |
|------------------------|------|--------|-----|------------|------|-------|------------|-----------|
| | CHL | CHL | KB | CHL | KB | MCF-7 | CHL(5hr) | CHL(24hr) |
| IC ₅₀ (ppm) | 1.8 | 2.3 | 8.5 | 1.6 | 25.4 | 9 | 13.8 | 15.9 |



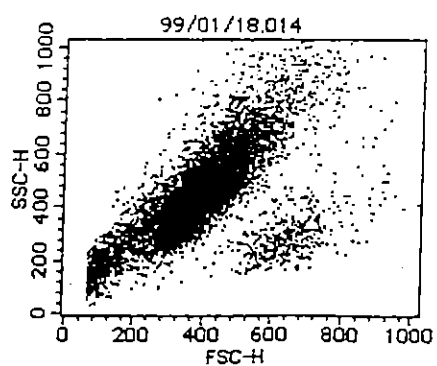
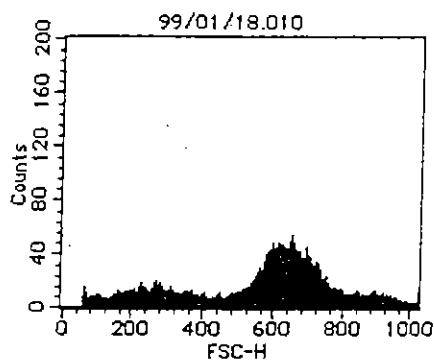
水銀無添加



水銀 5ppm



水銀 10ppm



水銀 20ppm

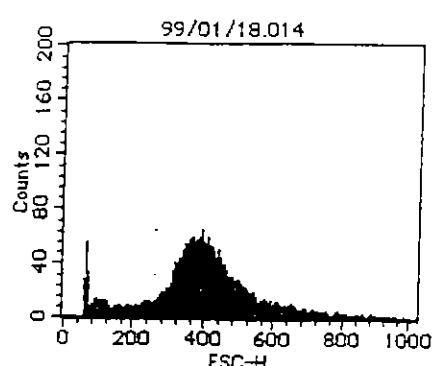


図 6 CHL 細胞の水銀添加に形態変化 (細胞径による)

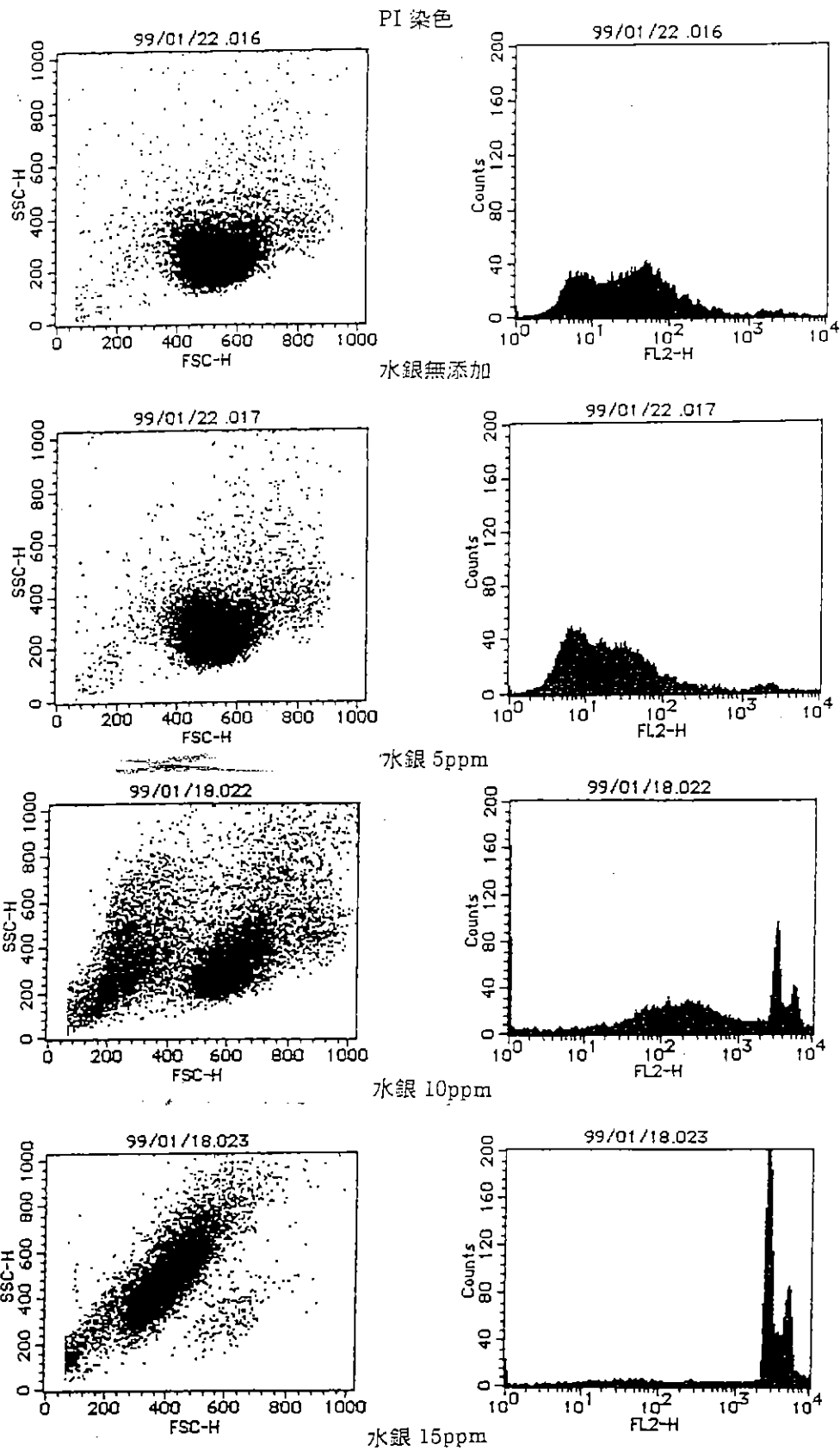
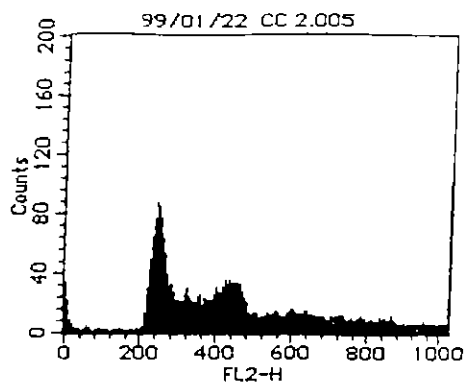
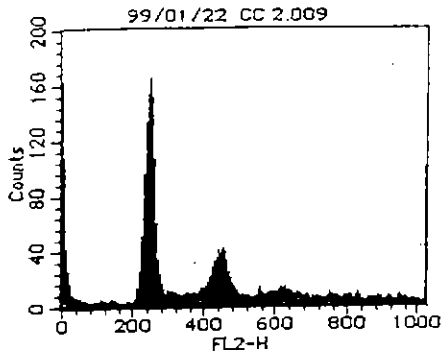
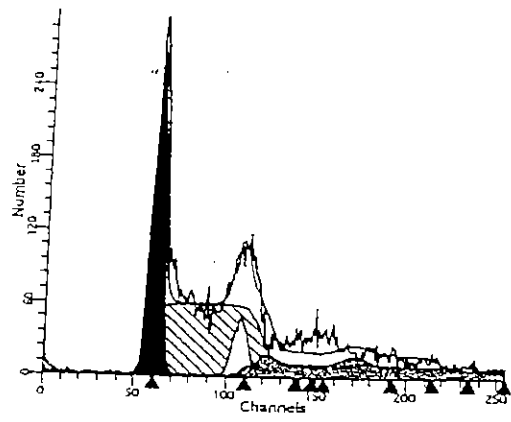


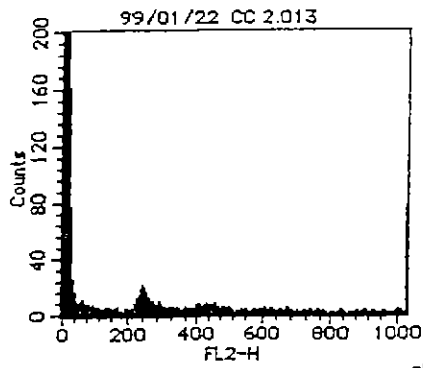
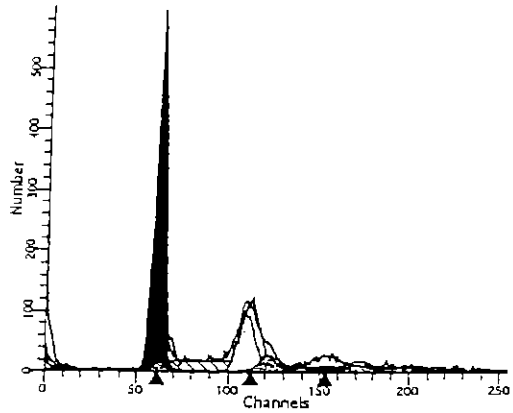
図 7. CHL 細胞の水銀添加による形態変化 [PI(Propidium Iodide)染色による]



水銀無添加



水銀 5ppm



水銀 15ppm

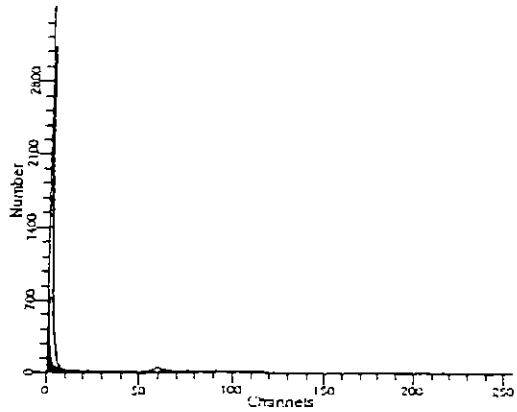
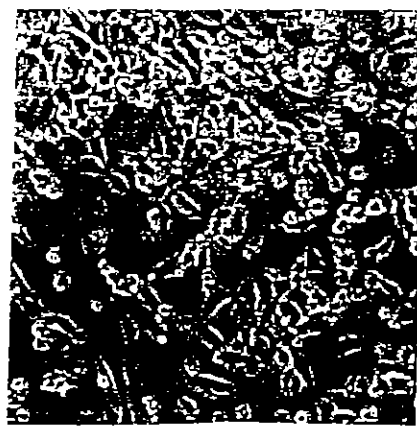


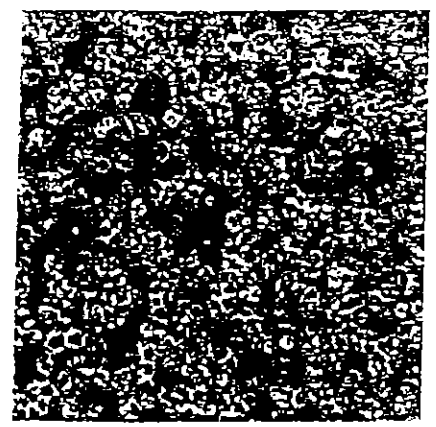
図 8. 水銀添加による CHL 細胞の細胞周期の変化



水銀 無添加



水銀 5 ppm



水銀 10 ppm

図 9 CHL 細胞の水銀添加に形態変化 (倒立顕微鏡: ×100 拡大像)

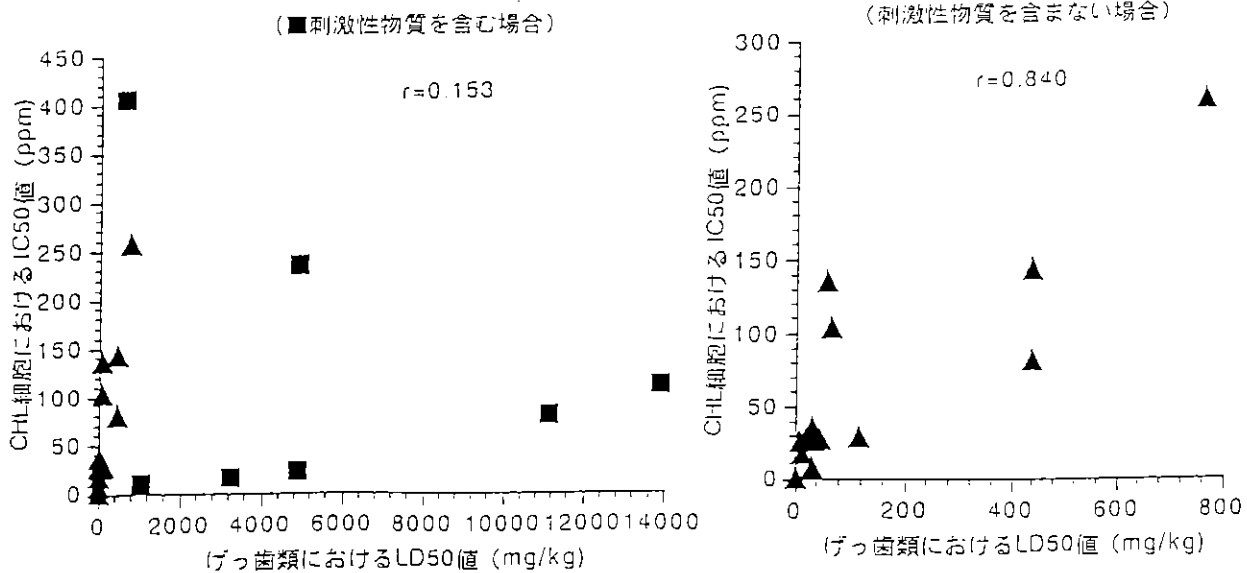


図10 CHL細胞におけるIC₅₀値とげっ歯類におけるLD₅₀値との関係

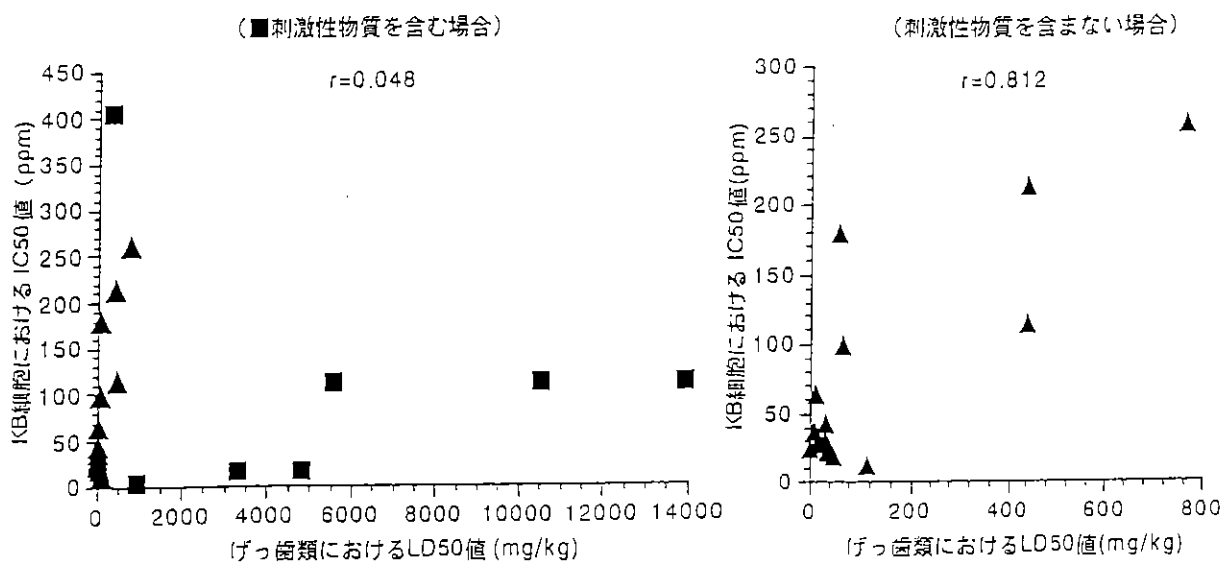


図11 KB細胞におけるIC₅₀値とげっ歯類におけるLD₅₀値との関係

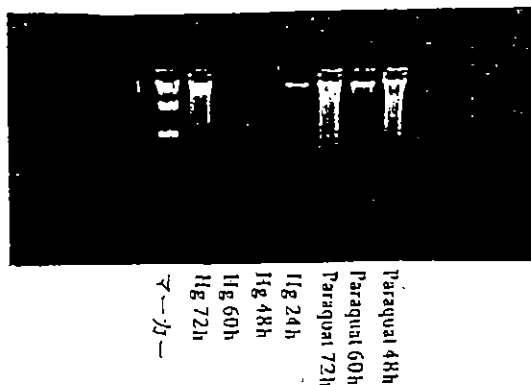
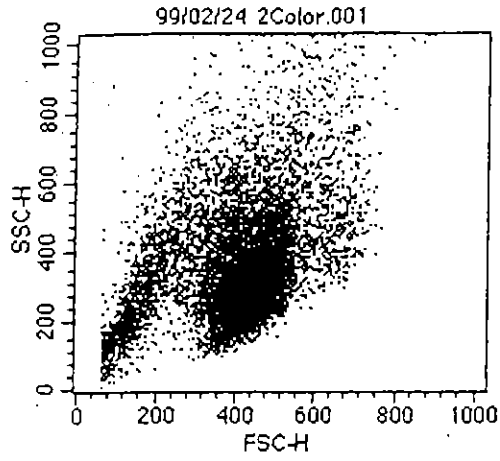
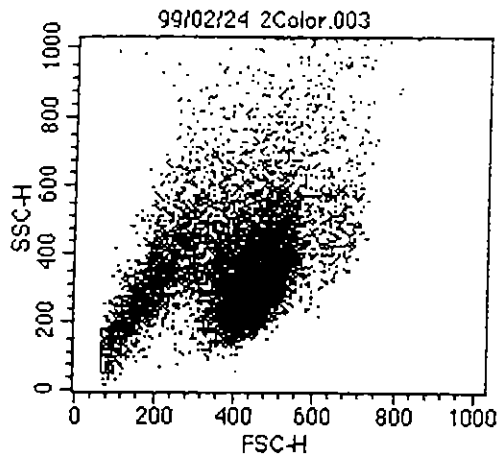
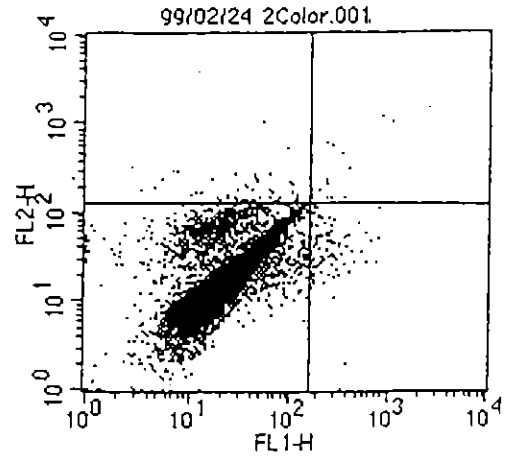


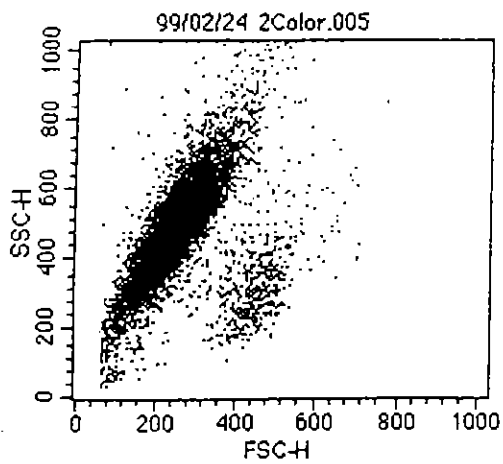
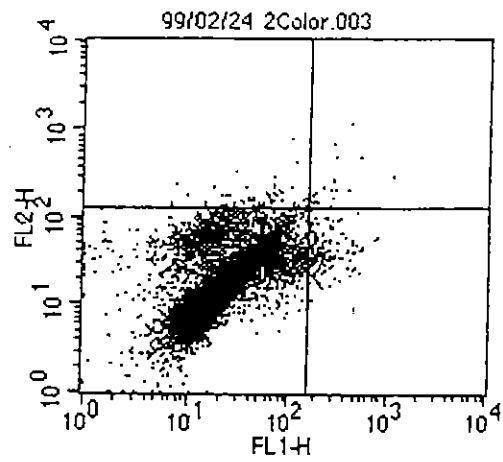
図12 フラグメント化DNAの検出



水銀無添加



水銀 5ppm



水銀 10ppm

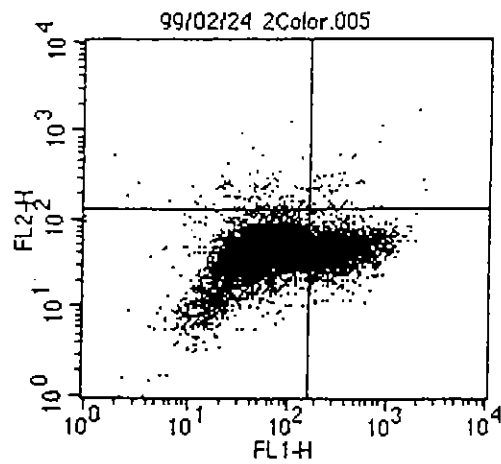


図 13 フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の解析
(PI および Annexin-V の二重染色による)