培養細胞を用いた環境化学物質の分化誘導能に関する研究

A Study of the Differentiation Inducibility of Cultured Cells
by Environmental Chemical Substances

慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室

鎌倉 光 宏

Mitsuhiro Kamakura

Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University, Tokyo

The author conducted an experimental study of the cell differentiation inducibility of some environmental chemical substances which currently draw attention because of their influences on the human body, using an azaguanine-resistant PCC4 cell line, a clone derived from mouse teratocarcinoma OTT 6050. Cells in monolayer culture or suspension culture were exposed to the test substances and the survival and morphological changes of the cells were determined.

It was extremely rare that embryonal carcinoma cells exposed and cultured in a monolayer showed differentiation in the control group, with the rate of both epithelial cell-like and fibroblast-like morphological changes being less than 1%. Cells cultured in normal medium following exposure and incubation in suspension culture showed various patterns of differentiation according to the type and concentration of the test substance.

In the cell groups exposed to mono, di-methylformamide, fibroblast-like differentiation was observed most frequently, while little or no epithelial differentiation was seen. These findings were in contrast to those observed in the cell groups exposed to mono, di-methylacetamide.

For dimethyl sulfoxide it is considered that there is a relatively limited range of optimal concentration for differentiation induction within the concentration range which is free from cell toxicity. Polybrene and diethylene glycol were proven to have low differentiation inducibility.

As to the differentiation induction potency of extracts (tar) of granules in exhausts from light-duty (4 cylinder) and heavy-duty (6 cylinder) diesel engines, no concentration-response relation was seen for the differentiation inducibility of light-duty tar and no constant tendency was observed for heavy-duty tar. However, for epithelial differentiation both light-duty tar and heavy-duty tar showed dose-response relations.

It is currently difficult to interpret completely the significance of differentiation inducibility. However, from the viewpoint of the effect on genes it is doubtlessly not unrelated to mutation, carcinogenicity and aging. It will be useful therefore, to perform this kind of experiment in the future also on selected environmental chemical substances.

Key words: Cell differentiation, Differentiation induction, Embryonal carcinoma cell,
Environmental chemical substances
細胞分化, 分化誘発, 胎児癌細胞, 環境化学物質

緒 言

細胞の癌化, 分化あるいは老化の過程については各々の類似点および相違点に関して以前より多くの研究報告があり, 可逆性が存在するか否かが論点の一つとなつて

いる。環境化学物質が生体に及ぼす影響について衛生学領域で問題になるのは, 一義的には毒性, 変異原性, 発癌性であると思われるが, それに加えて化学物質が細胞の癌化と分化に関して同種・同程度のあるいはかなり異なった影響を及ぼしているか否かを再現性のある系で検

討することは、物質の生体影響を広い観点から考察する点で有意義であると考えられる。

テラトカルシノーマ (奇形癌腫) の幹細胞である embryonal carcinoma 細胞 [以下、EC 細胞と略記] は、初期胚の細胞と同様の多分化能を保っている。近年、いくつかの EC 細胞がクローン化され、その in vitro 分化の系が確立された¹⁻²⁾。なかでも、マウスのテラトカルシノーマ OTT 6050 由来のクローンは、Friend 赤白血病細胞³⁾とともに embryogenesis および neoplasia を研究する優れた実験系であり、この細胞株を用いた bromodeoxyuridine, retinotic acid, hexamethylene bisacetamide などによる分化誘発実験の報告⁴⁻⁵⁾がある。

著者は今回、この EC 細胞株を用いた実験系により、大気汚染物質として依然として問題にされることが多いディーゼルエンジン排気物質中の粒子抽出物、数年前輸入ワインの添加物として問題になった diethylene glycol、産業の現場で肝毒性が問題となりつつある有機溶剤 N, N-dimethylacetamide, N,N-dimethylformamide さらに bioadhesive polymer として分化に影響を与える可能性が示唆されている polybrene などを対象として、monolayer culture および suspension culture に対する細胞分化誘発実験を行った。methylacetamide および methylformamide 類については双極子モーメントの高い極性溶媒 (polar solvent) の代表としての選択理由も含まれている。

対象および方法

使用細胞株

本分化誘発実験に使用した EC cell line は、azaguanine resistant の PCC4 細胞株 (以後、PCC4 AG と略記) より分離した subclone である。PCC4 AG は、国立ガンセンター研究所放射線研究部の御厚意により入手した。

培養条件

培地は、Delbecco's minimum essential medium (MEM) (Flow Laboratories) に 15% semi-fetal calf serum (SFCS) (中標津) を加えたものを使用した。

Monolayer culture には、2 mm グリッド付き 60 mm petri dish (Nunc, Catalog No. 169558) を使用し、培養開始時の細胞濃度が 7.5×10^3 single cells/cm² 即ち 2.1×10^5 cells/dish (培地量を 5 ml としたので 4.2×10^4 cells/ml) となるようにした。培養開始と同時に、試験物質を 5 枚ずつの dish に曝露させ、37°C、5% CO₂ の条件

下、3日間培養した。

Suspension culture には、15 ml 培養管 (Corning, Catalog No. 25760CUL) を使用し、培地量を 10 ml とし、培養開始時の細胞濃度が 10^6 cells/tube (= 10^5 cells/ml) となるようにし、培養開始と同時に試験物質を 2 本ずつの tube に曝露させ、37°C incubator 内に設置した緩速試験管回転培養装置 (ローテーター II, 大洋製) にて、1/2回転/min の速度で 4 日間、閉鎖系回転培養した。4 日後、曝露物質を含む培養液を遠心除去し、PBS (-) 液で細胞を洗浄後、細胞数を計数した。細胞数は、 $0.44 \sim 1.05 \times 10^5$ cells/ml で曝露開始時よりも増加していた。各組の 2 本の tube 内容を、正常培地で 6 枚の 2 mm グリッド付き 60 mm petri dish に分注し、 10^6 cells/dish (= 3.3×10^5 cells/ml) となるように調整した。その後、各 dish を 37°C、5% CO₂ の条件下、4日間培養し、観察を行った。

試験対象物質および曝露濃度

曝露濃度の設定は、過去の研究結果ならびに細胞生存率に関する予備実験の結果を参考にした^{4,6-14)}。予備実験では 4～5 段階の用量を曝露濃度としたが、acetamide, formamide 類などでは、分化が期待される濃度と細胞毒性がある程度強く出現する濃度が比較的近接していたために、本実験では 2 段階の用量のみを設定した。

1. N-methylacetamide (半井化学, 特級)

0.25, 0.5 (vol/vol %)

2. N,N-dimethylacetamide (和光純薬, 特級)

0.25, 0.5 (vol/vol %)

3. N-methylformamide (半井化学, 特級)

0.25, 0.5 (vol/vol %)

4. N,N-dimethylformamide (和光純薬, 特級)

0.25, 0.5 (vol/vol %)

5. Dimethyl sulfoxide (同仁化学, 吸収スペクトル用純溶媒)

0.10, 0.25, 0.5, 1.0 (vol/vol %)

6. Diethylene glycol (小宗化学, 特級)

1.0, 2.0 (vol/vol %)

7. Polybrene (Aldrich Chem.)

4.0, 8.0 $\mu\text{g/ml}$

8. Heavy Duty (6 気筒) ディーゼルエンジン排気物質中の粒子抽出物 (tar)

10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$

9. Light Duty (4 気筒) ディーゼルエンジン排気物質中の粒子抽出物 (tar)

10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$

を実験対象とした。常温で 1～6 は、いずれも水溶性の液体、7 は水溶性結晶であるので、溶解・稀釈は MEM 培地を直接用いて行った。8 と 9 の溶解は 5 の dimethyl sulfoxide を使用し、稀釈は MEM 培地を用いて行い、曝露液中の最終濃度が 0.1 vol/vol % 以下になるようにした。

なお曝露試料を作成した者と、その後の一連の培養実験を行った者は別の者で、実験者のバイアスを避けるよう心がけた。また、petri dish の番号づけもランダムなものにして、後者には分からないようにした。

分化 (differentiation) の解析

Monolayer culture については、細胞の形態変化を逐次観察し、72 時間後、各組の dish を PBS(－) 液で洗浄後、100% methanol で固定した。乾燥後、May-Grünwald Giemsa 染色を行った。

Suspension culture については、再播種 96 時間後、colony の流出と細胞の人工的収縮を避けるため培地を吸引後 PBS (－) 液で軽く洗浄し、中性緩衝 formalin 溶液 (pH 7.4, formalin 濃度 4 %) で固定した。その後、100 % methanol で固定し、乾燥後、同じく May-Grünwald Giemsa 染色を行った。

各標本を、実体顕微鏡ならびに正立生物顕微鏡で観察した結果、monolayer culture 標本では化学物質による細胞の形態変化が明瞭ではないので、細胞形態の定性的な把握に止め、suspension culture の標本において、細胞の形態変化とくに fibroblast 様の変化を観察・計測した。具体的には、グリッド付き dish で dish の中心にあるグリッドの交点から時計回りに 25 個の交点を拾い、各交点を原点とした 4 つの象限の原点に最も近い位置にある細胞を colony 形成の如何によらず 25×4 すなわち 100 個観察し、その形態を、embryonal carcinoma cell, epithelial cell (以下、EPI cell と略記), fibroblast-like cell (以下、F-L cell と略記) のいずれかに分類した。分類が困難である細胞は、ほとんどみられなかったが、glia 細胞様の変化を遂げた細胞については、過去の *in vitro* 実験において、その類似性が指摘されることから¹⁰⁾、F-L cell に分類した。

結 果

EC cell は、倒立位相差顕微鏡で生存状態を観察した場合でも、また固定・染色後の標本を正立顕微鏡で観察した場合でも、細胞は小形で、細胞質に乏しく、形状は球形に近い。また、細胞の境界が不明瞭で、syncytium のような外観を呈することが多く、細胞が密集してくると piling up が見られる。[写真 1]

Monolayer で曝露・培養した EC cell は、コントロール群では分化を示すことは極めてまれで、EPI cell あるいは F-L cell 様の形態変化を示す頻度は、ともに 1 % 以下であった。また、dimethylacetamide および methylacetamide 曝露を行った全群で、固定時に細胞の生存が認められず、念のため他の群を固定後 14 日間培養を続

写真 1 Embryonal carcinoma cell (living cell).
[photocontrast: ×100]

写真 2 Control cell group after suspension culture
(living cells). [photocontrast: ×400]

写真3 Epithelial cell differentiation after exposure to 0.25 vol/vol % dimethylacetamide.
[May-Grünwald Giemsa stain : $\times 400$]

写真4 Epithelial cell differentiation after exposure to 40 $\mu\text{g/ml}$ Heavy-duty diesel engine tar.
[May-Grünwald Giemsa stain : $\times 400$]

けたがコロニーの発育は認められなかった。これにより、methyl acetamide 類は他の曝露物質に比べ、mono-layer の EC cell に対して、強い毒性を有すると考えられた。

Suspension culture で曝露・培養後、正常培地で培養を続けた細胞群は、曝露物質の種類・濃度によってさまざまな分化様式を示した。

写真 2 は、suspension culture を行ったコントロール

写真 5 Fibroblast-like cell differentiation after exposure to 0.25 vol/vol % dimethylacetamide (living cell).
[photocontrast : $\times 400$]

写真 6 Fibroblast-like cell differentiation after exposure to 0.5 vol/vol % dimethylacetamide.
[May-Grünwald Giemsa stain : $\times 400$]

群であるが、細胞は EC cell の特徴を失っておらず、また特に分化も見られない。

写真3は、dimethylacetamide 0.25 vol/vol % 曝露群の細胞を固定・染色した標本であるが、EPI cell に分化したコロニーが認められる。十分に分化した EPI cell は多角で、細胞の境界は比較的明瞭である。細胞の大きさは、EC cell の5倍程度で、通常かなり扁平である。また、May-Griwald Giemsa 染色で EC cell よりも、やや赤紫色に染まる傾向がある。

写真4は、Heavy Duty diesel engine tar 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露群の細胞を固定・染色した標本であるが、同様に十分に分化した EPI cell のコロニーが認められる。

写真5は、dimethylformamide 0.25 vol/vol % 曝露群の固定前の写真である。両側の細胞群が球形を示しているのに対し、中央の細胞群が fibroblast 様の変化を遂げている様子が明らかである。

写真6は、dimethylacetamide 0.5 vol/vol % 曝露群の固定標本であるが、典型的な F-L 分化を遂げたコロニ

ーが認められる。

Table は suspension culture で曝露・培養を行った各細胞群の分化の頻度を、F-L cell と EPI cell に分けて示したものである。cell differentiation (%) は、suspension culture を行った各グループ6枚の dish の分化した細胞の百分率の実測値の平均ならびに標準偏差を表わす。曝露物質による細胞生存への影響は、分化した細胞、分化しなかった細胞とも同様に受けているはずで、方法のところで述べた解析方法を用いる限りは、cell differentiation (%) が細胞分化頻度の相対的指標となり得ると考えられる。

考 察

Table を見ると、F-L 分化については、いくつかの例外を除いて、どの群もコントロール群よりも高い分化頻度を示している。mono, di-methylformamide 曝露群では、F-L 分化が最も顕著に認められるが、EPI 分化がほとんど認められず、EPI 分化が同時にある程度の頻度で

Table The average differentiation of embryonal carcinoma cells after drug treatment in suspension.
(for every 6 dishes)

Compound added	Concentration	Cell differentiation	
		Fibroblast-like differentiation (%)	Epithelial differentiation (%)
Control		2.6 $\pm$ 1.9	0
N-Methylacetamide	0.25 vol/vol%	13.3 $\pm$ 7.5	2.7 $\pm$ 1.9
	0.5	29.3 $\pm$ 6.7	4.0 $\pm$ 3.3
N,N-Dimethylacetamide	0.25 vol/vol%	9.3 $\pm$ 5.0	16.0 $\pm$ 3.3
	0.5	10.7 $\pm$ 3.8	9.3 $\pm$ 1.9
N-Methylformamide	0.25 vol/vol%	22.7 $\pm$ 6.8	0
	0.5	24.0 $\pm$ 11.8	0
N,N-Dimethylformamide	0.25 vol/vol%	30.7 $\pm$ 9.1	0
	0.5	48.1 $\pm$ 7.2	1.0 $\pm$ 0.5
Dimethyl sulfoxide	0.10 vol/vol%	0	0
	0.25	20.0 $\pm$ 6.5	2.7 $\pm$ 3.8
	0.5	5.3 $\pm$ 5.0	0
	1.0	0	0
Diethylene glycol	1.0 vol/vol%	5.3 $\pm$ 5.0	1.3 $\pm$ 1.6
	2.0	13.3 $\pm$ 10.5	2.7 $\pm$ 2.1
Polybrene	4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.3 $\pm$ 1.9	4.0 $\pm$ 5.7
	8.0	4.0 $\pm$ 3.3	6.7 $\pm$ 5.0
Light-duty diesel engine tar	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	13.3 $\pm$ 3.8	4.0 $\pm$ 3.3
	20	13.3 $\pm$ 1.9	5.3 $\pm$ 3.8
	40	14.7 $\pm$ 5.0	6.7 $\pm$ 5.0
Heavy-duty diesel engine tar	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8.0 $\pm$ 0	6.7 $\pm$ 2.6
	20	20.0 $\pm$ 8.6	9.3 $\pm$ 3.4
	40	16.0 $\pm$ 0	16.0 $\pm$ 5.7

見られる mono, di-methylacetamide 曝露群と対照的である。田中ら⁷によると、Friend 赤白血病細胞においては曝露する化合物の極性、すなわち双極子モーメント (dipole moment) の大きさと、分化誘発能の間にある程度関係があり、N,N-dimethylacetamide, N-methylacetamide, N,N-dimethylformamide, N-methylformamide のほか、1-methyl-2-piperidone, N-methylpyrrolidinone, 2-pyrrolidinone, propionamide, pyridine-N-oxide, piperidone, triethylene glycol などでも比較的高いヘモグロビン合成能、すなわち分化誘発能が認められたという。ちなみに、N-methylacetamide, N,N-dimethylacetamide, N-methylformamide, N,N-dimethylformamide の双極子モーメントは、それぞれ、4.39, 3.72, 3.86, 3.86 debyes (デバイ、双極子モーメントの単位で CGS 静電単位またはガウス単位の 10^{-18} 倍に相当する) で、かなり高い方に属する。今回の EC 細胞を対象とした実験では、F-L 分化については 4 物質ともある程度の分化誘発を示したが、EPI 分化については前述したように formamide 類は、ほとんど誘発能を示さなかった。細胞の分化誘発と曝露物質の化学構造との関係は、現在なお十分に明らかにされていないが、Friend 赤白血病細胞の場合には、highly polar compound が、DNA あるいは DNA-protein complex の幾何学的配列 (conformation) を変化させ、転写 (transcription) が変更されて、その結果、赤芽球の分化、すなわちヘモグロビンの合成が行われるという報告がある⁷⁾。EC 細胞の場合には、その分化機構はさらに複雑であると考えられるが、分化の初期段階において細胞と細胞、そして細胞と基質の相互作用が決定的に重要であること⁸⁾、*in vitro* 分化の第 2 段階、すなわち多種類の分化した細胞が出現する段階には、glucose あるいは mannose の存在が必要であること⁹⁾ などが、部分的に知られている。さらに、fibronectin の産生と細胞の分化を関連づける意見^{11,12)} もあるが、その、分化の過程は複雑で、今回の実験の結果からは Friend 赤白血病細胞ほどには曝露物質の化学構造と分化誘発の間に関係がないように思われる。

細胞を培養する形態として今回の実験では monolayer と suspension の 2 通りの方法を用いた。PCC4 AG 細胞は、本来遊離系ではなく付着系の細胞である。ただ、FM3A や L5178Y などの遊離系の細胞も dish の中で confluent な状態になったり、培地内の血清濃度を低下させると一部が付着系に転ずることがある。したがって両者は画然と分けられるものではないが、suspension の状態でも曝露させたのは同濃度の曝露でも表面積や各細

胞が分かれていることから、より強い影響がでるのではないかと期待したためである。

また、分化の方向づけについては、今回の実験で参考にした Speers らの報告¹¹⁾ では、N,N-dimethylacetamide, hexamethylene bisacetacetamide および polybrene を inducing agent として、曝露を monolayer に対して行った場合、細胞は 99% 以上 EPI 細胞に変化し、曝露を suspension の状態で行った場合には、細胞は 7 日間以内に、やはり 100% 近く F-L 細胞に変化するという。本実験では、そのような単一方向の分化は見られず、monolayer 曝露群では、分化の頻度が低く、また suspension 曝露群においても EPI 分化が少なからず認められた。subclone の差や、培養条件の違いなども考慮すべきであろうが、元来多種類の細胞に分化する能力を有する EC 細胞が、Speers らの実験¹¹⁾ のように曝露物質の種類を問わず、細胞側の曝露条件のみによって、全ての細胞が一つの限られた方向に分化するというのは、考えにくい現象であるように思われる。

Dimethyl sulfoxide 曝露群は、今回の実験の最高および最低濃度で F-L 分化、EPI 分化ともに示さなかった。最高の 1.0 vol/vol % においても、細胞の発育は阻害されておらず、dimethyl sulfoxide については、細胞毒性を発揮しない濃度範囲において、比較的限制された範囲の分化誘発至適濃度が存在するのではないかと考えられた。他の薬剤についても、適切な曝露濃度レベルを設定すれば、同様の現象が認められる可能性はあると考えられる。

ディーゼルエンジン排気物質中の粒子抽出物 (tar) については、その性質上、適当な有機溶媒に溶解した後、培地に添加せざるを得ない。今回の実験では、その溶媒として、この種の実験でよく用いられる dimethyl sulfoxide を使用した。曝露液中の dimethyl sulfoxide の最終濃度が 0.1 vol/vol % 以下になるようにしたが、前述したようにこの濃度では dimethyl sulfoxide の分化誘発能は認められていない。Friend 赤白血病細胞を用いた研究^{9-13,14)} では、dimethyl sulfoxide 自身の分化誘発能がかなり問題となるが、EC 細胞を用いた場合には、Table に示したように、0.1 vol/vol % 以下の場合、その影響は相対的に小さいものと考えられる。したがって、Light および Heavy Duty tar で認められた分化誘発能、特に EPI 分化誘発能はタール自身が有する性質と考えて良いものと思われる。

本実験で使用したタールは、日本自動車研究所より供与されたものであるが、ダイナモメータのコントロール下、小型 (4 気筒) および大型 (6 気筒) ディーゼルエ

ンジンより排出されたガスを、捕集トンネル内で清浄空気と混合希釈し、ハイボリュームサンプラーでフィルタ上に吸引捕集された粒子を、塩化メチレンで抽出したものである。その化学的性状および変異原性試験の結果は、LD tar の場合、extraction rate が 45.0 wt%, elementary analysis は、C 82.9 (wt%, 以下同様), H 12.5, N 0.1, O 3.4 であった。polynuclear aromatic hydrocarbon の含量は benzo(k)fluoranthene 2.0 ($\mu\text{g/g}$ extract, 以下同様), benzo(a)pyrene 1.3, benzo(ghi)perylene 1.8, 1-nitropyrene 18 である。また Ames test の結果は TA100(+S9) で 390 (revertants/g extract, 以下同様), TA100(-S9) 1780, TA98(+S9) 200, TA98(-S9) 600 であった。同様に HD tar については, extraction rate 40.4 wt%, C 80.8 (wt%, 以下同様), H 11.9, N 0.3, O 4.7, benzo(k)fluoranthene 2.4 ($\mu\text{g/g}$ extract, 以下同様), benzo(a)pyrene 1.7, benzo(ghi)perylene 3.7, 1-nitropyrene 11 である。また Ames test の結果は TA100(+S9) で 1000 (revertants/g extract, 以下同様), TA100(-S9) 3860, TA98(+S9) 560, TA98(-S9) 900 であった^{15,16)}。Ames 試験でみた変異原性は, HD tar の方が強いが, その他の化学的性状には大差がないと思われる。

LD および HD tar の分化誘発能は, Table に示されたとおり, F-L 分化については, LD tar では濃度依存性が少なく, また, HD tar では一定の傾向を示さない。しかし, EPI 分化については, 両者ともに用量反応関係があり, 分化誘発能は HD tar の方が強い。上述した化学的性状からは, この差を説明することはできず, 混合物としてのタールに含まれる他の成分による可能性がある。各タールの, 他のロットでも同様の結果が得られるかについても, 検討する必要があるであろう。

Polybrene の正式化学名は, Poly[(dimethylimino)-1,3-propanediyl(dimethylimino)-1,6-hexanediyl dibromide] である。Bioadhesive polymer として, 経口内服薬の体内での放出を調節する作用がある¹⁷⁾。また血小板凝集作用があり¹⁸⁾, von Willebrand 病患者の血漿ではその作用が弱いことが知られている^{19,20)}。Speers ら¹¹⁾によると, Polybrene の EC 細胞に対する F-L 分化誘発能はかなり高いが, 今回の実験の結果では, むしろかなり低い方に属した。使用した polybrene は, ともに Aldrich Chem. 製であるので, この差の原因は, 細胞の subclone の違い, 実験に使用した牛胎児血清のロットおよび濃度の差などに帰せられるものと思われる。

プラスチック可塑剤, 不凍液などとして使用され, 輸

入ワインの添加物として問題となった diethylene glycol は, 2.0 vol/vol % 濃度で, 多少の F-L 分化を示したが, それ以外では高い分化誘発能を示さなかった。同物質は培養細胞に対する毒性ならびに発癌性については, 陽性所見を示すことが多い物質であるが²¹⁾, 今回の実験で観る限り, 分化誘発能は, あまり高くないものと思われる。

細胞のがん化と分化の差異については, 以前より多くの研究報告がある²²⁻²⁵⁾。両者の区別は, 腫瘍性病変が多くの場合可逆的であるのに対し, 正常な分化は一般に不可逆的であること, 種々の組織から生じた腫瘍細胞同士は, もとの正常組織の細胞同士よりも相互に良く似ていること, 分化が予測しうる経路にしたがって厳密にコントロールされた過程であるのに対して, 腫瘍性変化は組織や器官の生長における突発的な, 比較的ランダムな出来事と考えられること, などによってなされるのが一般的である。しかしながら, 正常な分化と発癌の間に多くの共通点を見出すことも可能で, 例えば正常に分化した細胞も腫瘍細胞も, いずれもそれぞれの代謝的, 形態的性格に関しては強く決定されていて, 分裂してもその性格を失うことが少ないこと²⁶⁾, 胚の栄養芽層細胞の研究等から腫瘍細胞の顕著な浸潤性は必ずしも脱分化の特性ではなく, むしろ正確には, さらに新しい分化がつけ加わったと考えるべきであること²⁷⁾, 分化も発癌もいくつかの例外を除けば, 通常は染色体の数および形態の変化を伴わないこと, などが挙げられている。

衛生学領域において, その異同を含め発癌と分化が具体的に問題となるのは, ある環境化学物質が細胞のがん化および分化に対して同種・同程度のあるいは異なった影響を及ぼし得るかについてであると思われる。突然変異を含めた *in vitro* におけるスクリーニング的な発癌試験としては, Ames 試験が著名であるが, 培養細胞を対象にしたものにも, 染色体異常試験, 不定期 DNA 合成試験, 姉妹染色分体交換試験, 選択培地による突然変異試験, 形質転換を指標とした試験管内発癌試験など, いくつかの実験方法が知られている。一方, 培養内分化については, 前述の Friend 赤白血病ウイルスや免疫グロブリンを産生する株などをを用いた実験方法が, 実験書などに比較的よく書かれているが, 実際に実験を行う段になると, 適切な cell line の入手, subclone の選択, また特に使用する牛胎児血清の選択などに少なからず困難な点があり, 衛生学, 公衆衛生学の研究者が実験を行うことは, きわめて稀である。今回の一連の実験は, 現在問題となりつつある代表的な環境化学物質を対象として行っ

たが、*in vitro* の発癌実験である形質転換 (transformation) 実験やこの細胞分化誘発実験など、*in vivo* 実験の結果を予想するのに役立つが、その実験手技が高度な *in vitro* 実験は、Ames 試験や培養細胞を用いた突然変異実験で対象を絞りこんだ後に、時間をかけて行うのが、適切であり、またそれが公衆衛生的な活用法であると思われる。

結 論

マウスのテラトカルシノーマ OTT6050 由来のクローンである、azaguanine resistant の PCC4 細胞株を用い、現在人体に影響を及ぼすことで注目されている、いくつかの環境化学物質を対象として分化誘発実験を行った。曝露は、monolayer culture, suspension culture の 2 種の状態に対して行い、細胞の生存および形態変化を観察、計測した。

1. Monolayer で曝露・培養した embryonal carcinoma cell は、コントロール群では分化を示すことは極めて稀で、epithelial cell あるいは fibroblast-like cell 様の形態変化を示す割合は、ともに 1% 以下であった。また、methylnacetamide 類は他の曝露物質に比べ、強い毒性を有することが示唆された。

2. Suspension culture で曝露・培養後、正常培地で培養を続けた細胞群は、曝露物質の種類・濃度によって、さまざまな分化様式を示した。fibroblast-like 分化については、いくつかの例外を除いて、どの群もコントロール群よりも高い分化頻度を示していた。

3. Mono, di-methylformamide 曝露群では、fibroblast-like 分化が最も顕著に認められるが epithelial 分化がほとんど認められず、両者が同時に、ある程度の頻度で見られる mono, di-methylacetamide 曝露群と対照的であった。

4. Dimethyl sulfoxide については、細胞毒性を発揮しない濃度範囲において、比較的限られた範囲の分化誘発至適濃度が存在するのではないかと考えられた。また、polybrene および diethylene glycol の分化誘発能は低いものと考えられた。

5. Light Duty (4 気筒) および Heavy Duty (6 気筒) ディーゼルエンジン排気物質中の粒子抽出物 (tar) の分化誘発能については、fibroblast-like 分化については、LD tar では濃度依存性が少なく、また HD tar では一定の傾向を示さなかった。しかし、epithelial cell 分化については、両者ともに用量反応関係があり、分化誘発能は HD tar の方が強かった。1-nitropyrene などの多環

芳香族炭化水素などの含有量の差からは、この現象を説明することはできず、混合物としてのタールに含まれる他の成分による可能性がある。

6. 分化誘発作用の意味するところを十分に解釈することは現状では難しい点が多い。しかし、本作用は遺伝子に対する影響という点では突然変異、発癌あるいは老化の問題と当然、無関係ではないと考えられる。対象を絞りこんだ後に、この種の実験をある程度時間をかけて行うのは今後とも重要であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室、近藤東郎教授に深甚なる謝意を捧げます。

本研究の一部は、財団法人日本自動車研究所が実施した「ディーゼル排気物質の健康影響に関する調査研究」(Health Effect Research Program on Diesel Exhaust Emissions)により行なった。また、本論文の要旨の一部は第60回日本産業衛生学会総会において発表した。

文 献

- 1) 村松 喬：テラトーマについて；EC 細胞を中心に、医学のあゆみ, **107**, 491-500 (1979)。
- 2) 井川洋二：培養テラトーマ (奇形腫) 細胞の分化、組織培養 **4**, 211-217 (1978)。
- 3) Friend, C., Patuleia, M.C. and de Harven, E.: Erythrocytic mutation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. NATIONAL CANCER INSTITUTE MONOGRAPH **22**, 505-522 (1966)。
- 4) Speers, W.C. and Lehman, J.M.: Increased susceptibility of murine teratocarcinoma cells to simian virus 40 and polyoma virus following treatment with 5-bromodeoxyuridine. J. Cell Physiol. **88**, 297-306 (1976)。
- 5) Strickland, S. and Mahdavi, V.: The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. Cell **15**, 393-403 (1978)。
- 6) Jacob, H., Dubois, P., Eisen, H. et al.: Effects de l'hexamethylene bis acetamide sur la differentiation de cellules de carcinome embryonnaire. C. R. Acad. Sci (D) (Paris) **286**, 109-111 (1978)。
- 7) Tanaka, M., Levy, J., Terada, M. et al.: Induction of erythroid differentiation in murine virus infected erythroleukemia cells by highly polar compounds. Proc. Nat. Acad. Sci. **72**, 1003-1006

- (1975).
- 8) Martin, G.R. and Evans, M.J.: Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells; formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 1441-1445 (1975).
 - 9) Avner, P., Dubois, P., Nicolas, J.F. et al.: Mouse teratocarcinoma, carbon source utilization patterns for growth and in vitro differentiation. *Exp. Cell Res.* **105**, 39-50 (1977).
 - 10) Vanden Berg, S.R., Ludwin, S.K., Herman, M.M. et al.: In vitro astrocytic differentiation from embryoid bodies of an experimental mouse testicular teratoma. *Am. J. Pathol.* **83**, 197-212 (1976).
 - 11) Speers, W.C., Birdwell, C.R. and Dixon, F.J.: Chemically induced bidirectional differentiation of embryonal carcinoma cells in vitro. *Am. J. Pathol.* **97**, 563-584 (1979).
 - 12) Wartiovaara, J., Levio, I., Virtanen, I. et al.: Appearance of fibronectin during differentiation of mouse teratocarcinoma in vitro. *Nature* **272**, 355-356 (1978).
 - 13) Friend, C., Scher, W., Holland, J.G. et al.: Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro; Stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **68**, 378-382 (1971).
 - 14) Terada, M., Nudel, U., Fibach, E. et al.: Changes in DNA associated with induction of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide in murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* **38**, 835-840 (1978).
 - 15) 加地造成, 中野信彦, 河合昭宏ら: ディーゼル排出粒子の捕集・分析, ディーゼル排気物質の生体影響, 総括編 (HERP研究会編集). 財団法人自動車研究所, p. 79-119, (1988).
 - 16) Yamaki, N., Kohno, T., Ishiwata, S. et al.: The state of the art of the chemical characterization of diesel particulates in Japan, Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust. (Editor: N. Ishinishi, R.O. McClellan, W. Stober et al.), p. 17-40, Elsevier, Amsterdam (1986).
 - 17) Kinam, P. and Robinson, J.R.: Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. *Int. J. Pharm.* **19**, 107-127 (1984).
 - 18) 高橋芳右, 長山礼三, 花野政晴ら: Polybrene (hexadimethrine bromide) による血小板凝集, 血液と脈管 **15**, 142-145 (1984).
 - 19) Rosborough, T.K. and Swaim, W.R.: Abnormal polybrene-induced platelet agglutination in von Willebrand's disease. *Thrombosis Res.* **12**, 937-942 (1978).
 - 20) Coller, B.S.: Polybrene-induced platelet agglutination and reduction in electrophoretic mobility: Enhancement by von Willebrand factor and inhibition by vancomycin. *Blood* **55**, 276-281 (1980).
 - 21) 鎌倉光宏, 近藤東郎: 形質転換による環境変異原の検出に関する考察; とくにディーゼルエンジン排気物質, トリハロメタン, ジエチレングリコールなどの細胞悪性転化能について, 第59回産業衛生学会講演集 65 (1986).
 - 22) Maclean, N.: *The Differentiation of Cells*, Edward Arnold Ltd., London, (1977).
 - 23) Saunders, G.C. and Wilder, M.: Repetitive maturation cycles in a cultured mouse myeloma. *J. Cell Biol.* **51**, 344-348 (1971).
 - 24) Bullough, W.S. and Deol, J.V.R.: The pattern of tumor growth. In *Control Mechanisms of Growth and Differentiation*. Symp. Soc. exp. Biol. no. 25, 255-275 (1971).
 - 25) Dustin, P.: Cell differentiation and carcinogenesis; a critical review. *Cell & Tiss. Kinet.*, **5**, 519-533 (1972).
 - 26) Hadorn, E.: Problems of determination and transdetermination. In *Brookhaven Symp. Biol.*, no. 18, 148-161 (1965).
 - 27) Piatt, J.: Studies on the problem of nerve pattern, I. Transplantation of the forelimb primordium to ectopic sites in *Ambystoma*. *J. exp. Zool.*, **131**, 173-201 (1956).

(受付 1989年6月22日 受理 1989年8月19日)