

組織培養細胞におよぼす各種薬剤の影響 第一報 キノロンカルボン酸系抗菌剤

永山在明・大木一憲
佐賀医科大学微生物学教室

組織培養細胞に対する各種化学療法剤の作用を、細胞の増殖を指標にして検討した。キノロンカルボン酸系抗菌剤として Cinoxacin, Nalidixic acid および 1-Ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(4-pyridyl)-3 quinoline carboxylic acid を用いこれらの 5~1,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度下で、マウス線維芽細胞 (L), マウス神経芽細胞 (Neuro 2A), ヒト正常細胞 (WI-38) ラット腎初代細胞の増殖を経時的に観察した。その結果、動物を用いる毒性試験の前段階として、組織培養細胞による細胞傷害試験は容易性、経済性の点から考慮しても、きわめて有効な手段となりうると考えられた。

はじめに

現在、種々の薬剤の毒性試験は、1) 純系のマウス、ラット等にその薬剤を投与し、50% 致死量 (LD_{50}) を算定する (急性毒性試験)、2) マウス、ラット、イヌ、サル等に 1~6 カ月間連続投与し、その動物の一般状態、体重、血液や尿所見、臓器の病理組織学的所見から判定する (亜急性および慢性毒性試験) という手法が主にとられている。

これらの *in vivo* の毒性試験の重要性は、ここで触れるまでもなく当然であるが、判定までにある一定の期間が必要であるという点、あるいは動物を用いることによる煩雑さを避けることができない点など短所もあげられる。

一方、組織培養法は、現在の医学生物学とくに、細胞生物学、発生学、ウイルス学、免疫学、放射線生物学ひいては遺伝学等、多岐にわたる分野で一般化してきた手技である。組織培養を行なう上で、細菌やカビの汚染を防ぐために、しばしば種々の抗生物質が培養液に添加されている。しかし、これら抗生物質は濃度によっては多少とも細胞に毒性を示すので、それぞれの薬剤については、その毒性を示す濃度を測定して使用濃度が決められてきた¹⁻⁵⁾。

現在よく用いられているのは、ペニシリン G 50~100 units/ml とストレプトマイシン 50~100 $\mu\text{g/ml}$ の併用ないしは、カナマイシン 30~60 $\mu\text{g/ml}$ 、またはゲンタミシン 50 $\mu\text{g/ml}$ という方法である。これらの使用濃度では雑菌等の汚染を防止し、しかも、細胞に対しての影響はほとんど無視しうる。このように組織培養の第一歩は、可能なかぎり毒性の少ない培養液、培養条件をつくりそれを保つことにある。

したがって、逆に培養条件に鋭敏に左右される動物細胞を用いて、薬剤の毒性を測定することが可能である。事実、制癌性を有する物質は一般的に細胞傷害性が強いことを利用し、組織培養による制癌剤のスクリーニングが試みられており⁶⁾、また、歯科材料の細胞毒性試験の一環として培養細胞の応用がなされてきた^{7,8)}。

そこで、種々の動物細胞を用い、薬剤の毒性試験を行ない、動物による毒性試験の前段階として、広く一般的に応用しうるかを検討するために以下の実験を試みた。

実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

キノロンカルボン酸系抗菌剤 Cinoxacin (CINX), Nalidixic acid (NA) および同系統の 1-Ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(4-pyridyl)-3 quinoline carboxylic acid (以下 Compound A と略す) について検討した。

2. 培養細胞

Table 1 に示すように、4 種類の細胞を用い Medium 199 に 20% 牛胎児血清 (Flow Lab.) を添加した培養液で細胞を培養した。L 細胞はマウス由来の線維芽細胞で増殖も旺盛で、コロニー形成率 (plating efficiency) も高い。

Neuro 2A はマウス神経芽細胞で、よく増殖するが、環境の劣化とともに樹枝状の突起を伸ばし、ニューロン状に形態変化をする細胞である。WI 38 は、ヒト由来の diploid cell で、培養条件にきわめて鋭敏ないわゆる正常細胞と考えられている細胞である。

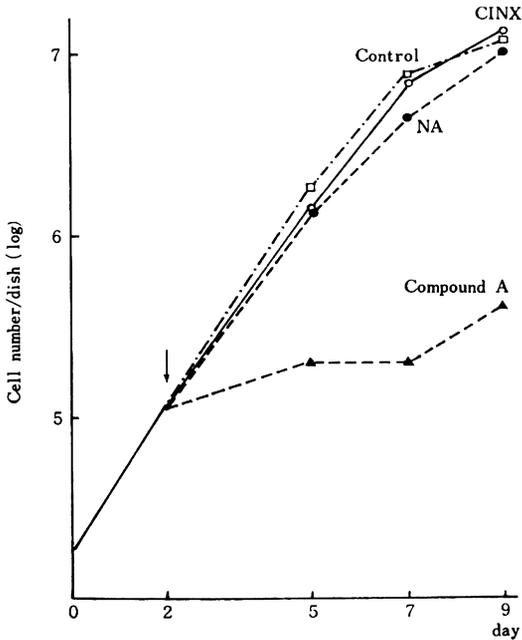
ラット腎初代細胞は、生後 1 日のラット (Wistar rat) の腎を細切後 0.25% トリプシン (Difco 1:250) で消化解離したもので、上皮様細胞と線維芽細胞の混合細胞である。

これらの細胞に、上記薬剤を 5~1,000 $\mu\text{g/ml}$ に添加し、細胞の増殖を経時的に観察した。

細胞数の計算は、0.25% トリプシンでプラスチック

Table 1 Some properties of several cell lines and rat kidney primary cell

	Origin	Chromosome makeup	Morphology	Efficiency of single cell to form colony
L	Mouse 2N=40	Heteroploid 66	Fibroblast	90%
Neuro 2A	Mouse 2N=40	Heteroploid 53	Neuronlike	1%
WI 38	Man 2N=40	Diploid 46	Fibroblast	7%
Rat Kidney Primary	Rat 2N=42	Diploid 42	Fibroblast Epithelial	0%

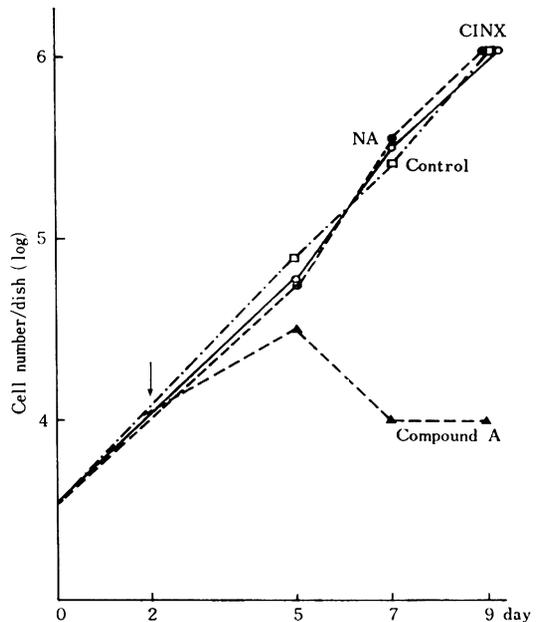
Fig. 1 Growth curves of L cells cultured with CINX, NA and Compound A at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 

・ディッシュから細胞を剥離し、血球計算板で細胞数を測定し、1 ディッシュ当りの細胞数を算定した。

実験成績

1. L 929 細胞の増殖に対する CINX, NA および Compound A の作用

プレート当たり 1.9×10^4 個の L 細胞を播き、培養 2 日目に各薬剤をそれぞれ最終濃度 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、5 日目、7 日目、9 日目の 3 回細

Fig. 2 Growth curves of Neuro 2A cells cultured with CINX, NA and Compound A at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 

胞数を測定した。個々のサンプルにつき、4 枚のプレートを用いその平均値を算出した。

CINX, NA とも 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で薬剤無添加のコントロールと同様に増殖し、形態的にも変化を認めなかった。

Compound A は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から細胞の増殖が低下し、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 97% の増殖抑制がみられた。各薬剤 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での L 細胞の増殖曲線を Fig. 1 に示す。

Compound A 投与後、L 細胞の増殖が他の群に比して抑制されていることが明らかである。

2. Neuro 2A 細胞の増殖に対する CINX, NA および Compound A の作用

プレート当たり 3.4×10^3 個の Neuro 2A 細胞を播き、その後は、L細胞の場合と同様に細胞数を算定した。各薬剤 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度での Neuro 2A 細胞の増殖曲線は Fig. 2 のようになる。

L細胞でみられたと同様、Compound A の増殖抑制作用が顕著である。5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 各濃度での 9 日目の細胞数をコントロールを 100% として算出すると Fig. 3 のようになる。

CINX, NA は 5~50 $\mu\text{g/ml}$ の間でほとんど増殖抑制がみられないのに反し、Compound A は 10 $\mu\text{g/ml}$ から増殖阻害を示し、濃度の上昇に伴い比細胞数が減少することが判明した。

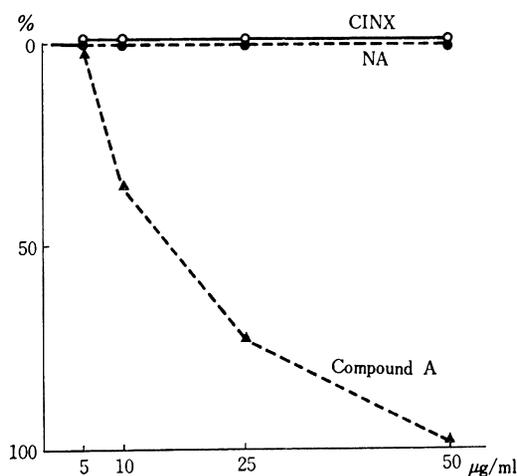
Fig. 2 で明らかなように、CINX, NA は 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で Neuro 2A の増殖にほとんど影響を認め得なかった。この濃度はヒト臨床投与において達し得る血中での最高濃度に匹敵する。しかし、尿中排泄濃度は CINX ではきわめて高いことが知られているので CINX および NA の両薬剤について、50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ での増殖を観察した。

Fig. 4 で明らかなように CINX は 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上では強い増殖抑制がみられる。NA の作用はさらに強く同じ 500 $\mu\text{g/ml}$ で細胞数の減少すなわち、細胞の死が観察された。

3. WI 38 細胞に対する CINX, NA の作用

WI 38 はヒト由来の細胞であり、またコロニー形成率も低く、染色体数も diploid でほぼ正常細胞と考えら

Fig. 3 Growth inhibition of Neuro 2A cells on 9th day at different concentration of CINX, NA and Compound A



れている細胞である。L細胞や、Neuro 2A 細胞に比べても、牛胎児血清や水に対する条件がきびしく、環境により左右されやすい細胞といえる。

プレート当たり 5.3×10^3 個の細胞を播き CINX, NA 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で検討した。Fig. 5 で示すようにコントロールの細胞でも増殖のカーブがゆるやかである。

WI 38 では NA 50 $\mu\text{g/ml}$ で 70% の増殖阻害がみられ、500 $\mu\text{g/ml}$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ では、細胞の死が認められて細胞数が減少する。

CINX 50 $\mu\text{g/ml}$ ではコントロールに比して 30% の阻害で NA に比して軽度であり、100~1,000 $\mu\text{g/ml}$ でも NA より細胞毒性が弱いことがうかがえる。50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 各濃度での 19 日目の細胞数をコントロールと比較すると Fig. 6 のようになる。

4. ラット腎初代細胞に対する CINX, NA の影響

Fig. 7 で示したように、NA は 50 $\mu\text{g/ml}$ までは、ほとんどコントロールと同様で、増殖に影響を与えないのに反し、500 および 1,000 $\mu\text{g/ml}$ は他の細胞よりもきわめて強い毒性を認める。すなわち、約 10^4 個の細胞が、8 日目では全く死滅することが判明した。一方 CINX は 50~1,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の上昇に応じた増殖抑制を認めるが、NA に比べてその毒性は弱いと考えられる。

Fig. 4 Growth curves of Neuro 2A cells cultured with different concentration of CINX and NA

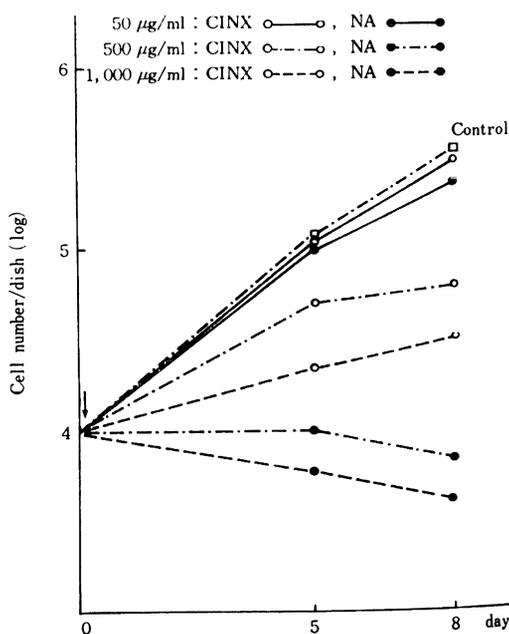
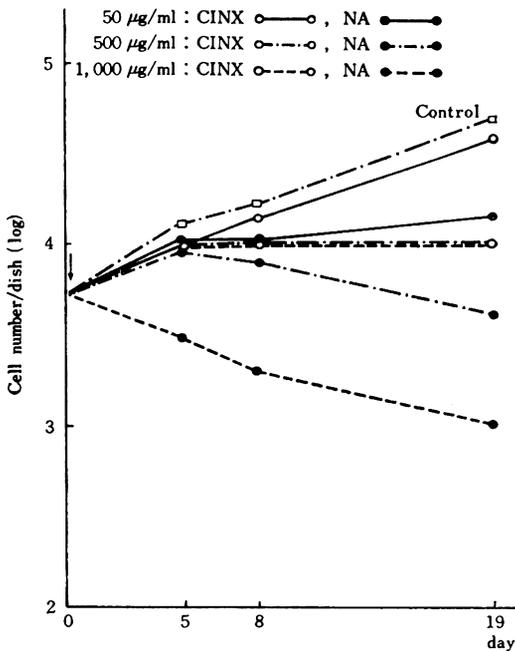


Fig. 5 Growth curves of WI 38 cells cultured with different concentration of CINX and NA



考 察

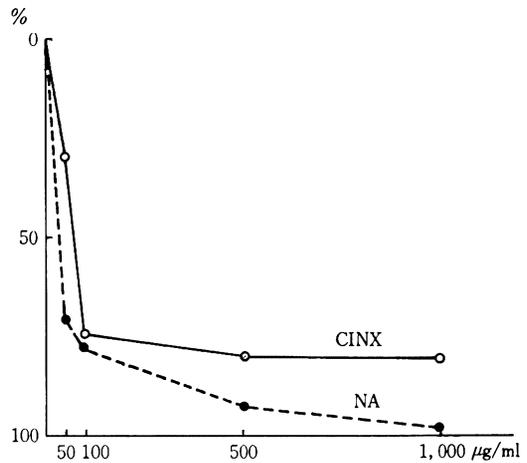
組織培養細胞を用いての種々の物質の細胞傷害を測定する方法としては、以下に述べるようにいくつかの方法が考えられる。

- 1) 細胞の増殖能をみる。
 - i) 増殖曲線 (growth curve)
 - ii) 分裂指数 (mitotic index)
- 2) コロニー形成率で判定する。
- 3) DNA 合成能
- 4) 特定の酵素あるいは蛋白の合成能
- 5) ウイルスの力価測定に用いられるように細胞変性効果を TCD₅₀ で算出する。
- 6) 細胞の生死を判定する。
- 7) 形態学的変化を観察する。

いずれの方法が、薬物の毒性試験に最も適しているかについては、それぞれの方法で一長一短があり、にわかには優劣をきめがたいが、細胞の増殖能から判定する方法は、経時的観察も容易であり、ここでは、各細胞の細胞数を測定し、増殖曲線を描かせる方法を用いた。

CINX のマウス・ラットの急性毒性を NA と比較すると、CINX 経口投与時のマウス・ラットの LD₅₀ 値は、NA の 1.5~2 倍の値が得られている⁹⁾。今回の組

Fig. 6 Growth inhibition of WI 38 cells on 19th day at different concentration of CINX and NA



織培養細胞による増殖抑制作用は一般的に CINX より NA が若干強く、したがって、CINX は NA より細胞毒性が少ないと考えられる。

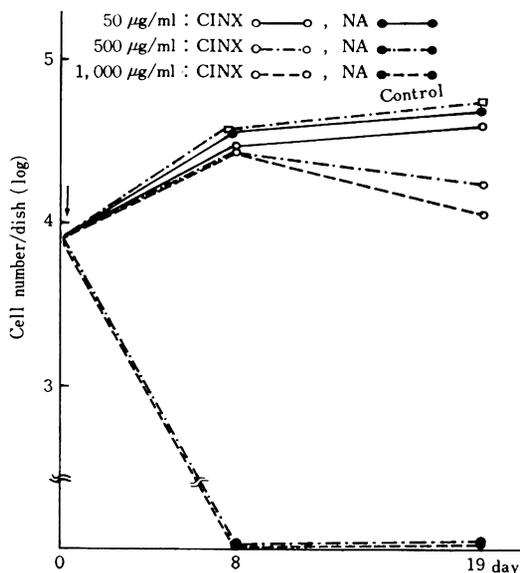
WI 38 (Fig. 5) でみられるように CINX は 500~1,000 µg/ml 19 日間の暴露で細胞の増殖は認められないものの、細胞数減少すなわち細胞を死に至らしめる程、毒性は強くないといえる。NA は 500 µg/ml を越えると細胞致死作用が生ずる。しかし、臨床用量における NA の血中および尿中濃度はそれぞれ 30 µg/ml, 200 µg/ml を越えないのに比し、CINX のそれは 30 µg/ml, 1,000 µg/ml であり、CINX では血中濃度に比して尿中排泄濃度が一過性に高いことが知られている。別の検討成績では CINX 1,000 µg/ml 以下、NA 100 µg/ml 以下の濃度での細胞増殖抑制作用は可逆的であり、両薬剤ともに、薬物の除去により再び細胞は増殖する¹⁰⁾。

CINX は現在まだ開発段階の薬剤であり、臨床応用例も少なく、ここで結論を導くのは早急ではあるが、両薬剤の血中移行濃度と尿中排泄濃度を考慮するとき、CINX では NA で報告されるような視覚異常、めまい等、中枢系の副作用は、NA より少ないことが予想され、逆に腎障害の認められる症例では、その腎障害が増強されることが懸念される。

Compound A については、CINX, NA に比して、きわめて細胞毒性が強いことが示唆されたが、動物による毒性試験や臨床応用例における副作用出現率との相関は、さらに検討を要すると考えられる。

今回の実験では線維芽細胞、神経芽細胞、腎初代細

Fig. 7 Growth curves of primary rat embryo kidney cells cultured with different concentration of CINX and NA



胞、ヒトの正常細胞を用いたが、WI 38 がヒト由来である点、薬剤に対する感受性が高い点などから、このような毒性スクリーニングに適していると考えられる。また三種の薬剤間でとくに臓器特異性を強く示唆するデータは得られなかったが、今後検討すべき問題の一つである。

癌原物質の検索のために、第一次のスクリーニング法として、微生物を用いる方法が考案、開発されてきた。なかでも、AMES ら^{12,13}によって開発されたヒスチジン要求性のネズミチフス菌を用いる方法は、発癌性と相関が高く、現在ひろく薬剤の検定にも応用されている。

同様の考えから、その容易さ、経済性、判定までの時間の短縮の点などから、動物実験の前段階として、薬剤の毒性試験を組織培養細胞によって検討することは、有意義と思われる。

前述したように、今回のデータは、あくまで個々の細胞に対する毒性試験であり、動物個体全体に対する毒性については、別の要素もあることであろうから、臨床応

用例における副作用などとの相関は、今後の実験や資料の蓄積に待たねばならないが、薬剤毒性試験の第1次スクリーニング法として、組織培養法の応用が一般化し、規格化されることを強く提言する。

文 献

- 1) PAUL, J.: Cell and tissue culture, 4th edition, Livingstone, Edinburgh, 1970
- 2) HU, F.; C.S. LIVINGOOD, P. JOHNSON & C.M.J. POMERAT: Tissue culture studies on human skin. IV. The comparative toxic effects of antibiotics on tissue culture explants of human skin and embryonic chick spleen. *J. Invest. Dermatol.* 20 : 357, 1953
- 3) FOGH, J. & C. HACKER: Elimination of Pleuropneumonia-like organisms from cell cultures. *Exp. Cell. Res.* 21 : 242~244, 1960
- 4) FISCHER, A. B.: Gentamicin as a bactericidal antibiotic in tissue culture. *Med. Microbiol. Immunol.* 161 : 23~39, 1975
- 5) SCHAFER, T. W.; A. PASCALE, G. SHIMONASKI & P. E. CAME: Evaluation of gentamicin for use in virology and tissue culture. *Applied Microbiology* 23(3) : 565~570, 1972
- 6) LEITER, J.; A. R. BOURKE, D. B. FITZGERALD, M. M. MACDONALD, S. A. SCHEPARTZ & I. WODINSKY: Screening data from the cancer chemotherapy national service center screening laboratories XI. *Cancer Res.* 22 (Suppl.) : 919~928, 1962
- 7) SISCA, R. F.; J. C. THONARD, D. A. LOWER & W. A. GEORGE: Responses of epithelial-like cells in tissue culture to implant materials. *J. Dent. Res.* 46 : 248~252, 1967
- 8) KERESZTESI, K. & G. KELLNER: The biological effect of root filling materials. *Int. Dent. J.* 16 : 222~232, 1966
- 9) 奈良間 功, 土谷 稔, 佐野正樹, 斎藤 実, 原田喜男: Cinoxacin の急性および亜急性毒性試験. *Chemotherapy* 28(S-4) : 406~439, 1980
- 10) 永山在明: 未発表データ
- 11) 医薬品副作用情報 No. 9 厚生省薬務局, 1974
- 12) AMES, B. N.; F. D. LEE & W. E. DURSTON: An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70 : 782~786, 1973
- 13) AMES, B. N.; W. E. DURSTON, E. YAMASAKI & F. D. LEE: Carcinogens are mutagens; a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70 : 2281~2285, 1973

EFFECTS OF CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS ON CELLULAR PHYSIOLOGY IN TISSUE CULTURE

I. QUINOLONE ANTIBACTERIAL AGENTS

ARIAKI NAGAYAMA & KAZUNORI OHKI

Department of Microbiology, Saga Medical School

The effects on animal cell proliferation of cinoxacin, nalidixic acid and 1-ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo-7- (4-pyridyl)-3 quinoline carboxylic acid (Compound A), new antibacterial compound related to nalidixic acid, were investigated in 4 mammalian cell cultures.

With regard to cytotoxicity, little difference could be found between cinoxacin and nalidixic acid. However, cells exposed to Compound A showed remarkable damage at the concentration of 10~25 $\mu\text{g/ml}$.

Comparison of these drugs' LD₅₀ values using mice or rats and their influence on cell growth in tissue culture proved that the application of its method would be useful for cytotoxicity test of new chemicals.