短 報

無機水銀暴露による PC 12 細胞の細胞死

Cell Death of PC12 Cell Induced after HgCl₂ Exposure

新井淑弘, 田島静子, 下條信弘

筑波大学社会医学系

Yoshihiro ARAI, Shizuko TAZIMA, Nobuhiro SHIMOJO

Institute of Community Medicine, University of Tsukuba

キーワード: PC12, Mercuric chloride, Apoptosis, Necrosis

目 的

作業現場での水銀への暴露による神経系の障害は、産業衛生上の問題として取り上げられている¹⁾。水銀による神経系の障害発現には神経細胞の脱落が関与していることが知られている。

PC 12 細胞はラットの副腎より得られた褐色細胞腫由来の株化細胞で、神経成長因子 (NGF) に反応して神経突起の成長やカテコールアミンの合成促進等の神経細胞様分化を起こすことが知られ、神経細胞の分化機構の研究等に多く用いられている細胞株である²⁾。

本研究では、NGF によって神経細胞様に分化した PC 12 細胞を塩化第二水銀を添加した培地中で培養したときに起こる細胞死が、RNA 合成阻害剤、蛋白合成阻害剤もしくはエンドヌクレアーゼ阻害剤の添加で抑制できるか否かを明らかにする事により、水銀暴露による PC 12 細胞の細胞死が、NGF 除去により観察できるような、細胞死に先行する蛋白合成を必要とする細胞死であるか否かを検討した。

方 法

今回使用した PC 12 細胞は理化学研究所細胞バンクより供与されたものを、10% 牛胎児血清を含むダルベッコ/ハム 12 1:1 (DF) 培地中で継代維持して、供与されてから 10 代以内のものを実験に使用した。細胞は 10% 牛胎児血清を含む DF 培地中で分散し、96 well のマイクロプレートに 2000 cells/well の密度になるよう分注した。24 時間後より分化用の DF 培地 (2% 牛胎児血清, transferrin 5 µg/ml, insulin 5 µg/ml, progesterone 20 mM および 5-fluorodeoxyuridine 10 µM を含む) 中で、NGF (100 ng/ml) を加えて 2 週間培養を行い分化させた。

1995 年 2 月 14 日受付; 1995 年 3 月 28 日受理

連絡先: 新井淑弘 〒305 茨城県つくば市天王台 1-1-1

筑波大学社会医学系. Correspondence to Y. Arai, Institute of Community Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Ten-noudai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

2 週間の分化期間の後に RNA 合成阻害剤 (actinomycin D: Ac D 2 µg/ml), 蛋白合成阻害剤 (cycloheximide: Cyc 10 µg/ml) もしくはエンドヌクレアーゼ阻害剤 (aurintricarboxylic acid: ATA 30 µM) を作用させて、その直後から、NGF を含む分化用の培地中で塩化第二水銀を添加して培養を行った。水銀を添加して 24 時間培養した後に、細胞の生存率を MTT 法で測定した。

MTT 法は Hansen ら³⁾の方法を一部修正して行った。まず、金属暴露終了後に well を DF 培地で静かに 1 回洗い、100 µl の分化用の DF 培地をいれた。10 µl の MTT (5 mg/ml) 溶液を加えて 37°C で 2 時間放置した。その後、100 µl の Lysing buffer (20% SDS, 50% DMF) を加えて、さらに 20 時間インキュベーションを行った。OD 値の測定は、マイクロプレートリーダー (MTP-32 CORONA) により行った。

得られたデータはコントロール (水銀暴露及び薬剤添加を行っていないもの) の値を 100% とする相対値で表した。さらに、金属暴露のみを行った群と薬剤を作用させてから金属暴露を行った各群とを比較するために、One way ANOVA を行い有意差 ($p < 0.05$) がみられたので、Fisher's PLSD によって各群間の検定を行った。統計計算は Macintosh 統計ソフト Stat View を用いて行った。

結 果

Fig. 1 は NGF により神経細胞様に分化した PC 12 細胞 (A) に HgCl₂ (10 µM) を添加した培地中で 24 時間培養したときの細胞 (B) の形態の変化を示した写真である。NGF により 2 週間分化させた細胞は多数の突起を伸展させて、神経細胞様の形態を示した。しかし、水銀を含む培地中で 24 時間培養した細胞では、突起をなくし丸い形態を示すものや、小体状になり MTT 反応を示さないものが観察された。

Fig. 2 には水銀 10 µM に暴露したときの細胞死に対する Cyc, Ac D 及び ATA の効果を示した。水銀のみに暴露したものに比べ、Cyc を作用させたもののみが有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。

Fig. 3 には水銀 30 µM に暴露したときの細胞死に対する Cyc, Ac D 及び ATA の効果を示した。10 µM に暴露したときと同様に Cyc を作用させたもので、わずかに高い値を示したが、有意な差は見られなかった。

考 察

今回、無機水銀暴露により見られた PC 12 細胞の細胞死はアポトーシス様の形態を示した。さらに蛋白合成阻害剤である Cyc によって細胞死の抑制が見られたことより細胞死に先行する蛋白合成の必要性が示唆された。

Pittman ら⁴⁾や Mesner ら⁵⁾は NGF 除去により起こる細胞死が蛋白合成阻害剤や RNA 合成阻害剤により抑

Fig. 1 Morphological change of neuronal PC12 cells following exposure to HgCl_2 . A; control B; exposed to HgCl_2 ($10 \mu\text{M}$).

制されることを報告し、細胞死に先行する蛋白の合成があることを示唆している。また Kunimoto⁶⁾ はラット小脳神経細胞の初代培養系でメチル水銀暴露実験を行って、今回の結果と同様のアポトーシス様の形態変化と、さらに核の凝集や DNA の断片化を観察し、メチル水銀暴露による神経細胞死でもアポトーシス様の細胞死が起こることを報告している。しかし、RNA 合成阻害剤の Ac D による細胞死の抑制効果はこの実験でも観察されなかったと報告している。

$30 \mu\text{M}$ の無機水銀に対する暴露では、Cyc 添加によっても細胞死の抑制が見られなかったことより、高濃度の水銀への暴露では多くの細胞は蛋白合成を介さない細胞死を起こしていることが示唆された。

Fig. 2 Ability of agents to block cell death following HgCl_2 ($10 \mu\text{M}$) exposure. □; $10 \mu\text{M}$ HgCl_2 , ■; $10 \mu\text{M}$ HgCl_2 and Cyc $10 \mu\text{g/ml}$, ▨; $10 \mu\text{M}$ HgCl_2 and Ac D $2 \mu\text{g/ml}$, ▩; $10 \mu\text{M}$ HgCl_2 and ATA $30 \mu\text{M}$, Mean and S.D. of four independent experiments. *; $p < 0.05$.

Fig. 3 Ability of agents to block cell death following HgCl_2 ($30 \mu\text{M}$) exposure. □; $30 \mu\text{M}$ HgCl_2 , ■; $30 \mu\text{M}$ HgCl_2 and Cyc $10 \mu\text{g/ml}$, ▨; $30 \mu\text{M}$ HgCl_2 and Ac D $2 \mu\text{g/ml}$, ▩; $30 \mu\text{M}$ HgCl_2 and ATA $30 \mu\text{M}$, Mean and S.D. of four independent experiments.

文 献

- 1) Andersen A, Ellingsen DG, Morland T, Kjuus H. A neurological and neurophysiological study of chloralkali workers previously exposed to mercury vapour. *Acta Neurol Scand* 1993; 88: 427-433.
- 2) 佐野 護. 神経成長因子の作用機構及び神経細胞分化研究モデル. *神経進歩* 1991; 35(1): 132-146.
- 3) Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunological Methods* 1989; 119: 203-210.
- 4) Pittman RN, Wang S, Dibenedetto AJ, Mills JC. A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *The J Neurosci*. 1993; 13(9): 3669-3680.
- 5) Mesner PW, Winters TR, Green SH. Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC 12 cells resembles that in sympathetic neurons. *The J Cell Biology*. 1992; 119: 1669-1680.
- 6) Kunimoto M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biocemical and Biophysical Research Communication* 1994; 204(1): 310-317.