

研究概要書

【研究テーマ】

アポトーシス誘導を指標とした環境汚染化学物質の毒性評価法の確立に関する研究

【団体の構成者】

藤田藤樹夫（近畿大学農学部農芸化学科教授）

持田 恭（島根県保健環境科学研究所主任研究員）

【研究の背景と目的】

細胞培養を用いた実験系は、動物実験に比べ、迅速に、安価に多数の被験物質の毒性試験を遂行でき、ヒトを含む哺乳動物細胞を使えるので、ヒトへの影響をより近似で観察でき、環境化学物質の毒性評価法として有意義である。また、一般に、生体は汚染物質に対して防衛機能を持つてゐるが、培養細胞系では被験物質は直接細胞に接触し作用するので生体に比べてはるかに強い毒性を示す場合が多い。さらに、世代時間も通常短いので分裂時に毒性を示す物質であれば強い死滅効果をもたらすことが多い。しかし、培養細胞系でみられるこれらの現象は、生体内でも個体が特殊な環境（有害物質の特定組織への蓄積、細胞分裂の盛んな発生時等）におかれている時には起こりうる可能性がある。従って培養細胞への毒性発現濃度は汚染物質の生体に対する影響発現の可能な最小作用量についての知見を与えらると思われ。

最近、同時に多量の試料の毒性評価ができる *in vitro* 法として、海洋発光細菌試験、96 穴マイクロプレートで実施する藻類生育阻害試験、酵母菌を用いる試験などが開発されてきた。アメリカの Chemical Abstract Service によると現在登録されている化学物質の数は約 900 万種にのぼり、さらに毎年約 40 万ずつ増えている。我々は日常的に 6 万種もの化学物質に囲まれて生活しているとされているが、このうち毒性に関する情報が得られるのはわずか 12 %程度である。こうした状況の中で、特に有害性の強い一部の化学物質だけでなく多数の化学物質に、人間を含む生態系が暴露される機会が増大しており、ますますその影響が懸念されているが従来の毒性評価法、つまり動物実験 (*in vivo*) では時間的にもまた、経済的にもとても対応できない。短時間で、しかも安価な毒性評価の一手段として培養細胞の導入を推進していく必要性が増している。

化学物質の動物、人間に対する急性毒性は従来の研究によれば非常に低かったりする。しかし、現在まで知られているような新しい害毒効果が出現しないとの保証はない。細胞レベルでの研究により、今後、広範囲な毒性評価が得られるものと思われる。更に、環境汚染化学物質によって、同一の種類動物を用いた動物実験の急性毒性データがないものも多数あり、本細胞培養実験を用いる毒性評価は、同一の細胞を同一の条件で、何度でも繰り返し実験ができ再現性がある利点をもつことから、動物実験のデータを補うものとして有効な実験系である。このことは細胞が生命の基本単位であり、その変化は生物個体レベルの変化となると考えられることから支持される。

【研究方法】

- ①培養細胞としてヒト由来のがん細胞（KB 細胞、HL-60 細胞）およびイヌ由来の細胞（MDCK 細胞）を用いた。
- ②細胞のラダー状 DNA 断片、巨大 DNA 断片はアガロースゲル電気泳動およびパルスフィールド電気泳動を用いて解析した。
- ③カスパーゼ 3 活性は蛍光強度法を用いた。

【結果および考察】

近年、リン酸トリクレジル(TCEP)、リン酸トリフェニル(TPP)、リン酸トリブチル(TBP)、リン酸トリス(クロロエチル)(TCEP)、リン酸トリス(ブトキシエチル)(TBXP)などの有機リン酸トリエステル類が環境水中、底泥、魚介類から検出され、健康への影響が危惧されている。そこで、これら有機リン酸トリエステル類の培養細胞の増殖を50%阻害する濃度(72h-ID50 値)を用いて毒性を比較検討したところ、表1に示した如く、ヒト由来のKB細胞に対しアリール系ではTCPがTPPより約2.9倍の強い毒性を示した。アルキル系ではTBPがTBXPより約9.1倍の強い毒性を示した。ハロアルキル系のTCEPはTBP、TCPよりも、それぞれ、約3.0倍、約1.2倍の弱い毒性を示したがTPP、TBXPよりは、それぞれ、約2.4倍、約3.0倍の強い毒性を示した。供試化合物中、最も強い毒性をTBPが示した。この毒性の関係はMDCK細胞およびHL-60細胞でも同様な傾向を確認した。

表1. がん細胞(KB)に対する有機リン酸トリエステル類のID50 値

化合物	72h-ID50 値 (ug/ml)
アリール系 TCP	70.0
TPP	200.0
アルキル系 TBP	27.5
TBXP	250.0
TCEP	82.0

次に、我々は、この細胞の増殖阻害の毒性評価法よりも高感度の毒性評価法を検討した。アポトーシスは、元来はネクローシスの凝縮という形態学的な特徴から見いだされた死にかたであるが、現在では、不必要な細胞を積極的に排除する機構として、生理条件下で認められる死として捉えられている。これに対して毒物が引き起こす死は、一般的なアポトーシスが遺伝子に支配された死であるのと対照的に偶発的な死、ネクローシスとして考えられてきた。水銀の毒性も、腎臓の近位尿細管上皮細胞の障害が特徴的で、これまでネクローシスという概念で説明されてきた。しかし、塩化第二水銀をラットに投与すると、その標的臓器である腎臓においてアポトーシスの生化学的指標であるDNAの断片化が誘導されている。

我々は、本研究で細胞の増殖阻害の毒性(72h-ID50 値)に先攻してアポトーシスの誘導が観察されることを TBP 暴露で、アポトーシスの生化学的であるラダー状の DNA 断片を確認した(図1)。それは、わずか7時間で確認された。この現象は揮発性の有機ハロゲン化合物、プラスチック添加物などの化合物でも確認することが出来た。

更に、TBP を暴露した DNA のパルスフィールド電気泳動を行ったところ、細胞に 1 mM 以上の TBP 暴露で約 1000bp の巨大 DNA 断片が、まず観察され次に約 100bp のラダー状 DNA 断片がみられた。このことから、アポトーシスを誘導する場合、DNA が、まず巨大 DNA の断片化を示し、次にアポトーシス特有のラダー状 DNA 断片を起こしていく経路が存在することが示唆された。

一般にアポトーシス誘導はラダー状 DNA 断片が確認される以前に、蛋白分解酵素カスパーゼ3活性が起こることが知られている。そこで、HL-60 細胞を用いて TBP 暴露後の DNA を研究したところ、ラダー状の DNA 断片が観察されるよりも低い濃度(0.1mM)で、カスパーゼ3活性化が引き起こされ(図2)、アポトーシスが誘導された。

以上の結果から、培養細胞のアポトーシス誘導の指標であるカスパーゼ3活性がラダー状 DNA 断片化の出現を測定するアポトーシス検出法よりも高感度の毒性評価法として有効であることを本研究で明らかにした。

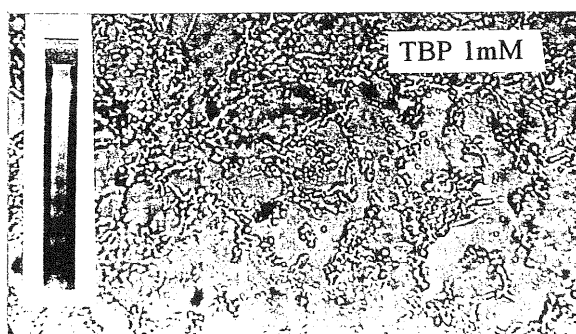


図1. ラダー状の DNA 像と細胞の形態変化像

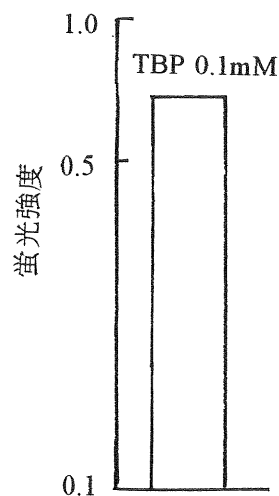


図2. カスパーゼ3活性

【得られた成果の今後の利用】

このアポトーシスを指標とした毒性評価法が大いに期待される。本研究で得られた成果は、将来的には環境水のバイオアッセイ(生物学的検定法)、環境汚染のバイオモニターおよび環境物質の毒性評価などにも利用され、環境科学における人体影響の研究への貢献が期待される。今後、環境化学物質の生体影響の研究の一環として培養細胞法が環境汚染化学物質の影響を評価する研究に、更なる利用度を増すものと考えられる。