

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

—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—

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

毒性学の分野において、化学物質の毒性指標の鍵となっている LD50値(50%致死量)は、「死」と言う多様な背景を包含した end point を用いている。このため、直接的に急性死に至らしめないような物質群の毒性が不当に軽く評価されるなどの様々な矛盾を内包している。本研究では、化学物質の毒性指標を「死」以外の生命に対する普遍的指標に置き換えるために、化学物質の 1) 個体レベル: 個体群の生存曲線(survival curve)に与える影響、2) 組織・臓器レベル: 諸臓器での細胞死に関わる分子指標(当面アポトーシスを標的とする)に与える影響、および、3) 分子レベル: 上記1)と2)に関わるいくつかの責任遺伝子群の発現や制御へ与える影響、の3つの視点からその毒性を再整理して、新しい分子毒性学的な指標を構築しようとするものである。なお、ここでとりあげるアポトーシスは外来性化学物質によって生じる病理・毒性学アポトーシス並びに過大もしくは過小に誘導される生理的アポトーシスの双方を持って総合的に評価するものであり、近年種々の試みがなされている。

今年度は、上記の「個体レベル」、「組織・臓器レベル」及び「分子レベル」が新しい分子毒性学的な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)及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、大塚、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。

研究目的

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

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。この新たな分子毒性学的な指標を得るために、急性毒性を①アポトーシスの出現や、②加齢促進効果といった面からの再整理を進めている。

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

Diethylstilbestol(DES)は、低血清濃度の条件下で、培養細胞に対し強力にアポトーシスを誘導する。この結果は、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を示唆している。そこで、サイトカインを用いて、血清中の何がDESによるアポトーシスを阻害しているのかを検討した。更にアポトーシス阻害剤及び活性酸素阻害剤も用いて検討した。また、DESは細胞の種、組織、エストロゲン受容体の有無に関係なくアポトーシスを誘導するが、その程度は細胞毎に若干異なる感受性を示しており、そこでHu-MI細胞及びその形質転換細胞を用いてDESの影響を検討した。

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

化学物質の毒性、劇物性の強さを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細胞レベル、遺伝子レベルで捕えることを目指す。その指標として、種々の方法を用いてアポトーシスの程度の差を捕えられれば、急性毒性指標として使用できるものと期待される。

大塚雅則: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

化学物質の安全性評価の一環として行われる急性毒性試験では、実験動物に化学物質を単回投与し、得られた半数致死量(LD₅₀)を基準に毒性評価が行われている。

本研究ではほ乳類培養細胞を用いて急性毒性を予知するために、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、アポトーシスが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。

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

化学物質の毒性評価法として、動物愛護の観点から使用する実験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、毒性学も生死や症状の発現などの従来の領域だけでなく、免疫毒性などを含めた分子生物学的な手法を用いた毒性評価法が求められている。そこで、より鋭敏で、かつ簡便な *in vitro* での毒性試験法の確立を目的として、今回は培養細胞を用いた細胞毒性試験法を検討する。細胞毒性試験での50%細胞増殖阻害濃度(IC₅₀値)を求めるとともに、とくに細胞死の1つであり、DNAの死でも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する細胞毒性試験法の可能性を検討した。

研究方法

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

①-1 p53 ノックアウトマウスを用いたBenzene吸入毒性試験:前年度に引き続き発がん試験の生涯観察を進め、過半のマウスが死に至った。現在死亡マウスの病理組織学的検索を行っている。また、この背景にある生物反応性として我々が開発した *in vivo* 造血幹細胞動態解析法(BUUV法)を用いた動態解析を行い、同時にWestern法及びDNA chip解析などによる発現遺伝子の解析を進めた。

①-2 チオレドキシシン遺伝子変異マウスを用いたパラコート誘発アポトーシス:パラコートの反応性投与標的臓器の解明と、その急性毒性に対する感受性の変化について、腹腔内単回投与の投与濃度・投与後の経時変化などをチオレドキシシン遺伝子過剰発現マウス及び、遺伝子欠失マウスを用いて検証を進めている。

②加齢促進効果

klotho マウスの有用性の検討:急性毒性と加齢との関

係の早期検出系ならびに、毒性発現の当該遺伝子機能との関係を明らかにすることを目的として、最近樹立された klotho 遺伝子への挿入変異によるヘテロ機能欠失マウス(Kuro-o M et al., Nature 390:45-51 1997)を鍋島教授から供与を受け、系統維持ならびにホモ変異マウス生産を行った。klotho 遺伝子ホモ変異マウスは加齢促進マウスとして知られ、寿命の平均は60.7日、胸腺及び性腺萎縮、粥状硬化症、骨粗鬆症など複合的な老化発現系を示すものであるが、極度の短寿命ともあいまって、唯一発がん促進だけは観察されていない。そこで、ホモマウス骨髓細胞を同系の致死線量照射したマウスへ移植して多数の均質な骨髓再建マウスを作成し、MNUによる発がん試験を開始した。また、同時にこのものの骨髓造血幹細胞を対象にMNUへの反応性に関する表現型の検索を進めた。

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

細胞増殖を調べる実験以外 BALB3T3 細胞は MEM、Hu-M1 細胞及びその形質転換細胞は、RPMI 1640 に、それぞれウシ胎児血清(FCS)を 10%添加した培地を用いて培養した。

細胞(BALB 3T3 細胞: 2×10^4 個、Hu-M1 細胞及びその形質転換細胞: 20×10^4 個)を 6 ウェルプレートに播種し、4 日間培養した。血清不含の培地で1回洗った後、FCS を 0.5 または 10%含む培地と交換すると同時に、各物質を添加した。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。1 群あたり 2 ウェルを用いた。

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

動物: SPF-Wistar Male Rat 10W(各群 n=4)
実験群: PQ-1 時間群、PQ-4 時間群、Cont-1 時間群、Cont-4 時間群の合計 4 群

被験物質: Paraquat(1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium

Dichloride 98%sol.: Code No.D0713, 東京化成)

投与濃度: 50.0mg/kg 体重腹腔投与(PQ 群)、control(滅菌生理食塩水 1ml/200g 体重: Cont 群)

投与期間: 投与1時間後と4時間後にネブタール麻酔下で解剖

測定項目: 血液検査、気管支肺胞洗浄液(BALF)検査、各臓器(脾臓、肺、胸腺)および末梢血白血球中 8OHdG、末梢血白血球中 p53 遺伝子の mRNA 発現量

大塚雅則: 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

1) 細胞

実験に用いたチャイニーズハムスター線維芽細胞 CHL/IU 細胞及び V79 細胞は、新生仔牛血清(三菱東京製薬)を 10%添加したイーグル MEM 培地(日水製薬)で 37°C、5% CO₂、飽和湿潤下において培養した。

2) 化学物質

作用機序が異なる 3 種類のアポトーシス誘発物質、actinomycin D (ActD, CAS No. 50-76-0、和光純薬)、thioacetamide (TAA, CAS No.62-55-5、和光純薬)、daunorubicin (DNR, CAS No.23541-50-6、和光純薬)を用いた。

3) 細胞毒性

96 穴マイクロタイタープレート(ヌンク社)に播種した細胞に被験物質を暴露した後、-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Cell Counting Kit-8、同仁化学)により細胞の生存率を計測した。

4) アポトーシス誘発物質に対する致死感受性

CHL/IU 細胞と V79 細胞をカルノア液(メタノール: 酢酸=3:1)で固定した後、Hoechst 33258 (和光純薬)により蛍光染色した。クロマチンの凝集、核の断片化などア

ポトーシスに特徴的な形態変化を指標としてアポトーシス細胞を蛍光顕微鏡下で識別し、500細胞中に占めるアポトーシス細胞の割合を求め、Apoptotic Index (AI, %)とした。

アポトーシスラダー検出キット(和光純薬)を用いて細胞からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動を行い、SYBR™ Green Iで染色した。

5) 二重染色によるアポトーシスとネクローシスの定量的評価の識別

CHL/IU細胞に種々の濃度のActD及びDNRをそれぞれ24時間及び20時間暴露し、細胞毒性を調べた。2段階の濃度でCHL/IU細胞を処理し、処理後48時間までアポトーシスとネクローシスの出現頻度に関する経時的变化を調べた。

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

◆用いた細胞; CHL/IU(肺線維芽細胞)、KB細胞(口腔内類表皮癌由来細胞)、Ginn-1(歯肉繊維芽細胞)、MCF-7(ヒト乳癌細胞)および健康な成人・実験者(3名)から採取したリンパ細胞の5種の細胞を用いた。

◆化学物質; 水銀やクロム、パラコート、フェノール、ヨード、Actinomycin Dなど25物質を各種濃度で培養液に添加して8・72時間接触させた。

◆細胞毒性試験法としては、ニュートラルレッド法、ギムザ染色法およびフローサイトメトリーを用いてIC50値を求めた。

◆フローサイトメトリー; Becton Dickinson製のImmunocytometry Systemを用い、細胞の大きさや構造を確認するとともに、PI(Propidium Iodide)とAnnexin-Vとの二重染色後に、生細胞、アポトーシス細胞および死細胞を分別し、それらの割合を求めた。

◆アポトーシス細胞の確認; DNAを抽出後、フラグメント化したDNAをアガロースゲル電気泳動法により確認す

るとともに、Acridine orangeとEthidium bromideとの二重染色後に、蛍光顕微鏡下で、形態変化と色調の違いで、生細胞、アポトーシス細胞、ネクローシス細胞の確認を行った。

研究結果

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

①-1 ワイルドマウスでBenzene暴露の造血幹細胞動態解析をBUUV法によって解析し、Benzene暴露中は細胞回転が停止すること、更に投与中止によって速やかに細胞回転が再開することが初めて見いだされた。更に、骨髓細胞から調整した蛋白を用いたWestern法によって、2週間のBenzene暴露直後にp21がup-regulateすることを明らかとした。またワイルドマウスでの細胞回転停止はp53遺伝子欠失マウスを用い場合には観察されないことも見いだした。

①-2 前年度に示唆的に得られたパラコート投与による精巣毒性誘発機序にチオレドキシシン分子が関与する可能性と、アポトーシスが急性毒性の強さの指標としてのLD₅₀値に変わり得る可能性について検証を進めているが、まとまった結果を得るに至っていない。

② 骨髓再建マウスによる発がん試験の結果、ホモマウス由来骨髓細胞再建群ではワイルドに比べて早期に死亡し、その背景として造血器腫瘍発生頻度が高くなっていることも観察された。さらにこの背景として、骨髓再建後のMNU投与によって造血幹細胞数の回復がホモマウスでワイルドに比べて悪いにも関わらず、末梢血数ではワイルドと差異なく回復傾向を認め、遺残傷害が高くなる可能性を持っていることが示唆された。

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

1)種々の物質の BALB 3T3 細胞における DES 誘導アポトーシスに対する影響として、FCS 0.5%の培地における DES(5 mg/ml)によるアポトーシスは、サイトカインである TNF(tumor necrosis factor、10 ng/ml)、TGF- β (transformation growth factor- β 、10 ng/ml)、Transferrin(100 mg/ml)、EGF(epidermal growth factor、200ng/ml)及び insulin(10 mg/ml)の影響を受けなかった。一方、カタラーゼ(H_2O_2 分解作用、300 units/ml)及び Z-VAD-FMK(caspase 阻害作用、50mM)は DES によるアポトーシスを阻害した。しかし、SOD(super oxide dismutase、 O_2^- 不均化作用、200 units/ml)は影響を与えなかった。

2)DES の Hu-M1 細胞及びその形質転換細胞における増殖に対する影響として、DES によるアポトーシスは Hu-M1 細胞に対して見られなかった。一方、その形質転換細胞である HuM1-TTu2 及び HuM1-MCA-TPA-1 細胞では、DES によるアポトーシスが観察された。

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

一般所見:

ラットの状態は、Cont-1 時間群、Cont-4 時間群および PQ-1 時間群においては、全て異常は認められなかった。しかし PQ-4 時間群で、投与 2 時間後くらいからうずくまり状態となり動きが鈍くなってきた。

臓器重量:

全ての群で、有意差は認められなかった。

血液所見:

白血球分画では、T-Neu%が PQ-4 時間群で有意に増加した。これは、パラコートによる何らかの急性炎症反応が起きた証拠であると思われる。

一般生化学検査においては、TP が PQ-4 時間群において有意な増加が認められた。Glu は、PQ-1 時間群、PQ-4 時間群とも有意に増加した。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が、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かった。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。また、CRE は PQ-1 時間群、PQ-4 時間群とも有意に増加し、腎機能障害が起きている可能性が示唆された。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。コルチゾールの最終産物であるコルチコステロンが、PQ-1 時間群、PQ-4 時間群とも有意に増加した。これは、いわゆるショック状態に陥ったことによる副腎皮質ホルモンの増加であると思われる。

BALF 所見:

回収率、血清と BALF 中の Urea 値から、回収された BALF 中の末梢気道と肺泡に存在する上皮被覆液(ELF)量も有意差はなかった。その他細胞傷害と肺泡/毛細血管バリアの透過性亢進を示す TP、ALP、LDH も多少の増加があった程度だったので、血管透過性はあまり亢進していないものと推測できた。

細胞数や細胞分画には変化はみられず、肺泡への炎症細胞などの遊走はなかったことが推測された。

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、PQ-4 時間群で PE、PS が増加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 が漏出する現象が報告されており、何らかの影響があったことが示唆された。

気道粘液の過分泌時に増加する SIAL と Fucose については、パラコート投与で増加傾向はあったが有意ではなかった。

抗酸化物質である GSH は、PQ-4 時間群で有意に増加した。BALF 中 GSH の由来や増加のメカニズムは不明であるが、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。

末梢白血球中、組織中 8OHdG:

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。なお、8OHdG は GC→TA のトランスペ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いる。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。脾臓中 8OHdG が、パラコート投与により増加傾向があったが有意ではなく、また、その他の組織においても顕著な変化は認められなかった。つまり、8OHdG を生成するほどの活性酸素が産生されなかったか、または、修復された可能性が考えられた。

末梢白血球中 p53 遺伝子 mRNA 量:

化学物質の代謝酵素遺伝子は曝露によって誘導され、このような遺伝子の mRNA は曝露者の末梢白血球中に多くなることが示唆されている。したがって、末梢白血球中 mRNA 量は、曝露とそれによる化学物質の活性化に密接に関係する反応マーカーになりうるのではないかと考えられる。同様に、パラコートによりアポトーシスが起るような負荷がかかれば、p53 遺伝子も誘導されてくることが期待され、mRNA 発現量が増すはずである。

mRNA 量は基本的に RT-PCR 法で測定されるが、従来のゲル電気泳動を利用した方法は定量性に欠ける。これに対して最近開発された Real time PCR 法を使用することによって高感度に mRNA 量を定量することができるようになった。また、目的とする遺伝子 mRNA 量の比較を行う場合には、内因性コントロール遺伝子の発現量

を基準にする場合が多い。このような遺伝子の大部分は従来ハウスキーピング遺伝子と言われているものであり、今回はラットでも発現している 18S rRNA を使用した。p53 cDNA の PCR は、特異的な TaqMan プローブ (Ratp53T732, 5'-Fam-TGACGGCCTGGCTCCTCCC-Tamra-3') を作成して、Real time PCR 法 (ABI PRISM 7700, PE Biosystems) で行った。結果の表示は、Cont-1 時間群の 1 サンプルを基準とした時の p53 遺伝子の PCR 産物量で示した。

また、ラットに対する特異的なプローブを作成したが、条件が合わずに、標的臓器と思われる肺組織での定量はできなかった。しかし、末梢白血球中 p53 遺伝子の mRNA 量は定量可能となり、パラコート投与群で有意ではないが、増加傾向が認められ、アポトーシスが起きた可能性が示唆された。

大塚雅則: 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

アポトーシス誘発物質に対する致死感受性

CHL/IU 細胞と V79 細胞を、それぞれ 1~60 nM の ActD で 24 時間、1~30 mM の TAA で 48 時間処理した後、MTT assay により細胞毒性を調べた。ActD の IC₅₀ はいずれの細胞においても約 30 nM であったが、TAA の IC₅₀ は CHL/IU 細胞において 17 mM であったのに対し、V79 細胞においては 35 mM であった。一方、ActD 処理では細胞間で AI (%) に差はみられなかったが、TAA 処理では CHL/IU 細胞においてアポトーシスがより高頻度に誘発されていた。

次に、アポトーシスの誘発を定量的に比較するために AI (%) が 10% となる濃度 (AC₁₀) を多項式近似値より算出した。ActD 処理における AC₁₀ はいずれの細胞においても約 25 nM であったが、細胞間で生存率に顕著な差がみられた TAA 処理における AC₁₀ は、

CHL/IU 細胞で約 10 nM であったのに対し、V79 細胞では約 23 nM であった。

二重染色によるアポトーシスとネクローシスの定量的評価

0~200 nM の ActD で 24 時間処理した CHL/IU 細胞を acridine orange と ethidium bromide で二重染色し、500 細胞中に占めるアポトーシスとネクローシスの割合を算出した。IC₅₀ 値の 30 nM に近い 25 nM からアポトーシスが誘発され、100 nM まで濃度に依存して増加し、100 nM でピークの 65% を示した。一方、ネクローシス細胞の割合は、上限の 500 nM まで増加する傾向を示した。次に、25、50 nM の ActD で CHL/IU 細胞を処理し、経時的変化(0~48 時間)について調べた。25 nM では 24 時間でアポトーシスが誘発され、48 時間でピークの 39% に達した。一方、50 nM では 12 時間でアポトーシスが誘発され、24 時間でアポトーシス誘発ピークの 60% に達し、その後漸減していった。

DNR についても同様の検討を行なった。0~50 μM の DNR を 20 時間暴露した CHL/IU 細胞を二重染色した結果、1 μM からアポトーシスが誘発され、10 μM で約 30% の誘発がみられた。次に 1、5 μM の DNR で CHL/IU 細胞を処理し、48 時間までの経時的変化を調べたところ、1 μM の DNR 処理では 15 時間でアポトーシスが誘発され、36 時間でピークの 56% に達した。一方、5 μM の DNR では 12 時間でアポトーシスが誘発され、18 時間でアポトーシス誘発ピークに達した。

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

1. 細胞毒性試験による IC₅₀ 値

4 種の細胞を用いた細胞毒性試験法により IC₅₀ 値を求め比較したところ、高い相関性が得られたが、細胞による特異性が認められた。すなわち Ginn-1 細胞

と CHL 細胞とでは相関性も高く、比較的近似した IC₅₀ 値が得られているが、KB 細胞や MCF-7 細胞による IC₅₀ 値は、CHL 細胞に比べて大きく、毒性が低く現れるという細胞特異性がみられた。また CHL 細胞は継代培養による変化が少なかったが、KB 細胞や MCF 細胞、Gin-1 細胞では継代による変化が比較的観察された。したがって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、かつ継代培養が容易な CHL 細胞が適当であろう。

また細胞毒性試験法での比較では、今回フローサイトメリーで求めた IC₅₀ 値は、従来のニュートラルレッド法やギムザ染色法との相関性が高かったが、フローサイトメリーでの IC₅₀ 値が大きく求められる傾向にあった。しかしフローサイトメリーによる方法では、IC₅₀ 値とともに、後述のアポトーシス細胞を分別しうることから有用性が大きいと考えられる。

次に、細胞毒性試験で求めた IC₅₀ 値と、げっ歯類で求めた in vivo での経口 LD₅₀ 値との関係であるが、ヨードやホルマリンのような皮膚・粘膜刺激性物質を除いた場合には、LD₅₀ 値と LC₅₀ 値とは有意な相関関係がみられた。これらの刺激性物質では、LD₅₀ 値に比して LC₅₀ 値が小さく現れることを示した。したがって刺激性物質の評価と、急性毒性の一次試験としての細胞毒性試験を個別に考える必要がある。

2. アポトーシス細胞の誘導

アポトーシス細胞をアガロース電気泳動法と蛍光顕微鏡法により確認するとともに、フローサイトメリーにより、生細胞、アポトーシス細胞および死細胞の分別を試みた。CHL/ IU 細胞とヒト・リンパ球に、水銀あるいは Actinomycin D を添加して 8・72 時間培養後に、IC₅₀ 値を求めるとともに、アポトーシス細胞の誘導を検討した。IC₅₀ 値は、CHL/IU 細胞に比べてリンパ細胞で低く、また水銀に比べて Actinomycin-D の値が低い結果で

あった。この IC50 値は、フローサイトメトリーによる生細胞の推移から求めたものであるが、生細胞、アポトーシス細胞および死細胞の割合の推移を示している。CHL/ IU 細胞では、アポトーシス細胞が、水銀の 15 および 20 ppm の添加で検出され、Actinomycin-D では低濃度の 0.5 nmol 添加で認められた。またヒトリンパ細胞でも同様の傾向がみられ、水銀の 10 および 15ppm 添加でアポトーシス細胞が認められ、Actinomycin-D の添加では 0.15nmol の低濃度から高い割合のアポトーシス細胞が観察された。さらに接触時間との関係では、8時間ではアポトーシス細胞の割合は少ないが、16・48 時間の接触で最も高い割合で認められ、72 時間後では減少する傾向にあった。

これらのことから、水銀では、IC50 値に近い濃度でアポトーシス細胞を検出したのに対して、Actinomycin D では、IC50 値よりもかなり低濃度で高率のアポトーシス細胞の誘導を認めた。フローサイトメトリーによる細胞毒性評価では、細胞の致死的影響を IC50 値で評価できるとともに、アポトーシスの誘導の程度も把握できることを示した。

考察・結論

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

①-1 従来 Benzene によって造血幹細胞は細胞回転が上がるものと考えられてきたが、これを BUUV 法によって解析した結果、Benzene 投与は細胞回転を止めること、更に投与中止によって速やかに細胞回転が再開することが明らかとなった。またこの細胞回転停止は p53 遺伝子欠失マウスでは観察されないことから、その分子基盤は p53 依存性であることが示唆された。この結果はワイルドマウス由来骨髓細胞を用いた Western 法で p21 が up-regulate にしていたことと良く

符合する。

これまで klotho マウスでの発がん高感受性は予想されるものの、短寿命のため検証できなかった。また、klotho 遺伝子産物は膜結合型と共に液性因子としても存在することが示されており、少なくともヘテロマウスでの血管反応性については、ワイルドマウスとのパラピオトーシスによって正常化することも示されていて、実態の予測を困難にしていた。今回のワイルドマウスを recipient として用いたホモ欠失マウス由来骨髓再建系での発がん高感受性の証明は、当該遺伝子産物の欠失が recipient から供給される液性因子では代償されない機能欠失をまねくことを示唆する事象として興味深い。

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

血清中に存在すると考えられるアポトーシスを阻害する物質を見つけ出す目的で、5 種類のサイトカインを添加してみたが、いずれのサイトカインもアポトーシスを阻害しなかった。一方、アポトーシスの過程において活性酸素の種の生成が見られることから、カタラーゼと SOD と添加したところ、カタラーゼのみアポトーシスを阻害した。この結果から、DES によるアポトーシスの誘導には、H₂O₂ の生成が関与していることが示唆された。

P53 の発現はアポトーシスを誘導することが知られている。一方、SV40 の large T 抗原は p53 タンパクと結合し、p53 の転写活性機能を阻害する。そこで SV40 の導入により形質転換した Hu-MI 細胞を用いて DES の影響を検討したところ、DES はアポトーシスを誘導しなかった。このことから DES は p53 を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。

以上の結果、DES によるアポトーシスを阻害している血清中の物質を見いだすことはできなかった。しかし、

その機構に H₂O₂ の生成及び p53 が関与していることが示唆され、DES の新しい機能が示された。

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

ラットへのパラコート単回投与 1 時間と 4 時間の早期について観察した。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、特に PQ-4 時間群において血液 T-Neu、Glu、TP、CRE、コルチコステロン、BALF-GSH の増加がみられたことは、何らかの炎症性の反応が起きたことが示唆された。

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。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。

癌抑制遺伝子である p53 遺伝子は、アポトーシス関連遺伝子である。末梢血白血球中 p53 遺伝子 mRNA 量は、パラコートにより増加傾向を示したことから、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た可能性が示唆された。しかし、動物を屠殺しないで、アポトーシスの有無を確認することは、特に標的臓器の場合は不可能であり、本研究の主旨とは合っていない。また、血液の場合はその限りではないが、化学物質の毒性の強さを鋭敏に示すほどの結果は得られていない。

大塚雅則: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

アポトーシス誘発物質に対する致死感受性の結果から、アポトーシスの誘発が細胞株における TAA の毒性影響の違いに関与していることが示唆された。また、二重染色法の適用により、単染色では困難であったアポトーシス初期細胞とアポトーシス

後期細胞をより明確に識別することが可能になり、定量化の精度を向上させることができた。さらにネクローシス細胞を併せて観察することにより、アポトーシスからネクローシスへの細胞死の移行を詳細に解析することが可能であると考えられる。

以上結果から、acridine orange と ethidium bromide の二重染色を用いることにより、アポトーシスを指標に比較的低濃度の領域で毒性評価が可能であると考えられた。

山中すみへ:アポトーシスを指標とした培養細胞による毒性評価と一般細胞毒性試験との比較

in vitro での IC₅₀ 値と in vivo での LD₅₀ 値との関係では、刺激性物質を含めた場合に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。皮膚・粘膜刺激性は、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 値が低くなると考えられた。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、目的に応じた個別の評価には有効であろう。一方、アポトーシス細胞の検出では、p53 に依存してアポトーシスを誘導するとされている Actinomycin D では、水銀の場合とは異なり、IC₅₀ 値よりもかなり低濃度の添加でアポトーシス細胞を高率に出現した。細胞毒性評価の 1 つとして、致死的影響の IC₅₀ 値とともにアポトーシスの誘導の程度も指標となりうる可能性を示した。以上の結果から、培養細胞を用いた細胞毒性試験による IC₅₀ 値は、個別に急性毒性や膜障害性を評価する一次試験法としては有用であることを示した。またアポトーシス細胞の検出により、化学物質によるアポトーシスの誘導の程度が把握でき、IC₅₀ 値とともにアポトーシス誘導の程度も細胞毒性の一指標となりうることを示唆した。