

戸倉新樹：光アレルギーの発症機序と対策。
アレルギー 55: 1382-1389, 2006.

戸倉新樹：薬剤性光線過敏症。臨床と研究
83: 87-90, 2006.

戸倉新樹：内服テストと内服照射テスト。皮
膚科診療プラクティス。19. 薬疹を極める。
文光堂, pp125-127, 2006.

戸倉新樹：後天性光線過敏症の病態。先端医
療シリーズ38 皮膚疾患の最新医療 斎田俊
明, 飯塚一編 221-224, 2007.

H. 知的財産権の出願, 登録状況
無し。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------------|--------------------|-------------------------|-----------|-----|------|---------|
| 戸倉新樹 | 内服テストと内服照射テスト | 宮地良樹、 滝川雅浩 編 | 皮膚科診療プラクティス. 19. 薬疹を極める | 文光堂 | 東京 | 2006 | 125-127 |
| 戸倉新樹 | 後天性光線過敏症の病態 | 斎田俊明, 飯塚一編 | 先端医療シリーズ38 皮膚疾患の最新医療 | 先端医療技術研究所 | 東京 | 2007 | 221-224 |
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|----------------|----------|-----------|------|
| Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, Tokura Y | Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells. | J Dermatol Sci | 41 | 127-136 | 2006 |
| Orimo H, Tokura Y, Hino R, Kasai H. | Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of cultured human keratinocytes by clinically used doses of narrowband and broadband ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A. | Cancer Sci | 97 | 99-105 | 2006 |
| Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, Nishigori C, Miyachi Y, Tokura Y, Narumiya S. | Prostaglandin E(2) is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. | Lab Invest | 87 | 49-55 | 2007 |
| Hino R, Kobayashi M, Mori T, Orimo H, Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y. | Inhibition of T helper 2 chemokine production by narrowband ultraviolet B in cultured keratinocytes. | Br J Dermatol | In press | | 2007 |
| 戸倉新樹 | 光アレルギーの発症機序と対策 | アレルギー | 55 | 1382-1389 | 2006 |

| | | | | | |
|------|----------|-------|----|-------|------|
| 戸倉新樹 | 薬剤性光線過敏症 | 臨床と研究 | 83 | 87-90 | 2006 |
|------|----------|-------|----|-------|------|

厚生労働科学研究事業費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担報告書

細胞毒性による *in vivo* 全身毒性の予測について
—各臓器由来細胞の反応性—

分担研究者： 田中 憲穂(財)食品薬品安全センター秦野研究所 遺伝毒性部長

研究要旨

急性毒性予測の為の代替法として、細胞毒性試験の可能性を調べてきた。生体での毒性反応を培養細胞で予測する為には、さまざまな要因について考慮することが必要であることがわかっている。本研究班ではこれまで、①代謝活性化の問題、②化学物質と蛋白との結合による毒性発現などの問題について基礎データを提供し、*in vitro*での毒性発現にこれらの要因が大きく関与していることを示した。本年度は、化学物質の臓器特異的な毒性発現の有無について調べる為、*in vitro*細胞毒性試験に用いる各臓器由来の4種の細胞株を用いて、動物実験で臓器特異的な毒性反応が報告されている14種の化学物質を用いて検討した。

その結果、用いた培養細胞の由来臓器と動物において臓器特異的な毒性発現が報告されている化学物質の間に関連性は見出せず、むしろ細胞種よりも代謝活性化や薬物の処理時間が毒性発現に大きく関与していることが推測された。

A. 研究目的

動物を用いる急性毒性試験の代替試験法として細胞毒性試験を適用する場合の問題点として、①生体内での薬物代謝、②薬物と蛋白との結合、③化学物質の臓器特異的な毒性反応、脳血管バリアーなどがある。本研究班ではこれまで、①S9を用いる薬物代謝による細胞毒性と、②化学物質と蛋白の結合による毒性変動についての基礎データを提供し、*in vitro*での毒性発現にこれら要因が大きく関与していることを示した。本年度は、化学物質の臓器特異的な毒性発現の有無について調べる為、*in vitro*細胞毒性試験に用いる各臓器由来の4種の細胞株を用い、動物実験で臓器特異的な毒性反応が報告されている14種の化学物質を用いて検討した。

B. 研究方法

細胞毒性試験として96ウェルプレートによるニュ

ートラルレッド法を行った。細胞はVERO細胞(アフリカミドリザル腎由来)、PC12細胞(ラット副腎髄質褐色細胞腫由来)、HepG2細胞(ヒト肝芽腫)、およびBALB/3T3 clone A31細胞(マウス胎児由来)を用いた。

化学物質は、以下に示す14種の化学物質を用いた。

肝毒性を示すもの:5種

Tetracycline HCl、carbon tetrachloride、coumarin、acetaminophene、thiophene

腎毒性を示すもの:3種

Cyclosporin A、gentamycin sulfate、4-aminophenol

神経毒性を示すもの:3種

Trichlorfon、*m*-cresol、2-hexanone

肝毒性と神経毒性を示すもの:1種

Malathion

腎毒性、肝毒性と神経毒性を示すもの:1種

Caffeine

対照物質:1種

Sodium lauryl sulfate (SDS)

化学物質は6時間処理(S9 0%、2%、5%)および24時間処理(S9 0%)の4系列について行った。S9 mixの組成は以下の通りとし、S9添加系では処理液中のS9濃度が2%または5%となるようにS9 mixを添加した。

- ・S9(フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンにより酵素誘導したラット肝)30%
- ・HEPES (pH7.2) 4 mM
- ・MgCl₂ 5 mM
- ・KCl 33 mM
- ・グルコース 6 リン酸 5 mM
- ・b-NADP⁺ 4 mM

細胞播種1日後に化学物質を処理した。6時間処理ではS9(2%または5%)存在下または非存在下で処理後、新鮮な培地に交換して更に18時間培養した。24時間処理では連続で24時間処理を行った。処理開始から24時間経に、ニュートラルレッド含有培地と交換し、更に3時間ニュートラルレッドの取り込みを行うために培養後した。細胞に取り込まれたニュートラルレッドを抽出液、540 nmの吸光度で測定を行った。

C. 試験結果と考察

各物質の4種類の細胞を用いた細胞毒性試験の結果をAppendix 1(図1-14)に示した。Gentamycin sulfate、2-hexanoneおよびThiopheneではいずれの細胞のいずれの処理系列でも試験を行った最高濃度の1 mg/mLまで細胞毒性を示さなかった。2-Hexanoneは代謝により神経毒性を示す化合物であるが、PC12細胞を初め、いずれの細胞でもS9の有無に関わらず、細胞毒性は示さなかった。これら3物質を除いた、11物質の各細胞で得られたIC₅₀値について化学物質の作用別に示す。

肝毒性を示す物質(Fig 1)

Carbon tetrachloride、Tetracycline HCl、Coumarin、Acetaminophene、Caffeine、Malathionでは、ヒトや動物実験において肝毒性についての報告がある。Carbon tetrachlorideは肝臓や腎臓で毒性を示す代表的な物質であるが、いずれの細胞のいずれの系列においてもほぼ同じIC₅₀値および細胞生存曲線を示した。Carbon tetrachlorideは、高濃度において、処理培地に溶解しきれない検体がプレートの底面を腐食していることから、この濃度での毒性は物質が細胞と物理的な接触をすることにより生じた可能性が考えられる。また、Carbon tetrachlorideでは、肝細胞由来でまだ薬物代謝能を有していることが知られているHepG2細胞や、ラットS9添加系での毒性の増強は認められなかった。これは処理後代謝されるまもなくすぐに検体が底面を腐食してしまったためとも考えられる。Caffeineおよびacetaminophenでは6時間処理ではS9の有無に関わらずほとんど毒性が認められず、24時間処理においてcaffeineではVERO細胞とBALB/3T3細胞で、AcetaminophenではVERO細胞とPC12細胞でわずかに細胞毒性が認められた。TetracyclinにおいてもBALB/3T3細胞を除いた3細胞で6時間処理ではS9の有無によらず弱い毒性が認められ、24時間処理で毒性が増強した。Coumarinでは6時間処理においてHepG2細胞とBALB/3T3細胞の両細胞でS9を添加した場合に、毒性が増強した。PC12細胞では処理時間、S9の有無に関わらずほぼ同じ毒性を示した。MalathionはPC12細胞ではいずれの系でも細胞毒性は認められなかったが、S9添加で残りの3細胞系では毒性の軽減が認められた。

腎毒性を示す物質(Fig 2)

Cyclosporin A、4-aminophenol、caffeineは腎毒性を示す物質として報告がある。Cyclosporin Aは主にCYP3Aで代謝され、毒性の弱い物質になることが知られているが、腎由来細胞のVERO細胞ではS9存在下でやや毒性が強くなったが、PC12細胞やBALB/3T3細胞ではS9による影響はほとんど見られなかった。また、すべての細胞で6時間処理よりも24

時間処理の方がより強い毒性が認められた。4-Aminophenol は Acetaminophen のマイナーな代謝物質としても知られている。すべての細胞で S9 非存在下では高濃度で、褐色の沈殿を形成し、この沈殿の形成されるよりも低い濃度でも強い細胞毒性を起こすが、S9 存在下では極端にその毒性は低下した。6 時間処理と 24 時間処理では著しい毒性の増強は認められなかった。Caffeine はいずれの細胞においても 6 時間では毒性が認められず、24 時間処理において VERO 細胞と BALB/3T3 細胞で細胞毒性が認められた。

神経毒性を示す物質 (Fig 3)

Trichlorfon、*m*-cresol、caffeine、malathion ではヒトや動物において神経毒性についての報告がある。Malathion は有機リン系の化合物で、作用機序としてはコリンエステラーゼ阻害を行い、肝臓での代謝により不活化される。PC12 細胞はもともと神経細胞でなく、NGFなどを加えると神経細胞様の形態を示す細胞で分化の研究に用いられている。神経毒性を示す薬物に対して PC12 細胞は特異的な細胞毒性作用は示さなかった。他の 3 細胞系では S9 添加系で毒性が弱くなる傾向が認められた。Trichlorfon も有機リン系の化合物でコリンエステラーゼ阻害を行う。体内では速やかに吸収代謝されるとの報告がある。PC12 細胞では S9 5% 添加系で若干の毒性の現象が認められた。*m*-Cresol は系によって若干の毒性の変化はあるものの、全体的に見ると BALB/3T3 細胞で S9 存在下および処理時間が長くなることで毒性がやや強くなった以外は、ほぼどの系でも変化はみられなかった。

対照物質 (Fig 4)

対照物質として用いた SDS はいずれの細胞のいずれの系列においてもほぼ同じ IC₅₀ 値および細胞生存曲線を示した。本物質は界面活性剤であり、細胞膜破壊により細胞毒性を生じることから、細胞種や S9 の有無および、培養時間による影響が及ばないと考えられる。

まとめ

以上の結果より、用いた培養細胞の由来臓器と動物において臓器特異的な毒性発現が報告されている化学物質の間に関連性は見出せず、むしろ細胞種よりも代謝活性化や薬物の処理時間で細胞毒性は変動した。

この様に明らかに臓器特異性が認められるような結果は得られなかった。むしろ細胞種よりも、S9 の有無および薬剤の処理時間が結果に影響を与えているようである。S9 の添加による毒性の軽減については既に報告しているように、代謝とは関係のないアルブミン添加によって毒性軽減が起こり、薬物と蛋白結合が毒性発現にかかわることが示されている。また、全体の結果から見ると、これまで細胞毒性試験で汎用している BALB/3T3 細胞がほぼどの検体でもよい感受性を示した。臓器特異性を示す薬剤の毒性反応を見るために用いた細胞株は、いずれも樹立されて長期にわたり培養されていた細胞で、臓器機能を有した状態の細胞とは言いがたい。一方、毒性のエンドポイントについても細胞の生死により評価していることから、それぞれの臓器に特異的な毒性指標について検討すべきであろう。

D. 研究発表

1. 論文発表

荒川京子、田中憲穂、高鳥浩介、澤田拓士：飼料から分離した代謝産物の遺伝毒性、Mycotoxins, 56(2)、7-64, 2006

Ayako Sakai, Chihiro Suzuki, Yasuhiko Masui, Kousuke Takatori and Noriho Tanaka: The activities

of Mycotoxins derived from Fusarium and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells), Mutation Res., (in press, 2007)

Yoshitaka HIGA, Mayumi KAWABE, Kyoko NABAE, Yosuke TODA, Sachiko KITAMOTO, Takumi HARA, Noriho TANAKA, Kimio KARIYA and Michihito TAKAHASHI: Kojic acid - absence of tumor -initiating activity in rat liver, and of

carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin. The Journal of Toxicological Sciences (in press, 2007)

Takumi Hara, Takashi Nishikawa, Hajime Sui, Kumiko Kawakami Hiroataka Matsumoto and Noriho Tanaka: In vivo photo skin micronucleus test using a sunlight simulator: Detection of 8-methoxypsoralen and benzo[a]pyrene. Mutation Res. (in press, 2007)

Hayashi, K., Sasaki, K., Asada, S., Tsuchiya, T., Tanaka, N., Umeda, M.: Detection of initiating and promoting activities of chemicals by two-stage model of Balb/c 3T3 cell transformation assay with optimized protocol. ATLA (submitted, 2007)

2. 学会発表

田中憲穂: 化学物質の安全性評価と動物実験代替法の動向について(欧米の動向を中心として) 高機能簡易型有害性評価手法開発ワークショップ

主催: NEDO, 2006年2月、東京

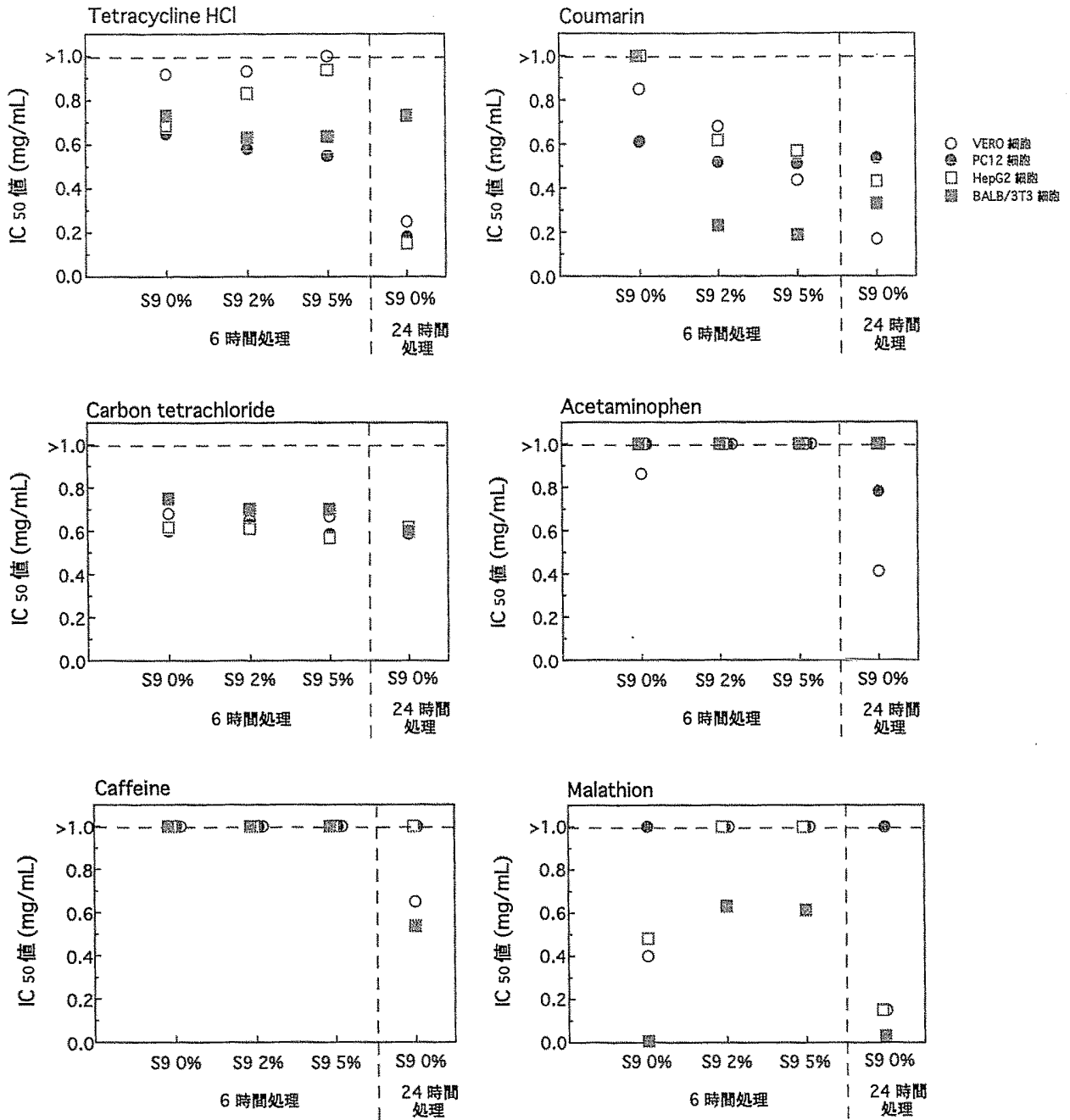


Fig 1 肝毒性を示す化学物質のIC₅₀値

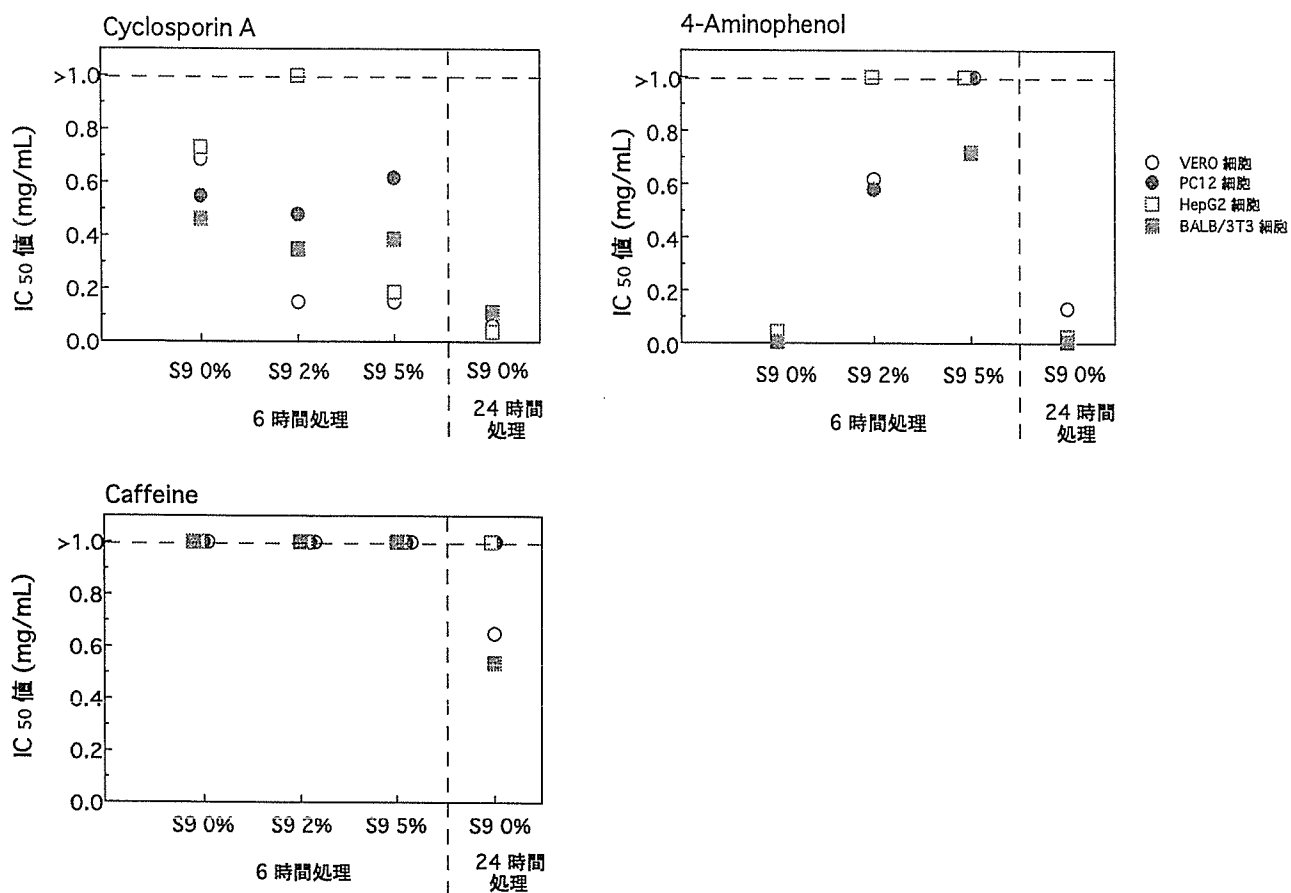


Fig 2 腎毒性を示す化学物質のIC₅₀値

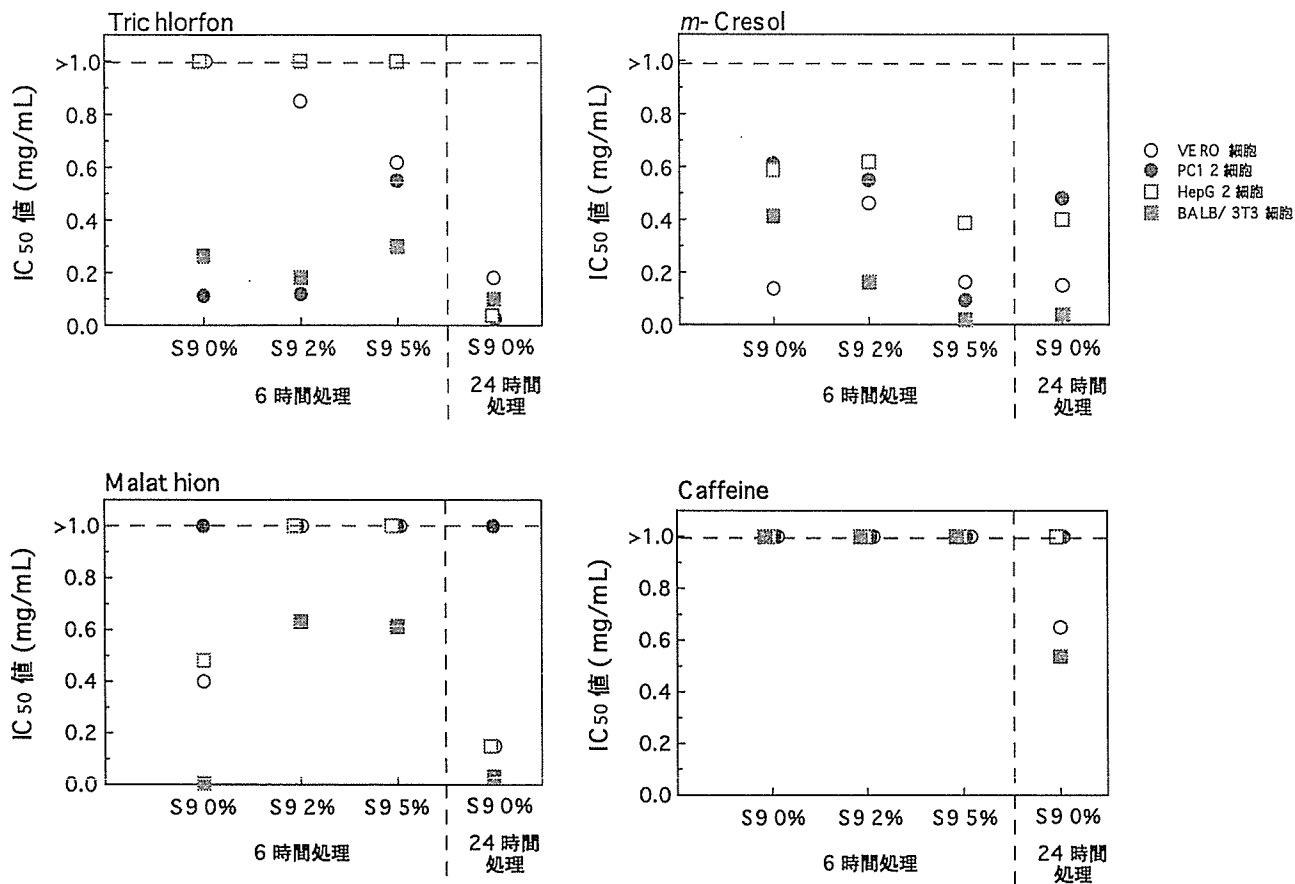


Fig 3 神経毒性を示す化学物質の IC₅₀ 値

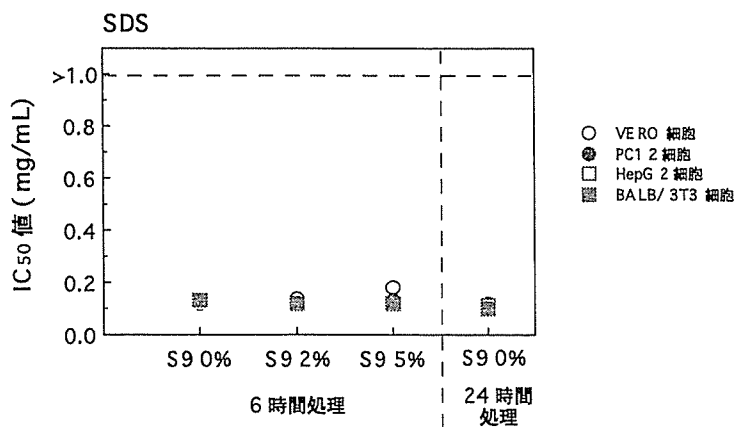


Fig 4 対照物質の IC₅₀ 値

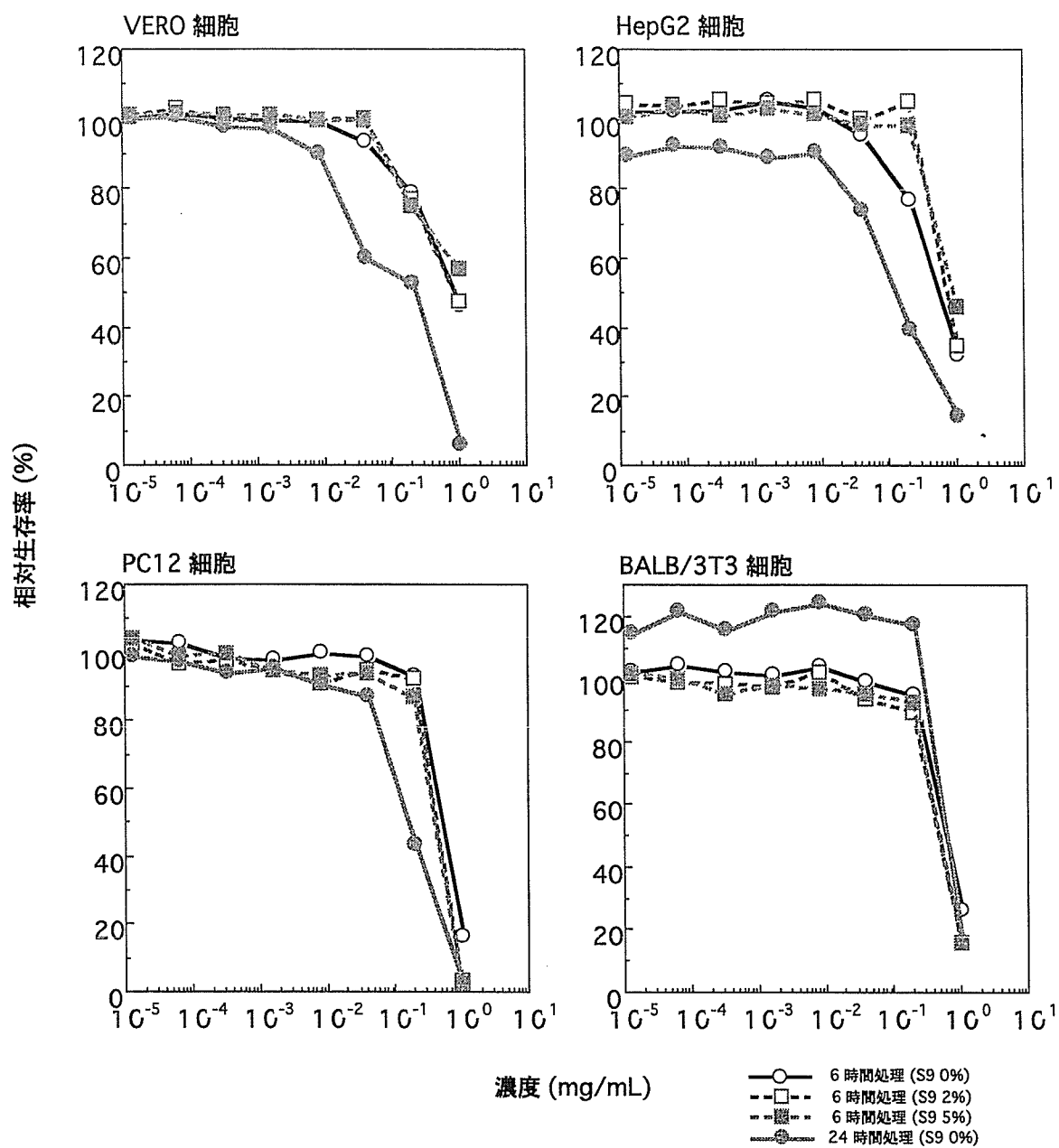
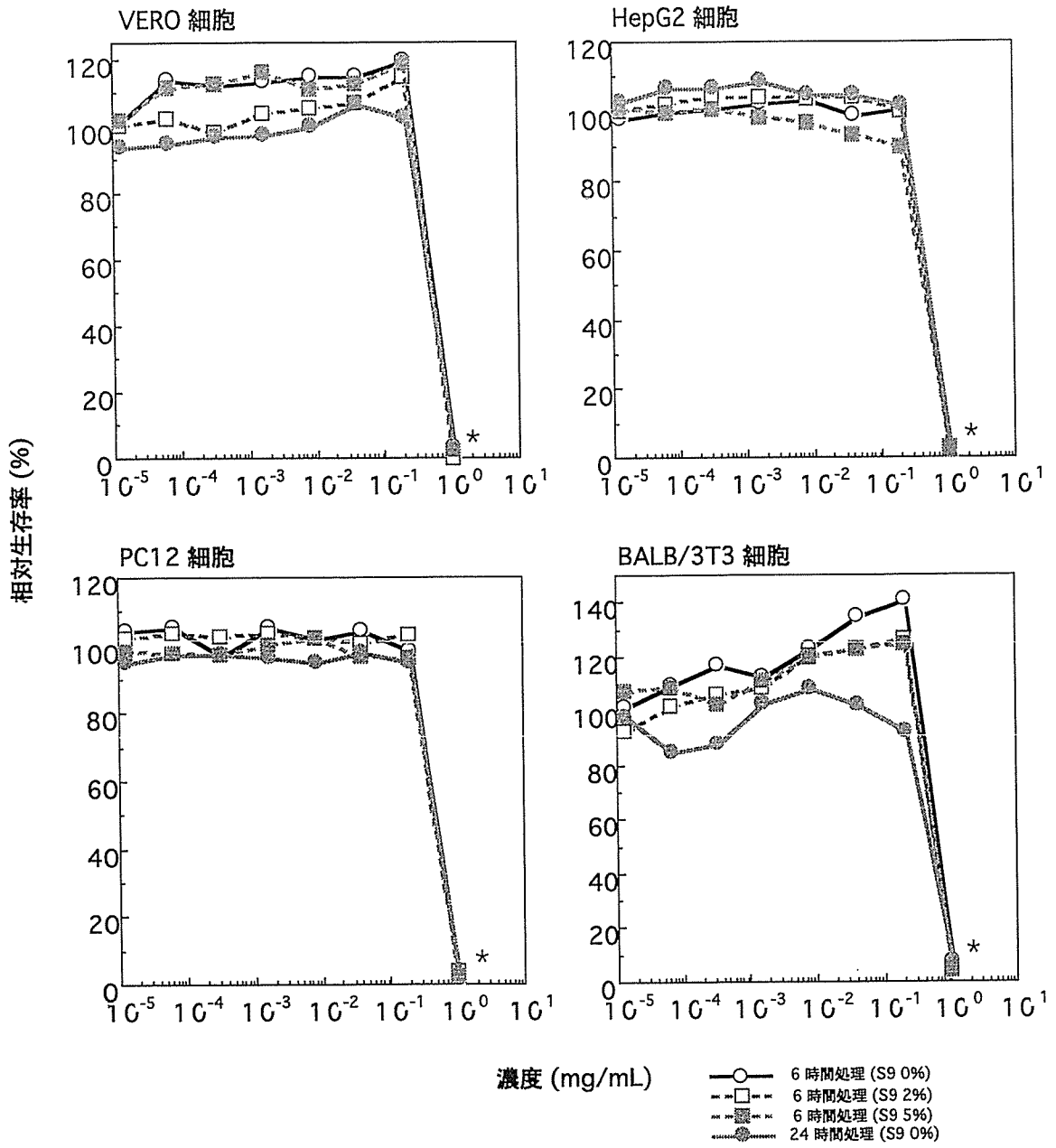


図1 Tetracycline HCl の4細胞における細胞毒性試験結果



*: 1.0 mg/mL では検体により底面が腐食

図2 Carbon tetrachloride の4細胞における細胞毒性試験結果

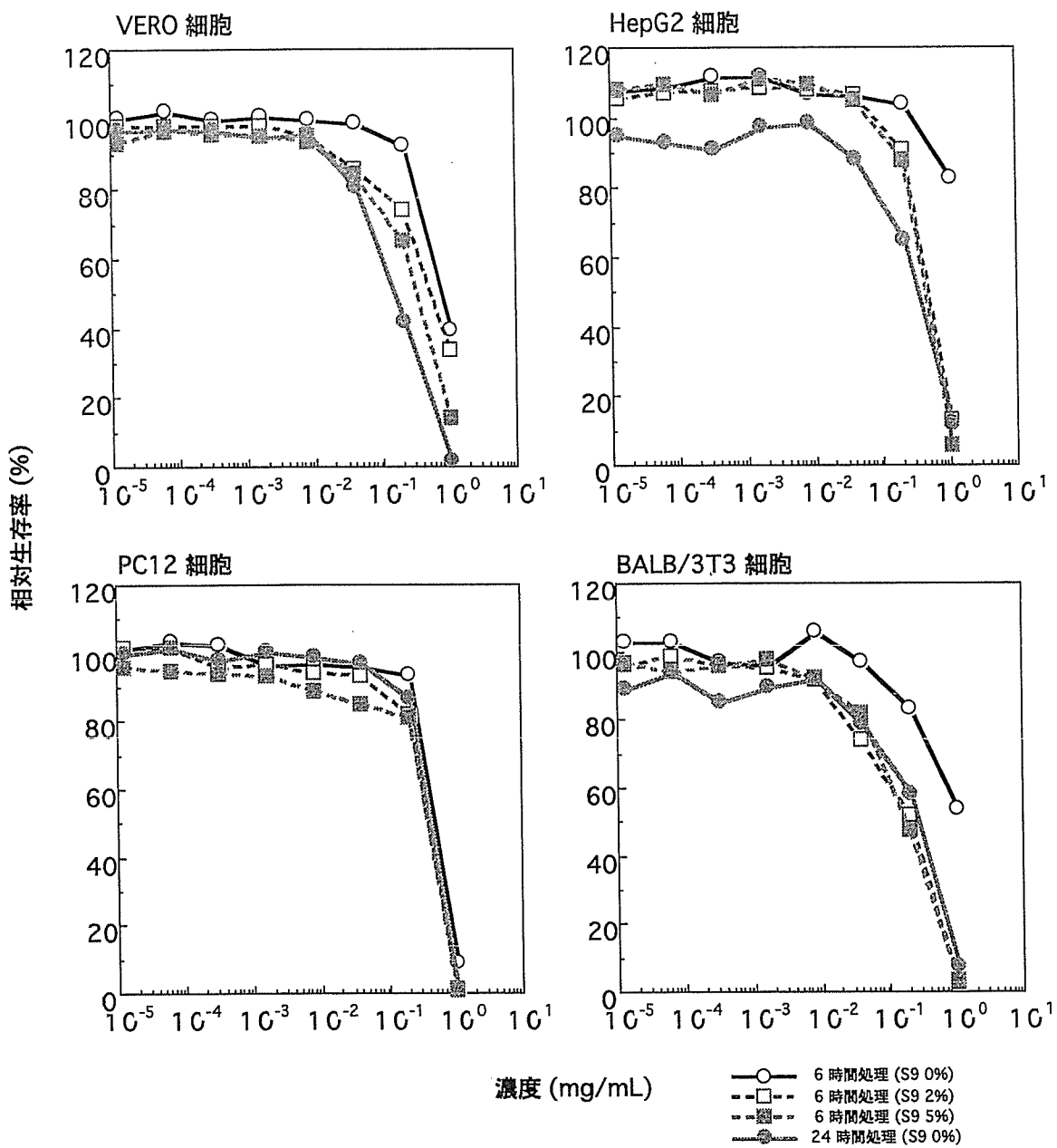


図3 Coumarin の 4 細胞における細胞毒性試験結果

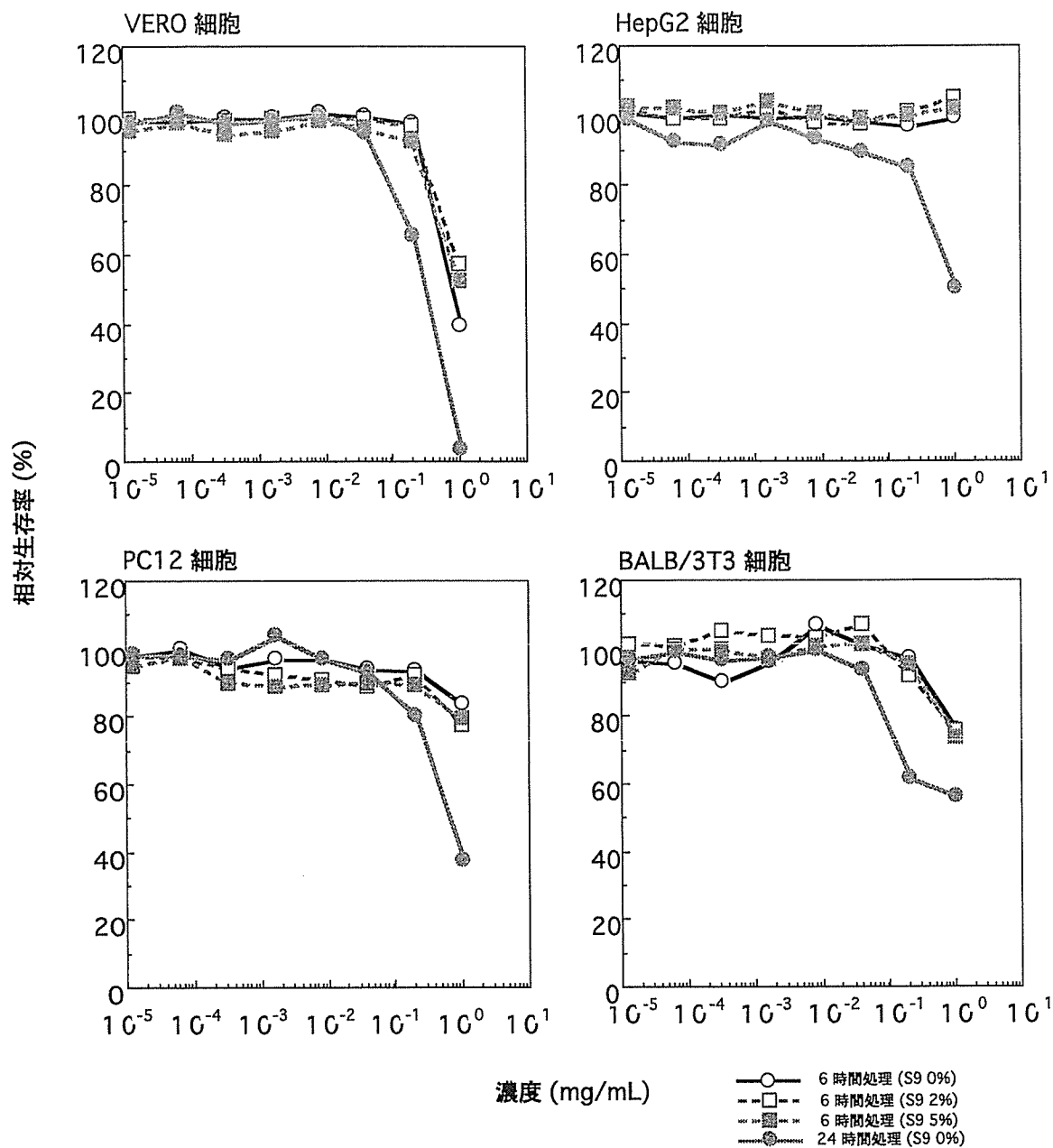


図4 Acetaminophene の 4 細胞における細胞毒性試験結果

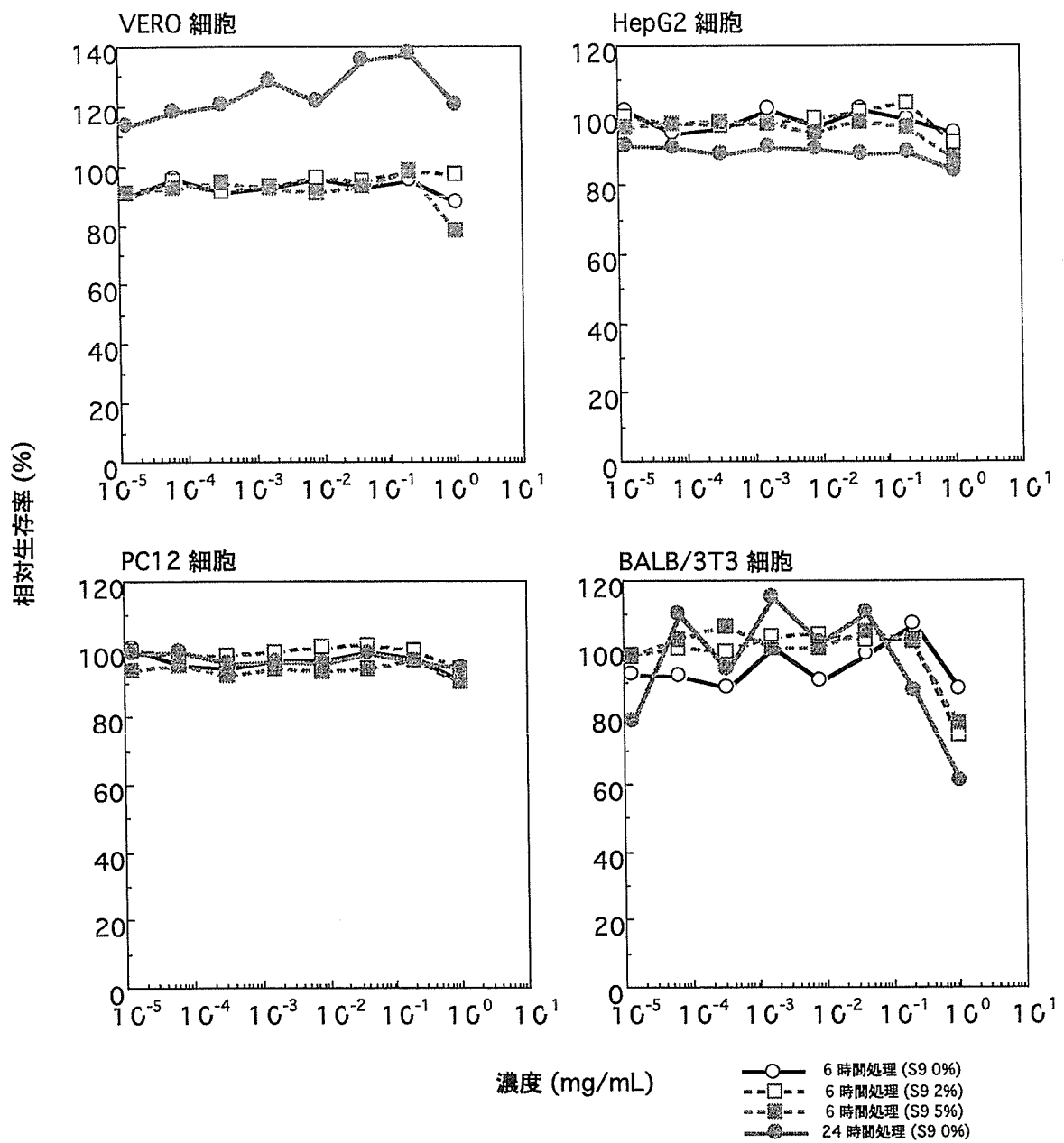


図5 Thiophene の4細胞における細胞毒性試験結果

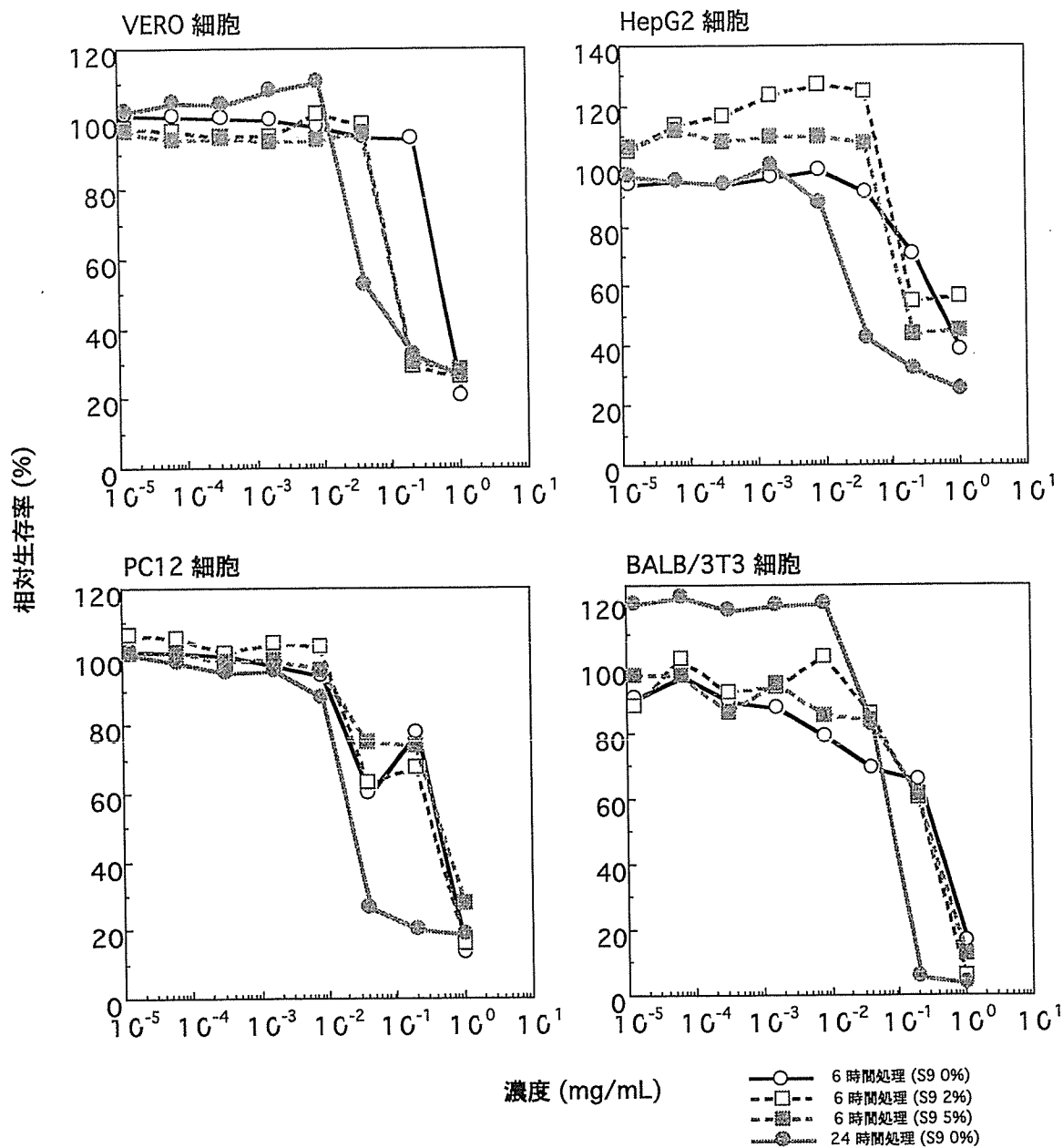


図6 Cyclosporin A の4細胞における細胞毒性試験結果

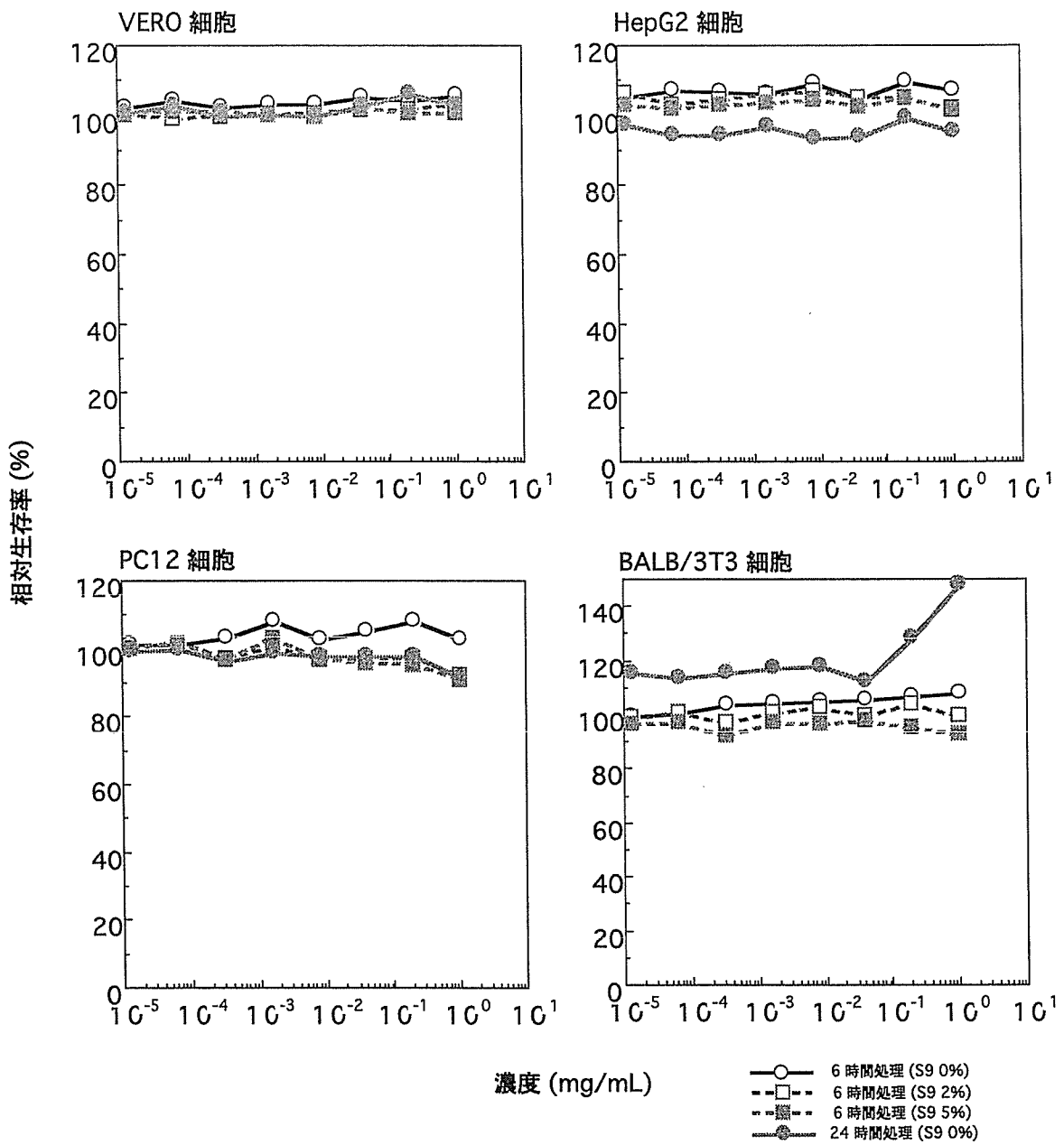
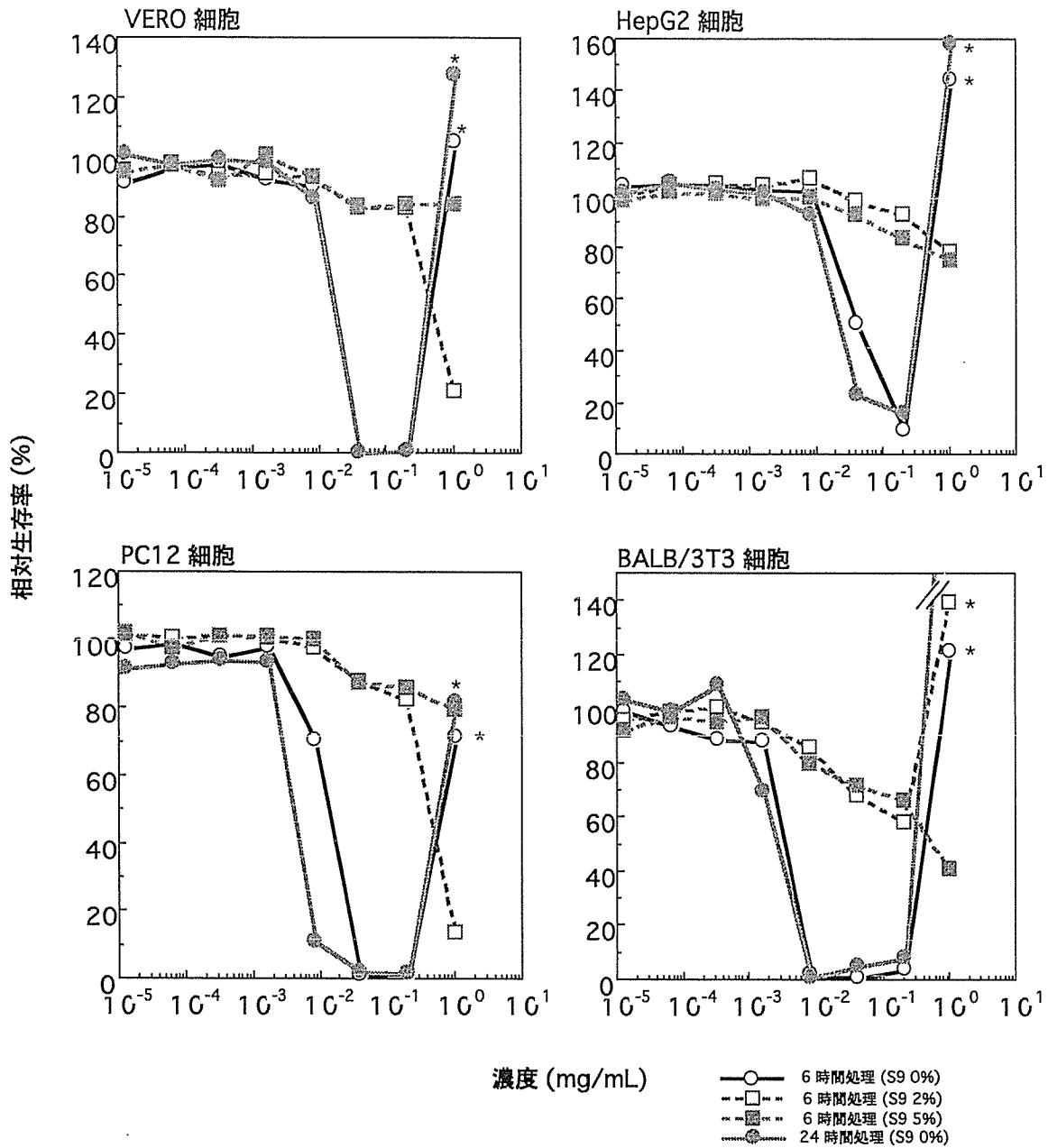


図7 Gentamycin sulfate の 4 細胞における細胞毒性試験結果



*: 被験物質沈殿溶解のため吸光度上昇

図 8 4-Aminophenol の 4 細胞における細胞毒性試験結果

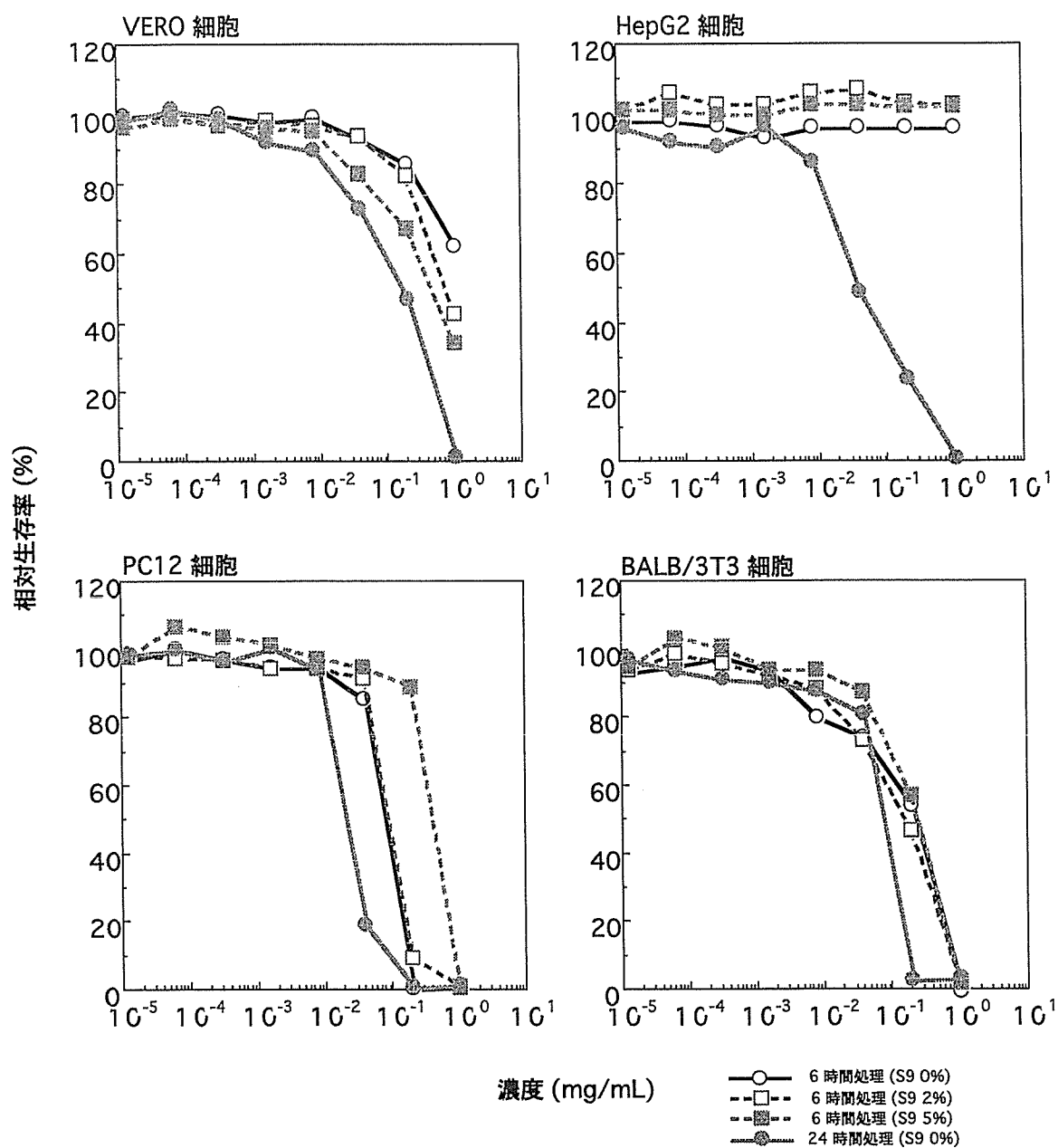


図9 Thrichlorfon の 4 細胞における細胞毒性試験結果

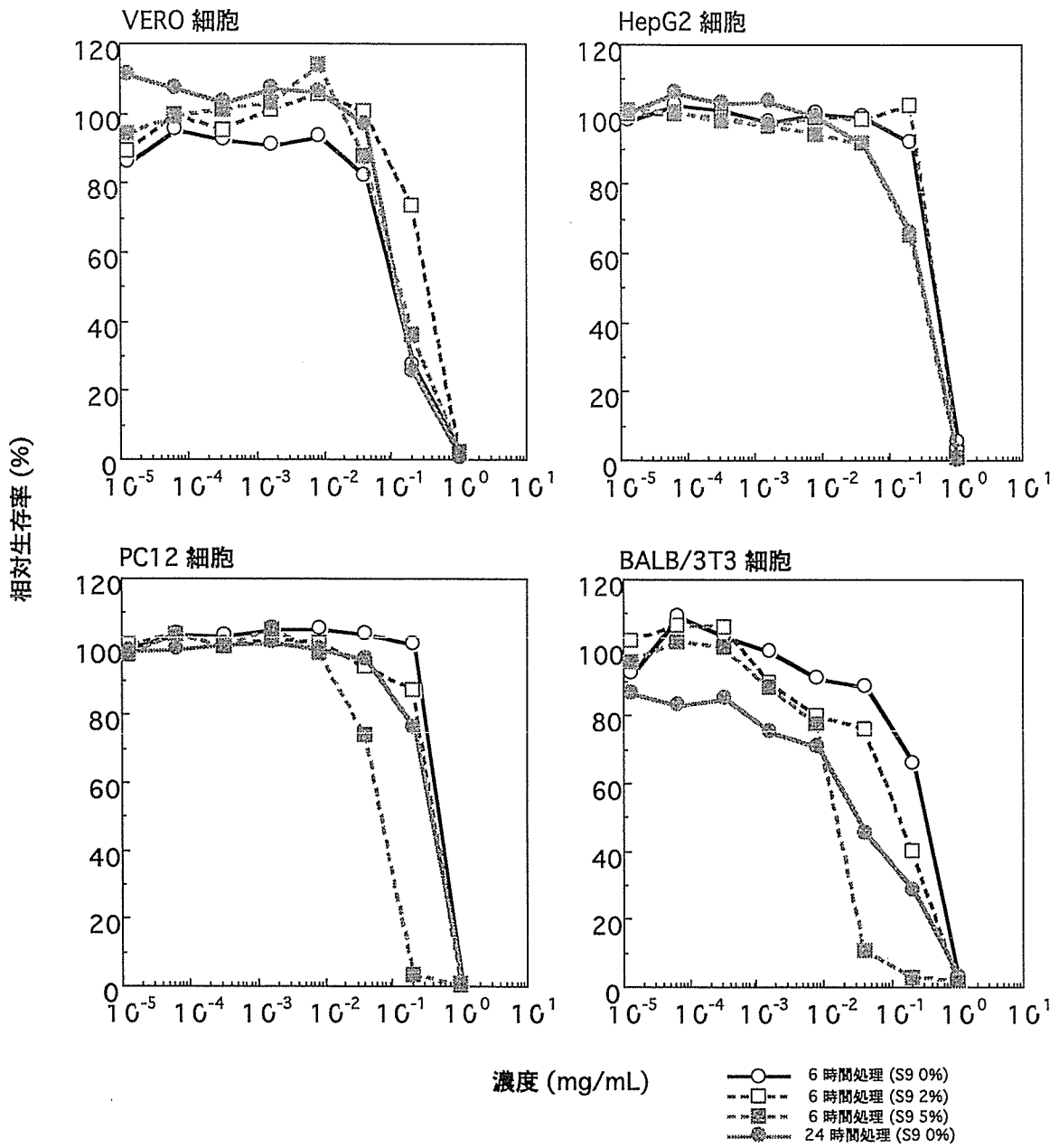


図 10 *m*-Cresol の 4 細胞における細胞毒性試験結果