培養細胞における Aflatoxin, Sterigmatocystin の作用発現

国 元 武 彦^{*1}

T. KUNIMOTO^{*1}: Mechanism of action of aflatoxin and sterigmatocystin on cultured cells

1. は じ め に

Aflatoxin B₁ (以下 Af. B₁) がラットなどの肝の RNA 合成を強く阻害することはよく知られている。また培養細胞でも核酸合成が阻害されることが、多くの研究者によって報告されている。培養細胞での結論は、主に放射性 nucleoside を用いた実験から導かれたものであり、一方そのような方法では核酸の合成速度を正しくとらえることはできないということも指摘されている。さらに cell-free の核酸合成系では Af. B₁ が何ら作用しないことも知られており、動物レベルと cell-free 系との間に位置すると考えられる培養細胞系での Af. B₁ の作用が、必ずしも従来報告されているとおりではないという可能性が示唆される。このような観点から、われわれは、aflatoxin 類の培養細胞に対する作用を再検討するのを感じ、以下に示すような実験を行った。なお関連したカビ毒 sterigmatocystin (以下 Str.) についても並行して実験を行った。

2. HeLa などの細胞に対する aflatoxin 類の作用

常法に従い、HeLa 細胞を用いて ³H-uridine, ³H-thymidine の核酸分画への取込みに対する Af. B₁ の作用を調べると、従来の報告の通り強い阻害がみられた。しかし、それと同時に以下に示す現象が観察された。i. ³²Pi の核酸分画への取込みは阻害されない。ii. 細胞全体への ³H-uridine, ³H-thymidine の取込みも阻害され、Dose-response 曲線が核酸分画への取込みの阻害の場合に一致する。iii. cell-free 系で uridine, thymidine のリン酸化は阻害されない。iv. 細胞内酸可溶性分画において、³H-uridine は80%以上が UTP+UDP として存在し、この分布は Af. B₁ によって変化しない。

これらの事実、HeLa 細胞において細胞外の ³H-uridine, ³H-thymidine が核酸に入っていく過程の中で、細胞膜を透過する段階が律速的であるということを示すとともに、Af. B₁ は nucleoside の膜透過を阻害するが核酸合成は阻害しないという可能性を示している。そこで真の核酸合成速度をみるために、HeLa 細胞の nucleotide pool を ³H-uridine, ³H-thymidine でラベルし、核酸分画への放射能の動きを調べると、Af. B₁ はまったく阻害しなかった。従って Af. B₁ は HeLa 細胞の核酸合成を阻害しないと結論され、従来報告されている Af. B₁ による核酸合成阻害は、Af. B₁ が nucleoside 膜透過を阻害することに起因した単なるみかけの現象であったと考えられる。同様な結果は Str. でも得られ、また HeLa 以外の細胞では、L5178Y (マウス白血病由来)、YH-7 (マウス肺由来) などの株細胞や、ラット腎およびラット肝非実質細胞の初代培養でも同じ結果が得られた。

^{*1} 国立予防衛生研究所 (東京都品川区大崎 2-10-35 〒141)

National Institute of Health (2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan).

さらに膜透過阻害の kinetics を調べた結果, aflatoxin 類は, uridine, thymidine に対して拮抗的に阻害することがわかり, K_i 値は低いものから Str., Af. B₁, G₁, B₂, G₂ の順であった。

3. 試験管内肝実質細胞に対する aflatoxin 類の作用

このように, aflatoxin 類の核酸合成に対する作用は, 動物体内の肝細胞と HeLa などの培養細胞とにおいて異っているように思われる。この点を追求するために, ラットおよびマウスの肝実質細胞を collagenase を用いて分離し, 浮遊状態または容器に附着させた初代培養の状態では, aflatoxin 類の作用を解析すると, 肝細胞では, aflatoxin 類によって nucleoside の膜透過が阻害される点とは他の細胞と同様であるが, 同時に RNA 合成の阻害も (みかけのものでない) たしかに起っていた。ラットとマウスで比較すると, Af. B₁ に対する感受性はラットの方が数倍高く, また Str. の作用はラットとマウスで異っていた (ラットでは合成阻害とともに RNA の分解の促進と思われる現象が見られた)。次に薬物代謝系との関連を知るために, microsome の薬物代謝酵素系の阻害剤である SKF 525A の存在下で aflatoxin を作用させると, RNA 合成の阻害が弱められた。

なお, 培養肝細胞に Af. B₁ を加え, 代謝物を TLC で分析すると, 短時間の内に Af. M₁ を含む新たな蛍光スポットが認められた。一方 HeLa 細胞では 24 hr 後でも新しいスポットは現われなかった。

4. 肝細胞または肝 microsome 共存下における aflatoxin 類の HeLa などの細胞に対する作用

以上に述べたようにわれわれの試験管内肝実質細胞は, aflatoxin 類の作用に関しては, 動物体内の肝細胞の性質をよく反映しているように思われるが, それでは HeLa などの培養細胞との差は何によるのであろうか。それが細胞自身の感受性の差に基づくものでないことは, HeLa などの細胞に肝細胞浮遊液, または肝 microsome を共存させて aflatoxin 類を作用させると, HeLa などの細胞でも RNA 合成が阻害されることから証明された。肝細胞または肝 microsome としてはラットとマウスから得られたものに同様な作用があり, 被験細胞としては, HeLa 以外に前述した各種細胞でも同じ結果が得られた。阻害の強さは Str., Af. B₁, G₁, B₂, G₂ の順であった。

肝 microsome を用いる場合には, NADPH 産生系が必須であり, SKF525A 存在下では aflatoxin 類の作用が弱められた。

これらの結果から, aflatoxin 類は肝 microsome の薬物代謝酵素系によって代謝され, 核酸合成を阻害するようになると結論される。さらに活性代謝物の本体を追求するために, 肝 microsome に依存した RNA 合成阻害の系に各種の物質を加えてみた。しかし, 代謝物の標的と考えられる DNA, 求核試薬である glutathione, epoxide hydrase の阻害剤である cyclohexene oxide などは Af. B₁ の作用にほとんど影響しなかった。これらの実験からは, 阻害活性の本体が epoxide であるということを支持する積極的証拠は得られなかった。

5. 考 察

一般に核酸合成の速度は放射性 nucleoside を用いて測定することが多いが, それが必ずしも正しい結論を与えないということが aflatoxin 類の場合にもあてはまると考えられる。たとえ培養肝細胞を用いた実験であっても, 放射性 nucleoside を使って得た結果の解析は慎重に行われなければならない。

aflatoxin 類が nucleoside の膜透過を阻害するということを, 発癌性と結びつけることは現状ではできないが, すくなくとも急性毒性の機構としては何らかの意味をもつものと考えられる。膜透

過に対する作用は, aflatoxin 類が代謝を受けずに発現するものと考えられ, 今まで報告のある他の膜系 (mitochondria, lysosome, endoplasmic reticulum) に対する作用も同様であろう.

一方, 核酸合成に対する aflatoxin 類の阻害作用は, 肝によって特異的な代謝を受けてはじめて発現されるものである. これは従来からいわれていることであるが, われわれは HeLa 細胞で RNA 合成の阻害が起きないことを利用し, そこに活性化の系を加えることによって直接的な証明をすると同時に定量的な扱いを可能にした. このような系により, 阻害活性を持つ代謝物の本体についても実験を行ったが明確な結果はまだ得られていない. 最近, 微生物に対する aflatoxin 類の変異原性が肝 microsome に依存して発現されることが報告され, その本体は epoxide であると考えられているが, われわれの阻害活性とは必ずしも一致しないようである.

また培養肝細胞を用いる系において Af. B₁ と Str. の作用に差が見出され, ラットとマウスの肝細胞の特異性も示唆された. マウスは動物レベルでは aflatoxin 類に対して抵抗性であるにもかかわらず, 分離肝細胞は感受性を持ち, また肝 microsome によって活性代謝物が作られることは, 種による感受性の差を考える上で興味深いものである.