

## Clioquinol の神経細胞に対する障害作用 (6)

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  $\mu$  M 程度で最小毒性濃度を示すことを報告し、今回は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を明らかにした。今回は、添加血清、アルブミンの種差について検討し、ウマ血清、アルブミンが SH-SY5Y 細胞の clioquinol の最小毒性濃度の低下をもたらすことを明らかにした。また、ウシ血清存在下での clioquinol 細胞毒性の経時変化を検討し、細胞突起占有面積が細胞体より高度に減少することを明らかにした。

### 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  $\mu$  M 程度で最小毒性濃度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  $\mu$  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。今回は培養細胞を SH-SY5Y に固定し種々の培養液について検討し、添加ウシ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を明らかにした。

今回は、添加血清、アルブミンの種差について検討し、ウマ血清、アルブミンが SH-SY5Y 細胞の生育障害をきたし、clioquinol の最小毒性濃度の低下をもたらすことを明らかにした。また、ウシ血清存在下での clioquinol 細胞毒性の経時変化を、細胞体占有面積、細胞突起占有面積の画像解析定量法により測定し、20  $\mu$  M clioquinol では 2 日後から阻害され、細胞突起占有面積減少が有意に高度であった。

### B. 研究方法

添加血清、アルブミンの種差について SH-SY5Y 細

胞培養の検討では、基礎培地として DMEM/HamF12 を用いた。添加血清は胎仔ウシ血清、成体ウシ血清、ヒト血清、ウマ血清とし、濃度は 2% とした。ウマ血清では 2% と 10% 添加の比較をした。6 穴培養皿に分散培養して 3 日後、7 日後に位相差顕微鏡で観察し記録した。血清アルブミンはそれぞれの培養用血清から、硫酸分画、blue Sepharose、DEAE sepharose を用いて精製した。濾過滅菌後基礎培地に添加した。

細胞毒性の経時的変化の検討では、成体ウシ血清を 10% 添加した DaigoT 培地を用いた。細胞体占有面積、細胞突起占有面積を画像解析で定量した。デジタル画像を Photoshop® にとりこみ、ぼかしを入れて平滑化し、個々の細胞集団の面積を ImageJ-win64 で計測した。また、細胞突起占有面積は、それぞれの細胞集団の細胞突起の先端を外接凸多角形で囲まれる面積と定義して同様計測し、細胞集団面積を除いて求めた。また、細胞突起占有面積と細胞集団占有面積の比を求め、細胞体と突起のどちらが細胞毒性効果を強く受けるのかを検討した。

### C. 研究結果

SH-SY5Y 細胞 plating の 3 日後に clioquinol (CQ) を、1、2、5、10、20  $\mu$  M として培養液をおきかえた。

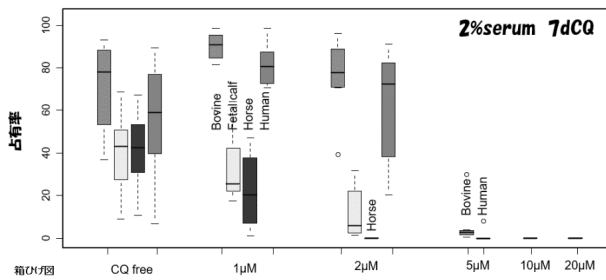


図1. 成体ウシ、胎仔ウシ、ウマ、ヒト血清の添加効果  
ヒト血清は成体ウシと同等で、胎仔ウシ、ウマでは clioquinol 耐毒性が低下した。

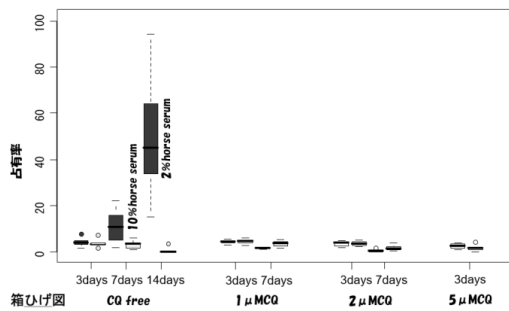


図2. ウマ血清添加効果 (2% vs 10%)  
10%では CQ を加えなくとも SH-SY5Y 細胞は発育しない。

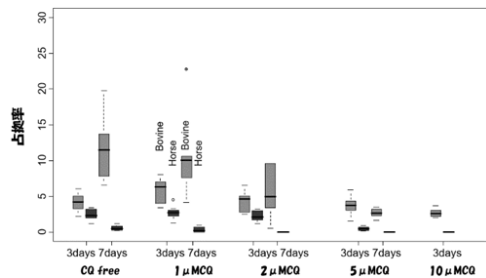


図3. 精製ウシ、ウマアルブミンの CQ 耐毒性効果  
ウマアルブミンでは CQ を加えなくとも生育促進効果がみられなかった。

培養液は DMEM/HamF12 基礎培地に添加血清は成体ウシ、胎仔ウシ、ウマ、ヒト血清を 2% 濃度として添加した。3 日後、7 日後に当該 well の代表的な連続しない部位を対物 10 倍で撮像し、占有面積を計測した。7 日後の結果を図 1 に示す。2% 血清では成体ウシでは CQ の最小毒性濃度は 5 μM であり、ヒト血清でも同様であったのに対し、胎仔ウシ、ウマでは 2 μM と耐毒性が低下していた。さらに、ウマ血清を 10% とすると、SH-SY5Y 細胞の発育は極端に阻害された (図 2)。

つぎに、培養血清から精製したアルブミンを添加し

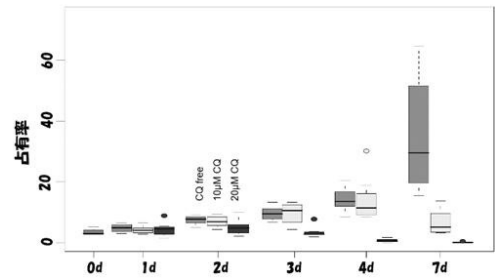


図4. 細胞占有面積の比率の経時的変化  
20 μ MCQ で 2 日後から相対的に低下する。

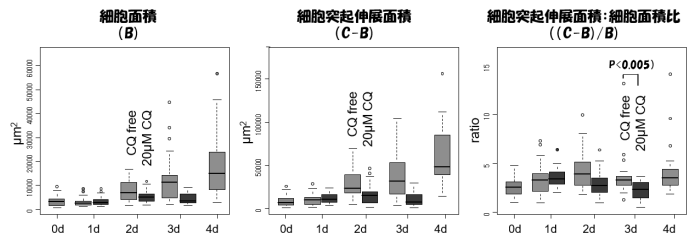


図5. 細胞占有面積と細胞突起伸展面積、突起伸展面積と細胞集団面積の比の経時的変化  
突起伸展面積と細胞集団面積の比は 2 日で低下しはじめ 3 日で有意となる。

観察計測をした。図 3 にウシとウマアルブミンの結果を示す。ウマアルブミンは SH-SY5Y 細胞に対し生育促進効果を示さず、耐毒性促進効果を示さなかった。

SH-SY5Y 細胞に対する CQ 毒性の経時変化の検討には、細胞集団面積と突起伸展面積を時間経過を追って計測した。その結果、20 μ MCQ の毒性効果は 2 日後から明らかとなり 4 日で SH-SY5Y 細胞はほぼ消失した (図 4)。

細胞集団面積と突起伸展面積の検討は、周囲と連絡しない細胞集団とその突起を選んで行った。この条件が可能であるのは CQ 添加後 4 日までであった。その後では周囲と融合し独立集団は得難く、20 μ MCQ では 4 日後でほぼ死滅した。図 5 にその結果を示す。突起伸展面積と細胞集団面積の比が 3 日後で有意に低下していることが明らかになった。

#### D. 考察

これまでの我々の CQ titration 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明らかにしたが、今回は基礎培地、添加血清濃度を変更して行った。その結果は

基礎培地による違いは少なく血清濃度に強く依存することを明らかにした。

今回の、種差による血清と精製血清アルブミンの添加効果は相当程度の相違をもたらすことが明らかになった。成体ウシに比べて胎仔ウシで耐毒性濃度が低下していた。また、ウマでは耐毒性濃度が低下するのみならず、添加血清濃度を2%から10%に変更することによりSH-SY5Y細胞の増殖阻害をもたらすことが明らかになった。神経系細胞培地としてウマ血清添加はしばしば行われてきたが、少なくともSH-SY5Y細胞に対しては生育阻害をもたらす。さらに精製ウマアルブミンでも生育促進作用が小さく、ウマ血清添加効果の一端はアルブミンにもよるものと推定された。

培養器についても今回はカバーガラス上での培養を検討した。プラスチック培養皿との差は小さく、10%成体ウシ血清添加でSH-SY5Y細胞に対しほぼ20 $\mu$ MでCQ最小毒性濃度を示した。経時変化では2日で生育阻害を示し3日で有意になった。SH-SY5Y細胞の突起伸展面積を突起に外接する凸多角形で代表させ、細胞集団面積との比を求めると、同様の経時変化を示し、2日で低下傾向を示した。このことは、CQの毒性効果は細胞体よりも突起伸展に強く働くことを示したが、程度は軽度にとどまり特異性は低いことが示唆された。

CQ低濃度の増殖促進効果については継続検討中である。

#### E. 結論

SH-SY5Y細胞の培養で種々の添加血清を用いclioquinolの毒性titrationを行った。成体ウシに比し胎仔ウシとウマで耐毒性濃度が低下した。添加ウマ血清濃度を10%とするとSH-SY5Y細胞の培養を阻害した。精製アルブミンではウマで同様の耐毒性濃度低下がみられた。SH-SY5Y細胞によるCQ毒性titrationにウマ血清添加は不適切と思われた。

カバーガラス上での培養SH-SY5Y細胞はこれまでと同様のclioquinolの毒性効果を示した。経過日数の検討では2日で生育阻害を示し3日で有意になった。SH-SY5Y細胞の突起伸展占有範囲を設定し細胞集団とのclioquinolの毒性効果を比較し、突起伸展が有意

に強く阻害されることが明らかになった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 豊島 至. Clioquinol 毒性濃度と添加血清. あきた病院医学雑誌, 10 巻 2 号, 5-10, 2022.
- 2) 豊島 至. Clioquinol に対する血清成分の耐毒性. あきた病院医学雑誌, 10 巻 2 号, 11-16, 2022.

##### 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