化学発光法による3種のフザリウムトキシンの細胞毒性試験

西本普喜子*¹, 山庄司志朗*¹, 一色賢司*²

F. NISHIMOTO*¹, S. YAMASHOJI*¹ and K. ISSHIKI*²: Cytotoxic examination of three *Fusarium* mycotoxins with chemiluminescent assay

Summary

Menadion-catalyzed hydrogen peroxide production by viable cells was proportional to viable cell number. The amount of hydrogen peroxide was measured with a chemiluminescent assay. This assay was applied as a toxicological examination for *Fusarium* mycotoxins. The usefulness of this assay was compared with those with the neutral red inclusion and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assays. Chemiluminescence assay was superior in speed and sensitivity to detect cytotoxicity. Intensity of cytotoxicity to HuH-6KK cell observed was in order of fusarenon-X, deoxynivalenol and nivalenol. To PC-3 and NIH3T3 cells, these mycotoxins showed almost the same toxicity as to HuH-6KK cell.

近年、食品、医薬品あるいは化粧品などの安全性や毒性に関する情報を効率的に得るために、ヒト細胞を含めた各種培養動物細胞を用いる毒性試験が行われるようになった。培養動物細胞を用いる研究手法は、動物実験に伴う膨大な経費や時間を削減できる上、再現性や定量性が向上することもある動物実験の代替や縮小への貢献が期待されている¹⁾。これまでに報告された方法では、細胞膜の損傷、酵素活性や代謝活性などの細胞機能毒性、高分子合成能、あるいは細胞増殖能の低下などを指標として、細胞毒性を検出している。

The diagram illustrates a photochemical reaction cycle. On the left, a cell is shown containing $H^+ + NADH$ and NAD^+ . A cycle of arrows connects the cell to the chemical structures. The top structure is menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone). The bottom structure is a reduced form of menadione (2-methyl-1,4-naphthodiol). An arrow points from the cell to the reduced form, and another from the reduced form back to the cell, where NAD^+ is produced. A third arrow points from the reduced form to the top structure, which is then converted to H_2O_2 and O_2 . The H_2O_2 and O_2 then react with a fluorophore (Aryl oxalate ester) to produce light.

Fig. 1. Mechanism for the production of H_2O_2 catalyzed by exogenous menadione in cell culture.

*1 キング醸造株式会社中央研究所 (〒675-01 加古川市平岡町新在家2333-2)
Institute of King Brewing Co. Ltd. (Shinzaike, Hiraoka, Kakogawa 675-01).

*2 農林水産省食品総合研究所 (〒305 つくば市観音台2丁目1-2)
National Food Research Institute (2-1-2 Kannondai, Tsukuba 305).

著者らは、メナジオン存在下での細胞の過酸化水素生成能を指標とする化学発光法により生育状況を迅速に観察する手法を開発した。^{2,3)} Fig. 1 にその原理を示した。本研究では、フザリウムトキシンの細胞毒性検出への化学発光法の応用を試み、neutral red (NR) 取り込み法ならびに 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 還元法の実験結果と比較を行い、供試したマイコトキシンの毒性発現のメカニズムについても考察を行った。

材料および方法

1. 供試細胞および培養方法

ヒト肝芽腫細胞 (HuH-6KK) は、10% 牛胎児血清 (FBS) および細胞培養用添加剤 RD-1 を含む E-RDF 培地 (極東製薬製) を用いて培養した。マウス線維芽細胞 (NIH3T3) は、10% FBS および 0.4% L-glutamine を含む DME 培地 (日研生物医学研究所製) を用いて、またヒト前立腺ガン細胞 (PC-3) は、10% FBS および 0.4% L-glutamine を含む DME/F12 (50/50) 培地 (日水製薬製) を用いて培養した。いずれの細胞も、37°C における 5% CO₂・飽和水蒸気条件下で培養し、実験に供した。

2. 供試毒素ならびに投与方法

Nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), fusarenon-X (4-acetylnivalenol, FX) は、いずれも和光純薬製の標準品を使用し、70%エタノールで溶解、濾過滅菌した後、各々の培地で希釈し、試験に用いた。細胞への投与には、次の A, B の2法を用いた。

投与方法 A 細胞をトリプシンで処理し、剥がれた細胞を各々の培地に懸濁した。細胞懸濁液を24ウェルマイクロプレートに分注し (1.25×10^4 cells/well), 48時間培養した。48時間後、細胞がサブコンフルエントの状態に達したところで、各ウェルから培地を除去してマイコトキシンを投与し、さらに24時間培養した。

投与方法 B トリプシン処理後の細胞懸濁液を24ウェルマイクロプレートに分注し (2.0×10^4 cells/well), 直ちにマイコトキシンを投与して48時間培養した。

Fig. 2. A plot of HuH-6KK cell number vs. menadione-catalyzed H₂O₂ production.

3. 化学発光を利用した細胞毒性の検出

各ウェルからマイコトキシンを含む培地を除去し、500 μ l の MEM 培地 (phenolred free, 日研生物医学研究所製) に置き換えた。200 mM のメナジオン・エチルアルコール溶液を 5 μ l 添加し、37°C でインキュベーションした。10分後に、50 μ l の発光試液を添加し、5 秒間の積算発光量をルミカウンター (アドバンテック東洋製) を用いて測定した。発光試液は、10 mg の bis (2-(3,6,9-trioxadecanyloxycarbonyl-4-nitrophenyl) oxalate と 1 mg の pyrene を acetonitrile に溶解して 10 ml としたものを使用した。発光量より、細胞の過酸化水素生成量を求め、未処理細胞に対するマイコトキシン投与細胞の過酸化水素生成量の百分率を算出し、これを細胞の相対的な viability とした。

なお、本法と従来法の実験結果を比較するため NR 取り込み法⁴⁾および MTT 還元法⁵⁾による細

Fig. 3. Cytotoxic effects of *Fusarium* toxins on HuH-6KK cells at subconfluent state.

HuH-6KK cells trypsinized were washed and diluted with E-RDF medium to prepare the cell number at 1.25×10^4 cells/well in 24 well tissue culture plate. After 48 hr culture, the cells were mixed with the *Fusarium* toxins and were cultured for 24 hr. The volume of medium was 500 μ l/well. The viability after the culture with the *Fusarium* toxins was determined by chemiluminescent (a), Neutral red inclusion (b), and MTT reduction (c) assay. Each symbol is as follows: ●, Nivale-nol (NIV); ■, Deoxynivalenol (DON); ▲, Fusarenon-X (FX). The value of each symbol was mean of duplicate determinations.

胞毒性試験を行った。

結 果

今回用いた化学発光法では、生細胞にメナジオンを加え、細胞の NADH 供給能力と、細胞膜の NADH: メナジオン酸化還元酵素活性の両者に依存する過酸化水素生成能力を測定する.^{2,8)} 生成された過酸化水素量は、細胞密度に比例した。Fig. 2 にヒト肝芽腫細胞 HuH-6KK 細胞を用いて過酸化水素の発生量を調べた結果を示した。他の細胞でも同様な結果が得られた。

サブコンフルエントの状態に達した HuH-6KK に NIV, DON, FX を投与方法 A により加えると、過酸化水素生成量は、投与濃度に依存して減少した (Fig. 3-a)。投与濃度 $10^{-2}\%$ での viability は、20~05%であった。投与方法 A を用いた場合には、NR 取り込み法 (Fig. 3-b) および

Fig. 4. Cytotoxic effects of *Fusarium* toxins at suspended state.

HuH-6KK cells trypsinized were washed and diluted with E-RDF medium to prepare the cell number at 2.0×10^4 cells/well in 24 well tissue culture plate and the cells were mixed with the *Fusarium* toxins. After then, the cells were cultured for 48 hr. The volume of medium was 500 μ l/well. The viability after the culture with the *Fusarium* toxins was determined by chemiluminescent (a), Neutral red inclusion (b), and MTT reduction (c) assay. Each symbol is as follows: ●, NIV; ■, DON; ▲, FX. The value of each symbol was mean of duplicate determinations.

MTT 還元法 (Fig. 3-c) での実験結果と比較しても、その検出感度に大きな差は認められなかった。しかし、化学発光法ではマイコトキシン投与後の細胞機能の活性測定操作に要する時間は10分程であったが、ニュートラルレッド取り込み法および MTT 還元法では、3~5 時間を要した。

一方、HuH-6KK 細胞懸濁液に投与方法 B により直接 NIV, DON, FX を加えた場合には過酸化水素生成量は、処理濃度 $10^{-5}\%$ 以上で急激に減少した (Fig. 4-a)。これに対して、化学発光法以外の検出方法 (Fig. 4-b, c) では、処理濃度 $10^{-5}\sim 10^{-2}\%$ にかけて、緩やかに viability が減少し、化学発光法の検出感度との間に違いが見られた。いずれの検出方法でも、強い細胞毒性が観察されたのは FX であり、ついで DON, NIV の順であった。さらに、マウス線維芽細胞 (NIH 3T3) およびヒト前立腺ガン細胞 (PC-3) に対する3種類のフザリウムトキシンの毒性試験 (投与方法 B) でも、細胞種により感受性は異なるが、供試毒素の毒性の強さの順序は一致してい

Fig. 5. Cytotoxic effects of *Fusarium* toxins on three kinds of cell cultures.

HuH-6KK, NIH3T3, and PC-3 cells trypsinized were washed and diluted with media to prepare the cell number at 2.0×10^4 cells/well in 24 well tissue culture plate and the cells were mixed with the *Fusarium* toxins. After then, the cells were cultured for 48 hr. The volume of medium was 500 μ l/well. The viability after the culture with the *Fusarium* toxins was determined by chemiluminescent assay. Each symbol is as follows: ●, NIV; ■, DON; ▲, FX. The value of each symbol was mean of duplicate determinations.

Fig. 6. Rapid detection of cytotoxic effects of tomatine.

Tomatine was mixed with subconfluent HuH-6KK cells in 24 well tissue culture plate, and the cells were cultured for 24 hr. After the culture, the viability (—) was determined by chemiluminescent assay. In the case of detection of cytotoxicity within 60 min incubation, the cells trypsinized was mixed with tomatine in 24 well tissue culture plate (2.0×10^5 cells/well) and the viability (---) was determined by chemiluminescent assay 10-60 min after mixing. Each symbol is as follows: ○, 10 min; △, 30 min; □, 60 min; ■, 24 hr. The value of each symbol is mean of duplicate determinations.

た (Fig. 5).

Fig. 6 に、膜障害性の毒物であるトマトより抽出されたグリコアルカロイド (トマチン)⁶⁾ の細胞毒性試験例を示した。

考 察

今回用いた化学発光法では、細胞膜の損傷による直接的な酵素等の機能障害、あるいは、解糖系依存のエネルギー代謝の障害のいずれかが生じたとき、その細胞活性の低下を簡便・迅速に検出することができる。^{2,3)}

Fig. 6 に示すように、サブコンフルエントの状態に達した細胞に毒素を加えた場合、トマチンのような細胞膜損傷作用を持つ毒物⁶⁾ では、24時間の処理により細胞毒性が明確に検出される。さらに、細胞懸濁液にトマチンを加えた場合、1時間以内にその細胞毒性を検出することができる。懸濁液中に分散している細胞の感受性は、トリプシン処理による軽度の細胞膜の損傷、あるいは薬物との接触面積の増加などの理由から、サブコンフルエントの状態に達した細胞よりも高くなったと考えられた。フザリウムトキシンを細胞懸濁液に添加した場合には、48時間後によりやく毒性が検出された (Fig. 4-a)。これらの結果から、今回供試したフザリウムトキシンは、急激な細胞膜損傷あるいは細胞破壊作用は弱く、むしろ細胞の分裂や増殖を抑制する、ゆっくりと抑制する作用があ

ると推測された。Ueno et al.⁷⁾ は、タンパク質の合成阻害による毒性発現のメカニズムを提案している。今回の実験結果はこの提案を直接指示するものではないが、膜機能障害性が弱かったことから、タンパク質の合成阻害等の他の作用によって毒性が発現される可能性が高いと考えられた。

今回、化学発光法と比較するために用いたニュートラルレッド取り込み法・MTT還元法は、生細胞ライソソームへのニュートラルレッド取り込み量、あるいは MTT がミトコンドリアの酵素との反応によりフォルマザンに変化し蓄積される量を分光光学的に定量するものである。いずれも自動化され、簡便な方法として利用されているが、これら色素を細胞内に浸透蓄積させるためには、3～4時間インキュベーションする必要がある、この間に細胞の活性が変化するおそれがある。一方、化学発光法では、分単位で発生する細胞毒性を検出することができる。このことが、化学発光法と他の2法の細胞毒性の検出速度と感度の違いとなって現れた可能性がある。

マウスを用いた毒性試験の結果⁸⁾ では、FX ならびに NIV に比べて DON の毒性は10倍程度弱いものであったが、本実験では細胞毒性の強さにこれほどの差は見られなかった。この現象は、原虫 *Tetrahymena* を用いた実験でも観察されている。⁷⁾ これらの現象は、動物個体における各マイコトキシンの吸収、代謝、排泄等の違いによる影響であると考えられた。

引用文献

- 1) 長澤 弘：畜産の研究，45，79 (1991)。
- 2) Yamashoji, S., Ikeda, T., Yamashoji, K.: Anal. Biochem., 181, 149 (1989)。
- 3) Yamashoji, S., Ikeda, T., Yamashoji, K.: Biochim. Biophys. Acta, 1059, 99 (1991)。
- 4) Borenfreund, E., Puerner, J. A.: Toxicol. Lett., 24, 119 (1985)。
- 5) Mosmann, T.: J. Immunol. Methods, 65, 55 (1983)。
- 6) Juvik, J. A., Stevens, M. A.: J. Amer. Soc. Hort. Sci., 107, 1061 (1982)。
- 7) Ueno, Y., Nakajima, M., Sakai, K., Ishii, K., Sato, N., Shimada, N.: J. Biochem., 74, 285 (1973)。
- 8) 芳澤宅實，諸岡信一：食衛誌，15，261 (1974)。