

神経系細胞における化学物質の毒性評価

大谷 航平, 白石 浩平, 杉山 一男, 山田 康枝

Evaluation of the toxicity of chemicals on neural cells

Kohei OHTANI, Kohei SHIRAIISHI, Kazuo SUGIYAMA, and Yasue YAMADA

There is an increasing interest of using bio-based polymers instead of conventional petroleum-based polymers. Biodegradable polylactic acids made from lactides are now used for the parts of cars, the drug delivery system and coatings of metal stents. The safety of the polymer was already known well. However, the toxicity of lactids is not investigated in detail. In order to evaluate the toxicity of lactides, human neuroblastoma cell lines SK-N-SH and the cultured primary neuron in rat were incubated with DL-lactide, L-lactide and toluene. While toluene was toxic, DL-lactide and L-lactide were nontoxic for both cells even high concentrations. The results indicated that lactides are safe to use.

Keywords : neural cells / human neuroblastoma / lactide / toxicity

1. 緒言

生分解性プラスチックは、従来のプラスチックと違い、自然界に存在する微生物によって最終的に二酸化炭素と水にまで分解される環境にやさしいプラスチックである。最近では、ポリ乳酸を使った生分解性プラスチックが注目されている。ポリ乳酸は環状化合物で、澱粉から作られるラクチドが開環重合してできるポリエステルで、剛性、引っ張り強度が強い、透明性が高いという特徴を持ち、微生物に分解されやすいという性質も持っている。また、マウスのアストロサイトを用いた細胞毒性試験でも、ポリ乳酸の被検物質濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ で毒性が認められないことが報告されており安全性評価が高い物質で組織の再形成の材料としても使われている⁽¹⁾。ラクチド

は、2分子のヒドロキシ酸が互いのヒドロキシ基とカルボキシ基が脱水縮合してできたエステル結合を分子内に持つ環状化合物であり、DL-ラクチド、D-ラクチド、L-ラクチドが存在する。

しかし、ポリ乳酸の原料であるラクチドの化学的特性や神経細胞に与える影響に関する報告はされていない。一方、トルエンは、毒性が強く、*in vitro* ではアポトーシスを誘導する物質として知られている。ラットやマウスなどの小動物を用いた毒性試験が行われているが組織や細胞レベルでの研究は乏しく、毒性の分子メカニズムも明らかにされていない⁽²⁾。

本研究では、トルエンのラット初代培養神経細胞とヒト神経芽細胞腫由来株 SK-N-SH 細胞への毒性を検討し、合わせてラクチドのこれらの細胞へ効果を検討した。

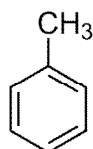


Fig. 1 トルエンの構造式

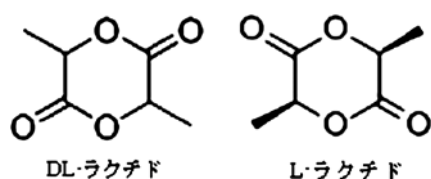


Fig. 2 DL-ラクチドとL-ラクチドの構造式

2. 実験材料と方法

2-1 試薬

2-1-1 トルエンとラクチドの調整

トルエンは揮発性物質であるため、使用直前にSIGMA社のDimethyl Sulfoxide (DMSO) に溶解し、200 mMに調整し、最終濃度0.5 mM, 1 mM, 2 mMになるように細胞に加えた。DL-ラクチドとL-ラクチドは、1 M水溶液を調整し、1 M NaOHでpH6に合わせた。その後、クリーンベンチ内でろ過滅菌し常温で保存し、使用の際に、最終濃度0.1 mM, 1 mM, 10 mMになるように調整し、細胞に添加した。

2-2 実験に用いた細胞

2-2-1 SK-N-SH 細胞

ヒト神経芽細胞腫由来株 SK-N-SH 細胞は、交感神経系の神経細胞や副腎髄質細胞が分化する前にかん化したものであり、神経細胞への分化能を持つことが知られている。本研究では、ヒト神経系細胞への化学物質の効果について検討するために用いた。

SK-N-SH 細胞は独立行政法人 理化学研究所バイオリソースセンターから購入した。GIBCO社のMinimum Essential Alpha Medium (MEM α)にFCSを最終濃度10%になるように調整後、播種し、37°C, 5%CO₂インキュベーター内で培養した。

2-2-2 ラット初代培養神経細胞培養法

今回用いたラット初代培養神経細胞は、正常ラット胎仔の脳の大脳皮質から取り出した神経細胞を培養したものである。正常な神経系受容体やタンパク質を発現しているため、細胞応答性が高く、薬物活性や細胞毒性評価に用いられている。本研究では、化学物質が正常な神経細胞に与える影響、細胞毒性について検討するため大脳皮質から取り出したラット初代培養神経細胞を使用した。

生理的緩衝塩類溶液であるハンクス液(組成: 塩化ナトリウム 8000 mg/L, 塩化カリウム 400 mg/L, リン酸一水素二ナトリウム 47.9 mg/L, リン酸二水素カリウム 60 mg/L, ブドウ糖 1000 mg/L, HEPES 568 mg/L)を入れたシャーレを4つ用意し氷冷しておく。妊娠ラット(Wistar rat)を麻酔後、腹部を切開し子宮を取り出しハンクス液を入れた。ハンクス液内で子宮から胎仔を取り出した後、胎仔を断頭した。顕微鏡下で大脳皮質を取り出しハンクス液を入れたシャーレに移した。

大脳皮質を0.25%トリプシン(PBSに溶解)(Difco社), 0.01%DNaseI (Sigma社)を含むHG-D-MEM培地(Gibco社)に移し、ハサミを用いて細かくした。37°Cで30分間、時々攪拌しながらインキュベーションを行った。最終濃度10%FBS培地を加え、1 μ l, 200 μ l, 1000 μ lピペットを用いてピペッティングし細胞をさらに細かくした。50 mlチューブにセレストレイナーを取り付け、細胞を濾した。集めた細胞液を15 mlチューブに移し、1000 rpmで2分間遠心した。細胞を1.0 \times 10⁶ cells/ml または 1.0 \times 10⁵

cells/ml に調整後、10%FBS 入り HG-D-MEM 培地にて培養した。グリア細胞の増殖を抑制するため、DNA 合成阻害剤である cytosine β -D-arabino-furanoside (Ara-C: SIGMA 社) を最終濃度 1~1.5 μ M になるよう添加した。HG-D-MEM と 10%FBS と Ara-C を加え、37°C の 5%CO₂ インキュベーターで培養した。神経細胞が神経突起を伸ばし、他の細胞と接合し神経ネットワークを形成するのを確認して実験に用いた。本研究では、培地と Ara-C の交換を 3 日に 1 回行い、培養 20 日のラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いた。

本研究は、近畿大学工学部動物実験小委員会の承認をへて近畿大学動物実験委員会の承認を受け、近畿大学動物実験規程に従って実施した。ラットは、株式会社 広島実験動物研究所から購入した。

2-3 MTT アッセイによる細胞毒性試験

2-3-1 MTT アッセイによる細胞増殖の測定

SK-N-SH 細胞を 2.0×10^5 cells/ml に調製し、コラーゲンコートされている 96 穴プレート(SUMILON 社)に 200 μ l ずつ播種した。試薬を 1 つのウェルに添加する際、トルエンは、最終濃度 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, ラクチドは、最終濃度 0.1 mM, 1 mM, 10 mM になるよう調整した。5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した後、PBS に溶解した 5% MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) 液を 20 μ l 添加し、4 時間、インキュベーションした。4 時間後、培地の除去と PBS による洗浄を 2 回繰り返した。溶解液 100 μ l (0.04 M イソプロパノール液と 10%SDS 溶液を等量混合) 加え測定用 96 穴プレートに移して 30 分間、37°C でインキュベーションした。その後、プレートリーダー (Bio-Rad 社) で 570 nm の吸光度を測定し、トルエンとラクチドの細胞毒性効果を検討した。

2-4 Live-Dead 染色

生細胞と死細胞を見分け、細胞毒性を検討するため、Bio Vision 社の Live-Dead 染色を用いた。SolutionA (Live-Dye) と SolutionB (propidium iodide) を用いたが、SolutionA (Live-Dye) は、細胞膜透過性の緑色蛍光色素で生細胞を緑色に染色し、SolutionB (propidium iodide) は、核酸にインターカレートする色素で死細胞を赤色に染色する試薬である。使用直前に Solution A 0.5 μ l と Solution B 0.4 μ l を PBS 800 μ l に溶解し混合溶液とする。20 日間培養したラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いてトルエンとラクチドを添加し 24 時間反応させた。その後、培地を抜き混合溶液を加えて 15 分間インキュベーションし、蛍光顕微鏡で生細胞と死細胞数を測定した。

3. 結果と考察

3-1 SK-N-SH 細胞に対するトルエンとラクチドの効果

3-1-1 SK-N-SH 細胞に対するトルエンの効果

トルエンが神経系細胞に及ぼす影響について詳細に検討するため、SK-N-SH 細胞に対するトルエンの毒性を検討した。

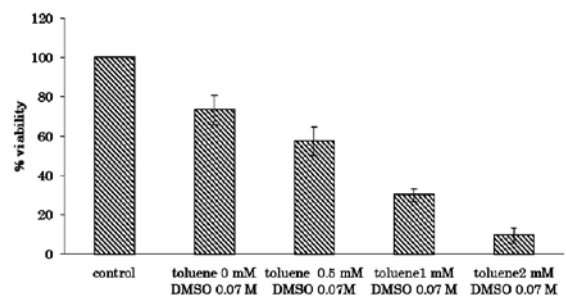


Fig. 3 SK-N-SH 細胞へのトルエンの効果
細胞濃度を 2.0×10^5 cells/ml に調節し、トルエンを 0.5 mM, 1 mM, 2 mM 添加後、24 時間培養し、MTT アッセイを行った。

トルエンを SK-N-SH 細胞に添加後、高濃度になるほど細胞生存率が著しく減少した。この結果から、SK-N-SH 細胞に対するトルエンの阻害活性を知るため 50%阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。IC₅₀ とは、化合物の生物学的、生化学的阻害作用の有効度を示す値である。細胞や酵素など半数を阻害するにはどのくらいの濃度が必要かを示し、より低い値を示す化合物ほど阻害剤として作用活性が高いといえる。

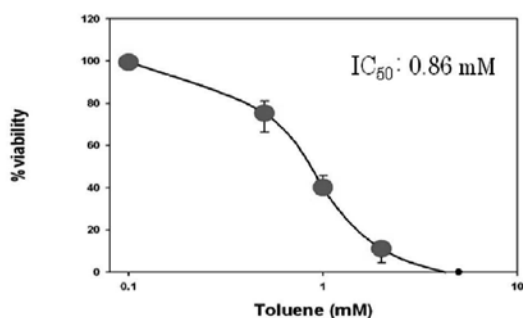


Fig. 4 トルエンの SK-N-SH 細胞の増殖に対する阻害曲線

SK-N-SH 細胞に対してトルエンを 0.5 mM, 1 mM, 2 mM 添加し阻害率を測定した。

Fig. 4 から、濃度依存的に毒性を増すことが認められた。50%阻害濃度 (IC₅₀) を算出すると、0.86 mM であった。Sarma^③らによるトルエンの他の細胞への毒性の研究報告では、ヒト前骨髄性白血病細胞 K562 の IC₅₀ は、4.40 mM, ヒトリンパ腫由来細胞株 U937 細胞の IC₅₀ は、3.79 mM, ヒト骨髄球性白血病細胞 HL-60 細胞の IC₅₀ は、2.74 mM であることが報告されている。これらを比較すると、SK-N-SH 細胞の IC₅₀ はかなり低いことが認められた。これより、SK-N-SH 細胞はトルエンに対する感受性が高いことが明らかとなった。ヒトの神経細胞はトルエンに対する感受性が高いことが示唆された。これより、細胞毒性を評価する際には、様々な組織の細胞での評価は欠かせないと考えられる。

3-1-2 SK-N-SH 細胞に対するラクチドの効果

ラクチドの毒性を調査するため SK-N-SH 細胞を

用いて検討した。

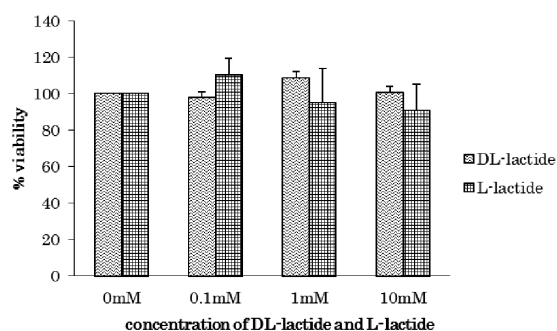


Fig. 5 SK-N-SH 細胞へのラクチドの効果

細胞濃度 2.0×10^5 cells/ml に調節し、0.1 mM, 1 mM, 10 mM の DL-ラクチドと L-ラクチドを添加し 24 時間培養し、MTT アッセイを行った。

Fig. 5 に示すように、DL-ラクチドと L-ラクチドの効果を比較したところ、10 mM (1.4 mg/ml) でも細胞毒性が見られなかった。DL-ラクチドで毒性が見られなかったことから D-ラクチドも毒性を示さないことが示唆された。

3-2 ラット初代培養神経細胞に対するトルエンとラクチドの効果

SK-N-SH 細胞への効果をもとに、トルエンとラクチドの 20 日後のラット初代培養神経細胞への効果を検討した。

3-2-1 Live-Dead 染色によるトルエンとラクチドの細胞毒性の観察

本研究では、ラット初代培養大脳皮質神経細胞にトルエン、DL-ラクチド、L-ラクチドを添加し、24 時間培養した。その後、Live-Dead 染色しそれぞれの物質の毒性について検討した。

Fig. 6 は、培養 20 日目のラット初代培養大脳皮質神経細胞に SK-N-SH 細胞ので用いたトルエン、DL-ラクチド、L-ラクチド 10 mM を添加後、24 時間培養した。その後、Live-Dead 染色し、生細胞(緑

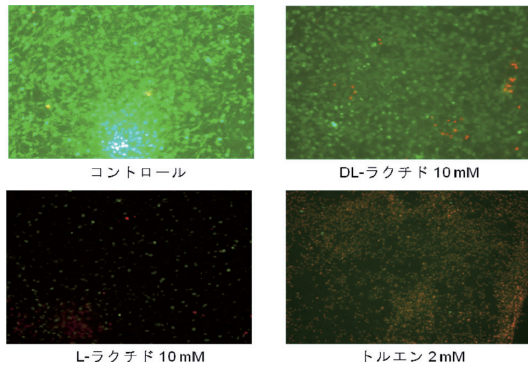


Fig. 6 トルエン, DL-ラクチド, L-ラクチドを添加時のラット初代培養大脳皮質神経細胞(Live-Dead 染色後) 培養 20 日目 細胞濃度 1.0×10^6 cells/ml

色)と死細胞(赤色)で染め分けたものである。ラット初代培養大脳神経細胞にトルエンを添加すると多くの死細胞が観察されたが, DL-ラクチド, L-ラクチドでは死細胞はほとんど見られなかった。したがって, ラクチドはラット初代培養大脳神経細胞に対して毒性をもたない物質であることが明らかになった。以上の結果より, ラクチドは, ヒトの神経系細胞またはラット神経細胞のどちらにも毒性を示さない物質であることが示された。このように, ヒト培養細胞とラットの初代培養細胞を用いることで, ヒトへの神経毒性をこれまでより厳密に知る事が可能となった。

4. 結言

ヒト神経芽細胞腫 K-N-SH に DL-ラクチドと L-ラクチドを添加し, 細胞毒性を検討したところ 10 mM でも毒性を示さなかった。同様にトルエンの毒性を検討したところ IC₅₀ は 0.86 mM であり高い毒性を示した。

ラット初代培養神経細胞でトルエン 2 mM, DL-ラクチド 10 mM, L-ラクチド 10 mM それぞれ添加するとトルエンでは多くの神経細胞が死んでいるのに対し, DL-ラクチド, L-ラクチドでは死細胞がほとんど見られなかった。以上から結果から, ラクチド

が SK-N-SH 細胞やラット初代培養神経細胞に対して神経毒性が認められない安全な物質であることが示された。

5. 参考文献

- (1) Tsuji, M., Inoue, Y., Sugawa, C., Tsunoda, M., Sugawa, T., Takahashi, M., Yuba, T., Tsuchida, T., Aizawa, Y., Higher Toxicity of dibutyltin and Poly-L-Lactide with a Large amount of tin but Lower Toxicity of Poly-L-Lactide of Synthetic Artificial Dura Mater Exhibited on Murine astrocyte Cell Line. *YAKUGAKU ZASSHI*, 130 847-855 (2010)
- (2) Singh, M. P., Ram, Ravi, K., Mishra, M., Shrivastava, M., Saxena, D. K., Effects of co-exposure of Benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster* : Alteration in hsf70, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. *Chemosphere*, 79, 577-587 (2010)
- (3) Sarma, S. N., Kim, Y. J., Song, M., Ryu, J. C., Induction of apoptosis in human leukemia cells through the production of reactive oxygen species and activation of HMOX1 and Noxa by benzene, toluene, and o-xylene. *Toxicology*, 3, 109-17 (2011)
- (4) Kuo, Y. C., Yeh, C. F., Effects of surface-Modified collagen on the adhesion, biocompatibility and differentiation of bone marrow stromal cells in poly (lactide-co-glycolide) /chitosan scaffolds. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 82, 624-631(2011).