ヒト歯肉由来培養線維芽細胞における テトラサイクリン系抗生物質の染色体異常誘導能

六 川 彰 筒 井 健 機

日本歯科大学歯学部薬理学教室

(主任：筒井健機教授)

(平成9年4月8日受付)

Study of the Ability of Tetracyclines to Induce Chromosome Aberrations in Cultured Human Fibroblasts Derived from Gingival Tissues

Akira Rokukawa and Takeki Tsutsui

Department of Pharmacology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

(Chief : Prof. Takeki Tsutsui)

The ability of tetracyclines (TCs) to induce chromosome aberrations was examined by using cultured human fibroblasts (HFG/MS cells) derived from gingival tissues. Treatment of HFG/MS cells with tetracycline · HCl (TC), chlortetracycline · HCl (CTC), demeclocycline · HCl (DMC) or minocycline · HCl (MINO) at 100-1,000 μ M for 48 h reduced colony-forming efficiency (CFE) in a dose-dependent manner. The rank order of the inhibitory effect of TCs on CFE was CTC < MINO < TC < DMC. No significantly different increases in the frequency of chromosome aberrations were observed in HFG/MS cells treated with

any compound at 100-1,000 μ M for 24 or 48 h. In addition, chromosome aberrations were not observed in HFG/MS cells following treatment with TCs at 10-100 μ M for 1 h in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free phosphate-buffered saline. No significant increases in the frequency of chromosome aberrations were detected when HFG/MS cells were treated with MINO at 100-1,000 μ M for 2 h in the presence of exogenous metabolic activation mediated by rat liver post-mitochondrial supernatant. The results indicate that there is no clastogenic activity of TCs against cultured human fibroblasts from gingival tissues under certain conditions.

Key words : Tetracyclines, Human fibroblasts, Chromosome aberrations

要旨：テトラサイクリン系抗生物質 (TCs) の安全性を遺伝毒性の面から検討する目的で、ヒト歯肉由来培養線維芽細胞 (HFG/MS 細胞) にテトラサイクリン (TC), クロルテトラサイクリン (CTC), デメクロサイクリン (DMC), ミノサイクリン (MINO) を作用させ、染色体異常誘導能を調べた。その結果、

- 1) 各 TCs の細胞毒性を細胞生存率から調べたところ、CTC, MINO, TC, DMC の順で強くなった。
- 2) Ca^{2+} , Mg^{2+} ならびに血清等を含有する通常の培養液中で TCs の 100~1,000 μ M を 24 または 48 時間細胞に作用させたが、染色体異常は誘導されなかった。
- 3) ラット肝ミクロソーム由来の薬物代謝酵素存在下で、MINO の 100~1,000 μ M を 2 時間作用させても染色体異常の誘導はみられなかった。
- 4) Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含の塩類溶液中で TCs の 10~100 μ M を 1 時間作用させたが、やはり染色体異常は誘導されなかった。
- 5) 上記の各実験系で、陽性対照として用いた N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンやアフラトキシン B₁ によって、細胞に染色体異常が誘導された。

以上の結果は、各 TCs により HFG/MS 細胞に対する細胞毒性が異なること、また、いずれの TCs も、本実

験条件下では、HFG/MS 細胞に染色体異常を誘起しないことを示している。

索引用語：テトラサイクリン類，ヒト線維芽細胞，染色体異常

緒 言

テトラサイクリン系抗生物質は、1948 年 Duggar¹⁾によりクロルテトラサイクリンが発見され、以後、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、デメクロサイクリン、メタサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリンなどが発見または半合成され、広く臨床に使用されている。

歯科領域では近年、歯周病の治療に抗生物質を用いた化学療法が行われている。歯周病と密接な関係にある細菌、すなわち、歯周病原性細菌に *in vitro* 感受性試験で優れた抗菌性を示すものとして、ペニシリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、クリングマイシン、メトロニダゾールなどがある²⁻⁷⁾。とくにミノサイクリンは、歯周病原性細菌に対して強い抗菌作用を示すことから臨床的研究も行われ、その結果、この薬物を歯周ポケット内に局所適用した場合の有効性、安全性および有用性が臨床的にも認められている^{8,9)}。

しかし、培養哺乳類細胞を用いた遺伝毒性試験で、テトラサイクリンによって染色体異常や遺伝子突然変異が誘起されたとの報告もある¹⁰⁻¹³⁾。たとえば、ヒトリンパ球¹⁰⁾やチャイニーズ・ハムスター由来の Don 細胞¹¹⁾、マウス乳がん由来の FM 3 A 細胞¹²⁾に染色体異常が、また、FM 3 A 細胞やチャイニーズ・ハムスター由来の V 79 細胞の *hprt* 遺伝子に突然変異が誘起される^{12,13)}。

そこで本研究では、テトラサイクリン系抗生物質の安全性を遺伝毒性の面から検討する目的で、ヒト歯肉由来の培養線維芽細胞に各種のテトラサイクリン類 (tetracyclines: TCs) を作用させ、TCs の細胞生存率に与える影響を調べるとともに、これらの薬物の染色体異常誘導能を調べた。

材料と方法

1. ヒト歯肉由来線維芽細胞の初代培養

矯正治療のために来院した健康人 (19 歳女性) の右側埋伏智歯抜歯時に切除した智歯相当部歯肉を培養に供した。切除した歯肉片を最終濃度が 1,000 units/ml と 1,000 μ g/ml になるように、それぞれ、ペニシリンと硫酸ストレプトマイシンを加えた滅菌リン酸緩衝液 [PBS (-): phosphate-buffered saline; 0.14

MNaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1mMKH₂PO₄, pH 7.4] 中で数回洗浄し、メスで約 1 mm 角に細切した。その 3~4 個ずつを直径 35 mm のプラスチックシャーレ (Falcon Labware, 米国) 内のコラーゲングル (0.24%) 上に置き、5% 炭酸ガス培養器 (37°C) (Forma 社, 米国) 中に静置した。翌日、ダルベッコ改変イーグル最少培地 (GIBCO 社, 米国) とハム F 12 培地 (GIBCO 社) の等量混液にウシ胎仔血清 (10 v/v%, Biocell 社, 米国), ヒドロコルチゾン [0.5 μ g/ml, 和光純薬工業 (株), 大阪], 炭酸水素ナトリウム [0.22 w/v%, 和光純薬工業 (株)], ペニシリン (100 units/ml, GIBCO 社) と硫酸ストレプトマイシン (100 μ g/ml, GIBCO 社) を添加した培地の 1 ml をシャーレに加えた。週 3 回培地を交換し、歯肉片から遊走し増殖してきた線維芽細胞でシャーレがほぼ一杯になるまで培養を継続した。なお、コラーゲングルは以下のようにして作製した。コラーゲングル [0.3%, type I; 高研 (株), 東京] をハム F 12 培地で 0.24% に希釈し、0.5 N の NaOH で pH を 7.4 に調整した。この溶液の 1 ml を直径 35 mm のプラスチックシャーレに入れて拡げ、5% 炭酸ガス培養器中に少なくとも一昼夜放置した。

2. ヒト歯肉由来培養線維芽細胞の継代培養

歯肉片から遊走し増殖してきた線維芽細胞〔以後、HFG/MS 細胞と呼ぶ〕を PBS (-) の 1 ml で 2 回洗浄後、0.25% トリプシンと 0.1% EDTA を含む PBS (-) (GIBCO 社) で 20 分間 (室温) 処理した。パスツールピペットでピペッティングしてコラーゲングル上から細胞を剝離、回収し、イーグル最少培地 (GIBCO 社) にウシ胎仔血清 (10 v/v%), セリン [0.2 mM, 和光純薬工業 (株)], アスパラギン酸 [0.1 mM, 和光純薬工業 (株)], ピルビン酸ナトリウム (1.0 mM, Sigma 社, 米国), 炭酸水素ナトリウム (0.22 w/v%), ペニシリン (100 units/ml) と硫酸ストレプトマイシン (100 μ g/ml) が加えてある培養液 (完全培養液) に浮遊させた。細胞を 1,300 rpm (260 g) で 3 分間遠心分離後上清を捨て、細胞塊を完全培養液の 10 ml に再浮遊後、再度同一条件で遠心分離した。細胞を再び完全培養液の 10 ml に浮遊し、75 cm² フラスコ (Costar 社, 米国) に全量を播種し培養した。細胞数がほぼ飽和密度に達した時点で細胞を PBS (-) の 5 ml で 2 回洗浄した。0.25% トリプシン (GIBCO 社) の 0.5 ml を加えて室温で 2~3 分間放置し、細胞を培養面から剝離した。

完全培養液に細胞を浮遊させ、1:2または1:4の分配比で継代培養した。実験には細胞集団倍加数が7~10のものをを用いた。

3. TCs と化学物質

塩酸テトラサイクリン (tetracycline hydrochloride : TC), 塩酸クロルテトラサイクリン (chlortetracycline hydrochloride : CTC), 塩酸デメクロサイクリン (demeclocycline hydrochloride : DMC), 塩酸ミノサイクリン (minocycline hydrochloride : MINO) は Sigma 社より購入した。これらを実験に依じて完全培養液その他で 300~1,000 μ M の濃度で溶解し、0.2 μ m の孔径をもつ滅菌フィルターでろ過滅菌した (詳細は各実験項目のところで述べる)。なお、CTC のみは 0.5 N の NaOH (完全培養液を溶媒とした) に 100 mM の濃度で溶解した。CTC を用いた実験では、0.005 N NaOH 含有完全培養液を対照群とした。N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine : MNNG) は和光純薬工業 (株) より購入し、培養用の蒸留水で 1.4 mM の濃度で溶解したのちろ過滅菌した。アフラトキシン B₁ [aflatoxin B₁ (AFB₁)], Sigma 社は 3.2 mM の濃度でジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide : DMSO) で溶解した。

4. 実験の種類

実験は、通常のウシ胎仔血清を含む完全培養液中で薬物を作用させた場合の他に、次の2通りでも行った。1) 薬物や化学物質のなかには、細胞のミクロソームに存在する薬物代謝酵素で代謝されてはじめて変異原性があらわれるものも少なくない。したがって、TCs をラット肝由来のミクロソーム分画存在下 (薬物代謝酵素存在下) で作用させた場合、2) TCs は2価の金属イオンとキレート結合すると細胞内への取り込みが低下する¹⁴⁾。したがって、Ca²⁺, Mg²⁺ を含まないハンクス塩類溶液 (以下、ハンクス液) 中で TCs を作用させた場合。

上記の各実験群において、それぞれ細胞の生存率及び染色体異常に及ぼす TCs の影響を調べた。なお、すべての実験操作は黄色蛍光灯下で行った。

5. 細胞生存率に及ぼす TCs の影響

1) 完全培養液中で作用させた場合

継代培養中の HFG/MS 細胞をトリプシン処理で培養面から剥離し、血球計算盤で細胞数を数えた。なお、同時に、90% 以上の細胞が単個細胞であることを確認した。次に、この HFG/MS 細胞の 200~1,000 個を直径 60 mm のプラスチックシャーレ (Falcon Labware) に播種し、一昼夜培養した。翌日、培養液を TCs (TC, CTC, DMC と MINO) 含

有完全培養液と交換した。48 時間後、細胞を完全培養液の 2 ml で 2 回洗浄し、さらに 10 日間培養した。形成されたコロニーをメタノールで固定し、10% ギムザ液で染色した。50 個以上の細胞からなるコロニーをコロニーとして数えた。細胞生存率に及ぼす各 TCs の影響は、TCs 作用群のシャーレあたりのコロニー数の平均値に対する TCs 無添加群の平均値の割合 (%) で表した。なお、実験には各濃度あたり 5 枚のシャーレを用いた。

2) 薬物代謝酵素存在下で作用させた場合

薬物代謝酵素存在下で行った実験では、以下の反応液で MINO を溶解・希釈して細胞に作用させた。

反応液は 5% ラット肝ミクロソーム分画と 20 mM PO₄²⁻, 3.1 mM Mg²⁺, 5 mM glucose 6-phosphate [オリエンタル酵母工業 (株), 東京] と 0.8 mM NADPH [オリエンタル酵母工業 (株)] からなる¹⁴⁾。この反応液を以後、S 15 反応液と呼ぶ。なお、5% ラット肝ミクロソーム分画には、phenobarbital [第一化学薬品 (株), 東京] と 5,6-benzoflavone (Aldrich 社, 米国) を腹腔内注射したオス Sprague-Dawley ラット (体重約 200 g) の肝ホモジネートを 15,000 g で遠心分離した上清をあてた¹⁵⁾。

HFG/MS 細胞の 200 個を、各実験群あたり 5 枚の直径 60 mm のプラスチックシャーレに播種した。一昼夜培養後、MINO を 2 時間細胞に作用させた。その後、細胞を 2 ml の完全培養液で 2 回洗浄し、10 日間培養してコロニーを形成させた。

3) ハンクス液中で作用させた場合

HFG/MS 細胞の 3.5×10⁵ 個を 25 cm² フラスコ (Falcon Labware) に播種し、一昼夜培養した。細胞を Ca²⁺, Mg²⁺ 不含のハンクス液の 2 ml で 2 回洗浄後、ハンクス液で溶解し希釈した MINO を 1 時間作用させた。ハンクス液の 2 ml で 2 回洗浄後、完全培養液を加えた。その後ラバーポリスマンを使って細胞をフラスコから剥離し、細胞数を数えたのち、各実験群につき 5 枚の直径 60 mm プラスチックシャーレにその 200~1,000 個を播種し、コロニーを形成させた。

6. TCs の染色体異常誘導能の検討

1) 完全培養液中で作用させた場合 (図 1 の実験 I)

HFG/MS 細胞の 1.5×10⁶ 個を 75 cm² フラスコに播種した。一昼夜培養後、完全培養液で溶解し希釈した TCs を作用させた。24 または 48 時間の作用終了 4 時間前に、分裂中期細胞を捕捉するため、最終濃度が 0.02 μ g/ml になるようにコルセミド¹⁶⁾ (GIBCO 社) を加えた。なお、陽性対照として薬物代謝を必要

図1 染色体異常検出のための実験系

▨ は薬物作用時間を表わす。

としない直接作用型の変異原物質である MNNG を以下の方法で作用させた。2×10⁶ 個の細胞を 75 cm² フラスコに播種し、一昼夜培養後 MNNG の 20 μM を 2 時間作用させた。完全培養液の 5 ml で細胞を 2 回洗浄後、さらに 22 時間培養した。培養終了 4 時間前に最終濃度が 0.02 μg/ml になるようにコルセミドを加えた。

染色体標本は次の方法で作製した。細胞を PBS (−) の 5 ml で 2 回洗浄後、0.25% トリプシンの 0.5 ml を加え、室温で 2~3 分間放置した。細胞をフラスコより剥離したのち、得られた細胞を PBS (−) の 10 ml で 1 回洗浄後、0.8% クエン酸ナトリウム水溶液に浮遊させて 20 分間室温で放置した。カルノア液 (メチルアルコール：酢酸, 3:1) で細胞を固定し、空気乾燥法¹⁶⁾で染色体標本を作製した。標本を 3% 緩衝ギムザ液 (pH 6.8~7.0) 中で 20~30 分間染色した。TCs の染色体異常誘導能の有無は、実験群あたり 100 個の分裂中期細胞について染色体の構造異常を調べ、その出現率を対照群のそれと比較して判定した (χ² テスト)。なお、染色分体上にみられる無染色部位の幅が染色分体の幅より大きく、かつ、染色分体断片が転置している場合を切断、していない場合をギャップとした。

2) 薬物代謝酵素存在下で作用させた場合 (図1の実験II)

HFG/MS 細胞の 1.5×10⁶ 個を 75 cm² フラスコに播種した。一昼夜培養後、S 15 反応液で溶解し希釈した MINO を細胞に 2 時間作用させた。完全培養液の 5 ml で 2 回洗浄し、さらに 22 または 46 時間培養した。培養終了 4 時間前に最終濃度が 0.02 μg/ml になるようにコルセミドを添加した。その後、前述の方

法で染色体標本を作製した。なお、陽性対照として薬物代謝酵素で代謝されてはじめて変異原性をあらわす AFB₁ (3.2 μM) を同一条件下で細胞に作用させた。また、MINO 作用群の対照群には MINO 無添加の S 15 反応液を、AFB₁ 作用群の対照群には 0.1% DMSO (14 mM DMSO) 含有 S 15 反応液を用いた。

3) ハンクス液中で作用させた場合 (図1の実験III)

HFG/MS 細胞の 1.5×10⁶ 個を 75 cm² フラスコに播種した。一昼夜培養後、細胞をハンクス液の 5 ml で 2 回洗浄後、ハンクス液で溶解し希釈した TCs を 1 時間作用させた。ハンクス液の 5 ml で 2 回洗浄後、完全培養液を加えて 23 または 47 時間培養した。培養終了 4 時間前に前述と同濃度のコルセミドを添加し、染色体標本を作製した。陽性対照として、MNNG の 20 μM を同一条件下で作用させた。

結 果

1. 完全培養液中で作用させた場合

1) 細胞生存率

各 TCs を 48 時間作用させた場合の細胞生存率を図 2 に示した。それぞれの TCs とともに、100 μM 作用群では細胞の生存率はほとんど低下しなかったが、300~1,000 μM に濃度が上がると、CTC を除いて濃度依存的に生存率が低下した。生存率の低下の割合は DMC で最も強く、次いで TC, MINO の順であった。

2) 染色体異常

各 TCs を作用させた時の細胞の染色体異常出現率を表 1 に示した。TCs を細胞に 100~1,000 μM の濃

図2 細胞生存率に及ぼすTCsの影響

TCsを完全培養液中で48時間細胞に作用させた。TC(●), CTC(■), DMC(▲), MINO(◆)。対照群のコロニー形成率は $35.3 \pm 3.2\%$ であった。シンボルマークはシャーレ5枚の平均値、バーは標準偏差を示す。バーのないのは、標準偏差がシンボルマーク内にあることを示す。

度で24時間作用させた時の染色体異常の出現率は、対照群のそれとほぼ同程度であった。一方、陽性対照として用いたMNNG作用群では、染色体異常の出現率が対照群と比較して有意に上昇した(表1, 図3)。

各TCsの100~1,000 μMを作用時間を延長して48時間作用させても、24時間作用群と同様、染色体異常頻度の上昇は認められなかった(実験データの掲載は省略)。一般に、染色体異常は細胞生存率が対照群の30%前後に低下する濃度で高頻度に出現する¹⁷⁾。本研究では図2にあるように、MINOの300 μMと1,000 μMの48時間作用群やTCとDMCの300 μM作用群の細胞生存率がこの範ちゅうに入るが、これらの作用条件下でも染色体異常の出現頻度は上昇しなかった。

2. 薬物代謝酵素存在下で作用させた場合

ここでは歯周病治療薬として局所適用されることの多いMINOについてのみ実験を行った。

1) 細胞生存率

ラット肝ミクロソーム存在下でMINOを細胞に2時間作用させた時の生存率を図4に示した。100~1,000 μMのMINOを細胞に作用させたところ、細胞生存率が対照群の60~70%に低下した。

2) 染色体異常

同様にラット肝ミクロソーム存在下でMINOを2時間作用させ、そののち22時間培養後に染色体標本を作製した時の染色体異常の出現率を表2に示した。MINOを100~1,000 μM作用させても染色体異常の頻度は上昇しなかった。これに反して陽性対照としてAFB₁を作用させた群では、染色体異常頻度の上昇が認められた。なお、MINOを2時間作用させたのち、さらに46時間培養した群でも、染色体異常頻度の上昇は認められなかった(データの掲載は省略)。

3. ハンクス液中で作用させた場合

1) 細胞生存率

本実験はMINOについてのみ行った。MINOをハンクス液中で1時間作用させたところ、図5にみられるように細胞生存率が濃度に依存して減少した。10, 30, 100, 300 μM作用群の生存率は、対照群のそれぞれ $97.5 \pm 10.6\%$, $62.1 \pm 13.4\%$, $24.8 \pm 4.7\%$, $2.8 \pm 0.8\%$ であった。一方、図2に示したように、完全培養液中でMINOの100, 300, 1,000 μMを48時間作用させた時の細胞生存率は、それぞれ $82.7 \pm 11.0\%$, $55.0 \pm 5.9\%$, $37.1 \pm 1.7\%$ であった。

2) 染色体異常

ハンクス液中でMINO(10~300 μM)を1時間作用させ、その後23時間培養した時の染色体異常頻度を表3に示した。本条件下でMINOを作用させた場合も染色体異常の誘導は認められなかった。細胞生存率が30%前後に低下するMINOの作用条件下、すなわち、30及び100 μM 1時間作用群(図5)でも染色体異常の出現率は上昇しなかった。一方、陽性対照として用いたMNNG作用群では、染色体異常の出現率が対照群と比較して有意に上昇した。なお、MINOの1時間作用後、47時間培養後に染色体標本を作製した群でも、染色体異常頻度の上昇は認められなかった(データの掲載は省略)。また、他のTCs、すなわち、TC, CTC, DMCについても同一条件下で作用させてみたが、いずれの場合も染色体異常頻度の上昇は認められなかった(データの掲載は省略)。

表 1 テトラサイクリン系抗生物質を 24 時間作用させた時の
ヒト歯肉由来培養線維芽細胞の染色体異常頻度

化学物質	濃度 (μ M)	染色体異常の種類 (%)					染色体 異常頻度 (%)
		ギャップ	切 断	染色分体 交 換	環 状 染色体	染色体 細分化	
対 照	0	1	0	0	0	0	1.0
TC	100	3	0	0	0	0	3.0
	300	1.3	0	0	0	0	1.3 ¹⁾
	1,000	(分裂中期細胞がほとんどない)					
CTC	100	1	0	0	0	0	1.0
	300	2	0	0	0	0	2.0
	1,000	1	0	0	0	0	1.0
DMC	100	1	0	0	0	0	1.0
	300	0.7	0	0	0	0	0.7 ¹⁾
	1,000	(分裂中期細胞がほとんどない)					
MINO	100	1	0	0	0	0	2.0
	300	2	0	0	0	0	2.0
	1,000	2.3	0	0	0	0	2.3 ²⁾
MNNG	20	15	6	2	0	0	22.0**

1) 調べた分裂中期細胞数：150 2) 調べた分裂中期細胞数：175

** 対照群との有意差 ($P < 0.01$)

図 3 N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) によるヒト歯肉由来
培養線維芽細胞の染色体異常

左：対照群，右：MNNG 作用群

図4 薬物代謝酵素存在下でMINOを作用させた場合の細胞生存率

対照群のコロニー形成率は $38.7 \pm 1.9\%$ であった。シンボルマークはシャーレ5枚の平均値、バーは標準偏差を示す。

図5 Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含の塩類溶液 (ハンス液) 中でMINOを作用させた場合の細胞生存率

対照群のコロニー形成率は $35.9 \pm 1.8\%$ であった。シンボルマークはシャーレ5枚の平均値、バーは標準偏差を示す。バーのないのは、標準偏差がシンボルマーク内にあることを示す。

表2 ラット肝ミクロソーム存在下でMINOを2時間作用させた時のヒト歯肉由来培養線維芽細胞の染色体異常頻度

化学物質	濃度 (μM)	染色体異常の種類 (%)					染色体異常頻度 (%)
		ギャップ	切 断	染色分体交換	環 状染色体	染色体細分化	
対 照	0	1	0	0	0	0	1.0
MINO	100	1	0	0	0	0	1.0
	300	2	0	0	0	0	2.0
	1,000	0	0	0	0	0	0
DMSO	14,000	1	0	0	0	0	1.0
AFB ₁	3.2	24	12	0	0	0	32.0 ¹⁾ **

1) 調べた分裂中期細胞数: 50

** 対照群との有意差 ($P < 0.01$)

表 3 Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含の塩類溶液中で1時間 MINO を作用させた時の
ヒト歯肉由来培養線維芽細胞の染色体異常頻度

化学物質	濃度 (μM)	染色体異常の種類 (%)					染色体 異常頻度 (%)
		ギャップ	切 断	染色分体 交 換	環 状 染色体	染色体 細分化	
MINO	0	3	0	0	0	0	3.0
	10	3	0	0	0	0	3.0
	30	6	0	0	0	0	6.0
	100	5	0	0	0	0	5.0
	300	(分裂中期細胞がほとんどない)					
MNNG	20	30.6	5.6	0	0	0	30.6 ¹⁾ **

1) 調べた分裂中期細胞数: 36

** 対照群との有意差 ($P < 0.01$)

図 6 各染色体異常検出系における実験結果のまとめ

(-) は染色体異常誘導能が陰性であることを示す。■ は薬物作用時間を表わす。

考 察

ヒト歯肉由来の培養線維芽細胞 (HFG/MS 細胞) を用いて, TCs の染色体異常誘導能を調べた。実験は Ca^{2+} , Mg^{2+} ならびに血清等を含有した通常の培養液中で TCs を細胞に作用させた場合と薬物代謝酵素存在下で作用させた場合, さらに, Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含の塩類溶液 (ハックス液) 中で作用させた場合の 3 通りで行った。TCs の作用時間は通常の培養液中で作用させた群では 24 ならびに 48 時間とした。比較的長時間 TCs を作用させたのは, TCs により障害を受けた細胞に細胞周期の進行遅延が起こり, 細胞の分裂中期到達時間が延長することを考慮したからである。また, 薬物代謝酵素導入群では TCs の作用時間を 2 時間, ハックス液中では作用時間を 1 時間とした。薬物

代謝酵素導入群では, 肝ミクロソーム混合液そのものにやや細胞毒性があり, 3 時間以上ではそれが強くあらわれたため作用時間を 2 時間とした。同様に, ハックス液中で TCs を作用させた群でも, 2 時間以上では細胞毒性が強くあらわれたため作用時間を 1 時間とした。

薬物代謝酵素導入群やハックス液中で TCs を作用させた群では, 作用後, 染色体標本作製するまで 22~47 時間培養した。これは, 前述したことと同様, TCs 障害による細胞周期の進行遅延を考慮したため, 染色体異常検出系確立のための International working group も推奨している培養時間である。ちなみに, 彼らは作用開始からサンプリングまでの培養時間は, 細胞周期時間 (HFG/MS 細胞では 26~30 時間) の 1.5 倍前後としている¹⁷⁾。

本研究ではすべての実験操作を黄色蛍光灯下で行っ

た。TCsは光により分解しやすいこと、また、TCを細胞に作用中、白熱灯で照射すると細胞毒性が増加し、DNA傷害が誘導されるとの報告があるためである¹⁸⁻²⁰⁾。

本実験条件下では、いずれの場合もTCsによってHFG/MS細胞に染色体異常は誘導されなかった(図6)。細胞生存率と染色体異常の出現率の関係は、それぞれの被験薬物によって異なるが、一般に細胞生存率が対照群の30%前後に低下する作用条件下で染色体異常が高頻度に出現するといわれている¹⁷⁾。本研究でもこの作用条件下で染色体異常を調べてみたが、結果は陰性であった。当教室の森山²¹⁾は、ヒト胎児由来の正常2倍体細胞を用いてMINOの染色体異常誘導能を調べているが、結果は本研究と同様、陰性であった。一方、TCによって培養ヒトリンパ球¹⁰⁾やチャイニーズ・ハムスター由来のDon細胞¹¹⁾、マウス由来のFM3A細胞¹²⁾に染色体異常や遺伝子突然変異が誘導されたとの報告がある。Witteら²⁰⁾は培養ヒト2倍体細胞を使って、TCの細胞毒性とDNA傷害能を白熱灯照射下と非照射下で比較している。その結果、非照射群ではTCによってDNA単鎖切断やDNA修復のための不定期DNA合成(UDS)は誘導されなかったが、照射群では細胞毒性が増強し、かつ、DNA切断やUDSの誘導が起こったという。照射によってTCが崩壊し、その際生じるヒドロキシラジカル($\cdot$ OH)などのフリーラジカルが細胞障害やDNA傷害を誘起することを、彼らはカタラーゼ添加によって完全にこれらの現象が阻止されることと、電子スピン共鳴(ESR)スペクトルで確認している。同様に、BhattacharjeeとPal¹³⁾は、TCによってV79細胞に誘導される突然変異の出現率は、抗酸化剤でフリーラジカル捕捉剤であるビタミンCを添加すると減少することを報告している。

前述の森山の研究²¹⁾は、本研究と同様、実験操作を黄色灯下で行ったものである。Don細胞¹¹⁾やFM3A細胞¹²⁾を用いた研究も当教室で行われたものであるが、これらはいずれも白色蛍光灯下で実験を行っている。したがって、Don細胞やFM3A細胞でみられた染色体異常や突然変異は、TCそのものの作用によるものではない可能性がある。ただし、フリーラジカルの消去作用に関与するカタラーゼやペルオキシダーゼ活性が、Don細胞やFM3A細胞のような株細胞では弱いことも考えられる。これについては、今後の研究を待つ必要がある。

TCsは一般に細胞の蛋白質合成を阻害する^{12,14)}。HFG/MS細胞に対するTCsの細胞毒性は各TCsで異なり、CTC, MINO, TC, DMCの順で強くなっ

た。この違いは取り込まれたTCsの細胞内濃度に起因しているものと思われる。筒井²²⁾はヒト歯肉由来培養ケラチノサイトを使ってTCsの細胞毒性と細胞内濃度との関係を調べ、細胞内取り込み速度と細胞内滞留率が高いものほど細胞毒性が強いことを報告している。ほとんどのTCsは消化管から容易に吸収されるが、TCsを服用した場合の吸収率は、空腹時でCTCが服用量の約30%、DMCが60~80%といわれている¹⁶⁾。脂溶性の高いものほど吸収率が高い¹⁶⁾。

培養細胞にTCsを作用させた場合、培地中の2価の金属イオン濃度が細胞生存率に影響を与える。図5に示したように、 Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含のハンス液中でMINOを作用させた群では、作用時間が1時間と短いにもかかわらず、図2で示した完全培養液中で48時間作用させた場合よりはるかに細胞毒性が強くあらわれた。完全培養液中の2価の金属イオンとMINOがキレート結合し、MINOの細胞内への取り込みが減少したものと思われる。

本研究では、TCsの染色体異常誘導能をHFG/MS細胞を使って調べた。今回用いた実験条件下では、テストしたいずれのTCsとも染色体異常を誘導しなかった。しかし、TCsの崩壊に伴うフリーラジカルの生成は、光照射下のみならず、非照射下でもわずかに起こる²⁰⁾。これに伴うDNA鎖の切断は作用時間に依存して増加するといわれている²⁰⁾。したがって、長期間にわたるTCsの適用によって、光に暴露される部位の皮膚のみならず全身にDNA傷害が誘起される可能性はある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御協力下さった日本歯科大学歯学部薬理学教室員の皆様に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Duggar, B.M.: Aureomycin, a product of the continuing search for new antibiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51: 177~181, 1948.
- 2) Baker, P.J., Evans, R.T., Slots, J. and Genco, R.J.: Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. J. Dent. Res., 64: 1233~1244, 1985.
- 3) Mashimo, P.A., Yamamoto, Y., Slots, J., Evans, R.T. and Genco, R.J.: *In vitro* evaluation of antibiotics in the treatment of periodontal disease. Pharmacol. Ther. Dent., 6: 45~56, 1981.
- 4) Newman, M.G., Hulem, C., Colgate, J. and Anselmo, C.: Antibacterial susceptibility of plaque

- bacteria. J. Dent. Res., 58 : 1722~1732, 1979.
- 5) Robinson, J.V.A. and James, A.L. : *In vitro* susceptibility of *Bacteroides corrodens* and *Eikenella corrodens* to ten chemotherapeutic agents. Antimicrob. Agents Chemother., 6 : 543~546, 1974.
 - 6) 高井亮栄 : ヒト歯肉縁下歯垢由来 *Bacteroides* の薬剤感受性に関する研究. 歯科医学 49 : 325~346, 1986.
 - 7) Walker, C.B., Pappas, J.D., Tyler, K.Z., Cohen, S. and Gordon, J.M. : Antibiotic susceptibilities of periodontal bacteria : *In vitro* susceptibilities to eight antimicrobial agents. J. Periodontol., Special issue, : 67~74, 1985.
 - 8) 栗本桂二, 磯島 修, 直良有香, 他 : ミノサイクリンの局所的応用による歯周炎治療法, LS-007 による治療方法の臨床的検討. 日歯周誌, 30 : 191~205, 1988.
 - 9) 上田雅敏, 山岡 昭, 前田勝正, 青野正男, 鈴木基之, 長谷川紘司, 宮田裕之, 鴨井久一, 楠 公任, 池田克己 : 歯周炎に対する LS-007 の有効性と有用性に関する臨床的ならびに細菌学的検討. 日歯周誌 30 : 223~235, 1988.
 - 10) Westland, M.M. : Effects of tetracycline on chromosomes cultured from human lymphocyte. J. Am. Med. Wom. Assoc., 22 : 718~724, 1967.
 - 11) 大森 庸, 鈴木蓉子, 関さち子, 前田博子 : Tetracycline の催奇形作用に関する研究, 第 1 報 Tetracycline による Don 株細胞の染色体異常. 神奈川歯学 9 : 25~35, 1974.
 - 12) Tsutsui, T., Umeda, M., Sou, M. and Maizumi, H. : Effect of tetracycline on cultured mouse cells. Mutation Res., 40 : 261~268, 1976.
 - 13) Bhattacharjee, S.B. and Pal, B. : Tetracycline-induced mutation in cultured Chinese hamster cells. Mutation Res., 101 : 329~338, 1982.
 - 14) Sande, M.A. and Mandell, G.L. : Antimicrobial agents, tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents, in : Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, (edited by Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F.) 7th ed., pp. 1170~1179, Macmillan Publishing Co., New York, 1985.
 - 15) Tsutsui, T., Degen, G.H., Schiffmann, D., Wong, A., Maizumi, H., McLachlan, J.A. and Barrett, J. C. : Dependence on exogenous metabolic activation for induction of unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells by diethylstilbestrol and related compounds. Cancer Res., 44 : 184~189, 1984.
 - 16) Hansen-Melander, E., Melander, Y. and Olin, M. L. : Chromosome preparation by air-drying at low temperature and Giemsa banding. Hereditas, 76 : 35~40, 1974.
 - 17) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P. and Sofuni, T. : Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. Mutation Res., 312 : 241~261, 1994.
 - 18) Davies, A.K., McKellar, J.F., Phillips, G.O., and Reid, A.G. : Photochemical oxidation of tetracycline in aqueous solution. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2 : 369~375, 1979.
 - 19) Piette, J., Decuyper, J. and Van deVorst, A. : DNA alterations photosensitized by tetracycline and some of its derivatives. J. Invest. Dermatol., 86 : 653~658, 1986.
 - 20) Witte, I., Oetken, G., Buschfort, C. and Hartmann, A. : A comparison of the DNA-damaging, the cytotoxic and genotoxic properties of tetracycline in human fibroblasts in the presence and absence of light. Mutation Res., 315 : 33~40, 1994.
 - 21) 森山憲一 : 塩酸ミノサイクリンの培養ヒト二倍体線維芽細胞に対する作用について. 歯学, 79 : 813~828 1991.
 - 22) 筒井健機 : テトラサイクリン類のヒト歯肉由来培養ケラチノサイトへの取り込みと毒性. 日歯周誌, 35 : 68, 1993 (抄録).

連絡先 :

日本歯科大学歯学部薬理学教室

〒102 千代田区富士見 1-9-20