

Clioquinol の神経細胞に対する障害作用 (5)

豊島 至 (国立病院機構あきた病院脳神経内科)

和田 千鶴 (国立病院機構あきた病院脳神経内科)

研究要旨

これまでの clioquinol の毒性の titration で、神経系培養細胞、一般培養細胞、初代神経細胞において、ほぼ $20\mu\text{M}$ 程度で最小濃度毒性を示すこと、また、速い軸索輸送において同じく $20\mu\text{M}$ で順行性、逆行性輸送ともに障害されることを報告した。今回は、種々の培養条件下で clioquinol 毒性の titration を検討した。その結果、血清濃度を下げることによって clioquinol の最小毒性濃度が低下すること、血清成分分画ではアルブミンのみが毒性抵抗を示すことが明らかになった。また、低濃度 clioquinol は増殖促進を示唆したので今後の検討予定とした。

A. 研究目的

報告者はこれまで clioquinol の毒性の titration を行い、神経系培養細胞、一般培養細胞、初代神経細胞において、ほぼ $20\mu\text{M}$ 程度で最小濃度毒性を示すことを本会で報告した。また、神経特異性を検討するために速い軸索輸送において毒性の titration を行い、同じく $20\mu\text{M}$ で順行性、逆行性輸送ともに障害されることを報告した。

これらの知見は同じ培養条件でおこなわれ、GIT 培地に 20% のウシ胎仔血清を加えたもので行われた。

しかしながら、一般に神経細胞は低濃度の血清条件で行われることが多いことから、今回は、培養神経細胞を SHSY5Y に固定して、clioquinol の毒性の titration を種々の培養条件下で行うことにした。基礎培地、血清濃度を変更し、それぞれの影響を検討した。それにより、血清濃度を下げることによって clioquinol の最小毒性濃度が低下することが分かったので、さらに、血清成分分画の影響についても検討した。

B. 研究方法

基礎培地として GIT、DaigoT、Hybridoma serum-free medium (HM)、DMEM、RPMI、aMEM、

DMEM/HamF12 (いずれも FujiFilm/Wako) について検討した。添加血清はウシ胎仔血清 (FBS, HyClone)、成体ウシ血清 (ABS: NewZeeland 産、Gibco/LifeTechnologies NZ) とし、濃度を変動させた。培養細胞は SHSY5Y に固定し 6 穴培養皿に分散培養して経時的に位相差顕微鏡で観察記録した。血清分画の検討にはヒトアルブミン、ヒトトランスフェリン、ウシアルブミン、ウシトランスフェリン、ウシガンマグロブリンを用いた。

C. 研究結果

連続しない培養プレートを対物 10 倍で撮像し DMSO のみの添加を対照として、これの半分以上の占有面積の濃度を最小毒性濃度とした。図 1 はその 1 例を示すが clioquinol (CQ) $2\mu\text{M}$ までは対照と差がないのに対して $5\mu\text{M}$ 以上では浮遊死細胞のみで、最小毒性濃度は $5\mu\text{M}$ と判定される。図 2 に各種培養液での 3 日後の最小毒性濃度を示す。FBS 濃度 10% 以上では最小毒性濃度は基礎培地の種類にかかわらず、ほぼ $20\mu\text{M}$ であった。また、5% とすると多くは最小毒性濃度が $10\mu\text{M}$ で、2.5% 以下では培養液によりばらついた。無血清培地では SHSY5Y 細胞の viability が低く、CQ 無添加でも培養維持が困難で毒性の判定

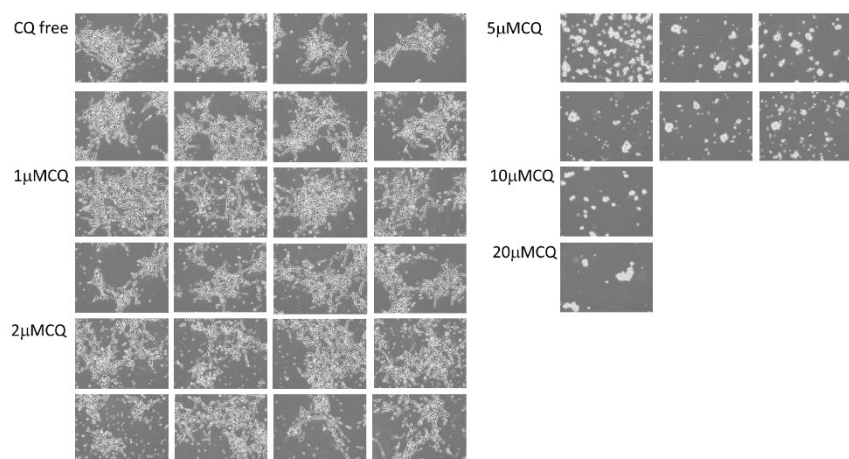


図1 Titration の判定

SHSY5Y 細胞が占有する面積が対照 CQ free に比して 1/2 以下となった well の CQ 濃度とする。
この例では 5 μ M 以上は死細胞なので最小毒性濃度は 5 μ M となる。

medium	fetal bovine serum (%)				
	20%	10%	5%	2.5/2%	0%
GIT	20 μ M	20 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M
HM	20 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	5 μ M
DaigoT	20 μ M	20 μ M	10 μ M	5 μ M	2 μ M
RPMI	20 μ M		10 μ M	2 μ M	2 μ M
DMEM	20 μ M		20 μ M	5 μ M	5 μ M
DMEM/HAMF12		20 μ M		10 μ M	5 μ M

図2 各種培養液で血清濃度を変更した際の最小毒性濃度
図1での判定法による。

には不十分であった。一部で定量的な検討をした。その結果、1 μ M の低濃度 CQ は増殖促進を示した。

血清のどの成分が耐毒性に寄与しているのか検討した。市販のヒトアルブミン、トランスフェリン、ABS より精製したウシアルブミン、トランスフェリン、ガンマグロブリンを添加して最小毒性濃度を検討した。全血清無添加では最小毒性濃度を向上させるものがない。

く、2%全血清にそれぞれを添加して、2%全血清よりも最小毒性濃度を上昇させるものを検討した。その結果を図3に示す。ヒトアルブミンとウシアルブミンのみが2%全血清の耐毒性を向上させることが明らかになった。

D. 考察

これまでの我々の CQ titltion 実験は 20%FBS 添加 GIT を用いて行い、最小毒性濃度が 20 μ M であることを種々の細胞を用いて、また、神経軸索輸送において報告した。今回は血清濃度の変更から始めた。培地変更後3日の観察では、GIT 培地で FBS を 5% 以下として最小毒性濃度が 10 μ M であったが FBS を除去しても最小毒性濃度が保たれた。基礎培地を変更すると FBS 5% 以上では同様であったが、2.5% 以下では最小毒性濃度が低値となり 2-5 μ M となった。さらに、無血清条件を洗浄により強化すると対照でも viability

	DMEM/HAMF12		DMEM/HAMF12 2%adult serum (bovine)			DMEM/HAMF12 2%adult serum (bovine)					
	10% serum	2% serum	human alb 4mg/ml	human Tf holo 0.2mg/ml	human Tf apo 0.2mg/ml	Bov alb 2.4mg/ml	Bov alb 1.2mg/ml	BovTf 0.29mg/ml	Bov Tf 0.15mg/ml	Bov gG 1.6mg/ml	Bov gG 0.8mg/ml
3d	>20 μ M	10 μ M	>20 μ M	20 μ M	10 μ M	>20 μ M	20 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M
7d	>20 μ M	5 μ M	20 μ M	5 μ M	5 μ M	10 μ M		5 μ M		5 μ M	
17d	20 μ M	5 μ M	10 μ M	5 μ M	5 μ M	20 μ M		5 μ M			

図3 血清成分添加による耐毒性

ヒトアルブミン、ウシアルブミン添加のみが2%結成添加よりも耐毒性の向上が見られた。

が低下して CQ の毒性効果の判定に適さないと判定された。

次に血清成分の CQ 毒性抵抗性分画を検討した。ヒトとウシでアルブミン、トランスフェリン、ガンマグロブリン（ウシのみ）で行った結果、アルブミンのみが対照に比して毒性抵抗性を示した。機序については今後の検討が必要である。

一部の資料で CQ 毒性効果を培養細胞専有面積で定量したところ、培養条件によっては CQ が $1\mu\text{M}$ 程度で細胞増殖促進効果を示し、今後詳細を検討することとした。

E. 結論

SHSY5Y 細胞の培養で clioquinol の毒性 titration を行い、一定の培養条件では一定の titration が得られることを確認した。培養液中の血清濃度が高いほど耐毒性は上昇したが線形ではなかった。血清成分の耐毒性をヒト成分と生成ウシ成分で検討した。有意の耐毒性の上昇を示したのはアルブミンであった。低濃度 CQ の増殖促進効果が観察されたが、今後の検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 豊島 至. 秋田県のスモン患者の出生年代と死亡年齢の相関. あきた病院医学雑誌, 8 巻 2 号, 13-18, 2020.
- 2) 豊島 至. Clioquinol の毒性容量と毒性濃度. あきた病院医学雑誌. 8 巻 3 号. 5-13. 2020.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

I. 文献

該当なし