

原 著

小脳初代培養細胞を用いたメチル水銀誘導性細胞死モデルにおける培養条件の影響

坂 上 元 栄¹⁾ 森 直 子¹⁾ 岡 崎 舞 子¹⁾
川 上 智 史¹⁾ 池 田 真 紀¹⁾ 中 村 亮 介¹⁾
原 俊 太 郎²⁾ 坂 部 貢¹⁾

1) 北里大学薬学部公衆衛生学

2) 昭和大学薬学部衛生化学

The effect of culture conditions on the methylmercury neurotoxicity in methylmercury-induced cell death model using primary neuronal culture from cerebellum of neonatal rat

Motoharu Sakaue¹⁾ Naoko Mori¹⁾ Maiko Okazaki¹⁾
Satoshi Kawakami¹⁾ Maki Ikeda¹⁾ Ryousuke Nakamura¹⁾
Shuntaro Hara²⁾ Kou Sakabe¹⁾

1) Department of Public Health and Molecular Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University

2) Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University

要約

メチル水銀は神経細胞死を誘導する神経毒性物質として広く知られており、その作用機序を解析する「神経細胞死モデル」として、小脳初代培養神経細胞が用いられている。しかし、その培養条件については実験系によって様々である。本研究では、メチル水銀の細胞毒性の解析に有用な小脳初代培養細胞のメチル水銀感受性に及ぼす培養条件の影響を検討する目的で、無血清培地を用いた実験を行った。はじめに、メチル水銀濃度を30nMに固定し培地量を変えたところ、メチル水銀誘導性細胞死は培地量依存的に増加した。また、培地へのセレン化合物の添加は、その濃度依存的にメチル水銀誘導性細胞死を有意に抑制した。以上の結果から、*in vitro* 実験系において、メチル水銀の濃度が一定でも、その細胞毒性の強さは、培地量、細胞数および培地中のセレン化合物量により影響を受けることが示唆された。

(臨床環境14:106~111, 2005)

受付:平成17年9月22日 採用:平成17年10月21日

別刷請求宛先:坂部 貢

〒108-8641 港区白金5-9-1 北里大学薬学部公衆衛生学教室

Received: September 22, 2005 Accepted: October 21, 2005

Reprint Requests to Kou Sakabe, Department of Public Health and Molecular Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641 Japan

Abstract

For basic studies of intracellular dynamics in methylmercury-sensitivity, the present study attempted to elucidate the effect of various culture conditions on the neurotoxicity in primary culture cells from cerebellum of neonatal rat. The findings were as follows: (a) the neuronal cell death in response to 30 nM methylmercury increased depending on the amount of culture media; (b) moreover, addition of selenium inhibited the neuronal cell death in concentration dependent manner. Above results clearly suggest that a level of neurotoxicity was influenced according to various culture conditions, such as the amount of culture media, the number of cells, and/or the amount of selenium, even if concentration of methylmercury did not change.

(Jpn J Clin Ecol 14 : 106~111, 2005)

《Key words》 methylmercury, primary neuronal culture system, neurotoxicity, culture condition, selenium

I. 緒言

メチル水銀は神経毒性物質であることが広く知られている。現在でも我々は食物から低用量ではあるが日常的に摂取している。近年、低用量のメチル水銀による神経系への影響が、学際分野だけではなく、一般社会においても関心を集めている。

メチル水銀処理による神経細胞死は高用量ではネクローシス^{1,2)}、低用量ではアポトーシス^{3,4)}であるとされている。小脳初代培養神経細胞は、メチル水銀の毒性に感受性が高く、その用量依存的に細胞死を生じ、極低濃度のメチル水銀処理でもアポトーシスが誘導される^{3,5~8)}ことから、*in vitro*でのメチル水銀誘導性細胞死のよい実験モデルとして、毒性発現のメカニズム解明に用いられている^{5~10)}。しかし、優れたモデルであるにもかかわらず、培養条件についての詳細な記載がないことから、報告によって培養条件が異なることが推測される。さらに、培養時のどのような要因がメチル水銀の培養細胞のメチル水銀細胞毒性感受性に影響を与えるのかについては、ほとんど明らかになっていない。

我々はこれまでに小脳初代培養細胞を用いて低濃度メチル水銀による神経細胞死誘導機構について検討してきた^{7,8)}。そこで、本研究では、メチル水銀誘導性神経細胞死のモデルとして我々が用いている小脳初代培養系において、水銀感受性に及ぼす培養条件、特に培地量、細胞数およびセレン化合物濃度の影響を検討した。

II. 方法

1. 試薬および細胞培養

小脳初代培養系は前田らの方法¹⁾を、一部改変して調製した。培地に添加した試薬は、特に記載のないもの以外はすべてSIGMA Chemical Company (St Louis, MO) の製品を用いた。生後24時間以内のWistar系ラット (Jcl: Wistar、日本クレア) から小脳を取り出した。消化液 (1%トリプシン、0.05%DNase I 添加 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco BRL, Grand Island, NY) 内で13分間室温にて消化し、HBSSで三回洗浄後、0.05%DNase I、12mM MgSO₄ 添加HBSSを加えパストールピペットでピッペティングした。遠心後、細胞を回収し、無血清培地 (1 mg/ml 結晶化ウシ血清アルブミン、10 μg/ml ウシインスリン、0.1nM L-チロキシン (T4)、0.1mg/mg ヒトトランスフェリン、1 μg/ml アプロチニン、30nM Na₂SeO₃、0.25% グルコース、100units/mL ペニシリン (Gibco)、135 μg/ml ストレプトマイシン (Gibco) 添加 Eagle's minimal essential medium (Gibco)) で1 x 10⁷細胞/mLに調製し、24穴培養皿の各wellに30 μLの細胞けん濁液を、液滴を形成するように播種し、CO₂インキュベータ内 (5%CO₂) で一時間培養した。さらに各wellに600 μLになるように培地を加え二日間の前培養を行った。細胞生存率の算定は、クリスタルバイオレット法^{3,7,8)}を用いた。

2. TUNEL 法

細胞死がアポトーシスであることを確認するた

め TUNEL 法を使用した。メチル水銀処理48時間後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定、洗浄後、*In situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用し、添付されていた説明書通りに処理した。TUNEL 陽性細胞数の増減について統計処理を行うため、細胞数を測定した。各 well あたり無作為に抽出した三視野について写真撮影を行い、全細胞数および TUNEL 陽性細胞数を用手法にて、一写真あたり少なくとも700個を測定し、全細胞数に対する TUNEL 陽性細胞数の割合を算出した。これを独立した三回の実験を行い、平均値±標準偏差で表示し、統計処理を行った。

3. メチル水銀処理と条件検討

メチル水銀処理は二日間の前培養後に行った。培地量の影響を検討するためメチル水銀を処理する直前に培地量を調製した。細胞数の影響については、細胞播種時に細胞けん濁液を希釈し細胞数を調製した。セレン化合物の影響を検討するため、メチル水銀処理30分前にセレン酸ナトリウムまたは亜セレン酸ナトリウムを添加した。

4. 統計解析

一元配置分散分析後、Dunnet 法または Bonferroni/Dunn 法を用いて有意差を検討した。各データは、平均値±標準偏差で示した。

III. 結果

1. メチル水銀による細胞死

小脳初代培養細胞において、メチル水銀処理48時間後に30nM 以上を処理した場合に顕著な細胞生存率の減少がみられた (図1)。そこで、その細胞死がアポトーシスであることを確認するため TUNEL 法による検討を行った (図2)。TUNEL 陽性細胞が、メチル水銀処理48および72時間後の両方において用量依存的に有意な増加を示した (図2D および E)。

2. 培地量および細胞数の影響

メチル水銀誘導性細胞死への培地量および細胞数の影響について検討した (図3)。メチル水銀非処理では、培地量のみを変化させてもその生存率に差はなかったが、メチル水銀処理では、培地

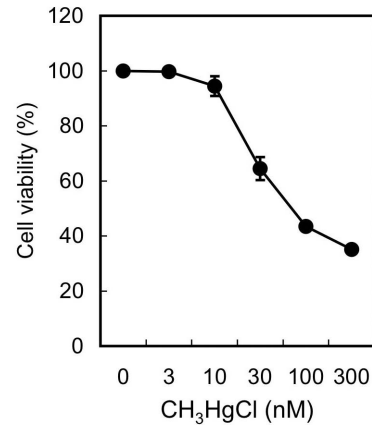


図1 小脳初代培養神経細胞におけるメチル水銀の用量依存的な細胞死

二日間の前培養後、終濃度が0から300nM になるようにメチル水銀を添加し48時間培養した。生存率はクリスタルバイオレット法にて測定した。0 nM 処理群の生存率を100%として平均値±標準偏差 (n=4) を示す。

量が300、600、900 μ L と増加するにつれ、細胞生存率がそれぞれ 80.37 ± 2.59 、 60.07 ± 3.15 、 $55.58 \pm 4.31\%$ と減少した (図3A)。さらに1穴あたりの細胞数が減少するに従って、希釈倍率1/1、1/2、1/4 に対して、細胞生存率は、それぞれ 89.44 ± 0.22 、 80.13 ± 0.49 、 $63.38 \pm 4.29\%$ と有意に減少した (図3B)。いずれの希釈倍率においても、それぞれの無処置群と比較してメチル水銀処置群は有意に細胞生存率が減少した。

3. セレン化合物の影響

セレンはメチル水銀の影響を緩和することが知られている。そこで、セレン化合物の中でもよく使用されている亜セレン酸およびセレン酸の培地中濃度のメチル水銀誘導性神経細胞死への影響について検討した (図4)。亜セレン酸およびセレン酸のどちらも30nM から用量依存的にメチル水銀による細胞死誘導を抑制した。しかし、100nM および300nM 処理群ではセレン酸処理群に比べ亜セレン酸処理群が有意な細胞死抑制を示した。亜セレン酸処理群では300nM 処理、セレン酸処理群では1000nM 処理によって完全な細胞死抑制がみられた。

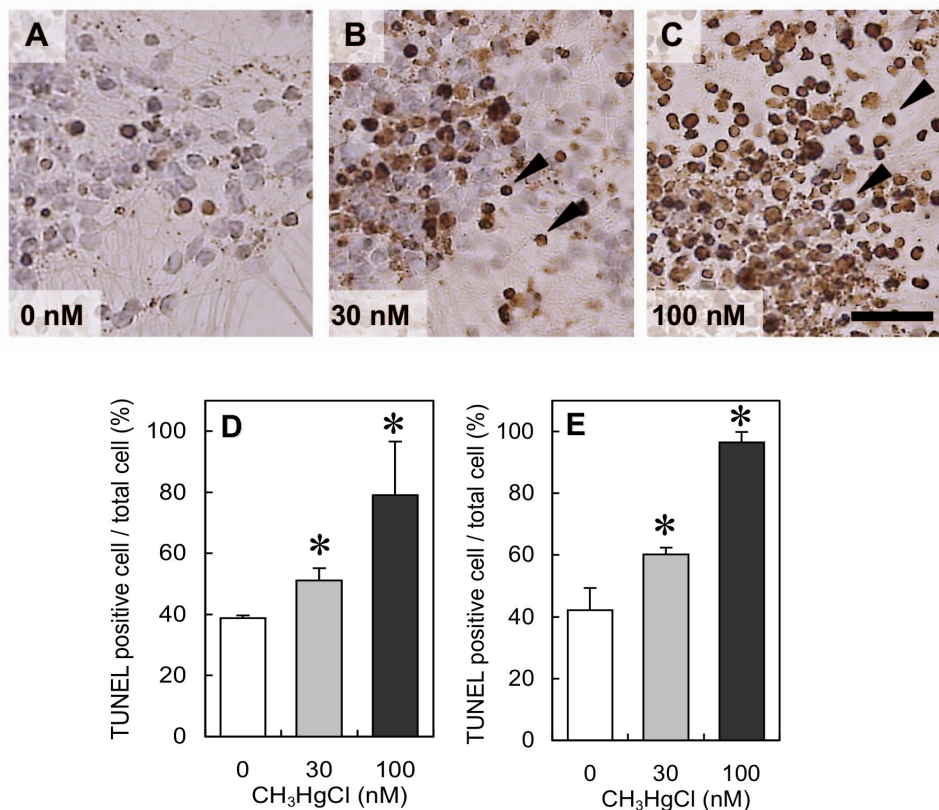


図2 小脳初代培養神経細胞へのメチル水銀処理後のTUNEL陽性細胞

二日間の前培養後、(A) 0nM、(B) 30nM、(C) 100nMになるようにメチル水銀を処理し48時間後にTUNEL法による検討を行った。陰性細胞も検出するため対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。矢頭は典型的な陽性反応細胞を示す。メチル水銀を添加 (D) 48時間後および (E) 72時間後の全細胞数に対するTUNEL陽性細胞数を割合で示した。データは平均値±標準偏差 (n=3)を示す。データは分散分析後、Dunnett法にて有意差検定を行った。*は0nM処理群に対する有意差を示す (p<0.01)。スケールバーは、40μmを示す。

IV. 考察

低濃度メチル水銀処理によって細胞死が誘導され、その細胞死は、TUNEL法によりアポトーシスであること^{3, 7, 8}が確認された(図1)。この低濃度メチル水銀誘導性神経細胞死への条件として、本研究では、培養時の培地量および細胞数、そしてセレン化合物濃度について着目し、検討を行った。

実験は、すべてメチル水銀30nMで処理をしたにもかかわらず、培地量が増加するにつれ、細胞生存率は減少した。さらに、播種した細胞数が減少するに従って、メチル水銀処理群の細胞生存率は減少した。すなわち、これらは、細胞あたりの培地量が多いほど細胞生存率が減少することを示唆するものである。メチル水銀はSH基に強い親

和性を持つことから、タンパク質中のシステイン残基に結合する¹²。システインと結合し、アミノ酸トランスポーターによって脳血液関門も通過することが知られている¹³。本研究において、メチル水銀の濃度は同じであっても培地量が増加するとメチル水銀の絶対量は増加する。細胞のタンパク質中のSH基に結合、または、細胞のアミノ酸トランスポーターによって細胞内に取り込まれることによって、細胞あたりのメチル水銀量が増加し、細胞死の増加が生じた可能性が考えられる。

セレン化合物は、メチル水銀の毒性を軽減することが広く知られている^{14, 15}。そのセレンの効果も、本研究において、小脳初代培養神経細胞におけるメチル水銀誘導性細胞死へのセレン化合物濃

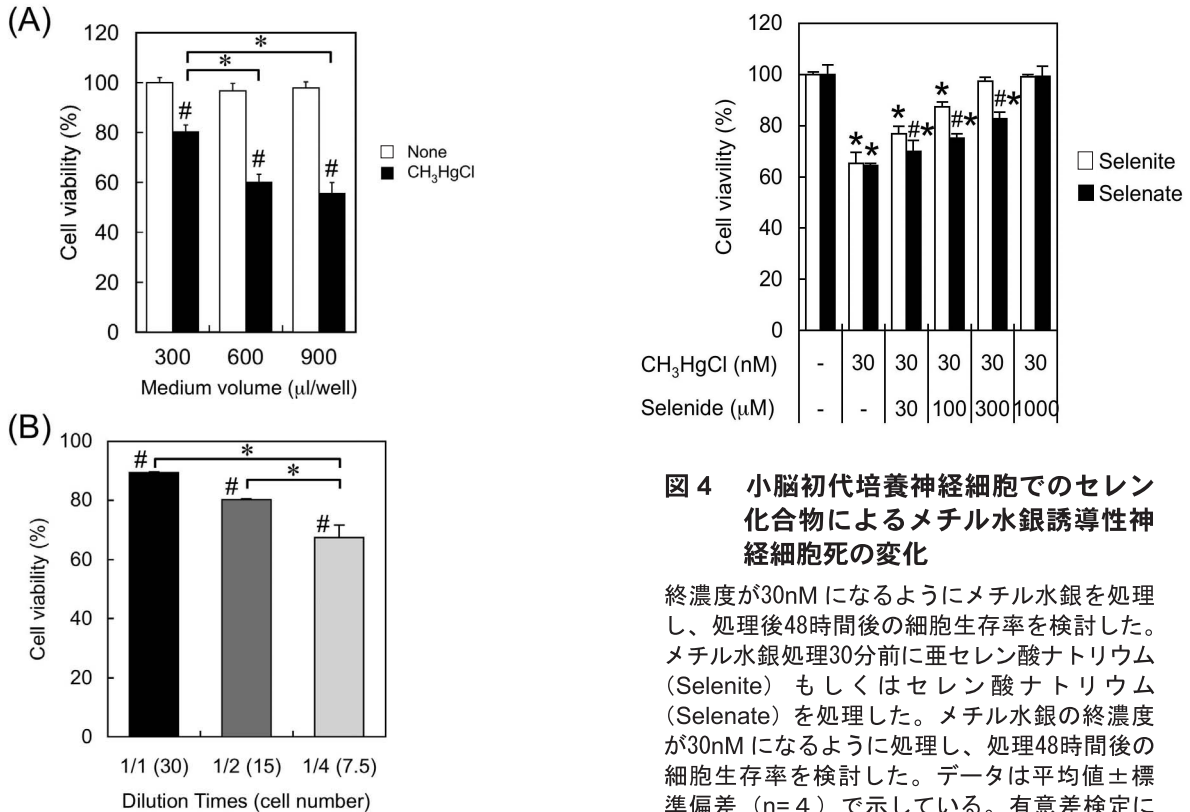


図3 小脳初代培養神経細胞での培地および細胞数によるメチル水銀誘導性神経細胞死の変化

メチル水銀の終濃度が30nMになるように処理し、処理48時間後の細胞生存率を検討した。メチル水銀処理前に (A) 細胞数を一定にし、培地量を変え、もしくは (B) 培地量を一定にして細胞数を変えた。横軸は (A) 1穴あたりの培地量、(B) 細胞けん濁液の希釈倍率と括弧中には実際の細胞数 ($\times 10^4$)、データは平均値±標準偏差 (Aはn=4、Bはn=3)を示す。有意差検定には、一元配置分散分析後、Bonferroni/Dunn法を用いた。*は希釈処理群間における有意差を示す ($p < 0.05$)。#はそれぞれの希釈処理群における対照群に対する有意差を示す ($p < 0.05$)。

度依存的な抑制作用として確認した。セレンは必須微量元素であり、培地への添加が必要である。小脳初代神経細胞培養系においては、無血清培地を用いた報告^{7,8)}やウシ胎仔血清を添加した培養系が用いられている^{3,5,6)}。ウシ血清中のセレン量は個体によって変化する¹⁶⁾ことから、ウシ胎仔血清も変化することが予想される。すなわち、血清を使用した培養系の場合、血清のLotによっ

図4 小脳初代培養神経細胞でのセレン化合物によるメチル水銀誘導性神経細胞死の変化

終濃度が30nMになるようにメチル水銀を処理し、処理後48時間後の細胞生存率を検討した。メチル水銀処理30分前に亜セレン酸ナトリウム (Selenite) もしくはセレン酸ナトリウム (Selenate) を処理した。メチル水銀の終濃度が30nMになるように処理し、処理48時間後の細胞生存率を検討した。データは平均値±標準偏差 (n=4) で示している。有意差検定には、一元配置分散分析後、Bonferroni/Dunn法を用いた。*は対照群との有意差を示す ($p < 0.05$)。#は同じ濃度における Selenite 処理群と Selenate 処理群間の有意差を示す ($p < 0.05$)。

て培地中のセレン含有量が異なる可能性が高い。したがって、本研究の結果と併せて考慮すると、血清を用いた培養細胞においてメチル水銀の影響を検討した場合、メチル水銀の感受性が変化する可能性がある。また、亜セレン酸は低濃度でもメチル水銀毒性を軽減した。セレン酸もメチル水銀の細胞毒性に対して濃度依存的に抑制したが、1 μM 処理において亜セレン酸と同じく、メチル水銀の細胞毒性に対して完全な抑制を示した。この亜セレン酸とセレン酸の抑制効果の差が生じる理由は、本研究結果からは不明である。この点に関してはさらなる検討が必要である。

本研究の結果から、*in vitro* 実験系において、メチル水銀の濃度が一定であっても、培地量、細胞数および培地中のセレン化合物量によって、メチル水銀による細胞毒性が変化することが示唆された。メチル水銀処理による神経細胞死は高用量

ではネクローシス^{1,2)}、低用量ではアポトーシス^{3,4)}が生じるとされている。メチル水銀が低用量の場合でも、培地量・細胞数・セレン化合物によって、生じた細胞死の形態がアポトーシスとネクローシスとが入れ替わる可能性も否定できないことを考慮すると、*in vitro* 実験系を用いる場合は、これらの要因の詳細な検討が必要となると思われる。

文献

- 1) Nakada S, Imura N: Susceptibility of lipids to mercurials. *J Appl Toxicol* 3: 131-135, 1983
- 2) Miura K, Imura N: Mechanism of methylmercury cytotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 18: 161-188, 1987
- 3) Kunimoto M: Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Com* 204: 310-317, 1994
- 4) Nagashima K, Fujii Y, et al: Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. *Acta Neuropathol* 91: 72-77, 1996
- 5) Dare E, Gotz M E, et al: Antioxidants J811 and 17 β -estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J Neurosci Res* 62: 557-565, 2000
- 6) Castoldi AF, Barni S, et al: Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J Neurosci Res* 59: 775-787, 2000
- 7) Sakaue M, Takanaga H, et al: Selective disappearance of an axonal protein, 440-kDa ankyrin_B, associated with neuronal degeneration induced by methylmercury. *J Neurosci Res* 73: 831-839, 2003
- 8) Sakaue M, Okazaki M, et al: Very low levels of methylmercury induce cell death of cultured rat cerebellar neurons via calpain activation. *Toxicology* 213: 97-106, 2005
- 9) Sarafian TA: Methyl mercury increases intracellular Ca²⁺ and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 61: 648-657, 1993
- 10) Limke TL, Otero-Montanez J, et al: Evidence for interactions between intracellular calcium stores during methylmercury-induced intracellular calcium dysregulation in rat cerebellar granule neurons. *J Pharm Exp Ther* 304: 949-958, 2003
- 11) 御子柴克彦、畠中弘：小脳神経細胞の培養。前田信明、御子柴克彦（編）：実験医学別冊神経生化学マニュアル、羊土社、1990、pp136-142
- 12) Ballatori N, Clarkson TW: Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. *Science* 216: 61-63, 1982
- 13) Aschner M, Aschner JL: Mercury neurotoxicity: Mechanisms of blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 169-176, 1990
- 14) Ganther HE, Goudie ML, et al: Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science* 175: 1122-1124, 1972
- 15) Kasuya M: Effect of selenium on the toxicity of methylmercury on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 35: 11-20, 1976
- 16) 樋口 徹、八嶋 藤男、他：平取町、日高町の黒毛羽種牛における血清、飼料中のセレンウムとトコフェロール値について。北獣会誌 33：238-240、1989